

**Konformationsstudien an  
Peptaibiotika und zyklischen Peptiden**

**Dissertation**

**Thomas Huber**



# **Konformationsstudien an Peptaibiotika und zyklischen Peptiden**

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vorgelegte

**Dissertation**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(*Doctor rerum naturalium*)

von

**Thomas Huber**

Bielefeld, Januar 2007

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald  
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Heberle  
Eingereicht: 5. Februar 2007  
Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2007



für meine Eltern





```
LOAD"DISS",8,1
SEARCHING DISS
READY.
POKE 808,227
RUN
```



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität Bielefeld an der Fakultät für Chemie im Arbeitskreis für organische und bioorganische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. Norbert Sewald angefertigt. Meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald danke ich insbesondere für die hervorragende Betreuung, die Möglichkeit des freien wissenschaftlichen Arbeitens, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Joachim Heberle danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eckhart W. Guthöhrlein für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich ihm für das Korrekturlesen aller während der Promotion erstellten Schriftstücke, die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Setzproblemen mit dem Makropaket  $\LaTeX$  durch das Erstellen funktionsfähiger  $\TeX$ -*hacks* und die fachspezifischen und fachfremden Diskussionen. Die besondere Lebensweise dieses Hamburger Jung von der Waterkant hat entscheidend zum guten Arbeitsklima in unserem Büro beigetragen.

Für die Messzeit am DMX900 NMR-Spektrometer bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Horst Kessler vom Lehrstuhl für organische Chemie der technischen Universität München. Bei Dr. Burkhard Luy und Dr. Christoph Freudenberger möchte ich mich für die Anleitung zur Messung der dipolaren Restkopplungen, die damit verbundene Probenvorbereitung und die Gastfreundschaft während meines Forschungsaufenthalts bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Zsuzsanna Majer und Dr. Elemér Vass an der Eötvös Loránd Universität in Budapest für die Aufnahme der FT/IR- und VCD-Spektren sowie für die

Hilfe bei deren Interpretation. Darüber hinaus möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und Gastfreundschaft während des Forschungsaufenthalts in Budapest bedanken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Philippe Hünenberger an der ETH in Zürich möchte ich für den lehrreichen Forschungsaufenthalt danken. Insbesondere möchte ich Vincent Kräutler für die Starthilfe bei der Durchführung von MD-Simulationen mit GROMOS danken.

Herrn Peter Mester und Herrn Dr. Andreas Mix danke ich für die Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen am NMR-Spektrometer.

All den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Sewald möchte ich für ihre Kollegialität und freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Sven Weigelt danke ich für die Synthese von Efrapeptin C und Dr. Miroslav Malešević, Marco Wißbrock sowie Anke Nieß danke ich für die Synthese der Peptide c-(AVPFG), c-(AV<sup>βh</sup>PFG), c-(LAVPFG) und c-(LAV<sup>βh</sup>PFG).

Sara McFarland danke ich für die im Rahmen eines Praktikums geleisteten Beiträge zur Konformationsanalyse von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG).

Meinem Freund Meik Nienaber möchte ich für die Hilfe bei Soft- und Hardwareproblemen, die Freundschaft und die Begleitung durchs Studium danken.

Mein besonderer Dank gilt Sylwia Urman, die mir in jeder Phase meiner Arbeit Verständnis, Geduld und Liebe entgegengebracht hat und immer aufmunternde Worte fand.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern danken, die durch ihre Geduld und Unterstützung mein Studium erst ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
2.1	Peptide . . . . .	3
2.1.1	Peptidbindung . . . . .	4
2.1.2	3D-Struktur der Proteine . . . . .	6
2.2	Zirkulardichroismus . . . . .	10
2.2.1	CD-Spektroskopie von Peptiden . . . . .	12
2.3	Kernmagnetische Resonanz . . . . .	14
2.3.1	Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie . . . . .	15
2.3.2	Das Impulsverfahren . . . . .	18
2.3.3	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	21
2.3.4	Spezielle NMR-Techniken . . . . .	23
2.4	Konformationsrelevante NMR-Parameter . . . . .	25
2.4.1	Chemische Verschiebung . . . . .	25
2.4.2	Temperaturgradient und Austausch der Amidprotonen . . . . .	26
2.4.3	Skalare Kopplung . . . . .	27
2.4.4	Kern-Overhauser-Effekt . . . . .	28
2.4.5	Dipolare Restkopplung . . . . .	32
2.5	Methoden der Konformationsanalyse . . . . .	38
2.6	<i>Molecular modelling</i> . . . . .	39
2.6.1	Wirkstoffdesign . . . . .	39
2.6.2	Molekülmechanik . . . . .	41

2.6.3	Energieminimierung . . . . .	45
2.6.4	Moleküldynamik . . . . .	46
2.6.5	Reduktion des Rechenaufwands im <i>molecular modelling</i> . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Konformationsanalyse von Efrapeptin C</b>	<b>53</b>
3.1	Nichtproteinogene Aminosäuren . . . . .	53
3.1.1	β-Aminosäuren . . . . .	54
3.1.2	C <sup>α</sup> -tetrasubstituierte Aminosäuren . . . . .	56
3.2	Peptidantibiotika . . . . .	57
3.2.1	Efrapeptine . . . . .	58
3.3	Ergebnisse . . . . .	60
3.3.1	CD-, IR- und VCD-spektroskopische Voruntersuchungen . . . . .	60
3.3.2	Konformationsanalyse von Efrapeptin C <b>1</b> in DMSO . . . . .	63
3.3.3	Konformationsanalyse von Efrapeptin C <b>1</b> mit RDC-Daten in DCM . . . . .	68
3.4	Experimenteller Teil . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Sequenzanalyse der Neo-Efrapeptine A und F</b>	<b>89</b>
4.1	Primärstrukturanalyse von Polypeptiden und Proteinen . . . . .	89
4.1.1	Chemische Methoden . . . . .	90
4.1.2	Spektrometrische und spektroskopische Methoden . . . . .	92
4.2	Neo-Efrapeptine . . . . .	95
4.3	Zielsetzung . . . . .	97
4.4	Sequenzanalyse von Neo-Efrapeptin A <b>2</b> . . . . .	98
4.5	Sequenzanalyse von Neo-Efrapeptin F <b>3</b> . . . . .	101
4.6	Experimenteller Teil . . . . .	104
<b>5</b>	<b>Vergleich verschiedener Algorithmen zur Generierung von Startstrukturen</b>	<b>111</b>
5.1	Algorithmen zur Generierung von Startstrukturen . . . . .	112
5.1.1	Systematische Suche . . . . .	112
5.1.2	Distanzgeometrie . . . . .	113
5.1.3	Zufallsbasierte Suchmethoden . . . . .	114
5.1.4	<i>Simulated annealing</i> . . . . .	115
5.1.5	MD-Simulationen . . . . .	116
5.2	Funktion und Struktur der RGD-Peptide . . . . .	117

5.3	Zielsetzung . . . . .	122
5.4	Ergebnisse . . . . .	123
5.4.1	Systematische Durchsuchung des Konformationsraums . . . . .	125
5.4.2	Distanzgeometrie als Strukturgenerator . . . . .	145
5.4.3	Erzeugung der Startstrukturen durch <i>Simulated annealing</i> . . . . .	162
5.4.4	Startstrukturen durch LE- oder 4D-MD-Simulationen . . . . .	182
5.5	Zusammenfassung . . . . .	198
5.6	Experimenteller Teil . . . . .	201
5.6.1	Systematische Durchsuchung des Konformationsraums . . . . .	201
5.6.2	DG und SA . . . . .	202
5.6.3	MD . . . . .	203
5.6.4	Analyse . . . . .	206
<b>6</b>	<b>Calciumabhängige Konformationsänderungen zyklischer, unpolarer Peptide</b>	<b>209</b>
6.1	Zielsetzung . . . . .	212
6.2	Ergebnisse . . . . .	214
6.2.1	CD-, IR- und VCD-spektroskopische Untersuchungen . . . . .	214
6.2.2	Konformationsänderungen von c-(AV <sup>βh</sup> PFG) <b>9</b> durch Calcium . . .	220
6.2.3	Konformationsänderungen von c-(LAV <sup>βh</sup> PFG) <b>10</b> durch Calcium . .	230
6.2.4	Konformationsänderungen von c-(AVPFG) <b>11</b> durch Calcium . . .	239
6.2.5	Konformationsänderungen von c-(LAVPFG) <b>12</b> durch Calcium . . .	248
6.3	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	253
6.4	Experimenteller Teil . . . . .	255
6.4.1	c-(AV <sup>βh</sup> PFG) <b>9</b> . . . . .	265
6.4.2	c-(LAV <sup>βh</sup> PFG) <b>10</b> . . . . .	273
6.4.3	c-(AVPFG) <b>11</b> . . . . .	279
6.4.4	c-(LAVPFG) <b>12</b> . . . . .	283
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>285</b>
<b>A</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>295</b>
A.1	proteinogene Aminosäuren . . . . .	295
A.2	sonstige relevante Aminosäuren . . . . .	297

<b>B</b>	<b>Sekundärstrukturelemente</b>	<b>299</b>
B.1	$\beta$ -Faltblattstrukturen . . . . .	299
B.2	Helikale Strukturen . . . . .	300
B.3	Schleifen . . . . .	301
B.3.1	$\alpha$ -Schleifen . . . . .	301
B.3.2	$\beta$ -Schleifen . . . . .	302
B.3.3	$\gamma$ -Schleifen . . . . .	304
<b>C</b>	<b>Zusätzliche Analysedaten</b>	<b>305</b>
C.1	Konformere von c-(RGDfV) <b>4</b> und c-(RGDfVG) <b>5</b> . . . . .	305
C.2	Konformere von c-(RGDf $\beta$ A) <b>6</b> , c-(RGDf $\beta$ L) <b>7</b> und c-(RGDfV $\beta$ A) <b>8</b> . . . . .	306
C.3	Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDfV) <b>4</b> . . . . .	307
C.4	Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDfVG) <b>5</b> . . . . .	309
C.5	Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDf $\beta$ A) <b>6</b> . . . . .	312
C.6	Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDf $\beta$ L) <b>7</b> . . . . .	315
C.7	Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDfV $\beta$ A) <b>8</b> . . . . .	317
<b>D</b>	<b>Programme</b>	<b>321</b>



# Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
CADD	computergestütztes Wirkstoffdesign ( <i>computer aided drug design</i> )
CAM	Zelladhäsionsmolekül ( <i>cell adhesion molecule</i> )
CD	Zirkulardichroismus ( <i>circular dichroism</i> )
COSY	Korrelationspektroskopie ( <i>correlated spectroscopy</i> )
CSA	chemische Verschiebungsanisotropie ( <i>chemical shift anisotropy</i> )
CW	<i>continuous wave</i>
d	Dublett
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarisation transfer (spectrum editing)</i>
DFT	Dichtefunktionaltheorie ( <i>density functional theory</i> )
DG	Distanzgeometrie
DIPSI	<i>decoupling in the presence of scalar interactions</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DQF	<i>double quantum filter</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EM	Energieminimierung

ESI	Elektronensprayionisierung
FID	<i>free induction decay</i>
FMD	<i>unrestrained</i> Moleküldynamik
FT	Fouriertransformation
GC	Gaschromatographie
GROMOS	<i>Groningen molecular simulation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital ( <i>highest occupied molecular orbital</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IR	infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LE	<i>local elevation</i>
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital ( <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> )
m	Multipllett
MALDI	matrixunterstützte Laser-Desorptionsionisierung ( <i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i> )
MD	Moleküldynamik
MLEV	Malcolm Levitts Breitband Entkopplungszyklus
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmbar
NMR	magnetische Kernresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOE	Kern-Overhauser-Effekt ( <i>nuclear Overhauser effect</i> )
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt Spektroskopie ( <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> )
NS	Anzahl der Scans ( <i>number of scans</i> )
ntRMD	zeitunabhängige <i>restrained</i> Moleküldynamik

O1P	Einstrahlfrequenz
PDB	Proteindatenbank ( <i>protein data bank</i> )
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFT	Puls-Fourier-Transformation
Ψ	pseudo
q	Quartett
RDC	dipolare Restkopplung ( <i>residual dipolar coupling</i> )
RMD	<i>restrained</i> Moleküldynamik
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROE	<i>rotating-frame Overhauser effect</i>
ROESY	<i>rotating-frame Overhauser effect spectroscopy</i>
s	Singulett
SA	<i>simulated annealing</i>
S/N	Signal zu Rauschen ( <i>signal-to-noise</i> )
SS	systematische Suche ( <i>systematic search</i> )
SW	<i>sweep width</i>
t	Triplet
TD	<i>time domain</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	Flugzeit ( <i>time of flight</i> )
TROSY	<i>transverse relaxation optimised spectroscopy</i>
URL	einheitlicher Ortsangeber für Ressourcen ( <i>uniform resource locator</i> )
UV	ultraviolett
VCD	schwingungszirkularer Dichroismus ( <i>vibrational circular dichroism</i> )



# 1

## Einleitung

Molekulare Erkennung beruht auf der Molekülstruktur und ist von elementarer Bedeutung für die spezifische Interaktion von Molekülen im lebenden Organismus. Ein Verständnis dieser biochemischen Reaktionen ist Ansatzpunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Prävention und Therapie von Fehlfunktionen.

Ein Großteil biochemischer Erkennungsprozesse erfolgt durch Proteine, welche eine hohe Spezifität gegenüber Liganden aufweisen. Emil Fischer postulierte bereits 1894 die Schlüssel-Schloss-Theorie, in der Rezeptor und Ligand oder Enzym und Substrat einander komplementäre räumliche Strukturen für die molekulare Erkennung besitzen müssen. Zu Beginn wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf Grundlage der Konstitution und Konfiguration aufgestellt, doch stellte sich bald heraus, dass auch die Konformation von entscheidender Relevanz ist. Die Schlüssel-Schloss-Theorie wurde alsbald durch das Konzept des *induced fit* erweitert, welches konformationelle Änderungen während der Bindung sowohl im Protein als auch im Liganden berücksichtigt. Hiernach ist die Konformation des Liganden in Lösung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht identisch mit derjenigen im Komplex, jedoch ist die biologische Aktivität eines Liganden bei einer entropiegetriebenen Bindung umso größer, je größer die Ähnlichkeit seiner Lösungs- und Komplexstruktur ist.

Zur Aufklärung der Molekülstruktur auf atomarer Ebene existieren derzeit zwei bevorzugte Methoden: die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie. Die Röntgenkristallographie ist auf den kristallinen Zustand beschränkt und liefert ein statisches Strukturbild mit hohen Auflösungen, im besten Fall auch für größere Moleküle unter 200 pm. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist die Strukturanalyse in Lösung mit in der Regel geringeren Auflösungen möglich. Sie ermöglicht zusätzlich Einblicke in die Dynamik des Moleküls durch Kombination mit rechnergestützten Modellierungsmethoden. Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden NMR-Techniken wie z. B. TROSY und RDC-Analysen entwickelt, mit denen das zugängliche Molekulargewicht deutlich erhöht werden konnte. Ein weiterer relevanter Aspekt dieser neuen Methoden ist die verbesserte Auflösung der berechneten Strukturen.

Die methodische Basis dieser Arbeit ist die Konformationsanalyse von Peptiden mit NMR-Spektroskopie und molekularmechanischen Rechnungen. Das Efraeptin C stellte mit der hohen Anzahl nichtproteinogener Aminosäuren wie Pip und Aib hohe Ansprüche an das Konformationsstudium, so dass hier dipolare Restkopplungen in unpolarem Ausrichtungsmedium gemessen wurden und als Randbedingungen in die molekularmechanischen Rechnungen einfließen. Die daraus resultierende Konformationsanalyse von Efraeptin C ist in Kapitel 3 detailliert beschrieben. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse einer Kooperation mit Syngenta Crop Protection Research beschrieben, welche die Aufklärung der Sequenzen neuartiger Efraeptinanaloga, der Neo-Efraeptine A und F, mittels MS- und NMR-Spektroskopie zum Ziel hatte. In Kapitel 5 werden verschiedene Methoden zur Generierung von Startstrukturen für die Konformationsanalyse miteinander verglichen. Für diesen Teilbereich wurden unterschiedliche zyklische RGD-Peptide mit bereits bekannter Konformation gewählt. Zur Generierung der Startstrukturen diente die systematische Durchsuchung des Konformationsraums, die Distanzgeometrierechnung, das *simulated annealing* und Variationen der MD-Simulation. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend bei der Strukturbestimmung von zyklischen Penta- und Hexapeptiden (Kapitel 6) angewandt und ebenfalls bei der Konformationsanalyse von Efraeptin C berücksichtigt. Im Rahmen der in Kapitel 6 beschriebenen Konformationsstudien zyklischer Peptide wird auch der Einfluss der Calciumionenkonzentration auf die Konformation systematisch untersucht. Darüber hinaus werden diese Ergebnisse mit FT/IR- und CD-Spektren verglichen. Das Kapitel 7 fasst die vorliegende Arbeit abschließend zusammen.

# 2

## Allgemeiner Teil

### 2.1 Peptide

Peptide sind Polymere, die durch Kondensation einzelner Aminosäuren entstehen. Verbunden werden die Monomere durch eine Peptidbindung (Amidbindung) zwischen der Carboxylgruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe der folgenden Aminosäure. Die natürlichen DNS-kodierten Peptide setzen sich üblicherweise aus den proteinogenen Aminosäuren zusammen, deren Ein- bzw. Dreibuchstabencode und Struktur in Anhang A.1 dargestellt sind.<sup>[1]</sup> Es handelt sich um chirale C<sup>α</sup>-substituierte L-Aminosäuren, mit Ausnahme des Glycins, das aufgrund der fehlenden Seitenkette achiral ist. Kürzlich wurden der Gruppe der allgemein bekannten 20 DNS-kodierten Aminosäuren Selenocystein und Pyrrolysin hinzugefügt.<sup>[2-7]</sup>

In Proteinen und Polypeptiden werden neben den nunmehr 22 im genetischen Code enthaltenen Aminosäuren auch verschiedene nicht DNS-kodierte Aminosäuren gefunden. Eine Auswahl an nichtproteinogenen Aminosäuren, die für diese Arbeit relevant sind,

kann im Anhang A.2 gefunden werden. Bisher sind über 250 nichtproteinogene Aminosäuren bekannt, die in Organismen vorkommen.

Die Peptide werden in biologischen Systemen ribosomal oder nichtribosomal synthetisiert und können anschließend posttranslational modifiziert werden.<sup>[8]</sup> Zu den kovalenten posttranslationalen Modifikationen gehören eine Vielzahl unterschiedlicher enzymatischer Reaktionen, die bevorzugt im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat stattfinden.<sup>[9]</sup> Daneben katalysieren Enzyme die Bildung von Disulfidbrücken, die Glykosylierung und die Iodierung. Die nichtribosomale Peptidbiosynthese von Mikroorganismen besitzt keine DNS-kodierte Sequenz und findet an Multienzymkomplexen basierend auf einer Vorlage statt. Diese Peptidsynthetasen besitzen eine einzigartige Anordnung der funktionellen Domänen zur Katalyse der sukzessiven Peptidkondensation aus den Substraten.<sup>[10-12]</sup> Auf diese Weise werden beispielsweise antibiotisch wirksame und membranaktive Peptide für den Ionentransport synthetisiert.<sup>[13]</sup>

Neben der großen Vielzahl an linearen Peptiden, deren Sequenz per Konvention vom N- zum C-Terminus angegeben wird, existieren noch zyklische Peptide. Sie variieren in ihrer Sequenz als auch in ihrer Ringgröße und werden z. B. durch eine Peptidbindung zwischen der C-terminalen und der N-terminalen Aminosäure oder Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten gebildet.

Die Funktion eines Proteins oder Peptids, die von zentraler Bedeutung in allen biologischen Prozessen in lebenden Organismen ist, kann nur anhand der Struktur verstanden werden, die von äußeren Parametern wie Temperatur, Lösungsmittelzusammensetzung, pH-Wert etc. abhängig ist. Die Analyse der dreidimensionalen Struktur ist deshalb von herausragender und grundlegender Bedeutung für Naturwissenschaftler, die sich mit Peptiden oder Proteinen beschäftigen.

### 2.1.1 Peptidbindung

Die Konformation der Polypeptide und Proteine wird durch zahlreiche innere und äußere Parameter beeinflusst. Zu den inneren Parametern zählen z. B. Atomabstände, Bindungswinkel, Rotationswinkel, sterische Hinderung und intramolekulare Wechselwirkungen.



Unter den äußeren Parametern versteht man die intermolekularen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, anderen Molekülen oder Ionen.

Die Röntgenstrukturanalyse ermöglichte die genaue Bestimmung der Peptidkonformation. Nach zahlreichen Versuchen der Proteinstrukturaufklärung gelang Pauling und Corey 1951 der Durchbruch bei der Aufstellung von Modellen für die wichtigsten Proteinkonformationen.<sup>[14-16]</sup>

Pauling und Mitarbeiter gingen von einer linearen Verknüpfung der Aminosäuren aus und untersuchten einfache lineare Peptide mit der Röntgenstrukturanalyse. Sie berechneten aus dem Streumuster einen um 15 pm verkürzten C-N-Abstand. Der N-C $\alpha$ -Abstand betrug hingegen wie üblich 0.147 nm. Sie folgerten daraus einen aus der Resonanzstabilisierung resultierenden partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung. Die von ihnen berechneten Atomabstände und Bindungswinkel sind in Abbildung 1 dargestellt.

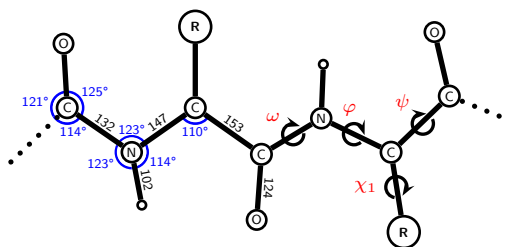


Abbildung 1: Darstellung eines Polypeptidstranges mit allen relevanten Bindungswinkel und -längen in pm, sowie der *backbone*-Torsionswinkel.<sup>[14]</sup>

Die Rotation um die C-N-Bindung ist stark eingeschränkt und hat eine Energiebarriere von  $105 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Es existieren folglich die *trans*- und die *cis*-Konfiguration, von denen die *cis*-Konfiguration um  $8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  energetisch ungünstiger ist. Bei Prolin ist die Energie der *trans*-Konfiguration erhöht, so dass die Energiedifferenz bei Xaa-Pro-Peptidbindung geringer ist. Der Anteil an *cis*-Peptidbindungen ist hier wesentlich höher. Dieses ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

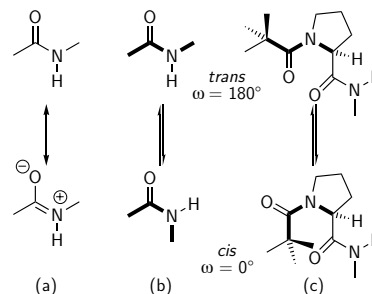


Abbildung 2: Resonanzstabilisierung (a) und *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidbindung (b) und Xaa-Pro-Peptidbindung (c).<sup>[8]</sup>

Aufgrund der eingeschränkten Rotation um die C-N-Bindung kann ein Polypeptidstrang als eine Aneinanderkettung von planaren Peptideinheiten beschrieben werden, die an C $\alpha$  miteinander verknüpft werden und feste Bindungsabstände und -winkel besitzen. Die Planarität der C-N-Bindung kann durch

Deformationen in zyklischen Peptiden oder kristallinen Strukturen um bis zu  $15^\circ$  vom idealen Wert  $180^\circ$  bei *trans*- bzw.  $0^\circ$  bei *cis*-Konfiguration abweichen. Die Konformation der *backbone*-Atome (N,  $C^\alpha$ , C) eines Peptidstranges kann somit durch die drei Torsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  beschrieben werden (s. Abbildung 1). Die Seitenkettentorsionswinkel werden mit  $\chi_1, \dots, \chi_n$  bezeichnet.

Die Konformation eines Peptids wird durch sterische Hinderung wie mögliche Überlappungen der  $H_i-H_{i+1}$ ,  $O_i-O_{i+1}$  und  $H_i-O_{i+1}$  van-der-Waals-Radien eingeschränkt. Diese Einschränkungen der Konformationsfreiheitsgrade kann jedoch durch konformationsstabilisierende Wechselwirkungen wie z. B. Wasserstoffbrücken partiell kompensiert werden. Die Konformation wird weiter durch die Seitenketten eingeschränkt. Ramachandran konnte erstmals die Winkel  $\varphi$  und  $\psi$  der partiell und vollständig erlaubten Konformationen in Form eines mittlerweile nach ihm benannten Diagramms angeben.<sup>[17,18]</sup>

### 2.1.2 3D-Struktur der Proteine

Traditionell ist die strukturelle Beschreibung der Proteine in vier Organisationsebenen unterteilt. Als Primärstruktur wird die Sequenz der Aminosäuren und eventueller kovalenter posttranslatorischer Modifikationen entlang der Polypeptidkette bezeichnet, deren Analyse in Abschnitt 4.1 beschrieben wird. Die nächst höhere Ebene, die Sekundärstruktur, beschreibt die nahe räumliche Anordnung der Rückgratome  $N^H$ ,  $C^\alpha$  und C. Zu dieser Ebene gehören Helices, Faltblätter und Schleifen (*turns*), die häufig durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die Analyse der Sekundärstruktur ist ein essentieller Bestandteil dieser Arbeit und wird detailliert in Abschnitt 2.5 beschrieben. Die Tertiärstruktur umfasst die dreidimensionale Struktur eines kompletten Polypeptidstranges. Während die Sekundärstruktur das Vorliegen verschiedener Strukturelemente anhand der Position der Rückgratome beschreibt, beinhaltet die Tertiärstruktur sowohl die Seitenkettenkonformation als auch die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander. Viele Proteine sind aus mehr als einem Polypeptidstrang aufgebaut, welche über nichtkovalente, seltener auch über kovalente Bindungen interagieren. Die Quartärstruktur bezeichnet die räumliche Anordnung aller im Protein vorkommenden Untereinheiten und beschreibt damit das Gesamtbild eines mehrkettigen Proteins.<sup>[8,19]</sup>

### 2.1.2.1 Helikale Strukturen

Eine Helix ist eine schraubenförmige Anordnung der Aminosäuren, die durch intramolekulare H-Brücken parallel zur Helixachse stabilisiert wird. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass die Winkel  $\varphi$  und  $\psi$  jeder Aminosäure denselben Wert haben. Der Helixtyp wird durch die Zahl  $n$  der Reste pro Windung, die auf die Helixachse projizierte Höhe  $h$  einer Windung und der Anzahl  $r$  der Rückgratatomte charakterisiert, die an der stabilisierenden H-Brücke beteiligt sind. Die Drehrichtung der Helix wird mit P (rechtsgängig) und mit M (linksgängig) symbolisiert.

Die verbreitetste helikale Struktur in Peptiden und Proteinen ist die rechtsgängige  $\alpha$ -Helix ( $3.6_{13}$ -P-Helix), bei der 3.6 Aminosäuren pro Windung ( $n = 3.6$ ) periodisch angeordnet sind und 13 Atome an dem Ring, der durch die stabilisierende H-Brücke geschlossen wird, beteiligt sind. Die Höhe einer Windung beträgt  $h = 540$  pm, und die Rückgratstorsionswinkel besitzen die Werte  $\varphi = -57^\circ$  und  $\psi = -47^\circ$ . Die Seitenketten sind in der  $\alpha$ -Helix orthogonal zur Helixachse zur Minimierung der sterischen Wechselwirkungen angeordnet. Sie wird durch H-Brücken zwischen  $\text{NH}_{i+4}$  und  $\text{CO}_i$  stabilisiert.

Weitere weniger verbreitete Helixtypen sind die  $3_{10}$ -Helix ( $3_{10}$ -P-Helix), das  $2.2_7$ -Band ( $2.2_7$ -P-Helix), die  $\pi$ -Helix ( $4.4_{16}$ -P-Helix) und die  $\gamma$ -Helix ( $5.1_{17}$ -P-Helix). Ein Beispiel für eine Helix, die nicht durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, ist die Polyprolinhelix ( $3$ -M-Helix).

Darstellungen der verbreiteten helikalen Peptidstrukturen sind im Abschnitt B.2 zu finden, während die Werte der Rückgratstorsionswinkel in der Tabelle 1 zusammengefasst sind.

### 2.1.2.2 $\beta$ -Faltblattstruktur

Die  $\beta$ -Faltblattstruktur ist zu den helikalen Strukturen grundsätzlich verschieden. In ihr stabilisieren Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polypeptidsträngen die Sekundärstruktur, welche parallel oder antiparallel zueinander angeordnet sein können. Die optimale Anordnung der H-Brücken in der antiparallelen Struktur lässt diese bevorzugt entstehen. Die sterischen Hinderungen der Aminosäureseitenketten bewirkt eine Faltung

Tabelle 1: Charakteristische Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  relevanter Sekundärstrukturelemente.

Sekundärstruktur	$\varphi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\varphi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$\varphi_{i+3}$	$\psi_{i+3}$
I- $\alpha_{RS}$ -Schleife	$-60^\circ$	$-29^\circ$	$-72^\circ$	$-29^\circ$	$-96^\circ$	$20^\circ$
II- $\alpha_{RS}$ -Schleife	$-59^\circ$	$129^\circ$	$88^\circ$	$-16^\circ$	$-91^\circ$	$-32^\circ$
I- $\alpha_{RU}$ -Schleife	$59^\circ$	$-157^\circ$	$-67^\circ$	$-29^\circ$	$-68^\circ$	$-39^\circ$
II- $\alpha_{RU}$ -Schleife	$54^\circ$	$39^\circ$	$67^\circ$	$-5^\circ$	$-125^\circ$	$-34^\circ$
I- $\alpha_{LS}$ -Schleife	$48^\circ$	$42^\circ$	$67^\circ$	$33^\circ$	$70^\circ$	$32^\circ$
II- $\alpha_{LS}$ -Schleife	$53^\circ$	$-137^\circ$	$-95^\circ$	$81^\circ$	$57^\circ$	$38^\circ$
I- $\alpha_{LU}$ -Schleife	$-61^\circ$	$158^\circ$	$64^\circ$	$37^\circ$	$62^\circ$	$39^\circ$
II- $\alpha_{LU}$ -Schleife	$-65^\circ$	$-20^\circ$	$-90^\circ$	$16^\circ$	$86^\circ$	$37^\circ$
I- $\alpha_C$ -Schleife	$-103^\circ$	$143^\circ$	$-85^\circ$	$2^\circ$	$-54^\circ$	$-39^\circ$
$\beta$ I-Schleife	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ I'-Schleife	$60^\circ$	$30^\circ$	$90^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ II-Schleife	$-60^\circ$	$120^\circ$	$80^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ II'-Schleife	$60^\circ$	$-120^\circ$	$-80^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ IV-Schleife	$-61^\circ$	$10^\circ$	$-53^\circ$	$17^\circ$		
$\beta$ VIa1-Schleife	$-60^\circ$	$120^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ VIa2-Schleife	$-120^\circ$	$120^\circ$	$60^\circ$	$0^\circ$		
$\beta$ VIb-Schleife	$-135^\circ$	$135^\circ$	$-75^\circ$	$160^\circ$		
$\beta$ VIII-Schleife	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-120^\circ$	$120^\circ$		
$\gamma$ -Schleife	$75^\circ$	$-64^\circ$				
$\gamma^i$ -Schleife	$-79^\circ$	$69^\circ$				
2.2 <sub>7</sub> -Band	$-78^\circ$	$59^\circ$				
3 <sub>10</sub> -Helix	$-49^\circ$	$-26^\circ$				
$\alpha$ -Helix	$-57^\circ$	$-47^\circ$				
$\pi$ -Helix	$-57^\circ$	$-70^\circ$				
Polyprolin II Helix	$-75^\circ$	$145^\circ$				
Kollagen	$-51^\circ$	$153^\circ$				
$\beta$ -Faltblatt (antiparallel)	$-139^\circ$	$135^\circ$				
$\beta$ -Faltblatt (parallel)	$-119^\circ$	$113^\circ$				

des Peptidrückgrats und dadurch eine Abweichung der Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  von den optimal gestreckten Werten von  $180^\circ$ . Des Weiteren bewirken sie meist eine rechtsgängige Verdrillung der einzelnen Stränge, was mit einer Optimierung der H-Brücken einhergeht. Zwischen den Strängen sind häufig Schleifen zu finden, die die notwendige Richtungs-umkehr bewirken. Die antiparallelen Faltblätter sind vorwiegend in den hydrophoben Zentren von Proteinen zu finden.

Die typischen Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Ihre Struktur ist in Abschnitt B.1 zu finden.

### 2.1.2.3 Schleifen

Die Schleifen (*turns*) bewirken eine Richtungs-umkehr des Polypeptidstranges und treten bevorzugt an der Oberfläche von Proteinen auf, so dass sie häufig Zentrum intermolekularer Erkennungsprozesse sind. Sie werden häufig durch H-Brücken zwischen dem Carbonylsauerstoff der ersten und dem Amidproton der letzten Aminosäure stabilisiert. Schleifen werden anhand ihrer Aminosäureanzahl klassifiziert und durch die Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der inneren Aminosäuren charakterisiert. Zur Klassifizierung der Schleifen sind sie in  $\delta$ - (2 Aminosäuren),  $\gamma$ - (3 Aminosäuren),  $\beta$ - (4 Aminosäuren),  $\alpha$ - (5 Aminosäuren) und  $\pi$ -Schleifen (6 Aminosäuren) unterteilt.<sup>[20]</sup> Die zur weiteren Charakterisierung notwendigen inneren Torsionswinkel sind z. B. bei  $\alpha$ -Schleifen die der Aminosäuren  $i+1$ ,  $i+2$  und  $i+3$ . Eine Zusammenfassung von charakteristischen Torsionswinkel der relevanten Schleifenstrukturen ist in Tabelle 1 zu finden, die dreidimensionalen Strukturen sind im Abschnitt B.3 abgebildet. Die Schleifen unterscheiden sich sowohl in der Orientierung der NH- bzw. CO-Bindungen als auch der Orientierung der Seitenketten.

Die  $\alpha$ -Schleifen wurden von Pavone *et al.* in neun Typen unterteilt.<sup>[21]</sup> Man unterscheidet zehn  $\beta$ -Schleifentypen, wobei die  $\beta$ III-Schleife das elementare Strukturelement der  $3_{10}$ -Helix ist und deshalb nicht mehr gesondert klassifiziert wird. Als so genannte *Prolin-turns* werden die  $\beta$ VIa- und  $\beta$ VIb-Schleifen bezeichnet, da sie in  $i+2$  Position eine *cis*-Peptidbindung aufweisen und diese Position meistens von einem Prolin oder einer N-Alkylaminosäure eingenommen wird.<sup>[22]</sup>

Einige Aminosäuren verfügen über eine strukturinduzierende Wirkung, die sie bevorzugte Positionen in Schleifen einnehmen lässt. D-Aminosäuren sind deshalb vorzugsweise in  $i+1$  Position von  $\beta$ II'-Schleifen zu finden, während *trans*-Prolin die Position  $i+1$  von  $\beta$ I- oder  $\beta$ II-Schleifen favorisiert. Die *cis*-Konfiguration lässt sich in den oben beschriebenen Prolin-*turns* finden. Das Glycin mit seiner helixunterbrechenden Eigenschaft ist hauptsächlich in den Positionen  $i+1$  und  $i+2$  von Schleifen lokalisiert.

Lewis *et al.* führten ein allgemeines Kriterium für das Vorliegen einer  $\beta$ -Schleife ein, nach dem die Distanz zwischen den C $^\alpha$  der Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  kleiner als 700 pm sein muss und keine Helix vorliegen darf.<sup>[23]</sup> Die  $\beta$ IV-Schleife ist eine Sammelgruppe von  $\beta$ -Schleifen, die keine Torsionswinkel anderer  $\beta$ -Schleifen erfüllen. Die angegebenen Torsionswinkel sind Durchschnittswerte und werden nicht zur Charakterisierung verwendet. Dieser Schleifentyp erfüllt nur das Distanzkriterium für  $\beta$ -Schleifen.<sup>[20]</sup>

## 2.2 Zirkulardichroismus

Die CD-Spektroskopie ist die meistgenutzte Anwendung chiroptischer Methoden. Mit ihr werden chirale Moleküle mit zirkular polarisiertem Licht photometrisch untersucht. Zirkular polarisiertes Licht entsteht durch Überlagerung von orthogonal zueinander stehenden, linear polarisierten Teilwellen mit gleicher Amplitude und einer Phasenverschiebung von  $\frac{\pi}{2}$ . In Abbildung 3 ist eine rechts- und linksgängige zirkular polarisierte Welle als Summe der Teilwellen dargestellt. Der elektrische Feldvektor rotiert bei rechtsgängigen Wellen einmal pro Wellenlänge im Uhrzeigersinn mit konstanter Stärke um den Ausbreitungsvektor.<sup>[24]</sup>

Zirkulardichroismus ist per Definition die Differenz der Absorption von rechts- und linksgängig polarisiertem Licht. Mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz lässt sich folgender mathematischer Zusammenhang aufstellen:

$$\Delta A = A_L - A_R = \varepsilon_L \cdot c \cdot l - \varepsilon_R \cdot c \cdot l = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l \quad (1)$$

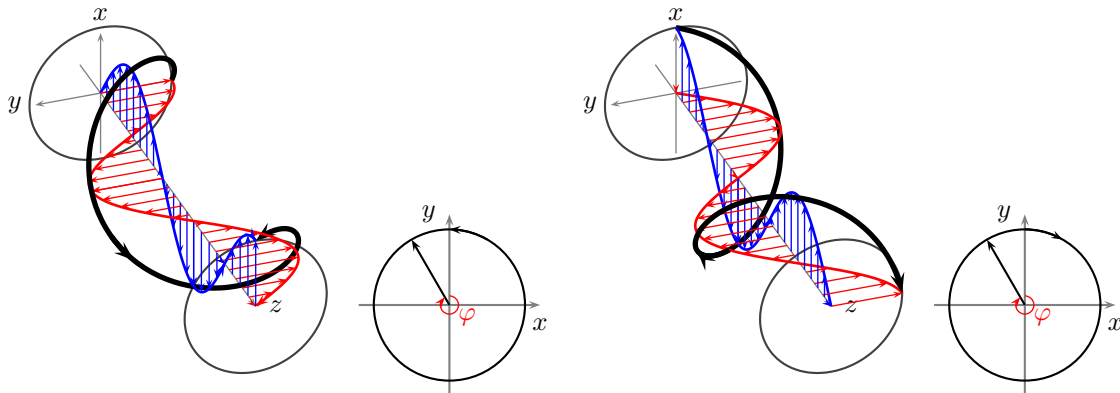


Abbildung 3: Darstellung einer rechtsgängigen (links) und einer linksgängigen (rechts) zirkular polarisierten Welle in Fortpflanzungsrichtung ( $t = t_0$ , nur Vektoren  $\vec{E}$  sind gezeichnet).<sup>[25]</sup>

Es resultiert der molar dekadische CD:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (2)$$

Wird durch ein zirkular dichroisches Medium linear polarisiertes Licht gestrahlt, werden die zirkular polarisierten Teilwellen unterschiedlich absorbiert, und es entsteht elliptisch polarisiertes Licht. In Abbildung 4 (a) und (b) ist eine elliptisch polarisierte Welle dargestellt. Der Feldvektor  $\vec{E}$  ändert sich periodisch in Ausbreitungsrichtung  $z$  mit der Zeit  $t$ .

Die Addition der Feldvektoren  $\vec{E}_R$  und  $\vec{E}_L$  ist in Abbildung 4 (c) dargestellt. Zeigen beide Feldvektoren in dieselbe Richtung, ergibt sich die große Halbachse  $\frac{a}{2}$  der Ellipse. Analog ergibt sich die kleine Halbachse  $\frac{b}{2}$ , wenn beide Feldvektoren in entgegengesetzte Richtungen weisen. Die Elliptizität  $\theta$  ist das Verhältnis der kleinen Halbachse zur großen Halbachse und ist direkt proportional zum CD (siehe Abbildung 4 (d)). Wird der CD in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  gemessen, erhält man ein CD-Spektrum.

Es existieren zahlreiche Methoden, den CD-Effekt durch Spektropolarimeter zu messen. Die meistgenutzte Methode ist die Modulation, bei der kontinuierlich zwischen links- und rechtsgängig zirkular polarisiertes Licht durch einen piezoelektrischen Quarzkristall mit einer Frequenz von 50 kHz umgeschaltet wird. Einige Geräte messen direkt die Elliptizität

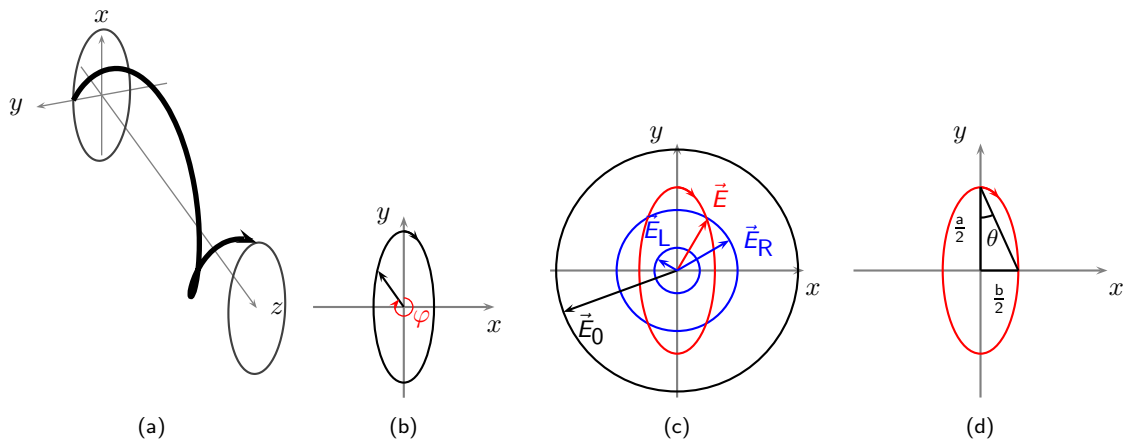


Abbildung 4: Darstellung einer rechtselliptisch polarisierten Welle in Abhängigkeit von der Fortpflanzungsrichtung zur Zeit  $t = t_0$  (a) und in Abhängigkeit von der Zeit am Ort  $z = z_0$  (b). Der eingezeichnete Winkel  $\varphi$  ist die Elliptizität. In (c) ist die Entstehung des Feldvektors elliptisch polarisierter Wellen (rot) aus den ursprünglichen zirkular polarisierten Wellen (blau) dargestellt. Mit  $\varepsilon_L < \varepsilon_R$  entsteht eine links elliptisch polarisierte Welle durch Überlagerung. Die Definition des Winkels  $\theta$  ist in (d) dargestellt.<sup>[25]</sup>

tät, doch kann auch durch Subtraktion der Absorptionen zweier separater Strahlen der CD-Effekt bestimmt werden.<sup>[24]</sup>

### 2.2.1 CD-Spektroskopie von Peptiden

Im Vergleich zur Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie ist die CD-Spektroskopie eine Methode zur Aufklärung der generellen Struktur eines Peptids oder Proteins und lässt keine Einblicke in die atomare Struktur des Moleküls zu. Nichtsdestotrotz findet sie eine breite Anwendung, da sie wesentlich geringer Substanzmengen und Zeit für die Analyse benötigt. Proteine mit einem Molekulargewicht über 40 kDa und Proteine, die nicht kristallisieren, können mit dieser Methode unter verschiedensten Bedingungen untersucht werden. Dabei können experimentelle Bedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur, Ionenkonzentrationen) gewählt werden, die bei anderen strukturaufklärenden Methoden nicht verwendet werden können.



Die Chromophore der Proteine bzw. Peptide sind die Peptidbindungen mit einem Absorptionsbereich  $< 240$  nm, aromatische Seitenketten der Aminosäuren (Absorption zwischen 260 nm und 320 nm) und Disulfidbindungen (schwache Absorption bei ca. 260 nm). Darüber hinaus können nichtproteinogene Cofaktoren wie die Häm-Gruppe, Flavin und Liganden CD-Effekte aufweisen.

Die Peptidbindung absorbiert das Licht im fernen UV-Bereich. Die drei  $\pi$ -Orbitale der Peptidbindung besitzen vier Elektronen, so dass zwei  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge möglich sind. Bei ca. 190 nm promoviert ein Elektron durch  $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ . Die andere Anregung  $\pi_+ \rightarrow \pi^*$  konnte bisher experimentell nicht nachgewiesen werden.<sup>[26]</sup> Das Orbital  $n$  der freien Elektronenpaare ist größtenteils am Carbonylsauerstoff lokalisiert, dessen Elektronen für den  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang Licht der Wellenlänge von ca. 220 nm absorbiert. Das andere Orbital  $n'$  mit einem freien Elektronenpaar liegt in der Ebene und Richtung der Carbonylbindung. Der Übergang, der bei höheren Energien stattfinden sollte, ist ebenfalls bisher experimentell nicht nachgewiesen worden, doch zeigen semiempirische Rechnungen, dass er energetisch in der Region der  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge liegen sollte.<sup>[27]</sup> Die  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge sind verbotene Übergänge und haben einen sehr geringen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\max} \approx 100 \text{ M}^{-1}$ .

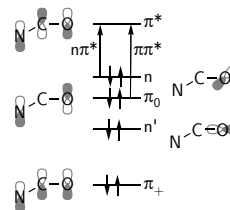


Abbildung 5: HOMO und LUMO und mögliche Elektronenübergänge der Peptidbindung.<sup>[24]</sup>

Ein CD-Spektrum beinhaltet eine Vielzahl an Informationen. Aus dem Absorptionsbereich der Peptidbindungen im fernen UV können mit verschiedenen Algorithmen Sekundärstrukturanteile bestimmt werden.<sup>[28,29]</sup> Viele dieser Methoden verwenden Basissätze von Proteinen, die bestimmte Faltungsmuster aufweisen und deren Struktur durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR vollständig aufgeklärt wurde. Ein Nachteil ist allerdings, dass Oligopeptide nicht als Basissätze in den Datenbanken aufgenommen sind, weshalb Strukturuntersuchungen dieser Peptide nicht zuverlässig sind.

Der Absorptionsbereich der aromatischen Seitenketten zwischen 260 nm und 320 nm enthält Informationen über die Tertiärstruktur. Die Absorption in diesem Bereich ist abhängig von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren, deren Dynamik und Umgebung, wie polare Gruppen, H-Brücken, Polarisierbarkeit und die räumliche Anordnung der Aminosäuren. Der theoretische Hintergrund für dieses Verhalten ist bisher noch nicht

geklärt, doch konnten durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren in Proteinen wichtige strukturelle Informationen erhalten werden.<sup>[30-32]</sup> Dieser *fingerprint*-Bereich des CD-Spektrums ist sehr empfindlich gegenüber Tertiärstrukturänderungen, so dass es möglich ist, durch Vergleich zweier Spektren zwischen Wildtyp und Mutante zu unterscheiden.

Die Aktivität von Cofaktor-Bindungsstellen in Proteinen kann durch CD-Spektroskopie unmittelbar anhand der charakteristischen CD-Signale untersucht werden.<sup>[33-34]</sup>

Die verbreitetste und wichtigste Möglichkeit, die die CD-Spektroskopie bietet, ist die direkte und schnelle Erkennung von konformationellen Änderungen. In Verbindung mit der *stopped-flow*-Methode können so die Proteinfaltung zeitlich verfolgt und wertvolle Informationen zu deren Mechanismus erhalten werden. Da Oligomere nicht in Strukturdatenbanken vorhanden sind, können lediglich deren konformationelle Ähnlichkeiten oder Änderungen mit der CD-Spektroskopie untersucht werden.

## 2.3 Kernmagnetische Resonanz

Ausgehend vom Nachweis des zu der Zeit schon länger postulierten Elektronenspins durch das Stern-Gerlach-Experiment im Jahre 1922, konnten Stern und Gerlach im Jahre 1933 in Molekularstrahlexperimenten den Nachweis für den Protonenspin erbringen.<sup>[35-39]</sup> Sie erhielten 1943 den Nobelpreis für Physik für ihre Arbeiten. Dieser Versuch kann als Ursprung der NMR-Technik angesehen werden. Isidor Isaac Rabi erhielt im folgenden Jahr ebenfalls den Nobelpreis für Physik für die ersten NMR- und ESR-Experimente, die er an einer modifizierten Stern-Gerlach-Apparatur durchführte.<sup>[40]</sup> Er erkannte, dass eine der Banden durch die Einstrahlung eines elektromagnetischen Wechselfelds geeigneter Frequenz, der Larmor-Frequenz, verschwand. Aufbauend auf diesen Ergebnissen gelang es Bloch *et al.* und Purcell *et al.* 1946 unabhängig voneinander, Kernresonanzsignale nachzuweisen.<sup>[41,43-45]</sup> Sie erhielten den Nobelpreis für Physik gemeinsam im Jahre 1952. 1954 wurde ein Jahr nach der Entdeckung der DNS-Helixstruktur das erste NMR-Spektrum einer biologischen Substanz von Jacobson *et al.* zur Untersuchung der Hydratisierung der DNS aufgenommen.<sup>[46,47]</sup> Kurze Zeit später wurde die Aufspaltung der Signale durch chemische Verschiebung und skalare Kopplungen erkannt, und

NMR entwickelte sich zu einer relevanten Methode in der analytischen Chemie.<sup>[48]</sup> Ernst und Anderson entwickelten 1965 die Puls-Fourier-Transformations-Spektroskopie (PFT) und leiteten damit eine neue Ära der NMR-Spektroskopie ein.<sup>[49;50]</sup> Ernst erhielt 1991 den Nobelpreis für Chemie. Bis dahin wurden NMR-Spektren mit der CW-Methode aufgenommen, bei der der Absorptionsfrequenzbereich kontinuierlich durchfahren wird. Mit der neuen Methode erfolgte eine gleichzeitige Anregung aller selektierten Kerne durch einen kurzen hochfrequenten Puls definierter Länge und Stärke. Zum einen wurde dadurch die Messgeschwindigkeit wesentlich verkürzt, zum anderen war es nun möglich, durch Akkumulation der Spektren das  $s/N$ -Verhältnis zu verbessern. Diesem wichtigen Schritt in der Entwicklung der NMR-Spektroskopie folgte kurze Zeit später die Breitbandentkopplung und Anfang der 70er Jahre die Mehrpulsverfahren. Die nun mögliche 2D- bzw. mehrdimensionale Technik wurde während der 90er Jahre insbesondere von K. Wüthrich zu einer mächtigen Analysetechnik der Biochemie weiterentwickelt. Er erhielt 2002 dafür den Nobelpreis für Chemie. Die NMR-Technik findet nunmehr breite Anwendung in der Physik, Chemie, Biochemie, Biologie und Medizin und deren Weiterentwicklung ist eng mit dem Fortschritt in der Computertechnik gekoppelt.

### 2.3.1 Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die meisten Atomkerne besitzen wie Elektronen einen Eigendrehimpuls  $\vec{P}$ , der für Atomkerne auch Kerndrehimpuls genannt wird. Er kann bei raumfreier Achse nur diskrete Werte von

$$|\vec{P}| = \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (3)$$

annehmen. Die Drehimpulsquantenzahl  $I$ , die auch Kernspin genannt wird, kann ganz- und halbzahlige Werte zwischen 0 und 6 annehmen und ist nicht theoretisch vorher-sagbar. Aus Gleichung 3 ist ersichtlich, dass Kerne mit einem Kernspin von 0 keinen Kerndrehimpuls besitzen. Als Beispiele seien hier die Isotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{16}\text{O}$  genannt, die in NMR-Experimenten nicht detektiert werden können.

Aus dem Drehimpuls  $\vec{P}$  folgt das magnetische Moment  $\mu$ . Die beiden Größen sind durch das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  als empirische Proportionalitätskonstante miteinander verknüpft

$$|\vec{\mu}| = \gamma |\vec{P}| = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)}. \quad (4)$$

Die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns im NMR-Experiment ist proportional zum gyromagnetischen Verhältnis, so dass Kerne mit kleinen  $\gamma$  wesentlich unempfindlicher im magnetischen Feld sind als Kerne mit großem  $\gamma$ . Die meisten Kerne besitzen eine parallele Ausrichtung ihres Kerndrehimpulses  $\vec{P}$  und ihres magnetischen Moments  $\vec{\mu}$ . Einige Kernsorten wie  $^{15}\text{N}$  und  $^{29}\text{Si}$  zeigen jedoch ein negatives gyromagnetisches Verhältnis. Ihr Kerndrehimpuls  $\vec{P}$  ist daher antiparallel zum magnetischen Moment  $\vec{\mu}$  ausgerichtet.

Wird nun ein äußeres statisches Magnetfeld  $\vec{B}_0$  angelegt, orientieren sich die Drehimpulse im Raum und können bei raumfester Achse in  $z$ -Richtung nur Werte von

$$\left| \vec{P}_z \right| = \hbar |m| \quad (5)$$

annehmen. Die magnetische Quantenzahl  $m$ , auch Orientierungsquantenzahl genannt, kann ganzzahlige Werte zwischen  $I$  und  $-I$  annehmen. Die Multiplizität eines Zustandes ist damit

$$M = 2I + 1. \quad (6)$$

Für das magnetische Moment in Feldrichtung  $z$  folgt aus Gleichung 5 und 4

$$\vec{\mu}_z = m\gamma\hbar. \quad (7)$$

Die Kerndipole präzedieren um die  $z$ -Achse mit der Larmor-Frequenz  $\nu_L$ , die proportional zur magnetischen Flussdichte  $\vec{B}_0$  und zum gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  ist,

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0. \quad (8)$$

Die Energiezustände im magnetischen Feld mit der Flussdichte  $\vec{B}_0$ , die ein Kerndipol annehmen kann, beträgt

$$E = -\vec{\mu}_z \vec{B}_0 = -m\gamma\hbar B_0 \quad (9)$$

und ist in Abbildung 6 für Kerne mit Kernspin  $1/2$  und  $1$  veranschaulicht. In der Quantenmechanik wird der Zustand  $m = +\frac{1}{2}$  mit der Spinfunktion  $\alpha$  und der Zustand  $m = -\frac{1}{2}$  mit der Spinfunktion  $\beta$  bezeichnet.

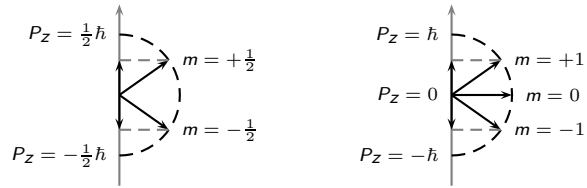


Abbildung 6: Richtungsquantelung des Drehimpulses  $\vec{P}$  im Magnetfeld für Kerne mit  $l = \frac{1}{2}$  und  $1$ . [51]

Der Energieunterschied zweier benachbarter Energieniveaus ist:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0. \quad (10)$$

Das Verhältnis der Populationen des energetisch höher liegenden Zustandes  $\alpha$  zu der des energetisch niedriger liegenden Zustandes  $\beta$  ist abgeleitet aus der Boltzmannstatistik mit der Boltzmannkonstante  $k$  bei der Temperatur  $T$ :

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{kT}. \quad (11)$$

Aufgrund der sehr geringen Energieunterschiede sind die Differenzen der Populationen gering. Es resultiert jedoch durch den Besetzungsunterschied eine makroskopische Magnetisierung  $\vec{M}_0$  (siehe Abbildung 7), die parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$  gerichtet sein kann.

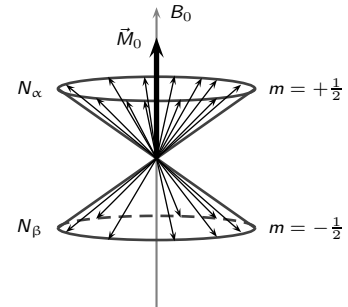


Abbildung 7: Besetzungsverhältnis mit  $N_\alpha > N_\beta$  von  $N$  Kernen auf dem Doppelpreziensionskegel mit einer resultierenden makroskopischen Magnetisierung  $\vec{M}_0$ . [51]

Das thermische Gleichgewicht (Gleichung 11) kann nur durch induzierte Übergänge, also der Kopplung mit magnetischen oder elektrischen Feldern, die die Resonanzbedingung

$$\Delta E = h\nu_{\text{res}} \quad (12)$$

erfüllen, erreicht werden. Jede Energieabsorption ist mit einer Umkehr der Kernspinorientierung verbunden, Absorption und Emission sind gleich wahrscheinlich. Erlaubte Übergänge sind nur die Einquantenübergänge, bei denen sich  $m$  um  $1$  ändert. Durch den Besetzungsunterschied wird überwiegend die Absorption gemessen. Ohne Relaxation würde so eine Gleichbesetzung  $N_\alpha = N_\beta$  (Sättigung) erreicht werden, bei der sich

Absorption und Emission kompensierten und kein Signal zu beobachten wäre.

Die Frequenz des eingestrahlichten Wechselfeldes  $\nu_{\text{res}}$  muss der Larmor-Frequenz  $\nu_{\text{L}}$  entsprechen, so dass sich folgende Resonanzbedingung in Abhängigkeit von der magnetischen Flussdichte  $\vec{B}_0$  aus den Gleichungen 10 und 12 ableiten lässt:

$$\nu_{\text{L}} = \nu_{\text{res}} = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0. \quad (13)$$

### 2.3.2 Das Impulsverfahren

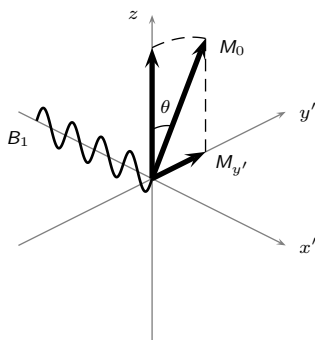


Abbildung 8: Verhalten der makroskopischen Magnetisierung  $\vec{M}_0$  im rotierenden Koordinatensystem nach einem beliebigen Impuls.

Ein Impuls wird durch einen Hochfrequenzgenerator erzeugt, der bei einer festen Frequenz  $\nu_1$  arbeitet. Aufgrund der kurzen Einschaltdauer  $\tau_{\text{P}}$  wird anstelle der erwarteten Frequenz ein symmetrisches, kontinuierliches Frequenzband um  $\nu_1$  erzeugt. Die Breite des zur selektiven Anregung der Kerne benötigten Frequenzbandes ist umgekehrt proportional zu  $\tau_{\text{P}}$ . Die Generatorfrequenz ist sowohl von der Kernsorte als auch von der magnetischen Flussdichte  $\vec{B}_0$  abhängig. So beträgt beispielsweise die Resonanzfrequenz von  $^1\text{H}$  im Magnetfeld mit einer Flussdichte von 14,10 T 600,13 MHz und von  $^{13}\text{C}$  150,90 MHz.

Das Frequenzband sollte für die NMR-Experimente breit genug gewählt werden, so dass alle Frequenzen einer Kernsorte angeregt werden. Da die Amplituden eines Anregungspulses jedoch mit größer werdenden Abstand zu  $\nu_1$  abnehmen und möglichst alle Kerne gleich stark angeregt werden sollen, werden üblicherweise kurze Pulse im Bereich von Mikrosekunden mit hoher Leistung verwendet. Diese so genannten *hard pulses* sind in der Regel ein bis zwei Zehnerpotenzen größer als die Spektrenbreite.

Zur einfacheren Darstellung der Wirkung von Impulsen auf die makroskopische Magnetisierung wird im Allgemeinen anstelle eines ortsfesten ein in der  $x, y$ -Ebene mit der Larmor-Frequenz rotierendes Koordinatensystem  $x', y', z$  verwendet. Die Wechselwirkung der magnetischen Vektoren  $\vec{B}_1$  der elektromagnetischen Welle in Richtung der  $x$ -Achse mit den Kerndipolen erzeugt eine Quermagnetisierung  $\vec{M}_{y'}$ . Der Impulswinkel

$\theta$  ist von der Impulsdauer  $\tau_P$  und der Amplitude  $B_{1i}$  abhängig, die für den Resonanzübergang mit der Frequenzkomponente  $\nu_i$  verantwortlich ist. Schematisch ist dieses in Abbildung 8 dargestellt und es gilt

$$\theta = \gamma \cdot B_{1i} \cdot \tau_P. \quad (14)$$

Die Empfängerspule ist in der  $y$ -Achse angeordnet, und das induzierte Signal ist zur Quermagnetisierung proportional. Ein  $90^\circ_{x'}$ -Puls würde somit ein maximales Signal verursachen, wo hingegen nach einem  $180^\circ_{x'}$ -Puls kein Signal beobachtet werden kann. Nach einem  $180^\circ_{x'}$ -Puls sind die Besetzungszahlen  $N_\alpha$  und  $N_\beta$  umgekehrt, ein  $90^\circ_{x'}$ -Puls bewirkt eine Gleichbesetzung. Da hier aber eine Quermagnetisierung vorliegt, ist dieser Zustand somit von der Sättigung zu unterscheiden. Anschaulich lässt sich die Quermagnetisierung durch in Phase präzedierende Kerndipole erklären (Phasenkohärenz).

Der Magnetisierungsvektor  $\vec{M}_0$  präzediert nach einem Impuls mit der Larmor-Frequenz  $\nu_L$  um die  $z$ -Achse. Die Rückkehr in den Gleichgewichtszustand wird Relaxation genannt und erfolgt nach Bloch durch Relaxationsprozesse erster Ordnung mit zwei verschiedenen Relaxationszeiten  $T_1$  (Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit) und  $T_2$  (Spin-Spin- oder transversale Relaxationszeit).<sup>[44]</sup> Die Reziproken dieser entsprechen den Geschwindigkeitskonstanten der Relaxationsprozesse. Im rotierenden Koordinatensystem wird die Relaxation durch die Blochschen Gleichungen beschrieben:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (15)$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \quad (16)$$

$$\frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2}. \quad (17)$$

Der freie Induktionsabfall (FID), der von der Detektorspule registriert wird, ist von der Quermagnetisierung  $\vec{M}_{y'}$  abhängig. Der FID ist ein Interferogramm, in dem sich die Generatorfrequenz  $\nu_1$  und die Resonanzfrequenzen aller beobachteten Kerne überlagern und entspricht dem Spektrum in der Zeitdomäne. Durch eine Fourier-Transformation (FT) lässt es sich in die Frequenzdomäne überführen.

Ein entscheidender Vorteil der PFT-NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit der Akkumulation. Das statische Rauschen mittelt sich durch das Aufsummieren teilweise heraus, so dass ein besseres  $S/N$ -Verhältnis erhalten wird. Das  $S/N$ -Verhältnis ist proportional zu:<sup>[52]</sup>

$$S/N \propto c \cdot \gamma_{\text{exc}} \cdot \frac{T_2}{T} \cdot \sqrt{\gamma_{\text{det}}^3 \cdot B_0^3 \cdot \text{NS}}. \quad (18)$$

Es ist ersichtlich, dass die Empfindlichkeit linear von der Probenkonzentration  $c$ , jedoch quadratisch von der Anzahl der Scans  $\text{NS}$  abhängt. In H,X-Korrelationsexperimenten ist es zudem aufgrund des gyromagnetischen Verhältnisses wichtig, Protonen zu detektieren und den Kern X durch Pulse anzuregen ( $\gamma_{\text{exc}} < \gamma_{\text{det}}$ ). Eine Variation der Messtemperatur  $T$  kann unter Umständen günstig sein. So sollte sie bei kleinen Molekülen mit langen  $T_2$ -Zeiten eher erniedrigt und bei kurzen  $T_2$  eher erhöht werden.

Bisher wurden nur Kerndipole betrachtet, die lediglich ein Resonanzsignal besitzen. Ein entscheidendes Kriterium für die weite Verbreitung als Analysemethode in der Chemie ist der Abschirmeffekt, der durch die unmittelbare Umgebung des betrachteten Kerns erzeugt wird. Dadurch die das effektive Magnetfeld  $\vec{B}_{\text{eff}}$  am Kernort stets kleiner als das angelegte Feld  $\vec{B}_0$ . Die Abschirmkonstante  $\sigma$  ist eine dimensionslose Größe, die unabhängig vom Magnetfeld mit zunehmender Elektronenzahl größer wird. Es gilt

$$\vec{B}_{\text{eff}} = (1 - \sigma) \vec{B}_0. \quad (19)$$

Für die Resonanzbedingung (Gleichung 12) folgt

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0. \quad (20)$$

Es lässt sich ableiten, dass chemisch nicht äquivalente Kerne durch ihre unterschiedliche Abschirmung getrennte Resonanzsignale besitzen, also unterschiedliche chemische Verschiebungen  $\delta$  besitzen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist ebenfalls eine dimensionslose Größe und wird seit 2001 wieder in ppm angegeben.<sup>[53]</sup> Sie entspricht der Frequenzdifferenz zu einer Referenzsubstanz, die abhängig von den beobachteten Kernen ist, und ist definiert durch

$$\delta_{\text{Substanz}} = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}}. \quad (21)$$



Nach der IUPAC-Empfehlung von 2001 soll der Zähler in Hertz und der Nenner in Megahertz angegeben werden, um der andauernden Verwendung von ppm als Dimension gerecht zu werden.<sup>[53]</sup>









Die Feinstruktur der NMR-Signale wird im Wesentlichen durch die Spin-Spin-Kopplung beeinflusst, welche durch die Wechselwirkung mit benachbarten Kerndipolen entsteht. Das effektive magnetische Feld am Kernort wird durch die Kopplung stärker oder schwächer. Dabei kann zwischen der indirekten über Bindungen erfolgenden (skalare Kopplung), und der direkten (dipolare Kopplung) Spin-Spin-Kopplung unterschieden werden. Direkte Kopplungen sind in der Festkörper-NMR-Spektroskopie von entscheidender Bedeutung und wirken durch den Raum, werden jedoch bei der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie durch die Molekülbewegung in niederviskosen Flüssigkeiten herausgemittelt. Aus der Feinstruktur der Signale lässt sich die Kopplungskonstante  $J$  ableiten, die unabhängig von der magnetischen Flussdichte  $\vec{B}_0$  ist.

Die Intensität der NMR-Signale ist zumindest bei Protonmessungen direkt proportional zur Anzahl der chemisch äquivalenten Atome und kann ebenfalls zur Strukturaufklärung genutzt werden. Verschiedene messtechnische und magnetische Eigenschaften von Heterokernen beeinflussen oft das Integral, so dass diese Information nicht unmittelbar genutzt werden kann.

### 2.3.3 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Durch die Etablierung der Pulstechnik mit anschließender Fouriertransformation durch Ernst und Anderson war es nicht nur möglich, 1D-NMR-Spektren in kürzerer Zeit aufzunehmen und durch Akkumulation das  $s/N$ -Verhältnis zu verbessern, sondern ebenfalls durch Einführung zusätzlicher Zeitvariablen mehrdimensionale NMR-Spektren aufzunehmen. Bei 1D-Spektren entspricht die Abszisse der Frequenzachse und die Ordinate ist proportional zur Signalintensität. Zweidimensionale NMR-Spektren lassen sich in zwei Varianten aufnehmen, den  $J$ -aufgelösten und den korrelierten NMR-Spektren. Bei den ersteren wird die chemische Verschiebung  $\delta$  gegen die Kopplungskonstante aufgetragen, während bei letzteren nur chemische Verschiebungen auf den Achsen aufgetragen werden.

Tabelle 2: Darstellung der grundlegenden Korrelationen in NMR-Experimenten zwischen H und einem beliebigen Kern X mit Spin  $\frac{1}{2}$ . [52]

Korrelation	NMR-Experiment(e)	Beschreibung
	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY	skalare Kopplung von Protonen über zwei bis drei Bindungen
	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY	skalare Kopplung von Protonen über $n$ Bindungen innerhalb eines Spinsystems
	$^1\text{H}, \text{X}$ -HMQC $^1\text{H}, \text{X}$ -HSQC	heteronukleare skalare Kopplung über eine Bindung
	$^1\text{H}, \text{X}$ -HMBC	weit reichende skalare, heteronukleare Kopplung
	X,X-COSY X,X-INADEQUATE	heteronukleare skalare Kopplung (Sensitivitätsprobleme bei geringer Häufigkeit)
	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOE Differenz $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY	homonukleare dipolare Kopplungen
	$^1\text{H}, \text{X}$ -NOE Differenz X,X-HOESY	heteronukleare dipolare Kopplungen
	1D Sättigungs- oder Inversionstransfer EXSY	langsamer Spinaustausch von Kernen an chemisch nicht äquivalenten Positionen (schneller Austausch führt zur Linienverbreiterung)

In allen 2D-Spektren entspricht die dritte Achse der Intensität der Signale. Die fundamentalen zweidimensionalen NMR-Experimente sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Heutzutage werden routinemäßig auch 3D-Spektren zur Strukturaufklärung von biologischen Molekülen aufgenommen, die allerdings in den meisten Fällen eine Isotopenanreicherung benötigen. Eine Auswahl an relevanten 3D-NMR-Experimenten zur Analyse der Primärstruktur ist in Abschnitt 4.1.2.2 zu finden. Die NMR-Experimente können theoretisch beliebig viele zusätzliche Zeitvariablen enthalten, die zum Routineprogramm gehörenden besitzen heutzutage jedoch maximal drei, was einem 4D-NMR-Spektrum entspricht.

Die mehrdimensionalen Techniken setzen eine Kopplung zwischen den Kernen voraus. Es kann sich um eine skalare als auch um eine dipolare Kopplung handeln, wobei letztere einen direkten Weg zur Strukturbestimmung durch NMR-Techniken eröffnet. Die Belegung der Achsen in einem mehrdimensionalen Spektrum unterliegt keiner Einschränkung,

so dass Korrelationen zwischen jeglicher Kombination von Protonen und Heterokernen gemessen werden können.

Bei simplen 1D-Experimenten erfolgt direkt nach dem Beobachtungspuls die Detektion. Dem Beobachtungspuls kann in komplexen Experimenten noch eine Präparationsphase vorgelagert werden (z. B. DEPT, TOCSY). Bei der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie ist die Detektion von der Präparation durch eine Evolutions- und Mischphase getrennt, die Aufnahme kann also in die folgenden Blöcke unterteilt werden:

Präparation — Evolution ( $t_1$ ) — Mischung ( $\Delta$ ) — Detektion ( $t_2$ ).

Die Mischphase kann zusätzliche Pulse zur Entwicklung der Spinsysteme enthalten. Die Mischzeit  $\Delta$  ist für ein gegebenes Experiment konstant. Die Evolutionzeit  $t_1$  erhöht sich hingegen inkrementell während des Experiments und entspricht direkt der Auflösung bzw. Anzahl der Experimente auf der  $F_1$ -Achse. Die erhaltenen Rohdaten werden fouriertransformiert sowohl bezüglich  $t_2$  als auch  $t_1$ :

$$S(t_1, t_2) \xrightarrow{\text{FT bezüglich } t_2} S(t_1, F_2) \xrightarrow{\text{FT bezüglich } t_1} S(F_1, F_2).$$

Ein Kreuzsignal entsteht in mehrdimensionalen Experimenten nur dort, wo zwei Kern-dipole miteinander koppeln. Die Präparation der Kreuzsignale ist natürlich vom NMR-Experiment selbst abhängig, so dass verschiedene strukturelevante Informationen enthalten sein können (siehe Tabelle 2).

### 2.3.4 Spezielle NMR-Techniken

Die NMR-Spektroskopie liefert eine Vielzahl von Informationen bezüglich der Struktur chemischer Verbindungen. Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde eine große Anzahl neuer NMR-Techniken entwickelt, die das Anwendungsspektrum erweitert oder innovative Strukturparameter eingeführt haben. So ist es heute möglich, interpretierbare NMR-Spektren von membranassoziierten Peptiden oder Proteinen, sowie von Nukleinsäuren und Zuckern aufzunehmen. Eine der herausragenden Methoden ist TROSY, das hochaufgelöste NMR-Spektren von Proteinen bis 100 kDa ermöglicht.<sup>[54]</sup> Der enorme Zeitaufwand zur Aufnahme multidimensionaler NMR-Spektren wurde durch Kupče und Free-

man entscheidend reduziert.<sup>[55]</sup> Dabei wird das gewünschte NMR-Spektrum aus 2D-NMR-Projektionsspektren mathematisch rekonstruiert und die direkte Aufnahme mehrdimensionaler Spektren überflüssig.<sup>[56]</sup> Dieses Verfahren wurde durch Hiller *et al.* automatisiert und durch ein 6D APSY-NMR-Spektrum ist nun eine nahezu vollständige Zuordnung des Peptidrückgrats mit nur einem NMR-Spektrum möglich.<sup>[57,58]</sup>

Festkörper-NMR-Spektren werden mit *magic angle spinning* (MAS) aufgenommen, deren Rotoren nun ca. 50 kHz erreichen, so dass Spektrenbreiten und Signalschärfen ähnlich der NMR in Flüssigkeiten erzielt werden.<sup>[59]</sup> Mobile NMR-Geräte (z. B. NMR-MOUSE<sup>TM</sup>) ermöglichen in neuester Zeit NMR-Imaging an jedem erdenklichen Ort, was die Anwendung der NMR-Spektroskopie in der Geologie und Biologie forciert und die Entwicklung von NMR-Experimenten in inhomogenen Feldern vorantreibt.<sup>[60]</sup> Kernspintomographen der neuesten Generation für die Medizin haben mittlerweile magnetische Flussdichten von ca. 5 T und nutzen ebenfalls die NMR-Techniken in inhomogenen Feldern zur Steigerung der Ergonomie.

#### 2.3.4.1 TROSY

Die Kerndipole haben nach der Anregung zwei Möglichkeiten wieder in den Gleichgewichtszustand zurück zu gelangen, durch die Spin-Gitter-Relaxation in Feldrichtung (longitudinale Relaxation  $T_1$ ) und die Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation  $T_2$ ) senkrecht zur Feldrichtung. Die longitudinale Relaxationsrate beeinflusst im Wesentlichen die Wiederholungsrate des NMR-Experiments, während die transversale Relaxationsrate die Breite und Intensität der NMR-Signale bestimmt, da die Phasenbeziehung zwischen den gebündelt präzedierenden Kernspins verloren geht. Die  $T_2$ -Relaxation wird einerseits durch lange Wartezeiten während der NMR-Experimente für Magnetisierungstransfers und andererseits durch die Größe des untersuchten Moleküls vergrößert, was die NMR-Spektroskopie auf Proteine von maximal ca. 30 kDa limitiert. Dipol-Dipol-Kopplung (DD) und chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) beschleunigen die  $T_2$ -Relaxation. TROSY nutzt die konstruktive Interferenz der beiden Relaxationsmechanismen zur Reduktion der transversalen Relaxation.<sup>[61]</sup>

In Abbildung 9 ist ein heteronukleares Zweispin-system, wie z. B.  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  als Energie-niveauschema dargestellt. Jeder Kerndipol ergibt wegen der skalaren Kopplung ein Dublett, so dass in einem zweidimensional korrelierten Spektrum vier Signale in Form eines Quadrats zu beobachten sind. Diese Signale würden durch die Breitbandentkopplung während der Evolutions- und Aufnahmezeit auf ein Signal im Zentrum reduziert. Die transversalen Relaxationszeiten dieser vier Peaks sind sehr unterschiedlich, und es ergibt sich ein sehr breites Signal, zwei mittelbreite Signale und ein sehr scharfes Signal. In einem TROSY-Experiment wird auf eine Entkopplung verzichtet und durch bestimmte Pulssequenzen wie z. B. ST2-PT (*single transition to single transition polarization transfer*) nur das scharfe Signal selektiert. Diese Sequenz unterdrückt nicht alle unerwünschten Signale, so dass sie von Schulte-Herbrüggen und Sørensen weiterentwickelt wurde und nun auch diese Artefakte unterdrückt werden können. [62]

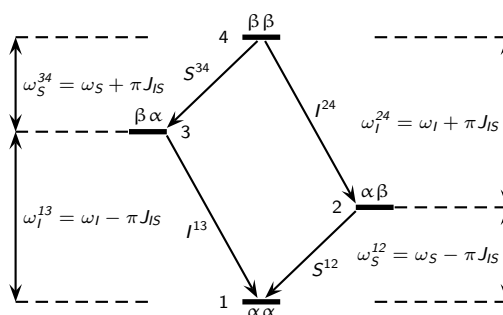


Abbildung 9: Energieniveauschema für ein heteronukleares Zweispin-system mit Kernspin  $\frac{1}{2}$  und den Übergangsoperatoren  $I^{13}$ ,  $I^{24}$ ,  $S^{12}$  und  $I^{34}$ . [54]

## 2.4 Konformationsrelevante NMR-Parameter

Den NMR-Spektren lassen sich eine Vielzahl von Informationen über die Konformation des Moleküls entnehmen. Im Folgenden werden die wichtigsten Parameter für Peptide und Proteine kurz beschrieben.

### 2.4.1 Chemische Verschiebung

Die Abschirmkonstante eines Kerndipols enthält neben den Informationen über die Konfiguration und Konstitution am Kernort auch Informationen über die Konformation. Die einzelnen Aminosäuren besitzen ein spezifisches Spinsystem, welches durch 2D-NMR-Techniken identifiziert werden kann. Wüthrich veröffentlichte als erster gemittelte chemi-

sche Verschiebungen für die Protonen jeder proteinogenen Aminosäure.<sup>[63]</sup> Dieses wird heutzutage von der *Biological Magnetic Resonance Data Bank* für *random coil* Konformationen der Aminosäuren weitergeführt.<sup>[64]</sup> Wishart *et al.* erkannten die Korrelation zwischen der chemischen Verschiebung der Kerndipole und der Konformation durch Analyse von Proteinen bekannter Struktur.<sup>[65]</sup> Sie stellten für  $H^N$ ,  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$  und  $N^H$  fest, dass in helikalen Strukturen die Resonanzen zu hohem Feld verschoben sind und für gestreckte Konformationen wie  $\beta$ -Faltblätter diese tieffeldverschoben sind.<sup>[65]</sup> Die vorgestellten Werte sind insbesondere für größere Peptide oder Proteine von Interesse, jedoch für kleinere Peptide aufgrund der nicht präsenten Sekundärstruktureinheiten irrelevant.

Wie bereits im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, kann zwischen einer Aminosäure Xaa und Prolin eine *cis*-Peptidbindung stabilisiert werden. Die Konfiguration der Peptidbindung kann aus den  $C^\beta$ - und  $C^\gamma$ -Resonanzfrequenzen und charakteristischer NOE-Kreuzsignalen abgeleitet werden.

Die chemische Verschiebung des  $C^\gamma$  des Prolins wird durch die Konfiguration der Xaa-Pro-Peptidbindung beeinflusst. Diese Resonanz wird durch die stärkere Abschirmung im *cis*-Konformer hochfeldverschoben, wodurch sich eine größere Differenz  $\Delta\delta(C^\beta, C^\gamma)$  ergibt. Die Differenz für das *cis*-Konformer liegt bei 8-10 ppm, während für die *trans*-Konfiguration eine Differenz von 5-6 ppm gefunden wird.<sup>[66,67]</sup>

Charakteristische NOE sind ebenfalls hilfreich für die Identifikation einer *cis*-Xaa-Pro-Peptidbindung. So werden große NOE zwischen den  $H^\delta$  des Prolins und  $H^N$  sowie  $H^\alpha$  der vorherigen Aminosäure bei einer *trans*-Konfiguration gemessen. Liegt eine *cis*-Konfiguration vor, sind große NOE zwischen den Atomen  $H^\alpha$  des Prolins und  $H^N$  sowie  $H^\alpha$  der vorherigen Aminosäure zu finden.<sup>[63]</sup>

## 2.4.2 Temperaturgradient und Austausch der Amidprotonen

Der Temperaturgradient  $\Delta\delta/\Delta T$  der Amidprotonen ist von der Ausrichtung der N-H-Bindungsvektoren abhängig. So werden in DMSO Gradienten von kleiner als  $-4$  ppb  $K^{-1}$  für Amidprotonen gefunden, die zum Lösungsmittel exponiert sind. Sind die Amidprotonen hingegen vom Lösungsmittel abgeschirmt, werden Gradienten größer als  $-3$  ppb  $K^{-1}$  gemessen. In Wasser sind in der Regel die Gradienten betragsmäßig größer, zeigen jedoch

Tabelle 3: Parameter  $A$ ,  $B$  und  $C$  der Karplus-Funktion für verschiedene Kopplungskonstanten.

${}^3J$	Torsionswinkel	$A$	$B$	$C$	$\vartheta$
${}^3J_{\text{H}\alpha,\text{HN}}$	$\varphi$	6.4	-1.4	1.9	$\varphi - 60^\circ$ (L-AS)
${}^3J_{\text{H}\alpha,\text{HN}}$	$\varphi$	6.4	-1.4	1.9	$\varphi + 60^\circ$ (D-AS)
${}^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta 2}$	$\chi_1$	9.5	-1.6	1.8	$\chi_1 - 120^\circ$
${}^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta 3}$	$\chi_1$	9.5	-1.6	1.8	$\chi_1$
${}^3J_{\text{N},\text{H}\beta 2}$	$\chi_1$	-4.5	1.2	0.1	$\chi_1 + 120^\circ$
${}^3J_{\text{N},\text{H}\beta 3}$	$\chi_1$	4.5	1.2	0.1	$\chi_1 - 120^\circ$

die gleiche Tendenz.<sup>[68]</sup> Dieselben Informationen können durch Messung der Austauschgeschwindigkeit der Amidprotonen durch Deuterium gewonnen werden.<sup>[69]</sup>

Die Temperaturgradienten bzw. Austauschgeschwindigkeiten können auf inter- oder intramolekulare Wasserstoffbrücken hinweisen und als *restraints* in molekülmechanischen Rechnungen berücksichtigt werden. Sinnvoll ist dieses bei größeren Peptiden und Proteinen, findet bei kleinen Peptiden jedoch nur als Validierungskriterium Anwendung.

### 2.4.3 Skalare Kopplung

Skalare Kopplungskonstanten liefern wichtige Informationen über die Konstitution und räumliche Anordnung der Kerndipole. Die Größe der Kopplungskonstanten ist nicht nur von der Anzahl der beteiligten Bindungen abhängig, sondern auch von der Elektronenkonfiguration, Konstitution und Konformation. Karplus fand einen Zusammenhang zwischen den Kopplungskonstanten und den von den beteiligten Atomen gebildeten Torsionswinkel, die Karplus-Funktion:<sup>[70,71]</sup>

$${}^3J = A \cdot \cos^2 \vartheta + B \cdot \cos \vartheta + C \quad (22)$$

Die Parameter  $A$ ,  $B$  und  $C$  sind abhängig von den beteiligten Atomen. Empirisch ermittelte Werte für eine Auswahl an Kopplungskonstanten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.<sup>[68]</sup>

Die skalaren Kopplungskonstanten können durch eine Vielzahl von NMR-Experimenten bestimmt werden.<sup>[72]</sup> In molekularmechanischen Rechnungen können die Kopplungskonstanten als *restraints* direkt oder als Torsionswinkel*restraints* verwendet werden.<sup>[73,74]</sup>

Die Berechnung eines Torsionswinkels aus der Karplus-Funktion ergibt zum Teil mehrere Lösungen, während ein umgekehrtes Vorgehen eine Kopplungskonstante zu einem Torsionswinkel liefert. Wegen der Mehrdeutigkeit und der relativ großen Fehlerbreite der Funktion werden in dieser Arbeit die Kopplungskonstanten zur Validierung der Ergebnisse verwendet. Lediglich die DG-Rechnungen von Efrapeptin C wurden mit Kopplungskonstanten als Randbedingung ausgeführt.

#### 2.4.4 Kern-Overhauser-Effekt

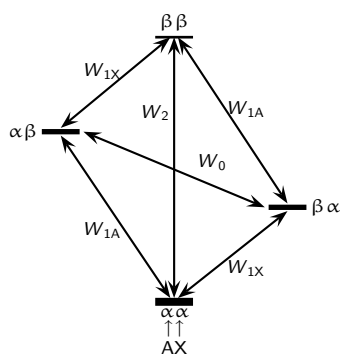


Abbildung 10: Energieniveauschema für ein AX-Zweispinsystem mit den Übergangswahrscheinlichkeiten für die Relaxation, wobei  $W_1$  Ein-,  $W_0$  Null- und  $W_2$  Doppelquantenübergänge entsprechen.

Der Kern-Overhauser-Effekt, kurz NOE, bewirkt Änderungen der Signalintensität durch dipolare Kopplung zweier benachbarter Kerndipole  $i$  und  $j$ . Er beruht auf Relaxationsphänomenen, die durch eine kontinuierliche Sättigung der Kernspinübergänge eines Kerns entstehen. Die so geschaffenen Besetzungsverhältnisse werden durch die Spin-Gitter-Relaxation ( $T_1$ ) ins Gleichgewicht zurück geführt.

In Abbildung 10 ist zur Erläuterung ein Energieniveauschema für ein AX-Zweispinsystem dargestellt, bei dem die Übergangswahrscheinlichkeiten durch  $W_1$  für Ein-,  $W_0$  für Null- und  $W_2$  für Doppelquantenübergänge eingezeichnet sind.<sup>[75]</sup> Die Wahrscheinlichkeiten  $W_1$  sind die erlaubten Übergänge, die auch durch elektromagnetische Wellen angeregt werden können. Für die Übergangswahrscheinlichkeiten  $W_0$  und  $W_2$

ändert sich die Orientierungsquantenzahl  $m$  um null oder zwei, weshalb sie für Anregungsprozesse verboten, für Relaxationen jedoch erlaubt sind. Die eingezeichnete Strichstärke ist ein Maß für die anfänglichen Besetzungszahlen im Gleichgewicht. Nach einer Sättigung der Übergänge des Kerns A während des NMR-Experiments sind die Niveaus  $\alpha\alpha$  und  $\beta\alpha$  sowie  $\alpha\beta$  und  $\beta\beta$  gleich besetzt. Dieses hat direkt keinen Einfluss auf die Signalintensität des Kerns X, jedoch relaxiert das System nun durch mögliche Null-



und Zweiquantenübergänge, was die Besetzungsunterschiede der Niveaus des Kerns X beeinflusst. Die Doppelquantenübergänge verstärken deren Intensität, während die Nullquantenübergänge diese verkleinern. Das Verhältnis beider Relaxationsprozesse ergibt die Verstärkung durch den Kern-Overhauser-Effekt.

Der Verstärkungsfaktor  $\eta$  ist abhängig von der Korrelationszeit  $\tau_c$ . Unter der Annahme, dass die Kerne ausschließlich nach dem dipolaren Mechanismus relaxieren und eine rasche Kernumorientierung (kurzes  $\tau_c$ ) vorherrscht, ist  $\eta$  definiert durch

$$\eta = \frac{\gamma_i}{2\gamma_j} = \frac{I - I_0}{I_0}. \quad (23)$$

$I_0$  entspricht der Signalintensität ohne NOE und  $\gamma$  den gyromagnetischen Verhältnissen der Kerne  $i$  und  $j$ . Die Korrelationszeit  $\tau_c$  entspricht der Dynamik des Moleküls und ist von der Temperatur, der Viskosität des Lösungsmittels und der Größe des Moleküls abhängig. Bei kleinen Molekülen mit kurzen  $\tau_c$  dominieren demzufolge die Zweiquantenübergänge, und der NOE ist positiv. In großen Molekülen mit langen  $\tau_c$  sind hingegen die Nullquantenübergänge effektiver, und der NOE ist negativ.

Aus der Differenz der Übergangswahrscheinlichkeiten  $W_0$  und  $W_2$  ergibt sich die longitudinale Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{ij}^{\text{NOE}}$ . Sie kann durch folgenden Zusammenhang berechnet werden

$$\sigma_{ij}^{\text{NOE}} = W_2 - W_0 = \frac{\gamma^4 \hbar^2 \tau_c}{10r_{ij}^6} \left( \frac{6}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - 1 \right). \quad (24)$$

Diese Gleichung hat einen Nulldurchgang, so dass kein NOE bei Molekülen mittlerer Größe bei entsprechender Feldstärke messbar ist (siehe Abbildung 11). Dipol-Dipol-Wechselwirkungen können in derartigen Molekülen durch den ROE bestimmt werden, der auf transversale Kreuzrelaxationen basiert und dessen Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{ij}^{\text{ROE}}$  keinen Nulldurchgang besitzt, daher immer observabel ist (siehe Abbildung 11) [76]

$$\sigma_{ij}^{\text{ROE}} = \frac{\gamma^4 \hbar^2 \tau_c}{10r_{ij}^6} \left( \frac{3}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + 2 \right). \quad (25)$$

Der Kern-Overhauser-Effekt liefert für die Konformationsanalyse die relevantesten Strukturinformationen, ist jedoch auf eine maximale Distanz zwischen den Kerndipolen von 500 pm beschränkt. Die Verstärkungseffekte sind proportional zu  $r_{ij}^{-6}$ , so dass durch Kali-

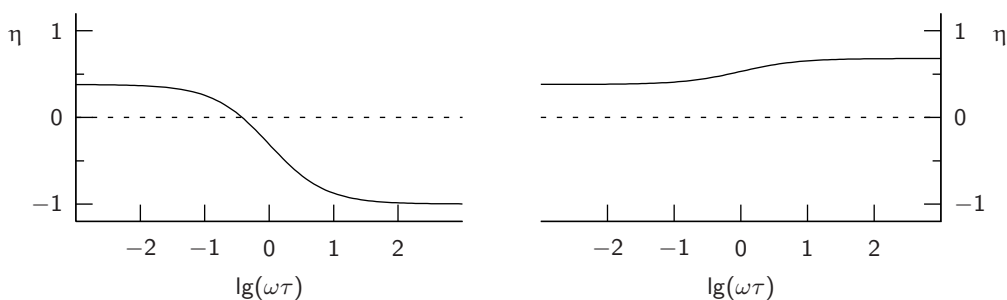


Abbildung 11: Verstärkungsfaktor  $\eta$  in Abhängigkeit von  $\omega\tau_c$  für NOE (links) und ROE (rechts).<sup>[77]</sup>

brierung der Signalintensitäten auf einen bekannten Referenzabstand atomare Distanzen berechnet werden können. Als Referenzabstand wird meist ein geminales Protonenpaar mit  $r_{\text{ref}} = 178$  pm gewählt, jedoch ist die Kalibrierung auch mit anderen raumfesten Protonen möglich. Die Kalibrierung erfolgt mit den Signalintegralen  $I$  durch die Gleichung

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \sqrt[6]{\frac{I_{\text{ref}}}{I_{ij}}}. \quad (26)$$

Dieser Funktion liegen folgende Vereinfachungen zugrunde:

- Das Molekül ist während des Austauschprozesses starr, so dass  $\tau_c$  der einzelnen Kerne konstant und ortsunabhängig ist.
- Die Wechselwirkung findet zwischen zwei Kernen statt (Zwei-Spin-Näherung).

Aufgrund dieser Näherungen besitzen die berechneten Abstände eine Toleranz von 5% bis 10% und fließen als obere Randbedingungen in die molekularmechanischen Rechnungen ein.<sup>[78]</sup>

Der Aufbau von NOE bzw. ROE folgt einer Exponentialfunktion. Die Misch- bzw. Spinlockzeiten sollten aus diesem Grund entsprechend kurz gewählt werden, um eine lineare Approximation zu gewährleisten.

Der ROE ist im Gegensatz zum NOE immer observabel, benötigt jedoch eine *Offset*-Korrektur, da durch das relativ schwache *Spinlock*-Feld eine Abhängigkeit des ROE vom Abstand zur Senderfrequenz entsteht.<sup>[79]</sup> Zusätzlich enthält ein ROE-Spektrum die Sig-

nalvolumina verfälschende TOCSY-Signale, weshalb zur Distanzberechnung aus Signalintensitäten nach Möglichkeit NOE-Spektren verwendet wurden.

Es ist nicht in jedem Fall möglich, diastereotope Protonen eindeutig zuzuordnen. Aus diesem Grund werden beim *molecular modelling* Pseudoatome konstruiert, die ein virtuelles Atom als Bezugspunkt für *restraints* darstellt. Die experimentell ermittelte Distanz wird dann durch einen dem Typ des Pseudoatoms spezifischen Wert korrigiert. Die Bezeichnung der Pseudoatome folgt in dieser Arbeit den Empfehlungen der IUPAC und verwendet die von GROMOS definierten Pseudoatomkorrekturen.<sup>[80]</sup> Hiernach werden Methylpseudoatome mit einem M (z. B. Methylprotonen des Ala:  $M^\beta$ ) und sämtliche anderen Pseudoatome mit einem Q symbolisiert (z. B. Methylenprotonen des Pro:  $Q^\beta$ ,  $Q^\gamma$  und  $Q^\delta$ ).

Ist die Zuordnung diastereotoper Protonen möglich, werden die Protonen nach der Empfehlung der IUPAC von 1970 als  $H^{\beta 2}$  und  $H^{\beta 3}$  bezeichnet.<sup>[81,82]</sup> Dies hat den Vorteil gegenüber der Angabe als Prochiralität (*proR* oder *proS*), dass sie unabhängig von der restlichen Seitenkette ist. Die Zuordnung erfolgt nach dem folgenden Schema für ein Kohlenstoffatom C mit den Substituenten X, Y, Z und Z' mit den Prioritäten  $X > Y > Z = Z'$ : Die Substituenten Z und Z' erhalten nun beim Blick entlang der X-C-Bindung die Nummern 2 und 3 so, dass Y, Z und Z' im Uhrzeigersinn angeordnet sind.

Die Zeitskala in der NMR-Spektroskopie ist lang im Vergleich zur thermischen Eigenbewegung der Molekülatome. Deshalb werden in NOE-Experimenten gemittelte Distanzen gemessen, die mehr als einer realen Konformation entsprechen können. Molekularmechnische Rechnungen führen so zu einer Struktur, die keiner der realen Konformationen entspricht und in einem Potenzialminimum gefangen sein kann. Dieses Problem kann mit der Verwendung von zeitabhängigen *restraints* gelöst werden, die nur im zeitlichen Mittel erfüllt sein müssen und dadurch das System bei der Anwendung von NMR-basierten Randbedingungen realistischer simulieren. In dieser Arbeit werden deshalb zeitabhängige *restraints* bei allen RMD-Rechnungen mit GROMOS96 verwendet.

### 2.4.5 Dipolare Restkopplung

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden Messtechniken der Festkörper-NMR-Spektroskopie im flüssigen Milieu etabliert. Die anisotropen NMR-Parameter, wie dipolare Kopplungen und chemische Verschiebungsanisotropie (CSA), würden sich in Lösung durch schnelle wahllose Reorientierung des Moleküls herausmitteln, im Festkörper sind sie dagegen omnipräsent. Durch eine partielle Ausrichtung des Moleküls in Lösung ist es möglich, die schnelle Reorientierung etwas zu unterdrücken. Mit dieser Methode ist nun die Messung von skalierbaren dipolaren Restkopplungen möglich (RDC).<sup>[83,84]</sup> Sie enthalten relevante Strukturinformationen, die in molekularmechanische Rechnungen einfließen können und grundsätzlich verschieden zu NOE-Kontakten sind. Diese neuen *restraints* sind deshalb zur Strukturaufklärung von Biomolekülen von großem Interesse. Ihre Anwendung verbessert zum einen die berechnete Struktur erheblich. So ist es nun möglich, Auflösungen von unter 0.2 nm mit NOE-Distanzen und RDC-Vektoren zu erhalten, was zuvor nur der Röntgenstrukturanalyse kleiner Moleküle vorbehalten war.<sup>[85]</sup> Zum anderen ist bei Nukleinsäuren, Proteinen mit mehreren Domänen und Oligosacchariden die Strukturanalyse überhaupt erst mit anisotropen NMR-Parametern möglich.

Die dipolare Restkopplung ist eine Konsequenz der Interaktion von zwei Kerndipolen und dem externen magnetischen Feld und wurde erstmals von Saupe und Englert beschrieben.<sup>[86,87]</sup> Der Betrag des durch die beiden Atome beschriebenen Vektors ist richtungsabhängig und manifestiert sich, wenn skalare Kopplungen zwischen beiden Atomen messbar sind, in einer Änderung dieser. Dipolare Restkopplungen können sowohl in heteronuklearen Spinsystemen, die über eine Bindung verbunden sind (z. B.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), als auch in homonuklearen Spinsystemen (z. B.  $\text{H}^{\text{N}}$ - $\text{H}^{\alpha}$ ) gemessen werden. Der mathematische Zusammenhang zwischen räumlicher Anordnung der Kopplungsvektoren und RDC ist<sup>[88]</sup>

$$D_{i,j(\theta,\varphi)} = -\frac{\mu_0 h \gamma_i \gamma_j S}{16\pi^3} \langle r_{i,j}^{-3} \rangle A_a \left( (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} R \sin^2 \theta \cos 2\varphi \right). \quad (27)$$

Der Ausrichtungstensor ist durch das molekülfeste Koordinatensystem  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$ ,  $A_{zz}$  definiert. Die axiale dimensionslose Komponente  $A_a$  bezieht sich auf die größte Komponente dieses Tensors, welche per Definition mit der  $z$ -Achse übereinstimmen muss. Die

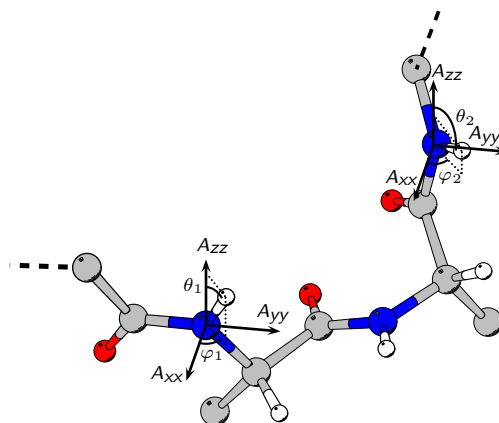


Abbildung 12: Orientierung zweier dipolarer Kopplungsvektoren zwischen  $H^N$  und  $N$  in einem Peptidabschnitt. Die Vektoren entsprechen den Bindungen zwischen den beiden Atomen, deren Winkel  $\theta_1$  und  $\varphi_1$  bzw.  $\theta_2$  und  $\varphi_2$  die Orientierung zum Ausrichtungstensor mit dem Achsensystem  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  und  $A_{zz}$  definieren.<sup>[89]</sup>

Rhombizität  $R$  des Tensors gibt die axial symmetrische Abweichung des Tensors wieder. Durch den generellen Ordnungsparameter  $S$  wird die Dynamik des Moleküls angegeben. Er kann durch Relaxationsexperimente bestimmt werden oder aber aufgrund der Erfahrung festgelegt werden. Der Wert für  $S$  liegt zwischen 0 und 1 und ein typischer, experimentell bestimmter Wert für die Rückgratatom einer ungeordneten Peptidstruktur ist  $0.77 \pm 0.07$ . Rückgratatom, die sich in einer stabilen Sekundärstruktur befinden, besitzen höhere Werte von  $0.89 \pm 0.03$ .<sup>[90]</sup> Seitenkettenatome besitzen aufgrund der höheren Mobilität dementsprechend geringere  $S$ -Werte.<sup>[91]</sup>  $\gamma_i$  und  $\gamma_j$  sind die gyromagnetischen Verhältnisse der beobachteten Kerne und  $\mu_0$  die magnetische Suszeptibilität. Die Winkel  $\theta$  und  $\varphi$  sind die Polarwinkel zur Beschreibung der Orientierung des Vektors im Koordinatensystem des Ausrichtungstensors (siehe Abbildung 12). Der mittlere Abstand zwischen den Kerndipolen  $i$  und  $j$  fließt mit  $r_{i,j}$  in die Funktion ein.

Mit Hilfe der Gleichung 27 kann die Orientierung des Vektors im Raum mit dem Ausrichtungstensor, der dipolaren Kopplung und dem Atomabstand berechnet werden. Sind beide koppelnden Atome miteinander verbunden, entspricht der Atomabstand dem Bindungsabstand. Es können auch dipolare Restkopplungen zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen bestimmt werden, bei denen dann mittlere Distanzen und Winkel verwendet werden.

Tabelle 4: Charakteristische dipolare Kopplungen  $D$  eines Peptidrückgrats.

Kerndipole	$D$ [kHz]
CH	47.9
NH	-24
HH	10-22
CC	4.9
CN	-2.0

Charakteristische Werte von dipolaren Kopplungen  $D$  sind für die Rückgratatom eines Proteins in Wasser in Tabelle 4 zusammengefasst. Aufgrund der erwarteten Linienbreite im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von ca. 10 – 20 Hz ist es daher wünschenswert, dipolare Restkopplungen auf wenige Hz mit Hilfe eines geeigneten Ausrichtungsmechanismus zu skalieren. Es ist so möglich, die RDC in hochaufgelösten NMR-Spektren zu detektieren. Die partielle Ausrichtung eines Moleküls beeinflusst ebenfalls die chemische Verschiebung von Kerndipolen (CSA). Die strukturellen Informationen, die hieraus gewonnen werden können, konnten von Cornilescu *et al.* an Ubiquitin angewandt werden.<sup>[92]</sup> Neben der CSA werden durch die Ausrichtung ebenfalls quadrupolare Wechselwirkungen für Kerne mit Spinquantenzahlen von  $I > \frac{1}{2}$  gefördert. Aufgrund dieses Effekts ist die Skalierung der Ausrichtung anhand der quadrupolaren Aufspaltung des Deuteriumsignals von  $\text{CDCl}_3$  möglich.<sup>[84]</sup>

Die partielle Ausrichtung eines Moleküls im magnetischen Feld kann mit drei unterschiedlichen Mechanismen erfolgen, mit einem externen magnetischen Feld, einem externen elektrischen Feld oder durch Ausrichtungsmedien. Bei der Verwendung eines magnetischen Feldes muss das Molekül ein permanentes magnetisches Dipolmoment oder eine magnetische Suszeptibilitätsanisotropie besitzen. Aufgrund der gestapelten Anordnung der aromatischen Ringe ist die Ausrichtung einer DNS-Doppelhelix stärker als bei diamagnetischen Proteinen.<sup>[47]</sup> Deshalb ist diese Methode zur Ausrichtung von DNS bzw. Protein-DNS-Komplexe sehr gut geeignet.<sup>[93]</sup> Die Ausrichtung von paramagnetischen Proteinen gelang Arnesano *et al.* mit reduziertem (diamagnetisch) und oxidiertem (paramagnetisch) Cytochrom  $b_{562}$ .<sup>[94,95]</sup> Eine Ausrichtung durch ein externes elektrisches Feld ist eigentlich nur bei Molekülen mit einem permanenten elektrischen Dipol möglich, da dieser den Effekt der elektrischen Polarisierbarkeit um mehrere Größenordnungen übersteigt. Mit diesem Mechanismus konnten Bonincontro *et al.* Lysozym im Abhängigkeit von der Temperatur und vom pH-Wert partiell ausrichten.<sup>[96]</sup>

Als partielle Ausrichtungsmedien zur Messung der RDC werden verschiedene Systeme verwendet. Eine Mischung aus Dihexanoylphosphatidylcholin (DHPC) und Dimyristoylphosphatidylcholin DMPC war das erste System und wurde von Sanders und Schwonek untersucht.<sup>[97]</sup> Bei Temperaturen von ca. 310 K bilden sich scheibenförmige Bizellen, die sich

im Magnetfeld ausrichten und dadurch für eine partielle Ausrichtung der zu untersuchenden Moleküle sorgen. Folgend wurden andere Flüssigkristallphasen entwickelt, die niedrigere Geliertemperaturen oder ein breites Temperaturspektrum besitzen und dadurch die Anwendung bei temperaturempfindlichen Proteinen ermöglichen. Ein anderes sehr einfach anwendbares Medium sind filamentöse Viren wie *fd* oder *Pf1*, die bei einer bestimmten Konzentration nematische Phasen bilden und so eine Ausrichtung induzieren.<sup>[98,99]</sup> Phagen und Bizellen richten sich parallel zum äußeren Magnetfeld aus. Eine orthogonale Ausrichtung kann mit dem Membranprotein Bacteriorhodopsin erfolgen, das ebenfalls für biologische Makromoleküle geeignet ist.<sup>[100,101]</sup> Neben dieser Auswahl existiert eine große Anzahl weiterer Medien für wässrige Systeme, die hier jedoch nicht weiter erörtert werden sollen.

In den letzten Jahren wurden Medien für organische Lösungsmittel etabliert. So können für apolare Lösungsmittel Flüssigkristalle wie Poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamat (PBLG) und deuteriertes 4-*N*-Pentyl-4'-cyanobiphenyl (PCBP) oder gestrecktes Polystyrol (PS) und Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet werden.<sup>[102–106]</sup> Für polare Lösungsmittel wie DMSO oder Methanol ist derzeit lediglich gestrecktes Poly(vinylacetat) (PVCA) nutzbar.<sup>[107]</sup>

Im Allgemeinen können RDC zwischen miteinander verbundenen Atomen einfacher bestimmt und verwendet werden, da hier der Abstand zwischen beiden Atomen konstant ist. Da die gemessene Kopplung zwischen zwei Kerndipolen  $J_{\text{exp}}$  die Summe der skalaren Kopplung  $J$  und der dipolaren Restkopplung  $D$  ist, ist es möglich das Vorzeichen von  $D$  direkt zu bestimmen, wenn das Vorzeichen von  $J$  bekannt ist. Da  $J$  bei einer schwachen Ausrichtung im Allgemeinen sehr viel größer ist als  $D$ , ist das Vorzeichens auch anhand der beobachteten Änderung von  $J_{\text{exp}}$  bestimmbar. Bei Peptiden sind die fünf RDC möglich ( $\text{NH}^{\text{N}}$ ,  $\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}$ ,  $\text{C}^{\alpha}\text{C}$ ,  $\text{CN}$  und  $\text{H}^{\text{N}}\text{C}$ ), die mit einer Vielzahl von NMR-Experimenten exakt bestimmt werden können.<sup>[108,109]</sup>

Die unterschiedlichen Typen der RDC können durch spezifische NMR-Experimente bestimmt werden. Zur Messung der RDC homonuklear koppelnder Kerndipole werden CO-SY-Experimente verwendet, für weitreichende dipolare Wechselwirkungen hat sich hier die DCOSY (*dipolar coupling spectroscopy*) bewährt.<sup>[110,111]</sup> Die dipolaren Restkopplungen verändern das Spektrum merklich, so dass zwischen Kernen, die skalar nicht koppeln, zusätzliche Korrelationssignale beobachtet werden. Die Kreuzsignale von skalar koppeln-

den Kernen werden wie oben beschrieben additiv durch die RDC beeinflusst. Eine sehr interessante Variante entwickelten Tian *et al.*, die mit CT-COSY (*constant time COSY*) die RDC anhand des Intensitätsverhältnisses zwischen Kreuzsignal und Diagonale ähnlich der Bestimmung von NOE-Distanzen aus NOE-Spektren bestimmen konnten.<sup>[112,113]</sup>

Dipolare Restkopplungen zwischen heteronuklearen Kerndipolen sind für die Konformationsanalyse von Peptiden und Proteinen von großem Interesse und werden mit modifizierten HSQC-Experimenten bestimmt. Die Modifikation beschränkt sich meist auf das Ausschalten der Entkopplung während der Evolutionsphase, kann jedoch auch weitreichender sein, wie z. B. *J*-modulierte HSQC-Spektroskopie.<sup>[114-118]</sup>

Die Ausrichtung des Vektors im Koordinatensystem entspricht einem deformierten Doppelkegel, da die Lösung der Gleichung 27 nicht eindeutig ist. Zu Beginn der Strukturuntersuchung muss die Orientierung und Größe des Tensors bekannt sein oder geschätzt werden.<sup>[119,120]</sup> Werden zusätzlich NOE-Distanzen verwendet, muss lediglich die Größe vorab bekannt sein, die Orientierung wird während der Strukturrechnungen bestimmt.<sup>[93,121]</sup> Es ist sinnvoll, zur Abschätzung der Tensorwerte verschiedene Typen der dipolaren Kopplungen zu verwenden um eine gute Näherung zu erhalten.

Die Größe des Ausrichtungstensors kann durch verschiedene Ansätze berechnet werden. Clore *et al.* erkannten, dass die Verteilung der RDC-Daten die Form des Tensors impliziert.<sup>[120]</sup> Aus einem Histogramm der RDC-Daten kann mit diesem Ansatz die axiale und die rhombische Komponente des Tensors errechnet werden. Die erhaltenen Werte sollten in der Regel nur als Startparameter verwendet werden. Warren und Moore stellten einen verbesserten Algorithmus vor, der basierend auf Energieminimierungsalgorithmen des *molecular modelling* die Komponenten des Tensors berechnet.<sup>[122]</sup> Eine systematische Suche basierend auf der 3D-Struktur des Moleküls wird mit dem Programm PALES durchgeführt.<sup>[121]</sup> Das Programm simuliert alle Möglichkeiten der Ausrichtung des Moleküls in ein Ausrichtungsmedium und berechnet hieraus unter Berücksichtigung hydrophober Wechselwirkungen den Tensor. Eventuell auftretende elektrostatische Wechselwirkungen sollen in nächster Zukunft bei den Berechnungen berücksichtigt werden. J. Meiler *et al.* schlugen die Konvertierung der RDC-Daten in sogenannte intervektorielle Projektionswinkel vor.<sup>[123]</sup> Der Vorteil dieser Methode ist die Verwendung des Kosinus zwischen den Vektoren als *restraints*, so dass sie unabhängig von einem zusätzlichen Koordinatensystem sind und die Größe des Ausrichtungstensors nicht bestimmen müssen.



Das Programm XPLOR-NIH berücksichtigt RDC-Daten durch eine quadratische Fehlerfunktion der Form

$$V_{\text{RDC}} = k_{\text{RDC}} \left( \langle D_{ij} \rangle_{\text{ber}} - \langle D_{ij} \rangle_{\text{exp}} \right)^2. \quad (28)$$

$\langle D_{ij} \rangle_{\text{ber}}$  sind die berechneten dipolaren Kopplungen,  $\langle D_{ij} \rangle_{\text{exp}}$  die experimentell bestimmten.  $k_{\text{RDC}}$  ist die Kraftkonstante. Dieser Pseudopotentialterm  $V_{\text{RDC}}$  wird während des *simulated annealing* minimiert.<sup>[124]</sup> Aufgrund der erhöhten Mobilität der Seitenkettenatome bietet sich die Verwendung eines halbgeöffneten Pseudopotentials an (siehe Gleichung 29).<sup>[118]</sup>

$$V_{\text{RDC}} = \begin{cases} k_{\text{RDC}} \left( \langle D_{ij} \rangle_{\text{ber}} - \langle D_{ij} \rangle_{\text{exp}} \right)^2 & \text{für } |\langle D_{ij} \rangle_{\text{ber}}| > |\langle D_{ij} \rangle_{\text{exp}}| \\ 0 & \text{für alle anderen} \end{cases} \quad (29)$$

Der Ausrichtungstensor wird durch ein Pseudomolekül aus vier Atomen simuliert, das ein zusätzliches Koordinatensystem repräsentiert. Die Orientierung dieses Pseudomoleküls wird während der Simulation kontinuierlich variiert, um eine möglichst gute Anpassung zu gewährleisten.

Die Konformationsanalyse mit der NMR-Spektroskopie ist durch den Einsatz anisotroper magnetischer Parameter revolutioniert worden. Insbesondere die dipolaren Restkopplungen bieten das Potential, hochaufgelöste Strukturvorschläge zu berechnen, so dass NOE-basierte Strukturbestimmungen in nächster Zeit obsolet werden könnten. Gerade für große Proteine wird diese Technik in Kombination mit TROSY (siehe Abschnitt 2.3.4.1) entscheidende Strukturinformationen liefern, da hier im Allgemeinen nur eine sehr limitierte Anzahl an NOE-Distanzen zur Verfügung stehen. Daneben ist diese Methode auch für das Studium von Nukleinsäuren oder anderen Makromolekülen in Lösung anwendbar.<sup>[125-127]</sup> Die RDC-*restraints* können in molekularmechanischen Rechnungen zum einen zur Strukturverfeinerung verwendet werden, wodurch die Qualität des berechneten Strukturvorschlag steigt. Zum anderen ist auch die *ab initio* Bestimmung einer Proteinstruktur auf der Basis von dipolaren Restkopplungen möglich.

## 2.5 Methoden der Konformationsanalyse

Zu Beginn der Konformationsanalyse müssen alle Kerndipole eindeutig zugeordnet werden. Dies gelingt meistens durch 2D-NMR-Experimente (siehe Abschnitt 2.3.3). Die konformationsrelevanten Parameter (siehe Abschnitt 2.4) können durch die Wahl geeigneter Pulsprogramme ermittelt werden und als Randbedingungen in den molekülmechanischen Rechnungen verwendet werden.

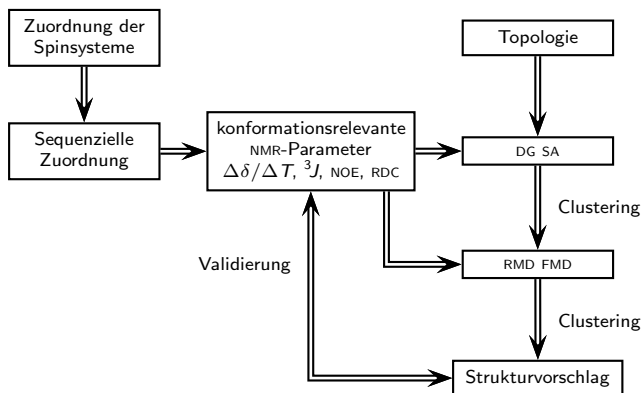


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Konformationsanalyse.

Die Startstruktur einer MD-Simulation ist von entscheidender Bedeutung und wird im Allgemeinen bei NMR-spektroskopischen Randbedingungen durch eine DG generiert. Eine Cluster-Analyse dieser generierten Strukturen wird entweder mit einem Distanz- oder Torsionswinkelkriterium durchgeführt und führt zu einer Startstruktur für die MD-Rechnungen.<sup>[77]</sup> Die MD-Simulationen sollten für eine ausreichende Simulationszeit erfolgen und explizite Solvensmoleküle berücksichtigen, um ein realistisches Modell des Moleküls zu erhalten. Das Aufzeichnen der Trajektorie für die spätere Analyse sollte bei MD-Rechnungen erst nach einer Äquilibrationszeit erfolgen. Eine abschließende FMD simuliert die Dynamik des aus der RMD erhaltenen Strukturvorschlags ohne experimentelle Randbedingungen und genügt dessen Validierung. Dieses ist als Schema in Abbildung 13 dargestellt.

Da es keine allgemein gültige Methode zur Konformationsanalyse gibt, muss sie dem jeweiligen System angepasst werden. Der in Abbildung 13 abgebildete Weg stellt viel-

mehr ein Grundgerüst dar, der im Rahmen dieser Arbeit in leicht modifizierten Formen verwendet und in den jeweiligen experimentellen Abschnitten beschrieben wird.

## 2.6 Molecular modelling

Das *molecular modelling* umfasst alle Untersuchungen an Molekülen, bei denen mathematische Methoden der theoretischen Chemie und der Vielteilchenphysik verwendet werden. Aufgrund des enormen Rechenaufwands basiert diese Methodik größtenteils auf Computern. Dieser Zusammenhang spiegelt sich ebenfalls in der simultan verlaufenden Entwicklung beider Bereiche wider. Das *molecular modelling* ist in jedem Teilbereich der Chemie in unterschiedlichen Formen präsent und ermöglicht die Visualisierung, Simulation und Manipulation von Stoffsystemen. Aufgrund des Umfangs dieses Teilbereichs wird im Folgenden der Schwerpunkt auf Konformationsanalysen von Biomolekülen gelegt.

### 2.6.1 Wirkstoffdesign

Die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs in der pharmazeutischen Forschung ist ein langwieriger und kostenintensiver Prozess. Die potentiellen Wirkstoffe für ein Therapieziel werden aus Stoffdatenbanken mit Naturstoffen oder Substanzen der kombinatorischen Chemie durch Aktivitäts- und Affinitäts-*screenings* identifiziert. Theoretische rechnergestützte Methoden können hier die Kosten und den Forschungsaufwand verringern, haben jedoch keinen Einfluss auf das mögliche Scheitern in präklinischen oder klinischen Phasen aufgrund schlechter ADMET-Eigenschaften (*adsorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity*), da diese Phase streng durch die Gesetzgebung geregelt ist und keine theoretische Studien zulässt.<sup>[128]</sup> Zu Beginn des Wirkstoffdesigns wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgrund der Konstitution und Konfiguration aufgestellt, doch stellte sich heraus, dass zuverlässige Aussagen über die Wirkung nur von der Konformation abgeleitet werden können. Die Konstitution und Konfiguration eines Wirkstoffs sollte deshalb mit dem Ziel einer definierten Konformation verändert werden.

Für das CADD werden derzeit zwei verschiedene Methoden verwendet. Ist die Struktur des Rezeptors oder Wirkorts bekannt, spricht man von direktem CADD, bei unbekann-

ter Struktur des Wirkorts hingegen von indirektem CADD. Beide Verfahren nutzen ihre eigenen Methoden und können komplementär eingesetzt werden.

Da beim indirekten CADD die Struktur des Wirkorts unbekannt ist, basiert diese Strategie auf die Analyse von bereits bekannten Liganden wie Naturstoffen oder Pharmakophoren. Das Ziel ist die Definition einer Leitstruktur, die strukturelle Gemeinsamkeit aller bekannten Liganden anhand von Ladungsverteilung, Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donoren und Raumerfüllung zu kombiniert. Die so gewonnene Leitstruktur kann anschließend als Basis für Substanzen fungieren, deren Aktivitätstests und Strukturuntersuchungen die Leitstruktur verifizieren. Wird ein guter Wirkstoff gefunden, kann dieser als Negativabdruck des Wirkorts verwendet werden (*receptor mapping*). Dieses Modell kann in einem direkten CADD zu einer besseren Leitstruktur führen.<sup>[129]</sup>

Kessler *et al.* etablierten das *spatial screening* zum Wirkstoffdesign in der Peptidchemie. Bei dieser Methode wird die konformationsinduzierende Wirkung einiger Aminosäuren in zyklischen Peptiden ausgenutzt, um die aktive Konformation der Erkennungssequenz zu bestimmen.<sup>[130,131]</sup> Für dieses Verfahren eignen sich beispielsweise D- und  $\beta$ -Aminosäuren. D-Aminosäuren bevorzugen die  $i+1$  Position einer  $\beta$ II'-Schleife und können den Konformationsraum in einem zyklischen Penta- oder Hexapeptid stark einschränken, so dass eine eindeutige Lösungsmittelkonformation vorliegt.<sup>[132,133]</sup> Durch einen D-Aminosäurescan, bei dem jede Aminosäure innerhalb der Wirksequenz eines zyklischen Peptides durch das D-Enantiomer ausgetauscht wird, kann die aktive Konformation analysiert werden. Daneben induzieren auch N-methylierte Aminosäuren bestimmte Konformationen.<sup>[134]</sup> Durch die N-Methylierung wird die Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konfiguration der Peptidbindung analog zu Xaa-Pro-Bindungen geringer.<sup>[135,136]</sup> Des Weiteren beeinflusst die sterische Hinderung und der Verlust der Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken die Konformationen entscheidend.<sup>[134]</sup> Sewald *et al.* konnten in dieser Folge zeigen, dass auch  $\beta$ -Aminosäuren bestimmte Konformationen (siehe Abschnitt 3.1.1) induzieren, und daher ebenfalls als Bausteine für das *spatial screening* geeignet sind.<sup>[137-140]</sup>

Steht für das CADD eine dreidimensionale Struktur des Wirkbereichs aus Röntgen-, NMR- oder auch Homologiedaten zur Verfügung, spricht man von direktem CADD. Bei dieser Methode bedient man sich verschiedener *Docking*-Algorithmen, um Substanzdaten-

banken durch ein *in silico screening* nach einem geeigneten Pharmakophor zu durchsuchen.<sup>[141]</sup> Ebenfalls möglich ist das *de novo* Design, das aus Fragmentdatenbanken innerhalb der Wirktasche neue Liganden generiert.<sup>[142–144]</sup>

## 2.6.2 Molekülmechanik

Die Schrödinger-Gleichung beschreibt die Bewegung der Elektronen und Atomkerne eines molekularen Systems und damit die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Teilchens in Abhängigkeit vom Energiezustand.<sup>[145]</sup> Folglich lässt sich die Struktur eines Moleküls durch Lösen der Schrödinger-Gleichung berechnen. In der Praxis ist dies jedoch nicht trivial, und sehr rechenaufwändig und daher nur für kleine Systeme anwendbar. Eine exakte Lösung der Gleichung ist schon bei einem Dreiteilchensystem wie  $\text{H}_2^+$  nicht mehr möglich, so dass sie durch die Born-Oppenheimer-Näherung, die aufgrund der relativen Massen die Wellenfunktion in eine Elektronen- und eine Kernwellenfunktion trennt, oder die Störungstheorie vereinfacht werden muss.<sup>[146]</sup>

Die *ab initio* Quantenmechanik löst die Wellenfunktion eines Moleküls durch Linearkombination der Atomorbitalwellenfunktionen. Die Energie des Systems und die Koeffizienten, die bei der Linearkombination verwendet werden, werden iterativ durch die *self consistent field* (SCF) Methode berechnet. Da dieses Vorgehen sehr rechenintensiv ist, werden in der Praxis Basissätze für Wellenfunktionen mit bereits berechneten Sätzen von Koeffizienten und Exponenten verwendet. Die Qualität der berechneten Molekülwellenfunktion hängt dann von der Wahl und Anzahl der zur Verfügung gestellten Basissätze ab.

Eine Variation der *ab initio* Methode ist die Dichtefunktionaltheorie (DFT), bei der Austausch- und Korrelationsfunktionale zur Berechnung der Elektronenkorrelationsenergien zusätzlich berücksichtigt werden, die bei herkömmlichen *ab initio* Verfahren nicht berechnet werden.<sup>[147]</sup> Die DFT basiert auf der Verwendung von Elektronendichtefunktionen zur Beschreibung des elektronischen Systems. Die verschiedenen Anwendungen dieser Theorie unterscheiden sich in der Verwendung der Elektronenkorrelationsenergien. Der Rechenaufwand für DFT-basierte Rechnungen ist ebenso groß wie für *ab initio* Methoden, doch besitzen sie meist eine höhere Präzision.

Bei semiempirischen Methoden werden die Parameter für die Interaktionen zwischen den Atomorbitalen nicht mehr explizit berechnet, sondern einem Satz vordefinierter Parametern entnommen, die die Form und Energie der Atomorbitale festlegen. Die Parameter werden von experimentellen Daten abgeleitet und liefern in der Regel gute Resultate bei reduziertem Rechenaufwand.

Eine alternative Methode zu den *ab initio* und semiempirischen Verfahren ist die Molekülmechanik, die auch unter dem Namen Kraftfeldmethode bekannt ist. Mit dieser wird die potentielle Energie eines Systems basierend auf der Born-Oppenheimer-Näherung ausschließlich aus den Koordinaten der Atomkerne mit Hilfe von Kraftfeldern berechnet. Die Elektronen werden durch implizite Parameter im Kraftfeld berücksichtigt. Das Molekül wird als mechanischer Körper angesehen, dessen Atome Massezentren sind, die durch Federn miteinander verbunden sind. Dieses ermöglicht die Anwendung einfacher physikalischer Gesetze der Newtonschen Mechanik zur Berechnung der potentiellen Energie. Beiträge der Bindungslängen, -winkel, Torsionswinkel und nichtkovalenten Wechselwirkungen werden empirisch ermittelt und als Parameter in einem Kraftfeld durch Funktionen verwendet (siehe Abbildung 14).

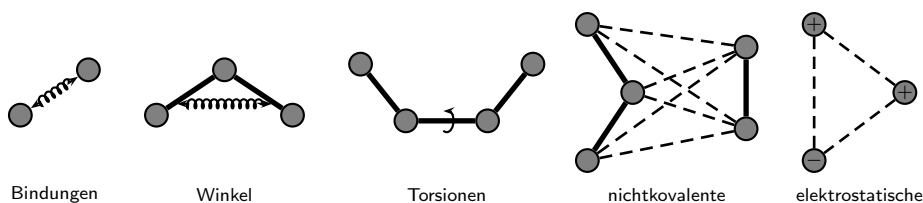


Abbildung 14: Die Komponenten der berechneten Gesamtenergie für die meisten Kraftfelder.

### 2.6.2.1 Kraftfelder

Eine Vielzahl an Kraftfeldern wurde für spezielle Aufgabenbereiche entwickelt und mit dem Ziel parametrisiert, in diesem Bereich die experimentellen Daten möglichst exakt zu berechnen und zu reproduzieren. Grundlegend für die Parameter sind in vielen Fällen *ab initio* Rechnungen. Die Parameter werden in der Regel im Laufe der Zeit iterativ verbessert.

Die analytische Form eines Kraftfelds ist vom verwendeten Kraftfeld selbst abhängig, doch ist allen Kraftfeldern gemein, dass sie sich additiv aus Partialtermen zusammensetzen. Die Partialterme sind in der Regel Strafterme, die die Abweichung von experimentell bestimmten Daten mit einer Kraftkonstante gewichten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kraftfeld GROMOS96 verwendet, dessen Parameter für Simulationen von Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden und DNS optimiert sind. Im Folgenden wird dieses Kraftfeld repräsentativ für alle Kraftfelder näher betrachtet.

#### GROMOS

Die potentielle Energie  $V$  eines Systems in Abhängigkeit von den Kernkoordinaten  $\vec{r}$  und den Kraftfeldparametern  $s$  setzt sich additiv aus den physikalischen  $V_{\text{phys}}$  und speziellen potentiellen Energie  $V_{\text{spez}}$  zusammen:

$$V(\vec{r}, s) = \underbrace{V_{\text{kov}}(\vec{r}, s) + V_{\text{nkov}}(\vec{r}, s)}_{V_{\text{phys}}(\vec{r}, s)} + V_{\text{spez}}(\vec{r}, s). \quad (30)$$

Beiträge zu den speziellen potentiellen Energien liefern nichtphysikalische Atominteraktionen wie Distanz-, Torsionswinkel- oder *4D-restraints*. Die physikalische Komponente entspricht den Bindungsenergien  $V_{\text{kov}}$  mit Termen für die Bindungslängen, -winkel, Torsionswinkel und unangemessenen Torsionen (*improper torsions*),

$$V_{\text{kov}}(\vec{r}, s) = V_{\text{Bindung}}(\vec{r}, s) + V_{\text{Winkel}}(\vec{r}, s) + V_{\text{Torsion}}(\vec{r}, s) + V_{\text{Improper}}(\vec{r}, s) \quad (31)$$

sowie den Energien aus nichtkovalenten Interaktionen  $V_{\text{nkov}}$  wie van-der-Waals- oder elektrostatischen Wechselwirkungen

$$V_{\text{nkov}}(\vec{r}, s) = V_{\text{vdW}}(\vec{r}, s) + V_{\text{elektro}}(\vec{r}, s). \quad (32)$$

GROMOS96 verwendet modifizierte harmonische Federgleichungen für die Strafterme, deren Kraftkonstanten den jeweiligen Parametern angepasst sind. Die potentielle Gesamtenergie eines Systems mit Ausnahme der speziellen Energien  $V_{\text{spez}}$  wird mit der Gleichung

$$\begin{aligned}
V(\vec{r}_N) = & \underbrace{\sum_l \frac{1}{4} k_l (l^2 - l_0^2)^2}_{\text{Bindungspotential}} + \underbrace{\sum_{\vartheta} \frac{1}{2} k_{\vartheta} (\cos \vartheta - \cos \vartheta_0)^2}_{\text{Winkelpotential}} \\
& + \underbrace{\sum_{\psi} k_{\psi} (1 + \cos \delta \cos(m\psi))}_{\text{Torsionspotential}} + \underbrace{\sum_{\xi} \frac{1}{2} k_{\xi} (\cos \xi - \cos \xi_0)^2}_{\text{Improperpotential}} \\
& + \underbrace{\sum_{i < j} \sum \left[ \frac{C_{12,ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{6,ij}}{r_{ij}^6} \right]}_{\text{Lennard-Jones-Potenzial}} + \underbrace{\sum_{i < j} \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}}}_{\text{Coulomb-Potenzial}} \quad (33)
\end{aligned}$$

berechnet. Die Gleichgewichtswerte sind mit dem Index 0 versehen und für kovalente Bindungen  $l_0$ , Bindungswinkel  $\vartheta_0$  und unangemessenen Torsionen  $\xi_0$  definieren sie das Potenzialminimum und werden wie die jeweiligen Kraftkonstanten  $k_l$ ,  $k_{\vartheta}$ ,  $k_{\psi}$  und  $k_{\xi}$  durch das Kraftfeld definiert. Die Phasenverschiebung  $\delta$  und Periodizität  $m$  sind vom jeweiligen Torsionswinkel  $\psi$  abhängig. So besitzt eine C-C-Einfachbindung die Werte  $\delta = 0$  und  $m = 3$  zur Generierung eines Energieprofils mit drei Minima bei  $60^\circ$ ,  $180^\circ$  und  $270^\circ$ . Eine Peptidbindung hat hingegen mit  $\delta = 180^\circ$  und  $m = 2$  zwei Minima bei  $0^\circ$  und  $180^\circ$ . Die Lennard-Jones-Parameter  $C_{12}$  und  $C_6$  sowie die Atomladungen sind ebenfalls durch das Kraftfeldes parametrisiert.

Unangemessene Torsionen, sogenannte *improper torsions*, sind Torsionswinkel zwischen vier Atomen, die nicht in Reihenfolge miteinander kovalent verbunden sind. Verwendet werden sie vor allem zur Fixierung einer Geometrie wie die Chiralität eines Atoms oder die Planarität einer partiellen Doppelbindung. So wird mit einem Wert von  $\xi_0 = 0$  die Planarität der Peptidbindung für die Atome C-C $^\alpha$ -N-O gewährleistet und die Chiralität des C $^\alpha$  in L-Aminosäuren durch  $\xi_0 = 35,26^\circ$  für die Atome C $^\alpha$ -N-C-C $^\beta$ .

Die nichtkovalenten Interaktionen sind abhängig von der Distanz zwischen den wechselwirkenden Atomen. Die van-der-Waals-Wechselwirkungen setzen sich aus einem repulsiven und einem dispersiven Anteil zusammen, besitzen eine kurze Reichweite und werden mit einem Lennard-Jones-Potenzial der allgemeinen Form

$$V(r) = k\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^n - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^m \right] \quad \text{mit} \quad k = \frac{n}{n-m} \left( \frac{n}{m} \right)^{\frac{m}{n-m}} \quad (34)$$



berechnet. Der  $r^{-n}$ -abhängige Term ist der Repulsionsterm und der  $r^{-m}$ -abhängige der Dispersionsterm. GROMOS verwendet ein atomtypspezifisches zweiparametrisches 12-6-Potential, d. h.  $n = 12$  und  $m = 6$ . Die weitreichenden Coulomb-Wechselwirkungen basieren auf den Partialladungen, die als Punktladungen an den Atomkoordinaten lokalisiert sind. Die Partialladungen können mit einer Vielzahl an Methoden berechnet werden, doch ist die Methode von Gasteiger und Marsili die meist genutzte, da sie rasch auch für große Systeme sinnvolle Ergebnisse liefert.<sup>[148]</sup>

### 2.6.3 Energieminimierung

Die Energieminimierung ist eine mathematische Geometrieoptimierung zum Auffinden eines Minimums auf der Energiehyperfläche, die durch das Kraftfeld berechnet wird. Ausgehend von einer Startstruktur versucht der Algorithmus die potentielle Energie schrittweise zu minimieren und alle auf die Atome wirkenden Kräfte auszubalancieren. Dieses führt zu dem Problem, dass das System nur in das nächstgelegene Energieminimum gelangt. Das Erreichen des globalen Minimums kann kein derzeit bekannter Algorithmus garantieren.

Die Energieminimierungsalgorithmen unterscheiden sich in ihrer Komplexität und Effizienz. Allen gemein ist ihr iterativer und numerischer Ansatz, da die Energiehyperfläche viele Variablen besitzt und komplex ist. Da dieser Ansatz unendlich wiederholt würde, gibt es ein Konvergenzkriterium, welches die Energieminimierung terminiert.

Die meistgenutzten Methoden zur Energieminimierung von Biomolekülen sind *steepest descent*, *conjugate gradients* und Newton-Raphson. Die ersten beiden sind Methoden, die die erste Ableitung der Energie nach den kartesischen Koordinaten, also Gradienten, zur Suche nutzen. Die Newton-Raphson-Methode ist wesentlich rechenaufwändiger, da sie zusätzlich die zweite Ableitung nutzt und somit Informationen über die Krümmung der Energiehyperfläche auswertet. Dies führt zu einer extrem schnellen Konvergenz innerhalb weniger Iterationen, da sich durch die Krümmungsinformationen die Richtungsänderung des Gradienten vorrausberechnen lässt. Sie wird allerdings aufgrund des Rechenaufwands bei großen Systemen nicht angewandt und von dem in dieser Arbeit benutzten GROMOS96 nicht angeboten.

Die *steepest descent* Methode wählt für die Minimierungsrichtung auf der Energiehyperfläche den steilsten Gradienten. Die Bewegung ist auf eine Dimension mit definierter Schrittweite reduziert. Ist das erste Minimum erreicht, bewegt sich das System orthogonal zum zuvor bestimmten Gradienten weiter. Dieser Algorithmus ist nicht effektiv, und es kommt häufig zu Oszillationen im Bereich des Minimums. Ein entscheidender Vorteil ist jedoch, dass er extrem robust ist und daher auch Startstrukturen weit abseits eines Minimums verarbeitet.

Das Problem der orthogonal zueinander stehenden Gradienten wird durch die *conjugate gradients* Methode umgangen. Bei dieser Methode wird die Richtung nach jedem Schritt neu bestimmt und konjugiert mit allen vorherigen. Die Berechnung der Richtung bevorzugt dabei besonders steile Gradienten. Der Vorteil dieser Methode ist die Effizienz und die Unterdrückung von Oszillationen in der Nähe des Minimums, wie sie bei *steepest descent* auftreten können.

## 2.6.4 Moleküldynamik

Die ersten Moleküldynamiksimulationen wurden zum Studium von Flüssigkeiten von Alder und Wainwright bereits in den 50er Jahren des vorherigen Jahrhunderts durchgeführt.<sup>[149,150]</sup> Die Dynamik eines Biomoleküls, des bovinen pankreatischen Trypsin-inhibitors, wurde erstmals von McCammon *et al.* im Jahre 1977 durchgeführt.<sup>[151]</sup> Dies war der Beginn einer rapiden Entwicklung der MD, welche eng mit der Entwicklung von leistungsstarken Computern verknüpft ist. Erstmals war es möglich, das starre Bild der bis dahin dominanten Röntgenstrukturen zu relativieren.

Die MD basiert auf die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen:

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial t^2}. \quad (35)$$

Dadurch wird eine Trajektorie erhalten, die Koordinaten in Abhängigkeit von der Zeit enthält und das System als realistisches Modell in nativer Umgebung wiedergibt. Die Integration erfolgt immer bei mehr als zwei Körpern aufgrund der Komplexität numerisch und ist deterministisch, d. h. die Simulation wird in gleich große Zeitintervalle  $\delta t$

unterteilt und die Koordinaten des folgenden Zeitpunkts aus denen des vorherigen errechnet. Die meistgenutzten Integrationsalgorithmen sind der Verlet- und der *leap-frog*-Algorithmus.<sup>[152,153]</sup> Der Verlet-Algorithmus hat den Nachteil, dass er die Geschwindigkeiten nicht explizit berücksichtigt und diese jeweils neu aus den Koordinaten und den Beschleunigungen berechnet werden müssen. Dieses Problem ist durch den *leap-frog*-Algorithmus behoben worden, der in dieser Arbeit von GROMOS96 ausschließlich verwendet wird.

Die Systemtemperatur bei MD-Rechnungen ist ein relevanter Parameter, da hierdurch dem System die notwendige Energie zur Verfügung gestellt wird, um Energiebarrieren zu überwinden und ein lokales Minimum zu verlassen. Die Erfassung des Konformationsraums durch eine MD-Simulation wird mit steigender Simulationstemperatur wahrscheinlicher. Des Weiteren sollte die Temperatur während einer Simulation konstant gehalten werden, um konformationelle Informationen bei einer gewünschten Temperatur sammeln zu können.

Das Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilungsgesetz der kinetischen Gastheorie gibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit  $v$  eines Teilchens mit der Masse  $m$  bei der Temperatur  $T$  an. Die Wahrscheinlichkeit  $f(v_{x,i})$ , dieses Teilchen bei der Temperatur  $T$  anzutreffen, ist

$$f(v_{x,i}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \cdot e^{-\frac{m_i v_{x,i}^2}{2kT}}. \quad (36)$$

Zu Beginn einer Simulation werden den Atomen auf Grundlage der Gleichung 36 und des Zufallszahlengenerators Impulse zugeordnet. Die Temperatur während der Simulation kann durch Skalieren ihrer Geschwindigkeiten mit einem Faktor

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{\text{Simulation}}}{T(t)}} \quad (37)$$

konstant gehalten werden. Berendsen *et al.* etablierten die in der Praxis gebräuchliche Methode der Kopplung des Systems an ein externes Wärmebad, welches der gewünschten Simulationstemperatur entspricht.<sup>[154]</sup> Das externe Bad agiert dabei als Reservoir für thermische Energie, das dem System diese zuführen als auch entnehmen kann. Wäh-

rend jedes Rechenzyklus werden die Geschwindigkeiten neu skaliert, der Ausgleich ist proportional zur Temperaturdifferenz zwischen Bad und System:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_{\text{Bad}} - T(t)). \quad (38)$$

Der Parameter  $\tau$  erlaubt es, die Kopplung des Systems an das Bad zu variieren. Der Skalierungsfaktor für die Geschwindigkeiten ergibt sich mit Gleichung 38 aus

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left( \frac{T_{\text{Bad}}}{T(t)} - 1 \right). \quad (39)$$

Ist der Kopplungsparameter  $\tau = \delta t$ , geht der Algorithmus in Gleichung 37 über. Eine schwache Kopplung mit dem Bad wird durch ein großes  $\tau$ , eine starke durch ein kleines  $\tau$  bewirkt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Systemtemperatur während der Simulation weniger schwankt.

Analog zur Kopplung des Systems an ein Temperaturbad kann das System für isobare Simulationen auch an ein externes Druckbad gekoppelt werden. Hier erfolgt die Anpassung des Systemvolumens und der Atomkoordinaten ebenfalls nach der von Berendsen *et al.* vorgeschlagenen Methode.<sup>[154]</sup>

### 2.6.5 Reduktion des Rechenaufwands im *molecular modelling*

Eine Trajektorie enthält die zeitliche Simulation eines Systems. Durch verschiedene Ansätze können ihr durch Mittelung oder *clustering* relevante Eigenschaften entnommen werden. Daher sollte die Simulationsdauer in Bezug auf die gewünschte makroskopische Eigenschaft ausreichend groß sein, um sinnvolle Werte zu erhalten. Die bisher vorgestellten Algorithmen sind jedoch sehr rechenintensiv, so dass verschiedene Ansätze existieren, um die Effizienz bei gleicher Genauigkeit zu erhöhen. Diese Methoden lassen sich nach van Gunsteren in die folgenden Gruppen einteilen:<sup>[155]</sup>

- Reduktion der Freiheitsgrade
- Reduktion der interatomaren Wechselwirkungen durch effiziente Nachbaratombestimmung

- Integrationsschrittverlängerung
- effizientes Durchsuchen des Konformationsraums mit verbesserten Algorithmen
- Potenzialfunktionsdeformation, Verkleinerung von Energiebarrieren
- Systemparameterskalierung
- verbesserte Computerarchitektur

Im Folgenden werden einige der verwendeten Methoden näher erläutert.

### 2.6.5.1 Reduktion der Freiheitsgrade

GROMOS nutzt die *united atom* Methode zur Reduktion der Freiheitsgrade. Mit diesem Ansatz werden nichtpolarisierte Wasserstoffatome einer C-H-Bindung nicht explizit berücksichtigt. Die Methin-, Methylen- und Methylgruppen werden auf einen Massenschwerpunkt reduziert, wodurch ein neuer Atomtyp mit angepasster Masse und van-der-Waals-Radius definiert wird. Dieser Ansatz erfordert jedoch bei der Verwendung von *NMR-restraints* die Konstruktion von virtuellen Atomen.

Die Umgebung des betrachteten Moleküls ist von entscheidender Bedeutung für die Resultate des *molecular modelling* und hat großen Einfluss auf die Struktur. Ein System mit unendlicher Ausdehnung wäre ideal zur Strukturanalyse, doch unmöglich praktisch zu erfassen. Aus diesem Grund ist das *molecular modelling* nur innerhalb eines begrenzten Simulationsvolumens möglich, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können. Für Biomoleküle ist es unrealistisch, sie im Vakuum zu simulieren, da dies zu einer Überbewertung der nichtkovalenten Wechselwirkungen führt. Die Simulation im Kontinuum mit konstanter Dielektrizitätskonstante simuliert eine native Umgebung des Moleküls ebenfalls nicht realistisch. Die explizite Berücksichtigung von Solvensmolekülen während MD-Simulationen ist zwar eine aufwändige Methode, doch erlaubt sie eine realistischere Simulation nativer Umgebungen. Eine Zelle mit definierter Geometrie bildet das Gesamtsystem, welches zur Reduktion des Rechenaufwands möglichst klein gehalten wird. Um Randeffekte zu vermeiden, werden periodische Randbedingungen eingeführt, d. h. es existieren Kopien der Zelle in alle Raumrichtungen. Durch Symmetrieoperationen

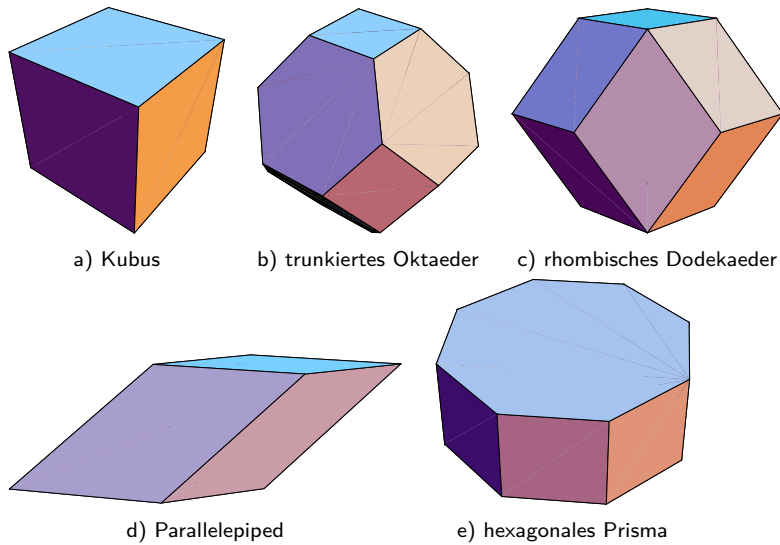


Abbildung 15: Gebräuchliche Simulationszelligeometrien.

wechselwirken die Atome in den Randbereichen der Zelle mit den Atomen des Symmetrienachbars. Ein entscheidendes Kriterium für die Wahl der Zellegröße ist der Abstand jedes Atoms zu dessen Spiegelbildern. Dieser muss größer sein als der *cutoff* für die nicht-kovalenten Wechselwirkungen, da sonst ein Atom mit sich selbst interagieren würde.

Für die Simulationszelle werden meist Polyeder gewählt, die der Form des zu untersuchenden Moleküls entsprechen. Der Kubus, das Parallelepiped, das hexagonale Prisma, das rhombische Dodekaeder und das abgestumpfte Oktaeder werden häufig bei MD-Simulationen verwendet. Sie sind in Abbildung 15 abgebildet. Das rhombische Dodekaeder und das abgestumpfte Oktaeder bieten sich für Simulationen von Peptiden und globulären Proteinen an, während gestreckte Strukturen wie DNS-Doppelstränge oder Faserproteine vorzugsweise in einem hexagonalen Prisma oder Parallelepiped simuliert werden sollten.

### 2.6.5.2 Reduktion der interatomaren Wechselwirkungen

Die Doppelsumme der nichtkovalenten Interaktionen in Gleichung 33 zeigt, dass über alle Atomepaare summiert wird, wodurch ein immenser Rechenaufwand notwendig ist. Dieser kann durch zwei Methoden wesentlich verringert werden. Zum einen werden die Atomnachbarn erster und zweiter Ordnung, d. h. das direkt gebundene Atom und das folgende, bei den Rechnungen ausgeschlossen. Handelt es sich nicht um ein aromatisches System, werden zusätzlich auch die Nachbarn dritter Ordnung vernachlässigt. Zum anderen skalieren die elektrostatischen Interaktionen mit  $r^{-1}$  und sind deshalb sehr weitreichend. Da nun in einem System nicht jede elektrostatische Interaktion zwischen jedem Atompaar sinnvoll ist, wird eine *cutoff*-Funktion  $S_{ij}$  eingefügt, und die nichtkovalente potentielle Energie wird durch

$$V_{\text{nkov}}(\vec{r}_N) = S_{ij} \cdot \left[ \sum_{i < j} \sum \left( \left[ \frac{C_{12,ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{6,ij}}{r_{ij}^6} \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} \right) \right] \quad (40)$$

berechnet. Die Funktion definiert einen Radius um ein Atom innerhalb dessen die Interaktionen berechnet werden. Die Interaktionen mit Atomen außerhalb dieses Radius sind Null. Der *cutoff* korreliert mit der Geometrie der Simulationszelle, beides sollte deshalb aufeinander abgestimmt sein.

### 2.6.5.3 Integrationsschrittverlängerung durch *constrained MD*

Die MD-Simulation ist eine komplexe Überlagerung von verschiedenen Bewegungen. Die hochfrequenten Bewegungen wie Bindungsvibrationen der C-H Bindung ( $\nu \approx 10^{14} \text{ s}^{-1}$ ) sind häufig von geringerem Interesse als die Schwingungen, die zu konformationellen Änderungen führen. Der Zeitintervall der Rechnung wird durch die Schwingung mit der höchsten Frequenz bestimmt, um Integrationsinstabilitäten zu vermeiden. Die nicht relevanten Bindungsabstände können durch *constraints* fixiert werden, wodurch das Zeitintervall vergrößert werden kann und Rechenzeit gespart wird.

Für die Einführung von *constraints* während der MD-Simulation existieren die beiden Algorithmen SHAKE und RATTLE.<sup>[156,157]</sup> Leimkuhler und Skeel zeigten, dass beide zu

identischen Ergebnissen bezüglich der Koordinaten und sehr ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Impulse führen.<sup>[158]</sup> Das verbreitetste Verfahren ist SHAKE, das nach der Integration die Koordinaten iterativ so anpasst, dass alle *constraints* innerhalb einer geringen Toleranz erfüllt sind. Der erhöhte Rechenaufwand für SHAKE wird durch das zwei- bis vierfache Zeitintervall mehr als ausgeglichen. Das Zeitintervall sollte für Rechnungen ohne *constraints* maximal 1 fs besser 0.5 fs betragen. Durch die Anwendung von SHAKE kann das Intervall problemlos auf 2 fs erhöht werden.



# 3

## Konformationsanalyse von Efrapeptin C

### 3.1 Nichtproteinogene Aminosäuren

Neben den 22 DNS-kodierten Aminosäuren kommen in natürlichen Polypeptiden häufig auch andere Aminosäuren und Verbindungen ähnlichen Typs vor. Sie können enzymatisch durch Stoffwechselreaktionen oder Modifikationen von Aminosäuren gebildet werden. Im Stoffwechsel werden beispielsweise D- oder  $\beta$ -Aminosäuren, aber auch  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren der nicht-ribosomalen Peptidsynthese zur Verfügung gestellt. Daneben existieren die biogenen Amine, die durch Decarboxylierung von  $\alpha$ -Aminosäuren entstehen. Zu diesen Typ gehört z. B. das Dopamin, das aus der seltenen Aminosäure L-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) gebildet wird, und das  $\beta$ -Alanin, das aus Aspartat synthetisiert wird und auch in Coenzym A enthalten ist.

Die Veränderung der Seitenketten in Proteinen nach deren Biosynthese wird posttranslationale Modifikation genannt und betrifft meist polare Aminosäuren. Zu den wichtigs-

ten Modifikationen gehören die Acylierung, Glycosylierung, Phosphorylierung,  $\gamma$ -Carboxylierung, Acetylierung und Hydroxylierung. Außerdem kann eine Markierung mit Ubiquitin für die Proteolyse erfolgen. Cysteinreste können sowohl durch eine Disulfidbrückenbildung miteinander verknüpft werden als auch mit hydrophoben Gruppen verbunden werden (z. B. Prenylierung).

### 3.1.1 $\beta$ -Aminosäuren

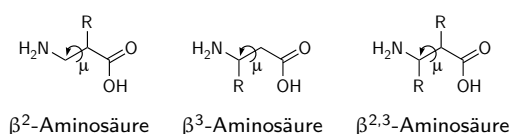


Abbildung 16: Verschiedene Typen der  $\beta$ -Aminosäuren

Bei den  $\beta$ -Aminosäuren befindet sich die Aminogruppe im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Aminosäuren nicht am  $C^\alpha$ , sondern am  $C^\beta$ . Somit befindet sich eine zusätzliche Methylengruppe zwischen der Carboxyl- und der Aminogruppe. Die Kon-

figuration des Peptidrückgrats wird nun durch einen zusätzlichen Torsionswinkel  $\mu$  beschrieben, definiert durch die Atome  $N-C^\beta-C^\alpha-C$ .  $\beta$ -Aminosäuren werden durch die Position der Substitutionen an  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  unterschieden. So werden sie in monosubstituierte  $\beta^2$ - und  $\beta^3$ - bzw. disubstituierte  $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren unterteilt (siehe Abbildung 16).

Die Trivialnamen leiten sich oft von denen der  $\alpha$ -Aminosäuren ab. Als Präfix wird dann „Homo“ verwendet, das eine zusätzliche Methylengruppe zwischen der Carbonylgruppe und der proteinogenen Seitenkette der zugrunde liegenden  $\alpha$ -Aminosäure symbolisiert.

Naturstoffe, die  $\beta$ -Aminosäuren enthalten, werden vorwiegend von Mikroorganismen produziert und besitzen meist eine antibakterielle oder toxische Wirkung. Als Beispiele seien hier Paclitaxel, Cryptophycine und Destruxine genannt. Das Paclitaxel aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* ist ein unter dem Namen Taxol kommerziell vertriebenes Chemotherapeutikum in der Tumorthherapie.<sup>[159]</sup> Aus den Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* können die Cryptophycine isoliert werden. Diese Depsipeptide sind ebenfalls von großem Interesse für die Tumorforschung.<sup>[160]</sup> Die Destruxine sind  $\beta$ -Alanin-haltige zyklische Hexadepsipeptide mit insektizider und immunsuppressorerischer Wirkung, isolierbar aus den Pilzen *Oospora destructor* und *Metarrhizium anisopliae*.<sup>[161]</sup>

$\beta$ -Peptide weisen eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen und Mikroorganismen auf und stellen daher interessante Ausgangsstoffe für pharmakologische Anwendungen dar.

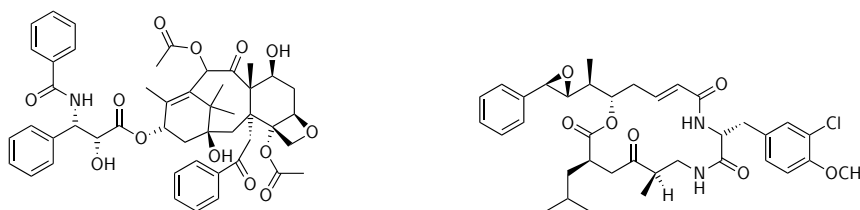


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Paclitaxel (links) und exemplarisch für die Gruppe der Cryptophycine das Cryptophycin-1 (rechts).

Analog zu den  $\alpha$ -Peptiden bilden  $\beta$ -Peptide definierte Sekundärstrukturen wie Helices und Faltblätter, die durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden.

Die stabilste helikale Struktur der  $\beta$ -Peptide ist die  $_{14}$ -Helix, die einen  $_{14}$ -gliedrigen Ring mit einer H-Brücke zwischen  $NH_i$  und  $CO_{i+2}$  bildet. Sie kann sich bereits in Oligopeptiden aus lediglich sechs Monomeren ausbilden, im Gegensatz zu den in der Regel notwendigen zehn bis zwölf Monomeren für eine  $\alpha$ -Helix.<sup>[162–164]</sup> Andere charakterisierte Helixtypen von  $\beta$ -Peptiden sind die  $_{10}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i+1}$ ) und die  $_{18}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i+3}$ ).<sup>[165]</sup>

Ebenso sind Helices mit richtungsinversen Wasserstoffbrücken gefunden worden. Zu ihnen gehören die  $_{8}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i-2}$ ), die  $_{12}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i-3}$ ), die  $_{16}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i-4}$ ) und die  $_{20}$ -Helix (H-Brücke von  $NH_i$  und  $CO_{i-5}$ ). Analog zur  $_{14}$ -Helix wird die  $_{12}$ -Helix bereits aus sechs Monomeren ausgebildet und ist damit die stabilste aus dieser Gruppe.<sup>[166,167]</sup>

Die  $\beta$ -Peptide können ebenfalls parallele und antiparallele Faltblattstrukturen ausbilden. Bei der antiparallelen Anordnung besitzen alle Torsionswinkel  $\mu$  den Wert  $0^\circ$ , nehmen also die *gauche*-Konformation ein. Hingegen bilden sich parallele Faltblattstrukturen aus, wenn der Torsionswinkel  $\mu$  die *anti*-Konformation einnimmt.<sup>[168]</sup>

Sind  $\beta$ -Aminosäuren in Schleifen involviert, werden diese *Pseudo-turns* genannt und erhalten den Präfix  $\Psi$ . Untersuchungen von  $\beta$ -Aminosäuren in zyklischen Peptiden zeigen, dass die strukturinduzierende Wirkung von D-Aminosäuren kompensiert werden kann und  $\beta$ -Aminosäuren bevorzugt in  $i+1$  Position von  $\Psi\gamma$ - oder auch  $\Psi\beta$ -Schleifen zu finden sind.<sup>[137–140]</sup>

### 3.1.2 C<sup>α</sup>-tetrasubstituierte Aminosäuren

Eine andere Gruppe von Aminosäuren, die nicht DNS-kodiert sind, sind die C<sup>α</sup>-tetrasubstituierten Aminosäuren, deren Gemeinsamkeit die Substitution des H<sup>α</sup> ist. Diese Substanzklasse lässt sich in achirale C<sup>α</sup>-tetrasubstituierte Aminosäuren mit und ohne C<sup>α</sup>-C<sup>α</sup>-Zyklisierung sowie chirale C<sup>α</sup>-tetrasubstituierte Aminosäuren unterteilen (siehe Abbildung 18).

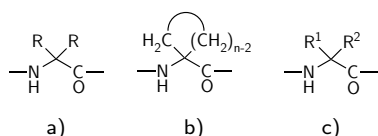


Abbildung 18: Schematische Darstellung einer achiralen C<sup>α</sup>-tetrasubstituierten Aminosäure ohne C<sup>α</sup>-C<sup>α</sup>-Zyklisierung a), einer achiralen C<sup>α</sup>-tetrasubstituierten Aminosäure mit C<sup>α</sup>-C<sup>α</sup>-Zyklisierung b) und einer chiralen C<sup>α</sup>-tetrasubstituierten Aminosäure c).

Zwei Vertreter dieser Aminosäuren, Aib und Iva, sind weit verbreitet als Bestandteil der Peptaibole. Die Peptaibole ist eine Untergruppe der Peptaibiotika mit antibiotischer Wirkung und bestehen aus ca. 5 bis 20 Aminosäuren. Sie besitzen einen zum Aminoalkohol reduzierten C-Terminus und einen hohen Anteil an Aib oder Iva. Gefunden wurden ebenfalls die Aminosäuren Ethylnorvalin und Hydroxyprolin. Für die Peptaibole existieren Strukturdatenbanken sowohl für die Naturstoffe als auch für die synthetischen Peptaibole und Peptaibolanaloga.<sup>[169,170]</sup>

Aib ist die einfachste achirale  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäure. Die strukturinduzierende Wirkung dieser Aminosäure wurde ausführlich durch Röntgenstrukturanalysen, NMR-basierte MD-Rechnungen und *molecular modelling* untersucht. Durch Röntgenstrukturanalysen konnten stabile rechts- und linkshändige  $3_{10}$ -Helices bei Homooligomeren von Aib nachgewiesen werden. Selbst das Tripeptid (Aib)<sub>3</sub> nimmt im festen Zustand diese Konformation ein.<sup>[171-173]</sup> In Lösung besitzt das Homooctamer (Aib)<sub>8</sub> ausschließlich eine  $3_{10}$ -helikale Struktur.<sup>[174]</sup> Heterooligomere, die mindestens einen Aib-Rest enthalten, besitzen eine starke Präferenz zur Ausbildung einer Helix oder  $\beta$ -Schleife. Sekundärstrukturelemente, die in ihnen gefunden wurden, sind die  $3_{10}$ -Helix,  $\alpha$ -Helix und Stränge von  $\beta$ -Schleifen.<sup>[175,176]</sup> Diese  $\beta$ -Schleifenstränge werden bevorzugt von alternierenden Sequenzen von Aib und Pro ausgebildet und werden als eine Untergruppe der  $3_{10}$ -Helices aufgrund der ähnlichen Faltung charakterisiert.<sup>[177]</sup> Die stabilisierenden Wasserstoffbrücken sind ebenfalls zwischen CO<sub>i</sub> und NH<sub>i+4</sub> lokalisiert.

Die Aminosäure Aib kann sowohl als Strukturbildner von Helices als auch  $\beta$ -Schleifen verwendet werden.  $\gamma$ -Schleifen und gestreckte Konformationen sind untypisch für diese Aminosäure, weshalb sie in der Peptidchemie als  $\beta$ -Faltblattinhibitor eingesetzt wird. Diese Eigenschaft macht die Aminosäure besonders für das Wirkstoffdesign interessant.<sup>[178]</sup> Ähnliche strukturinduzierende Präferenzen zeigten sich auch bei den achiralen  $C^\alpha$ -tetrasubstituierten Aminosäuren mit  $C^\alpha$ - $C^\alpha$ -Zyklisierung. Chirale  $C^\alpha$ -tetrasubstituierte Aminosäuren und achirale  $C^\alpha$ -tetrasubstituierte Aminosäuren ohne  $C^\alpha$ - $C^\alpha$ -Zyklisierung (ohne Aib) bilden eine Ausnahme dieser strukturellen Präferenzen und tendieren durch sterische Effekte der Seitengruppen zu gestreckten Konformationen ( $2_5$ -Helix). Dieser Effekt ist von der Größe der Seitenketten und den dadurch beeinflussten Winkel  $\tau$  zwischen N- $C^\alpha$ -C abhängig.<sup>[179]</sup>

## 3.2 Peptidantibiotika

Zur Abwehr mikrobieller Infektionen produzieren die meisten Organismen Peptidantibiotika, deren erstaunliche Vielfalt auf die Verwendung von nichtproteinogenen Aminosäuren basiert. Die Peptidantibiotika können in zwei Klassen eingeteilt werden, die ribosomal synthetisierten Vorläuferpeptide, die durch eine Reihe von posttranslationaler Modifikationen zu aktive Verbindungen reifen (z. B. Lantibiotika), und die nicht-ribosomal gebildeten Peptide (z. B. Cyclosporin).<sup>[180–182]</sup> Diese werden vorwiegend von Bakterien, Pilzen und Streptomyceten an den aus vier bis sechs Modulen bestehende Peptidsynthetasen (Multienzymkomplexe) produziert. Vieles deutet darauf hin, dass diese Peptide durch den *multiple-carrier thiotemplate* Mechanismus synthetisiert werden.<sup>[183]</sup> Jedes Modul der Synthetase hat die Fähigkeit, eine Aminosäure zu erkennen, zu aktivieren, ggf. zu modifizieren und an den wachsenden Peptidstrang anzuknüpfen. Die Aktivierung der Aminosäure erfolgt über einen Thioester. Die entstehenden Peptide können eine große Bandbreite an Aminosäuren wie L-, D- und nichtproteinogenen Aminosäuren enthalten und nachträglich durch N-Methylierung, Acylierung, Glycosylierung oder Zyklisierung modifiziert werden.<sup>[184]</sup> In der Regel wird eine begrenzte Anzahl verwandter Sequenzanaloga als Folge von Ungenauigkeit bei der Biosynthese produziert.

Tabelle 5: Sequenzen der Efrapeptine c bis g.

Efrapeptin	Sequenz
C	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X
D	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
E	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
F	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X
G	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X

Zu den Peptidantibiotika gehören die Aib-reichen Peptaibiotika, die von Pilzen gebildet werden und ebenfalls antibiotische wirken.<sup>[185]</sup> Eine Untergruppe der Peptaibiotika sind die bereits erwähnten Peptaibole, deren Bildung ebenfalls nicht-ribosomal erfolgt und einen zum Aminoalkohol reduzierten C-Terminus besitzen. Ihre antibiotische Wirkung beruht auf die Bildung von Ionenkanälen durch Membranen, welches die Leitfähigkeit durch die Membran erhöht. Dies wurde von Cafiso an Alamethicin intensiv untersucht.<sup>[186,187]</sup>

### 3.2.1 Efrapeptine

Die Efrapeptine besitzen zwar einen hohen Anteil an Aib sowie Iva und bestehen aus 16 Aminosäuren, gehören jedoch nicht zu der Gruppe der Peptaibole, wohl aber zu den Peptaibiotika. Sie werden von dem Pilz *Tolyocladium niveum* und weiteren Vertretern dieser Spezies als Gemisch von Sequenzanaloga produziert.<sup>[188,189]</sup> Die Sequenzen der Efrapeptine sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

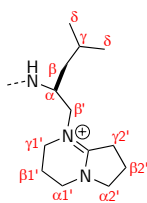


Abbildung 19:  
Kopfgruppe X der  
Efrapeptine.

Die Efrapeptine enthalten neben einem hohen Anteil an Aib, drei Pip-Reste und einen  $\beta$ Ala-Rest. Einige enthalten statt Aib auch die Aminosäure Iva. Die C-terminale Kopfgruppe X ist von Leucinol und DBN abgeleitet (siehe Abbildung 19). Die Efrapeptine waren die ersten Naturstoffe, in denen dieses quartäre Amidiniumion gefunden wurde. Ebenfalls aus der Fermentationsbrühe des Pilzes *Tolyocladium niveum* konnten die Elvapeptine isoliert werden, die sich einzig durch ein Spermidin-Derivat als C-terminale Kopfgruppe von den Efrapeptinen unterscheiden.<sup>[190]</sup> Das Spermidin-Derivat kann zur Kopfgruppe X

oxidiert werden, so dass die Elvapeptine wahrscheinlich die biologische Vorstufe der Efrapeptine sind (siehe Abbildung 20).<sup>[191]</sup>

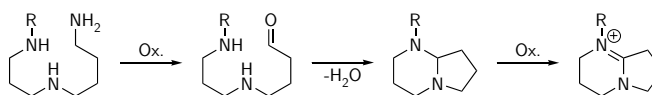


Abbildung 20: Oxidation des Spermidins zum Amidiniumion.

Die Biosynthese der Pipecolinsäure wurde kürzlich durch Gatto *et al.* aufgeklärt. Analog zur Biosynthese des Prolin aus Ornithin durch die Ornithin-Cyclodeaminase konnte im Rapamycin-Gencluster die Lysin-Cyclodeaminase identifiziert werden, die Lysin in Pipecolinsäure umwandelt.<sup>[192]</sup>

Die Struktur einer kurzen C-terminalen Teilsequenz aus Efrapeptin C wurde von Gupta *et al.* und Benedetti *et al.* aufgeklärt.<sup>[193–195]</sup> Sie zeigten, dass im Kristall die Struktur der fünf C-terminalen Aminosäuren keine helikale Struktur annimmt, sondern eher als ein Strang von  $\beta$ -Schleifen vorliegt. Die Kristallstruktur von Efrapeptin C im Komplex mit der mitochondrialen  $F_1$ -ATPase wurde von Abrahams *et al.* mit einer Auflösung von 0,31 nm aufgeklärt (siehe Abbildung 21).<sup>[196]</sup> Die Sekundärstruktur des Efrapeptin C ist zwischen den Aminosäuren 1 und 6 sowie zwischen 9 und 15  $3_{10}$ -helikal. Die Aminosäuren  $\beta$ Ala-7 und Gly-8 bilden einen flexiblen Bereich zwischen diesen beiden Regionen. Zwischen Leu-6 und  $\beta$ Ala-7 befindet sich eine *cis*-Peptidbindung.

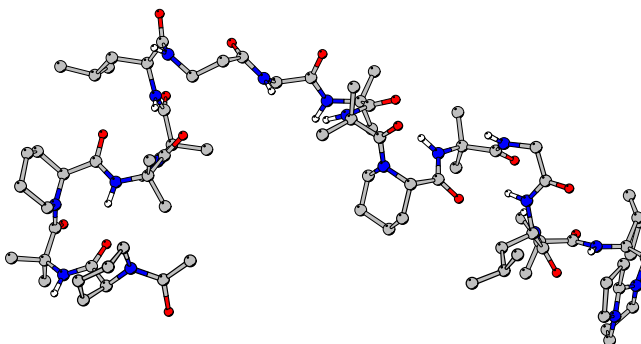


Abbildung 21: Röntgenstruktur des Efrapeptin C extrahiert aus dem Komplex mit der  $F_1$ -ATPase.

Die Efrapeptine inhibieren die  $F_0F_1$ -ATPase kompetitiv und hemmen dadurch die Phosphorylierung in Pflanzen und Bakterien, sowie die oxidative Phosphorylierung

in Mitochondrien und einigen Bakterien.<sup>[197–199]</sup> Die Wechselwirkungen zwischen der ATPase und dem Efrapeptin C sind vorwiegend hydrophober Natur. Durch die Bindung wird ein essentieller Argininrest in der Adeninnukleotid-Bindungstasche blockiert. Des Weiteren zeigen die Efrapeptide biologische Aktivität gegen Insekten und den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*.<sup>[200–202]</sup>

Die erste Totalsynthese von Efrapeptin C wurde von Jost *et al.* durch Kondensation von drei Fragmenten durchgeführt.<sup>[203]</sup> Die Fragmente Pip-1 – Gly-8 und Aib-9 – Gly-13 wurden durch Festphasensynthese, das C-terminale Fragment Leu-14 – X in Lösung mit Hilfe der Fmoc-Taktik dargestellt (siehe Abbildung 22).

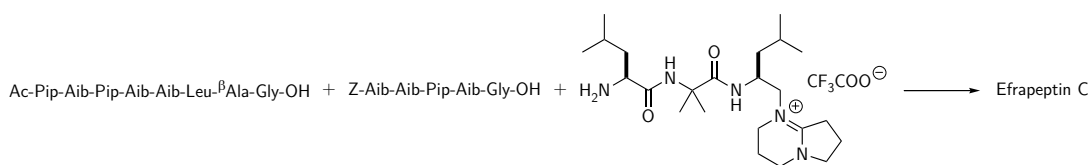


Abbildung 22: Totalsynthese des Efrapeptin c.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 CD-, IR- und VCD-spektroskopische Voruntersuchungen

Erste Informationen zu den konformationellen Eigenschaften des Efrapeptin C **1** erhielt Jost aus CD-spektroskopischen Untersuchungen in TFE.<sup>[204]</sup> Efrapeptin C zeigt in TFE zwei stark negative Absorptionsbanden bei 203 – 206 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang) und 225 – 235 nm ( $n$ - $\pi^*$ -Übergang), sowie eine stark positive Bande bei  $\approx 190$  nm (siehe Abbildung 23). Das CD-Spektrum ist für helikale Strukturen und das von Karle *et al.* beschriebene  $\beta$ -Schleifenband charakteristisch.<sup>[177,205,206]</sup> Das Verhältnis  $R = ([\theta]_{n-\pi^*} / [\theta]_{\pi-\pi^*})$  wird zur Unterscheidung der Strukturen  $\alpha$ - und  $3_{10}$ -Helix verwendet, wobei Werte von 1 für lange  $\alpha$ -helikale Polypeptide erhalten werden.<sup>[27,207,208]</sup> Für **1** wurde von Jost ein Wert von 0.3 in TFE gefunden, welcher auf eine dominante  $3_{10}$ -Helix hinweist, die wahrscheinlich mit ungeordneten Konformationen oder ausgedehnten Schleifenkonformationen wie dem  $\beta$ -Schleifenband im Gleichgewicht ist.



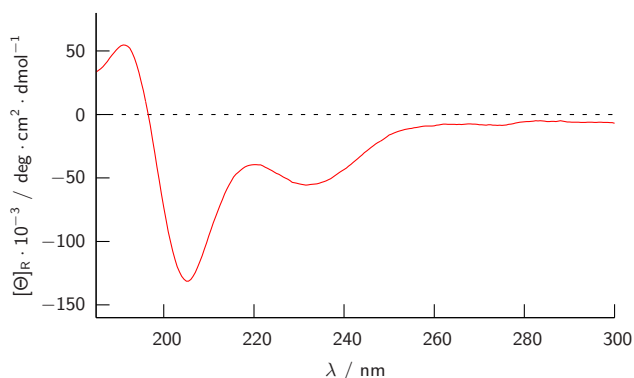


Abbildung 23: CD-Spektren von Efrapeptin C 1 in TFE bei 298 K.

Die FT/IR-Spektroskopie kann zur konformationellen Analyse von Peptiden in einer Vielzahl von Lösungsmitteln verwendet werden. Die Schwingungsfrequenz der Amid I-Bande korreliert mit der Sekundärstruktur des Peptids oder Proteins und wird vorwiegend von Streckenschwingungen der C=O-Bindung verursacht.<sup>[209]</sup> Die Amid I-Bande von  $\alpha$ -helikalen Konformationen erscheint zwischen  $1650 - 1655 \text{ cm}^{-1}$ , während  $\beta$ -Faltblattstrukturen Licht im Bereich von  $1620 - 1640 \text{ cm}^{-1}$  und  $\beta$ -Schleifen zwischen  $1690 - 1660 \text{ cm}^{-1}$  sowie  $1645 - 1635 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren.<sup>[210]</sup> Die Schwingungsfrequenzen der  $3_{10}$ -Helix bei  $1665 \text{ cm}^{-1}$  und  $\beta$ III-Schleife bei  $1686 \text{ cm}^{-1}$  und  $1643 - 1649 \text{ cm}^{-1}$  wurden von Dwivedi *et al.* berechnet.<sup>[211]</sup> Zusätzlich liegt die Amid II-Bande der  $3_{10}$ -Helix bei ca.  $1533 - 1531 \text{ cm}^{-1}$ .

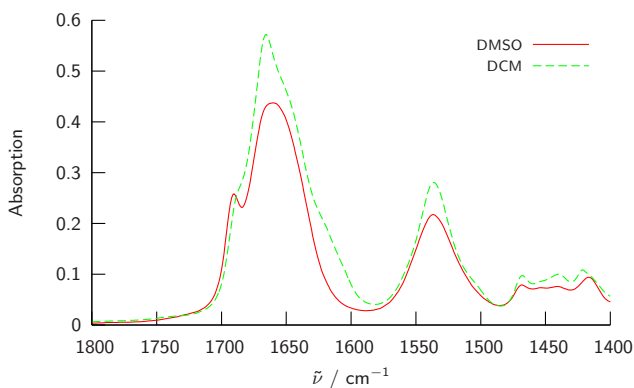


Abbildung 24: IR-Spektren von Efrapeptin C 1 in DMSO (rot) und DCM (grün) bei 298 K.

Tabelle 6: Lage der Amid I- und II-Banden von Efrapeptin **1** in DMSO und DCM.

	$\tilde{\nu}_{\text{DMSO}} [\text{cm}^{-1}]$	$\tilde{\nu}_{\text{DCM}} [\text{cm}^{-1}]$
Amid I	1690, 1660	1685, 1665, 1645
Amid II	1536	1536

Die Abbildung 24 zeigt die FT/IR-Spektren von Efrapeptin **1** in DMSO und DCM. Die Absorptionsmaxima der Amid I- und II-Banden sind in beiden Spektren bei nahezu identischen Wellenzahlen zu finden (siehe Tabelle 6). Die beiden Spektren unterscheiden sich auffallend in der separierten Bande bei  $1690 \text{ cm}^{-1}$  in DMSO und der verbreiterten Amid I-Bande in DCM zwischen  $1650 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ . Die FT/IR-Spektren lassen aufgrund der Absorptionsfrequenzen der Amid I- und II-Banden darauf schließen, dass in beiden Lösungsmitteln eine dominante  $3_{10}$ - oder  $\alpha$ -helikale Konformation vorliegt. Die Absorptionsbande bei  $1690 \text{ cm}^{-1}$  in DMSO wird wahrscheinlich durch zusätzliche  $\beta$ -Schleifen verursacht. Die Konformation in DCM wird aufgrund der verbreiterten Amid I-Bande zusätzlich entweder ungeordnete Strukturen oder  $\beta$ -Schleifenbänder ( $\beta$ III-Schleifen) enthalten. Hollósi *et al.* ordneten die Absorptionswellenzahlen bei  $1685 \text{ cm}^{-1}$  und  $1645 \text{ cm}^{-1}$  den zu Aib-Pip analogen Aib-Pro bzw. Dpg-Pro Amidbindungen zu.<sup>[212]</sup>

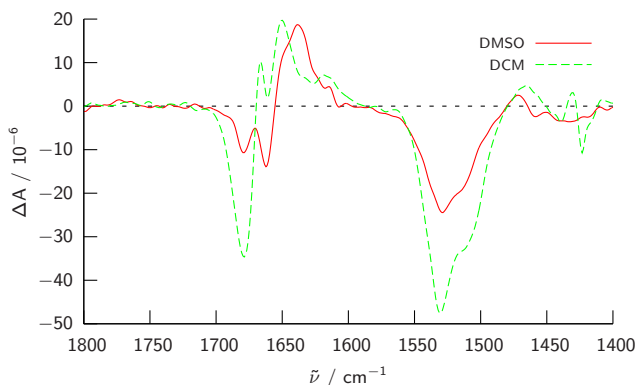


Abbildung 25: VCD-Spektren von Efrapeptin **1** in DMSO (rot) und DCM (grün) bei 298 K.

Im Gegensatz zur FT/IR-Spektroskopie ist eine Unterscheidung zwischen  $3_{10}$ - und  $\alpha$ -Helices mit der VCD-Spektroskopie durch die Analyse der Amid II-Bande möglich. Eine schwach negative Absorption wird für  $\alpha$ -helikale Strukturen gefunden. Starke negative Amid II-Banden deuten hingegen auf eine  $3_{10}$ -Helix hin. In Abbildung 25 sind die VCD-Spektren von **1** dargestellt. In beiden Lösungsmitteln ist ein positives *couplet* (negativ

zur hohen Energie) als Amid I-Bande und eine stark negative Amid II-Bande vorhanden, wodurch  $\alpha$ -helikale Strukturen ausgeschlossen werden können.

Yoder *et al.* untersuchten mit FT/IR-Spektroskopie und chiroptischen Methoden (L-Pro-Aib) $_n$  und Aib-(L-Pro-Aib) $_n$  Oligopeptide. Diese Peptide bilden in Lösung und im Kristall rechtsgängige  $\beta$ -Schleifenbänder.<sup>[206]</sup> Ihre Studien zeigten, dass eine Unterscheidung zwischen  $\beta$ -Schleifenbänder und  $3_{10}$ -Helix aufgrund der sehr ähnlichen Spektren nicht möglich ist.<sup>[213]</sup> Ihre Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den hier gemachten Beobachtungen und lassen den Schluss zu, dass sich die Konformation von Efrapeptin C durch eine  $3_{10}$ -Helix oder ein  $\beta$ -Schleifenband beschreiben lässt.

### 3.3.2 Konformationsanalyse von Efrapeptin C **1** in DMSO

Die aus ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren extrahierten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen von Efrapeptin C **1** in DMSO- $\text{D}_6$  sind in Tabelle 21 in Abschnitt 3.4 zusammengefasst. In den NMR-Spektren liegt nur ein Signalsatz vor und die Amidprotonenresonanzen sind weitgehend separiert, so dass mit einer stabilen Konformation gerechnet werden kann. Weiterhin zeigen die Resonanzsignale der  $\text{H}^{\text{N}}$  keine Linienverbreiterung aufgrund von dynamischen Prozessen. Das aprotische Lösungsmittel DMSO erhöht die Verweilzeit des  $\text{H}^{\text{N}}$  am Stickstoffatom, so dass intermolekulare dynamische Prozesse deutlich verlangsamt werden. Dies lässt eine exakte Bestimmung der  $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten ( $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\beta}}$  für  $^{\beta}\text{Ala}$ -7) zu. Die zusätzlichen NMR-Experimente zur Bestimmung der Temperaturgradienten der Amidprotonen stützen diesen Befund.

Aufgrund starker Signalüberlagerungen ist die absolute Zuordnung der diastereotopen Protonen mittels Kopplungskonstanten (siehe Kapitel 2.4.3) und NOE für die Aminosäuren nicht eindeutig möglich. Während des *modelling* werden deshalb Pseudoatome für diese Protonen verwendet, mit Ausnahme derjenigen des Gly-13, die durch einander komplementäre DG-Rechnungen zugeordnet werden konnten. Nicht zugeordnete diastereotope Protonen sind in den Aminosäuren  $^{\beta}\text{Ala}$ , Gly, Leu und Pip vorhanden. Die zyklische Aminosäure Pip ist konformationell stark eingeschränkt und die Aminosäuren  $^{\beta}\text{Ala}$  und Gly weisen eine starke Flexibilität auf. Eine verbesserte Zuordnung der diastereotopen Protonen würde deshalb nicht zu einer verbesserten Qualität der ermittelten Struktur führen.

In den NOE-Spektren konnten insgesamt 59 Proton-Proton-Distanzen eindeutig zugeordnet und integriert werden. Von diesen sind 23 intraresiduale, 26 sequenzielle und 10 weitreichende NOE-Distanzen (siehe Tabelle 22). Die durchschnittliche NOE-Verletzung während der RMD-Simulation beträgt 66 pm. Da die NOE-Distanzen nach Glättli und van Gunsteren als Obergrenzen bewertet werden sollten, sind die positiven NOE-Verletzungen von entscheidender Relevanz.<sup>[78]</sup> Während der RMD-Simulation tritt eine durchschnittliche positive NOE-Verletzung von 24 pm auf, deren Summe 494 pm beträgt.

Das Clustering der mit DG generierten 1000 Strukturen führt zu einem sehr heterogenen Konformationsgemisch. Während das Clustering nach Rückgratstorsionswinkeln lediglich zwei Cluster mit Populationen von 1.4% und 0.9% findet, resultiert das RMSD-Clustering nach Rückgratatomkoordinaten in mehreren höher populierte Clustern. Die Torsionswinkel der zentralen Struktur der gesamten Trajektorie besitzen typische Werte von  $3_{10}$ - bzw.  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturen zwischen den Aminosäuren Aib-4 und Aib-5 sowie zwischen Gly-9 und Aib-12. Die restlichen Torsionswinkel variieren stark und entsprechen keiner bekannten Sekundärstruktur. Dies kann auf die geringe relative Anzahl der NOE-*restraints* zurückgeführt werden. Dennoch wird die zentrale Struktur des mit 8.5% höchst populierte RMSD-Clusters als Startstruktur für die folgende RMD-Simulation verwendet.

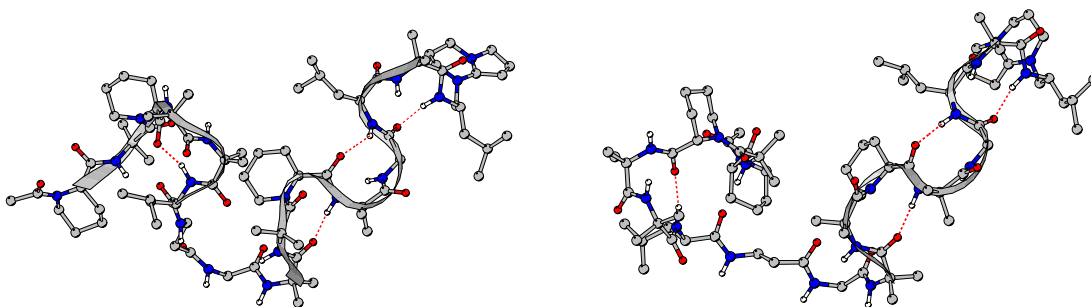


Abbildung 26: Zentrale Strukturen der Cluster I (links) und II (rechts) von Efrapeptin c in DMSO.

Während der RMD-Simulation zeigen sich entscheidende konformationelle Änderungen. Das Clustering der Trajektorie anhand der Rückgratstorsionswinkel ergibt nur zwei Konformationsfamilien I und II, die mit 16.2% bzw. 9.6% signifikant populierte sind. Die zentralen Strukturen dieser Cluster sind in Abbildung 26 dargestellt. Die gemittelten

Tabelle 7: Zusammenfassung der gemittelten Rückgratstorsionswinkel aus der gesamten RMD und den zentralen Strukturen der Cluster I und II für Efrapeptin C **1** in DMSO.

AS	RMD			Cluster I			Cluster II			Sekundärstruktur
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	
Pip-1	-111°	-89°		-110°	-154°		-98°	-164°		
Aib-2	112°	-37°		124°	-44°		124°	-45°		
Pip-3	-117°	-159°		-115°	-154°		-112°	-161°		
Aib-4	60°	26°		49°	39°		64°	31°		
Aib-5	64°	30°		60°	27°		54°	13°		
Leu-6	-114°	153°		-122°	125°		-102°	134°		
<sup>β</sup> Ala-7	138°	109°	-172°	-135°	93°	-154°	105°	-86°	176°	
Gly-8	177°	75°		110°	95°		33°	83°		
Aib-9	60°	36°		51°	38°		58°	35°		
Aib-10	45°	32°		55°	30°		37°	31°		
Pip-11	35°	49°		38°	41°		44°	43°		
Aib-12	-60°	-23°		-41°	-38°		-46°	-34°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Gly-13	-159°	-55°		-136°	51°		-132°	54°		
Leu-14	-64°	-52°		-62°	-37°		-61°	-33°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Aib-15	-54°	-9°		-97°	8°		-53°	-25°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
X	-95°			-110°			-114°			

Rückgratstorsionswinkel dieser Cluster und der gesamten Trajektorie sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

In Kapitel 2.4.1 wurde auf den Zusammenhang zwischen chemischer Verschiebung und Sekundärstruktur kurz eingegangen. Für Efrapeptin C können aufgrund des hohen Anteils nichtproteinogener Aminosäuren anhand der chemischen Verschiebungen sekundärstruktursensitiver Kerndipole wie z. B. H<sup>N</sup>, H <sup>$\alpha$</sup>  oder C <sup>$\alpha$</sup>  keine Rückschlüsse auf die Konformation getroffen werden. Einzigst für die Aminosäuren Leu und Gly sind Referenzdaten vorhanden, deren Analyse zeigt, dass die Resonanzen für H<sup>N</sup> und C <sup>$\alpha$</sup>  von Leu hochfeldverschoben sind und damit eine helikale Konformation bei diesen Aminosäuren wahrscheinlich ist. Die Resonanzen für H<sup>N</sup> von Gly liegen in einem für *random coil* typischen Bereich.

Ein Vergleich mit literaturbekannten Referenzdaten für Sekundärstrukturen in Polypeptiden (siehe Tabelle 1) zeigt für die zentralen Strukturen der RMD, dass zwischen den

Tabelle 8: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD für Efrapeptin C **1** in DMSO.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Aib-2 H <sup>N</sup>	Leu-6 O	29.3	-3.9
Aib-4 H <sup>N</sup>			0.1
Aib-5 H <sup>N</sup>			-7.3
Leu-6 H <sup>N</sup>	Aib-2 O	5.5	-2.6
Leu-6 H <sup>N</sup>	Pip-3 O	63.7	
$\beta$ Ala-7 H <sup>N</sup>	Aib-5 O	3.2	-2.3
Gly-8 H <sup>N</sup>			-5.8
Aib-9 H <sup>N</sup>	Aib-5 O	10.8	-6.0
Aib-10 H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala-7 O	3.0	-1.3
Aib-10 H <sup>N</sup>	Gly-8 O	8.0	
Aib-12 H <sup>N</sup>	Aib-9 O	59.2	-0.4
Gly-13 H <sup>N</sup>	Pip-11 O	0.4	-4.8
Leu-14 H <sup>N</sup>	Pip-11 O	33.8	-1.5
Aib-15 H <sup>N</sup>	Gly-13 O	16.0	-2.3
X-16 H <sup>N</sup>	Gly-13 O	75.9	-2.2

Aminosäuren Aib-12 und Aib-15 eine  $\alpha$ - oder  $3_{10}$ -Helix vorliegt. Die Torsionswinkel lassen keine eindeutige Unterscheidung dieser Helix Typen zu, jedoch zeigt das Wasserstoffbrückenmuster eine deutliche Präferenz der  $3_{10}$ -Helix in dieser Region (siehe Tabelle 8). Die  $3_{10}$ -Helix ist während der gesamten RMD-Simulation präsent und erweist sich als äußerst stabil.

Die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 7 nehmen in den Clustern I und II eine der antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur ähnliche Sekundärstruktur ein, mit einer  $\beta$ I'-Schleife mit Aib-4 in der  $i+1$  Position. Die Wasserstoffbrücken zwischen Aib-2 H<sup>N</sup> und Leu-6 O sowie zwischen Leu-6 H<sup>N</sup> und Pip-3 O sind mit 29.3% bzw. 63.7% hoch populiert und stabilisieren diese Struktur (siehe Tabelle 8).

Die experimentellen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  korrelieren weitgehend mit den berechneten der zentralen Struktur der RMD-Trajektorie. Eine Differenz lässt sich für die flexiblen Aminosäuren Gly und  $\beta$ Ala feststellen. Die Rückgratstorsionswinkel dieser AS deuten auf eine hohe Flexibilität des Efrapeptin C in diesen Bereichen (siehe Tabelle 7). Dieser Sachverhalt korreliert mit den experimentellen Kopplungskonstanten von ca. 6 Hz und der Karplus-Funktion (siehe Abschnitt 2.4.3).

Tabelle 9: Zusammenfassung der experimentellen und der anhand der Torsionswinkel berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$  bzw.  ${}^3J_{\text{HNNH}\beta}$  (Toleranzen in Klammern) für Efrapeptin C **1** in DMSO.

AS	$J$	ber [Hz]	exp [Hz]
Leu-6	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	9.0 (-1.8,+1.4)	7.9
$\beta$ Ala-7	${}^3J_{\text{HNNH}\beta}$	2.5 (-0.2,+1.2)	5.7
Gly-8	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	2.0 (-0.1,+1.2)	5.3
Gly-13	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	7.8 (-1.5,+1.4)	5.7
Leu-14	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	6.1 (-1.1,+1.3)	6.4
X	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	9.7 (-2.0,+1.4)	9.4

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen korrelieren ebenfalls weitgehend mit den gefundenen Strukturen. Es finden sich hohe Werte für Protonen, die als Donor für H-Brücken fungieren. Das Amidproton von Aib-4 ist laut Analyse zwar an keiner H-Brücke beteiligt, wird jedoch von den umliegenden Aminosäuren gegen das Solvens abgeschirmt, so dass der hohe Wert erklärbar ist. Etwas größere Werte als erwartet zeigen die Amidprotonen von Aib-10 und Gly-13, die nur im geringen Umfang an H-Brücken beteiligt sind und für das Solvens zugänglich sein sollten.

Insgesamt lässt sich aufgrund der geringen relativen Anzahl an NOE-Distanzen nur eine grobe Analyse der Sekundärstruktur durchführen. Eine stereospezifische Zuordnung der Aib-Methylgruppen ist anhand dieser NMR-Daten nicht möglich, und viele NOE-Kreuzsignale sind wegen Signalüberlappungen nicht zuzuordnen oder integrierbar. Die geringen Populationen der Cluster deuten auf eine hohe Flexibilität des Efrapeptin C in DMSO hin. Lediglich der  ${}_{3_{10}}$ -helikale Bereich zwischen Aib-12 und Aib-15 erweist sich als stabil. Die deutlichen NOE-Verletzungen machen eine erweiterte Sekundärstrukturanalyse unabdingbar.

### 3.3.3 Konformationsanalyse von Efrapeptin C **1** mit RDC-Daten in DCM

Die aus ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren bestimmten  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenzen von Efrapeptin C **1** in DCM- $\text{D}_2$  sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Da in den NMR-Spektren nur ein Signalsatz vorhanden ist, kann eine weitgehend stabile Konformation erwartet werden.

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen erfolgte, soweit möglich, aufgrund starker Signalüberlagerungen durch einander komplementäre Zuordnungen während DG-Rechnungen. Von Weigelt wurden erfolgreich unterschiedliche partiell deuterierte Sequenzen von Efrapeptin C synthetisiert (siehe Tabelle 10).<sup>[214,215]</sup> Diese ermöglichten eine Zuordnung der Methylgruppen aller Aib und erhöhten entscheidend die zur Verfügung stehenden NOE-*restraints*.

Tabelle 10: Sequenzen der partiell deuterierten Efrapeptide.

Sequenz	
I	Ac-Pip-Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly- $\text{D}_6$ -Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Gly-Leu-Aib-X
II	Ac-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly- $\text{D}_6$ -Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Gly-Leu- $\text{D}_6$ -Aib-X
III	Ac-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Pip-Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly- $\text{D}_6$ -Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Gly-Leu- $\text{D}_6$ -Aib-X
IV	Ac-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib- $\text{D}_6$ -Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly- $\text{D}_6$ -Aib-Aib-Pip- $\text{D}_6$ -Aib-Gly-Leu- $\text{D}_6$ -Aib-X

Aus dem NOE-Spektrum konnten insgesamt 92 Proton-Proton-Distanzen zugeordnet und bestimmt werden. Es wurden 40 intraresiduale, 35 sequenzielle und 17 weitreichende NOE-Distanzen ermittelt (siehe Tabelle 24).

In Abbildung 27 ist die durchgeführte Konformationsanalyse von Efrapeptin C schematisch dargestellt. Als Startstruktur für das RDC-basierte SA diente die zentrale Struktur der durch DG/SA generierten Strukturen ohne NOE-Verletzungen. Die verwendeten dipolaren Restkopplungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die gleichzeitige Verwendung unterschiedlicher Kopplungstypen erforderte eine faktorielle Normalisierung, die die unterschiedlichen gyromagnetischen Verhältnisse und Bindungsabstände berücksichtigt, und alle RDC-Werte bezüglich  $D_{\text{NHN}}$  normalisiert.

Die RDC wurden bei dem SA sukzessiv zugefügt. Durch eine sorgfältige Analyse der jeweils generierten 42 Strukturen mittels Perlskripten konnte eine Reihenfolge ermittelt



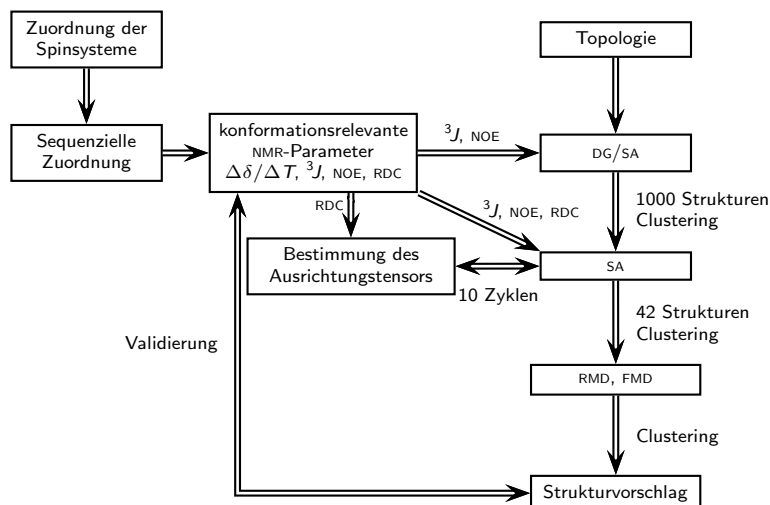


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Konformationsanalyse von Efrapeptin c.

werden, die zu einer Konvergenz des Systems führte. Parallel wurden die Kraftkonstanten der RDC-Potenziale schrittweise für die einzelnen Kopplungstypen erhöht (siehe Tabelle 17).

Da der Ausrichtungstensor nach jedem Zyklus neu berechnet wurde und zu Beginn der Strukturanalyse stark fluktuierte, konnte keine Clusteranalyse zur Analyse der Strukturen angewandt werden. Aus diesem Grund diente die energetisch günstigste Konformation als Startstruktur für das folgende SA. In Abbildung 28 ist die finale Struktur von Efrapeptin C nach dem SA dargestellt. Die gemittelte Struktur (siehe Abbildung 28 rechts) stellt farbkodiert die Variabilität der Atomkoordinaten dar. Die konservierten

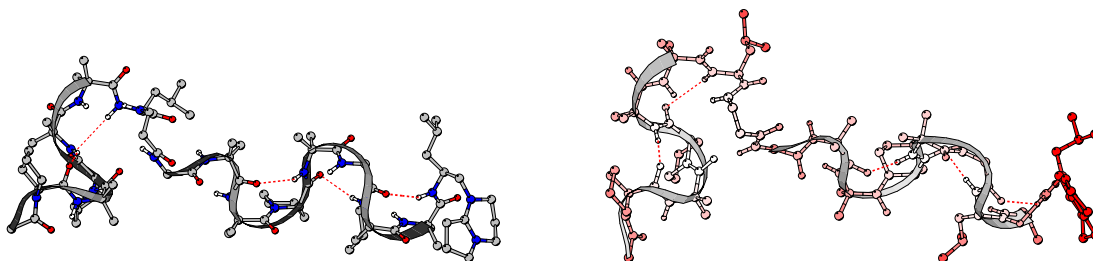


Abbildung 28: Finale (links) und gemittelte (rechts) Struktur von Efrapeptin C in DCM nach SA mit RDC-restraints.

Koordinaten sind in einem hellen Grauton dargestellt, während die Koordinaten mit erhöhter Dynamik im Farbton zu rot wechseln.

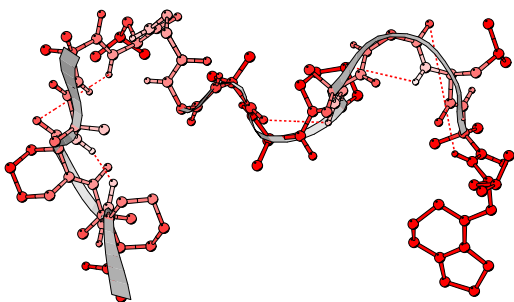


Abbildung 29: Gemittelte Struktur von Efrapeptin c in DCM nach DG.

Ein Vergleich mit der durchschnittlichen Struktur von **1** nach der DG (siehe Abbildung 29) zeigt, dass sich definierte Sekundärstrukturen ausbilden. Die geringe Anzahl möglicher NOE-*restraints* wird vornehmlich durch die hohe Flexibilität des Aminosäurestranges verursacht. Das *modelling* von Efrapeptin C in DMSO wurde mit einer sehr geringen Anzahl an NOE-*restraints* von 3,7 pro AS durchgeführt. Dieser Werte konnte in DCM auf 5,8 NOE-*restraints* pro AS gesteigert werden. Zusätzlich werden während der Strukturverfeine-

rung durch SA 2.1 RDC-*restraints* pro AS angewendet, so dass eine ausreichende Anzahl redundanzfreier *restraints* vorhanden ist. Aufgrund der Sequenz und der geringen Länge des Efrapeptin C können nicht die typischen Werte von  $12 \pm 5$  für NMR-Strukturanalysen erreicht werden.<sup>[216]</sup> Der Konformationsraum des Efrapeptin C wurde für das SA durch eine Erhöhung der NOE-Distanzentoleranz auf 20% leicht vergrößert, um die Dynamik nicht unnötig weiter einzuschränken.

Die Rückgratstorsionswinkel der finalen 42 Strukturen der RDC-SA und RMD sind durch Clustering gemittelt worden und in Tabelle 11 zusammengefasst. Zwischen den Aminosäuren  $\beta$ Ala-7 und Aib-9 befindet sich ein unstrukturierter Bereich. Der C-terminale Bereich zwischen Aib-10 und X-16 ist  $3_{10}$ - oder  $\alpha$ -helikal, der N-terminale Bereich zwischen Pip-1 und Leu-6 verzerrt  $3_{10}$ -helikal mit Überlagerungen von  $\beta I'$ -Schleifen. Die Flexibilität des Gly-13-Restes bewirkt während der RMD stärkere konformationelle Änderungen in diesem Bereich, so dass unterschiedliche Rückgratstorsionswinkel gemessen werden. Der durch eine Wasserstoffbrücke stabilisierte Bereich zwischen Aib-4 und Aib-5 kann durch Analyse der Rückgratstorsionswinkel keiner Sekundärstruktur nach der RDC-SA zugeordnet werden. Durch die relativ zum SA realistischere RMD-Simulation änderte sich die Konformation zu einer  $\beta I'$ -Schleife mit Aib-5 in  $i+1$  Position.

Tabelle 11: Zusammenfassung der über die RMD und SA gemittelten Rückgratstorsionswinkel für Efrapeptin c 1 in DCM.

AS	SA			RMD			Sekundärstruktur
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	
Pip-1	-96°	60°		-108°	127°		
Aib-2	-51°	-42°		-57°	-19°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Pip-3	-100°	37°		-125°	29°		
Aib-4	-64°	-60°		-46°	82°		$\alpha$ -Helix
Aib-5	-131°	36°		52°	50°		$\beta$ I'-Schleife ( $i+1$ )
Leu-6	82°	-3°		64°	-16°		$\beta$ I'-Schleife ( $i+2$ )
$\beta$ Ala-7	-97°	-69°	75°	-107°	58°	71°	$\Psi\gamma^i$ -Schleife
Gly-8	-42°	-94°		125°	-41°		
Aib-9	54°	42°		55°	13°		
Aib-10	-39°	-49°		-55°	-38°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Pip-11	-116°	54°		-107°	50°		
Aib-12	-57°	98°		-52°	-42°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Gly-13	60°	23°		-77°	-33°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Leu-14	-53°	-32°		-70°	-53°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
Aib-15	-120°	19°		-60°	-49°		3 <sub>10</sub> -/ $\alpha$ -Helix
X	-144°			-116°			

Die experimentellen und aus SA und RMD berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$  ( ${}^3J_{\text{HNNH}\beta}$  für  $\beta$ Ala) sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Korrelation ist nach beiden Rechnungen akzeptabel, jedoch sind die Differenzen nach der RMD-Simulation geringer. Die experimentelle Kopplungskonstante weicht deutlich von dem berechneten Wert für Gly-13 während der SA ab, so dass die lokale Konformation der RMD favorisiert ist.

Tabelle 12: Zusammenfassung der experimentellen und der anhand der Torsionswinkel berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$  bzw.  ${}^3J_{\text{HNNH}\beta}$  (Toleranzen in Klammern) für Efrapeptin c 1 in DCM.

AS	$J$	ber <sub>SA</sub>	ber <sub>RMD</sub>	exp
Leu-6	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	5.5 (-1.0,+1.3)	6.8 (-1.5,+1.8)	7.2
$\beta$ Ala-7	${}^3J_{\text{HNNH}\beta}$	6.7 (-1.3,+1.3)	9.4 (-1.8,+1.5)	8.6
Gly-8	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	2.6 (-0.1,+1.2)	2.7 (-0.4,+1.4)	4.2
Gly-13	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	6.9 (-1.5,+1.9)	3.7 (-0.5,+1.2)	4.7
Leu-14	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	4.0 (-0.6,+1.2)	5.6 (-1.0,+1.3)	4.2
X	${}^3J_{\text{HNNH}\alpha}$	9.0 (-1.8,+1.5)	9.7 (-2.0,+1.4)	9.2

In Tabelle 13 sind die Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD in Korrelation mit den Temperaturgradienten der Amidprotonen zusammengefasst. Für die Temperaturabhängigkeit  $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$  der Amidprotonen in DCM sind keine Literaturdaten bekannt. Eine Interpretation der absoluten Werte ist deshalb nicht möglich. Weiterhin korrelieren sie nicht mit den gefundenen Populationen der Wasserstoffbrücken und Sekundärstrukturen von Efrapeptin C (siehe Abbildungen 28 und 30).

Tabelle 13: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für Efrapeptin C **1** in DCM.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Aib-2			-1.2
Aib-4 H <sup>N</sup>	Pip-1 O	73.4	-1.0
Aib-5 H <sup>N</sup>	Pip-3 O	5.1	-0.1
Leu-6 H <sup>N</sup>	Pip-3 O	55.4	-0.2
Leu-6 H <sup>N</sup>	Aib-4 O	6.1	
$\beta$ Ala-7 H <sup>N</sup>	Aib-4 O	34.7	n. b.
$\beta$ Ala-7 H <sup>N</sup>	Aib-5 O	42.6	
Gly-8 H <sup>N</sup>	Leu-6 O	10.0	n. b.
Aib-9 H <sup>N</sup>	Aib-2 O	12.7	-1.4
Aib-9 H <sup>N</sup>	Pip-3 O	5.7	
Aib-9 H <sup>N</sup>	Leu-6 O	9.7	
Aib-9 H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala-7 O	9.4	
Aib-10 H <sup>N</sup>	Aib-2 O	59.0	-1.0
Aib-10 H <sup>N</sup>	Gly-8 O	2.2	
Aib-12 H <sup>N</sup>	Aib-9 O	72.2	-1.8
Gly-13 H <sup>N</sup>	Pip-11 O	10.3	-1.5
Leu-14 H <sup>N</sup>	Pip-11 O	24.1	-1.5
Leu-14 H <sup>N</sup>	Aib-12 O	18.2	
Aib-15 H <sup>N</sup>	Pip-11 O	62.5	-0.7
Aib-15 H <sup>N</sup>	Aib-12 O	6.6	
X-16 H <sup>N</sup>	Aib-12 O	30.2	-0.2
X-16 H <sup>N</sup>	Gly-13 O	44.6	

Das Wasserstoffbrückenmuster zeigt, dass allgemein eine  $3_{10}$ -Helix gegenüber einer  $\alpha$ -Helix favorisiert wird. Die Helix weitet sich jedoch in der Region zwischen Gly-13 und Aib-15 verursacht durch das Gly-13, so dass hier eine  $\alpha$ -Helix vorliegt.

Tabelle 14: Zusammenfassung der gemittelten Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen der Cluster I, II, III und IV aus der RMD für Efrapeptin C 1 in DCM.

AS	Cluster I			Cluster II			Cluster III			Cluster IV		
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$
Pip-1	-109°	133°		-111°	70°		-113°	36°		-95°	158°	
Aib-2	-55°	-17°		-46°	-30°		-53°	-25°		-53°	-20°	
Pip-3	-127°	28°		-131°	40°		-129°	37°		-117°	-11°	
Aib-4	-54°	79°		2°	-81°		-56°	94°		9°	-62°	
Aib-5	69°	32°		-146°	71°		47°	43°		-173°	49°	
Leu-6	71°	-3°		67°	-29°		60°	-7°		65°	-43°	
$\beta$ Ala-7	-114°	66°	62°	-104°	72°	77°	-99°	68°	58°	-83°	78°	54°
Gly-8	112°	-79°		111°	-72°		123°	-39°		116°	-81°	
Aib-9	62°	26°		43°	46°		68°	26°		60°	-9°	
Aib-10	-58°	-37°		-36°	-42°		-46°	-29°		-52°	-36°	
Pip-11	-111°	49°		-126°	49°		-128°	32°		-115°	38°	
Aib-12	-49°	-71°		-60°	52°		-31°	-66°		-51°	-79°	
Gly-13	-38°	-37°		94°	-60°		-77°	-30°		-40°	-49°	
Leu-14	-79°	-49°		64°	-85°		-84°	-32°		-50°	-36°	
Aib-15	-59°	-33°		-75°	25°		-60°	-28°		-60°	-43°	
X	-134°			-119°			-135°			-111°		

Aus der RMD konnten durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkel vier Clusterfamilien I bis IV ermittelt werden. Die Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Strukturen dieser Cluster sind in Tabelle 14 zusammengefasst, während die Strukturen in Abbildung 30 dargestellt sind. Die Cluster besitzen Populationen von 32.8% für I, 9.6% für II, 7.2% für III und 7.2% für IV. Es lässt sich erkennen, dass konformationelle Unterschiede zwischen den Clustern hauptsächlich in der Region um Aib-4 und Aib-5 sowie Aib-12 bis Leu-14 zu finden sind. Der höchst populierte Cluster I nimmt eine  $3_{10}$ -helikale Konformation im C-terminalen Bereich zwischen Aib-10 und X-16 ein und weist einen  $\beta$ -Schleifenstrang bzw. eine verzerrte  $3_{10}$ -Helix im N-terminalen Bereich zwischen Pip-1 und Leu-6 auf. Der ungeordnete Bereich zwischen  $\beta$ Ala-7 und Aib-9 wird durch eine mit 59.0% hoch populierte H-Brücke zwischen Aib-10  $H^N$  und Aib-2 O stabilisiert. Der Cluster III ist strukturell sehr ähnlich zu Cluster I und weist lediglich leichte Konformationsänderungen bei den Rückgratstorsionswinkeln der Aminosäuren Aib-4 und Aib-5

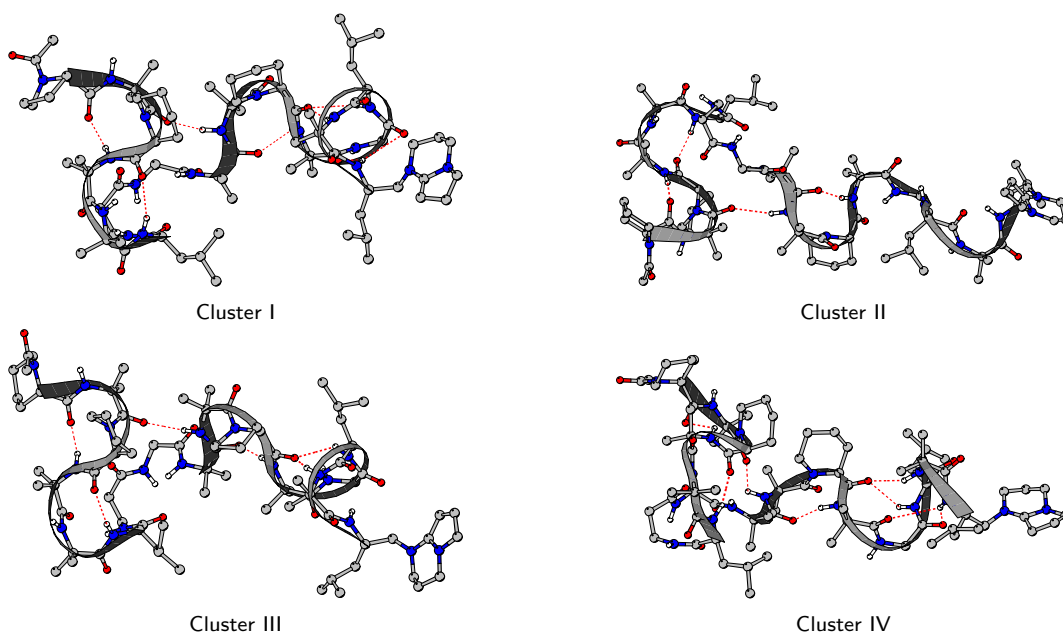


Abbildung 30: Zentrale Strukturen der Cluster I bis IV von Efraeptin C in DCM.

auf. Das Wasserstoffbrückenmuster wird von dieser konformationellen Variation nicht beeinflusst, so dass weiterhin eine helikale Konformation vorliegt.

Die Cluster II und IV weisen die Konformationsänderung bei den Rückgratstorsionswinkeln der Aminosäuren Aib-4 und Aib-5 ebenfalls in etwas ausgeprägterer Form auf, was dazu führt, dass in Cluster IV die helikale Sekundärstruktur nicht mehr deutlich zu erkennen ist. Zusätzlich hat der Cluster II jedoch eine drastische Änderung der Torsionswinkel im Bereich des Gly-13. Der Cluster II weist damit im Gegensatz zu den anderen drei Clusterfamilien keine ausgedehnte Sekundärstruktur auf. Diese stabile  $3_{10}$ -helikale Struktur des Efraeptin C im C-terminalen Bereich wird durch die hohe Rückgratsflexibilität und helixbrechenden Eigenschaften des Gly-13 in diesem Bereich gestört.

Das Efraeptin C kann anhand dieser Konformationsstudien detailliert beschrieben werden. Es sind  $3_{10}$ -Helices im N-terminalen Bereich zwischen Pip-1 und Leu-6 sowie im C-terminalen Bereich zwischen Aib-9 und der Kopfgruppe X zu finden. Dazwischen liegt eine ungeordnete Struktur zwischen  $\beta$ Ala-7 und Gly-8, die durch eine H-Brücke zwischen

Aib-10  $H^N$  und Aib-2 O stabilisiert wird. Das Peptid besitzt hohe Flexibilität im Bereich der Aminosäure Gly-13, wodurch sich hier die  $3_{10}$ -Helix häufig zu einer  $\alpha$ -Helix oder einer ungeordneten Struktur umlagert. Des Weiteren ist überraschenderweise eine erhöhte Flexibilität bei den Aminosäuren Aib-4 und Aib-5 zu finden, so dass die Sekundärstruktur des N-terminalen Bereichs zwischen Pip-1 und Leu-6 verzerrt wird.

Obwohl die Aminosäure Aib sowohl links- als auch rechtsgängige Helices stabilisiert (siehe Abschnitt 3.1.2), hat das Efrapeptin C nach der RMD ausschließlich rechtsgängige  $3_{10}$ -helikale Bereiche. Die strukturellen Eigenschaften der Aminosäure Pip könnten für dieses Verhalten verantwortlich sein, die in allen Rechnungen übereinstimmend Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  von ca.  $-115^\circ$  und  $56^\circ$  besitzt. Diese Hypothese kann jedoch nur durch weitere experimentelle Untersuchungen verifiziert werden.

Ein Vergleich der berechneten Konformationen mit der extrahierten Röntgenstruktur (siehe Abbildung 21) ist in Tabelle 15 zusammengefasst. Der RMSD-Wert wurde anhand der Rückgratatom N,  $C^\alpha$  und C für die finale Struktur nach der Strukturverfeinerung mit *RDC-restraints* und den zentralen Strukturen der Clusterfamilien der RMD-Simulation berechnet. Das sich die Konformation zwischen den Aminosäuren Leu-6 und Aib-9 bei allen Strukturvorschlägen deutlich von der Röntgenstruktur unterscheidet, finden sich hohe RMSD-Werte für den Vergleich des kompletten Peptidrückgrats. Aus diesem Grund werden zusätzlich die helikalen Bereiche zwischen Pip-1 und Aib-5 sowie Aib-10 und Aib-15 mit der Röntgenstruktur verglichen. Hier zeigt sich bei fast allen Strukturvorschlägen eine gute Korrelation. Lediglich die C-terminale Helix zwischen Aib-10 und Aib-15 der zentralen Struktur vom RMD-Cluster II besitzt einen hohen RMSD-Wert und weicht damit konformationell deutlicher von der Röntgenstruktur ab. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Struktur in Lösung der Röntgenstruktur recht ähnlich ist, was aufgrund der entropiegetriebenen Bindung an der ATPase nicht überraschend ist. Der flexible Bereich zwischen Leu-6 und Aib-9 sorgt bei der Bindung wahrscheinlich für die exakte Ausrichtung der beiden Helices in der Bindungstasche.

Die zentralen Strukturen der Cluster I bis IV wurden als Startstrukturen einer FMD-Simulation verwendet. Das Clustering der erhaltenen Trajektorien zeigt, dass die von Efrapeptin C ausgebildete  $3_{10}$ -Helix sehr stabil ist. Die zentralen Strukturen der Clusterfamilien aller FMD besitzen ausgeprägte  $3_{10}$ -helikale Strukturen, die durch die Fluktuationen um

Tabelle 15: Vergleich der extrahierten Röntgenstruktur mit den Strukturvorschlägen von Efrapeptin C **1** nach der Strukturverfeinerung mit RDC (RDC-SA) und aus der RMD (Cluster I bis IV) anhand der RMSD-Werte nach Rückgratstorsionswinkel.

Struktur	Pip-1 – Aib-5	Aib-10 – Aib-15	Pip-1 – X
RDC-SA	119	134	349
RMD Cluster I	132	88	403
RMD Cluster II	136	182	374
RMD Cluster III	135	97	367
RMD Cluster IV	121	87	404

Gly-13,  $\beta$ Ala-7 und Gly-8 sowie Aib-4 und Aib-5 gestört werden. Das Wasserstoffbrückenmuster ist während aller FMD nahezu identisch, jedoch weisen die einzelnen H-Brücken bedingt durch die erhöhten thermischen Bewegungen geringere Populationen auf. Die Anzahl der positiven NOE-Verletzungen steigt von 6 auf durchschnittlich 13. Die durchschnittlichen positiven NOE-Verletzung von 88 pm ist im Verhältnis zu der während der RMD von 15 pm akzeptabel.

Zusammenfassend ist die Struktur des Efrapeptin C in Lösung nun detailliert zu beschreiben. Durch die Anwendung von RDC-Daten und Synthese von deuterierten Efrapeptin C-Sequenzen konnte Zuordnung der Resonanzfrequenzen entschieden verbessert werden, so dass eine gute relative Anzahl an experimentellen *restraints* zur Verfügung stehen. Das RDC-SA resultierte in einer ausgezeichneten Startstruktur für die folgenden MD-Simulationen, welche eine Analyse der Dynamik zulassen. Das Efrapeptin C besitzt in Lösung zwei rechtsgängige  $3_{10}$ -helikale Strukturen, die durch einen unstrukturierten Bereich zwischen den Aminosäuren Leu-6 und Aib-9 miteinander verbunden sind. Dieser Bereich wird durch eine intramolekulare H-Brücke zwischen Aib-10 H<sup>N</sup> und Aib-2 O stabilisiert. Durch die Aminosäure Gly-13 kommt es zeitweilig zu einer Entwindung der Helix, so dass hier eine  $\alpha$ -Helix oder ein unstrukturierter Bereich vorliegt. Die erhöhte Dynamik der Aminosäuren Aib-4 und Aib-5 wird wahrscheinlich durch die nahestehenden Aminosäuren  $\beta$ Ala-7 und Gly-8 stark beeinflusst, da sich hier eine höhere Stabilität erwarten ließe.



### 3.4 Experimenteller Teil

Die CD-Spektren wurden bei 298 K mit einem J-810 CD-Spektroskop (Jasco) unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm von 300 nm bis 185 nm bei einer Peptidkonzentration von  $5.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  aufgenommen. Als Geräteparameter wurden die folgenden Einstellungen verwendet: *band width* 1 nm, *response* 1 s, *sensitivity* low, *data pitch* 0.5 nm, *scanning speed*  $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , *accumulation* 5. Die Elliptizität  $[\theta]$  ist in  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  angegeben. Die aufgenommenen Spektren wurden durch Subtraktion des Solvens TFE und anschließende S/N-Unterdrückung mit der Savitzky-Golay Methode bearbeitet.

Die FT/IR-Spektren wurden mit einer Auflösung von  $2 \text{ cm}^{-1}$  in DMSO- $\text{D}_6$  bzw. DCM mit einem Bruker Equinox 55 FT/IR-Spektrometer in einer  $\text{CaF}_2$ -Zelle mit einer Weglänge von 0.207 mm bei einer Peptidkonzentration von 4 mM aufgenommen.

Die VCD-Spektren wurden mit einer Auflösung von  $4 \text{ cm}^{-1}$  in DMSO- $\text{D}_6$  bzw. DCM mit einem Bruker PMA37 VCD/PM-IRRAS Modul an einem Bruker Equinox 55 FT/IR-Spektrometer aufgenommen. Der photoelastische ZnSe-Modulator des Instruments wurde auf eine Wellenzahl von  $1600 \text{ cm}^{-1}$  eingestellt. Zusätzlich wurde ein optischer Filter zur Erhöhung der Sensitivität in der Carbonylregion mit einem Transmissionsbereich von  $1960 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  verwendet. Das Instrument wurde mit einer CdS *multiple-wave*-Platte kalibriert. Die Messungen erfolgten in einer  $\text{CaF}_2$ -Zelle mit einer Weglänge von 0.207 mm bei einer Probenkonzentration von  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Das VCD-Spektrum wurde über 21000 Einzelspektren gemittelt. Zur Basislinienkorrektur wurde das Spektrum des Solvens subtrahiert.

Efraeptin C **1** wurde in einem NMR-Röhrchen in DMSO- $\text{D}_6$  bzw. DCM- $\text{D}_2$  gelöst, durch mehrmaliges Einfrieren im Vakuum entgast und anschließend unter Argonatmosphäre luftdicht verschlossen. Die Konzentration betrug zwischen 5 mM und 10 mM. Die NMR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K für Messungen in DMSO- $\text{D}_6$  und 294 K für Messungen in DCM- $\text{D}_2$  mit einem Bruker Avance Spektrometer bei einer magnetischen Flussdichte  $B_0$  von 14.1 T aufgenommen, entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von 600.13 MHz bzw.  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenz von 150.90 MHz. Für alle Experimente mit Aus-

nahme der eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Experimente wurde ein inverser 5 mm-TXI 600 MHz Probenkopf mit  $z$ -Gradient verwendet.

Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Spinsysteme erfolgte mit einem  $^1\text{H}$ -Spektrum, einem phasensensitivem doppelquantengefilterten COSY und einem TOCSY mit DIPSI2-Pulssequenz für den homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfer.<sup>[217–219]</sup> Zur Bestimmung der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen wurden zweidimensionale heteronuklear korrelierte inverse  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC- und HMBC-Spektren aufgenommen.<sup>[220–223]</sup> Ein zusätzlich aufgenommenes ROE-Spektrum diente zur Berechnung der für die Primärstrukturbestimmung erforderlichen interatomaren Distanzen.<sup>[76,224]</sup> Zur Akquisition und Prozessierung wurde das Programm XWIN-NMR von Bruker in der Version 3.1 und TOPSPIN in der Version 1.3 verwendet. Vor der Fourier-Transformation erfolgte eine Basislinienkorrektur und Apodisation des FID durch eine Verstärkungsfunktion. Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter von **1** sind in den Tabellen 19 und 20 zusammengefasst. Das Programm SPARKY wurde in der Version 3.110 für die Zuordnung der Resonanzfrequenzen und Integration der NOE- bzw. ROE-Kreuzsignale verwendet.<sup>[225]</sup>

Für die Messung der dipolaren Restkopplungen wurde mit  $\beta$ -Strahlung quervernetztes PDMS-T63 ( $M_n \approx 450000 \text{ g mol}^{-1}$ , 100 kGy) und PDMS-T61 ( $M_n \approx 320000 \text{ g mol}^{-1}$ , 60 kGy) der Firma ABCR GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland) als Ausrichtungsmedium verwendet, welches zuvor in DCM- $\text{D}_2$  mehrere Tage bis zum Gleichgewicht quellen konnte. Eine konstante quadrupolare Aufspaltung des Deuteriumsignals von  $\Delta\nu_Q = 19.8 \text{ Hz}$  wurde nach einer Woche erreicht und signalisierte die Gleichgewichtseinstellung. Das überstehende Lösungsmittel wurde entfernt und eine Stammlösung von Efrapeptin C **1** 2 Tage inkubiert, so dass eine finale Konzentration von ca. 7.9 mM erreicht wurde.

Die NMR-Spektren zur Messung der dipolaren Kopplungen wurden mit einem Bruker DMX900 Spektrometer bei einer magnetischen Flussdichte  $B_0$  von 21.14 T aufgenommen, entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von 900.13 MHz und einer  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenz von 226.34 MHz. Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  Resonanzfrequenzen erfolgte mit TOCSY-, NOE-,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC- und  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Spektren, deren Akquisitions- und Prozessierungsparameter in den Tabellen 19 und 20 zusammengefasst sind.  $^1J_{\text{CH}}$ - und  $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungen der isotopen sowie anisotropen Lösungen wurden mit  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-

Tabelle 16: Dipolare Restkopplungskonstanten  $D$  von Efrapeptin **1** in DCM/PDMS.

AS	$D_{\text{NHN}}$ [Hz]	$D_{\text{C}\alpha\text{H}\alpha}$ [Hz]	$D_{\text{C}\beta\text{H}\beta_{\text{ proS}}}$ [Hz]	$D_{\text{C}\beta\text{H}\beta_{\text{ proR}}}$ [Hz]
Pip-1		-2.89		
Aib-2	-3.63		0.38	-2.00
Pip-3		2.42		
Aib-4	-3.91		-2.03	-4.19
Aib-5	-3.24		1.31	-3.35
Leu-6	-4.08	-6.09		
$^{\beta}\text{Ala-7}$	-4.16	-11.10	-1.06	
Gly-8	-3.03	5.05/0.84		
Aib-9	-3.90		-3.88	0.48
Aib-10	-3.81		-1.27	3.06
Pip-11		5.43		
Aib-12	-4.25		-3.19	1.27
Gly-13	-4.25	-3.82/3.33		
Leu-14	-3.20	1.04		
Aib-15	-3.85		-2.13	1.33
X-16	-3.07	1.80		

bzw.  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren ohne Entkopplung ermittelt. Die RDC wurde nach der Methode von Yan *et al.* aus den Spektren extrahiert und sind in Tabelle 16 zusammengefasst.<sup>[226]</sup> Aufgrund von Signalüberlagerungen konnten die dipolaren Restkopplungen von  $^{\beta}\text{Ala-7}$  nicht eindeutig ermittelt werden und werden im Folgenden nicht berücksichtigt.

Die DG/SA wurde mit dem Programm XPLOR-NIH durchgeführt.<sup>[73,227]</sup> Die initiale Temperatur für das enthaltende SA wurde für 1000 Schritte auf 2000 K gehalten und anschließend innerhalb von 1000 Kühlritten mit einem Inkrement von 25 K auf 100 K gesenkt. Nach einer Minimierungsphase ohne Konvergenzkriterium von 200 Schritten wird die generierte Struktur mit einem Akzeptanzkriterium verglichen. Es werden Strukturen akzeptiert, deren Abweichungen für NOE-Distanzen geringer als 50 pm, für Bindungslängen kleiner als 5 pm und für Winkel, Torsionswinkel und *impropers* kleiner als  $5^\circ$  sind. Insgesamt wurden so 1000 Strukturen generiert. Das Clustering der Strukturen bezüglich ihrer Rückgratstorsionswinkel wurde mit dem von Guthöhrlein entwickelten Programm TORCL durchgeführt.<sup>[77]</sup> Hierzu wurden alle Torsionswinkel des Rückgrats für die Analy-

Tabelle 17: Parameter für das SA mit RDC-*restraints*.

Schritt	$f$			$T_{\text{INIT}}$ [K]	$n_{\text{HIGH}}$	$n_{\text{COOL}}$
	NH <sup>N</sup>	C <sup><math>\alpha</math></sup> H <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup> H <sup><math>\beta</math></sup>			
1	0.5	0.5	0.0	1000	1000	2000
2	0.5	0.5	0.0	2000	5000	6000
3	0.5	0.1	0.1	2000	5000	6000
4	0.75	0.2	0.2	2000	5000	6000
5	1.0	0.5	0.25	2000	5000	6000
6	1.0	1.0	0.5	2000	5000	6000
7	1.0	1.0	1.0	2000	5000	6000
8	1.0	1.0	1.0	1000	10000	6000
9	1.0	1.0	1.0	1000	10000	6000
10	1.0	1.0	1.0	2000	10000	6000

se mit einem *cutoff* von 60° verwendet. Clusterfamilien mit einer geringeren Population als 5% wurden als irrelevant eingestuft und verworfen.

Die Strukturverfeinerung von Efrapeptin C in DCM erfolgte mit *restraints* basierend auf RDC. Zunächst wurden mit DG/SA analog zum vorherigen Absatz 42 Strukturen generiert.<sup>[42]</sup> Die zentrale Struktur der resultierenden Clusterfamilie wurde als Startstruktur für das folgende SA mit Anwendung der RDC-*restraints* verwendet. Die Startwerte für den Ausrichtungstensor wurden mit der von Clore *et al.* beschriebenen Methode berechnet.<sup>[120]</sup> Die experimentellen RDC wurden mit Ausnahme deren der Aminosäuren  <sup>$\beta$</sup> Ala-7 und Gly-8 sukzessive dem SA hinzugefügt. Die Simulationslänge (Anzahl der Schritte  $n_{\text{HIGH}}$ ) bei der Starttemperatur  $T_{\text{INIT}}$  und die anschließenden Kühlungsschritte  $n_{\text{COOL}}$  zur finalen Systemtemperatur von 100 K wurden variiert und sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die erhaltende Struktur wurde ohne Konvergenzkriterium mit 1000 Schritten minimiert. Insgesamt wurden so jeweils 42 Strukturen pro Zyklus berechnet, deren energetisch günstigste für das folgende SA verwendet wurde.<sup>[42]</sup> Der Ausrichtungstensor wurde nach jedem Zyklus mit dem Programm Pales auf Grundlage dieser Startstruktur neu bestimmt.<sup>[121]</sup> Für die RDC-*restraints* wurde ein harmonisches Potenzial verwendet, dessen Kraftkonstanten um den Faktor  $f$  schrittweise erhöht wurden (siehe Tabelle 17). Das System konvergierte so nach 10 Zyklen.

Tabelle 18: Parameter der Aufheizphase von MD-Simulationen.

Schritt	Dauer $t$ [ps]	Zeitintervall $\delta t$ [fs]	Temperatur $T$ [K]	Kraftkonstante $k_r$ [kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-1</sup> ]
1	2	1	50	25000
2	5	1	100	10000
3	5	1	150	5000
4	5	1	200	1000
5	5	1	250	100
6	5	1	300 bzw. 294	10
7	10	2	300 bzw. 294	10

Für RMD-Simulationen wurden die zentralen Strukturen der DG/SA-Clusterfamilien verwendet. Das Programmpaket GROMOS96 wurde zur Berechnung der Newtonschen Bewegungsgleichungen verwendet. Diese Berechnungen basierten auf dem Kraftfeld GROMOS45A3 mit verbesserten Parametern für DMSO.<sup>[82,228,229]</sup> Analysiert wurden die Trajektorien mit dem Programmpaket GROMOS<sup>++</sup>.<sup>[230]</sup> Die Solvensbox wurde mit einem Abstand von mindestens 1.6 nm zwischen Peptid und Boxgrenze generiert. Für nichtkovalente Wechselwirkungen betrug der *cutoff* 1.4 nm. Nach einer Relaxation der Solvenskoordinaten mit fixierten Peptidkoordinaten durch eine *steepest descent* Energieminimierung mit maximal 5000 Schritten folgte die Aufheizphase zur Äquilibration des gesamten Systems. Sukzessiv wurde mittels kurzer MD-Simulationen und einer starken Kopplung an das externe Heizbad mit einer Relaxationszeit von 0.01 ps die Systemtemperatur in 50 K-Schritten auf 300 K (DMSO) bzw. 294 K (DCM) erhöht. Die Peptidkoordinaten wurden dabei durch Fixierung mit abnehmenden Kraftkonstanten langsam relaxiert. Die Parameter für die Aufheizphase sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Das äquilibrierte System wurde anschließend 2.5 ns mit einer Relaxationszeit von 0.1 ps schwach an das externe Temperaturbad von 300 K für die Simulationen in DMSO und 294 K für Simulationen in DCM gekoppelt. Das externe Druckbad sorgte mit einer ebenfalls schwachen Kopplung an das System mit einer Relaxationszeit von 0.5 ps für einen konstanten Druck von 101325 Pa. Für die Simulation wurde die isotherme Kompressibilität auf 4.575 kJ · mol<sup>-1</sup> · nm<sup>-3</sup> festgesetzt. Der SHAKE-Algorithmus wurde zur Verlängerung des Zeitintervalls auf 2 fs während der Simulationen mit einer Toleranz von 10<sup>-4</sup> verwendet. Die experimentellen NOE-Distanzen wurden mit einer Toleranz von

10% (DMSO) bzw. 20% (DCM) als zeitlich gemittelte *restraints* mit Kraftkonstanten von  $8000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$  verwendet. Die in GROMOS<sup>++</sup> implementierten Pseudoatom- und Multiplizitätskorrekturen wurden ebenfalls angewandt.<sup>[231]</sup> Die Kraftkonstante wurde für *restraints* zwischen zwei Amidprotonen halbiert. Das Clustering jeder zehnten Struktur der berechneten Trajektorie wurde bezüglich ihrer Rückgratstorsionswinkel bzw. Rückgratatomkoordinaten wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Die zentralen Strukturen der RMD-Clusterfamilien wurden als Startstrukturen einer *unrestrained* MD-Simulation verwendet. Für die 10 ns Simulation wurden die selben Parameter mit Ausnahme der Verwendung von NOE-*restraints* eingesetzt.

Tabelle 19: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von Efrapeptin **c 1**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
Efrapeptin <b>C 1</b> in DMSO-D <sub>6</sub>						
<sup>1</sup> H	zg30	64K	16	20.62, 6.18	0.3	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfph	4K×512	32	12.29, 6.18	1.8×14.4	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	mlevph	4K×256	32	10.21, 6.18	1.5×24.0	$\tau_m = 80$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyph	8K×512	32	10.21, 6.18	0.8×12.0	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyph	8K×512	32	10.21, 6.18	0.8×12.0	$\tau_m = 160$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H-HSQC	hsqcetgpsp	4K×256	48	11.00, 5.14	1.6×76.6	$J_{C,H} = 140$ Hz
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	hsqcetf3gpsi	2K×128	128	3.50, 7.50	1.0×21.4	$J_{N,H} = 90$ Hz
HMBC	hmbcgp1pndqf	4K×256	64	45.0, 115.0 11.00, 5.14 222.4, 99.8	1.6×131.1	2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ $J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 8$ Hz 2K×1K, sin <sup>2</sup>
Efrapeptin <b>C 1</b> in DCM-D <sub>2</sub> (isotop)						
<sup>1</sup> H	zg	32K	4	8.99, 4.56	0.3	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfph	2K×512	32	10.01, 5.35	2.9×11.7	4K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	4K×512	8	8.99, 4.56	2.2×18.0	$\tau_m = 70$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyph	2K×512	16	7.98, 3.25	4.0×15.8	$\tau_m = 300$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H-HSQC	invietgpsi	2K×512	32	7.98, 3.25	3.5×44.2	$J_{C,H} = 125$ Hz
<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H-HSQC	invietgpsi	2K×512	48	7.98, 3.25	3.5×26.5	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ $J_{C,H} = 125$ Hz, n. entkoppelt
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	1K×256	32	60.0, 40.0 3.99, 7.8 35.0, 122.0	3.5×12.5	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ $J_{N,H} = 91$ Hz
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	1K×256	64	3.99, 7.8 35.0, 122.0	3.5×12.5	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ $J_{N,H} = 91$ Hz, n. entkoppelt

Tabelle 20: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von Efrapeptin C 1.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, OIP [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
Efrapeptin C 1 in DCM-D <sub>2</sub> /PDMS100 (anisotrop)						
<sup>1</sup> H	zg	8K	1	11.97, 5.00	1.3	32K, exp., LB 0.3
<sup>1</sup> H	zgprrsp	8K	128	8.65, 4.93	1.0	$\nu_{offset}^{PR} = -4340.0\text{Hz}$
<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H-HSQC	invietfgpsiprrsp	2K×256	8	8.65, 4.93	3.8×53.1	32K, exp., LB 0.3
				60.0, 40.0		$J_{C,H} = 125\text{Hz}$ , n. entkoppelt
						$\nu_{offset}^{PR} = -4340.0\text{Hz}$ , SP: sm100.1000
						$2K \times 1K$ , $\sin^2$ , $+\frac{\pi}{2}$
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietfgpsipi	1K×256	64	3.99, 7.80	3.5×12.5	$J_{N,H} = 91\text{Hz}$ , n. entkoppelt
				35.0, 122.0		$2K \times 512$ , $\sin^2$ , $+\frac{\pi}{2}$
Efrapeptin C 1 in DCM-D <sub>2</sub> /PDMS60 (anisotrop)						
<sup>1</sup> H	zg	8K	1	11.97, 5.00	1.3	32K, exp., LB 0.3
<sup>1</sup> H	zgprrsp	8K	32	8.65, 4.93	1.0	$\nu_{offset}^{PR} = -4340.0\text{Hz}$ :
						32K, exp., LB 0.3
<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H-HSQC	invietfgpsiprrsp	8K×1k	72	8.65, 4.93	1.0×17.7	$J_{C,H} = 125\text{Hz}$ , n. entkoppelt
				80.0, 30.0		$\nu_{offset}^{PR} = -4340.0\text{Hz}$ , SP: sm100.1000
						$8K \times 2K$ , $\sin^2$ , $+\frac{\pi}{2}$
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietfgpsipi	1K×384	128	3.99, 7.80	3.5×8.3	$J_{N,H} = 91\text{Hz}$ , n. entkoppelt
				35.0, 122.0		$8K \times 4K$ , $\sin^2$ , $+\frac{\pi}{2}$



Tabelle 21: NMR-Resonanzfrequenzen von Efrapeptin C **1** in DMSO.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	sonstige
Pip-1		5.04	1.49/2.11	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.34; H <sup><math>\delta</math></sup> 3.00; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 3.73
Aib-2	8.25		1.41	
Pip-3		4.98	1.46/2.05	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.36; H <sup><math>\delta</math></sup> 2.98; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 4.10
Aib-4	7.67			
Aib-5	7.96		1.30/1.40	
Leu-6	7.54	4.01	1.63	
$\beta$ Ala-7	7.53	4.02	3.26	
Gly-8	8.33	3.59		
Aib-9	8.13		1.35/1.41	
Aib-10	7.67			
Pip-11		5.35	1.30/2.19	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.31; H <sup><math>\delta</math></sup> 2.73; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 4.22
Aib-12	7.65		1.38/1.44	
Gly-13	8.45	3.61/3.69		
Leu-14	7.85	3.93	1.47/1.66	H <sup><math>\delta</math></sup>
Aib-15	7.36		1.36	
X	6.96	4.21	1.40/1.49	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.16; H <sup><math>\beta'</math></sup> 3.31/3.54

AS	$\delta$ [ppm] N	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	sonstige
Pip-1	n. b.	52.0	26.8	
Aib-2	133.5	n. b.	n. b.	
Pip-3	n. b.	54.5	25.3	C 175.3
Aib-4	127.3	56.7		
Aib-5	123.0	n. b.	n. b.	
Leu-6	109.7	n. b.	n. b.	
$\beta$ Ala-7	109.9	n. b.	n. b.	C 171.8
Gly-8	111.8	n. b.		C 169.3
Aib-9	128.7	56.6		
Aib-10	130.6	n. b.	n. b.	
Pip-11	n. b.	53.2	25.1	C 172.0
Aib-12	129.9	n. b.	n. b.	C 175.8
Gly-13	101.0	n. b.		C 171.2
Leu-14	118.3	53.6	n. b.	C 172.3
Aib-15	124.2	56.8	26.6	C 174.4
X	112.1	n. b.	n. b.	

Tabelle 22: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für Efrapentin c 1 in DMSO.

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Pip-1 H $^{\alpha}$	Aib-2 H $^N$	228	251	254	Pip-11 H $^{\alpha}$	Leu-14 H $^N$	300	330	353
Pip-1 H $^{\beta 1}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	235	258	249	Pip-11 Q $^{\beta}$	Pip-11 H $^{\alpha}$	245	360	255
Pip-1 H $^{\beta 1}$	Aib-2 H $^N$	317	349	201	Pip-11 Q $^{\delta}$	Aib-12 H $^N$	269	422	502
Pip-1 Q $^{\delta}$	Pip-1 Q $^{\epsilon}$	236	440	225	Pip-11 Q $^{\epsilon}$	Aib-10 H $^N$	219	361	305
Pip-1 Q $^{\delta}$	Aib-2 H $^N$	305	426	445	Pip-11 Q $^{\epsilon}$	Pip-11 H $^{\alpha}$	249	398	274
Pip-1 Q $^{\epsilon}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	224	326	364	Aib-12 H $^N$	Gly-13 H $^N$	265	292	257
Aib-2 Q $^{\beta}$	Aib-2 H $^N$	253	498	264	Aib-12 M $^{\beta 1}$	Aib-12 H $^N$	238	345	330
Pip-3 H $^{\alpha}$	Aib-4 H $^N$	218	240	254	Aib-12 M $^{\beta 2}$	Aib-12 H $^N$	231	335	270
Pip-3 H $^{\alpha}$	Aib-5 H $^N$	258	284	305	Aib-12 M $^{\beta 1}$	Gly-13 H $^N$	299	425	418
Pip-3 H $^{\alpha}$	Leu-6 H $^N$	268	295	327	Aib-12 M $^{\beta 2}$	Gly-13 H $^N$	267	383	318
Pip-3 Q $^{\beta}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	247	362	235	Gly-13 H $^{\alpha 1}$	Gly-13 H $^N$	245	270	277
Pip-3 Q $^{\beta}$	Aib-4 H $^N$	345	470	230	Gly-13 H $^{\alpha 1}$	Leu-14 H $^N$	284	312	264
Pip-3 Q $^{\delta}$	Aib-4 H $^N$	291	449	499	Gly-13 H $^{\alpha 1}$	Aib-15 H $^N$	360	396	353
Pip-3 Q $^{\epsilon}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	224	366	356	Gly-13 H $^{\alpha 2}$	Gly-13 H $^N$	214	235	250
Pip-3 Q $^{\epsilon}$	Aib-2 H $^N$	238	384	295	Gly-13 H $^{\alpha 2}$	Leu-14 H $^N$	287	316	334
Pip-3 Q $^{\epsilon}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	236	382	303	Gly-13 H $^{\alpha 2}$	X-16 H $^N$	305	335	360
Aib-4 H $^N$	Aib-5 H $^N$	250	275	256	Leu-14 H $^N$	Gly-13 H $^N$	252	277	250
Aib-5 Q $^{\beta}$	Aib-5 H $^N$	258	504	256	Leu-14 H $^{\alpha}$	Leu-14 H $^N$	229	252	271
Leu-6 H $^N$	Aib-5 H $^N$	240	264	278	Leu-14 H $^{\alpha}$	Aib-15 H $^N$	220	242	234
$\beta$ Ala-7 H $^N$	Gly-8 H $^N$	320	352	317	Leu-14 H $^{\alpha}$	X-16 H $^N$	289	318	347
$\beta$ Ala-7 Q $^{\alpha}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	210	349	254	Leu-14 Q $^{\beta}$	Leu-14 H $^N$	237	351	236
$\beta$ Ala-7 Q $^{\beta}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	209	348	252	Leu-14 Q $^{\beta}$	Aib-15 H $^N$	329	452	338
Gly-8 Q $^{\alpha}$	Gly-8 H $^N$	204	341	249	Aib-15 H $^N$	Leu-14 H $^N$	229	252	280
Gly-8 Q $^{\alpha}$	Aib-9 H $^N$	201	338	278	Aib-15 Q $^{\beta}$	Aib-15 H $^N$	225	468	277
Gly-8 Q $^{\alpha}$	Aib-10 H $^N$	313	476	411	Aib-15 Q $^{\beta}$	X-16 H $^N$	248	498	390
Aib-9 Q $^{\beta}$	Aib-9 H $^N$	256	502	254	X-16 H $^N$	Aib-15 H $^N$	222	244	225
Aib-10 H $^N$	Gly-8 H $^N$	327	360	317	X-16 H $^{\alpha}$	X-16 H $^N$	223	245	283
Aib-10 H $^N$	Aib-9 H $^N$	244	268	281	X-16 Q $^{\prime\beta}$	X-16 H $^N$	234	347	297
Pip-11 H $^{\alpha}$	Aib-12 H $^N$	225	247	215	X-16 Q $^{\prime\beta}$	X-16 H $^{\alpha}$	209	320	253
Pip-11 H $^{\alpha}$	Gly-13 H $^N$	293	322	330					

Tabelle 23: NMR-Resonanzfrequenzen von Efrapeptin C **1** in DCM.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	sonstige
Ac	2.23			
Pip-1		5.25	1.62/2.20	H <sup><math>\gamma, \delta</math></sup> 1.3–1.7; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 3.09/3.84
Aib-2	7.19		1.51/1.56	
Pip-3		4.56	1.88/2.11	H <sup><math>\gamma, \delta</math></sup> 1.3–1.7; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 3.36/4.05
Aib-4	8.02		1.54/1.57	
Aib-5	7.83		1.57/1.63	
Leu-6	7.56	4.17	1.69/1.85	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.76; H <sup><math>\delta</math></sup> 0.90/0.98
$\beta$ Ala-7	7.47	3.12/4.11	2.36/2.80	
Gly-8	7.80	3.65/3.76		
Aib-9	7.55		1.52/1.53	
Aib-10	7.80		1.49/1.60	
Pip-11		4.94	1.69/2.29	H <sup><math>\gamma, \delta</math></sup> 1.4–1.8; H <sup><math>\epsilon</math></sup> 3.24/4.35
Aib-12	8.08		1.50/1.60	
Gly-13	7.96	3.69/3.84		
Leu-14	8.12	3.87	1.55/1.92	H <sup><math>\delta</math></sup> 0.94/0.99
Aib-15	7.23		1.53/1.55	
X	6.83	4.40	1.23/1.67	H <sup><math>\gamma</math></sup> 1.79; H <sup><math>\delta</math></sup> 0.94; H <sup><math>\beta'</math></sup> 3.35/3.45; H(DBN) 3.2–4.0

AS	$\delta$ [ppm] N	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	sonstige
Pip-1	n. b.	51.7	24.9	C <sup><math>\epsilon</math></sup> 44.7
Aib-2	135.0	n. b.	23.0/27.4	
Pip-3	n. b.	58.3	25.1	C <sup><math>\epsilon</math></sup> 42.3
Aib-4	128.4	n. b.	22.2/26.5	
Aib-5	125.5	n. b.	23.7/26.5	
Leu-6	113.9	54.1	40.0	
$\beta$ Ala-7	112.2	36.2	37.24	
Gly-8	113.0	46.2		
Aib-9	123.9	n. b.	22.9/27.9	
Aib-10	128.5	n. b.	24.6/26.6	
Pip-11	n. b.	56.5	25.3	C <sup><math>\epsilon</math></sup> 43.6
Aib-12	129.7	n. b.	24.9/26.5	
Gly-13	132.9	44.7		
Leu-14	120.4	55.2	39.6	
Aib-15	121.9	n. b.	23.0/27.4	
X	112.4	n. b.	41.2	C <sup><math>\beta'</math></sup> 56.9; C(DBN) 42.4, 44.1, 54.8

Tabelle 24: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für Efrapeptin **1** in DCM.

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ac M $^{\alpha}$	Aib-2 H $^N$	362	544	325	$\beta$ Ala-7 H $^{\alpha 2}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	278	334	255
Pip-1 H $^{\alpha}$	Aib-2 H $^N$	343	411	220	$\beta$ Ala-7 H $^{\beta 1}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	302	362	286
Pip-1 H $^{\alpha}$	Aib-4 H $^N$	357	429	437	$\beta$ Ala-7 H $^{\beta 1}$	Gly-8 H $^N$	269	323	207
Pip-1 H $^{\beta 1}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	294	352	230	$\beta$ Ala-7 H $^{\beta 2}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	364	436	233
Pip-1 H $^{\beta 2}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	297	357	246	Gly-8 H $^{\alpha 1}$	Gly-8 H $^N$	251	301	244
Pip-1 H $^{\beta 2}$	Aib-4 H $^N$	337	405	356	Gly-8 H $^{\alpha 2}$	Gly-8 H $^N$	282	338	278
Pip-1 H $^{\epsilon 1}$	Aib-2 H $^N$	371	445	276	Gly-8 H $^N$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	349	419	409
Pip-1 H $^{\epsilon 1}$	Aib-4 H $^N$	413	495	381	Aib-10 M $^{\beta 1}$	Aib-10 H $^N$	278	425	261
Aib-2 M $^{\beta 1}$	Aib-2 H $^N$	318	482	255	Aib-10 M $^{\beta 1}$	Pip-11 H $^{\epsilon 2}$	279	427	295
Aib-2 M $^{\beta 2}$	Aib-2 H $^N$	416	621	321	Aib-10 M $^{\beta 2}$	Aib-10 H $^N$	313	474	322
Aib-2 Q $^{\beta}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	431	474	444	Pip-11 H $^{\alpha}$	Aib-12 H $^N$	352	422	257
Aib-2 H $^N$	Aib-4 H $^N$	423	508	459	Pip-11 H $^{\alpha}$	Leu-14 H $^N$	334	400	399
Pip-3 H $^{\alpha}$	Aib-4 H $^N$	376	456	274	Pip-11 H $^{\beta 1}$	Pip-11 H $^{\alpha}$	289	347	233
Pip-3 H $^{\alpha}$	Leu-6 H $^N$	429	510	394	Pip-11 H $^{\beta 2}$	Pip-11 H $^{\alpha}$	295	353	247
Pip-3 H $^{\beta 1}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	288	346	232	Pip-11 H $^{\beta 2}$	Aib-12 H $^N$	435	521	435
Pip-3 H $^{\beta 2}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	319	383	250	Pip-11 H $^{\beta 2}$	Leu-14 H $^N$	437	525	384
Pip-3 H $^{\epsilon 1}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	419	503	394	Pip-11 H $^{\epsilon 1}$	Aib-10 H $^N$	361	433	367
Pip-3 H $^{\epsilon 1}$	Aib-2 H $^N$	320	384	368	Pip-11 H $^{\epsilon 1}$	Aib-12 H $^N$	301	361	291
Pip-3 H $^{\epsilon 1}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	364	436	354	Pip-11 H $^{\epsilon 2}$	Aib-10 H $^N$	286	341	246
Pip-3 H $^{\epsilon 1}$	Aib-4 H $^N$	395	475	231	Pip-11 H $^{\epsilon 2}$	Aib-12 H $^N$	370	444	379
Pip-3 H $^{\epsilon 2}$	Pip-1 H $^{\alpha}$	391	469	364	Aib-12 M $^{\beta 2}$	Aib-12 H $^N$	259	398	322
Pip-3 H $^{\epsilon 2}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	421	505	392	Aib-12 M $^{\beta 1}$	Gly-13 H $^N$	320	485	283
Pip-3 H $^{\epsilon 2}$	Aib-4 H $^N$	348	418	360	Aib-12 M $^{\beta 1}$	Aib-12 H $^N$	305	462	259
Pip-3 H $^{\gamma 1}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	367	441	413	Aib-12 M $^{\beta 2}$	Gly-13 H $^N$	257	396	323
Pip-3 H $^{\gamma 2}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	405	485	371	Gly-13 H $^{\alpha 2}$	Gly-13 H $^N$	244	292	249
Pip-3 H $^{\gamma 2}$	Aib-4 H $^N$	467	561	316	Gly-13 H $^{\alpha 2}$	Leu-14 H $^N$	354	424	327
Aib-4 M $^{\beta 1}$	Aib-4 H $^N$	316	480	262	Gly-13 H $^{\alpha 1}$	Gly-13 H $^N$	280	336	230
Aib-4 M $^{\beta 1}$	Leu-6 H $^N$	345	521	509	Gly-13 H $^N$	Aib-12 H $^N$	284	340	332
Aib-4 M $^{\beta 1}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	298	454	463	Gly-13 H $^N$	Leu-14 H $^N$	299	359	296
Aib-4 M $^{\beta 2}$	Aib-4 H $^N$	341	514	292	Leu-14 H $^{\alpha}$	Leu-14 H $^N$	283	339	251
Aib-5 M $^{\beta 1}$	Aib-5 H $^N$	328	498	324	Leu-14 H $^{\alpha}$	Aib-15 H $^N$	360	432	339
Aib-5 M $^{\beta 2}$	Aib-5 H $^N$	296	448	281	Leu-14 H $^{\beta 1}$	Leu-14 H $^N$	301	361	265
Aib-5 H $^N$	Leu-6 H $^N$	296	352	253	Leu-14 H $^{\beta 1}$	Aib-15 H $^N$	375	449	240
Leu-6 H $^{\alpha}$	Aib-5 H $^N$	337	397	422	Leu-14 Q $^{\beta}$	Aib-12 H $^N$	336	538	550
Leu-6 H $^{\alpha}$	Leu-6 H $^N$	301	361	197	Leu-14 H $^{\beta 2}$	Leu-14 H $^N$	297	357	230
Leu-6 H $^{\alpha}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	364	436	315	Aib-15 Q $^{\beta}$	X-16 H $^N$	363	399	380
Leu-6 H $^{\alpha}$	Gly-8 H $^N$	366	440	464	Aib-15 Q $^{\beta}$	Aib-15 H $^N$	284	312	258
Leu-6 H $^{\beta 1}$	Leu-6 H $^N$	346	416	394	Aib-15 Q $^{\beta}$	X-16 H $^N$	357	393	380
Leu-6 H $^{\beta 1}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	387	461	371	Aib-15 H $^N$	Leu-14 H $^N$	376	452	264
Leu-6 H $^{\beta 2}$	Leu-6 H $^N$	286	354	342	X-16 H $^{\alpha}$	X-16 H $^N$	305	365	285
Leu-6 H $^{\beta 2}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	348	412	327	X-16 H $^{\beta 1}$	X-16 H $^{\alpha}$	327	393	261
Leu-6 Q $^{\delta}$	Pip-3 H $^{\alpha}$	405	860	673	X-16 H $^{\beta 2}$	X-16 H $^N$	324	388	257
Leu-6 H $^{\gamma}$	Leu-6 H $^N$	321	385	289	X-16 H $^{\gamma}$	X-16 H $^N$	377	453	361
Leu-6 H $^N$	Pip-3 H $^{\alpha}$	346	416	394	X-16 H $^N$	Gly-13 H $^N$	528	634	515
$\beta$ Ala-7 H $^{\alpha 1}$	$\beta$ Ala-7 H $^N$	292	350	363	X-16 H $^N$	Leu-14 H $^N$	510	612	391
$\beta$ Ala-7 H $^{\alpha 1}$	Gly-8 H $^N$	367	441	263	X-16 H $^N$	Aib-15 H $^N$	300	360	291

# 4

## Sequenzanalyse der Neo-Efrapeptine A und F

In Kooperation mit Syngenta Crop Protection Research wurde die Sequenz von Neo-Efrapeptin A **2** und Neo-Efrapeptin F **3** mit Hilfe von Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Erforderlich war dieses aufgrund nahezu identischer Fragmentierungsmuster in den MS/MS-Massenspektren der beiden Peptide, die Isomere vermuten lassen. NMR-spektroskopisch zeigt sich, dass sich die Neo-Efrapeptine A und F in der Aminosäure 11 unterscheiden. Die Pípecolinsäure in Neo-Efrapeptin A ist in Neo-Efrapeptin F durch das Isomer 3-MePro substituiert.

### 4.1 Primärstrukturanalyse von Polypeptiden und Proteinen

Die kovalente Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren und eventuelle posttranslationale Modifizierung wie z. B. Glykosylierung oder Acetylierung wird traditionell als Pri-

märstruktur von Proteinen bezeichnet. Die Sequenzierung ist damit ein fundamentaler Bestandteil der Strukturuntersuchung von Proteinen und Polypeptiden.

#### 4.1.1 Chemische Methoden

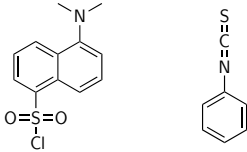


Abbildung 31: Dansylchlorid (links) und Phenylisothiocyanat (rechts).

Die Arbeiten von Frederick Sanger waren von herausragender Bedeutung für das molekularbiologische Verständnis des Lebens. Er erhielt 1958 seinen ersten Nobelpreis für Chemie für seine Arbeit an der Primärstrukturbestimmung des Rinderinsulins. Durch diese Arbeit, bei der mehrere Tonnen Bauchspeicheldrüsen die erforderlichen 100 g reinen Insulins lieferten, wurde gezeigt, dass die Sequenz der Aminosäuren die Struktur der Proteine entscheidend beeinflusst. Optimierung und Automatisierung der Methode von Sanger führten zu einer drastischen Verringerung der

Analysezeit und Probenmenge, so dass heute wenige Picomol innerhalb von einigen Tagen analysiert werden können. Seitdem sind eine Vielzahl an Primärstrukturen diverser Proteine aufgeklärt worden. Die Sequenz als Schlüssel führte in der folgenden Zeit zu vielen umfassenden biochemischen Methoden und Konzepten. Grundlegend ist sie für die Kristallstrukturbestimmung und das Verständnis der biochemischen Reaktivität eines Proteins. Sequenzvergleiche analoger Proteine gewähren weiterhin einen Einblick in die Evolution von Proteinstruktur und -funktion sowie in phylogenetische Beziehungen von Organismen. Viele Erbkrankheiten können durch Analyse der Primärstruktur aufgeklärt und dadurch in einigen Fällen auch therapiert werden.

Die Anzahl der im Protein vorhandenen unterschiedlichen Polypeptidketten kann durch Analyse der C- bzw. N-terminalen Aminosäure bestimmt werden. Die N-terminale Analyse kann durch verschiedene chemische oder enzymatische Methoden erfolgen. Dabei wird in den meisten Fällen die terminale Aminosäure derivatisiert, hydrolytisch abgespalten und anschließend separiert und analysiert. Breite Anwendung findet dabei das bereits von Sanger benutzte 2,4-Dinitrofluorbenzol und Dansylchlorid (siehe Abbildung 31), wobei letzteres sensitivere Analysen erlaubt.<sup>[232,233]</sup> Enzymatischer sequenzieller Abbau durch Aminopeptidasen unterliegt in der Praxis durch deren Spezifität einigen Einschränkungen. Der C-terminale Abbau kann ebenfalls enzymatisch wie auch chemisch erfolgen, doch ist er von geringerer Bedeutung. Bei den Enzymen sind hier die Carboxypeptidasen

zu nennen. Nennenswerte Bedeutung für die chemische Analyse hat die Hydrazinolyse, die alle Peptidbindungen spaltet und mit Ausnahme der C-terminalen Aminosäure Aminoacylhydrazide bildet. Dieses Gemisch kann anschließend chromatographisch analysiert werden.

Ist die Anzahl der Polypeptidketten bekannt, können die Disulfidbrücken oxidativ oder reduktiv gespalten werden, so dass denaturierte einzelne Ketten als Gemisch vorliegen. Durch nachfolgende Trennung und Reinigung werden einzelne Polypeptidketten für die Analyse der Aminosäurezusammensetzung und die Sequenzanalyse gewonnen.<sup>[234,235]</sup>

Spezifische Peptidbindungen können enzymatisch oder chemisch gespalten werden, und die Sequenzen der entstehenden Polypeptidfragmente anschließend einzeln analysiert werden. Durch überlagernde Spaltung können so auch sehr lange Peptidketten sequenziert werden, die andernfalls nicht vollständig untersucht werden könnten.

Die erste vollautomatische und heute weit verbreitete Methode zur N-terminalen Sequenzierung wurde von Pehr Edman 1949 entwickelt und 1967 mit dem *spinning-cup sequenator* automatisiert.<sup>[236,237]</sup> Die Sequenzierung verläuft schrittweise vom N-Terminus aus in den drei Schritten Kopplung, Abbau und Umlagerung. Dabei reagiert in jedem Schritt die  $\alpha$ -Aminosäure mit Phenylisothiocyanat (siehe Abbildung 31) unter leicht basischen Bedingungen. Die Abspaltung des Phenylisothiocyanataddukts erfolgt mit wasserfreiem HF. Das gebildete Thiazolinonderivat wird extrahiert und lagert sich in TFA zum stabileren Thiohydrantoinderivat um. Dieses kann chromatographisch analysiert werden. Die verbleibende, um eine Aminosäure verkürzte Polypeptidkette wird erneut der Sequenzierung unterworfen. Die Ausbeute jedes Zyklus ist kleiner als 100%, so dass üblicherweise nur 40-60, in neueren Geräten bis maximal 100 Aminosäuren identifiziert werden können. Weitere Verbesserungen dieser Technik, wie z. B. durch den Einsatz eines polymeren quartären Ammoniumsalzes (Polybren), den von Hewick *et al.* 1981 entwickelten Gasphasen-Sequenator oder den Festphasen-Sequenator von Laursen *et al.*, reduzierten die Zykluszeit und die notwendigen Substanzmengen auf wenige Picomol.<sup>[238,239]</sup>

Schlack und Kumpf entwickelten eine Methode zur C-terminalen Sequenzanalyse, die eine nützliche Erweiterung des Edman-Abbaus bei N-terminal geblockten Polypeptiden ist.<sup>[240]</sup> Der Peptidstrang wird mit Ammoniumthiocyanat und Acetanhydrid behandelt. Im alkalischen Medium wird anschließend die C-terminale Aminosäure abgespalten und

chromatographisch nachgewiesen. Zur Automatisierung wurde diese Methode später durch Einsatz anderer Aktivierungs- und Spaltungsverbindungen modifiziert und findet nun eine breite Anwendung.<sup>[241–243]</sup> Der Einsatz anderer Reagenzien löste ebenfalls viele Probleme wie die niedrige Sensitivität, geringe Ausbeute nach jedem Zyklus und Prolinabspaltung.

## 4.1.2 Spektrometrische und spektroskopische Methoden

### 4.1.2.1 MS

Die Massenspektrometrie ist derzeit die dominante Methode zur Sequenzierung von Peptiden und Proteinen.<sup>[244]</sup> Sie macht eine exakte und hoch sensitive Bestimmung von Molekularmassen selbst bei niedrigen Konzentrationen bis in den attomolaren Bereich möglich. Abhängig von der Ionisierungsmethode wird eine Fragmentierung weitgehend unterdrückt oder auch gestattet. Die verbreitetsten Ionisierungsmethoden für Biomolekülanalysen sind zur Zeit ESI und MALDI.<sup>[245,246]</sup>

Die Empfindlichkeit der Massenspektrometrie macht sie unentbehrlich für die Proteomik, die Charakterisierung sämtlicher zum gegenwärtigen Zeitpunkt exprimierten Proteine einer Zelle. Durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese wird ein Proteingemisch getrennt und anschließend mit einer Protease hydrolysiert. Die entstehenden Fragmente ergeben ein charakteristisches Muster (*fingerprint*) im MS-Spektrum, welches durch Vergleich mit einer Datenbank identifiziert werden kann.<sup>[247,248]</sup>

Die Tandem-Massenspektrometrie ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Methodik, bei der mindestens zwei Analysatoren sequenziell angeordnet sind.<sup>[249]</sup> Heute weit verbreitet sind die sog. Tripelquadrupolgeräte, die aus drei hintereinander angeordneten Quadrupolanalysatoren bestehen. Die erste Einheit dient zur Selektion des zu untersuchenden Vorläuferions. Der zweite Quadrupol wird mit einer Wechselspannung versorgt und dient als Stoßkammer und Fokussiereinheit. Die erzeugten Fragmentationen werden anschließend im dritten Quadrupol analysiert. Der letzte Quadrupol kann auch durch einen TOF-Analysator ersetzt werden, der eine höhere Empfindlichkeit und Auflösung speziell für Biomoleküle bietet.<sup>[250]</sup> Des Weiteren können mit dieser Methode Seitenkettenmodifikationen untersucht werden.<sup>[251]</sup>



Die bevorzugte Fragmentierung der Polypeptide an den Peptidbindungen liefert ein vorhersagbares Fragmentierungsmuster, das die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS bzw. MS<sup>n</sup>) zur bevorzugten Methode macht. Die Sequenz des Aminosäurestranges lässt sich bei Vorliegen von proteinogenen Aminosäuren leicht bestimmen, da die Aminosäuren eindeutige Massen besitzen und als Fragmentionen das um jeweils eine Aminosäure verkürzte Polypeptid detektiert wird. Als einzige Ausnahme seien hier die isobaren Aminosäuren Lysin und Glutamin zu nennen, die nicht unterschieden werden können. Eine Identifikation von nichtproteinogenen Aminosäuren ist wegen ihrer isobaren bzw. isomeren Struktur ebenfalls nicht eindeutig möglich. Dennoch können sowohl chemische Modifizierung der proteinogenen Aminosäuren als auch Disulfidbrücken erkannt werden. Das Fragmentierungsmuster kann sich allerdings bei Vorliegen posttranslationaler Modifizierung ändern, da deren stoßinduzierte Protonierung (CID) mit der der Peptidbindung konkurriert und in einigen Fällen bevorzugt erfolgt.<sup>[252]</sup> Einen Ausweg stellt die von Zubarev *et al.* entwickelte ECD-Methode dar, die durch einen zusätzlichen Elektronenstrahl die Aufnahme eines Elektrons durch die Fragmentionen erreicht, die dann binnen Femtosekunden umlagern und dissoziieren.<sup>[253]</sup> Der Peptidstrang fragmentiert nicht mehr bevorzugt an den Peptidbindungen, es werden aber zusätzliche Informationen zur Lage der posttranslationalen Modifizierung erhalten.

Viele Algorithmen wurde entwickelt, um die Sequenz aus MS/MS-Daten abzuleiten. Diese haben, zusammen mit verschiedenen Homologieanalyseansätzen, ein hohes Potenzial, die *de novo* Protein- bzw. Peptidsequenzierung durch Massenspektrometrie weiter zu verbessern.<sup>[254,255]</sup>

#### 4.1.2.2 NMR

Es gibt keine NMR-Pulssequenz, die simultan alle Protonen und heteronuklearen Resonanzen bestimmen lässt. Daher muss eine Kombination verschiedener NMR-Experimente verwendet werden, um die Resonanzfrequenz jedes einzelnen Atomkerns und deren Korrelationen zueinander zu erhalten. Zusätzlich können unterschiedliche Informationen aus den NMR-Spektren entnommen werden, die Aufschluss über die Struktur des Moleküls geben.

Die Sequenzanalyse mit NMR ist im Vergleich zur MS zeitaufwendiger und komplexer. Ein weiterer Nachteil ist, dass symmetrische Peptide oder Proteine schwer oder gar nicht zugeordnet werden können. Die geringe natürliche Häufigkeit des  $^{15}\text{N}$  schränkt die Anwendung ein, kann aber durch Anreicherungsverfahren kompensiert werden. Isobare und isomere Aminosäuren, die durch die Massenspektrometrie nicht unterschieden werden können, können durch eine NMR-Analyse des Spinsystems der betreffenden Aminosäure charakterisiert werden. Beide Techniken ergänzen sich und bieten durch ihre Kombination eine weite Anwendungsmöglichkeit.

Die NMR-Sequenzanalyse basiert im Wesentlichen auf der Identifikation der einzelnen Aminosäuren durch deren eindeutiges Spinsystem und anschließender Analyse der Konnektivitäten durch sequenzielle dipolare Kopplungen.<sup>[63]</sup> Weiterhin können verschiedene zwei-, drei- oder vierdimensionale NMR-Pulsprogramme verwendet werden, die allerdings eine Isotopenanreicherung von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  erfordern. NMR-spektroskopische Untersuchungen von Proteinen, deren Molekularmasse größer als 25 kDa sind, erfordern eine partielle Deuterierung oder zur Unterdrückung der Spindiffusion, die durch die lange Korrelationszeit verursacht wird, andere NMR-Methoden wie TROSY (siehe Abschnitt 2.3.4.1).<sup>[256,257]</sup>

Die Einführung der dritten Zeitvariablen in Pulssequenzen ergibt nach Fouriertransformation dreidimensionale NMR-Spektren, wodurch eine geringere Signalüberlappung im Vergleich zu ein- bzw. zweidimensionalen Spektren erreicht wird. Alle drei- bzw. vierdimensionalen Pulssequenzen nutzen homo- und heteronukleare Kopplungen, deren Korrelationswege für eine Auswahl an 3D- und 4D-NMR-Experimente in Abbildung 32 schematisch dargestellt sind. Durch eine geschickte Wahl der Experimente ist es möglich, die Konnektivitäten eines Polypeptidstranges zu ermitteln und damit die Primärstruktur aufzuklären. Des Weiteren enthalten die Spektren relevante Konformationsparameter, wie z. B. den Torsionswinkel  $\chi_1$  der jeweiligen Aminosäure im  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  TOCSY-HMQC-Spektrum.

Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen und damit die Aufklärung der Primärstruktur von isotopenangereicherten Peptiden oder Proteinen ist mit drei- bzw. vierdimensionalen NMR-Experimenten recht schnell und einfach durchzuführen. Die bei Proteinen notwendige Isotopenanreicherung ist bei Peptiden nicht in jedem Fall möglich, falls es sich z. B.

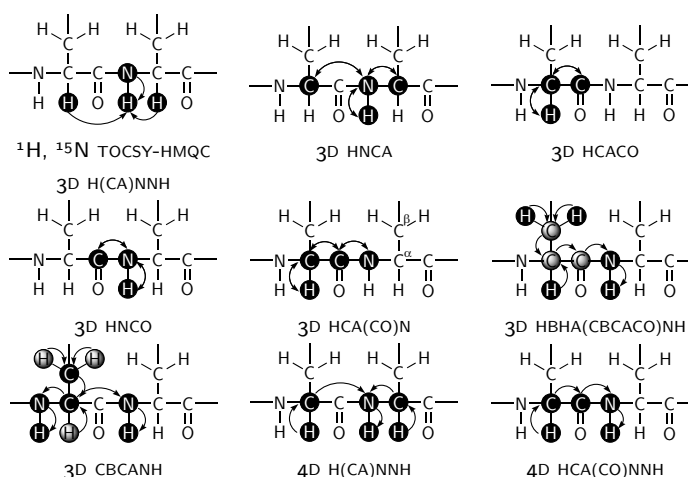


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Korrelationen in ausgesuchten 3D- und 4D-NMR Experimenten, die für die Primärstrukturbestimmung von Polypeptiden geeignet sind.<sup>[68]</sup>

um einen isolierten Naturstoff handelt. In diesen Fällen kann unter erheblichen Mehraufwand mit zweidimensionalen NMR-Experimenten (siehe Kapitel 2.3.3) der Peptidstrang sequenziert werden. Eine Kombination homo- und heteronuklear korrelierter sowie NOE- bzw. ROE-Spektren ermöglicht in der Regel eine sichere Zuordnung der Resonanzfrequenzen und somit eine eindeutige Sequenzanalyse.

## 4.2 Neo-Efrapeptine

Die Neo-Efrapeptine sind Sequenzanaloge der Efrapeptine, die im Abschnitt 3.2.1 beschrieben wurden. Sie wurden von Syngenta Crop Protection Research aus der leicht sauren Fermentationsbrühe (pH 5.5-8) des Milchschnimmelpilzes *Geotrichum candidum* durch Extraktion und ggf. Chromatographie isoliert, mittels HPLC, ESI(+)-MS und MS/MS analysiert und mittlerweile weitgehend charakterisiert. Die Neo-Efrapeptine wurden zur genaueren Untersuchung der insektiziden Wirkung der Efrapeptine als Referenzsubstanzen isoliert.

Tabelle 25: Sequenzen der Neo-Efrapeptine A bis E. [258]

Neo-Efrapeptin	Sequenz
A	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
B	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
C	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Iva-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
D	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
E	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Iva-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Iva-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X

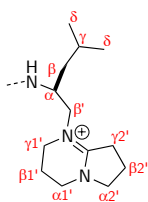


Abbildung 33:  
Kopfgruppe X der  
Neo-Efrapeptine.

Die Neo-Efrapeptine enthalten wie die Efrapeptine eine kationische Kopfgruppe X (siehe Abbildung 33), die von Leucinol und DBN abgeleitet werden kann, und einen hohen Anteil an den nichtproteinogenen Aminosäuren Aib, Iva und Pip. Die Sequenzen der Pentadecapeptide sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Ein essenzieller Unterschied zu den Efrapeptinen ist die Substitution der Aminosäure Aib an Position 9 gegen 1-Aminocyclopropancarbonsäure. Die Trivialnamensbezeichnung Neo-Efrapeptine leitet sich aus der strukturellen Verwandtschaft mit den Efrapeptinen ab.

Aus der Fermentationsbrühe wurden ebenfalls die Neo-Efrapeptine F und I isoliert, deren Massenspektren identische Fragmentierungsmuster mit den Neo-Efrapeptinen A bzw. B aufweisen. Das Isomerenpaar Neo-Efrapeptin A und F wurde daher im Rahmen dieser Arbeit NMR-spektroskopisch sequenziert.

Die Efrapeptine zeigen ein sehr günstiges biozides Spektrum bei Anwendung als präventives und/oder kuratives Schädlingsbekämpfungsmittel in niedrigen Konzentrationen an verschiedenen Arten von Nutz- und Zierpflanzen. Die insektizide und akarizide Wirkung ist unabhängig vom Entwicklungsstadium der Schädlinge und kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen. Die direkte Wirkung kann auch zeitversetzt z. B. bei der Häutung einsetzen. Eine indirekte Wirkung erfolgt durch das Einwirken auf die Fortpflanzungs- oder Schlupfrate. Das gesamte Spektrum der tierischen Schädlinge, die von Neo-Efrapeptinen betroffen werden können, ist in der Europäischen Patentanmeldung EP 0 736 252 aufgeführt. [258] Dem Anwendungsgebiet entsprechende Zielkulturen sind mannigfaltig und umfassen neben Zierpflanzen auch Nutzpflanzen wie Getreide, Gemüse, Obst, Fasergewächse und Lorbeergewächse. Des Weiteren kann eine Anwendung

auf Anbauflächen von Tabak, Nüssen, Kaffee, Zuckerrohr, Tee, Pfeffer, Wein, Hopfen, Bananen und Naturkautschuk erfolgen.

Bei biologischen Untersuchungen an jungen Soja- bzw. Kohlpflanzen wurde die insektizide Wirkung an Raupen des ersten Stadiums von *Heliothis virescens*, Raupen des dritten Stadiums von *Plutella xylostella* und Raupen des ersten Stadiums von *Spodoptera littoralis* studiert. Der anschließende Vergleich der Fraßschäden und die Relation der toten Raupen bei behandelten Pflanzen mit unbehandelten ergab in allen Fällen eine gute Wirkung gegen die Schädlinge. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurden die Neo-Efrapeptine als potente Insektizide mit günstigem bioziden Spektrum eingestuft und nach einer Patentierung als Pflanzenschutzmittel eingesetzt.<sup>[258]</sup>

Die Neo-Efrapeptine werden zur Anwendung in verschiedensten Formen mit unterschiedlichen Hilfsstoffen versetzt. Als Hilfsstoffe werden in der Regel Lösungs-, Streck-, Haft-, Netzmittel oder Warnfarbstoffe verwendet. Eine Verbreiterung der Wirkung kann durch Zusatz von anderen Insektiziden, Akariziden oder Nematoziden erfolgen.

Eine antibiotische Wirkung der Neo-Efrapeptine wird nicht ausgeschlossen und könnte wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu den Efrapeptinen durchaus möglich sein.

### 4.3 Zielsetzung

Die Isolierung und Charakterisierung neuer potenter Pflanzenschutzmittel ist analog zu den Arzneimitteln der Pharmaindustrie ein relevantes Forschungsgebiet der Naturwissenschaften. Die biologische Aktivität und Spezifität der Efrapeptine war Ausgangspunkt für eine detaillierte Untersuchung von Neo-Efrapeptinen als potente Insektizide. Nach der Isolierung der Neo-Efrapeptine A bis F und I wurden HPLC-, ESI(+)-MS- und MS/MS-Analysen zur Charakterisierung durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Neo-Efrapeptine eine analoge Primärstruktur zu den Efrapeptinen besitzen.

Die MS/MS-Analysen der Neo-Efrapeptine A bis E ergaben die in Tabelle 25 aufgeführten Sequenzen. Für die Neo-Efrapeptine A und F bzw. B und I wurden jedoch paarweise nahezu identische Massenspektren erhalten. Die Sequenzen der isomeren Neo-Efrapeptine

A und F sollten im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden. Da Unklarheit über die Anzahl und Struktur der isobaren Aminosäuren herrschte, sollten als weiterer Fokus diese detailliert analysiert werden.

## 4.4 Sequenzanalyse von Neo-Efrapeptin A **2**

Die von Syngenta Crop Protection Research durchgeführten MS/MS-Sequenzierungen führten zu dem in Abbildung 34 dargestellten Primärstrukturvorschlag. Im hochauflösten ESI-Massenspektrum findet man einen Molekülpeak bei  $m/z$  816.5308, der mit einer Molekularmasse von  $1632.0576 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  und der Summenformel  $\text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{N}_{18}\text{O}_{16}$  sehr gut korreliert. Des Weiteren können die Peaks bei  $m/z$  943.5562 und 689.5029 den Spaltfragmenten der Aminosäuren 1-10 und 11-16 zugeordnet werden. Jost zeigte, dass Peptidbindungen zwischen Aib und Pip im besonderen Maße empfindlich gegenüber Hydrolyse sind. Dabei ist die Bindung zwischen den Resten Aib-10 und Pip-11 die labilste der Efrapeptine.<sup>[204]</sup> Dieses Verhalten kann bei der Fragmentierung der Neo-Efrapeptine ebenfalls beobachtet werden. Die MS/MS-Analyse ( $P_1$   $m/z$  943.6 und 689.6) unter milden Kollisionsbedingungen ergab den gezeigten Strukturvorschlag.

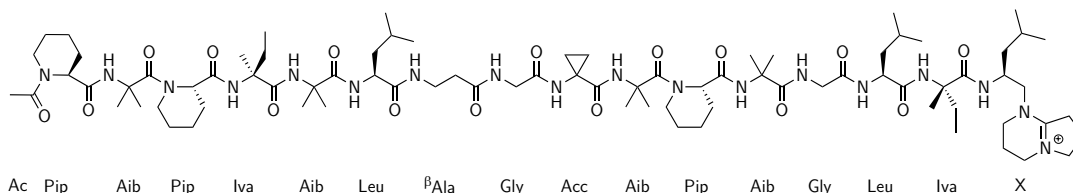


Abbildung 34: Schematische Darstellung von Neo-Efrapeptin A **2**.

Die CD-Spektroskopie benötigt nur sehr geringe Substanzmengen und ermöglicht es die konformationellen Eigenschaften eines Peptids oder Proteins schnell zu erhalten. Durch Vergleich von CD-Spektren kann sehr schnell erkannt werden, ob konformationelle Änderungen z. B. durch Substitution oder Modifizierung einzelner Aminosäuren vorliegen. In Abbildung 35 ist das CD-Spektrum von **2** im Vergleich mit dem des Efrapeptin C **1** dargestellt. In beiden Spektren werden zwei negative Banden bei den Wellenlängen 232 nm und 205 nm gefunden, deren Intensitäten und Maxima nahezu identisch sind. Das Verhältnis  $R = ([\theta]_{\pi-\pi^*} / [\theta]_{n-\pi^*})$  der beiden Minima als Maß für die  $3_{10}$ -Helizität

ist für Neo-Efrapeptin A 0.3. Für Efrapeptin C weicht es mit 0.4 leicht von dem von Jost bestimmten ab, was auf eine andere Schichtdicke und Konzentration zurück geführt werden kann.<sup>[204]</sup> Die sehr ähnlichen Verhältnisse  $R$  unterstützen damit die These, dass das Neo-Efrapeptin A in Lösung eine sehr ähnliche Konformation wie das Efrapeptin C besitzt und vorwiegend helikale Sekundärstrukturelemente aufweist.

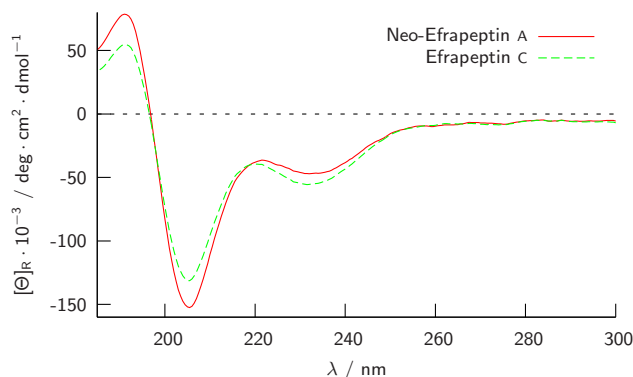


Abbildung 35: Vergleich der CD-Spektren von Neo-Efrapeptin A **2** und Efrapeptin C **1** in TFE bei 298 K.

Voraussetzung für die NMR-spektroskopische Sequenzanalyse eines Peptids oder Proteins ist die Zuordnung der Proton- und Kohlenstoffresonanzen. Die Aminosäuren werden durch ihre Spinsysteme identifiziert. Eine Kombination aus zweidimensionalen homo- und heteronuklear korrelierten NMR-Spektren wie COSY, TOCSY, HSQC und HMBC genügt meist dem Zweck der weiter reichenden Zuordnung einzelner Sequenzfragmente. Ferner tragen zweidimensionale NOE- oder ROE-Spektren wertvolle Proton-Proton-Distanzinformationen zur Primärstrukturanalyse und Kombination der identifizierten Sequenzabschnitte bei und machen diese unabdingbar. Schwierigkeiten sind vor allem durch die 2,2-dialkylierten Aminosäuren Aib, Acc sowie Iva und die zyklische Aminosäure Pip zu erwarten; Aib, Acc und Iva besitzen kein  $H^\alpha$  Proton, während Pip analog zum Prolin kein Amidproton  $H^N$  besitzt.

Jede Aminosäure ist für sich ein eigenständiges Spinsystem, das mit Hilfe von COSY- und TOCSY-Spektren zugeordnet werden kann. Das heteronukleare HSQC bzw. HMQC korreliert Protonen mit den gebundenen Kohlenstoffatomen basierend auf der Kopplungskonstanten  $^1J_{C,H}$ . Starke Signalüberlappung im Bereich der Methylprotonen kann in diesen Spektren eine exakte Zuordnung unmöglich machen. Die HMBC-Spektren be-

ruhen auf heteronuklearen, weitreichenden Kopplungen  ${}^{3+n}J_{C,H}$  und ermöglichen durch Korrelationspeaks zwischen  $C_{i-1}$  und  $H_i^N$  eine Verknüpfung der einzelnen Aminosäurespinsysteme. Der im Pulsprogramm angewendete *low pass* Filter unterdrückt die meisten durch  ${}^1J_{C,H}$ -Kopplungen hervorgerufenen Peaks, so dass fast ausschließlich weitreichende Korrelationsinformationen vorliegen. Die  ${}^{13}C$ -Zuordnung wurde durch die Resonanzphase im DEPT-135-Spektrum verifiziert. Das s/N-Verhältnis in HMBC-Spektren ist häufig gering, so dass H-H Kreuzsignale in NOE- bzw. ROE-Spektren zusätzliche Informationen liefern, die die Sequenzanalyse stark erleichtern und in manchen Fällen erst möglich machen. Die so bestimmten relevanten  ${}^1H$  und  ${}^{13}C$  NMR-Resonanzfrequenzen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Die Analyse der NMR-Daten ergibt die folgenden Sequenzfragmente:

Ac-Pip-Aib      Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib      Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X

Diese korrelieren sehr gut mit dem MS-Fragmentmuster und wurden größtenteils von  $H^N-H^N$  und  $H^N-H^\alpha$  Korrelationen abgeleitet. Die Amidbindung zwischen Iva-4 und Aib-5 konnte nur durch  $H^N-H^\beta$  Korrelationen nachgewiesen werden. Da Pip kein  $H^N$  und Aib kein  $H^\alpha$  besitzt, ist es nicht möglich, die Peptidbindung zwischen diesen Aminosäuren nachzuweisen. Ein theoretisch möglicher Nachweis durch dipolare Kopplungen zwischen den  $H^\epsilon$  des Pip und den  $H^\beta$  des Aib ist ebenfalls aussichtslos, da dieser Protonenabstand durch die helikale Struktur des Neo-Efrapeptins größer als 0.5 nm ist und daher kein NOE auftritt.

Mit Hilfe der MS-Daten können die Amidbindungen zwischen den Aminosäuren Aib-2 und Pip-3 sowie Aib-10 und Pip-11 direkt aus dem Fragmentierungsmuster nachgewiesen werden.

Die Analyse der NMR- und MS-Spektren führt zu der in Abbildung 34 gezeigten Primärstruktur und stimmt exakt mit der von Syngenta Crop Protection Research postulierten überein. In Abbildung 36 sind die relevanten NMR-Korrelationen sowie die Massenzahlen  $m/z$  der einzelnen Aminosäurefragmente zusammengefasst.

Die Sequenzierung des Neo-Efrapeptins A würde durch eine  ${}^{15}N$  Isotopenanreicherung vereinfacht, eine komplette Zuordnung aller Signale wäre so erst möglich, da mehrdimensionale heteronuklear korrelierte Spektren mit  ${}^{15}N$  in natürlicher Häufigkeit nur



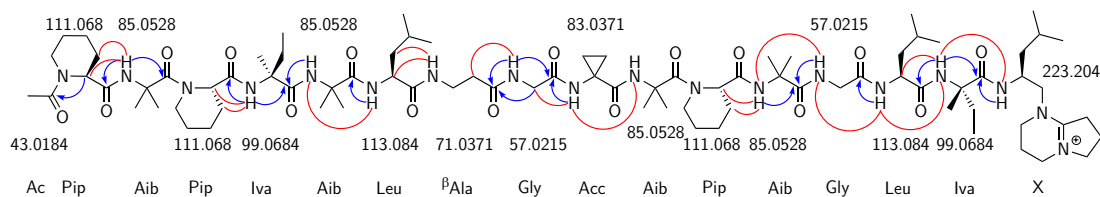


Abbildung 36: Schematische Darstellung der relevanten NMR-Korrelationen aus den HMBC- (blau) und ROE-Spektren (rot) von Neo-Efrapeptin A **2** sowie die  $m/z$ -Zahlen der enthaltenden Aminosäuren.

mit großen Substanzmengen aufgenommen werden können. Die Signalüberlagerungen würden durch die dritte bzw. vierte Zeitvariable im Pulsprogramm aufgelöst. Die hier diskutierten Daten zeigen, dass es durch die Kombination von MS und NMR möglich ist, diesen Nachteil weitestgehend zu minimieren.

## 4.5 Sequenzanalyse von Neo-Efrapeptin F 3

Das hochaufgelöste Massenspektrum ergibt, von der Massenladungszahl  $m/z$  816.5270 abgeleitet, eine Molekularmasse von  $1632.05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Dieses korreliert gut mit der Summenformel  $\text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{N}_{18}\text{O}_{16}$ . Analog zum Neo-Efrapeptin A und Efrapeptin C ist die Peptidbindung im Neo-Efrapeptin F zwischen Aib-10 und Pip-11 äußerst labil, so dass zwei Fragmentationen mit den Massenladungszahlen  $m/z$  943.5602 und 689.5058 auftreten. Die MS/MS-Analyse der beiden Fragmentationen ergibt das Fragmentierungsmuster zur Sequenzierung.

Das CD-Spektrum von Neo-Efrapeptin F zeigt analog zum Neo-Efrapeptin A zwei negative Banden mit Minima bei den Wellenlängen 234 nm und 205 nm. Ein Vergleich zum Efrapeptin C ist in Abbildung 37 gezeigt. Die Bande bei 234 nm ist im Vergleich zu **1** und **2** leicht rotverschoben. Das Verhältnis  $R = ([\theta]_{\text{n-}\pi^*} / [\theta]_{\text{\pi-}\pi^*})$  ist für Neo-Efrapeptin F 0,3, so dass auf eine ähnliche Lösungskonformation geschlossen werden kann. Das Intensitätsverhältnis des CD-Spektrums von **3** ist nahezu identisch zu dem von **1**, was die Sekundärstruktursimilarität weiter unterstützt.

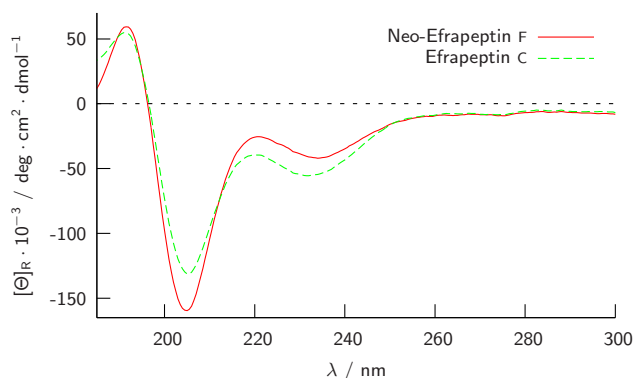


Abbildung 37: Vergleich der CD-Spektren von Neo-Efrapeptin F **3** und Efrapeptin C **1** in TFE bei 298 K.

Die NMR-Sequenzanalyse des Neo-Efrapeptin F basiert auf denselben NMR-Experimenten wie für **2**. Dieser Satz wurde lediglich um ein eindimensionales  $^{13}\text{C}$ - und ein HMQC-Experiment erweitert, welches unempfindlicher gegenüber Pulsvariationen ist, jedoch Nachteile bei der Signalschärfe aufweist. Basierend auf diesen Spektren gelingt die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoff-Resonanzfrequenzen des Neo-Efrapeptin F. Die nichtproteinogenen Aminosäuren erschweren analog zu Neo-Efrapeptin A (siehe Abschnitt 4.4) die Sequenzanalyse. Die Sequenzfragmente der N-terminalen (1 bis 10) und der C-terminalen (12 bis 16) Aminosäuren konnten durch eine kombinierte Analyse der MS- und NMR-Daten identifiziert werden. Starke Signalüberlappungen ließen eine eindeutige Spinsystemanalyse der fehlenden Aminosäure 11 jedoch nicht zu, so dass eine  $\text{MS}^n$ -Analyse mit variierten Kollisionsbedingungen durchgeführt wurde. Hier konnte für die Aminosäure 11 eine Massenladungszahl von  $m/z \approx 111$  bestimmt werden.

Die auffälligsten Unterschiede zwischen den NMR-Spektren der Neo-Efrapeptine A und F sind die Resonanzverschiebung des  $\text{H}^{\text{N}}$  von Gly-13 zu hohem Feld und ein separiertes Dublett bei  $\delta = 1.09$  ppm. Zusätzlich sind im Verschiebungsbereich der  $\text{H}^{\alpha}$ -Protonen der Pip-Reste nur zwei der erwarteten drei Peaks vorhanden. Auch hier zeigt sich, dass der Unterschied zwischen den beiden Isomeren **2** und **3** die Aminosäure 11 betrifft. Ausgehend vom separierten Dublett bei  $\delta = 1.09$  ppm konnte ein in den Efrapeptinen bislang nicht beobachtetes Spinsystem identifiziert werden. Dieses ist in Abbildung 38 dargestellt und kann der Aminosäure 3-MePro zugeordnet werden. Die Struktur dieser nichtproteinogenen Aminosäure ist durch  $^3J_{\text{H,H}}$  und  $^{3+n}J_{\text{C,H}}$  korrelierte NMR-

Spektroskopie verifiziert worden. Die Kopplungskonstante  $^3J_{H^\alpha H^\beta} = 5 \text{ Hz}$  deutet auf eine *trans*-Konfiguration von  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  hin. Eine Distanz von 0.33 nm zwischen  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  konnte durch Integration des ROE-Kreuzsignals ermittelt werden. Dieser Abstand ist jedoch mit einem großen Fehler behaftet, da starke Signalüberlagerung von Pip-3, Gly-8 und 3-MePro-11 eine exakte Integration verhindern. In diesem Verschiebungsbereich ist kein scharfes Signal zu finden, das auf eine kurze Distanz von ca. 0.24 nm aufgrund einer *cis*-Konfiguration zwischen  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  des 3-MePro hinweisen würde. Ausgehend von den ROE-Daten kann deshalb ebenfalls auf eine *trans*-Konfiguration dieser beiden Protonen geschlossen werden. Fredenhagen *et al.* bestätigen diesen Befund; sie konnten die absolute Konfiguration 2*S*,3*S* für das 3-MePro durch GC/MS-Analysen der Dansylderivate bestimmen.<sup>[259]</sup>

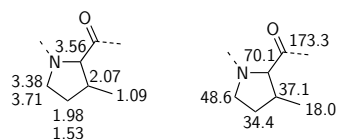


Abbildung 38: Spinsystem von 3-MePro mit den chemischen Verschiebungen der Protonen (links) und Kohlenstoffatome (rechts).

Die Resonanzverschiebung des  $H^N$  von Gly-13 zu hohem Feld wird vermutlich durch konformationelle Änderungen durch die Substitution der Aminosäure 11 verursacht, in der das  $H^N$  eine eher zum Lösungsmittel exponiertere Richtung einnimmt und sich dadurch die Abschirmung ändert. Des Weiteren ist ein Übergang von der von den Efraeptinen abgeleiteten  $3_{10}$ -helikalen Struktur zu einer  $\alpha$ -Helix oder eine erhöhte Dynamik des Glycinrestes denkbar.

Die ermittelten Resonanzfrequenzen der Protonen und Kohlenstoffatome sind in Tabelle 28 zusammengefasst und die erhaltende Sequenz des Peptidstranges in Abbildung 39 dargestellt.

Die Sequenz den Aminosäuren konnte hauptsächlich durch MS und weitreichende Korrelationen im HMBC nachgewiesen werden. Die Bindung zwischen Aib-10 und 3-MePro-11 wurde durch ROE-Kreuzsignale belegt. Eine schematische Darstellung der relevanten weitreichenden skalaren und dipolaren Kopplungen aus den HMBC- bzw. ROE-Spektren ist in Abbildung 40 wiedergegeben.

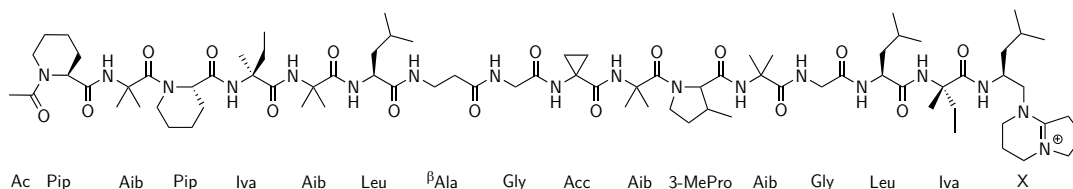
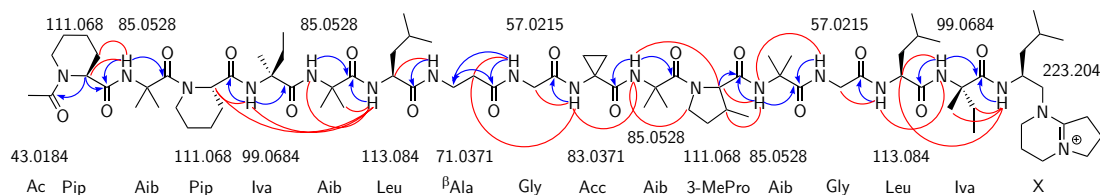


Abbildung 39: Schematische Darstellung von Neo-Efrapeptin F 3.

Abbildung 40: Schematische Darstellung der relevanten NMR-Korrelationen aus den HMBC- (blau) und ROE-Spektren (rot) von Neo-Efrapeptin F 3 sowie die  $m/z$ -Zahlen der enthaltenden Aminosäuren.

Die Ergebnisse der NMR-Analyse korrelieren sehr gut mit den MS-Daten. Nahezu alle Resonanzen konnten zugeordnet werden. Lediglich die Seitenketten von Pip konnten aufgrund starker Signalüberlagerungen mit der DBN-Kopfgruppe nicht eindeutig zugeordnet werden, was jedoch keinen Einfluss auf die Sequenzanalyse hat.

## 4.6 Experimenteller Teil

Die Isolierung des Neo-Efrapeptingemisches sowie deren chromatographische Aufreinigung wird in der Offenlegungsschrift DE 103 61 201 (A1) beschrieben.<sup>[260]</sup> Dieser Teilbereich der Arbeit wurde von Syngenta Crop Protection Research durchgeführt.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Voyager-DE<sup>TM</sup> BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation (Applied Biosystems) mit einem 1.2 m-Flugrohr im Positivionenmodus aufgenommen. Die Ionisierung erfolgt mit einem LSI-Stickstofflaser (Wellenlänge: 337 nm, Pulsbreite: 3 ns, Wiederholungsrate: 3 Hz, Beschleunigungsspannung: 20000 kV, *grid voltage*: 94%, *guide wire*: 0.05%). Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet und über 17 Einzelspektren gemittelt.

ESI-Massenspektren wurden mit einem Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonik) und einem Q-TOF I Massenspektrometer (Micromass) im Positivionenmodus aufgenommen. Als Lösungsmittel diente Methanol, Stickstoff wurde als Nebulations- und Trocknungsgas, Helium als Kühlgas verwendet. Eine Mischung von Polypropylenglykol ( $\bar{M} \approx 425$  und  $725$ ) in  $0.02$  M Ammoniumacetat in ACN wurde für die Massenfeinbestimmung als Referenzsignal verwendet.

Die CD-Spektren wurden bei  $298$  K mit einem J-810 CD-Spektrometer (Jasco) unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von  $0.1$  cm von  $300$  nm bis  $185$  nm bei einer Peptidkonzentration von  $5.9 \cdot 10^{-5}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  aufgenommen. Als Geräteparameter wurden die folgenden Einstellungen verwendet: *band width*  $1$  nm, *response*  $1$  s, *sensitivity* low, *data pitch*  $0.5$  nm, *scanning speed*  $50$  nm  $\cdot$  min $^{-1}$ , *accumulation*  $5$ . Die Elliptizität  $[\theta]$  ist in deg  $\cdot$  cm $^2$   $\cdot$  dmol $^{-1}$  angegeben. Die aufgenommenen Spektren wurden durch Subtraktion des Solvens TFE und anschließende S/N-Unterdrückung mit der Savitzky-Golay Methode bearbeitet.

$10.2$  mg Neo-Efrapeptin A **2** bzw.  $11.4$  mg Neo-Efrapeptin F **3** wurden in einem NMR-Röhrchen in jeweils  $0.75$  mL DMSO-D $_6$  gelöst. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Einfrieren im Vakuum entgast und anschließend unter Argonatmosphäre luftdicht verschlossen. Die NMR-Spektren wurden bei einer Temperatur von  $300$  K mit einem Bruker Avance Spektrometer bei einer magnetischen Flussdichte  $B_0$  von  $14.1$  T aufgenommen, entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von  $600.13$  MHz bzw.  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenz von  $150.90$  MHz. Für alle Experimente mit Ausnahme der eindimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Experimente wurde ein inverser  $5$  mm-TXI  $600$  MHz Probenkopf mit  $z$ -Gradient verwendet. Die heteronuklearen eindimensionalen Experimente wurden mit einem  $5$  mm-TXO  $600$  MHz Probenkopf mit  $z$ -Gradient durchgeführt.

Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Spinsysteme erfolgte mit einem  $^1\text{H}$ -Spektrum, einem phasensensitivem doppelquantengefilterten COSY und einem TOCSY mit DIPSI2-Pulssequenz für den homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfer.<sup>[217–219]</sup> Zur Bestimmung der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen wurden, neben den eindimensionalen  $^{13}\text{C}$  und DEPT- $135$  Spektren, zweidimensionale heteronuklear korrelierte inverse  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC- und HMBC-Spektren aufgenommen.<sup>[220–223]</sup> Ein zusätzlich aufgenommenes ROE-Spektrum diente zur Berechnung der für die Primärstrukturbestimmung erforderlichen in-

teratomaren Distanzen.<sup>[76,224]</sup> Zur Akquisition und Prozessierung wurde das Programm XWIN-NMR von Bruker in der Version 3.1 verwendet. Vor der Fourier-Transformation erfolgte eine Basislinienkorrektur und Apodisation des FID durch eine Verstärkungsfunktion. Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter von **2** und **3** sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Das Programm SPARKY wurde in der Version 3.110 für die Zuordnung der Resonanzfrequenzen und Integration der ROE-Kreuzsignale verwendet.<sup>[225]</sup>

### Neo-Efrapeptin A **2**

HR-MS (ESI, positiv)

$m/z = 943.5562$  [(Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib) + H]<sup>+</sup>, 816.5308 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 689.5029 [(Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X) + H]<sup>+</sup>.

$m/z_{(ber.)} = 943.5617$  [(Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib) + H]<sup>+</sup>, 816.5347 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 689.5078 [(Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X) + H]<sup>+</sup>.

MS/MS (ESI, P<sub>1</sub> ( $m/z$  943.7), positiv)

$m/z = 943.7$  [P<sub>1</sub>]<sup>+</sup>, 858.6 [P<sub>1</sub> - Aib]<sup>+</sup>, 775.6 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc]<sup>+</sup>, 719.6 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly]<sup>+</sup>, 705.5 [Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib]<sup>+</sup>, 647.5 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala]<sup>+</sup>, 620.6 [Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc]<sup>+</sup>, 534.4 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu]<sup>+</sup>, 449.4 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib]<sup>+</sup>, 409.4 [Pip-Iva-Aib-Leu]<sup>+</sup>, 350.3 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva]<sup>+</sup>, 296.3 [Pip-Iva-Aib]<sup>+</sup>, 239.2 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva-Pip]<sup>+</sup>, 211.2 [Pip-Iva]<sup>+</sup>, 154.1 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva-Pip-Aib]<sup>+</sup>.

MS/MS (ESI, P<sub>1</sub> ( $m/z$  689.6), positiv)

$m/z = 689.6$  [P<sub>1</sub>]<sup>+</sup>, 671.6 [P<sub>1</sub> - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 578.5 [P<sub>1</sub> - Pip]<sup>+</sup>, 565.5 [P<sub>1</sub> - C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 493.4 [P<sub>1</sub> - Pip-Aib]<sup>+</sup>, 464.4 [P<sub>1</sub> - X]<sup>+</sup>, 436.4 [P<sub>1</sub> - Pip-Aib-Gly]<sup>+</sup>, 367.3 [P<sub>1</sub> - X-Iva]<sup>+</sup>, 339.3 [P<sub>1</sub> - X-Iva-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 323.4 [P<sub>1</sub> - Pip-Aib-Gly-Leu]<sup>+</sup>, 254.2 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu]<sup>+</sup>, 197.2 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu-Gly]<sup>+</sup>, 169.2 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu-Gly-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 125.1 [(C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>) + H]<sup>+</sup>

## Neo-Efrapeptin F 3

HR-MS (ESI, positiv)

 $m/z = 943.5602$  [(Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib) + H]<sup>+</sup>, 816.5270 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 689.5058 [(3-MePro-Aib-Gly-Leu-Iva-X) + H]<sup>+</sup>. $m/z_{(\text{ber.})} = 943.5617$  [(Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib) + H]<sup>+</sup>, 816.5347 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 689.5078 [(3-MePro-Aib-Gly-Leu-Iva-X) + H]<sup>+</sup>.MS/MS (ESI, P<sub>1</sub> ( $m/z$  943.6), positiv) $m/z = 943.6$  [P<sub>1</sub>]<sup>+</sup>, 858.5 [P<sub>1</sub> - Aib]<sup>+</sup>, 775.5 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc]<sup>+</sup>, 719.5 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly]<sup>+</sup>, 705.4 [Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc-Aib]<sup>+</sup>, 647.4 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala]<sup>+</sup>, 620.4 [Pip-Iva-Aib-Leu- $\beta$ Ala-Gly-Acc]<sup>+</sup>, 534.3 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu]<sup>+</sup>, 449.3 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib]<sup>+</sup>, 409.3 [Pip-Iva-Aib-Leu]<sup>+</sup>, 350.2 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva]<sup>+</sup>, 296.2 [Pip-Iva-Aib]<sup>+</sup>, 239.1 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva-Pip]<sup>+</sup>, 154.1 [P<sub>1</sub> - Aib-Acc-Gly- $\beta$ Ala-Leu-Aib-Iva-Pip-Aib]<sup>+</sup>.MS/MS (ESI, P<sub>1</sub> ( $m/z$  689.6), positiv) $m/z = 689.5$  [P<sub>1</sub>]<sup>+</sup>, 671.5 [P<sub>1</sub> - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 578.4 [P<sub>1</sub> - 3-MePro]<sup>+</sup>, 565.4 [P<sub>1</sub> - C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 464.3 [P<sub>1</sub> - X]<sup>+</sup>, 436.4 [P<sub>1</sub> - 3-MePro-Aib-Gly]<sup>+</sup>, 367.3 [P<sub>1</sub> - X-Iva]<sup>+</sup>, 339.3 [P<sub>1</sub> - X-Iva-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 323.4 [P<sub>1</sub> - 3-MePro-Aib-Gly-Leu]<sup>+</sup>, 254.0 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu]<sup>+</sup>, 197.1 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu-Gly]<sup>+</sup>, 169.1 [P<sub>1</sub> - X-Iva-Leu-Gly-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 125.1 [(C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>) + H]<sup>+</sup>

Tabelle 26: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von Neo-Efrapeptin A 2 und Neo-Efrapeptin F 3.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter	Prozessierung
<b>Neo-Efrapeptin A 2</b>							
<sup>1</sup> H	zg30	32K	128	13.98, 6.17	0.3		32K, exp., LB 0.3
DEPT	dept135	64K	8K	238.3, 110.0	0.6		64K, exp., LB 1.0
COSY	cosydfph	4K×256	32	12.29, 5.56	1.8×28.8		2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×32.8	$T_m = 60$ ms	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyph	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×32.8	$T_m = 200$ ms	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsisp.2	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×147.4	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
				250.0, 110.0			
HMBC	inv4gplhrndqf	4K×256	64	13.35, 6.00	2.0×135.6	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin <sup>2</sup>
				230.0, 110.0			
<b>Neo-Efrapeptin F 3</b>							
<sup>1</sup> H	zg30	32K	128	13.98, 6.17	0.3		32K, exp., LB 0.3
<sup>13</sup> C	zgpg	32K	75K	238.3, 110.0	0.6	TXO	32K, exp., LB 1.0
DEPT	dept135	64K	8K	238.3, 110.0	0.6		32K, exp., LB 1.0
COSY	cosydfph	4K×256	32	12.29, 5.56	1.8×28.8	$T_m = 60$ ms	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×32.8	$T_m = 200$ ms	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyph	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×32.8	$T_m = 200$ ms	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsisp.2	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×141.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
				240.0, 110.0			
HMQC	inv4ph	4K×256	16	14.00, 6.00	2.1×147.4	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
				250.0, 110.0			
HMBC	inv4gplhrndqf	8K×256	64	13.98, 6.00	1.0×141.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin
				240.0, 110.0			



Tabelle 27: NMR-Resonanzfrequenzen von Neo-Efrapeptin A 2.

	$\delta$ [ppm] $H^N$	$H^\alpha$	$H^\beta$	sonstige
Pip-1		5.05	1.48/2.11	$H^\gamma, \delta$ 1.3–1.6; $H^\epsilon$ 3.19
Aib-2	8.32		1.40	
Pip-3		4.79	1.52/2.05	$H^\gamma, \delta$ 1.3–1.6; $H^\epsilon$ 3.18
Iva-4	7.71		1.72/2.00	$H^\gamma$ 0.76
Aib-5	7.75		1.33	
Leu-6	7.50	4.00	1.62	$H^\gamma$ 1.62; $H^\delta$ 0.82
$\beta$ Ala-7	7.54	2.36/2.40	3.21/3.34	
Gly-8	8.55	3.53		
Acc-9	8.65		0.94/1.26	
Aib-10	7.95		1.48	
Pip-11		5.26	1.31/2.19	$H^\gamma, \delta$ 1.3–1.6; $H^\epsilon$ 2.74
Aib-12	7.64		1.36	
Gly-13	8.39	3.63		
Leu-14	7.85	3.93	1.66	$H^\gamma$ 1.46; $H^\delta$ 0.86
Iva-15	7.14		1.68/1.85	$H^\gamma$ 0.80
X	7.01	4.20	1.49	$H^\gamma$ 1.15; $H^\delta$ 0.85; $H^{\beta'}$ 3.34

	$\delta$ [ppm] C	$C^\alpha$	sonstige
Ac	170.4		
Pip-1	171.7	51.8	
Aib-2	173.0	57.0	$C^\beta$ 25.5
Pip-3	172.4	55.4	
Iva-4	175.2	59.5	$C^\beta$ 27.7, $C^\gamma$ 8.11, $C^{\beta'}$ 22.8
Aib-5	174.7	56.7	
Leu-6	173.0	52.4	
$\beta$ Ala-7	172.8	35.6	$C^\beta$ 35.9
Gly-8	170.8	44.3	
Acc-9	172.2	34.3	$C^\beta$ 16.3
Aib-10	171.7	56.8	$C^\beta$ 25.4
Pip-11	171.8	53.5	
Aib-12	175.8	56.5	$C^\beta$ 26.0
Gly-13	171.4	44.1	
Leu-14	172.3	53.7	
Iva-15	174.1	60.1	$C^\beta$ 31.1, $C^\gamma$ 8.22, $C^{\beta'}$ 21.3
X		44.3	$C^{\beta'}$ 56.4

Tabelle 28: NMR-Resonanzfrequenzen von Neo-Efrapeptin **3**.

	$\delta$ [ppm] $H^N$	$H^\alpha$	$H^\beta$	sonstige
Pip-1		5.06	2.11	$H^{\gamma,\delta}$ 1.3–1.6
Aib-2	8.34		1.39	
Pip-3		4.79	2.05	$H^{\gamma,\delta}$ 1.3–1.6; $H^\epsilon$ 4.07
Iva-4	7.73		1.71/2.02	$H^\gamma$ 0.76
Aib-5	7.75		1.33	
Leu-6	7.50	4.00	1.61	$H^\delta$ 0.82
$\beta$ Ala-7	7.54	2.39	3.20/3.34	
Gly-8	8.60	3.54		
Acc-9	8.70		0.96/1.24	
Aib-10	8.02		1.44	
3-MePro-11		3.56	2.07	$H^\gamma$ 1.53/1.98; $H^\delta$ 3.38/3.7; $H^{\gamma'}$ 1.09
Aib-12	7.65		1.34	
Gly-13	7.90	3.66		
Leu-14	7.81	3.91	1.70	$H^\gamma$ 1.42; $H^\delta$ 0.85
Iva-15	7.10		1.69/1.88	$H^\delta$ 0.79
X	7.02	4.20	1.49	$H^\gamma$ 1.13; $H^\delta$ 0.84; $H^{\beta'}$ 3.35

	$\delta$ [ppm] C	$C^\alpha$	sonstige
Ac	164.2		
Pip-1	171.6	51.8	
Aib-2	173.4	56.8	$C^\beta$ 25.8
Pip-3	172.4	55.5	
Iva-4	175.5	59.6	
Aib-5	174.7	56.7	$C^\beta$ 27.2
Leu-6	172.7	52.3	$C^\beta$ 39.8
$\beta$ Ala-7	172.9	35.5	$C^\beta$ 35.9
Gly-8	170.8	44.3	
Acc-9	172.4	33.8	$C^\beta$ 16.9
Aib-10	173.8	56.7	$C^\beta$ 24.1
3-MePro-11	173.3	70.1	$C^\beta$ 37.1; $C^\gamma$ 34.4; $C^{\gamma'}$ 18.0; $C^\delta$ 48.6
Aib-12	176.4	56.4	$C^\beta$ 26.5
Gly-13	171.3	44.0	
Leu-14	172.3	53.7	$C^\beta$ 39.9
Iva-15	174.2	60.1	$C^\beta$ 30.6
X		44.4	$C^\beta$ 40.5; $C^{\beta'}$ 56.5

# 5

## Vergleich verschiedener Algorithmen zur Generierung von Startstrukturen

Eine Startstruktur ist von entscheidender Bedeutung für die Qualität einer Konformationsanalyse. Eine geeignete Kombination aus Startstruktur und Analyseverfahren kann dabei die Rechenzeit minimieren und gute Strukturvorschläge erzeugen. Gleichzeitig können so mögliche Artefakte, die durch falsch gewählte Startstrukturen erzeugt werden können, nahezu ausgeschlossen werden. Der gesamte Konformationsraum eines Moleküls kann bisher durch kein Verfahren vollständig erfasst werden, doch kann deren Qualität durch Wahl eines geeigneten Verfahrens direkt beeinflusst werden, um so den Konformationsraum annähernd vollständig zu erfassen.

Im Folgenden werden zunächst bekannte Algorithmen beschrieben, die zur Generierung von Startstrukturen genutzt werden können. Diese werden in sinnvoller Weise miteinander kombiniert und anhand zyklischer RGD-Peptide, deren Konformation bereits aufgeklärt wurde, auf ihre Qualität hin untersucht.

## 5.1 Algorithmen zur Generierung von Startstrukturen

Eine Schlüsselrolle der Konformationsanalyse nimmt die Durchsuchung des Konformationsraums ein, um Konformationen des Moleküls zu erfassen, die dessen makroskopisches Verhalten wiedergeben. Häufig wird dabei die globale Energieminimumkonformation gesucht. Neben einer zeit- und rechenintensiven systematischen Durchsuchung können verschiedene Arten der MD-Simulationen, zufallsbasierte Methoden und DG-Rechnungen verwendet werden. Die berechneten Strukturen können durch SA-Verfahren weiter verfeinert werden. Die in dieser Arbeit angewandten Algorithmen werden im Folgenden näher beschrieben.

### 5.1.1 Systematische Suche

Die systematische Suche macht sich regelmäßige und definierte Änderungen der Konformation zunutze, um den Konformationsraum eines Moleküls zu erfassen. Die generierte Struktur weist zumeist erhebliche Abweichungen vom nächstgelegenen Energieminimum auf, weshalb sich unmittelbar ein Energieminimierungsschritt anschließt (siehe Abschnitt 2.6.3). Eine Qualitätsbeurteilung der berechneten Struktur kann sowohl auf der Erfüllung experimenteller Randbedingungen als auch auf der konformationellen Energie basieren.

Große Moleküle wie z. B. Proteine besitzen sehr viele lokale Minima auf der Energiehyperfläche, so dass eine systematische Suche aufgrund des zu hohen Ressourcenaufwand in der Praxis unmöglich ist. Dennoch kann sie für kleine Peptide durchaus durchgeführt werden. In diesem Fall sind Variationen der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  sinnvoll.

Die Größe der Variation des definierten Freiheitsgrads (z. B.  $\varphi$  in Inkrementen von  $45^\circ$ ) beeinflusst unmittelbar die Anzahl der generierten Strukturen und dadurch die Auflösung bei der Erfassung des Konformationsraums. Wird der Konformationsraum mit kleinen Variationsinkrementen durchsucht, ist die Wahrscheinlichkeit, das globale Minimum zu finden sehr hoch, jedoch sind derartige Rechnung zeit- und kostenintensiv. Der

Rechenaufwand steigt bei alleiniger Variation der Torsionswinkel exponentiell an:

$$\text{Anzahl der Konformationen} = \prod_{i=1}^N \frac{360^\circ}{\vartheta_i}. \quad (41)$$

Dabei ist  $\vartheta_i$  das Torsionswinkelinkrement der Bindung  $i$ . Die systematische Suche hat zudem den Nachteil, dass der erforderliche Rechenaufwand nur wenig durch zusätzliche Randbedingungen verkürzt werden kann, da deren Validierung erst im Anschluss an die Generierung erfolgt. Eine Möglichkeit, die kombinatorische Explosion einzudämmen, ist die Verwendung von dreidimensionalen Molekülfragmenten zur Generierung des Moleküls. Diese Methode eignet sich besonders gut bei konformationell eingeschränkten zyklischen Verbindungen. Im Allgemeinen werden jedoch Methoden bevorzugt, die zwar keine Erfassung des gesamten Konformationsraums garantieren, jedoch qualitativ hochwertige Strukturen durch eine parallele Validierung oder Anwendung von experimentellen Daten liefern.

### 5.1.2 Distanzgeometrie

Die Beschreibung einer Konformation eines Moleküls mit  $N$  Atomen durch Distanzen zwischen jedem Atompaar ergibt eine  $N \times N$  Matrix, die insgesamt  $\frac{N}{2}(N - 1)$  interatomare Distanzen enthält. Die Distanzgeometrie erfasst den Konformationsraum durch eine zufallsgesteuerte Generierung von Distanzmatrizen, die anschließend in kartesische Koordinaten konvertiert werden. Die Korrelation aller verwendeten Distanzen sowie die Anwendung fester Bindungslängen und -winkel führt zu einer starken Einschränkung der Molekülfreiheitsgrade.

Eine DG-Rechnung ist aus vier Schritten aufgebaut.<sup>[261,262]</sup> Als erstes wird eine Matrix mit den kleinsten und größten Distanzen erzeugt. Anschließend wird innerhalb dieser Grenzwerte eine zufällige Matrix generiert. Im dritten Schritt wird diese Matrix in das kartesische Koordinatensystem transformiert. Auf die so berechnete Struktur wird durch Methoden wie EM oder SA ein Kraftfeld angewandt und so die Struktur verbessert. Der Rechenaufwand für dieses Verfahren skaliert im Gegensatz zur systematischen Suche nicht exponentiell sondern quadratisch mit der Systemgröße, so dass auch große Systeme selbst auf Standardcomputern untersucht werden können.

Die DG ist ein natürlicher Partner der Konformationsanalyse mit NMR, bedingt durch die direkte Anwendung der experimentell bestimmten interatomaren Distanzen auf das Molekül. Da dieses Verfahren die gesamte Abdeckung des Konformationsraums nicht garantiert, ist es notwendig, eine große Anzahl an möglichen Konformationen zu berechnen und die Qualität anhand der Homogenität dieser Lösungen zu verifizieren.

### 5.1.3 Zufallsbasierte Suchmethoden

Im Gegensatz zum systematischen Ansatz (siehe Abschnitt 5.1.1) durchsuchen zufallsbasierte Algorithmen den Konformationsraum nicht mittels vorhersehbarer konformationeller Variationen. Die Freiheitsgrade eines Moleküls werden vielmehr durch eine zufällige Änderung der Parameter wie Atomkoordinaten oder Torsionswinkel freier rotierbarer Bindungen erschlossen, und es sind dadurch drastische Konformationswechsel möglich.<sup>[263–266]</sup> Analog zur systematischen Suche muss die generierte Struktur energie-minimiert und anschließend mit den bereits gefundenen Strukturen verglichen werden. Es werden nur Strukturen gespeichert, die nicht bereits zuvor generiert wurden. Diese Methode endet, wenn eine festgelegte Anzahl an Konformationen generiert wurde oder keine neuen Konformationen mehr gefunden werden.

Die Startstruktur für den folgenden Zyklus dieser Methode kann unterschiedlich gewählt werden. Das einfachste Verfahren ist die Wahl der zuvor generierten Struktur oder eine der abgespeicherten. Dabei kann das Auswahlkriterium auch so gewählt werden, dass lediglich Konformationen mit der bisher niedrigsten Energie als Startstrukturen fungieren. Durch das Metropolis Monte Carlo-Verfahren wird versucht, die Suche nach der globalen Minimumkonformation zu beschleunigen. Bei diesem Verfahren wird die frisch generierte Struktur als neue Startstruktur verwendet, wenn sie eine geringere Energie als die zuvor generierte besitzt oder der Boltzmannfaktor der Energiedifferenz  $\Delta V$

$$e^{-\frac{\Delta V}{k_B T}} \quad (42)$$

größer als eine Zufallszahl zwischen 0 und 1 ist.

Keine der hier kurz beschriebenen Methoden besitzt entscheidende Vorteile gegenüber anderen. In jedem Fall ist ungewiss, ob der gesamte Konformationsraum erfasst wurde. Deshalb ist es sinnvoll durch diese Suchmethoden so lange neue Strukturen zu generieren, bis keine neuen mehr gefunden werden.

#### 5.1.4 *Simulated annealing*

Das *simulated annealing* ist eine computerbasierte Methode, die durch vorsichtige Temperaturkontrolle an der Phasengrenze zwischen flüssig und fest die Bildung eines Kristalls imitiert. Sie ist prinzipiell eine Optimierungsmethode und ist ein natürlicher Partner der DG, doch kann sie ebenso zur Durchsuchung des Konformationsraums verwendet werden. Der zugrunde liegende Prozess dieser Methode ist die Variation eines Kontrollparameters zur Optimierung einer Kostenfunktion.<sup>[267]</sup> Der Kontrollparameter ist für die Konformationsanalyse die Temperatur und die Kostenfunktion die interne Energie des Moleküls, die aus den verwendeten Kraftfeld resultiert. Dem System wird initial mittels einer MD- oder Monte Carlo-Simulation bei sehr hohen Temperaturen (meist zwischen 1000 K bis 2000 K) erlaubt, andere Konformationen einzunehmen. Durch die sehr hohen Temperaturen kann das System auch hohe Energiebarrieren überwinden und dadurch lokale Minima verlassen. Anschließend wird das System langsam auf Temperaturen zwischen 0 K und 100 K abgekühlt. Die Wahrscheinlichkeit, eine globale Minimumskonformation zu erreichen, steigt durch diesen Prozess an. Die Methode ist stark von den Parametern wie Geschwindigkeit und Endtemperatur der Abkühlphase sowie Dauer und Temperatur der Hochtemperaturphase abhängig. Sie profitiert von der Möglichkeit der gleichzeitigen Anwendung von Randbedingungen wie z. B. *NOE-restraints*.

Das SA kann als zufällige Methode nicht garantieren, den gesamten Konformationsraum zu erfassen und die optimale Lösung zu finden. Eine Variation des SA ist das *random SA*, das zu Beginn jedes Zyklus neue zufällige Startkoordinaten generiert.<sup>[268]</sup> Eine andere in dieser Arbeit verwendete Variation ist das *ab initio SA*, das jede Rechnung mit einer fest vorgegebenen Strukturvorlage beginnt.<sup>[269]</sup>

### 5.1.5 MD-Simulationen

Eine MD- oder Monte Carlo-Simulation kann zur Erfassung des Konformationsraums genutzt werden. Dabei kann das System Energiebarrieren überwinden und so in andere Regionen der Energiehyperfläche vordringen.

Im Gegensatz zu den im Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Monte Carlo-Algorithmus wird bei dieser Methode eine ‘echte’ Monte Carlo-Simulation verwendet, bei der keine Energieminimierung der generierten Struktur stattfindet und diese nach dem oben beschriebenen Metropolis-kriterium akzeptiert oder verworfen wird.

Die MD-Simulationen werden in der Regel bei hohen und physikalisch unrealistischen Temperaturen durchgeführt, um die Erfassung des Konformationsraums zu beschleunigen. Typischerweise werden Temperaturen von 1000 K bis 2000 K verwendet. Ein weiterer Vorteil dieses Vorgehens ist, dass das System nicht in einem lokalen Minimum während der Simulationszeit gefangen ist. Die Trajektorie wird anschließend in festen Intervallen ausgelesen, energieminiert und analysiert.

Eine Variante der MD-Simulation ist speziell für das Durchsuchen des Konformationsraums etabliert worden, das sogenannte *local elevation* oder *poling*.<sup>[270–272]</sup> Dieser Algorithmus benutzt eine Straffunktion im Geometrieoptimierungsschritt, um Konformationen zu unterdrücken, die eine zu große Ähnlichkeit zu bereits gefundenen besitzen. Die Straffunktion enthält einen definierbaren Energieterm, der lokal zur Energiehyperfläche addiert wird. Dadurch werden Bereiche auf der Energiehyperfläche vermieden, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt durchsucht werden. Dieser Art der MD-Simulation ist also eine Art Lernprozess integriert. Ein Nachteil dieser Methode ist die jeweilige aufwendige Optimierung der Straffunktion für jedes System.

Eine spezielle, von GROMOS96 zur Verfügung gestellte Variante der MD-Simulation ist die 4D-MD-Simulation.<sup>[273]</sup> Das System wird dabei in einem vierdimensionalen Raum simuliert, wodurch es seltener in lokalen Minima gefangen wird. Diese künstliche zusätzliche vierte Dimension wird nach der Simulation entfernt. Die zugrunde liegende Idee ist, dass durch die Erhöhung der Freiheitsgrade eines Systems die Anzahl der lokalen Minima auf der Energiehyperfläche verringert werden. Die Umgehung von Energiebarrieren im kartesischen Koordinatensystem kann so einfacher verlaufen. Einen extremeren



Ansatz wählten Crippen und Havel, die einen  $N$ -dimensionalen Raum für das Molekül wählten, in dem kein lokales Minimum existiert kann.<sup>[274,275]</sup> Ein implementierter Algorithmus erhöht lokal die Anzahl der Dimensionen für eine begrenzte Zeit und projiziert danach die Struktur wieder in das kartesische Koordinatensystem zurück. Durch die Implementierung in GROMOS96 war es erstmals möglich, in einer RMD-Simulation die Systemfreiheitsgrade durch eine zusätzliche Dimension zu erhöhen.

## 5.2 Funktion und Struktur der RGD-Peptide

Die bekannte RGD-Erkennungssequenz wurde durch Untersuchung einer Vielzahl von ECM-Proteinen identifiziert, die Signale mittels Integrinen an die Zelle übermitteln. Zum Verständnis der biologischen Funktion der RGD-Peptide wird im Folgenden kurz die proteininduzierte Signalübertragung an Zellen mit Fokus auf eine Gruppe der *cell adhesion molecules* (CAM), der Integrine, beschrieben.<sup>[276]</sup>

Die Interaktion einer Zelle mit ihrer Umgebung, der extrazellulären Matrix (ECM) oder anderen Zellen, ist essentiell und sichert das Überleben des Organismus. Diese Funktion wird durch die Präsentation von CAM gewährleistet. Sie übermitteln Signale sowohl von außen ins Zellinnere (*outside-in*) als auch von innen zum Zelläußeren (*inside-out*) und sind von Bedeutung bei der Zelladhäsion, -migration, -differenzierung und -apoptose.<sup>[277]</sup> Eine Fehlfunktion der Integrine führt häufig zu schweren Erkrankungen wie Krebs, Fehlfunktionen des Immunsystems, viralen Infektionen, Entzündungen, Thrombosen oder Osteoporose.

Die Integrine sind transmembrane Proteinkomplexe, die nichtkovalent aus jeweils einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind.<sup>[278]</sup> Bisher konnten 18 unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten identifiziert werden, deren Molekulargewicht zwischen 120 und 180 kDa liegt. Sie besitzen für die Substratbindung relevante, sich wiederholende kationenbindende Motive nahe dem N-Terminus. Von der kleineren  $\beta$ -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 90 und 110 kDa wurden bisher 8 verschiedene identifiziert. Ihre Struktur ähnelt der einer Schleife und wird durch eine Disulfidbrücke nahe des N-Terminus stabilisiert. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheiten verfügen über eine kurze Transmembranhelix

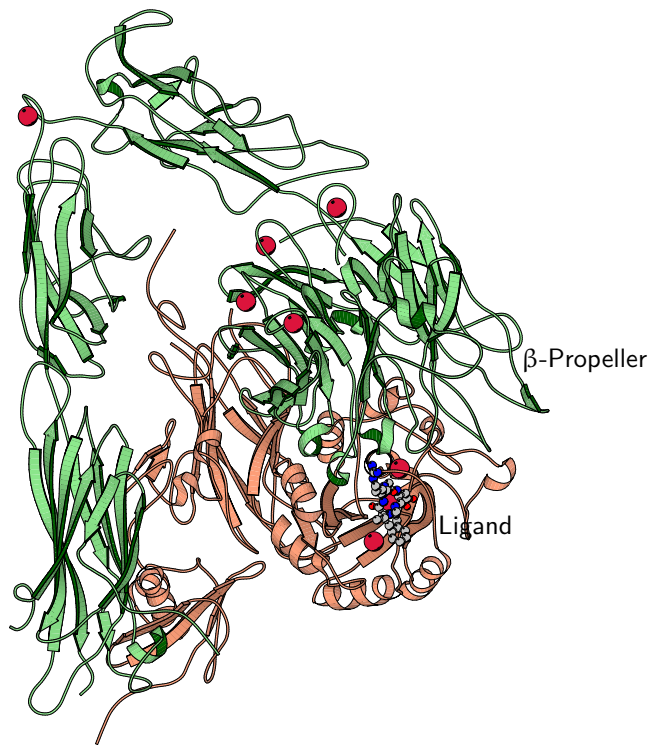


Abbildung 41: Röntgenstruktur des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  im Komplex mit dem zyklischen Pentapeptid  $\text{cyclo}(-\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-MeVal-})$ . Die gebundenen Metallionen sind als rote Kugeln, die  $\alpha$ -Untereinheit grün und die  $\beta$ -Untereinheit orange dargestellt (PDB 1L5G).<sup>[279]</sup>

und eine zytoplasmatische Domäne am C-Terminus.<sup>[280]</sup> Diese zytoplasmatische Domäne soll die Signalweiterleitung ins Zellinnere ermöglichen.<sup>[281]</sup> Es sind 24 bekannte Kombinationen der beiden Untereinheiten bekannt.<sup>[277]</sup> Die Röntgenstruktur des extrazellulären Teils des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  konnte durch Xiong *et al.* mit einer Auflösung von 310 pm aufgeklärt werden und leistete entscheidende Beiträge zum Verständnis der Struktur und Funktion der Integrine.<sup>[282]</sup> Wenige Zeit später beschrieben dieselben Autoren die Röntgenstruktur dieses Integrins in Komplex mit dem Liganden  $\text{cyclo}(-\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-MeVal-})$  (siehe Abbildung 41).<sup>[279]</sup> Das Integrin ist in der Kristallstruktur geknickt, was im Widerspruch zur erwarteten gesteckten Konformation steht. Die Konformationsänderungen resultieren wahrscheinlich aus der kationeninduzierte Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ . Der Ligand  $\text{cyclo}(-\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-MeVal-})$  ist in der Kristallstruk-

tur zwischen dem N-terminalen  $\beta$ -Propeller der  $\alpha_v$ -Untereinheit und der N-terminalen  $\beta A$ -Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit positioniert.

Die RGD-Sequenz ist in den meisten Fällen hinreichend für die Erkennung von Liganden und findet sich in einer Vielzahl von Proteinen wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Tenascin, Osteopontin und Thrombospondin, aber auch in einigen Viren wie dem humanen Adenovirus und dem Maul-und-Klauenseuche-Virus.<sup>[283–286]</sup> Verglichen mit anderen Rezeptoren wie Hormonrezeptoren, die mit einer Dissoziationskonstante zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-11}$  M eine sehr hohe Affinität besitzen, ist die Bindung der Liganden an die Integrine mit Dissoziationskonstanten zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$  M eher schwach. Aus diesem Grund präsentiert die Zelle in der Regel eine höhere Anzahl an Integrinen, so dass dennoch eine gute Adhäsion möglich ist.

Proteine, die die Sequenz RGD enthalten, sind nicht unbedingt Liganden der Integrine, da sie die Teilsequenz möglicherweise nicht an der Oberfläche exponieren. Des Weiteren sind die RGD-abhängigen Integrine selektiv gegenüber unterschiedlichen RGD enthaltenden Liganden, was auf konformationelle Unterschiede oder zusätzliche Bindungsstellen zurückzuführen ist.<sup>[131,287]</sup> Die Synthese kleiner zyklischer oder linearer Peptide, die die RGD-Sequenz enthalten, würde zu hochaffinen und selektiven Liganden führen, deren medizinische Anwendung im Bereich der Inhibition von pathologischen Integrin-Interaktionen oder zur Adhäsionsverbesserung von Gewebetransplantaten läge. Dieses wurde erstmals von Kessler *et al.* in zyklischen Peptiden mit der *spatial screening* Methode durchgeführt.<sup>[130]</sup> Hierbei wurde der Ligand c-(RGDfV) als hoch affin identifiziert, der später durch das *N*-methylierte Derivat c(RGDf<sup>N-Me</sup>V) ersetzt wurde und derzeit unter dem Namen Cilengitide in einer Reihe klinischer Phase-II-Tests zur Tumorthherapie getestet wird.<sup>[132,288]</sup>

Müller beschreibt in seiner Dissertation die Konformation der Peptide c-(RGDfV) **4** und c-(RGDfVG) **5** in DMSO.<sup>[289]</sup> Er verwendete eine eigenständig modellierte Startstruktur mit einer annähernd kreisförmigen Kontur, bei deren Modellierung speziell auf die Ausrichtung der Peptidbindungen und Seitenketten geachtet wurde, so dass keine intramolekularen Wasserstoffbrücken in der Startstruktur enthalten sind. Diese würden die von ihm gewählte Konformationsanalyse verfälschen. Aus einer folgenden 10 ps RMD-Simulation im Vakuum bei 1000 K wurden Startstrukturen für die anschließenden Simulationen

gewonnen. Ausgehend von diesen Strukturen wurde eine 60 ps MD-Simulation im Vakuum bei 300 K sowie im Solvens eine 100 ps RMD-Simulation mit anschließender 50 ps FMD-Simulation durchgeführt. Die so erhaltenen Konformationsvorschläge für die zyklischen Peptide **4** und **5** sind im Anhang in Kapitel C.1 dargestellt. Eine schematische Darstellung dieser Strukturen in Lösung ist in Abbildung 42 dargestellt, und sie werden im Folgenden etwas näher beschrieben.

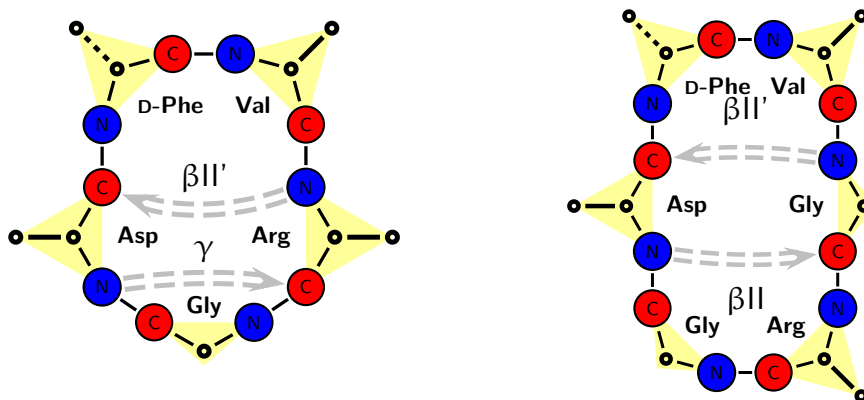


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Strukturen von c-(RGDFV) **4** und c-(RGDFVG) **5** in DMSO. [289]

Die Konformation des Peptids **4** während einer RMD-Simulation zeigt ein zu erwartendes  $\beta$ ,  $\gamma$ -Schleifenmuster. Die D-Aminosäure D-Phe besetzt die  $i+1$  Position einer  $\beta$ II'-Schleife, während das Gly die zentrale Position einer  $\gamma$ -Schleife einnimmt. Leichte Abweichungen der Rückgratstorsionswinkel gegenüber den Referenzwerten werden im Bereich der Peptidbindung zwischen Val und Arg beobachtet, was zu einer Aufweitung der  $\beta$ II'-Schleife führt. Die Population der  $\beta$ II'-Schleife beträgt während der Simulation lediglich 47%, und die Konformation wird von einer  $\beta$ I-Schleife mit Val in  $i+1$  Position überlagert. Werden nur die C $^{\alpha}$ -Atome betrachtet, lässt sich die Konformation von c-(RGDFV) nach Müller anschaulich als Umschlag beschreiben, bei dem das Gly C $^{\alpha}$  die Lasche repräsentiert. [289]

Das Peptid **5** arrangiert sich während der RMD-Simulationen in Solvens derart, dass eine  $\beta$ II'-Schleife mit D-Phe in  $i+1$  Position einer  $\beta$ II-Schleife mit Arg in  $i+1$  Position gegenüber liegt. Die  $\beta$ II-Schleife ist jedoch gegenüber der Idealgeometrie stark verzerrt und beide Schleifen werden von  $\gamma$ -Schleifen überlagert. Dies kann ebenfalls ein Indiz für ein schnelles Gleichgewicht zwischen einer  $\beta$ I- und einer  $\beta$ II-Schleife sein.

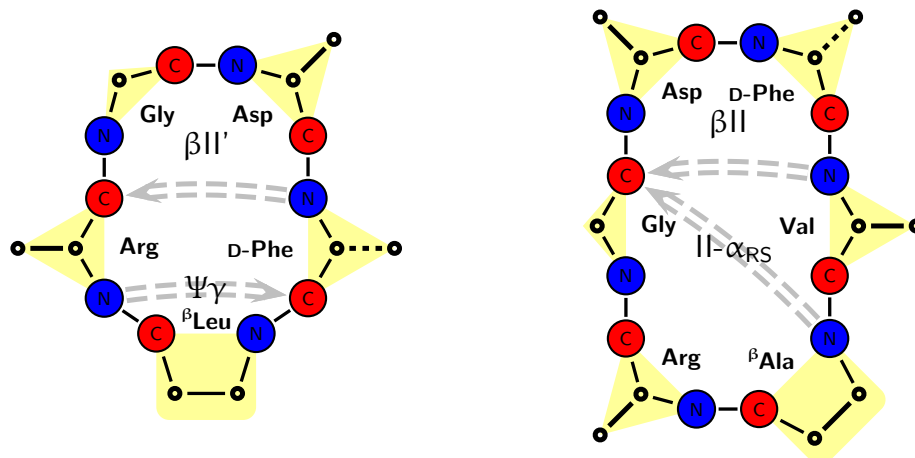


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Strukturen von  $c\text{-(RGDf}^{\beta\text{L}})$  **7** und  $c\text{-(RGDf}^{\beta\text{A}})$  **8** in DMSO. <sup>[139]</sup>

Schumann untersuchte die konformationelle Präferenz von  $\beta$ -Aminosäuren an zyklischen RGD-Peptiden. Die von ihm gewählte Konformationsanalyse umfasste ein DG/SA zur Generierung von 1000 Strukturen, die mit Clustering analysiert wurden. Anschließend wurde eine 50 bis 200 ps RMD-Simulation im Kontinuum ( $\epsilon = 45$ ) durchgeführt und abermals mit Clustering analysiert. Abschließend folgte eine 0.5 ns bis 2 ns FMD-Simulation im Kontinuum oder eine 0.5 ns FMD-Simulation in einer Solvensbox. Die so erhaltenen Konformationen für die Peptide **6**, **7** und **8** sind im Anhang in Kapitel C.2 dargestellt. Schematisch sind sie in Abbildung 43 dargestellt, und werden im Folgenden näher beschrieben.

Für das Peptid  $c\text{-(RGDf}^{\beta\text{A}})$  **6** ist keine definierte Sekundärstruktur beobachtet worden (siehe Abbildung 141). Die Ursache findet sich zum einen in der geringen Anzahl der experimentellen NOE-Distanzen. Zum anderen erhöhen die Aminosäuren Gly und  $\beta\text{Ala}$  die Flexibilität des zyklischen Pentapeptids erheblich. Das Peptid **6** ist aus diesem Grund zur Beurteilung der Qualität des Algorithmus zur Durchsuchung des Konformationsraums geeignet.

Das bestimmende Strukturelement des zyklischen Peptids **7** wird durch eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position gebildet. Gegenüberliegend findet sich eine  $\Psi\gamma$ -Schleife mit  $\beta\text{Leu}$  in zentraler Position, die nur selten durch eine H-Brücke stabilisiert wird. Die

Aminosäure  $\beta$ Leu erhöht die Flexibilität des Rückgrats in diesem Bereich, doch bleibt die Konformation des Peptids während einer RMD-Simulation dennoch stabil.

Das Peptid **8** zeigt während RMD-Simulationen eine hohe Flexibilität bedingt durch die Aminosäure  $\beta$ Ala. Im Vorzugskonformer findet sich eine II- $\alpha_{RS}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position, die von einer  $\beta$ II- und einer  $\gamma$ -Schleife überlagert ist. Zusätzlich findet sich eine analoge Struktur, bei der Arg die  $i+1$  Position der II- $\alpha_{RS}$ -Schleife besetzt. Es wird jedoch vermutet, dass sie als Artefakt der Startstruktur auftritt. Das Vorzeichen des  $\mu$ -Winkel der Aminosäure  $\beta$ Ala ändert sich während der Rechnungen häufig, doch induziert dieser Wechsel keine ausgeprägten Konformationsänderungen. Variationen treten lediglich in den Torsionswinkeln  $\varphi$  und  $\psi$  des  $\beta$ Ala auf, während die RGD-Sequenz konformationell unberührt bleibt.

Eine Neuberechnung der Lösungsmittelstruktur von **7** und **8** wurde zur Validierung eines neuen Konformationsanalyseprotokolls von Guthöhrlein durchgeführt.<sup>[77]</sup> Diese Berechnungen mit verlängerten Simulationsdauern führten im Falle von **7** zu einem sehr ähnlichen und im Falle von **8** zu einem identischen Strukturvorschlag.

### 5.3 Zielsetzung

Die Konformationsanalyse mit NMR und molekularmechanischen Rechnungen umfasst eine Vielzahl verschiedener Methoden. Abhängig vom System können unterschiedliche Kombinationen gewählt werden, deren Qualität mitunter fraglich erscheint. Dieses Projekt soll hauptsächlich zur Optimierung einer Konformationsanalyse von Oligopeptiden dienen und die Qualität und Effizienz einzelner Methoden in Abhängigkeit von der Startstruktur untersuchen. Es sollen acht unterschiedliche Methoden zur Generierung von Startstrukturen an bereits gut untersuchten zyklischen RGD-Peptiden durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit werden die Neuberechneten Konformationen mit den bereits bekannten Strukturvorschlägen verglichen. Zusätzlich wird anhand der NOE-Verletzungen die Qualität der Methode bewertet.

Als Startstrukturen werden vollständig gestreckte Konformationen gewählt, die nach einer kurzen Energieminimierung in die unterschiedlichen Methoden einfließen. Zur Durchsuchung des Konformationsraums und gleichzeitigen Generierung von Startstrukturen

werden neben einer systematischen Suche auch unterschiedliche Algorithmen der Programmpakete GROMOS96 und XPLOR-NIH gewählt. Von GROMOS96 wird zum einen das *local elevation*, das speziell zur Durchsuchung des Konformationsraums entwickelt wurde, und zum anderen die 4D-MD-Simulation, die durch eine zusätzliche, optionale Dimension Energiebarrieren überwinden kann, genutzt. Mit XPLOR-NIH werden Distanzgeometrien und zwei unterschiedliche *simulated annealing* Algorithmen berechnet. Das *ab initio simulated annealing* nutzt für jeden Rechenzyklus die gleiche Konformationsvorlage, während das *random simulated annealing* eine zufällig generierte Konformation für jeden Zyklus nutzt. Abschließend soll für jede generierte Struktur eine RMD-Simulation mit anschließender Analyse durchgeführt werden. Zur Analyse der Trajektorien dieser Oligopeptide hat sich das Perlpaket TORCL von Guthöhrlein bewährt und wird hier weitgehend verwendet.<sup>[77]</sup> TORCL ermöglicht ein sequentielles Clustering von Trajektorien nach beliebig vielen Torsionswinkeln und stellt zusätzlich eine umfangreiche Analyse der Clusterfamilien zur Verfügung.

## 5.4 Ergebnisse

Die gewählten zyklischen Peptide enthalten alle die Bindungssequenz RGD und als strukturinduzierende Aminosäure die Aminosäure D-Phe. Sie unterscheiden sich lediglich in der Art der zusätzlich vorhandenen Aminosäuren sowie der Ringgröße, die zwischen 15 und 19 variiert. Die Konformationen der Peptide **4** und **5** wurden bereits von Müller untersucht, die der Peptide **6**, **7** und **8** von Schumann. Die von ihnen gemachten Strukturvorschläge gelten als Referenz für alle durchgeführten Rechnungen (siehe Kapitel 5.2).

Der Einfluss der Startstruktur auf die folgenden molekülmechanischen Rechnungen wurde durch die Anwendung von unterschiedlichen Methoden der Konformationsanalyse untersucht. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 44 dargestellt.

Als Ausgangsstruktur für alle Rechnungen wurde eine vollständig gestreckte Konformation generiert. Diese wurde nach einer kurzen Energieminimierung den verschiedenen Konformationsanalysen als Startstruktur zur Verfügung gestellt. Neben einer systematischen Durchsuchung des Konformationsraums (ss) im Kontinuum ( $\epsilon = 45$ ) wurden verschiedene Algorithmen der Programmpakete GROMOS96 und XPLOR-NIH gewählt, die durch

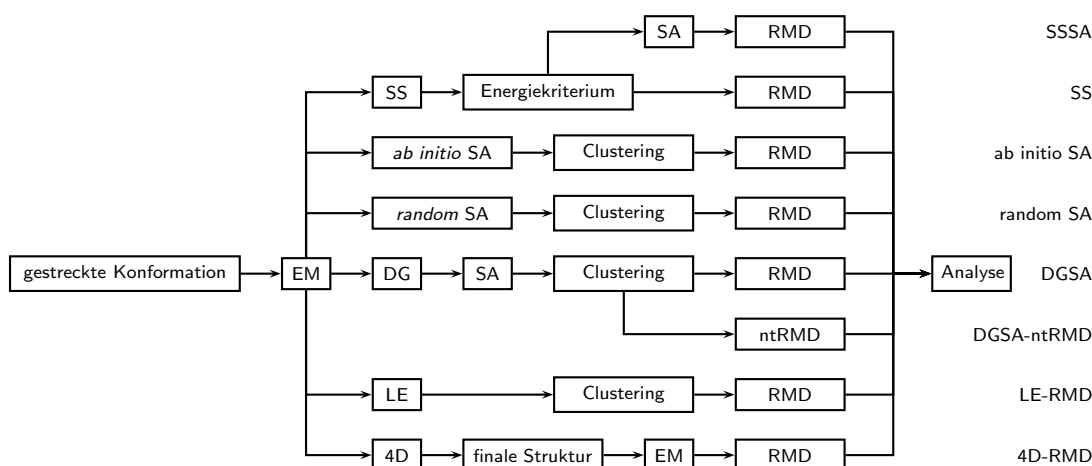


Abbildung 44: Schematische Darstellung der genutzten Methoden und deren verwendeten Bezeichnungen zur Konformationsanalyse zyklischer Peptide.

zusätzliche Variation der Auswertung kombiniert wurden. Für die Erfassung des Konformationsraums mit GROMOS96 wurden der *local elevation-* (LE) und der 4D-Algorithmus verwendet. Die LE-Simulation erfolgte im Kontinuum, während für die 4D-Simulation eine Solvensbox verwendet werden konnte. Mit der Software XPLOR-NIH wurden Distanzgeometrien berechnet und verschiedene *simulated annealing* Methoden im Vakuum verwendet. Mit Ausnahme einer Methode wurden alle mit einer RMD-Simulation in einer Solvensbox abgeschlossen und anschließend analysiert. In einem Fall wurde zum Studium des Einflusses der zeitabhängigen *NOE-restraints*, die über ein Zeitintervall  $\Delta t$  erfüllt sein müssen, eine ntRMD-Trajektorie berechnet, die zeitunabhängige *NOE-restraints* nutzt. [231,290]

Die Analyse der RMD-Trajektorien beschränkt sich aufgrund der hohen Anzahl der berechneten Strukturen auf den RMSD-Wert der Rückgrat-atome, der Rückgratstorsionswinkel und der Wasserstoffbrückenbindungen. Der RMSD-Wert wurde durch Überlagerung der Rückgrat-atome der gefundenen Struktur mit den Strukturvorschlägen von Müller bzw. Schumann berechnet. Da lediglich geringe Abweichungen im RMSD-Wert für um  $180^\circ$  gedrehte Peptidbindungen gefunden werden, beinhaltet die Berechnung neben den Rückgrat-atomen N, C $^\alpha$  und C auch das Carbonylsauerstoffatom O.



Die durch die verschiedenen Methoden berechneten Trajektorien und Strukturen der zyklischen Peptide **4** bis **8** werden im Folgenden beschrieben und analysiert.

### 5.4.1 Systematische Durchsuchung des Konformationsraums

Aus den ss-Trajektorien wurden jeweils die fünf energetisch günstigsten Konformationen entnommen (ss1 bis ss5) und den folgenden Rechnungen als Startstruktur zu Verfügung gestellt. Zur systematischen Durchsuchung des Konformationsraums wurden Variationen der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  aller Aminosäuren verwendet. In Gegenwart einer  $\beta$ -Aminosäure wurde zusätzlich der Torsionswinkel  $\mu$  variiert. Diese Methode der Konformationsanalyse ist schematisch in Abbildung 45 dargestellt, während die Durchführung dieser Experimente im Kapitel 5.6 detailliert beschrieben sind.

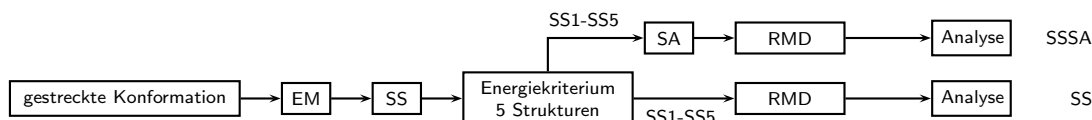


Abbildung 45: Schematische Darstellung der ss- und sssa-Methode.

#### 5.4.1.1 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **4**

##### Systematische Suche (ss)

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulationen der fünf niedrigsten Energiekonformationen aus der ss für **4** sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass mit Ausnahme von ss5 höher populierte Clusterfamilien gefunden werden. Mit ss5 als Startstruktur bilden sich zwei annähernd gleichbesetzte Konformationsfamilien.

Ein Vergleich mit der von Müller postulierte Konformation mittels des RMSD zeigt für alle Hauptkonformationen deutliche Abweichung, wenn von einer Übereinstimmung der Sekundärstrukturen bei Werten kleiner als 80 pm ausgegangen wird. Variationen

Tabelle 29: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS mit anschließender RMD für c-(RGDIV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SS1	2	91.2	105	6	82
		4.8	79	6	220
SS2	1	93.6	85	7	133
SS3	3	76.8	128	6	96
		16.8	102	7	124
		5.6	73	8	165
SS4	1	90.4	103	6	83
SS5	2	48.8	71	6	128
		41.6	104	6	89

der Rückgratstorsionswinkel, die eine Drehung der Peptidbindung um  $180^\circ$  bewirken, erhöhen den RMSD-Wert im Allgemeinen auf Werte über 80 pm.

Die Anzahl der NOE-Verletzungen sowie die Summe der positiven NOE-Verletzungen für die einzelnen zentralen Strukturen von **4** sind ebenfalls in Tabelle 29 zusammengefasst. Die geringste, jedoch nur befriedigende Anzahl wird ausnahmslos bei den höher populierten Clustern gefunden. Die Summe der positiven Abweichungen von den NOE-*restraints* fluktuiert und korreliert nicht immer mit deren Anzahl. Im Falle von SS1, SS3 und SS4 findet sich sowohl die geringste Anzahl als auch geringste positive Summe der NOE-Verletzungen für die Hauptkonformation. Diese zeigen jedoch bezüglich des RMSD deutlich Abweichungen zu der Referenzstruktur.

Ein Vergleich der ermittelten Rückgratstorsionswinkel mit denen der Referenzstruktur ist in Abbildung 46 dargestellt. Es zeigt sich, dass eine hohe Dynamik des Moleküls im Bereich der Torsionswinkel  $\varphi$  von Arg und D-Phe sowie der Torsionswinkel  $\psi$  von Asp und Val vorherrscht. Diese Torsionswinkel bewirken eine Drehung der Peptidbindungen zwischen Val und Arg sowie Asp und D-Phe. Fluktuationen im Bereich dieser Peptidbindung werden von Müller nicht beschrieben, während die der Peptidbindung zwischen Val und Arg die Bildung einer  $\beta$ -Schleife mit Val in  $i+1$  Position bewirken könnten. Die dazu erforderlichen Torsionswinkeländerungen zur Ausbildung einer H-Brücke zwischen Gly  $H^N$  und D-Phe O werden jedoch nicht beobachtet.

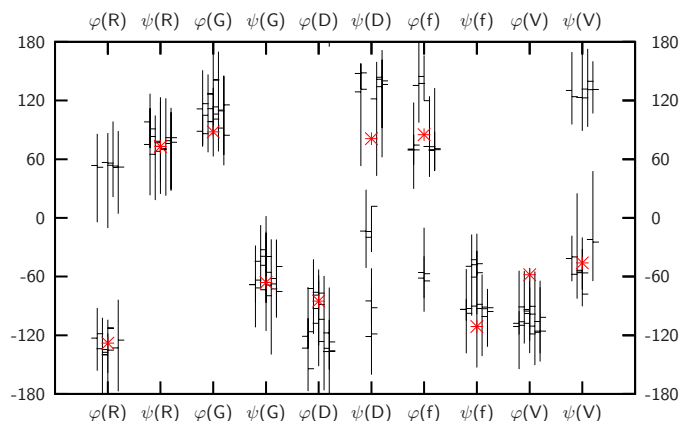


Abbildung 46: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV) 4.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD sind in Tabelle 153 zusammengefasst. Die stabilisierende H-Brücke der  $\beta$ II'-Schleife wird nur bei den Startstrukturen ss2 und ss5 häufig ausgebildet. Die gegenüberliegende  $\gamma$ -Schleife stabilisierende H-Brücke wird hingegen bei allen Startstrukturen nur selten gebildet. Weiterhin fallen deutliche Abweichungen der Populationen zu den von Müller publizierten Werten auf.

### Systematische Suche mit SA (SS/SA)

Die ss/SA-Methode enthält nach der Auswahl durch ein Energiekriterium ein SA. Dieses soll die Startstruktur für die RMD weiter verbessern und mögliche Konformationen, die einen Sattelpunkt der Energiehyperfläche besetzen, ausschließen. Die Qualität der Startstruktur sollte steigen.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der abschließenden RMD sowie die Analyse der NOE-Verletzungen sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Der Einfluss der SA-Methode ist deutlich anhand der erhöhten Anzahl der Clusterfamilien zu erkennen, deren jeweilige Hauptkonformationen auffallend geringere Populationen besitzen. Jeweils die zentralen Strukturen der Cluster mit der zweithöchsten Population besitzen Konformationen,

Tabelle 30: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS/SA mit anschließender RMD für c-(RGDIV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SSSA1	3	39.2	93	6	82
		27.2	69	6	140
		17.6	133	6	110
SSSA2	4	60.8	100	7	88
		20.0	85	6	97
		6.4	128	8	144
		4.8	108	5	185
SSSA3	2	78.4	103	5	78
		11.2	36	6	177
SSSA4	2	62.4	104	6	84
		29.6	67	6	132
SSSA5	3	42.4	112	5	90
		33.6	86	5	105
		14.4	53	6	134

die der Referenzstruktur recht ähnlich sind. Die Hauptkonformationen zeigen hingegen höhere Abweichungen. Die Qualität dieser Konformationsanalyse ist im Vergleich zur SS-Methode gestiegen, da sowohl die Anzahl als auch die durchschnittliche positive NOE-Verletzung gesunken ist.

In Abbildung 47 sind die Rückgratstorsionswinkel aller zentralen Clusterstrukturen mit ihren Minimal- und Maximalwerten abgebildet. Zum Vergleich sind die Referenzwerte als Sterne eingezeichnet. Auch hier können Fluktuationen der Peptidbindungen zwischen Val und Arg bei allen Startstrukturen beobachtet werden. Zusätzlich finden sich Variationen der Peptidbindungsausrichtung zwischen Asp und D-Phe bei den Startstrukturen SS1 und SS2.

Der Vergleich der Populationen der H-Brücken ist in Tabelle 154 zusammengefasst. Die von Müller ermittelten Populationen werden bei allen Startstrukturen nicht erreicht, jedoch zeigt sich ein konserviertes H-Brückenmuster. Die Präferenz zur Ausbildung einer  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position ist deutlich zu erkennen, und die RMD-Simulationen zeigen ein homogenes Bild der Struktur.

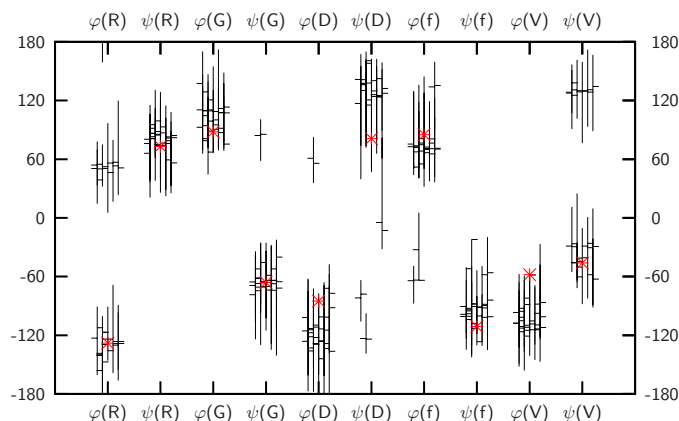


Abbildung 47: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der SS/SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDV) **4**.

Insgesamt erweisen sich die SS- und SS/SA-Methode für das Peptid **4** als brauchbar, und es können sinnvolle Strukturvorschläge gefunden werden. Jedoch weichen die Populationen stark von den Referenzdaten ab, und es treten starke Fluktuationen im Bereich zweier Peptidbindungen auf, die wahrscheinlich durch eine geringe Stringenz der NOE-*restraints* entstehen. Die NOE-Verletzungen sind im Vergleich zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden gering. Aufgrund der hoch populierte Hauptkonformere ist es möglich, die Vorzugskonformation in Lösung zu bestimmen.

#### 5.4.1.2 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) **5**

##### Systematische Suche (SS)

Das Clustering nach Rückgratstorsionswinkel der RMD-Simulation ergibt für jede Startstruktur mehrere Clusterfamilien, von denen die höher populierte als Hauptkonformation fungiert (siehe Tabelle 31). Die NOE-Verletzungen der zentralen Clusterstrukturen sind gering und zeigen nur bei den niedrig populierte Nebenkonformationen sowohl in der Anzahl als auch in der Summe der positiven Abweichung einen signifikanten Anstieg. Die Startstrukturen mit der niedrigsten potentiellen Energie (SS1 bis SS3) zeigen aufgrund

Tabelle 31: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS mit anschließender RMD für c-(RGDIVG) 5.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SS1	2	74.4	211	1	29
		17.6	185	2	22
SS2	4	48.0	102	3	46
		9.6	132	1	1
		6.4	161	1	6
		4.8	148	5	106
SS3	2	66.4	190	1	27
		24.0	177	1	9
SS4	4	64.8	64	2	52
		7.2	123	3	61
		5.6	85	2	35
		4.8	90	4	107
SS5	3	64.8	79	2	49
		7.2	95	3	59
		4.8	69	3	88

ihrer hohen RMSD-Werte eine sehr geringe Übereinstimmung mit der Referenzstruktur von Müller. Die Startstrukturen SS4 und SS5 sind der postulierten Struktur weitaus ähnlicher.

Der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit der Referenzstruktur ist grafisch in Abbildung 48 dargestellt. Es zeigen sich zum Teil große Abweichungen, insbesondere für die Torsionswinkel  $\varphi(\text{Gly-2})$ ,  $\psi(\text{Asp})$ ,  $\varphi(\text{D-Phe})$  und  $\psi(\text{Gly-6})$ . Gute Korrelationen werden lediglich mit den Startstrukturen SS4 und SS5 beobachtet, während den RMD-Simulationen mit den Startstrukturen SS1 bis SS3 keine Konformation entnommen werden kann, in der alle Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  innerhalb einer Toleranz von  $30^\circ$  übereinstimmen. Im Vergleich zu den anderen verwendeten Methoden besitzen die berechneten Hauptkonformere sehr niedrige NOE-Verletzungen, und sind deshalb durchaus sinnvolle Strukturvorschläge.

Bei der Analyse der während der RMD gebildeten H-Brücken für die Startstrukturen SS1 bis SS3 fällt auf, dass vorwiegend Wasserstoffbrücken zwischen den Rückgratatomen und der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp gebildet werden, die die Konformation

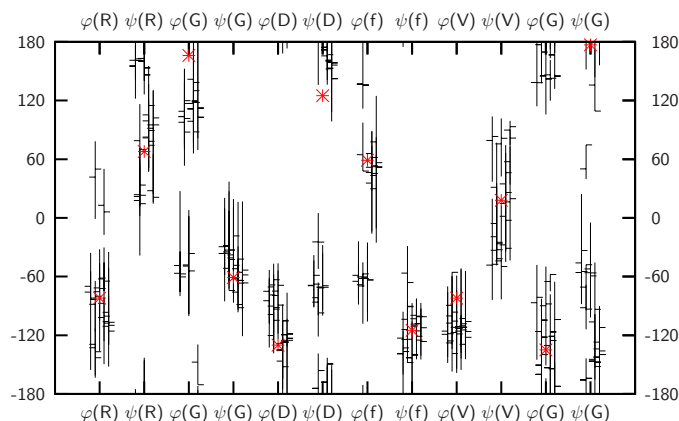


Abbildung 48: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFVG) **5**.

stark deformieren. Schleifenstabilisierende H-Brücken zwischen Rückgratatomen treten nur in äußerst geringen Anteilen auf, so dass diese Strukturen keine dominanten Sekundärstrukturen enthalten (siehe Tabelle 161).

Die Startstrukturen ss4 und ss5 korrelieren recht gut mit den von Müller gefundenen Werten unter Berücksichtigung der Verwendung von zeitabhängigen *NOE-restraints*. Diese sind wahrscheinlich für die geringeren Populationen der H-Brücken verantwortlich. Dennoch ist bei beiden Startstrukturen das dominante  $\beta/\beta$ -Strukturmotiv anhand der Wasserstoffbrücken zu erkennen. Die beschriebenen Überlagerungen der  $\beta$ -Schleifen mit  $\gamma$ -Schleifen sind hingegen in geringerem Umfang zu beobachten.

### Systematische Suche mit SA (SS/SA)

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulation für die Startstrukturen, die nach der ss/SA-Methode generiert wurden, sind in Tabelle 32 mit den berechneten NOE-Verletzungen zusammengefasst. Jede Clusterfamilie besitzt eine hoch populierte Hauptkonformation und weist zusätzliche Nebenkongformationen auf. Während die RMSD-Werte im Allgemeinen durch das zusätzliche SA gesunken sind, nimmt die NOE-Verletzung hin-

Tabelle 32: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS/SA mit anschließender RMD für c-(RGDIVG) 5.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SSSA1	3	67.2	89	3	64
		8.0	111	2	58
		6.4	90	5	229
SSSA2	2	74.4	147	3	38
		6.4	174	2	19
SSSA3	2	53.6	202	1	28
		28.0	169	3	40
SSSA4	3	61.6	77	2	49
		11.2	102	5	161
		6.4	87	2	39
SSSA5	3	64.8	79	2	44
		7.2	95	4	177
		4.8	69	5	66

sichtlich Anzahl und Summe zu. Dennoch sind die NOE-Verletzungen akzeptabel, und es könnte aufgrund der Clusterpopulationen ein Strukturvorschlag gefunden werden.

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel ergibt eine hohe Rückgratdynamik des Peptids (siehe Abbildung 49). Die gemessenen Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  für die Strukturen SSSA2 und SSSA3 weichen teilweise deutlich von denen der Referenzstruktur ab. Wie schon bei der SS-Methode werden diese Strukturen durch stabile H-Brücken zwischen Rückgratatom und Carboxylgruppe von Asp deformiert. Dieses reflektiert auch die Analyse der H-Brückenpopulationen während der RMD (siehe Tabelle 162).

Recht gute Übereinstimmungen finden sich bei den Startstrukturen SSSA1, SSSA4 und SSSA5, in denen das in der Referenzstruktur beschriebene  $\beta/\beta$ -Schleifenmuster gefunden wird. Die Wasserstoffbrückenpopulationen korrelieren mit der Referenzstruktur und zeigen einen höheren Anteil einer  $\gamma$ -Schleife um Gly-2 bei den Startstrukturen SSSA1 und SSSA5, während andere  $\gamma$ -Schleifen in weitaus geringerem Umfang gebildet werden.

Die Anwendung eines SA nach der systematischen Durchsuchung des Konformationsraums erweist sich lediglich für SSSA1 als nützlich. Zwei Konformationen (SSSA2, SSSA3) konnten nicht das Potentialminimum verlassen und zeigten während der Analyse analoge



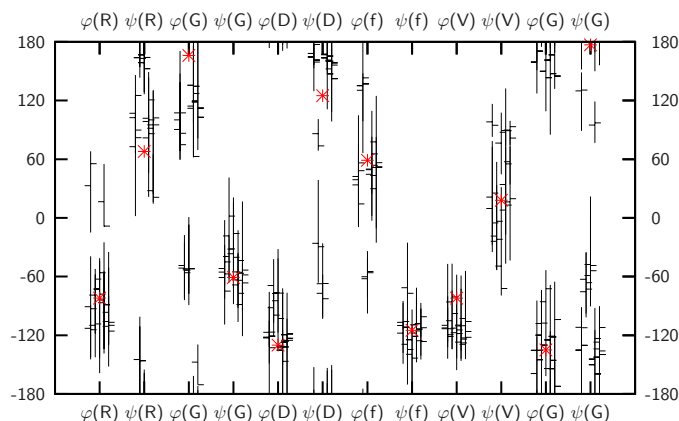


Abbildung 49: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der SS/SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIVG) **5**.

Ergebnisse wie bei der SA-Methode. Die Startkonformationen SSSA4 und SSSA5 ergaben schon während der SA-Methode recht gute Korrelationen. Diese wurden durch das zusätzliche SA nicht verändert, so dass sich diese Methode für dieses System zwar als vorteilhaft erweist, jedoch nicht in allen Fällen sinnvolle Ergebnisse liefert.

### 5.4.1.3 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-βAla-) **6**

#### Systematische Suche (SS)

Für das Peptid **6** konnte von Schumann keine hinreichend hoch populierte Konformation beobachtet werden. Ein Vergleich mit einer Referenzstruktur ist aus diesem Grund nicht möglich, so dass ein RMSD-Wert nicht bestimmt werden kann.

In Tabelle 33 sind die Ergebnisse der Clusteranalyse und NOE-Verletzungen zusammengefasst. Die zentralen Strukturen besitzen teilweise recht hohe NOE-Verletzungen. Diese Strukturen würden bei einer Konformationsanalyse nicht berücksichtigt werden, so dass ausgehend von den Populationen der Clusterfamilien eine Hauptkonformation für das Peptid **6** für die Startstrukturen SS2, SS3 und SS4 bestimmt werden könnte.

In Abbildung 50 sind einige Vorzugstorsionswinkel ersichtlich, deren Variationen äußerst gering sind, so dass es mit dieser Methode durchaus möglich wäre, eine Hauptkonformation zu bestimmen.

Tabelle 33: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS mit anschließender RMD für  $c\text{-(RGdf}^{\beta\text{A}})$  **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SS1	3	36.1	3	18
		20.7	3	57
		9.3	3	59
SS2	2	65.9	5	91
		6.8	7	123
SS3	2	85.6	4	92
		8.8	6	165
SS4	1	87.4	4	91
SS5	4	27.7	5	41
		27.0	1	10
		11.5	7	108
		10.3	3	25

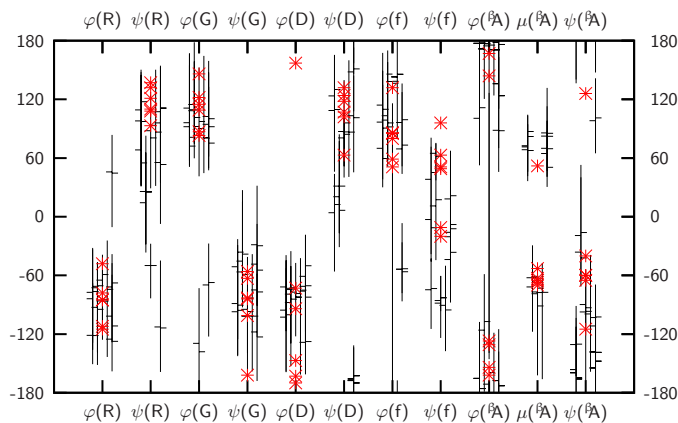


Abbildung 50: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für  $c\text{-(RGdf}^{\beta\text{A}})$  **6**.

Das Peptid **6** tendiert zur Ausbildung von  $\gamma$ -Schleifen bevorzugt mit Gly, Arg und Asp in zentraler Position. Ein Vergleich mit Referenzdaten ist nicht möglich, doch wird eine Gleichverteilung der Populationen dieser H-Brücken erwartet.

Die Analyse der H-Brücken ergibt ein inhomogenes Bild, jedoch wäre auch hier die Bestimmung einer Hauptkonformation durch die Wahl von nur einer Startstruktur möglich (siehe Tabelle 169). Diese Methode eignet sich für **6**, wenn alle Startstrukturen berücksichtigt werden. Die Analyse aller RMD-Simulationen ergibt in der Gesamtheit ein wie von Schumann beschriebenes dynamisches Verhalten von **6** in DMSO.

### Systematische Suche mit SA (SS/SA)

Die Verwendung eines zusätzlichen SA vor der RMD-Simulation verringert die NOE-Verletzungen im Vergleich zur SS-Methode deutlich (siehe Tabelle 34). Durch die zusätzliche Konformationsraumsdurchsuchung werden entsprechend mehr Clusterfamilien gebildet, was dem flexiblen zyklischen Peptid **6** eher entspricht. Die NOE-Verletzungen sind sehr niedrig und anhand der Populationen kann mit Ausnahme der Startstruktur SSSA1 keine Vorzugskonformation bestimmt werden. Eine Konformationsanalyse, bei der lediglich SSSA1 als Startstruktur verwendet wird, würde die ausgeprägte Dynamik des Moleküls nicht repräsentieren.

Die Betrachtung der Rückgratstorsionswinkel während der RMD-Simulationen legt die Vermutung nahe, dass Vorzugskonformationen durchaus existieren (siehe Abbildung 51). Die Variationen sind sehr gering, und es kommt zu auffälligen Anteilen bestimmter Torsionswinkel in allen Clusterfamilien. Dennoch bietet die SS/SA-Methode Vorteile gegenüber der reinen SS-Methode, da hier z. B. für  $\beta$ Ala während nahezu aller RMD-Rechnungen sowohl positive als auch negative  $\mu$ -Torsionswinkel gefunden werden. Dieses Verhalten konnte zuvor mit der SS-Methode nicht beobachtet werden.

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel ergibt analog zur SS-Methode eine inhomogene Verteilung einzelner Konformationen bei den Startstrukturen (siehe Tabelle 170). Die systematische Durchsuchung des Konformationsraums benötigt für **6** die gleichzeitige Verwendung verschiedener Startstrukturen, um die Flexibilität zu erkennen. Einzelne Startstrukturen verzerren dieses Konformationsbild zugunsten einzelner Hauptkonformere, so dass eine den Beobachtungen von Schumann analoge hohe Dynamik des Peptidrückgrats

Tabelle 34: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS/SA mit anschließender RMD für c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
SSSA1	2	77.6	2	22
		12.8	4	67
SSSA2	5	46.4	1	9
		16.0	2	49
		6.4	4	43
		5.6	5	57
		4.8	6	64
SSSA3	5	29.6	5	39
		20.8	3	82
		16.0	2	11
		6.4	3	38
		4.8	1	8
SSSA4	3	41.6	2	11
		20.0	2	53
		9.6	5	47
SSSA5	6	34.4	2	14
		15.2	4	61
		15.2	4	35
		6.4	2	28
		5.6	5	87
		4.8	5	33

nur durch die Betrachtung aller generierten Konformationen erkannt werden kann. Wird lediglich eine Startstruktur zur Konformationsanalyse verwendet, verleitet die Bildung hoch populierter Hauptkonformere zur Annahme einer stabilen Lösungsmittelkonformation. Das zusätzliche SA schafft es teilweise, die energetischen Minimumkonformationen zu verlassen, doch findet sich weitgehend die Bildung von Hauptkonformationen analog zur SS-Methode.

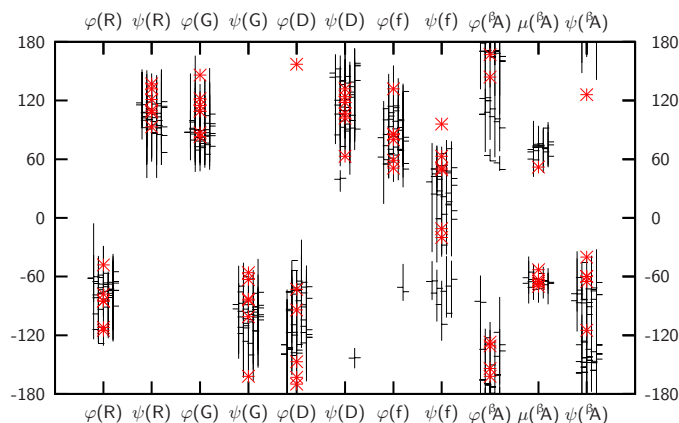


Abbildung 51: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der SS/SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDf <sup>$\beta$</sup> A) **6**.

#### 5.4.1.4 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- <sup>$\beta$</sup> Leu-) **7**

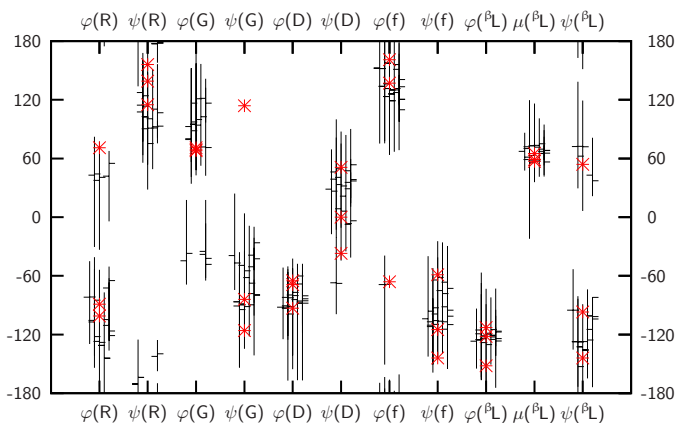
##### Systematische Suche (SS)

In Tabelle 35 sind die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulationen zusammengefasst. Zusätzlich enthält die Tabelle die RMSD-Werte der zentralen Clusterstrukturen zu den von Schumann gefundenen drei Hauptkonformationen von **7** (K1 bis K3). Die Analyseergebnisse bezüglich der NOE-Verletzungen sind in den letzten beiden Spalten aufgeführt.

Mittels der Clusteranalyse kann aus jeder RMD-Trajektorie eine hoch populierte Hauptkonformation bestimmt werden. Bei den Startstrukturen SS2, SS3 und SS5 werden zusätzlich Nebenkongformationen in geringerer Population beobachtet. Die RMSD-Werte der gefundenen Hauptkonformationen sind mit der zweiten Nebenkongformation der Referenzstruktur relativ niedrig. Die von Schumann beschriebene Hauptkonformation wird anhand der RMSD-Werte lediglich in geringer populierte Clustern ausgebildet. Im Vergleich zu den anderen Methoden werden hier recht hohe NOE-Abweichungen bei allen Strukturen gefunden.

Tabelle 35: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des ss mit anschließender RMD für c-(RGDf<sup>βL</sup>) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
ss1	1	92.8	92	126	85	8	98
ss2	3	69.9	93	97	58	5	75
		7.3	126	74	98	4	100
ss3	2	6.9	67	151	90	8	98
		77.5	118	131	59	4	69
		11.0	75	144	93	4	53
ss4	1	87.2	109	128	47	4	57
ss5	4	54.4	88	111	66	5	78
		21.6	103	149	78	7	141
		4.8	74	163	99	3	73
		4.8	96	117	92	5	88

Abbildung 52: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf<sup>βL</sup>) **7**.

Ein Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit den Referenzstrukturen zeigt eine eingeschränkte Übereinstimmung (siehe Tabelle 177). Abweichungen treten bei den Torsionswinkeln der Aminosäuren Arg und Gly auf. In diesem Bereich werden Rückgratkonformationen für die Torsionswinkel  $\psi(\text{Arg})$  und  $\varphi(\text{Gly})$  gefunden, die durch keine

Referenzstruktur repräsentiert werden. Hingegen wird für den Torsionswinkel  $\psi(\text{Gly})$  die Konformation einer Referenzstruktur nicht populiert.

Die Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulationen sind in Tabelle 177 zusammengefasst und korrelieren nur in geringem Umfang mit denen der Referenzstrukturen. Das H-Brückenmuster der Startstrukturen ss1 und ss5 entspricht eher denen der Referenznebenkonformationen. Die Startstrukturen ss2 bis ss4 enthalten in der Referenzstruktur entsprechendes H-Brückenmuster in geringer Population. Bei der Startstruktur ss5 ist zusätzlich die Bildung einer  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position mit etwas höherem Anteil von 2.6% zu beobachten.

### Systematische Suche mit SA (SS/SA)

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulationen nach einem zusätzlichen SA sind in Tabelle 36 zusammengefasst. Es ergeben sich für alle Startstrukturen hoch populierte Hauptkonformationen und bei dreien zusätzlich gering populierte Nebenkongformationen. Anhand der RMSD-Werte ist ersichtlich, dass auch hier die Struktur der Hauptkonformationen eher der zweiten Nebenkongformationen der Referenzstrukturen entspricht. Eine nennenswerte Ähnlichkeit zur Hauptkonformation der Referenzstrukturen ist nur bei der Startstruktur ss3 in gering populierte Clustern zu beobachten.

Tabelle 36: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS/SA mit anschließender RMD für c-(RGDF $^{\beta}$ L) 7.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
ss1	2	82.4	91	101	52	3	49
		8.0	141	89	108	7	133
ss2	1	95.2	114	128	54	5	68
ss3	3	77.6	94	93	60	5	61
		10.4	82	155	96	4	112
		4.8	94	160	93	6	77
ss4	2	88.0	97	92	60	4	56
		5.6	119	62	98	4	110
ss5	1	94.4	115	135	54	6	75

Durch das zusätzlich SA ist die Anzahl der Clusterfamilien gesunken. Die niedrigeren NOE-Verletzungen aller Startstrukturen würden die Bestimmung einer Vorzugskonformation ermöglichen, die jedoch aufgrund der hohen RMSD-Werte strukturell von dem Hauptkonformer der Referenzstrukturen deutlich abweicht.

Ein Vergleich der populierten Rückgratstorsionswinkel mit denen der Referenzstrukturen ist grafisch in Abbildung 53 dargestellt. Es sind Abweichung für die Torsionswinkel  $\psi(\text{Gly})$  und  $\psi(\beta\text{Ala})$  zu erkennen. Zusätzlich werden mit einem geringen Anteil negative Werte für  $\mu(\beta\text{Leu})$  gefunden. Die Korrelation mit den Referenzstrukturen ist im Vergleich zur ss-Methode etwas besser, zumal sich die Region um Arg und Gly durch das zusätzlich SA als weniger flexibel erweist.

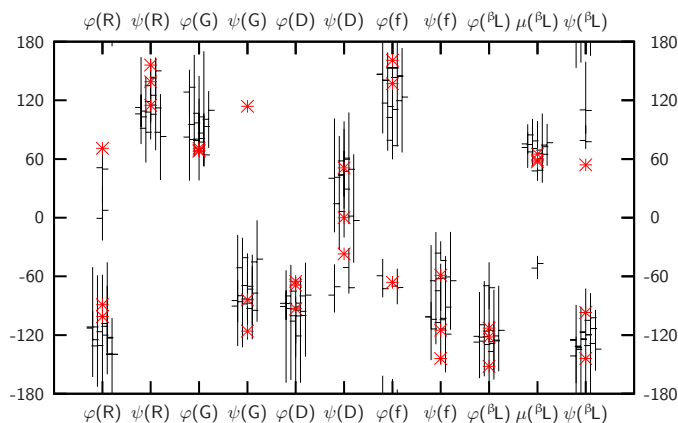


Abbildung 53: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss/sa-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGdf $^{\beta}$ L) 7.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD-Simulationen sind in Tabelle 178 zusammengefasst. Im Allgemeinen sind im Vergleich zur Referenzstruktur die Populationen wesentlich geringer. Jedoch ändert sich durch das zusätzliche SA die Konformation für alle Startstrukturen zugunsten der Hauptkonformation der Referenzstrukturen. Ein den Nebenkongformationen der Referenzstrukturen entsprechendes H-Brückenmuster tritt nur noch in geringen Anteilen auf. Zusätzlich kann in der ssa3-Trajektorie mit einem Anteil von 4.0% eine  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position beobachtet werden.



Die Vorzüge der zusätzlichen SA während der Konformationsanalyse mittels einer systematischen Durchsuchung des Konformationsraums sind anhand des Peptids **7** deutlich zu erkennen. Die NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen sinken, und anhand der H-Brückenmuster kann eine Übereinstimmung mit den Referenzhauptkonformationen gefunden werden.

#### 5.4.1.5 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-<sup>β</sup>Ala-) **8**

##### Systematische Suche (SS)

Durch Clustering der RMD-Simulationen können bei den Startstrukturen SS1, SS4 und SS5 hoch populierte Hauptkonformationen identifiziert werden (siehe Tabelle 37). Bei den Startstrukturen SS2 und SS3 sind die höchst populierte Clusterfamilien nur zur einem geringen Anteil der Trajektorie präsent, und eine eindeutige Hauptkonformation kann nicht festgelegt werden. Die RMSD-Werte und NOE-Verletzungen aller zentralen Strukturen sind sehr hoch, so dass von großen konformationellen Abweichungen zu den Referenzstrukturen ausgegangen werden kann.

Tabelle 37: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS mit anschließender RMD für C-(RGDIV<sup>β</sup>A) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2		
ss1	1	81.8	179	199	4	131
ss2	4	17.1	172	194	3	60
		6.0	209	225	6	228
		5.1	185	193	6	179
		5.0	213	236	5	148
ss3	3	44.8	170	187	3	70
		12.4	161	183	4	139
		7.4	178	185	6	204
ss4	2	67.3	179	201	4	142
		5.5	220	224	4	103
ss5	1	81.5	179	199	4	128

Die Rückgratstorsionswinkel während der RMD-Simulation weichen zum Teil deutlich von denen der Referenzstrukturen ab (siehe Abbildung 54). Die Torsionswinkel  $\psi(\text{Gly})$ ,  $\psi(\text{Asp})$  und  $\varphi(\beta\text{Ala})$  der Referenzstrukturen werden in der RMD nicht gefunden, und für den Torsionswinkel  $\psi(\beta\text{Ala})$  wird eine größere Streuung beobachtet. Die Analyse der Torsionswinkel bestätigt die von den RMSD-Werten abgeleiteten konformationellen Abweichungen. Es kann davon ausgegangen werden, dass keine zentrale Struktur konformationelle Ähnlichkeit zu einer der Referenzstrukturen besitzt.

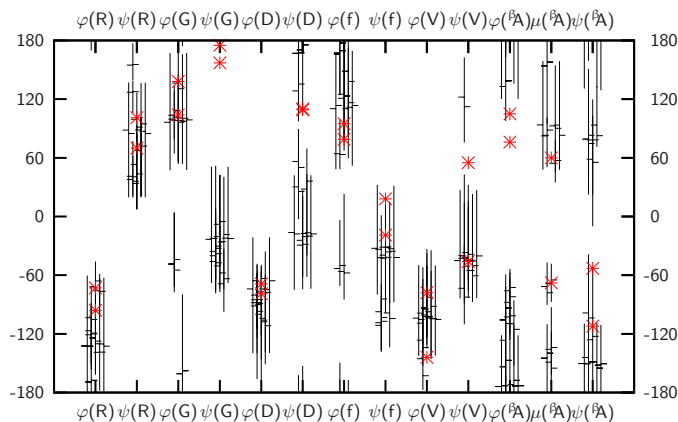


Abbildung 54: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV $\beta$ A) **8**.

Während aller RMD-Simulationen werden lediglich die Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung zweier  $\gamma$ -Schleifen um Asp und Arg populiert (siehe Tabelle 185). Die Bildung einer II- $\alpha_{\text{RS}}$ - oder  $\beta$ II-Schleife wird mit keiner Startstruktur beobachtet. Die ss-Methode führt im Vergleich zu den Referenzstrukturen zu anderen Konformationen, die aufgrund der geringen Populationen eine hohe Flexibilität besitzen. Eine Konformationsanalyse des Peptids **8** mit dieser Methode ist aufgrund eines inhomogenen Verhaltens schwierig bzw. unmöglich.

Systematische Suche mit SA (SS/SA)

Die Verwendung eines SA vor der RMD-Simulation verringert die NOE-Verletzungen aller zentralen Strukturen sehr deutlich (siehe Tabelle 38). Die Identifikation einer Hauptkonformation erweist sich weiterhin für die Startstrukturen SS2 und SS3 als schwierig, zumal niedrig populierte Clusterfamilien konformationelle Ähnlichkeiten zu den Referenzstrukturen besitzen oder keine NOE-Verletzungen besitzen. Erfolgversprechend ist die Startstruktur SS5, die geringe NOE-Verletzungen und eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Referenzstrukturen aufweist. Die Startstrukturen SS1 und SS4 zeigen während der RMD-Simulation keine Tendenz zur Ausbildung einer den Referenzstrukturen ähnlichen Struktur, obwohl ihre NOE-Verletzungen im Toleranzbereich liegen.

Im Vergleich zur SS-Methode ist die Korrelation der Rückgratstorsionswinkel mit denen der Referenzstrukturen besser (siehe Abbildung 55). Dennoch sind Abweichungen bei den Torsionswinkeln  $\psi(\text{Gly})$  und  $\psi(\text{Asp})$  zu beobachten. Die weite Streuung der Tor-

Tabelle 38: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des SS/SA mit anschließender RMD für c-(RGDFV<sup>β</sup>A) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum \text{NOE}$ [pm]
			k1	k2		
ss1	3	76.8	178	186	2	37
		5.6	180	181	4	88
		5.6	191	194	3	75
ss2	4	18.4	186	208	4	58
		17.6	196	209	2	51
		14.4	56	86	5	98
		5.6	211	217	0	0
ss3	4	36.0	163	169	2	43
		22.4	89	74	2	31
		8.0	169	173	3	38
		7.2	130	144	4	99
ss4	3	57.6	196	201	2	46
		9.6	199	213	2	67
		5.6	183	200	5	117
ss5	1	89.6	58	84	5	57

sionswinkel  $\psi(\text{Gly})$ ,  $\varphi(\text{Asp})$  und  $\psi(\text{Asp})$  während der RMD weist auf eine Flexibilität des Peptidrückgrats hin, die von den Referenzstrukturen nicht repräsentiert wird.

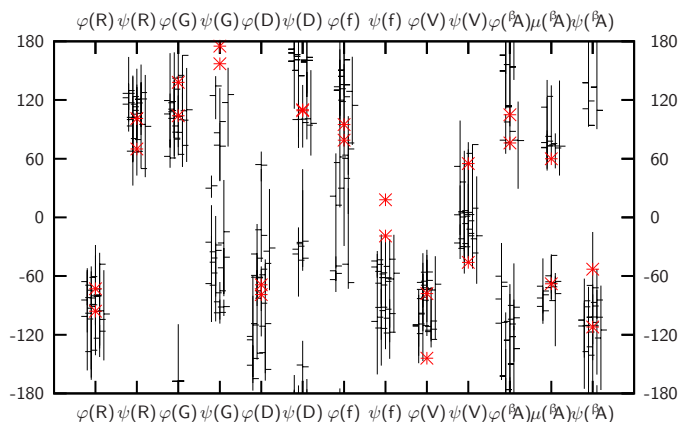


Abbildung 55: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der ss/sa-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIV <sup>$\beta$ A</sup>) **8**.

Die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulationen bestätigt die vorherigen Beobachtungen (siehe Tabelle 186). Mit den Startstrukturen ss1 und ss4 wird die II- $\alpha_{RS}$ - bzw.  $\beta$ II-Schleife mit Asp in  $i+1$  Position nicht populiert. Im Vergleich zu der ss-Methode sind die Populationen der H-Brücken noch geringer, und es kann keine konformationelle Korrelation zu den Referenzstrukturen gefunden werden. Im Gegensatz dazu kann bei den restlichen Startstrukturen der Einfluss des zusätzlichen SA direkt beobachtet werden. Die Startstruktur ss5 korreliert trotz geringerer Populationen der H-Brücken sehr gut mit den Referenzstrukturen. Bei den Startstrukturen ss2 und ss3 konnte durch das SA das lokale Minimum der Energiehyperfläche verlassen und so der Konformationsraum deutlich vergrößert werden. Zu einem geringen Anteil werden hier den Referenzstrukturen ähnliche Konformationen populiert. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der Clusteranalyse.

### 5.4.2 Distanzgeometrie als Strukturgenerator

Die Strukturanalyse mit einer DG und anschließender SA ist eine gängige Methode der NMR-Konformationsanalyse. Generiert wurden mit dieser Methode jeweils 1000 Strukturen, von denen die zentralen Strukturen des Rückgratstorsionswinkelclusterings der abschließenden RMD als Startstruktur zur Verfügung gestellt wurden. Zur Analyse der RMD wurden die in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Kriterien verwendet. Die DG/SA-Methode ist schematisch in Abbildung 56 dargestellt, und detaillierte Informationen zur Durchführung der Rechnungen sind im Kapitel 5.6 zu finden.

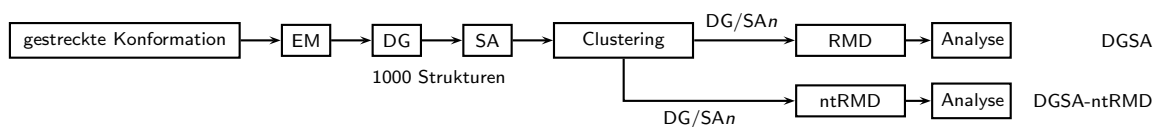


Abbildung 56: Schematische Darstellung der DG/SA-Methode ( $n \in \mathbb{N}$ ).

#### 5.4.2.1 cyclo-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) 4

##### DG/SA mit anschließender RMD

Das Clustering der mit DG/SA generierten 1000 Strukturen ergab einen Cluster mit einer Population von 95.9%, dessen zentrale Struktur als Startstruktur für die folgende RMD fungierte.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD sind in Tabelle 39 zusammenfasst. Die Hauptkonformation ist ausgesprochen hoch populiert, was auf eine hohe Stabilität und Qualität

Tabelle 39: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender RMD für c-(RGDIV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	2	76.0	88	5	86
		7.2	150	7	124

der Startstruktur hinweist. Zusätzlich sind der RMSD-Wert als auch die NOE-Verletzungen für die Hauptkonformation im Vergleich zu den anderen benutzten Methoden sehr gering.

Unterschiede zwischen der Referenzstruktur und der Hauptkonformation finden sich ausschließlich im Bereich der Peptidbindung zwischen Val und Arg, die bei der DG/SA-Konformation um ca.  $180^\circ$  gedreht ist (siehe Abbildung 57). Durch diese Drehung wird eine  $\gamma$ -Schleife um D-Phe gebildet. Des Weiteren findet sich eine  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position.

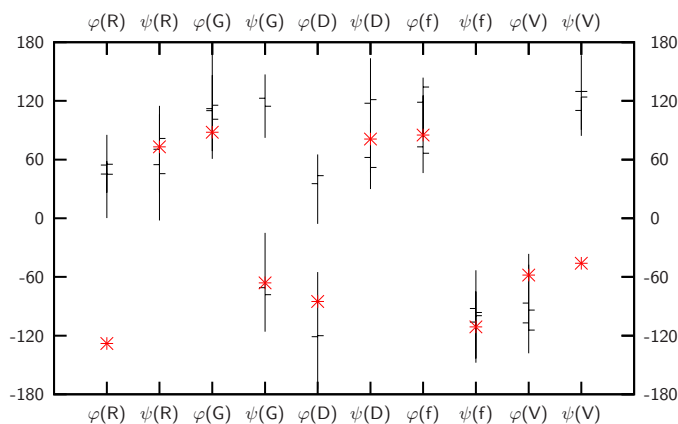


Abbildung 57: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGD)IV **4**.

Ein Vergleich der während der RMD populierten H-Brücken ist in Tabelle 155 zusammengefasst. Die Populationen der RMD-Trajektorie weichen allgemein deutlich von denen der Referenztrajektorie ab. Aufgrund der gedrehten Peptidbindung zwischen Val und Arg wird die  $\beta$ -schleifenstabilisierende H-Brücke zwischen Arg  $H^N$  und Asp O nicht ausgebildet. Die H-Brücke zur Stabilisierung der  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position ist mit 16.7% deutlich geringer populiert.

Die Methode kommt zwar zu einem eindeutigen Ergebnis, doch zeigt dieses eine veränderte Sekundärstruktur. Die Überlagerung der  $\beta$ II'-Schleife mit D-Phe in  $i+1$  Position durch eine  $\gamma$ -Schleife wird von Müller ebenfalls beobachtet, doch liegt diese Konformation dort nur zu einem sehr geringen Anteil vor.

DG/SA mit anschließender ntRMD

Als Variation dieser Methode wird die abschließende RMD-Simulation ohne zeitabhängige NOE-*restraints* durchgeführt. Die Ergebnisse der Clusteranalyse dieser ntRMD sowie die Auswertung der NOE-Verletzungen sind in Tabelle 40 zusammengefasst. Die Hauptkonformation ist wie bei der DG/SA-Methode hoch populiert und besitzt einen sehr geringen RMSD-Wert. Die Anzahl der positiven NOE-Verletzungen ist akzeptabel, jedoch werden einige *restraints* im Vergleich zur RMD-Simulation mit zeitabhängigen NOE-*restraints* bereits deutlich überschritten.

Tabelle 40: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender ntRMD für c-(RGDFV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	2	91.2	67	6	146
		8.0	120	5	139

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen beider Cluster sind grafisch in Abbildung 58 mit ihren Minimal- und Maximalwerten dargestellt. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur. Die Nebenkonformation weicht in den Torsionwinkeln  $\psi(\text{Gly})$  und  $\varphi(\text{Asp})$  von der Referenzkonformation ab.

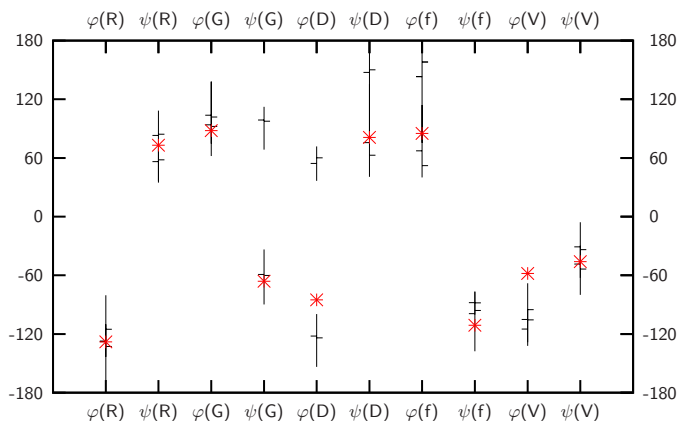


Abbildung 58: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-ntRMD-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV) 4.

Die Populationen der von Müller beobachteten H-Brücken in **4** sind in Tabelle 156 zusammen mit den während der ntRMD populierte zusammengefasst. Beide schleifenstabilisierenden Wasserstoffbrücken sind in ähnlichem Ausmaß populierte, jedoch werden keine Überlagerungen mit anderen von Müller postulierten Sekundärstrukturen beobachtet.

Da Müller ebenfalls zeitunabhängige NOE-*restraints* nutzte, ist die sehr gute Übereinstimmung der berechneten Daten mit denen der DG/SA-ntRMD-Methode nicht überraschend. Die Überlagerung der Sekundärstrukturelemente kann jedoch mit dieser Methode nicht nachvollzogen werden. Diese sind durch die Verwendung der zeitabhängigen *restraints* eher zu beobachten, doch zeigt die Konformationsanalyse mit der DG/SA-Methode, dass die Startkonformation anscheinend in einem lokalen Minimum gefangen ist.

#### 5.4.2.2 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) **5**

##### DG/SA mit anschließender RMD

Die Clusteranalyse der 1000 mit DG/SA generierten Strukturen ergab insgesamt neun Clusterfamilien, von denen die zentralen Strukturen der fünf höchst populierte mit Populationen von 19.8% (DG/SA1), 15.6% (DG/SA2), 12.9% (DG/SA3), 11.0% (DG/SA4) und 8.1% (DG/SA5) als Startstrukturen verwendet wurden.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulation nach der Generierung von Startstrukturen nach der DG/SA-Methode sind in Tabelle 41 zusammengefasst. Mit allen Startstrukturen wird ein hoch populierte Cluster erhalten, der geringe NOE-Verletzungen aufweist. Die RMSD-Werte der Strukturen DG/SA1 und DG/SA3 lassen eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur vermuten, während die Strukturen DG/SA2 und DG/SA4 deutlichere Abweichungen zeigen. Die Nebenkongformationen werden nur in geringem Umfang populierte und besitzen zum Teil unbefriedigende NOE-Verletzungen.

Die populierte Rückgratstorsionswinkel der RMD-Simulation sind zum Vergleich mit der Referenzstruktur in Abbildung 59 grafisch dargestellt. Die Referenzwerte korrelieren mit Ausnahme der Startstruktur DG/SA2 sehr gut mit den gemessenen Werten. Die Startstruktur DG/SA2 weicht bei den Torsionswinkeln im Bereich zwischen Gly und D-Phe



Tabelle 41: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender RMD für c-(RGDVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	4	60.0	73	2	53
		6.4	104	2	36
		4.8	106	4	233
		4.8	93	4	89
DG/SA2	1	88.8	144	3	24
DG/SA3	4	62.2	54	2	52
		5.6	126	3	56
		4.8	88	3	106
		4.8	70	3	55
DG/SA4	3	64.0	105	3	57
		8.8	86	5	162
		4.8	77	3	68
DG/SA5	3	70.4	87	2	48
		6.4	128	4	89
		5.6	85	4	121

deutlich von den Referenzdaten ab. Grund hierfür ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptidrückgrat und der Asp Seitenkette, so dass Gly-2 die  $i+1$  Position einer  $\beta$ I-Schleife einnimmt.

Die relevanten Wasserstoffbrücken während der RMD sind zum Vergleich mit den Referenzdaten in Tabelle 163 zusammengefasst. Die  $\beta/\beta$ -Schleifenstruktur der Referenzstruktur ist bei allen Startstrukturen mit Ausnahme der Struktur DG/SA2 deutlich zu erkennen. Die Tendenz zur Bildung einer  $\gamma$ -Schleife mit Gly-2 in zentraler Position ist gegenüber der postulierten Struktur etwas erhöht, was an der Verwendung von zeitabhängigen NOE-*restraints* liegen kann.

Die Startstruktur DG/SA2 weicht in ihren Torsionswinkeln  $\varphi$  und  $\psi$  als auch im Wasserstoffbrückenmuster deutlich von der Referenzstruktur ab. Aufgrund der geringen NOE-Verletzungen kann sie als zusätzliche Struktur behandelt werden, die im Gleichgewicht mit der Referenzstruktur ist.

Die DG/SA-Methode zeigt klar die Dominanz des  $\beta/\beta$ -Schleifenmusters für **5** in Lösung für die Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA3 bis DG/SA5. Darüber hinaus erzeugt sie

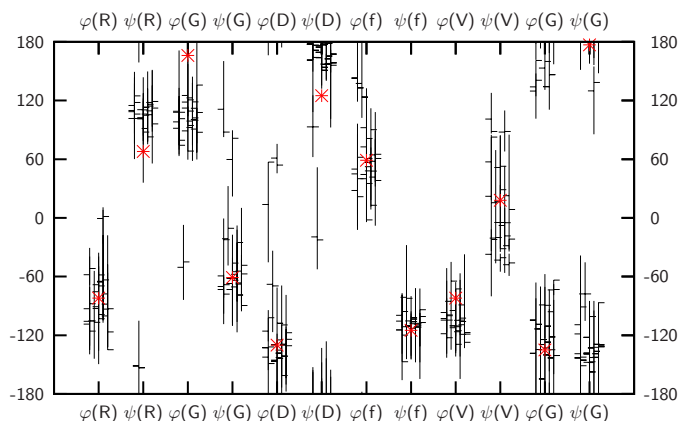


Abbildung 59: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIVG) 5.

jedoch auch andere Konformationen, die durchaus plausibel erscheinen. Es kann daraus geschlossen werden, dass der Konformationsraum mit dieser Methode recht gut erschlossen wird und eine ausreichende Menge Konformationen, die die experimentellen Randbedingungen erfüllen, zur Verfügung gestellt werden.

#### DG/SA mit anschließender ntRMD

Die Verwendung der zeitunabhängigen NOE-*restraints* während der RMD-Simulation verändert die Ergebnisse der Clusteranalyse und verringert die Populationen der Hauptkonformationen bei den Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA2 (siehe Tabelle 42). Die Anzahl und Summe der NOE-Verletzungen wird erstaunlicherweise bei allen Konformationen geringer, jedoch treten bei den Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA2 sehr hohe RMSD-Werte auf. Die restlichen Startstrukturen besitzen ausgehend von den RMSD-Werten im Vergleich zur Referenzstruktur ähnliche zentrale Clusterstrukturen.

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel zeigt für die Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA2 Abweichungen im Bereich zwischen Gly-2 und D-Phe (siehe Abbildung 60). Hingegen korrelieren die Startstrukturen DG/SA3 bis DG/SA5 sehr gut mit den Torsionswinkeln der Referenzstruktur. Bei der Verwendung dieser Startstrukturen wird mit hohem

Tabelle 42: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender ntRMD für c-(RGDIVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	3	45.6	155	1	12
		26.4	183	3	56
		12.8	167	2	40
DG/SA2	2	55.2	148	2	18
		35.2	179	3	50
DG/SA3	2	84.8	85	2	57
		9.6	115	2	69
DG/SA4	1	81.6	64	2	53
DG/SA5	2	78.4	74	2	48
		16.0	81	2	45

Anteil ein  $\beta/\beta$ -Schleifenmuster während der RMD-Simulation bebildet. Die Konformationen der zentralen Clusterstrukturen mit den Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA2 sind äußerst verzerrt. Während der ntRMD-Simulation der Struktur DG/SA1 werden bevorzugt  $\gamma$ -Schleifen mit Arg oder Gly-6 in zentraler Position gebildet. Die Startstruktur DG/SA2 enthält während der ntRMD-Simulation bevorzugt  $\beta$ I- oder  $\beta$ VIII-Schleifen mit Gly-2 in  $i+1$  Position.

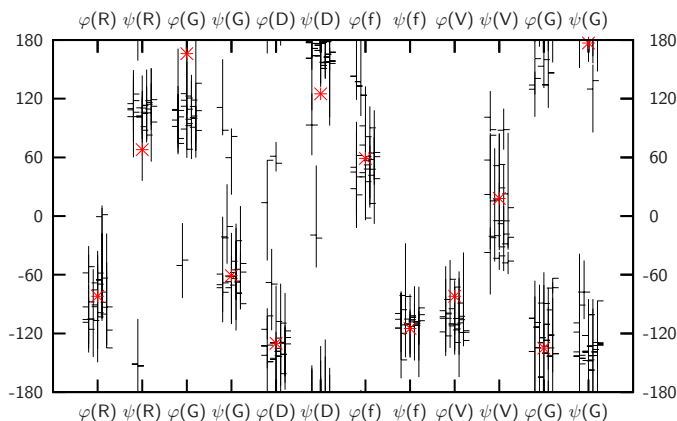


Abbildung 60: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-ntRMD-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIVG) **5**.

Die Population der H-Brücken während der ntRMD-Simulation ist in Tabelle 164 zusammengefasst, deren Analyse für die Startstrukturen DG/SA3 bis DG/SA5 ein  $\beta/\beta$ -Schleifenmuster ergibt. Die  $\beta$ -Schleifen sind sehr hoch populiert und werden teilweise von  $\gamma$ -Schleifen überlagert. Dies korreliert sehr gut mit der Referenzstruktur. Die Startstrukturen DG/SA1 und DG/SA2 enthalten hingegen keine von Müller postulierten Schleifen und sind stark verzerrt. Aufgrund der äußerst geringen NOE-Verletzungen sind es dennoch sinnvolle Strukturvorschläge, die bei einer Konformationsanalyse berücksichtigt werden sollten. Diese zusätzlich gefundenen Konformationen zeigen das Potential der Distanzgeometrie bei der Durchsuchung des Konformationsraums im Vergleich zu der von Müller gewählten kurzen MD-Simulation bei hoher Temperatur.

#### 5.4.2.3 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- $\beta$ Ala-) **6**

##### DG/SA mit anschließender RMD

Die 1000 mit DG/SA generierten Strukturen ergeben durch Clustering nach Rückgrats-torsionswinkel sieben Cluster mit Anteilen von 29.7%, 24.7%, 16.3%, 13.3%, 5.6%, 4.7% und 3.8%. Die zentralen Strukturen der vier höchst populierten Clusterfamilien wurden als Startstrukturen (DG/SA1 bis DG/SA4) für die RMD verwendet. Als Sekundärstrukturelement kann bei den beiden höchst populierten Konformationsfamilien eine  $\gamma$ -Schleife mit Arg in zentraler Position festgestellt werden. Die nächsten beiden Clusterfamilien enthalten keine definierten Sekundärstrukturen. Die Durchsuchung des Konformationsraums mit einer reinen DG-Rechnung erscheint für **6** zunächst effektiv.

Wie bereits im Abschnitt 5.4.1.3 beschrieben, kann für das Peptid **6** keine Hauptkonformation beobachtet werden. Deshalb ist eine Berechnung von RMSD-Werten nicht möglich.

Die anschließende RMD-Simulation mit den zentralen Strukturen der DG-Rechnung als Basis ergibt eine Vielzahl an Clusterfamilien, deren jeweilige Hauptkonformation gering populiert ist. Die Bestimmung einer Vorzugskonformation in Lösung ist anhand dieser Ergebnisse nicht möglich und zeigt klar die Flexibilität von **6**. Alle zentralen Strukturen der gebildeten Cluster weisen geringe NOE-Verletzungen auf (siehe Tabelle 43), so dass die Sekundärstruktur von **6** nicht mit einer einzelnen Struktur sinnvoll ist.

Tabelle 43: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender RMD für c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	5	48.0	1	9
		17.6	4	85
		10.4	3	13
		7.2	3	55
		4.8	3	61
DG/SA2	5	41.6	3	23
		20.0	4	47
		10.4	5	47
		4.8	3	77
		4.8	6	29
DG/SA3	3	57.6	3	18
		19.2	2	60
		6.4	5	56
		6.4	3	54
DG/SA4	7	24.8	3	26
		13.6	3	52
		9.6	2	21
		6.4	5	88
		6.4	5	52
		6.4	3	54
		6.4	2	33

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel zeigt eine Variabilität der Torsionswinkel im Bereich der Aminosäuren Asp, D-Phe und <sup>β</sup>Ala, während die RGD-Sequenz konserviert erscheint (siehe Abbildung 61). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Schumann gemacht. In ebenfalls guter Korrelation werden bevorzugt  $\gamma$ -Schleifen mit jeder Aminosäure in zentraler Position und unterschiedlichen Populationen gefunden.

Das Wasserstoffbrückenmuster ändert sich mit jeder Startstruktur, die bei der Analyse berücksichtigt werden sollte, da die DG-Rechnung jede mit annähernd gleicher Population generiert hat. Das Problem der subjektiven Auswahl einzelner energetisch relevanter Konformationen, wie bei der systematischen Durchsuchung des Konformationsraums wird durch die DG-Rechnung ausgeschlossen. In Tabelle 171 sind die Populationen der H-Brücken während der RMD zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass eine  $\gamma$ -Schleife

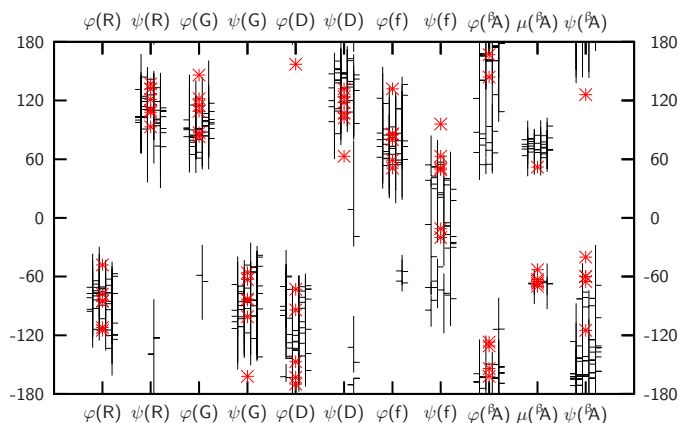


Abbildung 61: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für  $c\text{-}(\text{RGDF}^{\beta})$  **6**.

mit Arg oder Asp in zentraler Position seltener gebildet wird. Die  $\gamma$ -Schleifen um D-Phe und Gly sind favorisiert, doch fluktuiert deren Anteil an der Trajektorie.

Die DG/SA-Methode liefert für die Konformationsanalyse von **6** sehr gute Ergebnisse, die in Einklang mit den von Schumann gemachten Beobachtungen stehen. Die berechneten Cluster werden annähernd gleich populiert und die zentralen Strukturen besitzen niedrige NOE-Verletzungen, so dass eine eindeutige Strukturauswahl nicht möglich ist.

#### DG/SA mit anschließender ntRMD

Die Verwendung von zeitunabhängigen NOE-*restraints* während der RMD-Simulation ergibt im Vergleich zur vorherigen Prozedur deutlich höhere Populationen der Hauptkonformationen, während die NOE-Verletzungen der zentralen Clusterstrukturen sinken (siehe Tabelle 44).

Die Population der Rückgratstorsionswinkel der ntRMD-Simulation sind denen der RMD-Simulation bei der DG/SA-Methode sehr ähnlich (siehe Abbildung 62). Lediglich geringe Variationen und verkleinerte Abweichungen treten auf, die in der Stringenz der *restraints* bei der ntRMD-Rechnung ihre Begründung finden.

Tabelle 44: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender ntRMD für c-(RGDf<sup>βA</sup>) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
DG/SA1	4	34.4	2	10
		24.0	2	11
		5.6	2	26
		4.8	1	9
DG/SA2	3	72.0	2	23
		6.4	3	35
		4.8	3	49
DG/SA3	3	56.8	1	8
		8.8	3	17
		5.6	3	70
DG/SA4	3	39.2	4	59
		27.2	2	61
		20.8	2	58

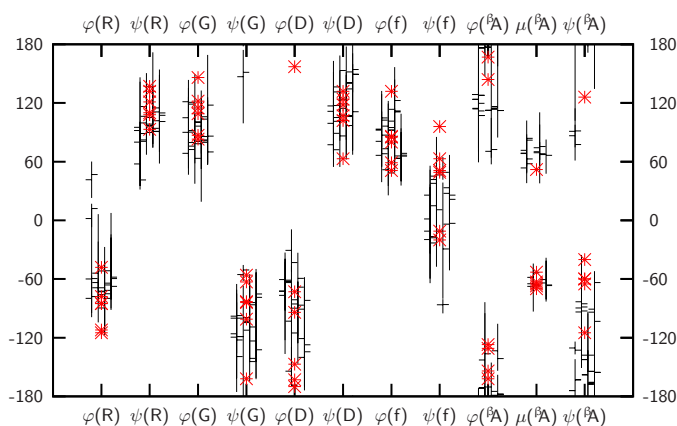


Abbildung 62: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-ntRMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf<sup>βA</sup>) **6**.

Die Populationen der H-Brücken während der ntRMD sind analog zu denen der RMD (siehe Tabelle 172). Die  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position wird etwas geringer populiert, während die um Asp mit einer Startstruktur (DG/SA1) einen höheren Anteil

besitzt. Die zeitunabhängigen *restraints* haben für **6** nur einen geringen Einfluss auf die Konformationsanalyse, führen jedoch zu einer deutlich stärkeren Population einzelner Clusterfamilien.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Distanzgeometrie eine große strukturelle Variabilität generiert, so dass mit dieser Methode auch sehr flexible Moleküle konformationell erfasst werden können. Die NOE-Verletzungen sind für alle Strukturen niedrig, und in Verbindung mit den annähernd gleichen Populationen der Cluster unterstreichen sie die Konformationsvielfalt von **6**.

#### 5.4.2.4 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- $\beta$ Leu-) **7**

##### DG/SA mit anschließender RMD

Die Clusteranalyse der 1000 durch DG/SA generierten Strukturen ergibt zwei Clusterfamilien mit Populationen von 92.2% (DG/SA1) bzw. 5.4%. Zur weiteren Analyse wurde die Nebenkongformation aufgrund der geringen Population nicht berücksichtigt.

Die Clusteranalyse der RMD-Simulation von DG/SA1 ergab die in Tabelle 45 zusammengefassten Werte. Neben einer mit 72.8% populierten Hauptkongformation wird eine Nebenkongformation mit einem Anteil von 20.0% populiert. Die RMSD-Werte deuten darauf hin, dass die zentrale Struktur des höchst populierten Clusters einer Nebenkongformation der Referenzstrukturen entspricht. Die zentrale Struktur der Nebenkongformation entspricht konformationell der Hauptkongformation der Referenzstrukturen. Die NOE-Verletzungen sind im Vergleich zu anderen Methoden gering.

Tabelle 45: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender RMD für c-(RGDF $\beta$ L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
DG/SA1	2	72.8	107	129	48	4	62
		20.0	64	143	82	6	73



Ein Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit den Referenzstrukturen zeigt eine recht gute Übereinstimmung (siehe Abbildung 63). Abweichungen treten bei den Torsionswinkeln  $\psi(\text{Gly})$  und  $\varphi(\text{D-Phe})$  auf. Der Torsionswinkel  $\mu(\beta\text{Leu})$  besitzt während der RMD ausschließlich positive Werte, was mit den Referenzstrukturen übereinstimmt.

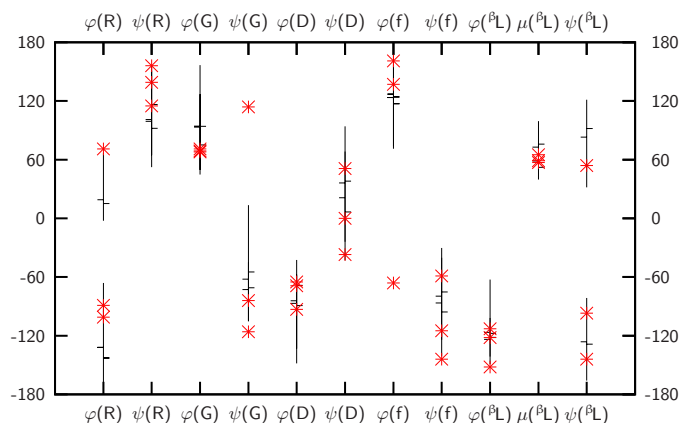


Abbildung 63: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf $^{\beta}$ L) 7.

Die Population der H-Brücken während der RMD-Simulation ist deutlich geringer, als bei den Referenzstrukturen beobachtet wurde (siehe Tabelle 179). Dennoch ist eine klare Präferenz zur Ausbildung der durch die Referenzstrukturen beschriebenen Hauptkonformation zu erkennen. Die H-Brücken der Nebenkongformationen werden in Bezug auf eine  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position in geringerem Maße gebildet. Die Dominanz der Hauptkonformation wird mit dieser Methode klar ersichtlich, während die zusätzlich gefundene Nebenkongformation die Dynamik des System widerspiegelt.

#### DG/SA mit anschließender ntRMD

Der Einfluss der zeitunabhängigen NOE-*restraints* wird durch die Clusteranalyse der ntRMD-Simulation deutlich (siehe Tabelle 46). Fast die gesamte Trajektorie wird durch eine Clusterfamilie repräsentiert, deren zentrale Struktur geringe NOE-Abweichungen

besitzt. Aufgrund der RMSD-Werte wird eine größere Ähnlichkeit zur zweiten Nebenkonformation der Referenzstrukturen erwartet. Da die RMSD-Werte zu allen Referenzstrukturen gering sind, kann die zentrale Clusterstruktur auch eine Übergangskonformation zwischen jenen darstellen.

Tabelle 46: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender ntRMD für c-(RGDf<sup>β</sup>L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	∑NOE [pm]
			k1	k2	k3		
DG/SA1	1	94.4	88	93	64	3	55

Ein Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit denen der Referenzstrukturen ist grafisch in Abbildung 64 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nicht alle Torsionswinkel entsprechend der Referenzstrukturen populiert werden. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür ist der durch die zeitunabhängigen *restraints* eingeschränkte Konformationsraum während der RMD. Dennoch werden alle gefundenen Rückgratstorsionswinkel auch in den Referenzstrukturen gefunden.

Das Wasserstoffbrückenmuster korreliert mit der Hauptkonformation der Referenzstruk-

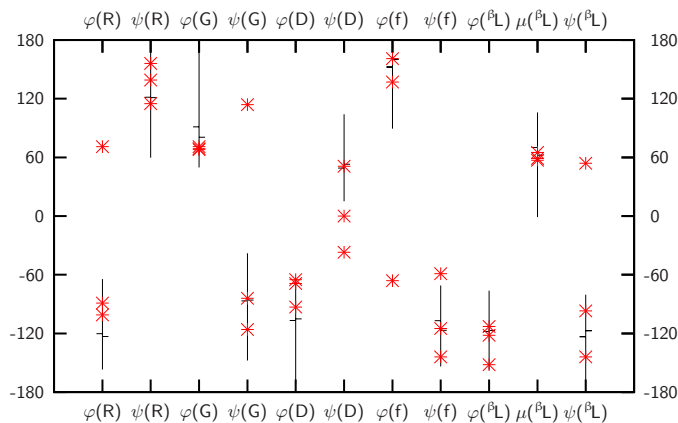


Abbildung 64: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-ntRMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf<sup>β</sup>L) **7**.

turen (siehe Tabelle 180), jedoch mit deutlich geringerem Anteil an der Trajektorie. Durch die Verwendung der zeitunabhängigen *NOE-restraints* wird die bei anderen Methoden populierte  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position nicht mehr beobachtet. Zusätzlich sinkt der Anteil der in den Nebenkongformationen der Referenzstruktur gebildeten Wasserstoffbrücken.

Die Verwendung von zeitunabhängigen *NOE-restraints* während der RMD-Simulation von **7** schränkt die Freiheitsgrade des Systems deutlich ein und führt zu einer Verzerrung der Struktur. Durch die enthaltenen Aminosäuren Gly und  $\beta$ Leu ist das Rückgrat dieses Peptids flexibel. Dies ist bei der Verwendung von zeitabhängigen *restraints* zu beobachten, jedoch nicht bei dieser Analyseverfahren.

#### 5.4.2.5 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **8**

DG/SA mit anschließender RMD

Das Clustering der mit DG/SA generierten 1000 Strukturen ergibt insgesamt sieben Clusterfamilien. Eine Hauptkongformation mit einer Population von 31.9% wird gefunden. Die Populationen der Nebenkongformationen betragen 6.3%, 4.7%, 4.7%, 4.5%, 3.9% und 3.9%. Für die weitere Kongformationsanalyse wurde ausschließlich die Hauptkongformation als Startstruktur verwendet.

Tabelle 47: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender RMD für c-(RGD $\beta$ Ala) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2		
DG/SA1	1	99.2	49	85	5	115

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulation sowie die Analyse der NOE-Verletzungen sind in Tabelle 47 zusammengefasst. Während der Simulation liegt im Wesentlichen nur eine Kongformation mit einem Anteil von 99.2% vor. Die RMSD-Werte der zentralen Clusterstrukturen deuten auf eine hohe Ähnlichkeit der Rückgratsatomkoordinaten im Vergleich zu den Referenzstrukturen hin. Die gefundene zentrale Struktur

repräsentiert beide Referenzstrukturen in annähernd gleicher Qualität. Während der gesamten Simulationsdauer treten fünf NOE-Verletzungen mit einer Summenabweichung von 115 pm auf, welche im Vergleich zu anderen Methoden etwas höher, doch durchaus akzeptabel sind.

Die Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstruktur sind grafisch in Abbildung 65 im Vergleich zu den Referenzstrukturen dargestellt. Die Konformation korreliert sehr gut mit der Hauptkonformation der Referenzstrukturen. Eine Population negativer Torsionswinkel  $\mu$  von  $\beta$ Ala wird während der RMD nicht beobachtet.

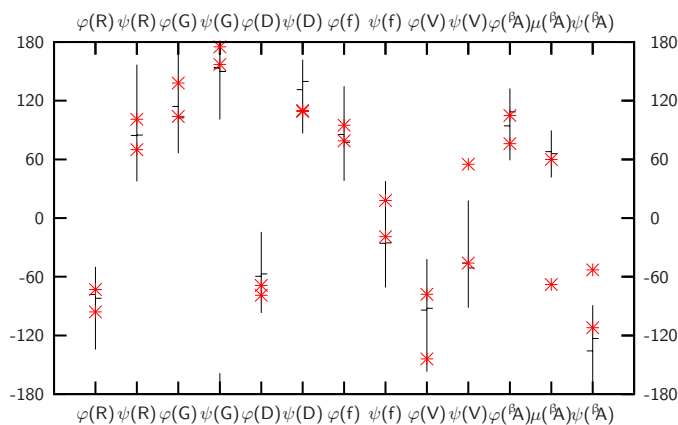


Abbildung 65: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV $\beta$ A) **8**.

Die Analyse der H-Brücken ergibt eine klare Präferenz zur Bildung einer II- $\alpha_{RS}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position, die von einer  $\beta$ II-Schleife überlagert wird. Dies korreliert sehr gut mit den Beobachtungen von Schumann. Leichte Abweichungen ergeben sich aufgrund der geringeren Tendenz zur Bildung einer  $\gamma$ -Schleife um Asp. Der II- $\alpha_{RS}$ -Schleife gegenüberliegend kann eine  $\gamma$ -Schleife mit Arg in zentraler Position gefunden werden, die im Vergleich zu den Referenzstrukturen deutlich häufiger durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird.

Die DG/SA-Methode ergibt einen Strukturvorschlag, der sich als äußerst stabil erweist und sehr gut mit den Referenzstrukturen korreliert. Negative Werte für den Torsionswin-

kel  $\mu$  von  $^{\beta}\text{Ala}$  werden nicht populiert, jedoch könnte dies gegebenenfalls mit einer Analyse der Nebenkongformation nach der Startstrukturgenerierung beobachtet werden.

#### DG/SA mit anschließender ntRMD

Die Verwendung einer ntRMD-Simulation anstatt einer RMD führt zu den in Tabelle 48 zusammengefassten Ergebnissen. Analog zur RMD findet sich eine hoch populierte Clusterfamilie, deren zentrale Struktur große konformationelle Ähnlichkeit zur Hauptkongformation der Referenzstrukturen besitzt. Der RMSD-Wert zur Nebenkongformation ist etwas höher und deutet aufgrund seines Betrags die Ausrichtungsumkehr einer Peptidbindung an. Die NOE-Verletzungen sind im Vergleich zur RMD-Simulation etwas geringer und im Toleranzbereich.

Tabelle 48: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des DG/SA mit anschließender ntRMD für c-(RGDFV $^{\beta}\text{A}$ ) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2		
DG/SA1	1	90.4	49	94	4	96

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel ergibt keine ausgeprägten Änderungen im Vergleich zur DG/SA-Methode (siehe Abbildung 66). Die Torsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der Referenzhauptkongformation werden auch während der ntRMD populiert und sind in den zentralen Clusterstrukturen zu finden. Auch hier werden negative Werte des Torsionswinkels  $\mu$  von  $^{\beta}\text{Ala}$  nicht populiert. Da auch Schumann eine ntRMD-Simulation verwendete, ist diese Abweichung von den Referenzstrukturen eher durch die verwendete Startstruktur bedingt. Die Nebenkongformation nach der Strukturgenerierung durch DG sollte hier ebenfalls berücksichtigt werden.

In Tabelle 188 sind die Populationen der Wasserstoffbrücken während der ntRMD-Simulation zusammengefasst. Die II- $\alpha_{\text{RS}}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position ist zu bemerkenswerten 87.8% im Vergleich zur RMD höher populiert, der Anteil der überlagernden  $\beta$ II-Schleife verringert sich. Die  $\gamma$ -Schleife um Asp wird während der ntRMD nicht po-

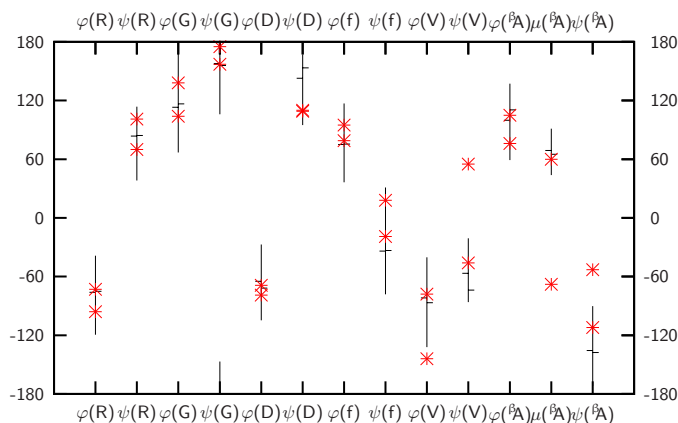


Abbildung 66: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der DG/SA-ntRMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV) $\beta$ A **8**.

puliert. Diese Ergebnisse korrelieren weitgehend mit den Referenzstrukturen und zeigen klar die Präferenz zur Bildung einer II- $\alpha_{RS}$ -Schleife.

Die Verwendung einer ntRMD-Simulation anstatt einer RMD zur Konformationsanalyse des Peptids **8** verändert den Strukturvorschlag in keiner Weise. Die Populationen der H-Brücken weichen leicht voneinander ab, doch kann dies durch die Verwendung der zeitunabhängigen NOE-*restraints* erklärt werden.

### 5.4.3 Erzeugung der Startstrukturen durch *Simulated annealing*

Das *simulated annealing* ist nicht der ideale Algorithmus zur Erfassung des gesamten Konformationsraums, doch besitzt er aufgrund der parallelen Anwendung experimenteller Randbedingungen Vorteile gegenüber einer systematischen Suche. Es werden zwei verschiedene Arten des SA eingesetzt, das *ab initio* und das *random* SA. Es wird erwartet, dass der Konformationsraum vom letzterem besser durchsucht als von ersterem. Jeweils 1000 Strukturen werden generiert, die anschließend durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkel analysiert werden. Die zentralen Strukturen der Clusterfamilien dienen als Startstruktur der nachfolgenden RMD-Simulation. Zur Analyse der RMD-Trajektorien werden die in Abschnitt 5.4 beschriebenen Kriterien verwendet. Die *ab initio* und *random*

SA-Methode sind schematisch in Abbildung 67 dargestellt. Informationen zur Durchführung der Rechnungen sind im Kapitel 5.6 zu finden.

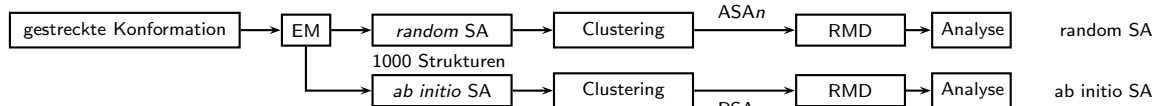


Abbildung 67: Schematische Darstellung der *ab initio* und *random SA*-Methode ( $n \in \mathbb{IN}$ ).

### 5.4.3.1 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **4**

#### *ab initio* SA

Durch das *ab initio* SA wurde eine Clusterfamilie mit einem Anteil von 99.7% generiert, deren zentrale Struktur als Startstruktur für die RMD fungierte. Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Trajektorie und die Korrelation der zentralen Strukturen mit den NOE-restraints sind in Tabelle 49 zusammengefasst. Während der RMD scheint eine stabile Konformation von **4** vorzuliegen, die sporadisch eine minder populierte Nebenkonformation einnimmt. Die NOE-Verletzungen beider Strukturen sind vergleichbar, doch die RMSD-Werte deuten auf eine bessere Übereinstimmung der Referenzstruktur mit der Nebenkonformation hin.

Tabelle 49: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *ab initio* SA mit anschließender RMD für c-(RGDIV) **4**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
ASA1	2	82.4	95	5	80
		10.4	63	5	90

Die Korrelation der Rückgratstorsionswinkel erscheint auf den ersten Blick sehr gut (siehe Abbildung 68), doch nimmt nur die Nebenkonformation mit einer Population von 10.4% eine  $\beta$ II'/ $\gamma$ -Konformation analog zur Referenzstruktur ein. Die Hauptkonformation weist Abweichungen durch die Drehung der Peptidbindung zwischen Val und Arg auf. Aus diesem Grund sind die Populationen der H-Brücken während der RMD ebenfalls

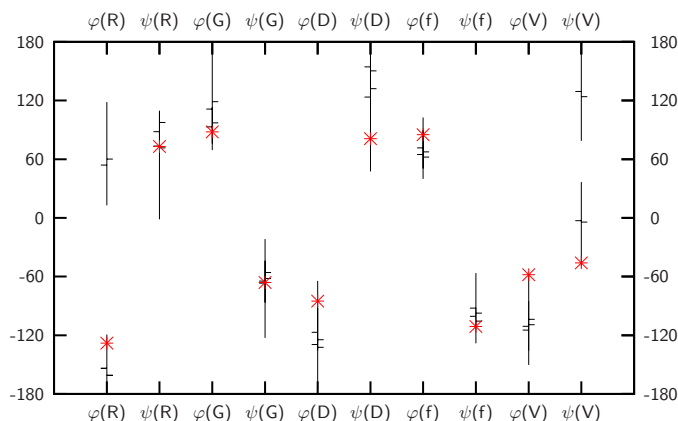


Abbildung 68: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *ab initio* SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDV) 4.

weitaus geringer als die von Müller berechneten (siehe Tabelle 157). Einzig die  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position tritt als auffälliges Strukturmerkmal auf.

#### *random SA*

Durch das *random SA* werden zwei Clusterfamilien mit Populationen von 95,4% und 3,5% generiert. Im Folgenden wird nur die zentrale Struktur des höchst populierten Clusters berücksichtigt.

Die Clusteranalyse und Analyse der NOE-Verletzungen der RMD-Trajektorie sind in Tabelle 50 zusammengefasst. Es werden drei Clusterfamilien ermittelt, von denen eine mit 80% dominant ist. Die Haupt- und erste Nebenkongformationen weisen geringere NOE-Verletzungen als die niedrigst besetzte Nebenkongformation auf. Die RMSD-Werte verhalten sich hierzu entgegengesetzt. Die zweite Nebenkongformationen deutet auf eine gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur aufgrund des geringen RMSD-Werts hin, besitzt jedoch hohe NOE-Verletzungen.

Die Rückgratstorsionswinkel zeigen eine weitgehend gute Korrelation mit der Referenzstruktur (siehe Abbildung 69). Die Haupt- und erste Nebenkongformation weichen jedoch



Tabelle 50: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *random* SA mit anschließender RMD für c-(RGDV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
RSA1	3	80.0	100	7	91
		6.4	140	6	127
		5.6	55	6	176

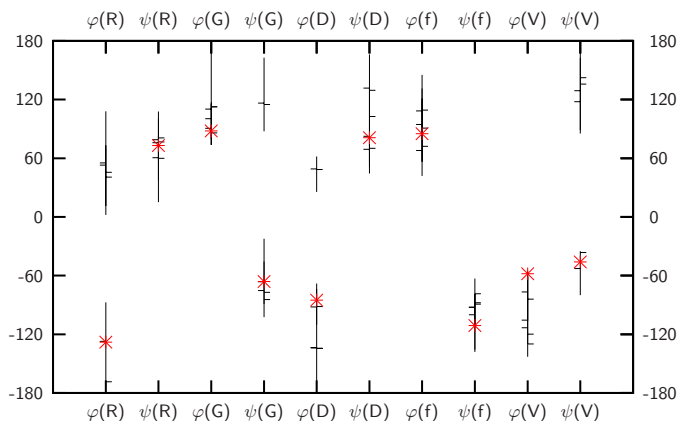


Abbildung 69: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *random* SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDV) 4.

durch eine Drehung der Peptidbindung zwischen Val und Arg von der Referenzstruktur ab, so dass die  $\beta$ -schleifenstabilisierende H-Brücke nur zu 0.9% der Trajektorie gebildet wird (siehe Tabelle 158). Klar ersichtlich ist sowohl bei den Torsionswinkeln als auch den Wasserstoffbrückenpopulationen die Ausbildung einer  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position. Die H-Brücken der Referenzstruktur, die durch Überlagerung der primären Sekundärstrukturelemente auftreten, sind auch mit dieser Methode nicht zu beobachten.

Auch die Nutzung der *ab initio*- und *random* SA-Methode zeigt eine hohe Dynamik der Region zwischen Val und Arg, so dass die postulierte Hauptkonformation der Referenzstruktur so gut wie nie beobachtet wird. Diese wird mit beiden Methoden in nur geringem Umfang ausgebildet, weshalb statistische Analysen der H-Brückenbindungen

über die gesamte Trajektorie nicht aussagekräftig sind und die publizierten Werte nicht reproduzierbar sind.

### 5.4.3.2 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) **5**

#### *ab initio* SA

Das Clustering nach Rückgratstorsionswinkel der 1000 mit *ab initio* SA generierten Strukturen ergibt insgesamt neun Cluster. Die fünf höchst populierten Clusterfamilien mit Anteilen von 19.4% (ASA1), 17.5% (ASA2), 15.1% (ASA3), 10.8% (ASA4) und 9.8% (ASA5) werden bei der weiteren Analyse berücksichtigt.

Das Clustering der RMD-Simulation nach dem *ab initio* SA ergibt die in Tabelle 51 zusammengefassten Clusterfamilien. Mit Ausnahme der Strukturen ASA2 und ASA3 können hoch populierte Hauptkonformere beobachtet werden, die bei den Konformationen ASA1 und ASA4 gut mit der Referenzstruktur übereinstimmen. Die zentralen Strukturen der Clusterfamilien weisen insbesondere für die Nebenkongformationen recht große NOE-

Tabelle 51: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *ab initio* SA mit anschließender RMD für c-(RGDVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
ASA1	2	62.4	57	2	55
		5.6	83	5	121
ASA2	3	28.0	123	1	7
		24.8	66	3	61
		7.2	114	3	62
ASA3	4	42.4	106	3	40
		20.0	86	1	33
		11.2	95	3	45
		7.2	130	4	93
ASA4	2	76.0	52	2	43
		8.0	93	5	236
ASA5	3	68.8	100	2	54
		6.4	115	5	126
		5.6	109	5	282

Verletzungen auf. Diese sind jedoch für die jeweiligen Hauptkonformationen durchaus akzeptabel.

Der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel ergibt für die Startstrukturen ASA2 und ASA3 Abweichungen bei den Winkeln  $\psi(\text{Asp})$  und  $\varphi(\text{D-Phe})$  sowie für ASA3 zusätzlich bei  $\varphi(\text{Arg})$ . Die übrigen Startstrukturen zeigen eine geringe Streuung und korrelieren recht gut mit den Torsionswinkeln der Referenzstruktur (siehe Abbildung 70).

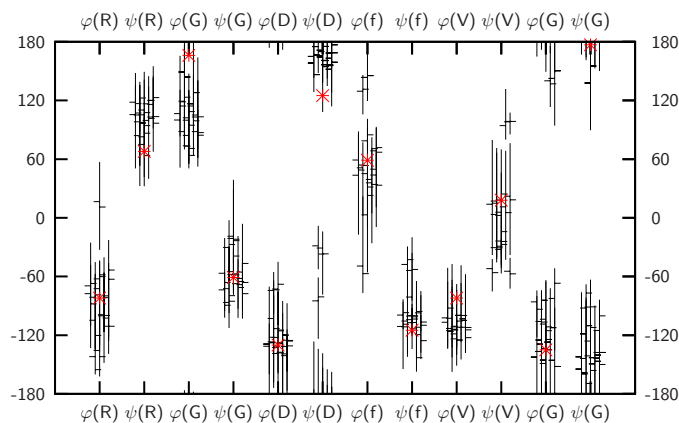


Abbildung 70: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *ab initio* SA-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFVG) **5**.

Die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulation ergibt ein homogenes H-Brückenmuster für **5** (siehe Tabelle 165). Alle Trajektorien korrelieren mit der Referenzstruktur und zeigen eine  $\beta/\beta$ -Schleifenkonformation. Die Tendenz zur Bildung einer  $\gamma$ -Schleife mit Arg oder Val in zentraler Position ist deutlich geringer, während die  $\gamma$ -Schleife um Gly-2 häufiger gebildet wird.

Die Strukturen ASA2 und ASA3 nehmen während der Simulation in geringerem Umfang eine der Referenzstruktur vergleichbare Konformation ein und erweisen sich als äußerst flexibel. Durch das Clustering sind wahrscheinlich zentrale Clusterstrukturen extrahiert worden, die während eines Übergangs zwischen zwei Konformationen entstanden. Dies könnte ein Grund für die höheren RMSD-Werte sein (siehe Tabelle 51), da die Betrachtung der Trajektorie sinnvolle Ergebnisse liefert.

*random SA*

Die *random SA*-Methode generiert für **5** eine hohe Anzahl möglicherer Konformationen. Als Startstruktur für die folgende RMD-Simulation ergeben sich durchaus sinnvolle und akzeptable Strukturvorschläge. Die Homogenität der Trajektorien ermöglicht eine eindeutige Konformationsanalyse.

Das Clustering der mit *random SA* generierten 1000 Strukturen ergibt analog zum *ab initio SA* insgesamt neun Cluster. Auch hier werden nur die zentralen Strukturen der fünf höchst populierten Cluster mit Populationen von 17.3% (RSA1), 17.0% (RSA2), 13.9% (RSA3), 10.1% (RSA4) und 8.9% (RSA5) verwendet.

Bei Verwendung des *random SA* als Startstrukturgenerator werden durch ein Clustering der RMD-Simulation die in Tabelle 52 zusammengefassten Clusterpopulationen erhalten.

Tabelle 52: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *random SA* mit anschließender RMD für c-(RGDFVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
RSA1	5	48.0	79	1	33
		8.8	97	2	79
		6.4	91	2	53
		6.4	71	3	94
		4.8	94	3	48
RSA2	6	39.2	107	3	52
		12.8	101	4	79
		8.0	51	3	52
		6.4	121	0	0
		5.6	124	1	20
RSA3	3	4.8	121	3	16
		75.2	79	2	50
		4.8	110	5	231
RSA4	3	4.8	52	5	95
		56.8	117	3	55
		8.8	99	4	48
RSA5	3	6.4	103	5	57
		41.6	101	2	31
		28.8	46	3	55
		5.6	71	2	24

Die erhöhte Anzahl der Clusterfamilien deutet auf eine hohe Flexibilität des zyklischen Peptids hin, doch ist anhand der Populationen die Bildung einer Hauptkonformation zu erkennen. Die zentralen Strukturen der höchst populierten Cluster besitzen bei allen RMD-Rechnungen geringe NOE-Verletzungen. Von größerem Interesse ist die dritte Nebenkonzformation der RMD, bei der die Startstruktur RSA2 verwendet wurde, da sie keinerlei NOE-Verletzungen aufweist. Bei genauerer Betrachtung der Konformation stellt sich jedoch heraus, dass es sich um eine Übergangskonformation handelt, die nicht als Strukturvorschlag verwendet werden sollte. Dies reflektiert auch der hohe RMSD-Wert.

Die RMSD-Werte zeigen für die Strukturen RSA1 und RSA3 gute Übereinstimmungen mit der Referenzstruktur, während die Hauptkonformationen der übrigen Startstrukturen von der Geometrie der Referenzstruktur abweichen. Dennoch sind die Hauptkonformere der Startstrukturen RSA2, RSA4 und RSA5 aufgrund der niedrigen NOE-Verletzungen zunächst sinnvolle Strukturvorschläge, und könnten nur durch eine weitere Validierung mit experimentellen Daten ausgeschlossen werden.

Der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit der Referenzstruktur zeigt Abweichungen für **5** bei den Winkeln  $\varphi(\text{Arg})$ ,  $\psi(\text{Gly})$  und  $\psi(\text{Asp})$  für wenige Startstrukturen. Allgemein korrelieren die Torsionswinkel gut mit der Referenzstruktur und besitzen geringe Standardabweichungen.

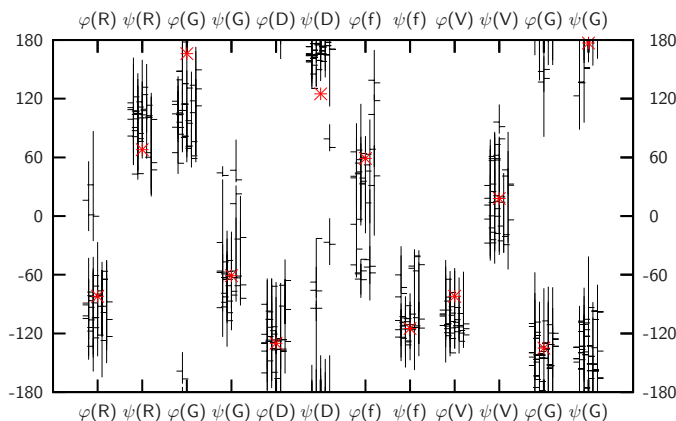


Abbildung 71: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *random SA*-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDFVG) **5**.

Die Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulation ergeben ein homogenes Bild von der Konformation. Leichte Abweichungen sind bei der Startstruktur RSA5 durch einen geringeren Anteil an  $\beta$ -schleifeninduzierenden H-Brücken zu erkennen (siehe Tabelle 166). Dies ist durch eine höhere Tendenz zur Ausbildung von H-Brücken zwischen Peptidrückgratatomen und der Asp Seitenkettencarboxygruppe begründbar, doch sind die ermittelten Daten durchaus im Rahmen der Toleranz.

Die Ergebnisse der *random SA*-Methode korrelieren mit denen der *ab initio SA*-Methode für **5** sehr gut. Die Hauptkonformere besitzen niedrige NOE-Verletzungen und zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur. Ein Unterschied ergibt sich lediglich durch die höhere Anzahl der durch *random SA* generierten sinnvollen Startstrukturen, die hier jedoch auf maximal fünf beschränkt wurde. Es lässt sich mit beiden Methoden eine gutes Bild der Solvensstruktur von **5** erzeugen.

#### 5.4.3.3 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- $\beta$ Ala-) **6**

##### *ab initio SA*

Wie bereits im Abschnitt 5.4.1.3 beschrieben, kann für das Peptid **6** keine Hauptkonformation beobachtet werden. Deshalb ist eine Berechnung von RMSD-Werten nicht möglich.

Das *ab initio SA* generierte insgesamt 1000 Konformere, die durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkeln insgesamt fünf Clusterfamilien ergeben, davon haben drei Populationen über 15% (36.9%, 33.3% bzw. 15.3%). Lediglich die zweithöchst besetzte zentrale Struktur enthält als einziges Sekundärstrukturelement eine  $\gamma^i$ -Schleife um Arg. Dies deutet bereits an, dass das Peptid in Lösung keine stabile Hauptkonformation einnimmt.

Die Clusteranalyse der RMD-Simulationen ergibt die in Tabelle 53 zusammengefassten Anteile der Clusterfamilien an der Trajektorie. Es wird eine hohe Anzahl an Konformationen mit geringen NOE-Verletzungen gebildet, was gut mit den von Schumann gemachten Beobachtungen korreliert.

Tabelle 53: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *ab initio* SA mit anschließender RMD für c-(RGdf<sup>βA</sup>) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
ASA1	2	73.6	3	19
		16.0	3	79
ASA2	6	37.6	2	26
		13.6	1	8
		10.4	3	53
		7.2	5	67
		5.6	2	11
ASA3	9	4.8	3	65
		27.2	4	48
		10.4	3	20
		9.6	6	86
		7.2	4	51
		7.2	2	29
		5.6	5	35
		5.6	2	8
4.8	2	36		
		4.8	3	37

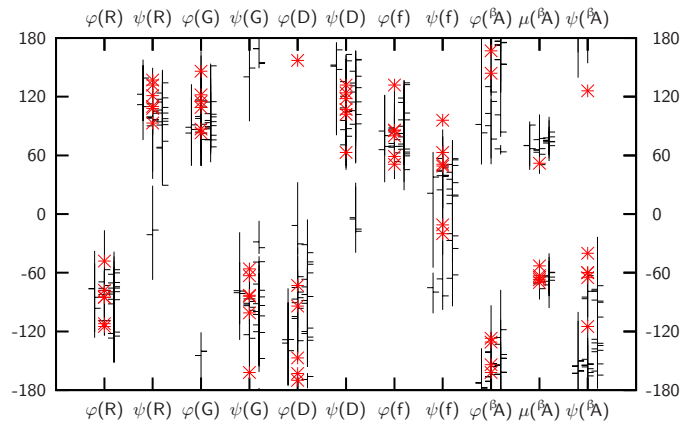


Abbildung 72: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *ab initio* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGdf<sup>βA</sup>) **6**.

Die Tolerenzen der Rückgratstorsionswinkel aller Clusterfamilien sind in Abbildung 72 zum Vergleich dargestellt. Nahezu alle Torsionswinkel können große Intervalle möglicher Werte annehmen. Die *NOE-restraints* bewirken nur eine geringe Stringenz der Konformation.

Die Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulationen sind in Tabelle 173 zusammengefasst. Die  $\gamma$ -Schleife mit Arg in zentraler Position ist niedriger populiert, diejenige um Gly ist in allen Trajektorien präsent. Dennoch ergibt sich ein inhomogenes H-Brückenmuster, so dass die Kombination aller Trajektorien die Flexibilität des Peptids **6** wiedergibt.

#### *random SA*

Das Clustering der mit *random SA* generierten 1000 Strukturen ergibt insgesamt acht Clusterfamilien, darunter drei mit Populationen von über 15% (35.2%, 23.5% und 15.3%). Im Vergleich zum *ab initio SA* zeigt sich hier eine erhöhte Vielfalt der generierten Konformationen. Die ersten beiden Konformationsfamilien besitzen als einziges Sekundärstrukturelement eine  $\gamma^i$ -Schleife mit Arg in zentraler Position. Der dritte Cluster enthält kein den Idealwerten entsprechendes Sekundärstrukturelement.

Tabelle 54: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *random SA* mit anschließender RMD für c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
RSA1	1	87.2	4	71
RSA2	6	29.6	4	37
		26.4	4	37
		10.4	5	50
		8.0	4	64
		6.4	2	43
		4.8	5	122
RSA3	3	64.8	2	11
		12.8	3	28
		12.0	3	97



Die RMD-Simulationen der zentralen Strukturen aus den drei höchst besetzten Clusterfamilien reduzieren die Konformationsvielfalt im Vergleich mit der *ab initio* SA-Methode leicht. Die Anzahl der Clusterfamilien sinkt bei allen Startstrukturen, während die NOE-Verletzungen vergleichbar sind.

Das Clustering der RMD-Simulation mit RSA1 als Startstruktur ergibt lediglich einen Cluster, so dass auf eine Vorzugskonformation von **6** geschlossen werden kann. In Kombination mit der Clusteranalyse der zuvor generierten 1000 RSA-Strukturen ist dieser Schluss jedoch nicht zulässig. Die Konformationsanalyse sollte anhand der an nähernd gleichpopulierten Konformationsfamilien RSA1, RSA2 und RSA3 erfolgen, um sinnvolle Resultate zu ergeben.

Die Rückgratstorsionswinkel sind im Vergleich zur *ab initio* SA-Methode in kleineren Intervallen positioniert (siehe Abbildung 73). Auffallend ist der nur zu geringen Anteilen vorhandene negative Torsionswinkel  $\mu$  der Aminosäure  $\beta$ Ala. Hier zeigen andere Methoden Vorteile, die beide Konformationen populieren.

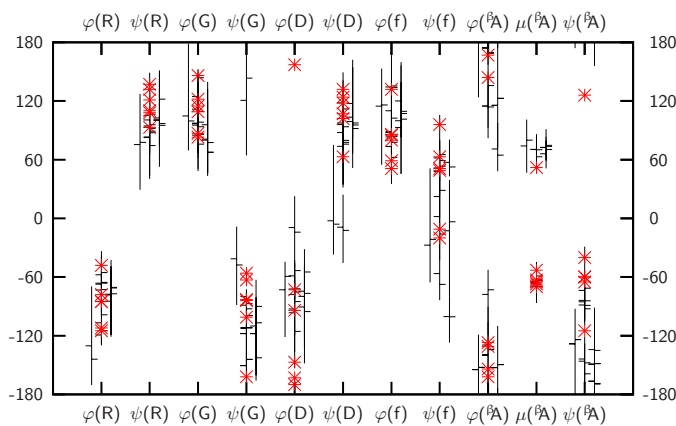


Abbildung 73: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *random* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDF $\beta$ A) **6**.

Die beobachteten H-Brücken in der RMD-Trajektorie sind im Vergleich zur *ab initio* SA-Methode insbesondere bei der Startstruktur RSA3 annähernd gleichbesetzt. Für die anderen beiden Startstrukturen favorisiert das System die Bildung einer  $\gamma$ -Schleife um

Asp. Somit ist die *random SA*-Methode nicht grundsätzlich zur Konformationsanalyse von **6** geeignet. Obwohl zu Beginn jedes SA eine zufällige Konformation generiert wird, erfasst die *ab initio SA*-Methode, die jedesmal mit derselben gestreckten Konformation des Peptid beginnt, einen größeren Konformationsraum.

#### 5.4.3.4 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- $\beta$ Leu-) **7**

##### *ab initio SA*

Die Clusteranalyse der mit *ab initio SA* generierten 1000 Strukturen ergibt fünf Clusterfamilien mit Populationen von 48.6%, 22.2%, 8.2%, 6.3% und 6.2%. Von diesen wurden die zentralen Strukturen der drei höchst populierten Cluster als Startstruktur für die folgende RMD verwendet.

Das Clustering der RMD-Simulation ergibt für alle Startstrukturen jeweils eine hoch populierte Hauptkonformation, die den RMSD-Werten entsprechend der zweiten Nebenkongformation der Referenzstrukturen entspricht (siehe Tabelle 55). Die Nebenkongformationen der Startstruktur ASA1 zeigen konformationelle Ähnlichkeiten zur Hauptkongformation der Referenzstrukturen. Die Nebenkongformation der Startstruktur ASA3 scheint aufgrund der hohen RMSD-Werte und NOE-Verletzungen ein Artefakt der verwendeten Startstruktur zu sein. Die NOE-Verletzungen der restlichen Kongformere ist gering und durchaus akzeptabel.

Tabelle 55: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *ab initio SA* mit anschließender RMD für c-(RGDf $\beta$ L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
ASA1	3	76.0	120	140	56	4	68
		7.2	74	159	98	5	78
		6.4	86	154	105	4	77
ASA2	1	85.6	108	107	57	3	55
ASA3	2	80.8	94	100	51	3	57
		6.4	145	184	147	6	170

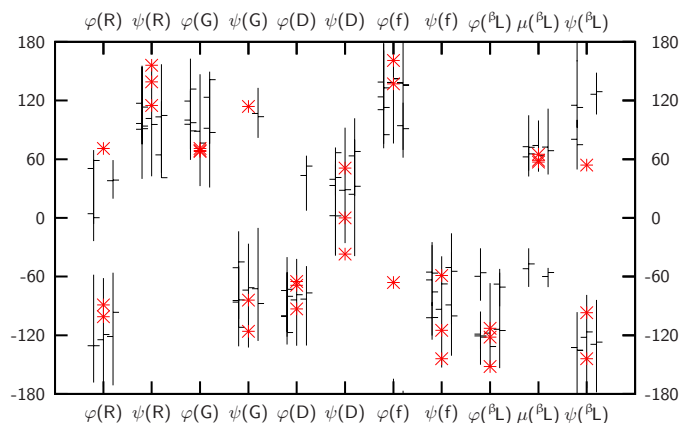


Abbildung 74: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *ab initio* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf <sup>$\beta$</sup> L) **7**.

Die während der RMD populierte Rückgratstorsionswinkel sind grafisch in Abbildung 74 dargestellt. Abweichungen von der Referenzstruktur sind für die Torsionswinkel  $\varphi(\text{Arg})$  und  $\psi(\beta\text{Leu})$  zu erkennen. Des Weiteren werden bei den Torsionswinkeln  $\varphi(\text{Asp})$  und  $\mu(\beta\text{Leu})$  Werte populierte, die nicht in den Referenzstrukturen gefunden werden. Der negative Torsionswinkel der Referenzstrukturen für  $\varphi(\text{D-Phe})$  wird nicht besetzt. Dennoch können diese Konformationen aufgrund der niedrigen NOE-Verletzungen als sinnvolle Strukturvorschläge gelten, wenn sie weitere experimentelle Daten erfüllen.

Die Wasserstoffbrücken während der RMD zeigen eine Dominanz der Hauptkonformation der Referenzstrukturen (siehe Tabelle 181). Die Anteile an der RMD-Trajektorie sind im Vergleich zu den von Schumann gefundenen Werten sehr gering. Zusätzlich wird eine  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position mit einem Anteil von 3.0% bei der Startstruktur ASA1 populierte. Es erweist sich schwierig, mit dieser Methode die Hauptkonformation der Referenzstrukturen zu erhalten, die hier jeweils als Nebenkongformation auftritt. Eine Auswahl ist aufgrund der geringen NOE-Verletzungen nicht eindeutig möglich.

*random SA*

Durch Clustering wurden die mit RSA generierten 1000 Strukturen analysiert. Es ergaben sich insgesamt fünf Clusterfamilien mit Populationen von 46.2%, 30.1%, 9.5%, 6.6% und 3.3%. Von diesen wurden die zentralen Strukturen der drei höchst besetzten Cluster als Startstruktur für die anschließende RMD-Simulation verwendet.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulationen sind in Tabelle 56 zusammengefasst. Bei den Startstrukturen RSA1 und RSA2 ist die Zuordnung einer Hauptkonformation anhand der Clusterpopulationen möglich. Die auf RSA3 basierende Rechnung ergibt zwei Hauptkonformere, die zu jeweils einem Drittel der Trajektorie vorliegen. Zu jeder Hauptkonformation kann mindestens eine Nebenkonformation identifiziert werden. Die NOE-Verletzungen jeder zentralen Struktur sind im Vergleich zur *ab initio* SA-Methode im Durchschnitt etwas höher. Anhand der RMSD-Werte ist ersichtlich, dass in den Trajektorien der Startstrukturen RSA1 und RSA2 vorwiegend die zweite Nebenkonformation der Referenzstrukturen vorliegt. Die Hauptkonformation wird lediglich zu einem geringen Anteil der Trajektorie eingenommen. Mit der Startstruktur RSA3 kann diese Hauptkonformation der Referenzstrukturen nicht identifiziert werden und das Hauptkonformer würde aufgrund der erhöhten NOE-Verletzung bei einer weiteren Konformationsanalyse nicht berücksichtigt werden. Die Hauptkonformere der Startstrukturen RSA1 und RSA2 besitzen durchaus akzeptable NOE-Verletzungen.

Tabelle 56: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *random SA* mit anschließender RMD für *c*-(RGDF $\beta$ L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
RSA1	3	72.8	96	95	68	5	71
		10.4	121	48	91	4	92
		5.6	32	142	90	5	90
RSA2	2	80.8	119	142	57	4	61
		9.6	137	99	101	7	116
		36.0	99	118	91	8	110
RSA3	3	34.4	95	96	66	3	58
		10.4	111	148	78	8	116

Der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit den Referenzstrukturen zeigt Abweichungen für die Winkel  $\psi(\text{Arg})$ ,  $\varphi(\text{Gly})$  und  $\psi(\text{Asp})$  (siehe Abbildung 75). Abweichungen zu einer Referenzstruktur sind für Torsionswinkel von  $\psi(\text{Gly})$  zu erkennen. Diese Torsionswinkelwerte werden jedoch mit keiner der im Rahmen dieses Projekts benutzten Methoden beobachtet, so dass daraus geschlossen werden kann, dass diese nicht zugänglich sind.

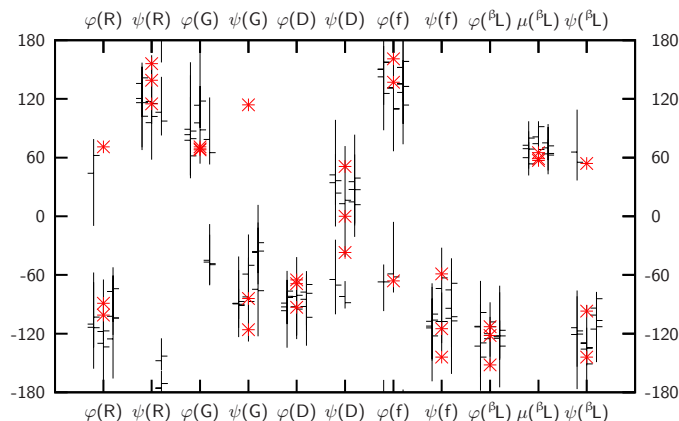


Abbildung 75: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *random* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDf $\beta$ L) **7**.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD sind im Vergleich zu den Referenzstrukturen deutlich geringer (siehe Tabelle 182). Anhand des H-Brückenmusters ist zu erkennen, dass bei Verwendung der Startstrukturen *RSA2* und *RSA3* sowohl die Hauptkonformation als auch die Nebenkongformation der Referenzstrukturen populiert werden. Im Vergleich dazu werden aufgrund hoher Dynamik H-Brücken während der RMD von *RSA1* nur in geringem Umfang gebildet.

Zusammengefasst erweist sich die Konformationsanalyse mit einem *ab initio* bzw. *random* SA für das Peptid **7** als schwierig und eine Korrelation mit dem Hauptkonformer der Referenzstrukturen wird nicht gefunden. Es kann jedoch aufgrund der niedrigen NOE-Verletzungen davon ausgegangen werden, dass es sich dennoch um einen sinnvollen Strukturvorschlag handelt.

5.4.3.5 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **8***ab initio* SA

Die Clusteranalyse der mittels ASA generierten 1000 Startstrukturen ergibt eine Clusterfamilie (ASA1) mit einer Population von 77.3%.

Die Ergebnisse der Clusteranalyse der RMD-Simulation sind in Tabelle 57 zusammengefasst. Anhand der Populationen kann eine Hauptkonformation identifiziert werden, die große konformationelle Ähnlichkeit zur Referenzhauptkonformation aufweist. Daneben können drei minder populierte Nebenkongformationen bestimmt werden, von denen zwei höhere NOE-Verletzungen und keine strukturelle Ähnlichkeit zu den Referenzstrukturen besitzen.

Tabelle 57: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *ab initio* SA mit anschließender RMD für c-(RGDIV $\beta$ A) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2		
ASA1	4	47.2	35	86	3	88
		7.2	186	202	4	149
		7.2	157	178	4	111
		5.6	77	96	4	72

Die Rückgratstorsionswinkel sind zum Vergleich mit den Referenzstrukturen grafisch in Abbildung 76 dargestellt. Die höchst populierte Clusterfamilie korreliert sehr gut mit der Konformation der Referenzstrukturen. Abweichungen ergeben sich insbesondere für die Torsionswinkel  $\psi(\text{Gly})$ ,  $\psi(\text{D-Phe})$ ,  $\varphi(\beta\text{Ala})$  und  $\psi(\beta\text{Ala})$ . Für diese werden während der RMD Werte gefunden, die zu höheren NOE-Verletzungen führen. Diese Flexibilität des Peptids **8** induziert zu keinem Zeitpunkt der RMD negative Werte für  $\mu(\beta\text{Ala})$ , so dass zwar eine gute Korrelation dieser Konformationsanalysemethode mit der Referenzhauptkonformation gefunden wird, jedoch nicht mit der Nebenkongformation der Referenzstrukturen.

Die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD ist etwas geringer als die der Hauptreferenzstrukturen, korreliert mit dieser aber sehr gut (siehe Tabelle 189). Abwei-

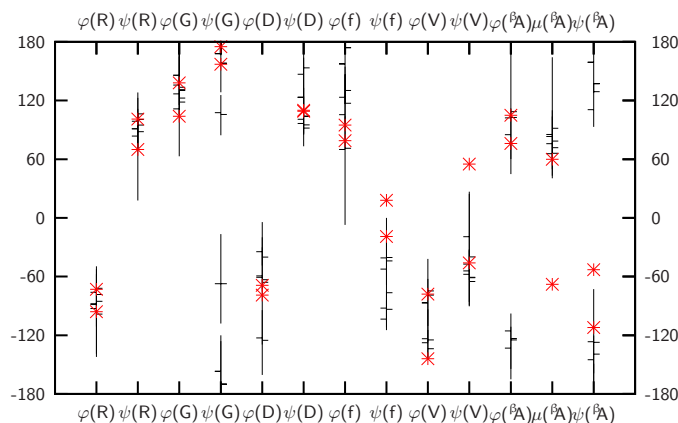


Abbildung 76: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *ab initio* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIV <sup>$\beta$</sup> A)<sub>8</sub>.

chungen finden sich lediglich im Bezug auf die Nebenkonformation der Referenzstrukturen. Die II- $\alpha_{RS}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position ist das dominante Sekundärstrukturelement dieses Peptids. Die Überlagerung dieser Schleife durch eine  $\beta$ II-Schleife ist ebenfalls deutlich zu erkennen. Die  $\gamma$ -Schleife um Asp ist etwas geringer populiert.

### random SA

Das Clustering der 1000 durch RSA generierten Strukturen ergibt insgesamt acht Clusterfamilien und beweist damit im Gegensatz zu den anderen Methoden eine deutlich bessere Durchsuchung des Konformationsraums von **8**. Die zentralen Strukturen der ersten drei Clusterfamilien mit Populationen von 35.0% (RSA1), 5.7% (RSA2) und 5.5% (RSA3) wurden als Startstrukturen für die anschließende RMD verwendet.

Die Startstrukturen RSA1 und RSA2 ergeben nach Clustering der RMD-Simulation jeweils eine hoch populierte Clusterfamilie, deren zentrale Struktur im Falle von RSA1 konformationelle Ähnlichkeit zu den Referenzstrukturen und geringe NOE-Verletzungen besitzt (siehe Tabelle 58). Die zentralen Clusterstrukturen der RMD mit den Startstrukturen RSA2 und RSA3 weichen strukturell zu den Referenzstrukturen stark ab. Die NOE-Verletzungen der RSA2-basierenden RMD sind im Gegensatz zu RSA1 und RSA3 sehr hoch.

Während der RMD mit RSA3 als Startstruktur kann keine Hauptkonformation gefunden werden, und obwohl die NOE-Verletzungen im Allgemeinen gering sind, wird keine konformationelle Ähnlichkeit zu den Referenzstrukturen beobachtet.

Tabelle 58: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen des *random* SA mit anschließender RMD für c-(RGDV<sup>βA</sup>) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	∑NOE [pm]
			K1	K2		
RSA1	1	88.8	46	79	3	99
RSA2	3	63.2	194	205	4	152
		7.2	230	239	6	263
		4.8	213	216	4	236
		20.0	180	201	2	64
RSA3	7	17.6	185	202	3	59
		7.2	192	209	2	73
		6.4	164	186	2	80
		5.6	206	220	3	168
		5.6	179	205	3	98
		4.8	202	216	3	110

Ein Vergleich der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Clusterstrukturen mit den Referenzstrukturen ist grafisch in Abbildung 77 dargestellt. Ersichtlich ist eine sehr gute Korrelation der RMD mit RSA1 als Startstruktur mit der Hauptreferenzstruktur. Die anderen mit RSA2 und RSA3 identifizierten Konformationen korrelieren lediglich bei den Torsionswinkeln  $\varphi(\text{Asp})$ ,  $\psi(\text{Arg})$ ,  $\varphi(\text{D-Phe})$  und  $\psi(\text{D-Phe})$ , während die restlichen Torsionswinkel zum Teil deutliche Abweichungen aufweisen.

Auffallende konformationelle Variationen der mit den Startstrukturen RSA2 und RSA3 analysierten Konformationen sind ebenfalls mit der Analyse der H-Brückenpopulationen während der RMD-Simulationen zu beobachten (siehe Tabelle 190). Während die Startstruktur RSA1 eine gute Korrelation mit den Referenzstrukturen zeigt und eine II- $\alpha_{\text{RS}}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position gefunden wird, treten bei den Startstrukturen RSA2 und RSA3 als einzige Sekundärstrukturmerkmale  $\gamma$ -Schleifen mit Arg und Asp in den zentralen Positionen auf. Auffallend ist ebenfalls, dass während aller RMD-Simulationen negative Torsionswinkelwerte für  $\mu(\beta\text{Ala})$  nicht populiert werden.



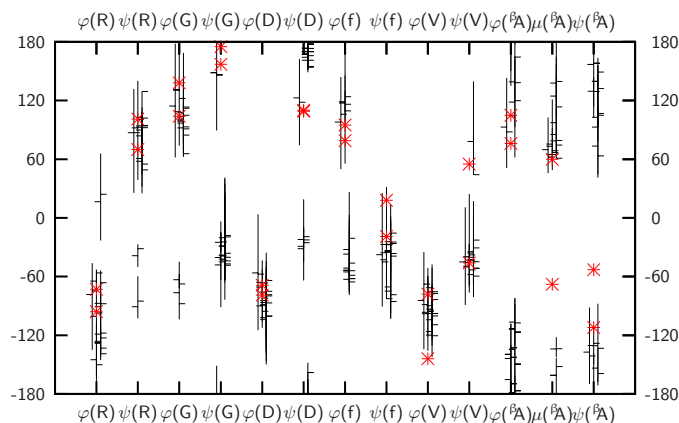


Abbildung 77: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der *random* SA-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDFV <sup>$\beta$ A</sup>) **8**.

Die Generierung von Startstrukturen mit Hilfe eines SA für das Peptid **8** erweist sich als durchaus gute Möglichkeit für die Konformationsanalyse. Die ASA-Methode ermittelt recht zuverlässig die den Referenzstrukturen entsprechende Konformation mit sehr niedrigen NOE-Verletzungen. Bei der RSA-Methode ist dies ebenfalls unter Berücksichtigung der Startstrukturpopulationen zuverlässig möglich, jedoch werden im Vergleich zur ASA-Methode höhere NOE-Verletzungen beobachtet. Die generierten Startkonformationen mit geringeren Populationen erweisen sich bei der RMD-Simulation unter diesen Bedingungen als stabil und können das lokale Energieminimum nicht verlassen. Demzufolge ergeben sich ausgeprägte Abweichungen von den durch Schumann identifizierten Referenzstrukturen. Die hohen NOE-Verletzungen der zentralen Clusterstrukturen aus der RMD mit RSA2 als Startstruktur zeigen jedoch, dass während dieser Simulation keine den NOE-*restraints* entsprechende Konformation gebildet wurde. Die Konformationsanalyse anhand dieser RMD würde keine zuverlässige Konformation ergeben. Die Verwendung von RSA3 als Startstruktur führt jedoch im Gegensatz dazu zu Konformationen, die von den Referenzstrukturen deutlich abweichen und geringere NOE-Verletzungen besitzen. Hier sind Studien der Flexibilität des Peptids **8** möglich, die während der Konformationsanalyse von Schumann nicht beobachtet worden sind.

### 5.4.4 Startstruktur durch LE- oder 4D-MD-Simulationen

Das Programmpaket GROMOS96 bietet die Möglichkeit, den Konformationsraum mit speziellen MD-Simulationen zu durchsuchen. Eine Methode ist *local elevation*, das durch Addition eines Energieterms häufig gefundene Konformationen energetisch benachteiligt. Eine weitere Methode ist die 4D-MD-Simulation, die durch eine zusätzliche Dimension während der Simulation die Freiheitsgrade des Systems erhöht und dadurch die Anzahl der lokalen Minima auf der Energiehyperfläche verringert.

Die Trajektorie der LE-Methode wird nach Rückgratstorsionswinkel geclustert und die zentralen Strukturen der Clusterfamilien werden als Startstrukturen der folgenden RMD-Simulation verwendet. Im Gegensatz dazu wird bei der 4D-MD-Simulation die finale Struktur verwendet, da gleichzeitig NOE-*restraints* berücksichtigt werden und das System zum Simulationende ein energetisches Minimum einnimmt.

Informationen zur Durchführung der Rechnungen sowie deren Analyse erfolgt nach den in Abschnitt 5.4 beschriebenen Kriterien. Die LE- und 4D-MD-Simulationen sind schematisch in Abbildung 78 dargestellt.

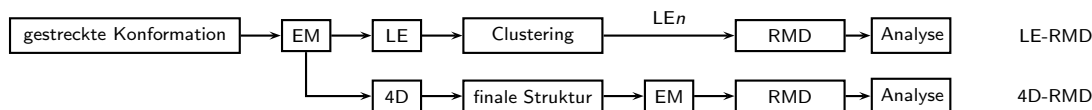


Abbildung 78: Schematische Darstellung der LE- und 4D-MD-Simulationen ( $n \in \mathbb{N}$ ).

#### 5.4.4.1 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) 4

##### *local elevation* (LE)

Die LE-Trajektorie konnte durch Clustering in 15 unterschiedliche Clusterfamilien unterteilt werden. Die zentralen Strukturen der mit Populationen von 21.6% (LE1), 7.3% (LE2) und 5.0% (LE3) höchst besetzten Cluster wurden als Startstrukturen für die anschließende RMD verwendet.

Die in Tabelle 59 zusammengefassten Ergebnisse der Clusteranalyse und der positiven NOE-Verletzungen der RMD-Simulation zeigen, dass jeweils eine Clusterfamilie gebildet wird. Die durch die LE-Simulation gewonnene Konformation scheint recht stabil zu sein, weist jedoch erhöhte NOE-Verletzungen auf. Die zentralen Strukturen der Cluster scheinen im ausreichenden Maße mit der Referenzstruktur übereinzustimmen.

Tabelle 59: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen der *local elevation* RMD mit anschließender RMD für *c*-(RGDFV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
LE1	1	96.0	79	6	122
LE2	1	94.4	86	7	128
LE3	1	100.0	82	7	125

Auch der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur (siehe Abbildung 79). Alle Strukturen besitzen als dominantes Sekundärstrukturelement eine  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position. Die Abweichung im Bereich des Torsionswinkels  $\psi(\text{Asp})$  resultiert aus der Bildung von H-Brücken zwischen den Amidprotonen von Val und Arg mit der Seitenkettencarboxylgruppe des Asp. Diese deformieren die Sekundärstruktur derart, dass eine H-Brücke zur Stabilisierung

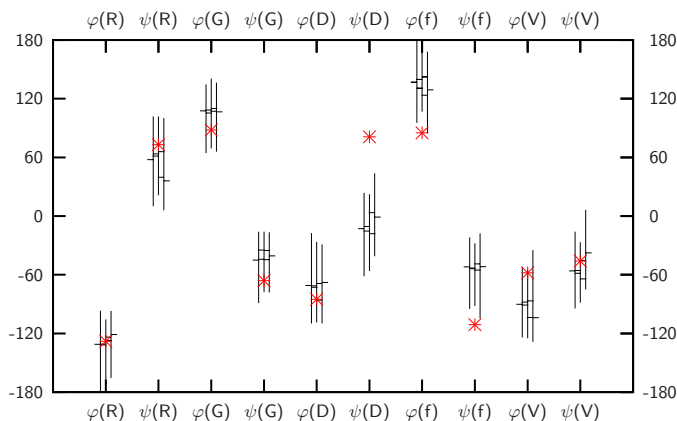


Abbildung 79: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der LE-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für *c*-(RGDFV) 4.

der verzerrten  $\beta$ -Schleife mit D-Phe in  $i+1$  Position nicht beobachtet wird (siehe Tabelle 159).

Die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulation kann mit einer  $\beta$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position beschrieben werden, die von einer  $\gamma$ -Schleife um Gly überlagert wird. Diese Konformation unterscheidet sich deutlich von der Referenzstruktur, obwohl die RMSD-Werte eine ähnliche Struktur vermuten ließen. Die bevorzugte Bildung von H-Brücken zwischen Rückgratsatomen und der Asp Carboxylgruppe während der RMD wird nur durch diese Methode der Konformationsanalyse beobachtet und scheint ein Artefakt der *in continuo* generierten Startstrukturen zu sein.

#### 4D-MD-Simulation

Die Clusteranalyse der abschließenden RMD-Simulation der 4D-RMD-Methode ergibt eine Hauptkonformation mit einem Anteil von 46.4% und zwei Nebenkonformationen mit einer Population von jeweils ca. 20%. Die Hauptkonformation besitzt neben einer zufriedenstellenden NOE-Verletzung einen hohen RMSD-Wert, der auf deutliche Abweichungen zur Referenzstruktur hinweist. Die Werte der Nebenkonformationen verhalten sich invers und weisen höhere NOE-Verletzungen neben geringeren RMSD-Werten auf.

Tabelle 60: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der finalen Struktur des 4D-RMD mit anschließender RMD für c-(RGDIV) 4.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
4D	3	46.4	135	5	91
		20.8	80	6	133
		20.0	105	6	101

Die Abweichungen lassen sich durch den Vergleich der Rückgratstorsionswinkel erkennen (siehe Abbildung 80). Die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Val und Arg sowie Asp und D-Phe besetzen jeweils zwei Energieminima. Die  $\gamma$ -Schleife mit Gly in zentraler Position erweist sich als dominantes Strukturmerkmal und ist in allen Strukturen präsent. Die Population der stabilisierenden H-Brücke fällt jedoch mit 18.4% geringer aus als erwartet. Die anderen H-Brücken der Referenzstruktur werden nicht in nennenswerten Anteilen gebildet (siehe Tabelle 160).

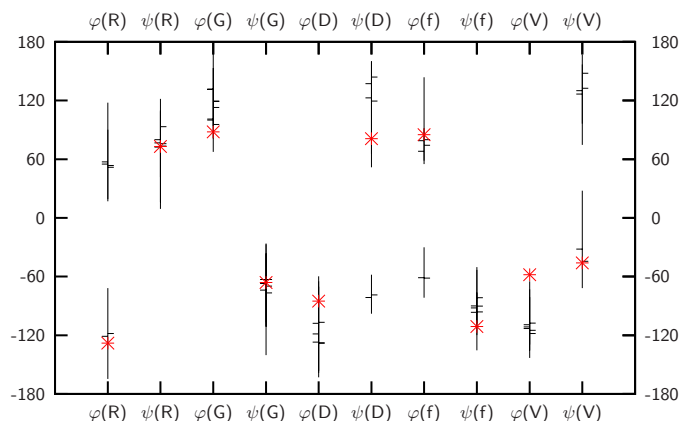


Abbildung 80: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der 4D-RMD-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIV) 4.

Die erste Nebenkongformation zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Referenzstruktur und enthält gegenüber der  $\gamma$ -Schleife eine  $\beta$ II'-Schleife mit D-Phe in  $i+1$  Position. Bei der Hauptkongformation sind die Peptidbindungen zwischen Val und Arg sowie Asp und D-Phe um  $180^\circ$  gedreht, so dass sich eine verzerrte  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position bildet. Eine Drehung der Peptidbindung zwischen Asp und D-Phe wird in der zweiten Nebenkongformation beobachtet und führt zu einer  $\gamma$ -Schleife um D-Phe, der eine  $\beta$ -Schleife mit Arg in  $i+1$  Position gegenüberliegt.

Die Kongformationsanalyse nach der 4D-RMD-Methode ergibt für 4 eine schlechte Übereinstimmung mit der Referenzstruktur. Die generierten Strukturen enthalten Strukturmerkmale, die mit anderen Methoden nicht beobachtet wurden. Dies macht sie vielleicht für Kongformationsanalysen mit einer höheren Anzahl und stringenteren NOE-*restraints* attraktiv.

5.4.4.2 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) **5***local elevation* (LE)

Das Clustering der LE-Trajektorie ergibt 16 Clusterfamilien, von denen die zentralen Strukturen der drei höchst besetzten mit Populationen von 22.2% (LE1), 14.7% (LE2) und 9.1% (LE3) zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Tabelle 61: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen der *local elevation* RMD mit anschließender RMD für c-(RGDFVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
LE1	1	97.6	83	4	108
LE2	2	84.8	148	3	63
		14.4	101	2	26
LE3	2	87.2	86	4	106
		11.2	93	6	151

Die Clusteranalyse der Konformationsstudie von **5** mit der LE-Methode ergibt die in Tabelle 61 zusammengefassten Werte. Neben den hoch populierte Hauptkonformeren treten zusätzlich bei zwei Startstrukturen Nebenkonformationen auf. Die zentralen Strukturen der Clusterfamilien korrelieren mäßig mit der Referenzstruktur, da alle RMSD-Werte größer als 80 pm sind. Die NOE-Verletzungen der Strukturen LE1 und LE3 sind recht hoch, so dass auf eine schlechte Übereinstimmung mit den experimentellen Randbedingungen geschlossen werden kann. Die Clusterfamilien der Startstruktur LE2 besitzen zwar geringere NOE-Verletzungen, weichen jedoch konformationell stark von der Referenzstruktur ab.

Die Rückgratstorsionswinkel der mit der LE-Methode generierten Strukturen weichen zum Teil deutlich von denen der Referenzstruktur ab (siehe Abbildung 81). So kommt es zu keiner Übereinstimmung der Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  von Gly-2,  $\varphi$ (Asp) und  $\psi$ (D-Phe). In Verbindung mit den hohen RMSD-Werten kann darauf geschlossen werden, dass die generierten Strukturen die Konformation der Referenzstruktur nicht repräsentieren.

Die Wasserstoffbrücken sind im Vergleich zu den Referenzstrukturen äußerst niedrig populierte (siehe Tabelle 167), und die Konformation der Referenzstruktur liegt zu maximal

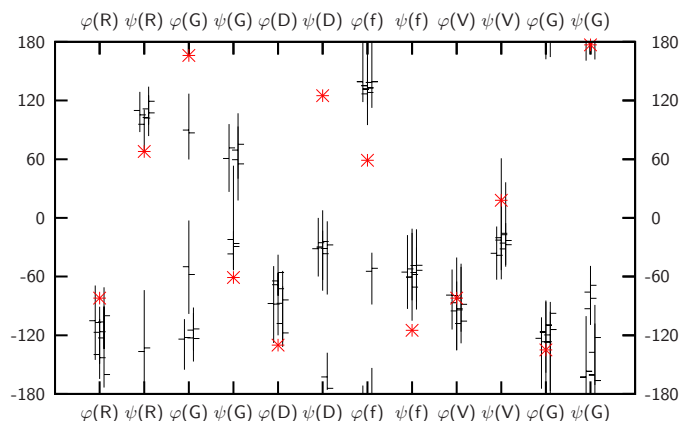


Abbildung 81: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der LE-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFVG) **5**.

1% der Trajektorie vor. Die genauere Betrachtung der generierten Struktur ergibt eine klare Tendenz zur Ausbildung von H-Brücken zwischen Rückgrat-NH-Gruppen und der Carboxylgruppe des Asp. Diese Wasserstoffbrücken verzerren die Konformation und erweisen sich als sehr stabil während der RMD-Simulation. Der Effekt beruht wahrscheinlich auf der Durchsuchung des Konformationsraums im Kontinuum und verfälscht die Konformationsanalyse deutlich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die LE-Methode zur Generierung von Startstrukturen für das Peptid **5** im Vergleich zu anderen Methoden eine äußerst schlechte Leistung zeigt.

#### 4D-MD-Simulation

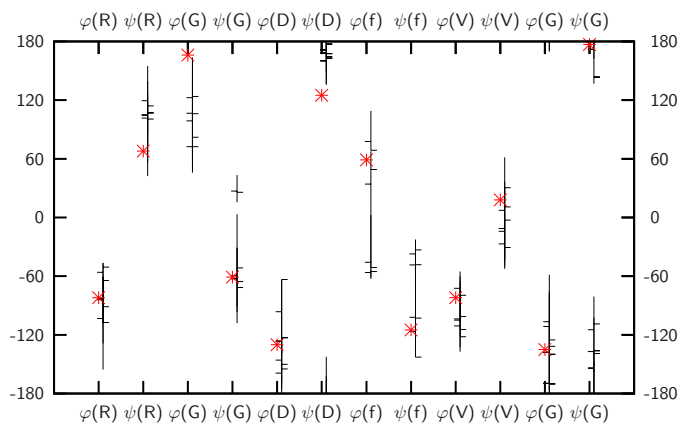
Die Clusteranalyse der mit der 4D-RMD-Simulation generierten Strukturen ergibt eine Hauptkonformation und drei Nebenkongformationen (siehe Tabelle 62). Die recht hohen RMSD-Werte lassen konformationelle Abweichungen vermuten. Die NOE-Verletzungen sind für die Hauptkonformation äußerst gering. Die Nebenkongformationen besitzen akzeptable NOE-Summenverletzungen, jedoch eine etwas höhere Anzahl an Überschreitungen.

Tabelle 62: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der finalen Struktur des 4D-RMD mit anschließender RMD für c-(RGDIVG) **5**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
4D	4	52.8	101	1	27
		9.6	99	4	56
		6.4	93	5	82
		5.6	65	3	77

Die Rückgratstorsionswinkel korrelieren sehr gut mit denen der Referenzstruktur (siehe Abbildung 82). Eine leichte Abweichung ist bei einer Nebenkonformation für den Torsionswinkel  $\varphi(\text{Gly-2})$  zu beobachten.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD-Simulation sind in Tabelle 168 zusammengefasst. Die Bereitschaft zur Ausbildung einer  $\gamma$ -Schleife mit Gly-2 in zentraler Position ist im Vergleich zur Referenzstruktur etwas erhöht, die anderen  $\gamma$ -Schleifen werden nur im geringen Umfang beobachtet. Dennoch ist die Präferenz zur Ausbildung eines  $\beta/\beta$ -Schleifenmusters klar zu erkennen, und die Trajektorie spiegelt das Verhalten der Referenzstruktur angemessen wider.

Abbildung 82: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der 4D-RMD-Methode mit den von Müller gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDIVG) **5**.



Die 4D-RMD-Methode erweist sich für das Peptid **5** als gute und schnelle Methode zur Durchsuchung des Konformationsraums und generiert durchaus sinnvolle Startkonformationen für eine anschließende RMD-Simulation.

#### 5.4.4.3 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-<sup>β</sup>Ala-) **6**

##### *local elevation* (LE)

Insgesamt können 17 Clusterfamilien durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkel in der LE-Trajektorie identifiziert werden, die jeweils unter 10% populiert sind. Von diesen werden die drei höchst populierten Cluster mit Populationen von 9.5% (LE1), 5.5% (LE2) und 5.3% (LE3) als Startstrukturen verwendet.

Wie bereits im Abschnitt 5.4.1.3 beschrieben, kann für das Peptid **6** keine Hauptkonformation beobachtet werden. Aus diesem Grund ist die Berechnung von RMSD-Werten nicht möglich.

Die scheinbar gute Durchsuchung des Konformationsraums durch die LE-MD-Simulation wird durch die Clusteranalyse der anschließenden RMD-Simulation getrübt (siehe Tabelle 63). Mit Ausnahme der RMD von LE3 werden jeweils hoch populierte Cluster erhalten.

Tabelle 63: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen der *local elevation* RMD mit anschließender RMD für c-(RGDF<sup>β</sup>A) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
LE1	1	87.2	4	70
LE2	2	86.4	3	55
		5.6	7	99
LE3	7	22.4	4	22
		14.4	1	10
		13.6	5	38
		9.6	5	114
		6.4	6	176
		5.6	5	113
		4.8	3	89
LE4	1	96.8	6	150

Zusätzlich sind die NOE-Verletzungen im Vergleich zu anderen Methoden der Konformationsstudien an **6** im Durchschnitt höher.

Die Analyse der Rückgratstorsionswinkel, die während der RMD-Simulation populiert werden, ergibt eine hohe Variabilität der Winkel (siehe Abbildung 83). Auffallend ist jedoch, dass der Torsionswinkel  $\mu$  des  $\beta$ Ala nur selten negative Werte einnimmt. Im Vergleich mit anderen Methoden zur Konformationsstudien werden hier auch Torsionswinkel erhalten, die für das Peptid **6** nicht beobachtet wurden. Der Grund hierfür ist die starke Tendenz zur Ausbildung von H-Brücken zwischen Rückgrat- und Seitenkettenatomen.

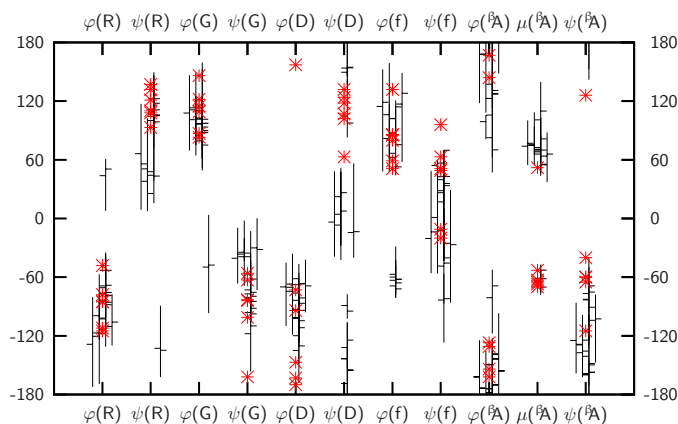


Abbildung 83: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der LE-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für  $c$ -(RGDf $^{\beta}$ ) **6**.

Die beobachteten H-Brücken in der RMD-Trajektorie sind in ihrer Population für die Startstrukturen LE1 bis LE3 vergleichbar mit anderen Methoden (siehe Tabelle 175). Starke Abweichungen sind für die Startstruktur LE4 zu beobachten, die durch die sehr stabilen H-Brücken zwischen Peptidrückgrat und Seitenketten in einem lokalen Minimum gefangen ist. Diese Simulation könnte zur Fehleinschätzung des Systems führen und die Konformationsanalyse verfälschen.

### 4D-MD-Simulation

Die finale Struktur der 4D-RMD-Simulation wird als Startstruktur der folgenden RMD-Simulation verwendet. Das anschließende Clustering ergibt zwei Hauptkonformationen und drei Nebenkonformationen (siehe Tabelle 64). Die NOE-Verletzungen sind im Allgemeinen gering.

Tabelle 64: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der finalen Struktur des 4D-RMD mit anschließender RMD für c-(RGDf<sup>β</sup>A) **6**.

Startstruktur	Cluster	Population [%]	NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
4D	5	34.4	2	16
		12.8	5	89
		7.2	2	36
		5.6	4	101
		5.6	4	26

Die Rückgratstorsionswinkel der Cluster sind in Abbildung 84 dargestellt. Die 4D-RMD-Simulation zeigt Variationen im Bereich zwischen Asp und D-Phe. Der Torsionswinkel  $\mu$  der Aminosäure <sup>β</sup>Ala nimmt mit dieser Methode lediglich positive Werte ein; das Peptid erweist sich als recht rigide im Vergleich zu anderen Methoden. Der Konformationsraum

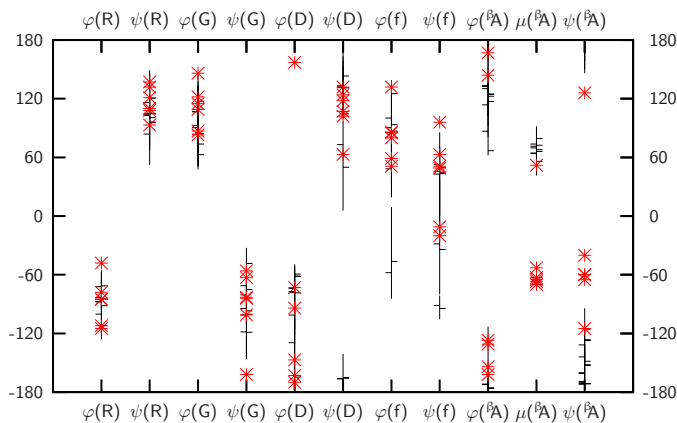


Abbildung 84: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der 4D-RMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf<sup>β</sup>A) **6**.

wird anscheinend mit diesem Verfahren nicht ausreichend durchsucht und die verwendeten NOE-*restraints* scheinen im Gegensatz zu den anderen verwendeten Methoden eine hohe Stringenz zu besitzen.

Die Population der Wasserstoffbrücken bestätigt diese Beobachtung (siehe Tabelle 176). Es kann ein Gleichgewicht zwischen zwei Konformeren festgestellt werden, die jeweils eine  $\gamma$ -Schleife um D-Phe bzw. Gly enthalten. Die Populationen anderer  $\gamma$ -Schleifen sind sehr gering und würden bei Konformationsanalysen vernachlässigt werden. Die Flexibilität des Systems wird mit dieser Methode für **6** nur unzureichend dargestellt.

#### 5.4.4.4 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- $\beta$ Leu-) **7**

##### *local elevation* (LE)

Durch Clustering der LE-Trajektorie ergeben sich 21 Cluster, von denen die zentralen Strukturen der drei höchst populierten mit Populationen von 14.9%, 8.6% und 5.3% als Startstrukturen für die folgende RMD-Simulation fungieren.

In Tabelle 65 sind die Ergebnisse der Cluster- und NOE-analyse mit den RMSD-Werten zwischen zentralen Clusterstrukturen und Referenzstrukturen zusammengefasst. Die Konformere LE1 und LE3 ergeben jeweils zwei annähernd gleich populierte Clusterfamilien, wodurch eine eindeutige Bestimmung der Vorzugskonformation schwierig wird. Aus der Startstruktur LE2 wird ein Cluster durch Clustering erhalten. Anhand der RMSD-Werte ist ersichtlich, dass bei allen Startstrukturen bevorzugt die zweite Nebenkongformation

Tabelle 65: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen der *local elevation* RMD mit anschließender RMD für c-(RGDF $\beta$ L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
LE1	2	54.4	111	128	49	4	72
		36.8	111	145	73	7	151
LE2	1	98.4	112	140	52	5	88
LE3	2	53.6	96	114	91	8	97
		35.2	84	101	48	5	78

der Referenzstrukturen gebildet wird. Die NOE-Verletzungen sind im Vergleich zu anderen Methoden etwas höher.

Die während der RMD eingenommenen Rückgratstorsionswinkel weichen zum Teil deutlich von denen der Referenzstruktur ab (siehe Abbildung 85). So werden durch eine unzureichende Durchsuchung des Konformationsraums bei den Torsionswinkel  $\varphi(\text{Arg})$ ,  $\psi(\text{Gly})$ ,  $\psi(\text{D-Phe})$  und  $\psi(\beta\text{Leu})$  Werte der Referenzstrukturen nicht populiert. Gänzlich andere Torsionswinkel werden für  $\psi(\text{Arg})$  und  $\varphi(\text{Gly})$  gefunden. Das Peptidrückgrat im Bereich der Aminosäuren Arg und Gly nimmt eine andere Konformation ein als in den Referenzstrukturen.

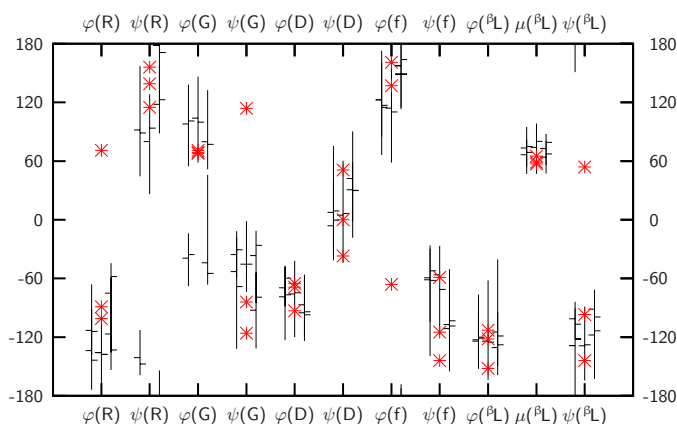


Abbildung 85: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der LE-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für  $c\text{-}(\text{RGDF}^{\beta\text{Leu}}) \mathbf{7}$ .

Die populierten Wasserstoffbrücken während der RMD lassen erkennen, dass die Startstrukturen LE1 und LE3 bevorzugt Konformationen bilden, die den Nebenkongformationen der Referenzstrukturen entsprechen (siehe Tabelle 183). Die Hauptreferenzstruktur wird lediglich zu einem geringen Anteil eingenommen. Während der RMD der Startstruktur LE2 wird hingegen ausschließlich das H-Brückenmuster der Hauptreferenzkonformation gefunden.

Starke Verzerrungen des Peptidrückgrats werden jedoch durch äußerst stabile H-Brücken zwischen den Amidprotonen und der Carboxylfunktion des Asp verursacht. Diese H-

Brücken sind wahrscheinlich ein Artefakt aus der *in continuo* LE-RMD. Hierdurch ergibt sich keine Übereinstimmung mit den Referenzstrukturen, und es können lediglich Nebenkonformationen identifiziert werden.

#### 4D-MD-Simulation

Die Verwendung einer 4D-RMD-Simulation als Startstrukturgenerator mit anschließender RMD-Simulation der finalen Struktur führt zu den in Tabelle 66 zusammengefassten Ergebnissen. Die zentrale Struktur der Clusterfamilie ist der zweiten Nebenkonformation der Referenzstrukturen konformationell ähnlich. Die leicht erhöhten NOE-Verletzungen sind tolerierbar.

Tabelle 66: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der finalen Struktur des 4D-RMD mit anschließender RMD für c-(RGDF<sup>β</sup>L) **7**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]			NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2	K3		
4D	1	91.2	124	133	62	4	76

Der Vergleich der Rückgratstorsionswinkel, die während der RMD populiert werden, mit denen der Referenzstruktur ergibt leichte Abweichungen für die Torsionswinkel der Aminosäuren Arg und Gly (siehe Abbildung 86). Des Weiteren wird der Konformationsraum nicht ausreichend durchsucht, so dass Torsionswinkelkonformationen der Referenzstrukturen nicht während der RMD populiert werden.

Die Analyse der Wasserstoffbrücken ergibt, dass während der RMD bevorzugt eine H-Brücke zwischen Asp H<sup>N</sup> und Arg O gebildet wird (siehe Tabelle 184). H-Brücken zwischen Peptidrückgrat und der Carboxylgruppe des Asp führen zu einer Verzerrung der Konformation, so dass die Hauptkonformation der Referenzstrukturen nicht identifiziert werden kann.

Für das Peptid **7** erweisen sich die MD-Simulationen zur Durchsuchung des Konformationsraums als unbrauchbar, da sie zu einer Überbewertung der intraresidualen H-Brücken zwischen Rückgrat und Seitenketten führen. Diese verzerren die Konformation, so dass

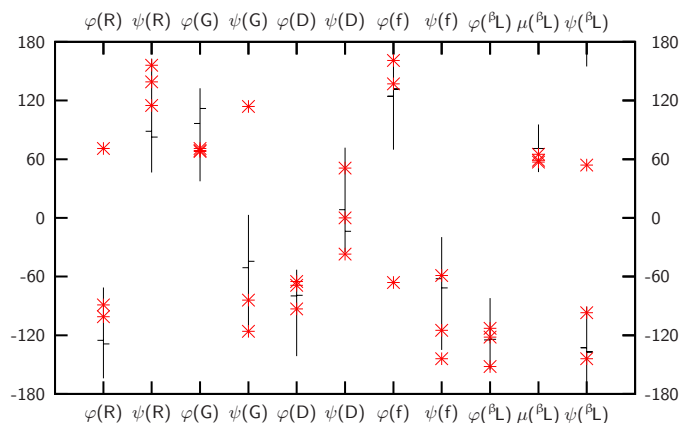


Abbildung 86: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der 4D-RMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDf<sup>β</sup>L) 7.

keine Übereinstimmung mit den von Schumann durchgeführten Konformationsanalysen erzielt werden kann.

#### 5.4.4.5 cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-<sup>β</sup>Ala-) 8

##### *local elevation* (LE)

Das Clustering der LE-Trajektorie ergibt insgesamt 14 Clusterfamilien, so dass auf eine ausreichende Durchsuchung des Konformationsraums geschlossen werden kann. Die zentralen Strukturen der drei höchst populierten Cluster mit Populationen von 37.8% (LE1), 10.5% 2% und 6.6% (LE3) wurden als Startstrukturen für die folgende RMD-Simulation verwendet.

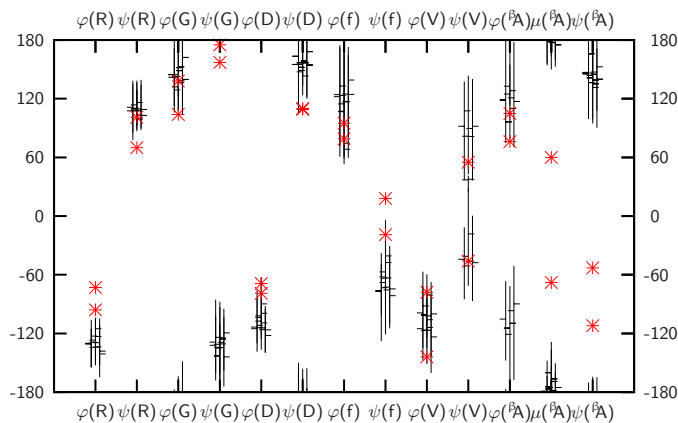
Die Ergebnisse der Clusteranalyse sind in Tabelle 67 mit den RMSD-Werten und NOE-Verletzungen zusammengefasst. Mit den Startstrukturen LE1 und LE3 ist die Identifikation einer Hauptkonformation während der RMD-Simulation möglich. Bei der Startstruktur LE2 ergeben sich zwei annähernd gleich besetzte Clusterfamilien. Alle zentralen Strukturen besitzen keine konformationelle Ähnlichkeit zu den Referenzstrukturen und sehr hohe NOE-Verletzungen.

Tabelle 67: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der zentralen Strukturen der *local elevation* RMD mit anschließender RMD für c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum$ NOE [pm]
			K1	K2		
LE1	2	72.8	182	167	8	285
		25.6	167	159	8	329
LE2	3	49.6	175	183	7	271
		34.4	178	164	7	314
		4.8	177	166	8	291
LE3	2	66.4	187	199	7	278
		29.6	174	174	9	337

Ein Vergleich der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Clusterstrukturen mit denen der Referenzstrukturen ergibt teilweise große Abweichungen für nahezu alle Torsionswinkel (siehe Abbildung 87). Die Torsionswinkel  $\mu$ (<sup>β</sup>Ala) und  $\psi$ (<sup>β</sup>Ala) zeigen keinerlei Übereinstimmung mit den Referenzstrukturen; dieses Segment besitzt eine ungewöhnliche, vollständig gestreckte Konformation.

Die Wasserstoffbrücken der Referenzstrukturen können während keiner RMD-Simulation beobachtet werden (siehe Tabelle 191). Die Bildung von H-Brücken zwischen den Sei-

Abbildung 87: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der LE-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8**.



tenketten von Asp und Arg stellt sich bei einer genaueren Betrachtung als Ursache für diese starken Abweichungen heraus.

Die Ergebnisse der Konformationsanalyse für das Peptid **8** weichen mit der LE-Methode stark von den Ergebnissen von Schumann ab und erweisen sich aufgrund der sehr hohen NOE-Verletzungen als unbefriedigend. Zwar wird der Konformationsraum durch das LE sehr gut durchsucht, doch werden aufgrund der Simulation im Kontinuum H-Brücken zwischen den Seitenketten der Aminosäuren gebildet, die eine Verzerrung des Rückgrats bewirken.

#### 4D-MD-Simulation

Das Clustering der RMD-Simulation der finalen Struktur nach der 4D-RMD-Simulation ergibt einen hoch populierten Cluster, dessen zentrale Struktur geringe NOE-Verletzungen und eine sehr gute konformationelle Übereinstimmung mit den Referenzstrukturen zeigt (siehe Tabelle 68). Die zentralen Strukturen der beiden Nebenkongformationen weisen erhebliche strukturelle Abweichungen von den Referenzstrukturen auf und würden aufgrund der hohen NOE-Verletzungen bei einer Konformationsanalyse nicht berücksichtigt werden.

Ein grafischer Vergleich der Rückgratstorsionswinkel mit denen der Referenzstrukturen ist in Abbildung 88 dargestellt. Die Torsionswinkel korrelieren sehr gut mit denen der Referenzstrukturen, und der Grund für die erhöhten RMSD-Werte für die Nebenkongformationen ist ersichtlich. Bei dieser Methode werden zusätzlich negative Werte für den Torsionswinkel  $\mu(\beta\text{Ala})$  populiert. Diese Variation bewirkt gleichzeitig eine Änderung

Tabelle 68: Ergebnisse der Clusteranalyse sowie die positiven NOE-Verletzungen der finalen Struktur des 4D-RMD mit anschließender RMD für c-(RGDFV $\beta$ A) **8**.

Struktur	Cluster	Population [%]	RMSD [pm]		NOE-Verletzungen	$\sum\text{NOE}$ [pm]
			K1	K2		
4D	3	67.2	51	80	3	85
		5.6	157	149	5	223
		4.8	134	142	5	135

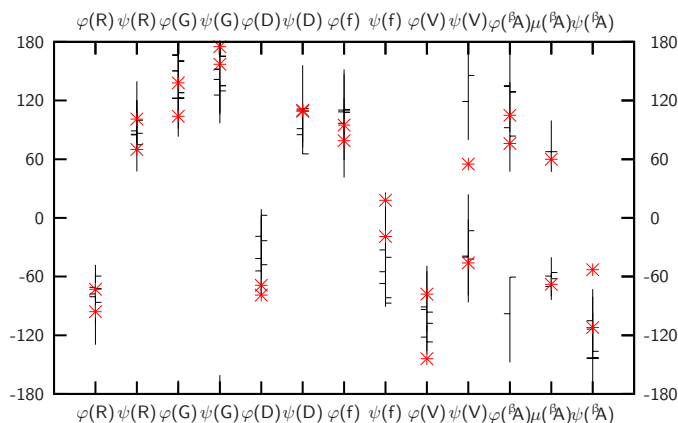


Abbildung 88: Vergleich der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\mu$  der zentralen Clusterstrukturen (horizontale Linien) und deren Minimal- und Maximalwerten (senkrechte Linien) nach der 4D-RMD-Methode mit den von Schumann gefundenen Werten (Sterne) für  $c\text{-(RGDFV}^{\beta\text{Ala}}\text{) 8}$ .

der räumlichen Anordnung der Peptidbindung zwischen Val und  $\beta\text{Ala}$  und erhöht den RMSD-Wert.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD-Simulation lassen den Schluss zu, dass eine  $\beta\text{II}$ -Schleife mit Asp in  $i+1$  Position von einer  $\text{II-}\alpha_{\text{RS}}$ -Schleife überlagert wird (siehe Tabelle 192). Dieses Verhalten weicht etwas von den Referenzstrukturen ab, doch kann insgesamt eine sehr gute Korrelation festgestellt werden.

## 5.5 Zusammenfassung

Die zyklischen Peptide  $c\text{-(RGDFV)}$ ,  $c\text{-(RGDFVG)}$ ,  $c\text{-(RGDF}^{\beta\text{Ala}}\text{)}$ ,  $c\text{-(RGDF}^{\beta\text{L}}\text{)}$  und  $c\text{-(RGDFV}^{\beta\text{Ala}}\text{)}$  wurden bereits von Müller und Schumann im Rahmen ihrer Promotionen konformationell untersucht.<sup>[139,289]</sup> Ihre Ergebnisse dienen als Referenz der hier durchgeführten Konformationsanalysen.

Als Grundlage für das Studium des Einflusses der Startstruktur auf die Konformationsanalyse wurde eine vollständig gestreckte Konformation gewählt. Diese nach einer kurzen Energieminimierung generierten Strukturen wurden als Ausgangskonformationen

für verschiedene Algorithmen zur Generierung von Startstrukturen für eine abschließende RMD-Simulation verwendet. Ein sehr rechenintensiver Algorithmus, die systematische Durchsuchung des Konformationsraums, wurde auf zwei unterschiedliche Weisen genutzt. Zum einen wurde nach der Wahl einer geeigneten Konformation anhand eines Energiekriteriums direkt eine RMD-Simulation zur Konformationsanalyse verwendet. Zum anderen wurde vor dieser abschließenden RMD ein *simulated annealing* zur weiteren Verfeinerung der Konformation durchgeführt.

Als weiterer Algorithmus wurden zwei verschiedene Arten des *simulated annealing* genutzt, um jeweils 1000 Strukturen auf Basis einer Strukturvorlage bzw. zufallsbasiert zu generieren. Durch Clustering dieser Strukturen wurde eine repräsentative Startstruktur für die abschließende RMD gewählt.

Eine Kombination aus DG, SA und RMD kann als klassische NMR-Konformationsanalyse angesehen werden und diente zum Studium des Einflusses zeitunabhängiger *NOE-restraints* während der RMD-Simulationen.

Zwei spezielle Arten der MD-Simulationen, die von GROMOS96 angeboten werden, sind die LE- und 4D-Simulationen. Das Potential der LE-Simulationen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig ausgeschöpft werden, da auf eine aufwendige Anpassung der Simulationsvariablen verzichtet wurde. Zusätzlich erwies sich die Simulation im Kontinuum als problematisch, da häufig starke Abweichungen von den Referenzstrukturen gefunden wurden. Die Erhöhung der konformationellen Freiheitsgrade durch eine 4D-RMD-Simulation erwies sich in einigen Fällen als sehr nützlich und ergab sinnvolle Ergebnisse.

Im Allgemeinen hat sich für die Konformationsanalyse der gewählten zyklischen Peptide die DG/SA-Methode als äußerst vorteilhaft erwiesen. Dieses Verfahren erzeugt mit hoher Wahrscheinlichkeit sinnvolle Startstrukturen mit niedrigen NOE-Verletzungen für die abschließende RMD-Simulation und benötigt im Vergleich zu den anderen Methoden nur eine geringe Rechenleistung. Sehr gute Ergebnisse wurden mit diesem Verfahren für das Peptid c-(RGDFV<sup>βA</sup>) gefunden. Mit diesem Algorithmus fand sich neben den Methoden *ab initio* SA und 4D-RMD eine sehr gute Korrelation mit den Referenzstrukturen.

Die Verwendung von zeitabhängigen *NOE-restraints* während der RMD ergibt in allen Fällen mit Ausnahme der Konformationsstudien von c-(RGDFV) eine bessere Korrelati-

on mit den Referenzdaten. Zusätzlich kann in allen Fällen die Flexibilität des Peptids genauer untersucht werden als mit zeitunabhängigen *restraints*.

Die systematische Durchsuchung des Konformationsraums zeigt für alle gewählten Peptide eine schlechte Korrelation mit den Referenzdaten und im Vergleich zu den anderen Methoden höhere NOE-Verletzungen. Die zusätzliche Strukturverfeinerung durch ein SA konnte für c-(RGDFV) und c-(RGDFVG) die Qualität der Konformationsanalyse aufgrund niedrigerer NOE-Verletzungen etwas verbessern, doch fand sich auch hier keine gute Übereinstimmung mit den Referenzstrukturen. In dieser Arbeit wurde eine rein objektive Auswahl der fünf energetisch niedrigsten Startstrukturen für die RMD angewandt. Die Gefahr einer subjektiven Wahl ist bei der Anwendung dieses Verfahrens groß. Zudem stellt dieser Algorithmus das rechenintensivste der verwendeten Verfahren dar und kann für große Moleküle aufgrund der immanenten kombinatorischen Explosion nicht angewandt werden.

Die *simulated annealing* Methoden (*ab initio* und *random*) ergeben teilweise eine gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten und recht niedrige NOE-Verletzungen. Erstaunlicherweise ist das vorlagenbasierte *ab initio* SA dem zufallsbasierten *random* SA bei den Peptiden c-(RGDFV), c-(RGDF<sup>β</sup>A) und c-(RGDFV<sup>β</sup>A) überlegen, und das Potential des *random* SA entfaltet sich erst bei den etwas größeren Molekülen c-(RGDFVG) und c-(RGDFV<sup>β</sup>A).

Die LE-Simulation kann, wie bereits oben beschrieben, nicht überzeugen. Auf eine systembezogene Anpassung der Simulationsparameter wurde hier verzichtet, und die Simulation im Kontinuum verzerrt häufig die Peptidkonformation durch die Bildung von intraresidualen H-Brücken mit den Seitenketten. Zusätzlich werden bei einigen Peptiden sehr hohe NOE-Verletzungen für die Hauptkonformere beobachtet. Die 4D-RMD-Simulation ergibt für die kleineren Peptide c-(RGDFV) und c-(RGDF<sup>β</sup>L) sehr schlechte Korrelationen mit den Referenzstrukturen. Zusätzlich sind die NOE-Verletzungen im Vergleich zu den anderen Methoden etwas höher. Bei größeren Systemen wie c-(RGDFVG) und insbesondere c-(RGDFV<sup>β</sup>A) ist die Korrelation mit den Referenzstrukturen gut bis sehr gut, und es werden geringere NOE-Verletzungen beobachtet. Dieses Verhalten kann aus der Verwendung der 4D-*restraints* für die nichtbindenden Interaktionen resultieren, da es bei den kleineren Peptiden wahrscheinlicher ist, dass Energiebarrieren nur durch Bindungsbrü-

che überwunden werden können. Dies wurde bei den Simulationen jedoch nicht erlaubt und könnte weitere Vorteile einbringen.

Die gute Korrelation der Ergebnisse der DG/SA-Methode mit den Referenzstrukturen gewährleistet eine Komparabilität mit Strukturdaten aus anderen Quellen. Weiterhin wird mit diesem Verfahren die Objektivität einer Konformationsanalyse gewährleistet. Aus diesem Grund wird die DG/SA-Methode in dieser Arbeit als Grundlage zur Konformationsanalyse von Peptiden verwendet.

## 5.6 Experimenteller Teil

Die experimentell bestimmten NOE-Distanzen in DMSO-D<sub>6</sub> der zyklischen RGD-Peptide c-(RGDFV) **4**, c-(RGDFVG) **5**, c-(RGDF<sup>β</sup>A) **6**, c-(RGDF<sup>β</sup>L) **7** und c-(RGDFV<sup>β</sup>A) **8** wurden den Dissertationen von Müller und Schumann entnommen und die Maximaldistanzen anhand der in GROMOS<sup>++</sup> implementierten Pseudoatom- und Multiplizitätskorrekturen neu berechnet.<sup>[139,231,289]</sup> Diese wurden für alle molekularmechanischen Rechnungen verwendet und sind in den Tabellen 70 bis 74 zusammengefasst.

Die Startstruktur für alle Rechnungen wurde mit XPLOR-NIH generiert.<sup>[73,227]</sup> Alle Bindungslängen und Seitenkettentorsionswinkel wurden entsprechend der Topologie als Standardwerte eingesetzt. Die Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  erhielten Werte, die einer vollständig gestreckten Konformation entsprechen. Anschließend wurde die Struktur mit 200 Schritten energieminiert.

### 5.6.1 Systematische Durchsuchung des Konformationsraums

Die systematische Durchsuchung des Konformationsraums wurde mit dem Programm Insight<sup>®</sup> II auf einer Silicon Graphics Workstation durchgeführt. Variiert wurden die Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  in Schritten von jeweils 45°. Enthielt das zyklische Peptid eine  $\beta$ -Aminosäure, so wurde zusätzlich der Torsionswinkel  $\mu$  variiert. Als Kraftfeld für die *conjugate gradient* Energieminimierungen ( $\leq 500$  Schritte) im Kontinuum mit fester Dielektrizitätskonstante von  $\varepsilon = 45$  wurde das Kraftfeld Amber verwendet. Die fünf

energetisch günstigsten Konformationen wurden für die anschließenden Rechnungen der Trajektorie entnommen.

Das *simulated annealing* der sSSA-Methode wurde mit dem Programm XPLOR-NIH durchgeführt.<sup>[73]</sup> Die initiale Temperatur betrug 1000 K. Die anschließende Kühlphase auf 100 K enthielt insgesamt 2000 Schritte. Mit diesem Algorithmus wurden insgesamt 1000 Strukturen generiert, die das Akzeptanzkriterium erfüllen. Dieses Kriterium enthält als Obergrenze für Abweichungen von den NOE-Distanzen 50 pm, von den Bindungslängen 5 pm und für die Winkel, Torsionswinkel und *impropers* 5°.

Die generierten Strukturen wurden anhand ihrer Rückgratstorsionswinkel wie in Abschnitt 5.6.4 geclustert.

### 5.6.2 DG und SA

Die DG- und SA-Rechnungen wurden mit dem Programm XPLOR-NIH durchgeführt.<sup>[73,227]</sup> Eine schematische Darstellung der Vorgehensweise ist in Abbildung 89 dargestellt.

Die DG/SA-Methode beinhaltet die Generierung einer gestreckten Startkonformation, einer DG und ein anschließendes SA. Das SA wurde mit einer anfänglichen Temperatur von 2000 K für 1000 Schritte begonnen. Darauf folgte ein Abkühlprozess von 1000 Schritten auf eine finale Temperatur von 100 K mit Dekrementen von jeweils 50 K. Insgesamt wurden so 1000 Konformationen berechnet, die dem Akzeptanzkriterium (siehe Abschnitt 5.6.1) genügen. Die Analyse dieser erfolgte durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkeln mit einem *cutoff* von 60°. Die zentralen Strukturen der Cluster wurden als Startstrukturen für folgende Rechnungen verwendet.

Das *ab initio* SA begann mit 6000 Schritten bei einer initialen Temperatur von 1000 K. Anschließend wurde das System innerhalb von 3000 Kühlritten auf eine finale Temperatur von 100 K mit Dekrementen von 50 K gekühlt. Das *random* SA begann mit einer initialen Temperatur von 1000 K. Die generierten Strukturen wurden durch einen weiteren DG/SA-Schritt abgekühlt, dessen Parameter denen der DG/SA-Methode entsprechen. Die anschließenden Analyseschritte wurden analog zur DG/SA-Methode durchgeführt.

## 5.6.3 MD

Die RMD-Simulationen wurde mit dem Programmpaket GROMOS96 durchgeführt; basierend auf dem Kraftfeld GROMOS45A3 mit verbesserten Parametern für DMSO durchgeführt.<sup>[82,228,229]</sup> Nach einer Relaxation der Solvenskoordinaten mit fixierten Peptidkoordinaten durch eine *steepest descent* Energieminimierung mit maximal 1000 Schritten folgte die Aufheizphase zur Äquilibration des gesamten Systems. Sukzessiv wurde mittels kurzer MD-Simulationen und einer starken Kopplung an das externe Heizbad mit einer Relaxationszeit von 0.01 ps die Systemtemperatur in 50 K-Schritten auf 300 K erhöht. Die Peptidkoordinaten wurden dabei durch Fixierung mit abnehmenden Kraftkonstanten langsam relaxiert. Die Parameter für die Aufheizphase sind in Tabelle 69 zusammengefasst.

Tabelle 69: Parameter der Aufheizphase von RMD-Simulationen.

Schritt	Dauer $t$ [ps]	Zeitintervall $\delta t$ [fs]	Temperatur $T$ [K]	Kraftkonstante $k_r$ [kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-1</sup> ]
1	2	1	50	25000
2	5	1	100	10000
3	5	1	150	5000
4	5	1	200	1000
5	5	1	250	100
6	5	1	300	10
7	10	2	300	10

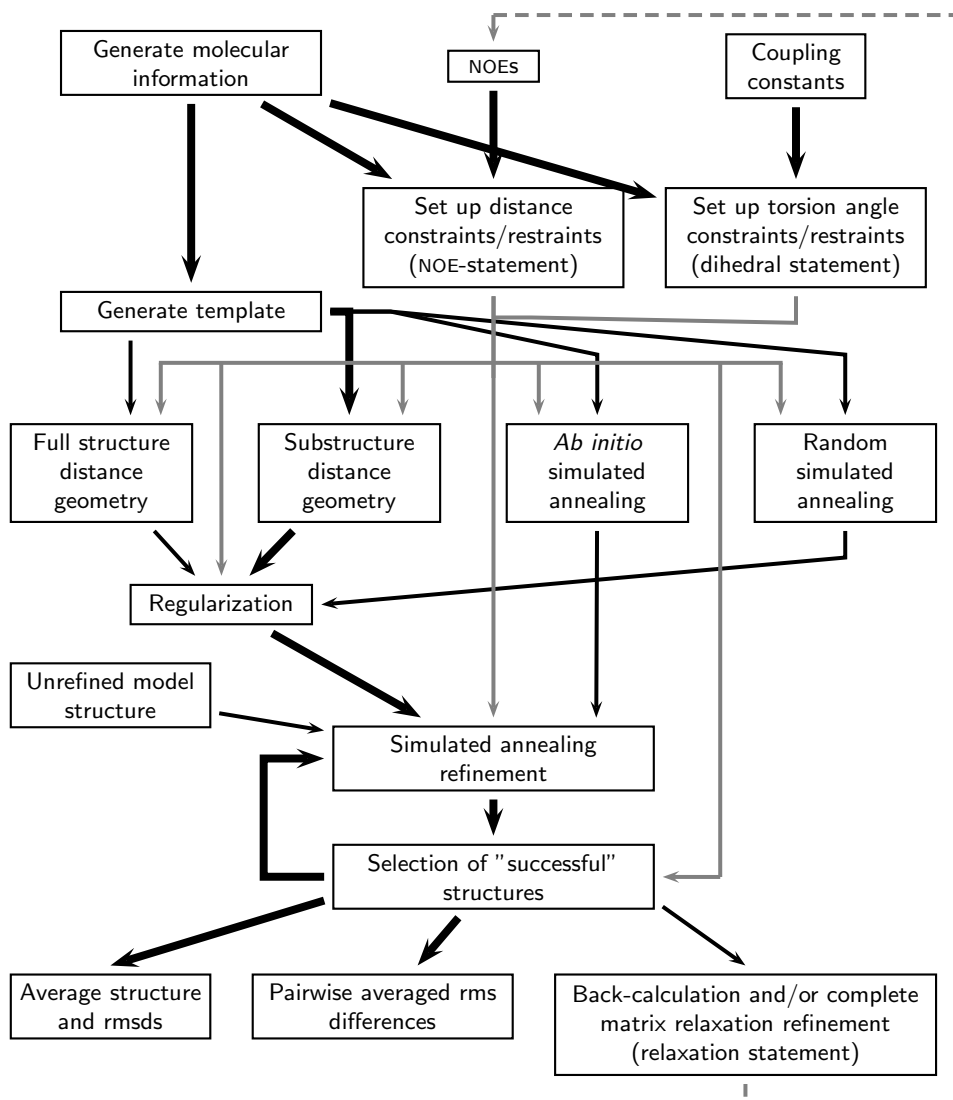
Das äquilibrierte System wurde anschließend 2.5 ns mit einer Relaxationszeit von 0.1 ps schwach an das externe Temperaturbad von 300 K gekoppelt. Das externe Druckbad sorgte mit einer ebenfalls schwachen Kopplung an das System mit einer Relaxationszeit von 0.5 ps für einen konstanten Druck von 101325 Pa. Die isotherme Kompressibilität wurde für die Simulation auf 4.575 kJ · mol<sup>-1</sup> · nm<sup>-3</sup> festgesetzt. Der SHAKE-Algorithmus wurde zur Verlängerung des Zeitintervalls auf 2 fs während der Simulationen mit einer Toleranz von 10<sup>-4</sup> verwendet. Die experimentellen NOE-Distanzen wurden mit einer Toleranz von 10% mit Kraftkonstanten von 8000 kJ · mol<sup>-1</sup> · nm<sup>-1</sup> genutzt. Um den Einfluss von zeitlich gemittelten *restraints* zu bestimmen, wurden ebenfalls MD-Simulationen ohne zeitliche Mittelung berechnet. Die Pseudoatom- und Multiplizitätskorrekturen von

GROMOS<sup>++</sup> wurden zu den experimentellen NOE-Distanzen addiert.<sup>[231,290,291]</sup> Die Kraftkonstante wurde für *restraints* zwischen zwei Amidprotonen halbiert.

Die *local elevation* MD-Rechnungen wurden mit den zuvor genannten Parametern durchgeführt.<sup>[270]</sup> Abweichend wurde kein explizites Solvens berechnet, so dass ein *in continuo*-System mit konstanter Dielektrizitätskonstante von  $\varepsilon = 45$  verwendet wurde. Die gaußförmige Strafenergiefunktion erhielt eine Kraftkonstante von  $42 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .<sup>[42]</sup> Die Schrittweite für die konformationellen Änderungen aller Rückgratstorsionswinkel betrug  $22.5^\circ$ . Insgesamt wurden so 200 ps simuliert.

Eine 200 ps 4D-RMD-Simulation bei 300 K wurde mit dem Programm GROMOS96 und den zuvor genannten Parametern der RMD-Simulation zur Generierung von Startstrukturen verwendet, deren finale Struktur in folgenden Rechnungen als Startstruktur verwendet wurde.<sup>[273]</sup> Alle Peptidatome erhielten eine zusätzliche Dimension zur Erhöhung der Freiheitsgrade. Die Solvensatome verblieben im dreidimensionalen Koordinatensystem. Die 4D-Projektionskonstante war für alle Atome gleich und wurde auf  $50000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$  gesetzt. Die initialen 4D-Koordinaten wurden auf Null gesetzt und die anfänglichen Geschwindigkeiten aus der Maxwell-Verteilung bei einer Temperatur von 10 K berechnet. Das Temperaturbad von 10 K der vierten Dimension wurde mit einer Austauschzeit von 0.1 ps an das System gekoppelt. Berücksichtigt wurden bei der Simulation die nichtbindenden sowie die 4D-*restraints* Interaktionen.



Abbildung 8g: Schematische Darstellung der Generierung der Startstrukturen mit DG/SA.<sup>[227]</sup>

### 5.6.4 Analyse

Das Clustering jeder zehnten Struktur der berechneten Trajektorien wurde bezüglich ihrer Rückgratstorsionswinkel bzw. Rückgratatomkoordinaten mit einem *cutoff* von 60° bzw. 60 pm durchgeführt.<sup>[77]</sup> Hierfür wurde der *nearest neighbour* Algorithmus verwendet.<sup>[292]</sup>

Die Wasserstoffbrücken und NOE-Verletzungen wurden mit dem Programm hbond bzw. noe von GROMOS<sup>++</sup> analysiert. Das Kriterium für eine H-Brücke war 250 pm und 135°. Der gewichtete Abstand wurde mit einem  $r^{-6}$ -Mittel berechnet.

Die RMSD-Werte wurden mit dem Programm PyMOL anhand der Rückgratatome C, O, N und C<sup>α</sup> berechnet.<sup>[293]</sup> Durch die Verwendung des Sauerstoffatoms wird der RMSD-Wert aussagekräftiger bezüglich der räumlichen Ausrichtung der Peptidbindungen.

Tabelle 70: Zusammenfassung der von Müller gemessenen NOE-Distanzen (exp) und der Neuberechneten korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) für c-(RGDFV) **4** in DMSO.<sup>[289]</sup>

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]	
		exp	max			exp	max
Arg H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	267	294	Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	277	305
Arg H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	268	295	Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	263	289
Arg H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	287	316	Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	296	326
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	346	518	Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α3</sup>	232	255
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	268	421	Asp H <sup>N</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	279	435
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	320	485	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	291	449
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	234	257	D-Phe H <sup>α</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	242	389
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>N</sup>	278	306	Val H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	206	226
Gly H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	187	206	Val H <sup>N</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	317	482
Gly H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α3</sup>	274	301	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	239	263
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	335	504	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	258	284
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	391	573	Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>β</sup>	265	292

Tabelle 71: Zusammenfassung der von Müller gemessenen NOE-Distanzen (exp) und der Neuberechneten korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) für c-(RGDFVG) **5** in DMSO. [289]

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]	
		exp	max			exp	max
Arg H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	274	301	D-Phe H <sup>N</sup>	Val H <sup>N</sup>	365	402
Arg H <sup>N</sup>	Gly Q <sup>α</sup>	250	399	D-Phe H <sup>N</sup>	Asp H <sup>N</sup>	360	396
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	272	426	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	280	436
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	310	473	D-Phe H <sup>N</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	390	572
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	276	431	D-Phe H <sup>α</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	230	374
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	305	467	Val H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	222	244
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>δ</sup>	370	547	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	280	308
Gly H <sup>N</sup>	Asp H <sup>N</sup>	288	317	Val H <sup>N</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	290	448
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	236	260	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	335	369
Gly H <sup>N</sup>	Gly Q <sup>α</sup>	282	438	Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>β</sup>	266	293
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	365	541	Gly H <sup>N</sup>	Val H <sup>N</sup>	282	310
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	390	572	Gly H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	375	413
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	288	317	Gly H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	280	308
Asp H <sup>N</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	305	467	Gly H <sup>N</sup>	Gly Q <sup>α</sup>	253	402
Asp H <sup>α</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	278	433	Gly H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	406	447

Tabelle 72: Zusammenfassung der von Schumann gemessenen NOE-Distanzen (exp) und der Neuberechneten korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) für c-(RGDF<sup>β</sup>A) **6** in DMSO. [139]

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]	
		exp	max			exp	max
Arg H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	285	314	Asp H <sup>N</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	253	312
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	303	374	Asp H <sup>α</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	243	300
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	226	279	D-Phe H <sup>N</sup>	βAla H <sup>N</sup>	276	304
Arg H <sup>N</sup>	βAla Q <sup>α</sup>	230	284	D-Phe H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	228	251
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	281	347	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>β3</sup>	276	304
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	241	297	D-Phe H <sup>α</sup>	D-Phe H <sup>β2</sup>	245	270
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	236	260	βAla H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	313	344
Gly H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	258	284	βAla H <sup>N</sup>	βAla H <sup>β3</sup>	285	314
Gly H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α3</sup>	331	364	βAla H <sup>N</sup>	βAla H <sup>β2</sup>	292	321
Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	304	334	βAla H <sup>α3</sup>	βAla H <sup>β2</sup>	243	267
Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α3</sup>	252	277	βAla H <sup>α2</sup>	βAla H <sup>β3</sup>	254	279
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	259	285				

Tabelle 73: Zusammenfassung der von Schumann gemessenen NOE-Distanzen (exp) und der Neuberechneten korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) für c-(RGDf<sup>β</sup>L) **7** in DMSO. [139]

Atom 1	Atom 2	r [pm]		Atom 1	Atom 2	r [pm]	
		exp	max			exp	max
Arg H <sup>N</sup>	βLeu H <sup>N</sup>	390	429	Asp H <sup>α</sup>	Asp H <sup>β2</sup>	237	261
Arg H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	254	279	Asp H <sup>α</sup>	Asp H <sup>β3</sup>	260	286
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	370	547	D-Phe H <sup>N</sup>	βLeu H <sup>N</sup>	319	351
Arg H <sup>N</sup>	βLeu Q <sup>α</sup>	228	372	D-Phe H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	220	242
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	252	401	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	269	296
Arg H <sup>α</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	241	387	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>β2</sup>	350	385
Gly H <sup>N</sup>	Asp H <sup>N</sup>	384	422	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>β3</sup>	270	297
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	221	243	D-Phe H <sup>α</sup>	D-Phe H <sup>β2</sup>	272	299
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	288	446	D-Phe H <sup>α</sup>	D-Phe H <sup>β3</sup>	243	267
Gly H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>γ</sup>	313	476	βLeu H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	204	224
Gly H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	232	255	βLeu H <sup>N</sup>	βLeu Q <sup>α</sup>	238	384
Asp H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>N</sup>	233	256	βLeu H <sup>N</sup>	βLeu H <sup>β</sup>	291	230
Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α2</sup>	385	424	βLeu H <sup>N</sup>	βLeu H <sup>γ</sup>	287	316
Asp H <sup>N</sup>	Gly H <sup>α3</sup>	242	266	βLeu Q <sup>α</sup>	βLeu H <sup>β</sup>	225	368
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	255	281	βLeu H <sup>β</sup>	βLeu H <sup>γ</sup>	224	246
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>β2</sup>	289	318	βLeu H <sup>β</sup>	βLeu M <sup>δ1</sup>	263	379
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>β3</sup>	299	329	βLeu H <sup>β</sup>	βLeu M <sup>δ2</sup>	236	342

Tabelle 74: Zusammenfassung der von Schumann gemessenen NOE-Distanzen (exp) und der Neuberechneten korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) für c-(RGDv<sup>β</sup>A) **8** in DMSO. [139]

Atom 1	Atom 2	r [pm]		Atom 1	Atom 2	r [pm]	
		exp	max			exp	max
Arg H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	338	372	D-Phe H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	228	251
Arg H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	288	317	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	348	383
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	304	465	D-Phe H <sup>N</sup>	D-Phe Q <sup>β</sup>	253	378
Arg H <sup>N</sup>	βAla H <sup>α3</sup>	279	307	Val H <sup>N</sup>	βAla H <sup>N</sup>	263	289
Arg H <sup>N</sup>	βAla H <sup>α2</sup>	247	272	Val H <sup>N</sup>	D-Phe H <sup>α</sup>	241	265
Arg H <sup>N</sup>	Arg Q <sup>β</sup>	275	430	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	294	323
Gly H <sup>N</sup>	Asp H <sup>N</sup>	410	451	Val H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	275	303
Gly H <sup>N</sup>	Arg H <sup>α</sup>	240	264	Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>β</sup>	246	271
Gly H <sup>N</sup>	Gly Q <sup>α</sup>	272	389	Val H <sup>α</sup>	Val Q <sup>γ</sup>	235	569
Asp H <sup>N</sup>	Gly Q <sup>α</sup>	274	391	Val H <sup>β</sup>	Val Q <sup>γ</sup>	210	531
Asp H <sup>N</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	254	403	βAla H <sup>N</sup>	Val H <sup>α</sup>	253	278
Asp H <sup>N</sup>	Asp H <sup>α</sup>	257	283	βAla H <sup>N</sup>	βAla Q <sup>β</sup>	272	389
Asp H <sup>α</sup>	Asp Q <sup>β</sup>	238	384	βAla H <sup>N</sup>	Val H <sup>β</sup>	293	322
D-Phe H <sup>N</sup>	Val H <sup>N</sup>	298	328	βAla Q <sup>α</sup>	βAla Q <sup>β</sup>	255	461

# 6

## Calciumabhängige Konformationsänderungen zyklischer, unpolarer Peptide

Wasser ist mit einem Anteil von ca. 70% der Hauptbestandteil lebender Organismen. Eine Elementaranalyse der übrigen Substanz ergibt, dass die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel insgesamt etwa 92% der Biotrockenmasse ausmachen (siehe Tabelle 75). Daneben existieren in geringeren Konzentrationen Ionen wie Calcium, Kalium, Magnesium und Natrium. Lebensfähig ist der Organismus allein durch diese Elemente jedoch nicht, da eine begrenzte Anzahl an so genannten Spurenelementen essentiell für die biologische Funktion einer Vielzahl von Enzymen ist. Zu diesen Spurenelementen gehören unter anderem Fluor, Eisen, Kobalt, Mangan, Zinn, Silizium, Kupfer und Chrom.

Tabelle 75: Chemische Zusammensetzung des menschlichen Körpers.<sup>[19]</sup>

Element	<i>w</i> [%]	Element	<i>w</i> [%]
C	61.7	K	1.3
N	11.0	S	1.0
O	9.3	Cl	0.7
H	5.7	Na	0.7
Ca	5.0	Mg	0.3
P	3.3		

Das Calcium ist neben dem Eisen das wohl bedeutendste und vielseitigste Element in ionischer Form im Organismus. Neben der Hauptfunktion als Skelettbildner (Biomineralisation) ist es an vielen fundamentalen physiologischen Vorgängen beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Zellteilung, hormonale Sekretion, Blutgerinnung, Antikörperreaktion, Photosynthese, Sinneswahrnehmung, Energieerzeugung und Muskelkontraktion. Verallgemeinert fungiert das Calcium im Körper als Informationszweischenträger (*second/third messenger*), Auslösefaktor (*trigger*), Regulator und Signalverstärker. [294]

Die intrazelluläre Gesamtkonzentration an freien und gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beträgt ca. 1 mM, während die extrazelluläre ca. 2 mM beträgt. Die Konzentration an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytosol kann um zwei bis vier Größenordnungen geringer sein und beträgt ca. 0.1  $\mu\text{M}$ . Der Konzentrationsunterschied über zelluläre Membranen wird durch aktiven Transport mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen aufrechterhalten und kann mehr als drei Größenordnungen betragen.

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation ist ein zweiwertiges Ion ohne Redoxfunktion mit einem Ionenradius von ca. 110 pm. Es besitzt in Komplexen häufig recht irreguläre Geometrien mit Koordinationszahlen von 7 oder 8. In biologischen Systemen komplexiert Calcium bevorzugt mit Wasser, dem Carbonylsauerstoffatom von Peptidbindungen sowie Hydroxyl- und Carboxylatresten. Ein gut untersuchtes Beispiel für die Koordination von Calciumionen ist das in der glatten Muskulatur vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -bindende Parvalbumin, das häufig mehrere benachbarte calciumselektive „EF-Hand“-Bindungsstellen besitzt (siehe Abbildung 90). Das  $\text{Mg}^{2+}$  besitzt im Komplex mit Parvalbumin eine reguläre oktaedrische Konfiguration. Im Gegensatz dazu wird das  $\text{Ca}^{2+}$  in einer weniger regulären Konfiguration mit einer Koordinationszahl von 8 komplexiert und lässt das Protein die Komplexgeometrie bestimmen. Dadurch wird eine höhere Geschwindigkeit der Komplexierung erreicht, woraus ein schnellerer Informationsaustausch resultiert. [295]

Ein Beispiel für die strukturstabilisierende Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kations ist das Protein  $\alpha$ -Lactalbumin (siehe Abbildung 90), eine Untereinheit des Enzyms Lactose-Synthase. [296,297] Die Bindung des Kations bewirkt eine Erhöhung der temperaturbedingten Denaturierung von 20 °C auf 70 °C und die Rückfaltung zur nativen Konformation ist nur in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen möglich. [298,299] Die Kristallstruktur der calciumbindenden Schleife im  $\alpha$ -Lactalbumin unterscheidet sich von den bekannten calciumselektiven

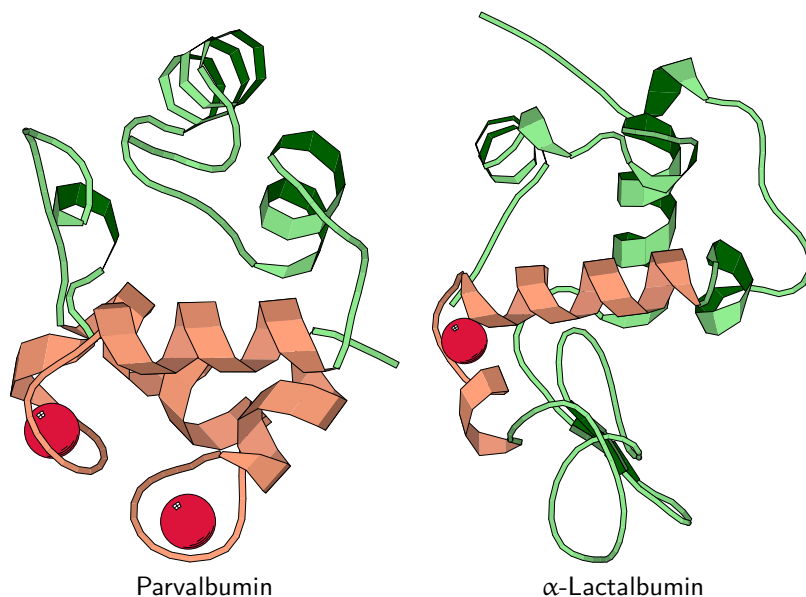


Abbildung 90: Röntgenstruktur von Parvalbumin mit einer Auflösung von 160 pm (links) und humanen  $\alpha$ -Lactalbumin mit einer Auflösung von 115 pm (rechts). Die Kationen sind als rote Kugeln und die „EF-Hand“-Bindungsstellen orange dargestellt (PDB 1B8R,1B9O).<sup>[300,301]</sup>

„EF-Hand“-Bindungsstellen. Sie enthält einen hohen Anteil polarer Aminosäuren und wird von einer  $\alpha$ - und einer kurzen  $3_{10}$ -Helix flankiert.<sup>[302]</sup>

Die wichtigste Rolle des Calciums im Körper besteht in der Beteiligung an strukturbildenden Bestandteilen wie Knochen und Schalen. Dies ist auf die Unlöslichkeit seiner Carbonate und Phosphate (Calcit und Apatit) zurückzuführen, die zusammen mit einer organischen Matrix (Templat) ein organisch-anorganisches Kompositsystem bilden. Zu diesen polymeren organischen Matrixmaterialien gehören sowohl Proteine als auch Lipide und Polysaccharide. Strukturuntersuchungen an Proteinen, die morphologisch mit dem Biomineral interagieren, haben gezeigt, dass diese ungeordnete und offene Konformationen favorisieren.<sup>[303,304]</sup> Dennoch ist es diesen Proteinen und Peptiden möglich, das Kristallwachstum oder Ablagerung anamorph gebildeter Kristallkeime direkt zu beeinflussen, so dass z. B. biologischer Calcit anstatt als rhomboedrischer Kalkspat in funktionell sinnvoller Form kristallisiert.

Das Wirkstoffdesign fokussiert das Interesse auf molekulare Bausteine, die ungewöhn-

liche Konformationen induzieren und stabilisieren können. Von großem Interesse für peptidische Wirkstoffe sind  $\beta$ -Aminosäuren mit Seitenketten an C<sup>2</sup> und/oder C<sup>3</sup> (siehe Abschnitt 3.1.1) und konformationell eingeschränkte  $\alpha,\alpha$ -dialkylierte Aminosäuren (siehe Abschnitt 3.1.2). Die strukturinduzierende Wirkung gelöster Kationen im Organismus wird jedoch im Allgemeinen vernachlässigt. Die durch Kationen hervorgerufenen konformationellen Änderungen können jedoch einen Verlust der biologischen Aktivität des Wirkstoffs nach sich ziehen.

## 6.1 Zielsetzung

In seiner Dissertation untersuchte Malešević den konformationellen Einfluss von  $\beta$ -Homoaminosäuren an zyklischen Modellpeptiden.<sup>[137]</sup> Zyklische Peptide stellen eine herausragende Möglichkeit dar, konformationelle Eigenschaften einzelner Aminosäuren zu studieren und durch Kombinatorik bioverfügbare Wirkstoffe zu entwickeln. So können durch eine geschickte Wahl von Sequenz und Ringgröße Selektivität und Aktivität gesteuert werden.

An die synthetisierten Modellpeptide wurden vor der Synthese unterschiedliche Anforderungen gestellt, um die anschließenden spektroskopischen Untersuchungen zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. Ein wichtiger Punkt war die Verwendung von Gly, um Epimerisierung während des Ringschlusses zu vermeiden. Weiterhin wurden Aminosäuren mit Seitenkettenfunktionalitäten vermieden, um zusätzliche spektroskopische Effekte zu vermeiden. Zum Studium der konformationellen Präferenz enthielten alle Peptide die Aminosäure Pro, die durch das  $\beta$ -Homoanalogon  $\beta^h$ Pro substituiert wurde. Die Peptide in Tabelle 76 wurden von Malešević synthetisiert.

Tabelle 76: Synthetisierte zyklische Modellpeptide.

	$\alpha$ -Aminosäuren	Analog
Tetrapeptid	cyclo(-Ala-Pro-Phe-Gly-)	cyclo(-Ala- $\beta^h$ Pro-Phe-Gly-)
Pentapeptid	cyclo(-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-)	cyclo(-Ala-Val- $\beta^h$ Pro-Phe-Gly-)
Hexapeptid	cyclo(-Leu-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-)	cyclo(-Leu-Ala-Val- $\beta^h$ Pro-Phe-Gly-)



Die Konformation dieser Peptide wurde FT/IR- und CD-spektroskopisch untersucht. Exemplarisch wurde die Sekundärstruktur des Peptids cyclo(-Ala-Val- $\beta^{\text{h}}$ Pro-Phe-Gly-) in DMSO und TFE mit NMR-basierten molekulardynamischen Rechnungen analysiert. Das Peptid besitzt in DMSO zwei sich überlagernde Konformationen mit Populationen von 70% bzw. 30%. In der Hauptkonformation findet sich eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position und eine  $\Psi\gamma$ -Schleife mit  $\beta^{\text{h}}$ Pro in  $i+1$  Position. In der Nebenkonformation befindet sich das  $\beta^{\text{h}}$ Pro in  $i+1$  Position einer  $\Psi\beta$ -Schleife, während Ala die  $i+1$  Position in einer  $\gamma$ -Schleife einnimmt. In TFE nimmt cyclo(-Ala-Val- $\beta^{\text{h}}$ Pro-Phe-Gly-) bevorzugt die Nebenkonformation ein, die in DMSO gefunden wurde. Die Aminosäure  $\beta^{\text{h}}$ Pro besetzt hierbei die  $i+1$  Position von sich überlagernden  $\Psi\gamma$ - und  $\Psi\beta$ -Schleifen ein. [140]

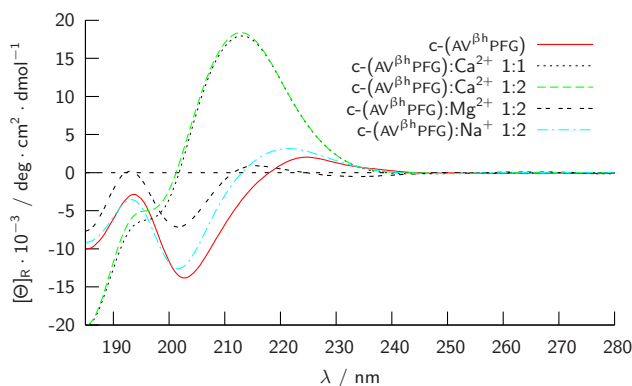


Abbildung g1: CD-Spektren von c-(AV $\beta^{\text{h}}$ PFG) **g** in TFE in Gegenwart verschiedener Kationen.

Der Einfluss von Kationen, die an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt sind, auf die Konformation dieser Peptide konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht werden (siehe Abbildungen g1 und g2). Die induzierten konformationellen Änderungen können entscheidend für die biologische Aktivität und Spezifität peptidischer Wirkstoffe sein.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, dass biologisch präsente Kationen teilweise einen ausgeprägten Einfluss auf die Konformation von zyklischen Peptiden haben. Dies gab Anreiz zu detaillierten Strukturuntersuchungen der Peptide c-(AV $\beta^{\text{h}}$ PFG), c-(LAV $\beta^{\text{h}}$ PFG), c-(AVPFG) und c-(LAVPFG) mit NMR und molekulardynamischen Rechnungen. Als Kation wurde zunächst das  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation gewählt, da dieses den ausgeprägtesten Einfluss auf die Konformation aller untersuchten Peptide zeigte.

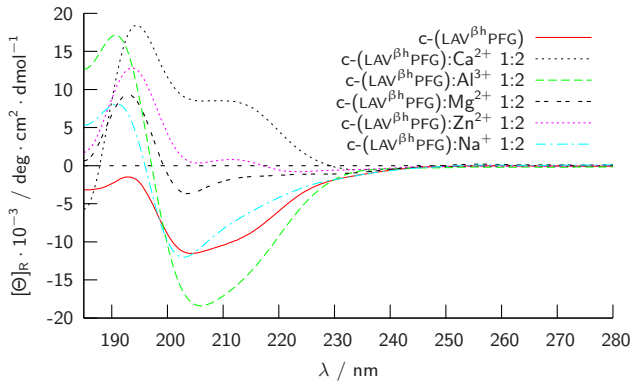


Abbildung g2: CD-Spektren von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE in Gegenwart verschiedener Kationen.

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 CD-, IR- und VCD-spektroskopische Untersuchungen

Die NMR-Spektroskopie ist die leistungsfähigste Methode für Konformationsstudien von zyklischen Peptiden in Lösung. Die relativ lange Zeitskala im Millisekundenbereich von NMR-Untersuchungen ergibt bei der Interpretation gemittelte konformationsrelevante Parameter, die die Anwendung von molekülmechanischen Rechnungen unabdingbar ma-

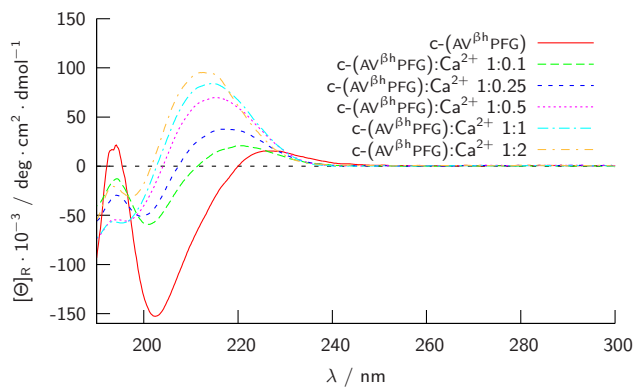


Abbildung g3: CD-Spektren von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in TFE bei 298 K in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>-Kationen.

chen. Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie sind die Zeitskalen der chiroptischen und vibrationspektroskopischen Methoden um mehrere Größenordnungen kleiner, so dass sich Überlagerungsspektren der einzelnen Konformationen eines Moleküls ergeben.

Das konformationelle Verhalten der Peptide *c*-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9**, *c*-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10**, *c*-(AVPFG) **11** und *c*-(LAVPFG) **12** wurde vor den zeitintensiven NMR-Strukturstudien mit CD-, FT/IR- und VCD-spektroskopischen Untersuchungen analysiert. Die bereits von Malešević beobachteten kationenabhängigen Konformationsänderungen fokussierten diese Studien auf das Kation Ca<sup>2+</sup>, das ausgeprägte Strukturänderungen erwarten ließ.

Die CD-, FT/IR- und VCD-Spektren von **9** in Gegenwart unterschiedlicher Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen sind in den Abbildungen 93, 94 bzw. 95 dargestellt. Es ist in allen Spektren ersichtlich, dass konformationelle Änderungen durch eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induziert werden.

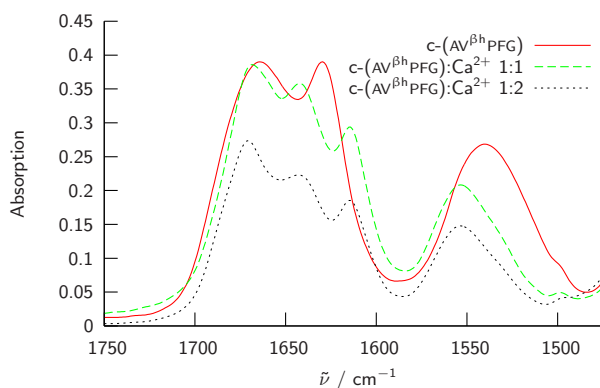


Abbildung 94: IR-Spektren von *c*-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>-Kationen.

Das CD-Spektrum von **9** wird von der negativen Bande bei ca. 205 nm dominiert und kann keinem bekannten Strukturelement zugeordnet werden. Die schwach positive Bande bei ca. 225 nm könnte ein Indiz für eine Ψγ-Schleife sein. Das CD-Spektrum verändert sich bereits bei Zugabe geringer Mengen Ca<sup>2+</sup>. Durch eine weitere Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration werden diese Änderungen immer geringer, so dass ein 1:1- oder 1:2-Komplex von Peptid und Kation vermutet wird. Dies ist auch in den FT/IR- und VCD-Spektren zu erkennen. Die Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Kationen bewirkt auch hier eine ausgeprägte Veränderung der Spektren. Der Unterschied zwischen den Verhältnissen

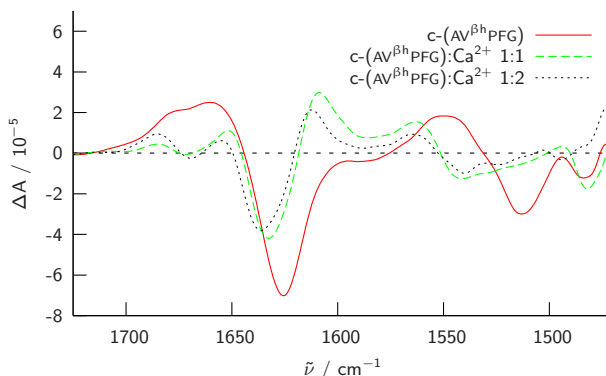


Abbildung 95: VCD-Spektren von  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **9** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

1:1 bzw. 1:2 von Peptid zu  $\text{Ca}^{2+}$  ist jedoch auf die Intensität der Banden beschränkt, während die Absorptionswellenlängen nicht beeinflusst werden.

Die CD-, FT/IR- und VCD-Spektren von **10** in Gegenwart unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind in den Abbildungen 96, 97 bzw. 98 dargestellt.

Das CD-Spektrum zeigt analog zu dem von **9** eine negative Bande bei ca. 205 nm. Zusätzlich ist eine negative Bande bei ca. 215 nm vorhanden. Beide Banden korrelieren mit CD-Daten, die für Schleifen ermittelt wurden.<sup>[24]</sup>

Die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnisses induziert Konformationsänderungen, die wahr-

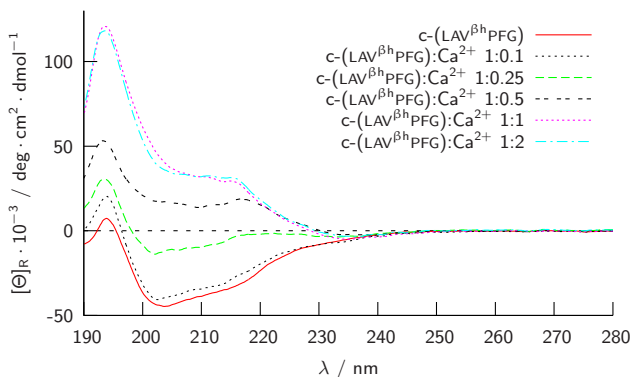


Abbildung 96: CD-Spektren von  $c\text{-(LAV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **10** in TFE bei 298 K in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

scheinlich in einem 1:1-Komplex resultieren. Die CD- und FT/IR-Spektren der Verhältnisse 1:1 und 1:2 unterscheiden sich sowohl in der Position als auch in der Intensität der Banden nur geringfügig. Hingegen sind in den VCD-Spektren der Verhältnisse 1:1 und 1:2 Unterschiede zu erkennen. Vermutlich unterscheiden sich beide Konformationen durch die räumliche Ausrichtung eines nichtwasserstoffbrückenbildenden bzw. lösungsmittlexponierten Amidprotons, das die Peptidkonformation nicht beeinflusst.

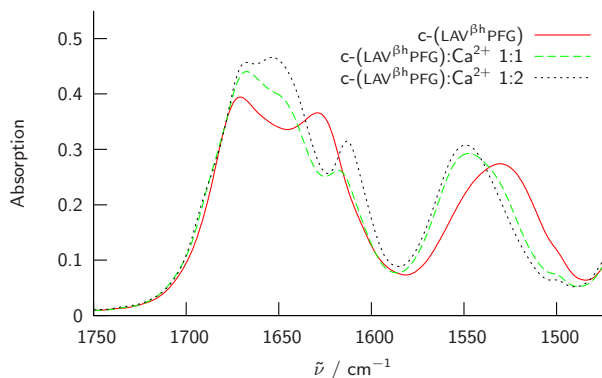


Abbildung 97: IR-Spektren von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>-Kationen.

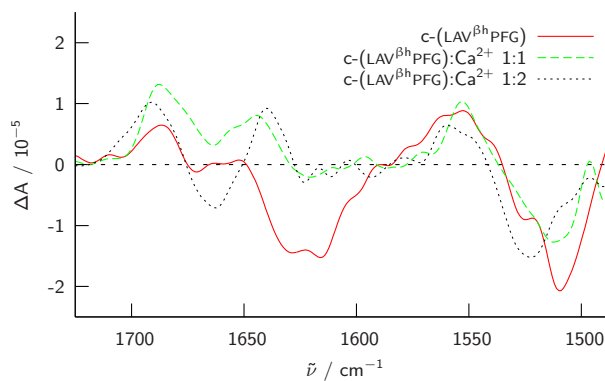


Abbildung 98: VCD-Spektren von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>-Kationen.

Die CD- und FT/IR-Spektren von **11** in Gegenwart unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind in den Abbildungen 99 und 100 gezeigt.

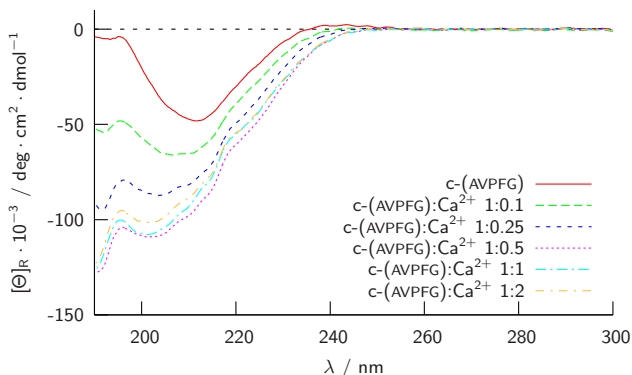


Abbildung 99: CD-Spektren von  $c\text{-(AVPFG)}$  **11** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

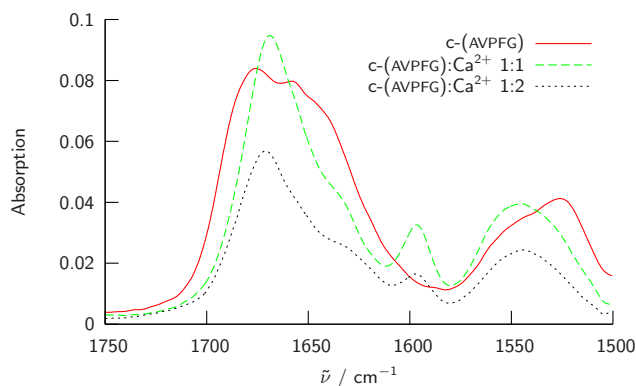


Abbildung 100: IR-Spektren von  $c\text{-(AVPFG)}$  **11** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

Das CD-Spektrum von  $c\text{-(AVPFG)}$  **11** unterscheidet sich erwartungsgemäß zu dem von  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **9**. Die negative Bande bei ca. 210 nm ist rotverschoben und die schwach positive Bande bei ca. 225 nm ist nicht mehr vorhanden.

Das CD-Spektrum deutet die Bildung eines 2:1- oder 1:1-Komplexes an, da sich das Spektrum unwesentlich bei weiterer Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen ändert. Dieser Befund kann leider mit Hilfe des FT/IR-Spektrums nicht verifiziert werden, doch findet sich auch hier ein analoger Kurvenverlauf bei den Verhältnissen 1:1 und 1:2. Lediglich die Intensitäten der IR-Banden unterscheiden sich.

Die CD-, FT/IR- und VCD-Spektren von **12** in Gegenwart unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind in den Abbildungen 101 und 102 dargestellt.

Das CD-Spektrum von *c*-(LAVPFG) **12** besitzt im Gegensatz zu *c*-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** keine negative Bande bei ca. 205 nm. Diese scheint blauverschoben bei ca. 200 nm zu sein. Zusätzlich ist eine negative Bande bei ca. 215 nm mit einer Schulter bei ca. 225 nm vorhanden. Anhand des CD-Spektrums sollte sich die Konformation von *c*-(LAVPFG) grundlegend von der der anderen zyklischen Peptide **9**, **10** und **11** unterscheiden.

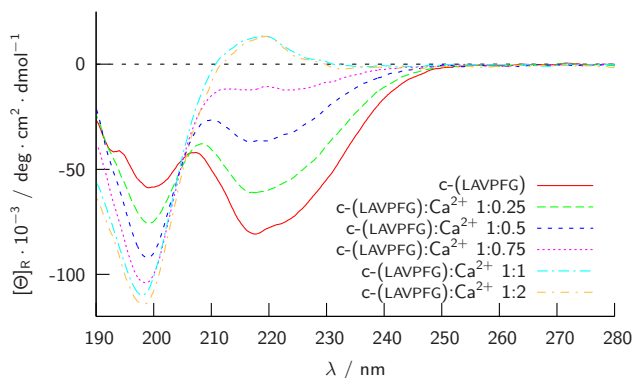


Abbildung 101: CD-Spektren von *c*-(LAVPFG) **12** in TFE bei 298 K in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

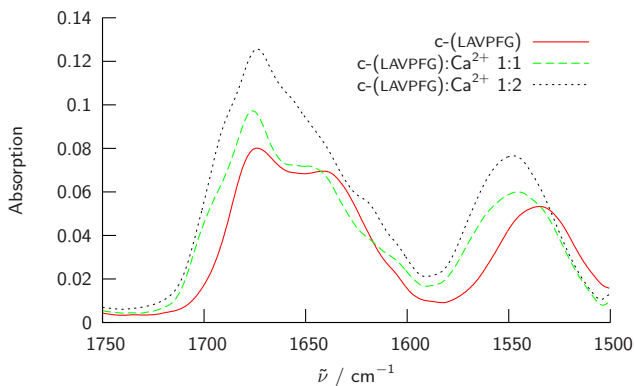


Abbildung 102: IR-Spektren von *c*-(LAVPFG) **12** in TFE in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

Eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt nicht zur Ausbildung eines stabilen Komplexes, da konformationelle Änderungen im CD- als auch im FT/IR-Spektrum erkannt werden können. Im IR-Spektrum zeigt sich durch eine weitere Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Absorptionsfrequenzverschiebung der Amid II-Bande. Leichte Veränderungen der Amid I-Bande zwischen den Verhältnissen 1:1 und 1:2 sind ebenfalls zu erkennen.

## 6.2.2 Konformationsänderungen von $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)} \mathbf{9}$ durch Calcium

### 6.2.2.1 DMSO

Die aus ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren erhaltenen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen von  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)} \mathbf{9}$  in  $\text{DMSO-D}_6$  sind in Tabelle 116 in Abschnitt 6.4.1 zusammengefasst. In den Spektren ist nur ein Signalsatz zu erkennen; die Resonanzfrequenzen der Amidprotonen sind klar separiert. Folglich sollte  $\mathbf{9}$  eine stabile Konformation in DMSO besitzen.

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen erfolgte mit zueinander komplementären DG-Rechnungen, da nicht eindeutig anhand der extrahierten Kopplungskonstanten und Distanzen ein bevorzugtes Seitenkettenrotamer ermittelt werden konnte.

Den NOE-Spektren konnten insgesamt 44 Proton-Proton-Distanzen entnommen werden, davon sind 25 intraresidual, 16 sequenziell und 3 weitreichend (siehe Tabelle 123 in Abschnitt 6.4.1). Diese flossen in die Distanzgeometrie ein und resultierte in einer Konformation mit Ala in  $i+1$  Position einer  $\gamma^i$ -Schleife, die von einer  $\beta$ -Schleife überlagert ist. Die Aminosäure  $^{\beta\text{h}}\text{Pro}$  nimmt die zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife ein.

Während der RMD erweist sich diese Struktur als äußerst stabil und wird zu 87% populiert (siehe Abbildung 103). Daneben zeigt das Clustering eine Nebenkongformation mit einer Population von 12% (siehe Abbildung 104). In dieser Struktur besetzt  $^{\beta\text{h}}\text{Pro}$  ebenfalls die zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife, die hier allerdings von einer  $\Psi\beta$ -Schleife überlagert ist. Während der RMD ist eine durchschnittliche positive NOE-Verletzung von 14 pm zu beobachten. Die Anzahl der positiven NOE-Verletzungen beträgt 3 mit einer Summenabweichung von 42 pm.



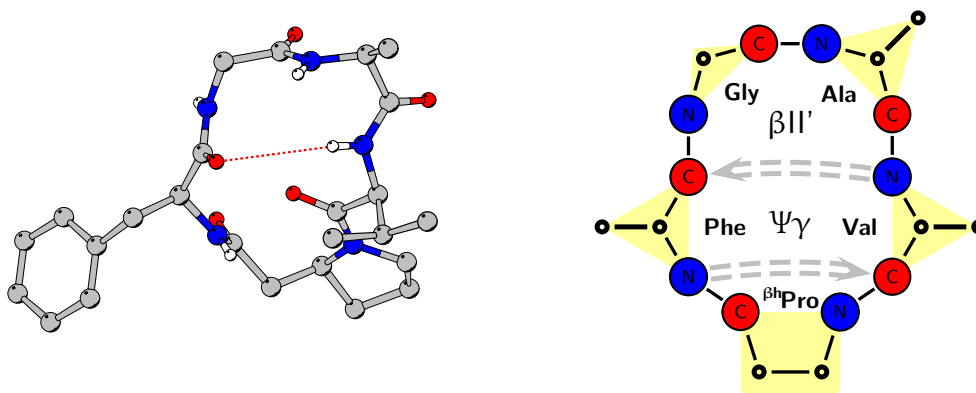


Abbildung 103: Darstellung der Konformation 1 von  $c\text{-}(AV^{\beta H}\text{PFG})$  **9** in DMSO.

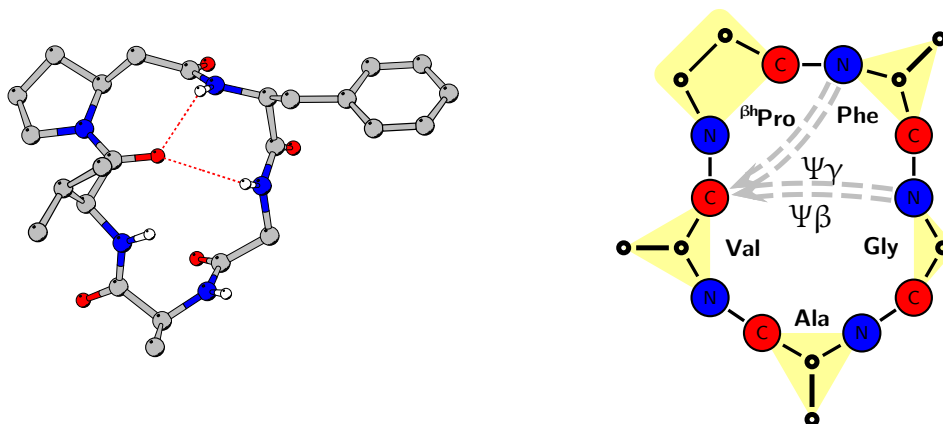


Abbildung 104: Darstellung der Konformation 2 von  $c\text{-}(AV^{\beta H}\text{PFG})$  **9** in DMSO.

Die Rückgratstorsionswinkel der Haupt- und Nebenkongformation von **9** sind in Tabelle 77 zusammengefasst. Die erhöhte Flexibilität des Peptidrückgrats, die durch die Aminosäure Gly verursacht wird, ist initiiierend für die beobachteten konformationellen Änderungen, die zur Ausbildung der Haupt- und Nebenkongformation führen.

Aus den gefundenen Kongformationen wurden mit Hilfe der Karplus-Funktion die theoretischen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  berechnet (siehe Tabelle 78) Die experimentellen

Tabelle 77: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel der Haupt- und Nebenkonformation von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in DMSO.

AS	Konformation 1			Konformation 2		
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$
Ala	-86°	-38°		-65°	-41°	
Val	-81°	170°		-102°	173°	
<sup>βh</sup> P <sub>RO</sub>	-62°	-116°	88°	-54°	-115°	95°
Phe	-114°	110°		-80°	-60°	
Gly	97°	-103°		-128°	-92°	

Tabelle 78: Zusammenfassung der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>H<sub>NH</sub>α aus der RMD für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in DMSO.</sub>

AS	<sup>3</sup> J <sub>H<sub>NH</sub>α</sub> [Hz]		
	ber <sub>Konf. 1</sub>	ber <sub>Konf. 2</sub>	exp
Ala	6.5 (-1.2,+1.3)	4.6 (-0.7,+1.3)	6.9
Val	7.5 (-1.4,+1.4)	8.2 (-1.6,+1.5)	9.0
Phe	9.4 (-1.9,+1.5)	5.8 (-1.0,+1.3)	8.8
Gly	5.6 (-1.2,+1.8)	9.4 (-1.9,+1.4)	3.4

Kopplungskonstanten werden von dem Hauptkonformer sehr gut erfüllt. Das Nebenkonformer hingegen hat größere Abweichungen bei den Aminosäuren Phe und Gly, was jedoch aufgrund der geringen Population während der RMD akzeptabel ist.

Die Populationen der H-Brücken während der RMD sind in Tabelle 79 zusammengefasst. Ein Vergleich mit den Temperaturgradienten der Amidprotonen zeigt unter Einbeziehung einer möglichen Abschirmung zum Lösungsmittel eine recht gute Übereinstimmung. Das Amidproton des Gly besitzt einen Wert, der eine Unterscheidung zwischen exponierter und abgeschirmter Ausrichtung schwierig gestaltet. Dieses Verhalten wird in der Tat durch die RMD bestätigt. Weiterhin ist eine klare Präferenz des Amidprotons von Val zur Ausbildung einer H-Brücke zu beobachten, deren Population von 22.6% vergleichsweise niedrig ausfällt.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in DMSO-D<sub>6</sub> in Gegenwart von 1 bzw. 2 Äquivalenten Ca<sup>2+</sup>-Kationen sind in den Tabellen 117 und 118 in Abschnitt 6.4.1 zusammengefasst. Die experimentellen Proton-Proton-Distanzen sind in den Tabellen

Tabelle 79: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für  $c\text{-}(AV^{\beta^h}\text{PFG})$  **9** in DMSO.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala H <sup>N</sup>			-5.0
Val H <sup>N</sup>	Phe O	22.6	-0.1
Phe H <sup>N</sup>			-5.0
Gly H <sup>N</sup>			-3.4

124 und 125 im selben Abschnitt zusammengefasst. Diese Distanzen ergaben die in Abbildung 105 dargestellten Strukturvorschläge für  $\text{cyclo-}(-\text{Ala-Val-}^{\beta^h}\text{Pro-Phe-Gly-})$  **9** in Gegenwart von 1 und 2 Äquivalenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen.

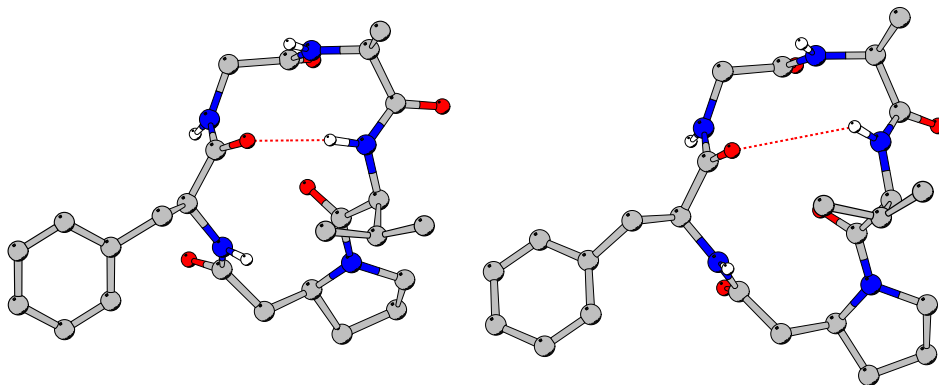


Abbildung 105: Strukturvorschlag für  $c\text{-}(AV^{\beta^h}\text{PFG})$  **9** in DMSO mit 1 (links) bzw. 2 (rechts) Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die gefundenen Strukturen besitzen dieselbe Konformation wie die Hauptkonformation von **9** in Abwesenheit von Kationen. Die Aminosäure  $^{\beta^h}\text{Pro}$  nimmt die zentrale Position in einer  $\Psi\gamma$ -Schleife ein, der eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position gegenüberliegt. DMSO bildet anscheinend eine stabile Solvathülle aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon = 45$ ) um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus, so dass diese die Peptidkonformation nicht beeinflussen können. Konformationelle Änderungen wurden bei den chiroptischen und spektroskopischen Untersuchungen in den Lösungsmitteln ACN und TFE beobachtet, weshalb die Konformationsanalysen in TFE wiederholt wurden.

## 6.2.2.2 TFE

Die aus ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren erhaltenen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen von  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)} \mathbf{9}$  in  $\text{TFE-D}_2$  sind in den Tabellen 119, 120, 121 und 122 in Abschnitt 6.4.1 zusammengefasst. Die NMR-Spektren des Peptids in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen sowie bei einem Verhältnis von 1:1 enthalten jeweils einen Signalsatz, während bei einem Verhältnis 1:2 zwei Sätze zu erkennen sind.

Die aus den NOE-Spektren berechneten H-H-Distanzen sind in den Tabellen 126, 127, 128 und 129 in Abschnitt 6.4.1 zusammengefasst. Bei Abwesenheit von Kationen können für  $\mathbf{9}$  in TFE 32 NOE-Distanzen (19 intraresidual, 11 sequenziell, 2 weitreichend) bestimmt werden. Bei Anwesenheit von einem Äquivalent  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind 30 NOE-Distanzen (20 intraresidual, 9 sequenziell, 1 weitreichend) zugeordnet und berechnet worden. Bei zwei Äquivalenten ergaben sich 21 NOE-Distanzen (11 intraresidual, 8 sequenziell, 2 weitreichend) für Signalsatz A und lediglich 13 NOE-Distanzen (8 intraresidual, 5 sequenziell, 0 weitreichend) für Signalsatz B.

Tabelle 80: Zusammenfassung der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  aus der RMD für  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)} \mathbf{9}$  in TFE.

AS	$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	ber	exp
Ala	4.2 (-0.8,+1.2)	5.4
Val	9.4 (-1.9,+1.6)	9.3
Phe	9.6 (-1.9,+1.4)	8.5
Gly	4.5 (-0.7,+1.3)	4.1

Das Clustering der mittels DG generierten Strukturen ergibt für  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  in TFE zwei Clusterfamilien mit Populationen von 55% und 45%. Das  $\beta\text{hPro}$  nimmt in beiden Konformationsfamilien die zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife ein. Sie unterscheiden sich ausschließlich in der räumlichen Ausrichtung der Phe-Gly Amidbindung. Die zentralen Strukturen beider Clusterfamilien wurden als Startstrukturen für die anschließende RMD-Simulation verwendet, aus denen durch Clustering jeweils zwei hoch populierte Strukturfamilien identifiziert werden können. Die Rückgratstorsionswinkel dieser Clusterfamilien sind in der Tabelle 81 zusammengefasst sind. Eine Überlagerung der zentralen Strukturen jeder Clusterfamilie ist in Abbildung 106 dargestellt. Die Anzahl der positiven NOE-Verletzungen beträgt für beide RMD 6 mit einer durchschnittlichen positiven NOE-Verletzung von 12 pm. Die Summe der positiven NOE-Verletzungen beträgt 72 pm bzw. 77 pm.

Tabelle 81: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen der Clusterfamilien von  $c\text{-}(AV^{\beta\text{h}}\text{PFG})$  **g** in TFE.

AS	Konformation 1			Konformation 2			Konformation 3			Konformation 4		
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$
Ala	$-67^\circ$	$-34^\circ$		$-65^\circ$	$-21^\circ$		$-58^\circ$	$-29^\circ$		$-56^\circ$	$-38^\circ$	
Val	$-104^\circ$	$114^\circ$		$-132^\circ$	$118^\circ$		$-118^\circ$	$115^\circ$		$-108^\circ$	$119^\circ$	
$\beta^{\text{h}}\text{Pro}$	$-59^\circ$	$-85^\circ$	$121^\circ$	$-43^\circ$	$-86^\circ$	$107^\circ$	$-54^\circ$	$-90^\circ$	$115^\circ$	$-62^\circ$	$-87^\circ$	$121^\circ$
Phe	$-109^\circ$	$-4^\circ$		$-133^\circ$	$82^\circ$		$-131^\circ$	$47^\circ$		$-98^\circ$	$-28^\circ$	
Gly	$-157^\circ$	$-132^\circ$		$120^\circ$	$-125^\circ$		$145^\circ$	$-137^\circ$		$-144^\circ$	$-126^\circ$	

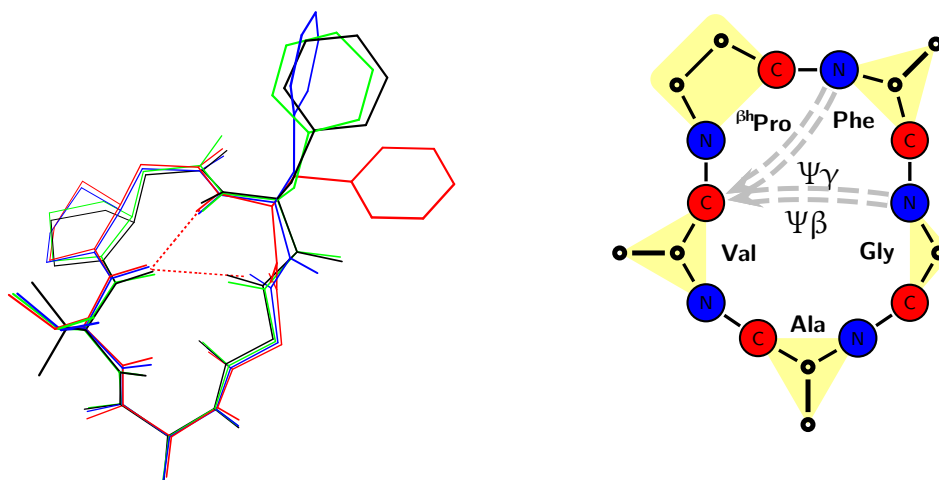


Abbildung 106: Überlagerung der Konformationen von  $c\text{-}(AV^{\beta\text{h}}\text{PFG})$  **g** in TFE.

Es ist zu erkennen, dass die Konformation von  $\text{cyclo-}(-\text{Ala-Val-}\beta^{\text{h}}\text{Pro-Phe-Gly-})$  **g** in TFE sehr stabil ist. Mit Ausnahme der Torsionswinkel  $\psi(\text{Phe})$  und  $\varphi(\text{Gly})$  zeigen alle Rückgratstorsionswinkel nur Fluktuationen innerhalb der typischen Dynamik eines zyklischen Peptids dieser Größe. Starke Variationen treten lediglich im Bereich der Amidbindung zwischen Phe und Gly auf, wodurch die  $\Psi\gamma$ -Schleife mit  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  in der zentralen Position innerhalb kurzer Zeitintervalle von einer  $\Psi\beta$ -Schleife überlagert wird.

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen sind in Tabelle 82 zusammengefasst. Die Überlagerung der  $\Psi\gamma$ -Schleife mit einer  $\Psi\beta$ -Schleife mit  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  in  $i+1$  Position ist auch hier zu erkennen und korreliert mit den gemessenen Temperaturabhängigkeiten. Das Ala

Tabelle 82: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in TFE.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala H <sup>N</sup>			-9.2
Val H <sup>N</sup>	Gly O	2.4	-0.7
Phe H <sup>N</sup>	Val O	47.8	-3.7
Gly H <sup>N</sup>	Val O	32.9	-4.2

H<sup>N</sup> ist während der MD-Simulation ausschließlich dem Solvens exponiert, was ebenfalls gut mit den experimentellen Werten übereinstimmt. Abweichungen finden sich hingegen beim Temperaturgradienten des Val H<sup>N</sup>. Dies zeigt keinerlei Tendenz zur Ausbildung einer  $\gamma$ -schleifenstabilisierenden Wasserstoffbrücke und ist während der RMD kaum gegen Solvensmoleküle abgeschirmt.

Die aus der RMD berechneten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (siehe Tabelle 80) korrelieren sehr gut mit den experimentell bestimmten Werten und sind alle innerhalb der Fehlertoleranz. Da die berechneten Strukturen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** sehr gut mit diesen experimentellen Daten korreliert, verbleibt die Ursache für den hohen Temperaturgradienten von Val H<sup>N</sup> unklar.

Das Clustering der generierten DG-Strukturen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in Gegenwart von 1 Äquivalent Ca<sup>2+</sup>-Ionen ergibt einen zu 99.1% populierten Cluster, dessen zentrale Struktur als Startstruktur für die folgende RMD fungierte. Das Clustering der RMD ergibt ebenfalls einen mit 99.2% hoch populierten Cluster, dessen zentrale Struktur in Abbildung 107 gezeigt wird. Die Konformation ändert sich während der RMD nur geringfügig im Bezug auf die verwendete Startstruktur. Die Anzahl der positiven NOE-Verletzungen beträgt für die gesamte RMD **9** mit einer durchschnittlichen Verletzung von 18 pm. Die Summe aller positiven NOE-Verletzungen ist 166 pm.

Die Aminosäure <sup>βh</sup>Pro besetzt während der DG und RMD die zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife, der eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position gegenüber liegt. Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Struktur sind in Tabelle 83 zusammengefasst. Die Population der H-Brücken während der RMD ist in Tabelle 84 zusammengefasst. Die Temperaturgradienten der Amidprotonen korrelieren sehr gut mit der berechneten Struktur und deren H-Brücken-Population. Das Amidproton der Aminosäure Gly wurde durch

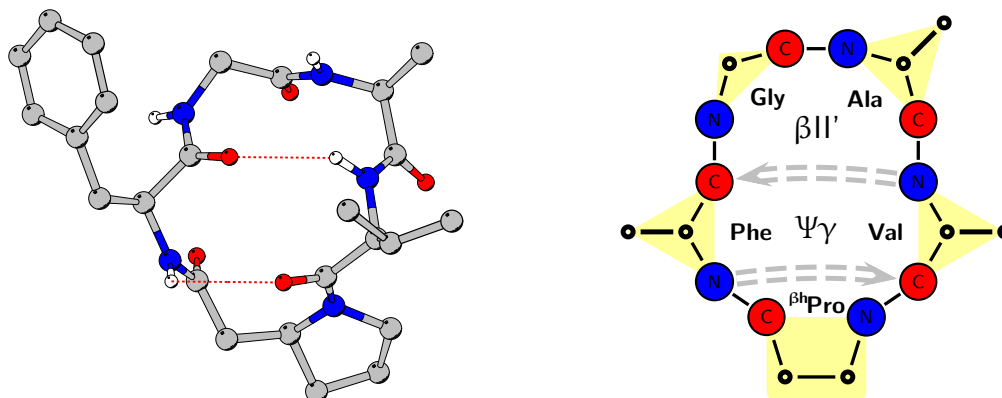

 Abbildung 107: Strukturvorschlag für  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG) \mathbf{9}$  in TFE mit 1 Äq.  $Ca^{2+}$ .

 Tabelle 83: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel und berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{HNH\alpha}$  der zentralen Struktur der Clusterfamilie aus der RMD von  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG) \mathbf{9}$  in TFE mit 1 Äq.  $Ca^{2+}$ .

AS	RMD			${}^3J_{HNH\alpha}$ [Hz]
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	ber
Ala	$-87^\circ$	$-41^\circ$		7.1 ( $-1.3, +1.4$ )
Val	$-96^\circ$	$103^\circ$		8.5 ( $-1.7, +1.4$ )
$\beta^hPro$	$-22^\circ$	$-131^\circ$	$83^\circ$	
Phe	$-66^\circ$	$130^\circ$		6.2 ( $-1.2, +1.3$ )
Gly	$76^\circ$	$-115^\circ$		6.6 ( $-1.4, +1.9$ )

die  $Ca^{2+}$ -Kationen stark beeinflusst, so dass das  ${}^1H$ -Resonanzsignal deutlich verbreitert wurde. Eine Bestimmung des Temperaturgradienten war deshalb nicht mehr möglich. Die H-Brücke zwischen Val  $H^N$  und Phe O wirkt strukturinduzierend und stabilisiert die  $\beta II'$ -Schleife. Hierdurch wird  $\beta^hPro$  in der zentralen Position der  $\Psi\gamma$ -Schleife fixiert, die überraschenderweise nicht durch eine H-Brücke zwischen Phe  $H^N$  und Val O stabilisiert wird. Die geringe Temperaturabhängigkeit von  $\delta(H^N)$  der Aminosäure Phe ist ebenfalls ein Indiz für dieses Verhalten.

Die Kopplungskonstanten  ${}^3J_{HNH\alpha}$  konnten aufgrund der starken Verbreiterung der  ${}^1H$ -Resonanzfrequenzen nicht bestimmt werden. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Vergrößerung der  $T_2$ -Relaxationszeit durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Amidprotonen und  $Ca^{2+}$ -Kationen.

Tabelle 84: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für  $c\text{-}(AV^{\beta\text{h}}\text{PFG})$  **9** in TFE mit 1 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala H <sup>N</sup>			-6.6
Val H <sup>N</sup>	Phe O	25.3	0.0
Phe H <sup>N</sup>			-8.0
Gly H <sup>N</sup>			n. b.

In Gegenwart von zwei Äquivalenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen enthalten die NMR-Spektren zwei separierbare Signalsätze. Der RMD-Cluster des Signalsatzes A ist zu 100% populiert; dessen zentrale Struktur ist in Abbildung 108 dargestellt. Diese wirkt im Vergleich zum Strukturvorschlag in Gegenwart von einem Äquivalent  $\text{Ca}^{2+}$  etwas verzerrt, die Lage der Sekundärstruktureinheiten und Position der Aminosäuren ist jedoch unverändert. Auch hier besetzt  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  die zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife, der eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position gegenüberliegt.

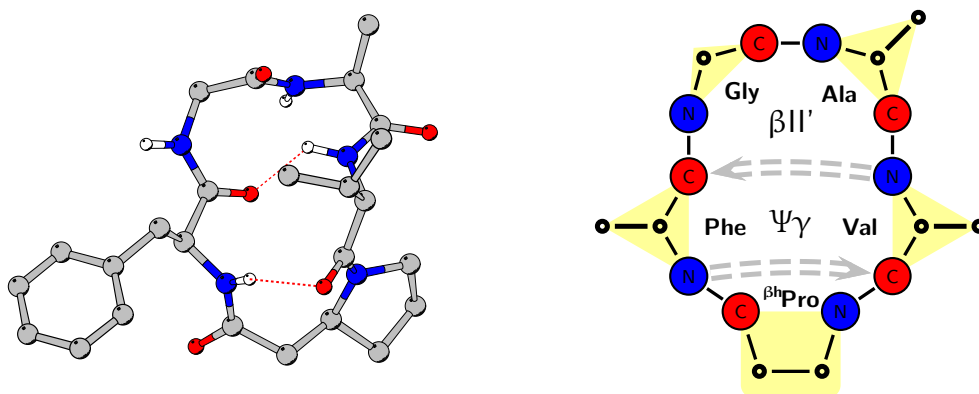


Abbildung 108: Strukturvorschlag für  $c\text{-}(AV^{\beta\text{h}}\text{PFG})$  **9** in TFE mit 2 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$  (Signalsatz A).

Insgesamt können während der RMD für den Signalsatz A neun positive NOE-Verletzungen mit durchschnittlich 24 pm beobachtet werden. Die Summe aller positiven Verletzungen beträgt 219 pm.

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Struktur und der daraus berechneten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 85 zusammengefasst. Die Population der H-Brücken



Tabelle 85: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel und berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der zentralen Struktur der Clusterfamilie aus der RMD von c-(AV $^{\beta\text{h}}$ PFG) **g** in TFE mit 2  $\text{\AA}$ q.  $\text{Ca}^{2+}$ .

AS	RMD			${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	ber
Ala	$69^\circ$	$-7^\circ$		6.8 (-1.5,+1.9)
Val	$-117^\circ$	$57^\circ$		9.6 (-1.9,+1.5)
$\beta^{\text{h}}$ Pro	$-2^\circ$	$-77^\circ$	$82^\circ$	
Phe	$-91^\circ$	$-158^\circ$		8.1 (-1.6,+1.4)
Gly	$-66^\circ$	$103^\circ$		3.8 (-0.5,+1.2)

Tabelle 86: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(AV $^{\beta\text{h}}$ PFG) **g** in TFE mit 2  $\text{\AA}$ q.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala H <sup>N</sup>			-7.7
Val H <sup>N</sup>	Phe O	22.9	0.0
Val H <sup>N</sup>	Gly O	47.5	
Phe H <sup>N</sup>	Val O	78.6	-9.3
Gly H <sup>N</sup>			n. b.

während der RMD ist in Tabelle 86 zusammengefasst. Auffallend ist hier, dass die  $\beta\text{II}'$ -Schleife durch eine verzernte  $\gamma$ -Schleife überlagert wird. Während die Temperaturgradienten der Amidprotonen von Ala, Val und Gly sehr gut mit der RMD-Simulation korrelieren, findet sich für Phe H<sup>N</sup> eine unerwartet hohe Temperaturabhängigkeit. Diese kann durch den Strukturvorschlag nicht erklärt werden.

Analog zur Konformationsanalyse in Gegenwart von einem Äquivalent  $\text{Ca}^{2+}$  können keine  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten experimentell bestimmt werden, so dass eine Strukturverifikation auf diesem Weg nicht möglich ist.

Das Clustering der RMD mit NOE-Distanzen des Signalsatzes B resultiert in drei Clusterfamilien, die unterschiedliche Konformationen besitzen (siehe Abbildung 109). Die zu geringe Anzahl der *restraints* ist bedingt diese Diversität. Eine zusätzliche Verifikation durch weitere experimentelle Daten ist nicht möglich, so dass keine sinnvolle Struktur ausgewählt werden kann.

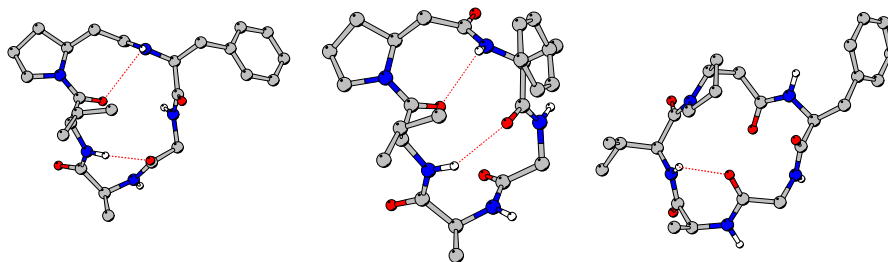


Abbildung 109: Strukturvorschläge für  $c\text{-(AV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **9** in TFE mit 2 Åq.  $\text{Ca}^{2+}$  (Signalsatz B).

### 6.2.3 Konformationsänderungen von $c\text{-(LAV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$ **10** durch Calcium

Die zugeordneten  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenzen von  $c\text{-(LAV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **10** in  $\text{TFE-D}_2$  sind in Abschnitt 6.4.2 in den Tabellen 130 bis 133 zusammengefasst.

Die diastereotopen Protonen werden während der DG- und MD-Rechnungen größtenteils als Pseudoatome behandelt. Soweit möglich wurden sie durch einander komplementäre Zuordnungen während der anfänglichen DG-Läufe oder durch Kopplungskonstanten aus den NMR-Spektren zugeordnet.

In den NMR-Spektren von  $c\text{-(LAV}^{\beta\text{h}}\text{PFG)}$  **10** können zwei separierbare Signalsätze analysiert werden. Die Resonanzfrequenzen zeigen teilweise große Variationen, so dass von sehr unterschiedlichen Konformationen ausgegangen werden kann. Eine *cis*-Konfiguration der Peptidbindung zwischen Val und  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  kann nicht mit absoluter Sicherheit bestätigt werden. Die Differenz  $\Delta\delta(\text{C}^\gamma, \text{C}^\delta)$  von  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  ist in Signalsatz A mit 10.6 ppm nur unwesentlich größer als die in Signalsatz B (9.1 ppm). Die tieffeldverschobene Resonanz des  $\text{C}^\delta$  könnte jedoch als Indiz gelten (siehe Tabelle 130 und 131). Zwischen Val  $\text{H}^\alpha$  und  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$   $\text{H}^\beta$  kann ein starker NOE detektiert werden. Außerdem ist zwischen Val  $\text{H}^\alpha$  und  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$   $\text{Q}^\epsilon$  kein NOE erkennbar, so dass von einer *cis*-Konfiguration der Peptidbindung Val- $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  ausgegangen werden kann. In Signalsatz B sprechen ein starker NOE zwischen Val  $\text{H}^\alpha$  und  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$   $\text{Q}^\epsilon$ , sowie das Fehlen eines NOE zwischen  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$   $\text{H}^\beta$  und Val für eine *trans*-Konfiguration der Peptidbindung.

Für Signalsatz A können in den NOE-Spektren insgesamt 33 Proton-Proton-Distanzen zugeordnet und integriert werden. Davon sind 20 intraresidual, 12 sequenziell und 1 weitrei-

chend (siehe Tabelle 134). Der Signalsatz B birgt insgesamt 42 Proton-Proton-Distanzen, davon 29 intraresidual, 11 sequenziell und 2 weitreichend (siehe Tabelle 135).

Das Clustering nach Rückgratstorsionswinkel ergibt für Signalsatz A einen Cluster mit einer Population von 41.5%, dessen zentrale Struktur als Startstruktur für die folgende RMD-Simulation verwendet wird. Während der RMD treten insgesamt zwei positive NOE-Verletzungen mit einem durchschnittlichen Wert von 47 pm auf, die sich zu einer Abweichung von insgesamt 95 pm addieren. Das Clustering der RMD-Trajektorie ergibt einen Cluster mit einer Population von 95.1%, dessen zentrale Struktur in Abbildung 110 dargestellt ist. Neben einer *cis*-Peptidbindung zwischen Val und  $\beta^{\text{h}}$ Pro wird die Konformation durch eine  $\Psi\beta$ -Schleife mit  $\beta^{\text{h}}$ Pro in  $i+2$  Position und einer  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position bestimmt. Die Rückgratstorsionswinkel dieses Strukturvorschlags für **10** und die daraus berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  sind in Tabelle 87 zusammengefasst. Die ermittelten experimentellen Kopplungskonstanten korrelieren sehr gut mit den berechneten und liegen alle innerhalb der Toleranz.

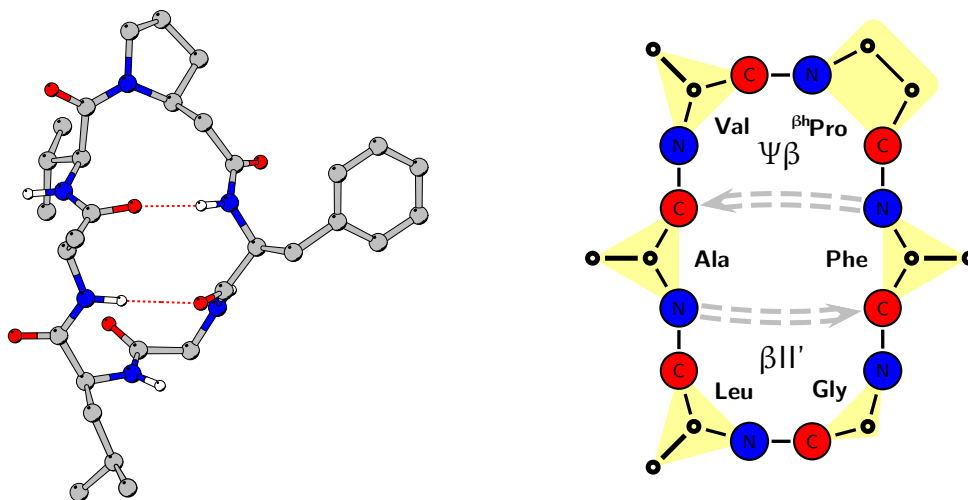


Abbildung 110: Strukturvorschlag für c-(LAV $\beta^{\text{h}}$ PFG) **10** in TFE (Signalsatz A).

In Tabelle 88 sind die experimentellen Temperaturgradienten der Amidprotonen sowie die Populationen der H-Brücken während der RMD zusammengefasst. Insgesamt unterstützen zwei höher populierte Wasserstoffbrücken den Strukturvorschlag (siehe Abbildung 110). Besonders ausgeprägte Temperaturgradienten sind für die Aminosäuren Leu

Tabelle 87: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel und berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der zentralen Struktur der Clusterfamilie aus der RMD von c-(LAV $^{\beta\text{h}}$ PFG) **10** in TFE (Signalsatz A).

AS	RMD			${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	ber	exp
Leu	$-62^\circ$	$-22^\circ$		5.5 ( $-1.0,+1.3$ )	6.5
Ala	$-130^\circ$	$117^\circ$		9.6 ( $-2.0,+1.4$ )	n. b.
Val	$-91^\circ$	$130^\circ$		7.5 ( $-1.4,+1.4$ )	6.1
$^{\beta\text{h}}$ Pro	$-85^\circ$	$-131^\circ$	$154^\circ$		
Phe	$-129^\circ$	$110^\circ$		9.5 ( $-1.9,+1.5$ )	8.8
Gly	$62^\circ$	$-110^\circ$		6.9 ( $-1.5,+1.9$ )	n. b.

Tabelle 88: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAV $^{\beta\text{h}}$ PFG) **10** in TFE (Signalsatz A).

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>			-0.2
Ala H <sup>N</sup>	Phe O	59.0	-8.0
Val H <sup>N</sup>	Leu O	9.2	-5.7
Phe H <sup>N</sup>	Ala O	44.7	-5.3
Gly H <sup>N</sup>			-4.5

und Ala zu finden. Diese signalisieren für H<sup>N</sup> von Leu eine Involvierung in eine H-Brücke bzw. Ausrichtung des N-H<sup>N</sup>-Vektors zum Molekülzentrum. Während der RMD ist diese Bindung jedoch dem Solvens exponiert, so dass keine Übereinstimmung mit der Simulation existiert. Analog dazu verhält sich das H<sup>N</sup> von Ala. Obwohl das H<sup>N</sup> während 59.0% der Gesamtsimulation eine Wasserstoffbrücke ausbildet, signalisiert der experimentelle Temperaturgradient die Exposition zum Solvens. Des Weiteren korrelieren die experimentellen Werte für Val, Phe und Gly schlecht mit den theoretischen. Dieses Verhalten ist nicht zu erklären, da sowohl die NOE-Distanzen, als auch die Kopplungskonstanten sehr gut mit dem Strukturvorschlag korrelieren.

Das Clustering der DG-Rechnung basierend auf den Proton-Proton-Distanzen für Signalsatz B ergibt zwei Cluster mit Populationen von 60.3% und 38.7%. Die folgenden RMD-Simulationen mit diesen Strukturen als Startstrukturen führen beide zu der in Abbildung 111 dargestellten Konformation. In dieser nimmt das  $^{\beta\text{h}}$ Pro die  $i+1$  Position einer  $\Psi\beta$ -Schleife ein, welcher eine  $\beta\text{II}$ -Schleife mit Leu in  $i+1$  Position gegenüber liegt. Diese

Konformation wird durch drei Wasserstoffbrücken zwischen Val H<sup>N</sup> und Leu O bzw. Gly O sowie zwischen Gly H<sup>N</sup> und Val O stabilisiert (siehe Tabelle 8g). Die Analyse der ausgebildeten H-Brücken während der RMD-Simulation zeigt auch, dass die  $\beta$ II-Schleife durch eine  $\gamma$ -Schleife mit Ala in zentraler Position überlagert wird.

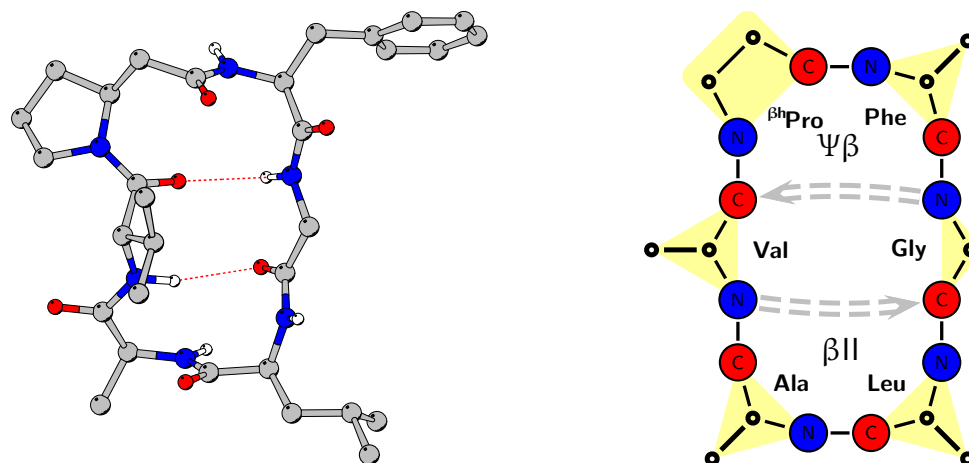


Abbildung 111: Strukturvorschlag für c-(LAV <sup>$\beta$</sup> ProPG) **10** in TFE (Signalsatz B).

Während der RMD treten insgesamt 8 positive NOE-Verletzungen mit einer durchschnittlichen Diskrepanz von 19 pm auf. Diese summieren sich zu einer gesamten positiven Verletzung von 152 pm.

Das Wasserstoffbrückenmuster korreliert sehr gut mit den experimentell bestimmten Temperaturgradienten der Amidprotonen (siehe Tabelle 8g). So finden sich hohe Gradienten für die H<sup>N</sup> von Val und Gly. Im Gegensatz dazu besitzen die dem Solvens exponierten Amidprotonen von Leu, Ala und Phe kleine Temperaturgradienten.

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Struktur des Clusters sind in Tabelle 90 zusammengefasst. Der berechnete Strukturvorschlag korreliert sehr gut mit den ermittelten Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ , welche sich alle innerhalb der Toleranzen befinden.

Zusammenfassend lassen sich für **10** zwei Konformationen bestimmen, die, abgesehen von den Temperaturgradienten für den Signalsatz A, sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Die beiden Strukturvorschläge unterscheiden sich in der Konfi-

Tabelle 8g: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE (Signalsatz B).

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>			-4.5
Ala H <sup>N</sup>			-4.5
Val H <sup>N</sup>	Leu O	27.1	-2.1
Val H <sup>N</sup>	Gly O	33.1	
Phe H <sup>N</sup>			-7.8
Gly H <sup>N</sup>	Val O	16.4	-0.6

Tabelle 9g: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel und berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der zentralen Struktur der Clusterfamilie aus der RMD von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE (Signalsatz B).

AS	RMD			${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	ber	exp
Leu	-83°	97°		6.4 (-1.1,+1.4)	7.1
Ala	64°	10°		6.9 (-1.5,+1.9)	n. b.
Val	-114°	126°		9.6 (-1.9,+1.5)	8.0
βhPro	-78°	68°	66°		
Phe	32°	77°		5.9 (-1.2,+1.9)	7.2
Gly	169°	-165°		2.2 (-0.1,+1.1)	3.0

guration der Val-βhPro-Peptidbindung. Dies beeinflusst die Lage der sich gegenüberliegenden β-Schleifen und der konformationsstabilisierenden Wasserstoffbrücken.

In Gegenwart von einem Äquivalent Ca<sup>2+</sup>-Kationen kann in den NMR-Spektren nur noch ein Signalsatz gefunden werden. Die Präsenz einer *cis*-Peptidbindung zwischen Val und βhPro kann aufgrund der Resonanzfrequenz des C<sup>δ</sup> von βhPro sowie der Differenz  $\Delta\delta(\text{C}^\gamma, \text{C}^\delta) = 7.4$  ppm ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 132).

In den NOE-Spektren können insgesamt 44 Proton-Proton-Distanzen zugeordnet und integriert werden, davon 23 intraresidual, 11 sequenziell und 0 weitreichend (siehe Tabelle 136). Das Clustering der damit generierten DG-Strukturen ergibt einen Cluster mit einer Population von 96.1%, dessen zentrale Struktur eine Ψβ-Schleife mit βhPro in *i*+1 Position enthält. Bei der anschließenden RMD-Simulation treten 6 NOE-Verletzungen auf. Die Summe der Überschreitungen beträgt 184 pm und es resultiert eine durchschnittliche Verletzung von 31 pm.

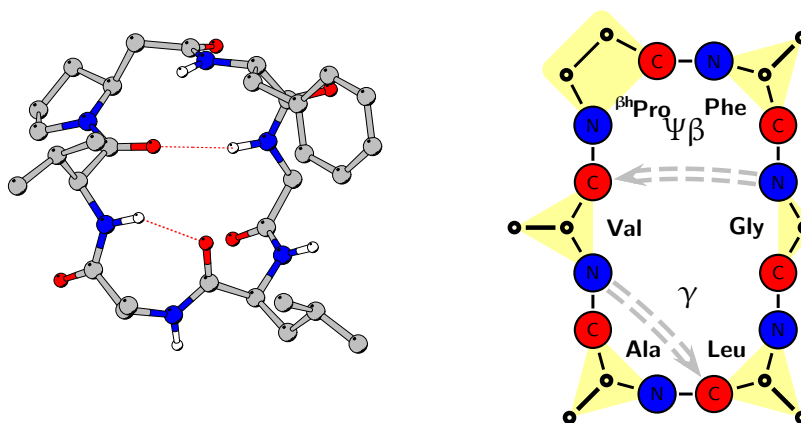


Abbildung 112: Strukturvorschlag 1 für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) 10 in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Das Clustering der RMD-Simulation ergibt insgesamt drei Konformationsfamilien mit Populationen von 31.4%, 28.6% und 10.8%. Die Konformation 1 des höchst populierten Clusters ist in Abbildung 112 dargestellt. Neben einer  $\Psi\beta$ -Schleife mit <sup>βh</sup>Pro in  $i+1$  Position enthält diese eine  $\gamma$ -Schleife mit Ala in zentraler Position. Die Konformation 2 ist in Abbildung 113 dargestellt. In ihr befindet sich eine  $\beta$ II-Schleife mit Leu in  $i+1$  Position. Aufgrund der Flexibilität der Aminosäure Gly wird hier die Wasserstoffbrücke zwischen Gly H<sup>N</sup> und Leu O nicht gebildet. Die geringst besetzte Konformationsfamilie 3 ist in Abbildung 114 dargestellt. Sie besitzt ein Geflecht von  $\gamma$ -Schleifen mit <sup>βh</sup>Pro, Phe und Gly in deren zentralen Positionen. Das Peptid c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) weist eine hohe Dynamik auf, so dass eine eindeutige Konformation nicht bestimmt werden kann. Jedoch ist die Tendenz zur Ausbildung einer  $\Psi\beta$ -Schleife mit <sup>βh</sup>Pro in  $i+1$  Position zu erkennen, der eine von einer  $\gamma$ -Schleife überlagerte  $\beta$ -Schleife gegenüberliegt.

Die Rückgratstorsionswinkel der ermittelten Konformationen 1 bis 3 sind in Tabelle 91 zusammengefasst. Die über die gesamte RMD-Trajektorie berechneten Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  korrelieren recht gut mit den experimentell bestimmten. Werden aus den Torsionswinkeln der einzelnen Konformationen die Kopplungskonstanten berechnet, finden sich mehrfach Abweichungen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Dynamik des Moleküls erhöht. Dieses Verhalten ist überraschend, da die Fixierung einer Konformation erwartet wurde.

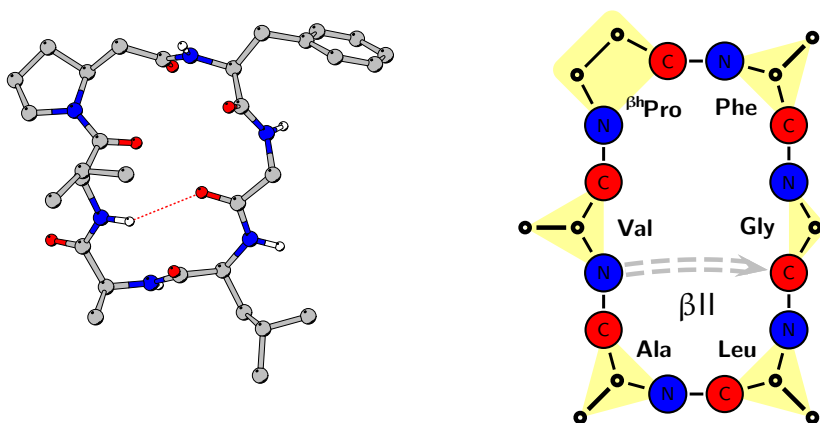


Abbildung 113: Strukturvorschlag 2 für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Tabelle g1: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen der Clusterfamilien aus der RMD und den berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  für die gesamte RMD-Simulation von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

AS	Konformation 1			Konformation 2			Konformation 3			${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	$\varphi$	$\psi$	$\mu$	ber	exp
Leu	-66°	152°		-35°	138°		-83°	-170°		3.5 (-0.4,+1.2)	5.0
Ala	65°	-67°		76°	-32°		-35°	-46°		6.8 (-1.5,+1.8)	5.9
Val	-135°	154°		-105°	152°		-106°	142°		9.3 (-1.9,+1.4)	9.9
<sup>βh</sup> Pro	-59°	-113°	104°	-59°	-133°	80°	-49°	-112°	116°		
Phe	-69°	-48°		-113°	144°		-101°	43°		7.9 (-1.5,+1.4)	6.2
Gly	174°	-87°		74°	127°		89°	-37°		2.4 (-0.2,+1.5)	3.8

Die Populationen der Wasserstoffbrücken, die während der RMD-Simulation auftreten, sind in Tabelle g2 zusammengefasst. Die ermittelten Temperaturgradienten der Amidprotonen korrelieren gut mit den Populationen. Die Überlagerung der  $\beta$ II-Schleife mit Leu in  $i+1$  Position mit einer  $\gamma$ -Schleife ist gut zu erkennen. Die gegenüberliegende  $\Psi\beta$ -Schleife besitzt eine geringere Population und wird von zwei  $\gamma$ -Schleifen mit <sup>βh</sup>Pro und Phe in zentraler Position überlagert.

Wird die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf zwei Äquivalente erhöht, kann in den NMR-Spektren ebenfalls nur ein Signalsatz zugeordnet werden. Die <sup>1</sup>H-Resonanzfrequenzen sind in Tabelle 133 zusammengefasst.



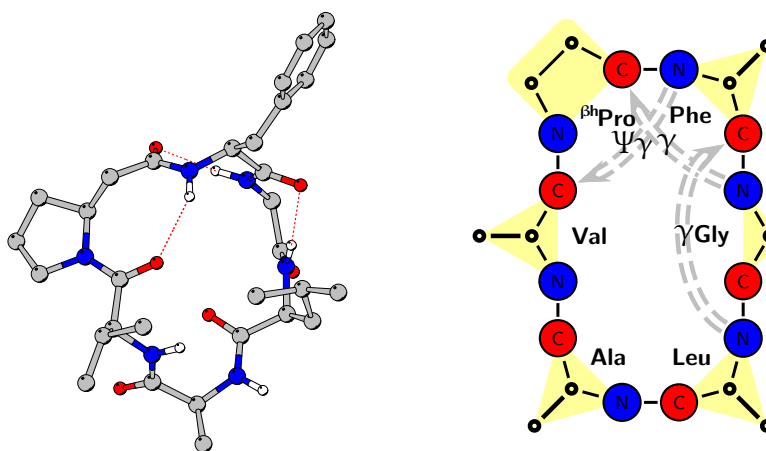


Abbildung 114: Strukturvorschlag 3 für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Tabelle g2: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>	Phe O	9.2	-6.0
Ala H <sup>N</sup>			-9.7
Val H <sup>N</sup>	Leu O	40.2	0.8
Val H <sup>N</sup>	Gly O	15.2	
Phe H <sup>N</sup>	Val O	6.3	-9.7
Gly H <sup>N</sup>	Val O	21.7	0.6
Gly H <sup>N</sup>	<sup>βh</sup> Pro O	5.0	

In den NOE-Spektren können insgesamt 57 Proton-Proton-Distanzen zugeordnet und integriert werden, davon 37 intraresidual, 18 sequenziell und 2 weitreichend (siehe Tabelle 137). Das Clustering der damit berechneten DG-Strukturen ergibt einen Cluster mit einer Population von 100%, deren Rückgratstorsionswinkel mit keiner klassischen Sekundärstruktur übereinstimmen.

Während der RMD-Simulation treten 15 positive NOE-Verletzungen mit einer durchschnittlichen Überschreitung von 18 pm auf, deren Summe 271 pm beträgt. Das Clustering der Trajektorie ergibt einen Cluster mit einer Population von 98.6%, dessen zentrale Struktur in Abbildung 115 dargestellt ist. Sie besitzt eine verzerrte Ψβ-Schleife

mit  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  in  $i+1$  Position, die von einer  $\gamma$ -Schleife um Phe überlagert ist. Eine Wasserstoffbrücke, die die  $\Psi\beta$ -Schleife stabilisiert wird während der RMD nicht gebildet (siehe Tabelle 93). Auffallend an dieser Struktur ist die Ausrichtung der Carbonylsauerstoffe der Aminosäuren Val,  $\beta^{\text{h}}\text{Pro}$  und Gly zum Solvens, was auf eine mögliche Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen schließen lässt.

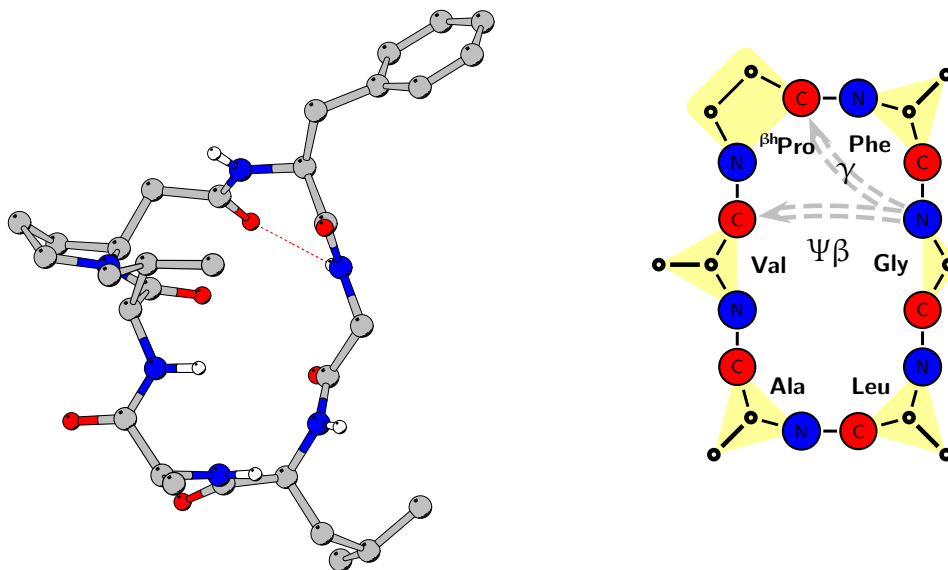


Abbildung 115: Strukturvorschlag für c-(LAV $\beta^{\text{h}}$ PFG) **10** in TFE mit 2 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen sind in Tabelle 93 den Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD-Simulation gegenübergestellt. Hier korrelieren die Werte recht gut mit dem Strukturvorschlag, mit Ausnahme des Amidprotons der Aminosäure Ala. Dieses sollte aufgrund des Gradienten dem Solvens nicht exponiert sein. Dies ist jedoch während der Simulation zu beobachten. Das Amidproton der Aminosäure Val zeigt eine positive Temperaturabhängigkeit, die, obwohl keine H-Brücke in nennenswerter Population gebildet wird, durch die Ausrichtung des  $\text{N-H}^{\text{N}}$ -Vektors zum Molekülzentrum erklärbar ist.

Die Rückgratstorsionswinkel des Strukturvorschlags sind in Tabelle 94 zusammengefasst. Die daraus berechneten Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  korrelieren sehr gut mit den experimentell bestimmten.

Tabelle 93: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup>.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>			-5.7
Ala H <sup>N</sup>			-3.3
Val H <sup>N</sup>			1.3
Phe H <sup>N</sup>			-8.0
Gly H <sup>N</sup>	β <sup>h</sup> Pro O	24.2	-2.5

Tabelle 94: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel und berechneten Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>HNHα</sub> der zentralen Struktur der Clusterfamilie aus der RMD von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup>.

AS	RMD			<sup>3</sup> J <sub>HNHα</sub> [Hz]	
	φ	ψ	μ	ber	exp
Leu	-101°	-51°		8.9 (-1.7,+1.5)	5.4
Ala	-72°	-47°		5.8 (-1.0,+1.3)	6.0
Val	-109°	143°		9.5 (-1.9,+1.4)	10.2
β <sup>h</sup> Pro	-87°	-111°	-87°		
Phe	-83°	87°		6.7 (-1.3,+1.3)	6.3
Gly	133°	-155°		2.2 (-0.2,+1.4)	3.7

### 6.2.4 Konformationsänderungen von c-(AVPFG) **11** durch Calcium

Die zugeordneten <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Resonanzfrequenzen von c-(AVPFG) **11** in TFE-D<sub>2</sub> sind in Abschnitt 6.4.3 in den Tabellen 138 bis 141 zusammengefasst.

Die diastereotopen Protonen sind während der DG- und MD-Rechnungen als Pseudoatome behandelt worden. Soweit möglich erfolgte eine Zuordnung durch DG-Läufe mit einander komplementären Zuordnungen und durch die den NMR-Spektren entnommenen Kopplungskonstanten.

Das zyklische Peptid **11** besitzt in TFE zwei unterschiedliche Konformationen, da in den NMR-Spektren zwei komplette Signalsätze (A+B) zugeordnet werden können. Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl eine *trans*- als auch *cis*-Konfiguration der Val-Pro-Peptidbindung vorliegt. In Signalsatz A ist die Differenz Δδ(C<sup>β</sup>,C<sup>γ</sup>) des Prolins mit 9.6 ppm nur etwas größer als für Signalsatz B, bei dem 8.5 ppm gefunden werden.

Weiterhin ist bei keinem Signalsatz eine Tieffeldverschiebung der C<sup>β</sup>-Resonanz zu erkennen. Eine Zuordnung anhand spezifischer NOE ist aufgrund der geringen Anzahl separierbarer und integrierbarer NOE-Kreuzsignale ebenfalls nicht möglich. Versuche mit DG-Rechnungen unterschiedlicher Konfiguration der Peptidbindung zwischen Val und Pro zeigten sehr geringe NOE-Verletzungen, wenn für den Signalsatz A eine *cis*- und für Signalsatz B eine *trans*-Konfiguration vorausgesetzt wird.

Aus den NOE-Spektren können für Signalsatz A insgesamt 18 Proton-Proton-Distanzen (11 intraresidual, 7 sequenziell, keine weitreichend) berechnet werden (siehe Tabelle 142). Für den Signalsatz B wurden insgesamt 18 Proton-Proton-Distanzen (10 intraresidual, 5 sequenziell, 3 weitreichend) zugeordnet (siehe Tabelle 143).

Das Clustering der 1000 Strukturen aus der DG-Rechnung ergibt für Signalsatz A zwei Cluster mit Populationen von 50.5% und 40.8%. Beide Cluster besitzen eine verzerrte β-Schleife mit Gly in *i*+1 Position. Während der höher populierte Cluster eine verzerrte βII-Schleife enthält, ist die Peptidbindung zwischen Gly und Ala gedreht, und es präsentiert sich eine βII-Schleife in gleicher Position.

Die beiden Konformationen der DG-Rechnungen für Signalsatz A werden als Startstrukturen für RMD-Simulationen verwendet. Diesen kann durch Clustering nach Rückgratstorsionswinkel jeweils eine Konformation mit einer Population von 99.2% (1) bzw. 100.0% (2) entnommen werden. Die zentralen Strukturen dieser Cluster sind in Abbildung 116 als Überlagerung dargestellt. Die verzerrten β-Schleifen der DG-Strukturen werden während der RMD durch γ-Schleifen überlagert und sind praktisch nicht mehr detektierbar. Als ausschließliches Strukturmerkmal besitzen beide Strukturen γ-Schleifen, bei Konformation 1 mit Gly in zentraler Position, bei Konformation 2 mit Ala.

Bei Signalsatz A treten während der RMD bei Verwendung der Konformation 1 als Startstruktur keine positiven NOE-Verletzungen auf. Die Konformation 2 zeigt während der RMD lediglich eine positive NOE-Verletzung mit einer Abweichung von 4 pm.

Die Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD sind in Tabelle 95 zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass während der RMD ausschließlich γ-Schleifen in erwähnenswerten Zeitintervallen ausgebildet werden. Das H-Brückenmuster als Kombination aus beiden Konformationen korreliert recht gut mit den experimentellen Temperaturgradienten der Amidprotonen.

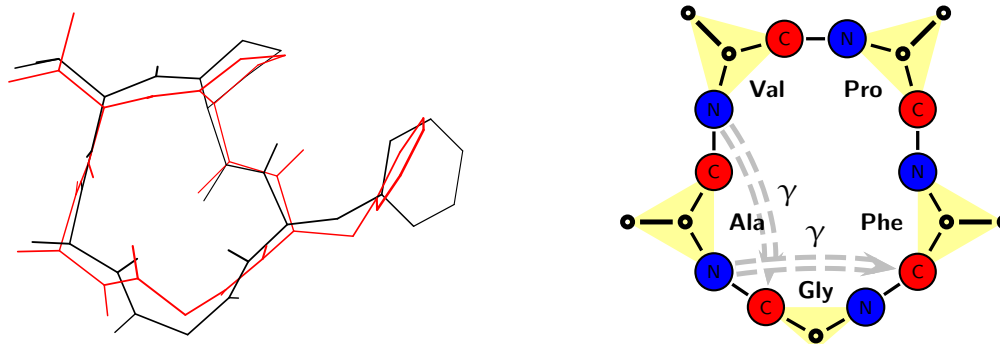


Abbildung 116: Überlagerung der RMD-Konformationen 1 und 2 von c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz A).

Tabelle 95: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz A).

Donor	Akzeptor	Population [%]		$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
		RMD <sub>1</sub>	RMD <sub>2</sub>	
Ala H <sup>N</sup>	Phe O	16.6		-3.6
Val H <sup>N</sup>	Gly O		20.6	-4.3
Phe H <sup>N</sup>				-6.3
Gly H <sup>N</sup>	Pro O		1.7	-9.5

Das Clustering der DG-Strukturen des Signalsatzes B ergibt ebenfalls zwei Cluster mit Populationen von 68.0% und 31.9%. Beide Konformationen unterscheiden sich lediglich durch Variationen der Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der Aminosäure Ala. Die Aminosäure Pro besetzt in beiden Konformationen die  $i+1$  Position einer  $\beta$ I-Schleife.

Die RMD-Simulationen der beiden aus den DG-Rechnungen extrahierten Strukturen haben geringe NOE-Verletzungen. Die Anzahl der positiven Verletzungen liegt bei 4 bzw. 3, die sich über die gesamte RMD zu 121 pm bzw. 94 pm addieren. Die durchschnittliche positive NOE-Verletzung ist 30 pm bzw. 31 pm.

Das Clustering der RMD-Trajektorien resultiert in insgesamt drei Konformationen. Zwei zentrale Strukturen werden aus den mit 49.6% (1) und 42.4% (2) populierte Clustern erhalten, die dritte aus dem mit 91.2% populierte Cluster der anderen RMD. Diese sind als Überlagerung in Abbildung 117 dargestellt. Die Struktur 1 weist eine  $\gamma$ -Schleife mit

Tabelle g6: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz B).

Donor	Akzeptor	Population [%]		$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
		RMD <sub>1</sub>	RMD <sub>2</sub>	
Ala H <sup>N</sup>	Pro O	8.1	0.9	-7.0
Ala H <sup>N</sup>	Phe O	4.2	1.1	
Val H <sup>N</sup>	Gly O	11.6	1.6	-2.0
Phe H <sup>N</sup>	Val O	9.3	19.2	-2.8
Gly H <sup>N</sup>	Ala O	4.8	1.3	-4.8
Gly H <sup>N</sup>	Val O		2.2	

Ala in  $i+1$  Position aus. Die Konformationen der Strukturen 2 und 3 sind nahezu identisch und besitzen eine  $\gamma$ -Schleife mit Pro in zentraler Position. In allen Konformationen befindet sich eine verzerrte  $\beta$ -Schleife mit Phe in  $i+1$  Position.

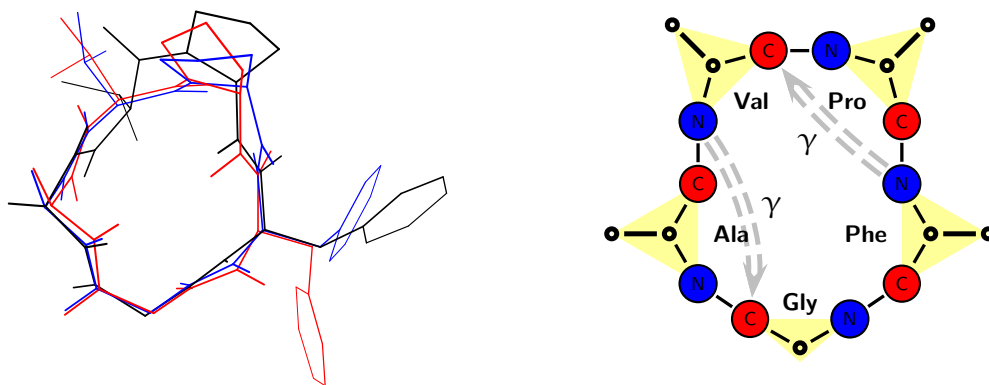


Abbildung 117: Überlagerung der RMD-Konformationen 1 bis 3 von c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz B).

Während der RMD werden Wasserstoffbrücken zwischen unterschiedlichen Donoren und Akzeptoren ausgebildet. Dadurch werden sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Schleifen gebildet. Der Energiegewinn durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke wirkt jedoch nicht stabilisierend auf die Sekundärstruktur des cyclischen Peptids **11**, so dass lediglich die  $\gamma$ -schleifenstabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Phe H<sup>N</sup> und Val O eine nennenswerte Population erreicht. Die anderen H-Brücken werden jeweils in geringen Maße ausgebildet und weisen auf eine hohe Dynamik und unbestimmte Sekundärstruktur hin.

Tabelle 97: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen der Clusterfamilien aus der RMD von c-(AVPFG) **11** in TFE der Signalsätze A und B.

AS	RMDA1		RMDA2		RMDB1		RMDB2		RMDB3	
	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$
Ala	-103°	-82°	73°	-80°	-120°	74°	-96°	-91°	-77°	-88°
Val	-123°	97°	-137°	109°	-15°	120°	-122°	-23°	-139°	-13°
Pro	-84°	-41°	-86°	-75°	-62°	137°	-77°	79°	-80°	56°
Phe	-83°	113°	-65°	106°	21°	107°	-13°	122°	42°	109°
Gly	96°	-86°	91°	82°	113°	-78°	134°	-74°	124°	-82°

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen von Val und Phe weisen recht hohe Werte auf, die auf eine Beteiligung an H-Brücken oder Abschirmung gegenüber dem Solvens hinweisen. Dies kann anhand der RMD gezeigt werden, jedoch sind die Populationen der H-Brücken im Vergleich eher gering. Die Temperaturgradienten von Ala und Gly können durch die RMD bestätigt werden.

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen von **11** aller berechneten Cluster sind in Tabelle 97 zusammengefasst. Außer  $\gamma$ -Schleifen mit unterschiedlichen Aminosäuren in zentraler Position können keine charakterisierten Sekundärstrukturelemente identifiziert werden.

Tabelle 98: Zusammenfassung der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  aus der RMD für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz A).

AS	${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]		
	ber <sub>A1</sub>	ber <sub>A2</sub>	exp
Ala	9.2 (-1.9,+1.4)	6.8 (-1.5,+1.9)	n. b.
Val	9.3 (-1.8,+1.5)	9.4 (-1.9,+1.4)	5.8
Phe	5.5 (-0.9,+1.3)	6.8 (-1.2,+1.4)	8.5
Gly	5.2 (-1.0,+1.8)	5.2 (-1.0,+1.8)	6.1

Die berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  für Signalsatz A sind in Tabelle 98 zusammengefasst, für Signalsatz B in Tabelle 99. Für Signalsatz A liegen die experimentellen Kopplungskonstanten von Val und Phe außerhalb der Toleranzen. Ein Grund hierfür ist nicht direkt erkennbar, doch besitzen alle Kopplungskonstanten Werte zwischen 5.5 Hz und 8.5 Hz, wodurch sich eine Vielzahl an möglichen Rückgratstorsions-

winkel ergibt. Die berechneten Strukturen können somit auch Extremwerte darstellen, die durch eine hohe Dynamik der Struktur herausgemittelt werden. Ein analoges Bild zeigt dieser Vergleich für die ermittelten Werte von Signalsatz B.

Tabelle 99: Zusammenfassung der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  aus der RMD für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz B).

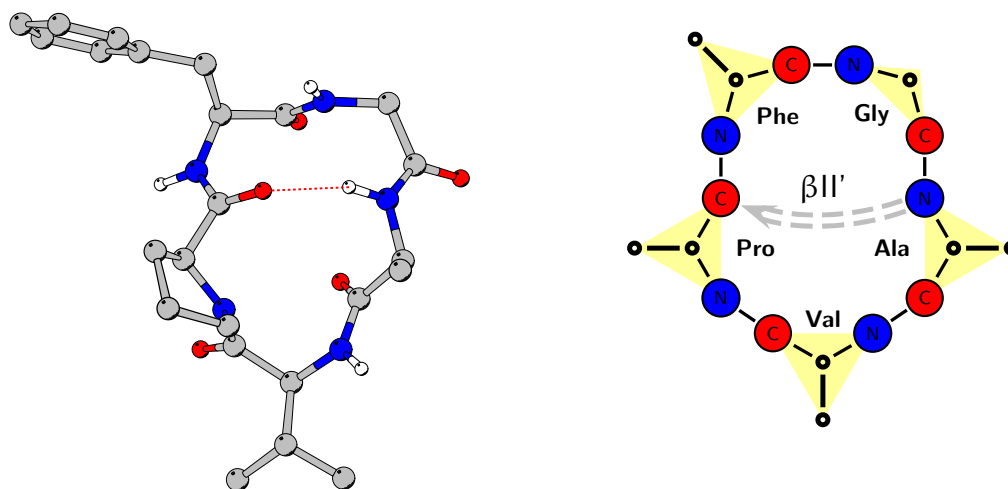
AS	${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]			
	ber <sub>A1</sub>	ber <sub>A2</sub>	ber <sub>A3</sub>	exp
Ala	9.0 (−1.8,+1.5)	8.0 (−1.5,+1.4)	6.5 (−1.2,+1.3)	4.2
Val	2.2 (−0.2,+1.3)	9.7 (−2.0,+1.4)	9.4 (−1.9,+1.4)	9.8
Phe	4.5 (−0.9,+1.7)	4.2 (−0.8,+1.7)	5.2 (−1.1,+1.7)	7.9
Gly	3.9 (−0.7,+1.7)	2.2 (−0.2,+1.3)	2.1 (−0.2,+1.3)	4.8

Zusammengefasst kann die Konformation von c-(AVPFG) **11** in TFE als hoch dynamisch betrachtet werden. Die berechneten NOE-Distanzen stellen über Millisekunden gemittelte H-H-Distanzen dar und resultieren für beide Signalsätze in einer Vielzahl an möglichen Konformationen. Eine Korrelation mit anderen experimentellen Daten, wie Temperaturgradienten oder Kopplungskonstanten, ist teilweise möglich, jedoch ergeben sich häufig Abweichungen, die auf schnelle Sekundärstrukturänderungen des Peptids in Lösung hinweisen.

In Gegenwart von einem Äquivalent  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen wird eine *cis*-Peptidbindung zwischen Val und Pro nicht mehr gebildet, da in den NMR-Spektren nur noch ein Signalsatz identifiziert werden kann und die Differenz  $\Delta\delta(\text{C}^\beta, \text{C}^\gamma)$  von Pro mit 2.9 ppm eine *trans*-Konfiguration anzeigt. Grund hierfür kann die Bildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes mit direkter Beteiligung der Carbonylgruppe des Pro sein, so dass Konfigurationsänderungen der Peptidbindung energetisch nicht begünstigt sind.

Den NOE-Spektren können insgesamt 34 NOE-Distanzen entnommen werden, davon sind 21 intraresidual, 10 sequenziell und 3 weitreichend (siehe Tabelle 144). Die daraus berechneten 1000 DG-Strukturen ergeben nach Clustering nach Rückgratstorsionswinkeln eine Clusterfamilie mit einer Population von 100.0%, deren zentrale Struktur eine  $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Phe in  $i+1$  Position besitzt. Diese wird als Startstruktur für die folgende RMD-Simulation verwendet, deren Clustering zwei Konformationsfamilien mit Populationen von 68.8% und 18.4% ergibt. Insgesamt treten während der RMD 5 positive




 Abbildung 118: Strukturvorschlag für c-(AVPFG) **11** in TFE mit 1 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

NOE-Verletzung mit einer Summe von 113 pm und einer durchschnittlichen Verletzung von 22 pm auf.

Die zentrale Struktur des höher besetzten Clusters ist in Abbildung 118 dargestellt. Die durch DG-Rechnungen ermittelte  $\beta\text{II}'$ -Schleife erweist sich als stabil und ist auch während der RMD präsent. Die zentrale Struktur des nieder besetzten Clusters ist nicht dargestellt, doch weist sie als einzigen Konformationsunterschied eine Vorzeichenumkehr der Rückgratstorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der an der  $\beta\text{II}'$ -Schleife beteiligten Aminosäuren Pro, Phe und Gly auf, so dass eine  $\beta\text{II}$ -Schleife mit Phe in  $i+1$  Position resultiert.

 Tabelle 100: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel, der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der zentralen Strukturen der Clusterfamilien aus der RMD von c-(AVPFG) **11** in TFE mit 1 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

AS	RMD <sub>1</sub>		RMD <sub>2</sub>		$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]		
	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	ber <sub>1</sub>	ber <sub>2</sub>	exp
Ala	$-92^\circ$	$-138^\circ$	$-123^\circ$	$-129^\circ$	7.1 (-1.4,+1.3)	9.7 (-2.0,+1.4)	7.2
Val	$-72^\circ$	$-33^\circ$	$-68^\circ$	$-35^\circ$	6.8 (-1.3,+1.4)	6.2 (-1.1,+1.3)	n. b.
Pro	$-96^\circ$	$143^\circ$	$-83^\circ$	$-154^\circ$			
Phe	$56^\circ$	$-101^\circ$	$-58^\circ$	$134^\circ$	6.8 (-1.5,+1.9)	3.8 (-0.5,+1.2)	n. b.
Gly	$-79^\circ$	$-38^\circ$	$72^\circ$	$-29^\circ$	7.0 (-1.4,+1.3)	6.5 (-1.4,+1.8)	4.3

Die Rückgratstorsionswinkel sowie die daraus berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der beiden zentralen Strukturen sind in Tabelle 100 zusammengefasst. Aufgrund einer Signalverbreiterung können nicht alle Kopplungskonstanten exakt bestimmt werden, so dass lediglich für Ala und Gly experimentelle Werte vorliegen. Während die Kopplungskonstanten von Ala recht gut mit den berechneten Strukturen korrelieren, findet sich für Gly keine gute Übereinstimmung. Wird jedoch eine durchschnittliche Kopplungskonstante von Gly über die gesamte RMD berechnet, so ergibt sich ein Wert von 5.1 Hz ( $-0.9, +1.3$ ), der dem experimentellen Wert besser entspricht.

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen und Populationen der H-Brücken sind in Tabelle 101 zusammengefasst. Die Temperaturgradienten sind für alle Amidprotonen besonders gering und deuten auf das Fehlen von jeglichen Wasserstoffbrücken hin. Dennoch finden sich während der RMD zwei H-Brücken mit Populationen, die höhere Werte erwarten lassen würden. Ein Grund hierfür ist nicht erkennbar.

Tabelle 101: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(AVPG) **11** in TFE mit 1 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala $\text{H}^{\text{N}}$	Pro O	34.1	-9.5
Val $\text{H}^{\text{N}}$	Phe O	17.7	-7.4
Phe $\text{H}^{\text{N}}$			-9.4
Gly $\text{H}^{\text{N}}$	Pro O	3.5	-11.7

Wird die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen auf zwei Äquivalente erhöht, ändern sich in den NMR-Spektren die chemischen Verschiebungen nur geringfügig gegenüber denen in Gegenwart von einem Äquivalent gefundenen Werten. Nur ein Signalsatz ist präsent, und die  ${}^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen des Pro sind mit einer *trans*-Peptidbindung zwischen Val und Pro kompatibel.

Den NOE-Spektren können insgesamt 25 Proton-Proton-Distanzen entnommen werden, davon 15 intraresidual, 8 sequenziell und 2 weitreichend (siehe Tabelle 145). Die anhand dieser Distanzen berechneten DG-Strukturen ergeben eine Clusterfamilie mit einer Population von 100.0%. Die zentrale Struktur dieses Clusters wurde als Startstruktur für die folgende RMD-Simulation verwendet, während der lediglich eine NOE-Verletzung mit einem durchschnittlichen positiven Wert von 7 pm auftritt. Das Clustering der RMD-

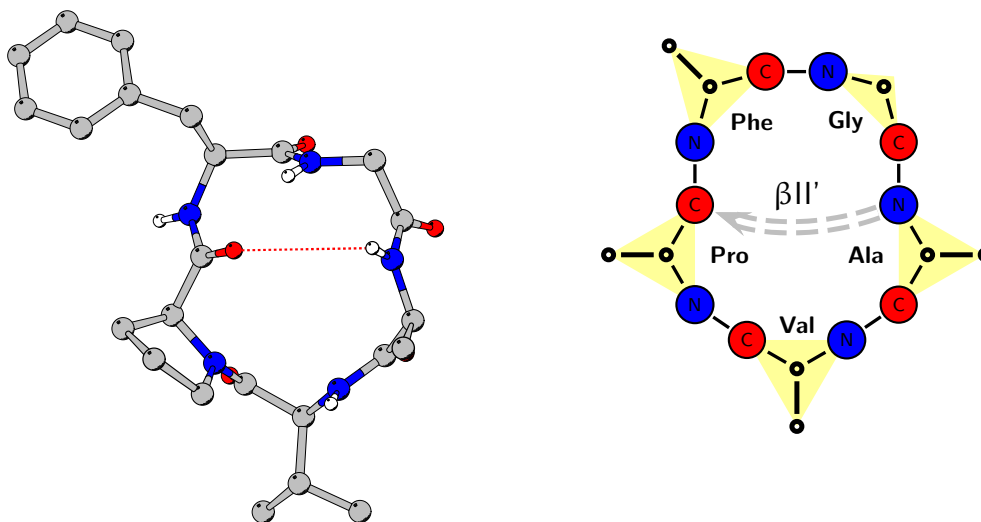


Abbildung 119: Strukturvorschlag für c-(AVPFG) **11** in TFE mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Trajektorie ergibt einen zu 96.0% populierten Cluster, dessen zentrale Struktur in Abbildung 119 dargestellt ist. Sie besitzt eine zur Konformation in Gegenwart von einem Äquivalent Ca<sup>2+</sup>-Ionen identische Konformation mit einer verzerrten  $\beta$ II'-Schleife mit Phe in  $i+1$  Position.

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Struktur sowie die berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  sind in Tabelle 102 zusammengefasst. Die Temperaturgradienten der Amidprotonen im Vergleich mit den Populationen der während

Tabelle 102: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel, der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{HNH}\alpha}$  der zentralen Struktur aus der RMD von c-(AVPFG) **11** in TFE mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

AS	RMD		$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	$\varphi$	$\psi$	ber <sub>1</sub>	exp
Ala	-65°	-105°	6.8 (-1.2,+1.4)	9.3
Val	-95°	-42°	8.5 (-1.7,+1.4)	4.4
Pro	-87°	132°		
Phe	62°	-80°	6.9 (-1.5,+1.8)	4.2
Gly	-91°	-67°	7.3 (-1.4,+1.4)	4.8

Tabelle 103: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für *c*-(AVPFG) **11** in TFE mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Ala H <sup>N</sup>	Pro O	15.0	-2.6
Val H <sup>N</sup>			-4.3
Phe H <sup>N</sup>			-8.6
Gly H <sup>N</sup>	Pro O	11.8	-8.2

der RMD ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind in Tabelle 103 zusammengefasst. Weder die berechneten Kopplungskonstanten noch die ermittelten H-Brücken korrelieren in zufriedenstellendem Maß mit den experimentellen Daten. Zwar wird eine H-Brücke zwischen H<sup>N</sup> des Ala und O des Pro ausgebildet, doch findet sich eine weitaus geringere Population als erwartet. Das Val H<sup>N</sup> wird dem Solvens recht frei exponiert und sollte daher einen geringeren Temperaturgradienten aufweisen. Entgegengesetztes ist für Gly H<sup>N</sup> zu finden. Während es bei der RMD zu einer Überlagerung der  $\beta$ II'-Schleife mit einer  $\gamma$ -Schleife durch Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen H<sup>N</sup> von Gly und O von Pro mit einem Anteil von 11.8% an der Gesamttrajektorie kommt, ist die ermittelte Temperaturabhängigkeit deutlich geringer und deutet eine Exposition zum Solvens an. Analog zu dieser Beobachtung verhalten sich die Kopplungskonstanten, die nicht mit den experimentellen Daten korrelieren. Eine Begründung hierfür findet sich nicht.

### 6.2.5 Konformationsänderungen von *c*-(LAVPFG) **12** durch Calcium

Die Zuordnung der <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Resonanzfrequenzen von *c*-(LAVPFG) **12** in TFE-D<sub>2</sub> ist in den Tabellen 146 und 147 in Abschnitt 6.4.4 zusammengefasst. In den NMR-Spektren sind zwei Signalsätze zu beobachten, **12** nimmt TFE daher zwei verschiedene Konformationen ein. Die genauere Betrachtung der <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenzen zeigt, dass der Unterschied zwischen beiden Konformationen die Konfiguration der Val-Pro-Peptidbindung ist (siehe Tabelle 146 und 147). Die Differenz  $\Delta\delta(C^\beta, C^\gamma)$  beträgt für Signalsatz A 9.8 ppm und für Signalsatz B 3.6 ppm. In Signalsatz A ist das NMR-Signal von C<sup>β</sup> gegenüber Signalsatz B tieffeldverschoben. Hieraus folgt, dass in Signalsatz A die Val-Pro-Peptidbindung *cis*- und in Signalsatz B *trans*-Konfiguration besitzt.

Die diastereotopen Protonen des Signalsatzes A wurden während der DG- und MD-Rechnungen als Pseudoatome behandelt, da insgesamt nur wenige NOE gemessen wurden. Für den Signalsatz B erfolgte die Zuordnung der diastereotopen Protonen anhand von DG-Rechnungen mit einander komplementärer Zuordnung und den extrahierten Kopplungskonstanten.

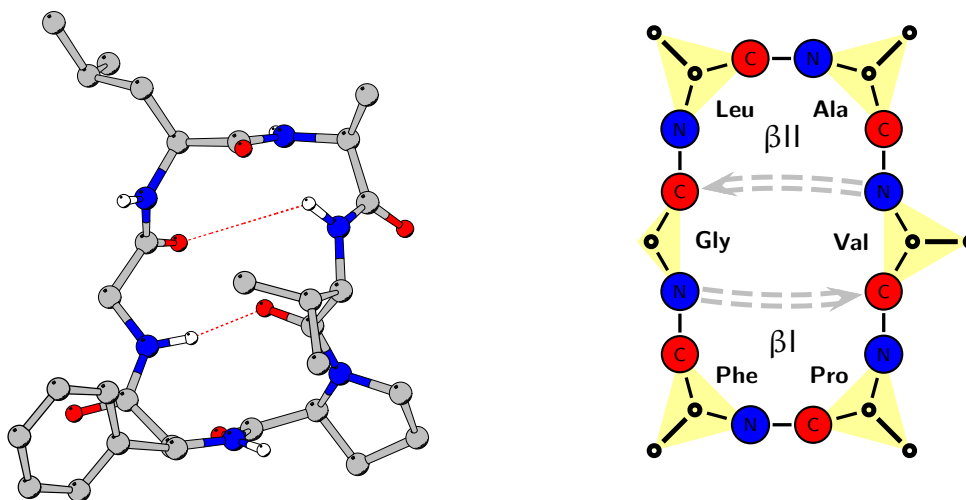


Abbildung 120: Darstellung der Konformation 1 abgeleitet von Signalsatz A von c-(LAVPFG) 12 in TFE.

Für den Signalsatz A konnten insgesamt 20 Proton-Proton-Distanzen bestimmt werden, davon sind 11 intraresidual, 8 sequenziell und 1 weitreichend (siehe Tabelle 148). Für Signalsatz B sind 42 NOE-Signale eindeutig zugeordnet und integriert worden, davon sind 23 intraresidual, 15 sequenziell und 4 weitreichend (siehe Tabelle 149).

Das Clustering der mittels DG berechneten Strukturen ergibt für beide Signalsätze jeweils einen Cluster mit Populationen von 97.7% (A) bzw. 99.4% (B). Die zentralen Strukturen dieser Clusterfamilien werden als Startstrukturen für die folgende RMD-Simulation verwendet, während derer nur geringfügige konformationelle Änderungen auftreten.

Die RMD-Rechnung für Signalsatz A resultiert in zwei Clustern mit Populationen von 55.2% und 35.2%. Während der Simulation treten drei positive NOE-Verletzungen mit einer Summe von 35 pm auf. Die durchschnittliche Verletzung beträgt 11 pm. Die zentralen Strukturen der gefundenen Cluster sind in den Abbildungen 120 und 121 dargestellt.

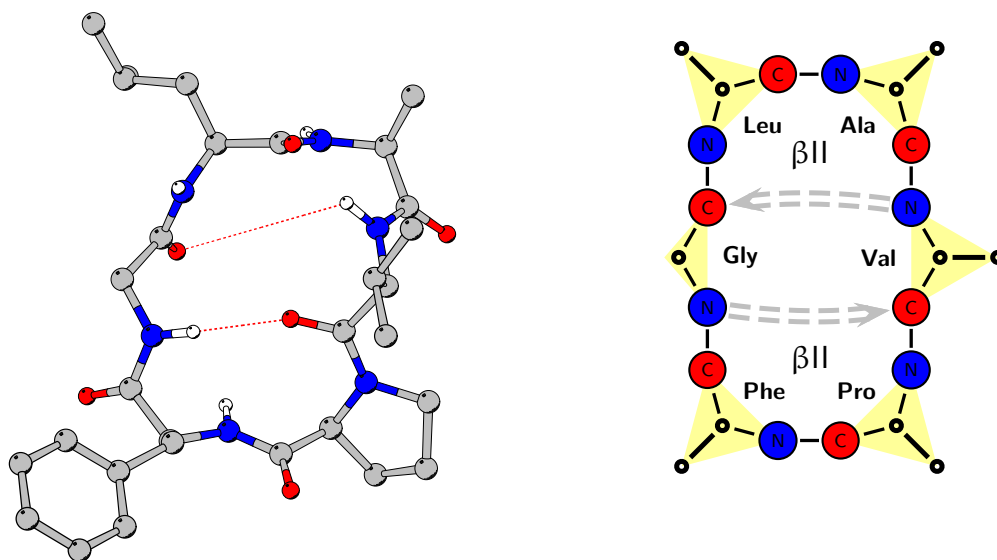


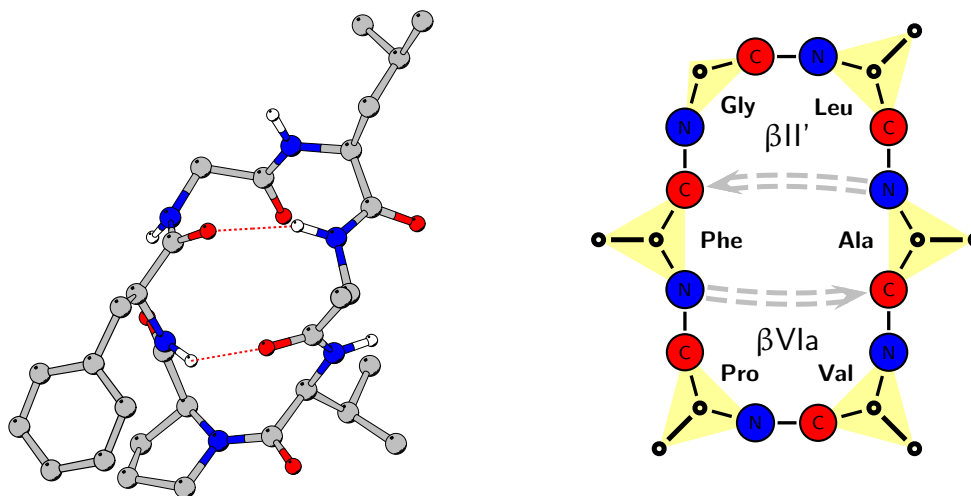
Abbildung 121: Darstellung der Konformation 2 abgeleitet von Signalsatz A von c-(LAVPFG) **12** in TFE.

Die Strukturvorschläge für den Signalsatz A sind konformationell sehr ähnlich. Die höher populierte Clusterfamilie 1 enthält zwei gegenüberliegende  $\beta$ -Schleifen, eine  $\beta$ II-Schleife mit Leu in  $i+1$  Position und eine  $\beta$ I-Schleife mit Pro in  $i+1$  Position. Die Konformation 2 weist hier hingegen eine  $\beta$ II-Schleife mit Pro in  $i+1$  Position auf.

Die RMD-Simulation für Signalsatz B resultiert in einem Cluster mit einer Population von 99.2%, dessen zentrale Struktur in Abbildung 122 dargestellt ist. Insgesamt treten zwei positive NOE-Verletzungen mit einer Summe von 64 pm und einer durchschnittlichen Verletzung von 32 pm auf.

Der Strukturvorschlag für Signalsatz B besitzt eine  $\beta$ II'-Schleife mit Gly in  $i+1$  Position und eine für *cis*-konfigurierte Xaa-Pro-Peptidbindungen typische  $\beta$ VIa-Schleife mit Pro in  $i+2$  Position.

Die Rückgratstorsionswinkel der zentralen Clusterstrukturen der Signalsätze A (Konformation 1 und 2) und B sind in Tabelle 104 zusammengefasst. Die daraus berechneten theoretischen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  sind in der Tabelle 106 mit den dazugehörigen experimentellen zusammengefasst. Für Signalsatz A liegen die experimentellen


 Abbildung 122: Darstellung der Konformation abgeleitet von Signalsatz B von c-(LAVPFG) **12** in TFE.

Werte leicht außerhalb der Toleranzen. Aufgrund der sehr geringen NOE-Verletzungen während der RMD sind die Abweichungen nicht erklärbar. Zudem korrelieren die Temperaturgradienten der Amidprotonen sehr gut mit den Populationen der Wasserstoffbrücken während der RMD (siehe Tabelle 105). Aufgrund der Signalüberlagerung der  $H^N$ -Resonanzfrequenzen der Aminosäuren Val und Phe sind deren Kopplungskonstanten nicht bestimmbar. Zudem kann wegen dieser Überlagerung der Temperaturgradient für das  $H^N$  des Val nicht korrekt bestimmt werden. Das  $H^N$  des Gly besitzt eine  $T_1$ -induzierte

 Tabelle 104: Zusammenfassung der Rückgratstorsionswinkel der zentralen Strukturen der Clusterfamilien aus der RMD von c-(LAVPFG) **12** in TFE der Signalsätze A und B.

AS	RMD <sub>A1</sub>		RMD <sub>A2</sub>		RMD <sub>B</sub>	
	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$
Leu	-93°	117°	-121°	126°	-43°	-33°
Ala	70°	-53°	68°	-47°	-114°	90°
Val	-76°	128°	-89°	129°	-39°	119°
Pro	-51°	-34°	-59°	102°	-83°	-13°
Phe	-43°	-27°	154°	-55°	-86°	79°
Gly	-178°	-102°	-116°	-103°	72°	-134°

Tabelle 105: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAVPFG) **12** in TFE (Signalsatz A).

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>			-8.0
Ala H <sup>N</sup>			-5.3
Val H <sup>N</sup>	Gly O	87.4	n. b.
Phe H <sup>N</sup>			-7.0
Gly H <sup>N</sup>	Val O	62.2	-3.2

Signalverbreiterung, so dass diese Kopplungskonstante ebenfalls nicht bestimmt werden kann.

Beim Vergleich der  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  Kopplungskonstanten mit den theoretisch Berechneten findet sich für Signalsatz B eine gute Übereinstimmung (siehe Tabelle 106). Die Werte liegen alle innerhalb der Toleranzen. Die Temperaturgradienten der Amidprotonen korrelieren nur in geringem Maße mit den Populationen der H-Brücken während der RMD. Der Strukturvorschlag besitzt jedoch eine leicht gebogene Konformation, in der die schleifenstabilisierenden Wasserstoffbrücken dem Solvens exponiert und durch keine Seitenkette abgeschirmt werden. Diese Struktur erklärt die resultierenden geringeren Temperaturgradienten.

Nach Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Kationen ist eine Aggregation von c-(LAVPFG) **12** innerhalb von drei bis vier Stunden zu beobachten. Aus diesem Grund ist eine Konformationsanalyse mit NMR nicht möglich und eine Studie der konformationellen Eigenschaften von  $\beta^{\text{h}}$ Pro in zyklischen Hexapeptiden mit diesen Modellpeptiden ausgeschlossen.

Tabelle 106: Zusammenfassung der berechneten und experimentellen Kopplungskonstanten  ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$  aus der RMD für c-(LAVPFG) **12** in TFE der Signalsätze A und B.

AS	${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]			AS	${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ [Hz]	
	ber <sub>A1</sub>	ber <sub>A2</sub>	exp		ber <sub>B</sub>	exp
Leu	8.5 (-1.7,+1.4)	9.3 (-1.9,+1.4)	6.8	Leu	4.0 (-0.6,+1.2)	5.1
Ala	6.7 (-1.5,+1.9)	6.7 (-1.4,+1.8)	9.3	Ala	8.4 (-1.6,+1.4)	7.2
Val	6.9 (-1.3,+1.4)	8.8 (-1.8,+1.4)	n. b.	Val	2.3 (-0.1,+1.2)	n. b.
Phe	4.0 (-0.6,+1.2)	3.0 (-0.3,+1.2)	n. b.	Phe	7.8 (-1.5,+1.4)	7.9
Gly	6.7 (-1.3,+1.3)	9.5 (-1.9,+1.5)	n. b.	Gly	5.9 (-1.2,+1.8)	5.6



Tabelle 107: Temperaturgradienten der Amidprotonen und die Population der Wasserstoffbrücken während der RMD für c-(LAVPFG) **12** in TFE (Signalsatz B).

Donor	Akzeptor	Population [%]	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ [ $\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$ ]
Leu H <sup>N</sup>			-10.3
Ala H <sup>N</sup>	Phe O	21.4	-6.5
Val H <sup>N</sup>	Leu O	18.3	-4.9
Phe H <sup>N</sup>	Ala O	33.0	-5.3
Gly H <sup>N</sup>	Pro O	32.6	-3.3

### 6.3 Zusammenfassung und Diskussion

Sinnvolle Strukturvorschläge, die weitestgehend im Einklang mit experimentellen Daten stehen, konnten für die zyklischen Peptide c-(AV<sup>β<sup>h</sup></sup>PFG) **9**, c-(LAV<sup>β<sup>h</sup></sup>PFG) **10**, c-(AVPFG) **11** und c-(LAVPFG) **12** erarbeitet werden. Zusätzlich konnten die konformationellen Änderungen unter Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Kationen für die Peptide **9**, **10** und **11** untersucht werden. Die Bildung von Aggregaten im Falle von **12** verhinderte diese Konformationsstudien.

Die strukturinduzierende Wirkung der nichtproteinogenen Aminosäure <sup>β<sup>h</sup></sup>Pro konnte anhand dieser molekularmechanischen Rechnungen detailliert untersucht werden. Im Solvens DMSO bzw. TFE und bei einer *trans*-Konfiguration der Xaa-<sup>β<sup>h</sup></sup>Pro-Peptidbindung befindet sie sich in den hier untersuchten Peptiden ausschließlich in der zentralen Position einer Ψγ-Schleife oder in *i*+1 Position einer Ψβ-Schleife.

Die Konfiguration der Xaa-<sup>β<sup>h</sup></sup>Pro-Peptidbindung kann analog zu Xaa-Pro-Bindungen analysiert werden, jedoch sind die <sup>13</sup>C-Verschiebungsdifferenzen bei den β-Homoanaloga etwas größer. Eine eindeutige Zuordnung kann meist anhand der tieffeldverschobenen C<sup>δ</sup>-Resonanzfrequenz erfolgen. Befindet sich eine *cis*-Peptidbindung vor dem <sup>β<sup>h</sup></sup>Pro, nimmt es bevorzugt die *i*+2 Position einer Ψβ-Schleife.

In allen hier untersuchten zyklischen Peptiden konnten konformationelle Änderungen durch den Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Kationen beobachtet werden, die im Einklang mit den vorangegangenen FT/IR- und chiroptischen Untersuchungen stehen. Die Peptide enthalten zu einem geringen Prozentsatz eine *cis*-Konfiguration der Xaa-<sup>β<sup>h</sup></sup>Pro- bzw. Xaa-Pro-

Peptidbindung. Durch die Erhöhung der Calciumkonzentration war in allen Fällen diese Konfiguration nicht mehr zu beobachten. Während bei den Peptiden  $c\text{-}(AV^{\beta h}\text{PFG})$  **9** und  $c\text{-}(LAV^{\beta h}\text{PFG})$  **10** die konformationellen Änderungen eher gering sind und sich teilweise nur auf die Unterdrückung der *cis*-Konfiguration beschränken, konnte bei **11** ein drastischer Konformationswechsel beobachtet werden, der zu einer stabilen Konformation führte.

Das Peptid **12** lässt anhand der chiroptischen Untersuchungen unterschiedliche Konformationen in Gegenwart von einem Äquivalent und zwei Äquivalenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erwarten. Die leicht zeitverzögerte Bildung von Aggregaten bei Zugabe der Calciumsalze verhinderte leider die Analyse dieser sehr interessanten Konformationsänderungen.

Ein genereller Einfluss der Kationen auf die Konformation zyklischer Peptide kann nicht eindeutig bestimmt werden. Zwar können Tendenzen erkannt werden, jedoch ist die Position der Kationen mit NMR und MD-Rechnungen nicht zu bestimmen. Versuche, mit  $^{43}\text{Ca}$ -NMR-Spektren die Umgebung der Kationen zu bestimmen, schlugen aufgrund der sehr geringen Konzentration fehl. Aufgrund des Kernspins von  $7/2$  wurde versucht, das  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Cd}^{2+}$  zu ersetzen. Da die CD-Spektren in Gegenwart von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen auf andere Konformationen hinweisen, wurden keine detaillierten Konformationsanalysen mit NMR durchgeführt.

Eine Möglichkeit, die Position der Kationen exakt zu bestimmen, wäre die Titration der Peptide mit paramagnetischen Kationen. Aufgrund der ähnlichen Komplexchemie und annähernd gleichen Ionenradien können die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen durch  $\text{Ce}^{3+}$ -Kationen ersetzt werden.<sup>[305,306]</sup> Ein Problem, das durch den Einsatz der paramagnetischen Ionen entstehen kann, ist eine starke Verkürzung der Relaxationszeiten, was eine starke Linienverbreiterung zur Folge hat. Eine Titration mit  $\text{Mg}^{2+}$ -Kationen wäre deshalb ebenfalls denkbar.<sup>[305]</sup>

Die  $\text{Ce}^{3+}$ -Kationen sollten die Konformation der zyklischen Peptide auf ähnliche Weise beeinflussen wie  $\text{Ca}^{2+}$ . Dieses kann mittels CD-Spektroskopie vorab geprüft werden. Die NMR-Strukturuntersuchungen basieren in Gegenwart der paramagnetischen Kationen auf deren Einfluss auf die longitudinale Relaxationszeit einzelner Kerndipole. Hierdurch können mit Hilfe der Gleichung nach Solomon und Curie Distanzen berechnet werden, die direkt in molekularmechanischen Rechnungen verwendet werden können und eine

exakte Positionierung der Kationen ermöglichen.<sup>[307]</sup> In letzter Zeit wurden einige Konformationsanalysen dieser Art veröffentlicht.<sup>[308–310]</sup>

## 6.4 Experimenteller Teil

Die CD-Spektren wurden bei 298 K mit einem J-810 CD-Spektroskop (Jasco) unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm von 300 nm bis 185 nm bei einer Peptidkonzentration von ca.  $5.0 \cdot 10^{-5}$  M aufgenommen. Als Geräteparameter wurden die folgenden Einstellungen verwendet: *band width* 1 nm, *response* 1 s, *sensitivity* low, *data pitch* 0.5 nm, *scanning speed*  $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , *accumulation* 3. Die Elliptizität  $[\theta]$  ist in  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  angegeben. Die aufgenommenen Spektren wurden durch Subtraktion des Solvens TFE und anschließende S/N-Unterdrückung mit der Savitzky-Golay Methode bearbeitet. Zur Titration mit Kationen wurden Lösungen von  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  bzw.  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  in TFE verwendet.

Die FT/IR-Spektren wurden mit einer Auflösung von  $2 \text{ cm}^{-1}$  in DMSO- $\text{D}_6$  bzw. TFE mit einem Bruker Equinox 55 FT/IR-Spektrometer in einer  $\text{CaF}_2$ -Zelle mit einer Weglänge von 0.207 mm bei einer Peptidkonzentration von 4 mM aufgenommen. Zur Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurden die Peptide mit Lösungen von 4.0 mM bzw. 8.0 mM an  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  in TFE gelöst, so dass ein molares Verhältnis von Peptid zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von 1:1 bzw. 1:2 erhalten wurde.

Die VCD-Spektren wurden mit einer Auflösung von  $4 \text{ cm}^{-1}$  in TFE mit einem Bruker PMA37 VCD/PM-IRRAS Modul an einem Bruker Equinox 55 FT/IR-Spektrometer aufgenommen. Der photoelastische ZnSe-Modulator des Instruments wurde auf eine Wellenzahl von  $1600 \text{ cm}^{-1}$  eingestellt. Zusätzlich wurde ein optischer Filter zur Erhöhung der Sensitivität in der Carbonylregion mit einem Transmissionsbereich von  $1960 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  verwendet. Das Instrument wurde mit einer CdS *multiple-wave*-Platte kalibriert. Die Messungen erfolgten in einer  $\text{CaF}_2$ -Zelle mit einer Weglänge von 0.207 mm bei einer Probenkonzentration von  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Das VCD-Spektrum wurde über 21000 Einzelspektren gemittelt. Zur Basislinienkorrektur wurde das Spektrum des Solvens subtrahiert.

Durch mehrmaliges Einfrieren im Vakuum wurde eine ca. 0.2 mM Peptidlösung in den Lösungsmitteln DMSO- $\text{D}_6$  bzw. TFE- $\text{D}_2$  entgast und anschließend unter Argonatmosphäre

re luftdicht verschlossen. Die NMR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K mit einem Bruker Avance Spektrometer bei einer magnetischen Flussdichte  $B_0$  von 14.1 T aufgenommen, entsprechend einer  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz von 600.13 MHz bzw.  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenz von 150.90 MHz. Für alle Experimente wurde ein inverser 5 mm-TXI 600 MHz Probenkopf mit  $z$ -Gradient verwendet.

Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Spinsysteme erfolgte mit einem  $^1\text{H}$ -Spektrum, einem phasensensitivem doppelquantengefilterten COSY und einem TOCSY mit DIPSI2-Pulssequenz für den homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfer.<sup>[217–219]</sup> Zur Bestimmung der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen wurden zweidimensionale heteronuklear korrelierte inverse  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC- und HMBC-Spektren aufgenommen.<sup>[220–223]</sup> Die relevanten Kopplungskonstanten wurden dem  $^1\text{H}$ -Spektrum entnommen. Zusätzlich zu NOESY mit verschiedenen Mischzeiten wurde ein ROE-Spektrum aufgenommen, um chemischen Austausch zu erkennen.<sup>[76,311]</sup> Vor der Fourier-Transformation erfolgte eine Basislinienkorrektur und Apodisation des FID durch eine Verstärkungsfunktion.

Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter von **9**, **10**, **11** und **12** sind in den Tabellen 108 bis 115 zusammengefasst. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen sind in den Abschnitten 6.4.1 bis 6.4.4 zusammengefasst. Die *molecular modelling* Rechnungen erfolgten mit den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Arbeitsschritten, jedoch wurde keine RDC-basierende Strukturverfeinerung durchgeführt. Die MD-Rechnungen in TFE wurden in einer anhand der Parameter von Fioroni *et al.* erstellten Solvensbox durchgeführt.<sup>[312]</sup>

Tabelle 108: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von  $c\text{-(AV}^{\beta\text{H}}\text{PFG)} \mathbf{9}$ .

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
$c\text{-(AV}^{\beta\text{H}}\text{PFG)} \mathbf{9}$ in DMSO-D <sub>6</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	20.00, 4.14	0.2	128K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfhpr	8K×512	32	20.00, 4.14	1.5×23.4	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	mlevphpr	8K×512	32	20.00, 4.14	1.5×23.4	$\tau_m = 80$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	8K×512	32	20.00, 4.14	1.5×23.4	$\tau_m = 160, 180, 200$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyetpr	8K×256	32	20.00, 4.14	1.5×46.9	$\tau_m = 320$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4phpr	4K×256	32	20.00, 4.14	2.9×117.9	$J_{C,H} = 145$ Hz 1K×1K, sin
$c\text{-(AV}^{\beta\text{H}}\text{PFG)} \mathbf{9} + 1$ Äq. Ca <sup>2+</sup> in DMSO-D <sub>6</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	128K	64	20.00, 3.55	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfhpr	8K×512	32	20.00, 3.55	1.5×23.4	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	mlevphpr	4K×256	32	20.00, 3.55	2.9×46.9	$\tau_m = 80$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	8K×512	32	20.00, 3.55	1.5×23.4	$\tau_m = 140, 160, 180, 200$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyetpr	2K×256	32	20.00, 3.55	5.9×46.9	$\tau_m = 320$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4phpr	4K×256	32	20.00, 3.55	5.9×165.1	$J_{C,H} = 145$ Hz
HMBC	inv4gplrndqfpr	2K×256	16	280.0, 125.0 20.00, 3.55	5.9, 165.1	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ 1K×1K, sin

Tabelle 109: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(AV<sup>8h</sup>PF<sub>6</sub>) **9**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, OLP [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(AV <sup>8h</sup> PF <sub>6</sub> ) <b>9</b> + 2 Äq. Ca <sup>2+</sup> in DMSO-D <sub>6</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	128K	64	20.00, 3.55	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfp <sub>hpr</sub>	8K×512	32	20.00, 3.55	1.5×23.4	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	mlevp <sub>hpr</sub>	4K×256	32	20.00, 3.55	2.9×46.9	$\tau_m = 80$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	8K×512	32	20.00, 3.55	1.5×23.4	$\tau_m = 160, 180, 200$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyetpr	2K×256	32	20.00, 3.55	5.9×46.9	$\tau_m = 320$ ms 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4p <sub>hpr</sub>	2K×256	16	20.00, 3.55	5.9×165.1	$J_{C,H} = 145$ Hz 1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gplrndqfpr	2K×256	16	20.00, 3.55	5.9, 165.1	1K×1K, sin
c-(AV <sup>8h</sup> PF <sub>6</sub> ) <b>9</b> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	10.52, 5.15	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfp <sub>hpr</sub>	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2p <sub>hpr</sub>	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 60$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	10.52, 5.15	1.5×12.3	$\tau_m = 320, 360, 400, 440$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4p <sub>hpr</sub>	2K×256	16	10.52, 5.15	3.1×59.0	$J_{C,H} = 145$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbcgplpndqf	4K×512	64	11.00, 5.13	1.6×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz, $\tau_m J_{C,H} = 10$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup>
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	2K×256	16	5.00, 7.50	1.5×7.5	$J_{N,H} = 90$ Hz 2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
<sup>13</sup> C	zgp <sub>g30</sub>	64K	6K	200.8, 100.0	0.5	32K, exp., LB 1.0
DEPT	dept135	64K	6K	200.8, 100.0	0.5	32K, exp., LB 1.0, $J_{C,H} = 145$ Hz

Tabelle 110: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(AV<sup>β</sup>PFG) **9**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(AV <sup>β</sup> PFG) <b>9</b> + 1 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	10.52, 5.15	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfphpr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2phpr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 60$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	10.52, 5.15	1.5×12.3	$\tau_m = 320, 360, 400, 440$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4phpr	2K×256	16	10.52, 5.15	3.1×59.0	$J_{C,H} = 145$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbeglpndqf	4K×512	64	11.00, 5.13 222.4, 99.8	1.6×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 10$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup>
c-(AV <sup>β</sup> PFG) <b>9</b> + 2 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	10.52, 5.15	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfphpr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2phpr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 60$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K×256	16	10.52, 5.15	1.5×24.6	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	10.52, 5.15	1.5×12.3	$\tau_m = 250, 320, 360, \dots, 480$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4phpr	2K×256	16	10.52, 5.15	3.1×59.0	$J_{C,H} = 145$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbeglpndqf	4K×512	64	11.00, 5.13 222.4, 99.8	1.6×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 10$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup>

Tabelle 111: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(LAV)<sup>βh</sup>PFG) **10**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(LAV) <sup>βh</sup> PFG) <b>10</b> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	16	11.02, 5.19	0.1	128K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfp1pr	4K×512	16	11.02, 5.19	1.6×12.9	4K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2p1pr	4K×512	16	11.02, 5.19	1.6×12.9	$\tau_m = 60$ ms 2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K×512	16	11.02, 5.19	1.6×12.9	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	11.02, 5.19	1.6×12.9	$\tau_m = 150, 200, \dots, 400$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4p1pr	2K×256	16	10.52, 5.19	3.1×59.0	$J_{C,H} = 145$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbcgp1ndqf	4K×512	64	11.02, 5.13	1.6×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 10$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup>
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	2K×256	16	2.99, 7.50	0.9×29.8	$J_{N,H} = 90$ Hz 2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
c-(LAV) <sup>βh</sup> PFG) <b>10</b> + 1 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	32	11.02, 5.11	0.1	128K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfp1pr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	4K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2p1pr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	$\tau_m = 60$ ms 2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	$\tau_m = 150, 200, \dots, 500$ ms 2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsi1prsp	2K×256	16	11.02, 5.11	3.2×48.8	$J_{C,H} = 145$ Hz 4K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	2K×256	16	2.99, 7.50	0.9×9.5	$J_{N,H} = 90$ Hz 2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$



Tabelle 112: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	sw, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(LAV <sup>βh</sup> PFG)	<b>10</b> + 2 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>					
<sup>1</sup> H	zgpr	16K	32	11.02, 5.11	0.4	128K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfphpr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	4K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCYSY	dipsi2phpr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	$\tau_m = 60$ ms 2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyphpr	4K×512	16	11.02, 5.19	1.6×12.9	$\tau_m = 200$ ms 2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	11.02, 5.11	1.6×12.9	$\tau_m = 200, 250, \dots, 400$ ms 2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsi	2K×256	16	11.02, 5.11	1.6×48.8	$J_{C,H} = 145$ Hz
HMBC	hmbcgp1pndqf	4K×512	16	165.7, 75.0 11.01, 5.13	1.6×65.5	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$ $J_{C,H} = 145$ Hz
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	invietf3gpsi	2K×256	16	222.4, 99.8 2.99, 7.50 100.0, 120.0	0.9×29.5	2K×1K, sin <sup>2</sup> $J_{N,H} = 90$ Hz 2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$

Tabelle 1.13: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(AVPFG) **11**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, $\omega_{IP}$ [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(AVPFG) <b>11</b> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	11.02, 5.17	0.1	128K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfpplr	4K×512	16	11.02, 5.17	1.6×12.9	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2plr	2K×512	16	11.02, 5.17	3.2×12.9	$\tau_m = 90$ ms
ROESY	roesyplr	2K×512	16	11.02, 5.17	3.2×12.9	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyplr	2K×256	16	11.02, 5.17	3.2×25.8	$\tau_m = 200$ ms
HSQC	hsqetgpsp	2K×256	16	10.01, 5.15 165.7, 75.0	2.9×97.7	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbcgpplndqf	4K×512	32	11.02, 5.17 240.0, 105.0	1.6×70.7	$J_{C,H} = 125$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 8$ Hz
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	hsqet3gpsi	2K×256	64	4.01, 7.50 31.8, 115.0	1.2×7.6	2K×2K, sin
c-(AVPFG) <b>11</b> + 1 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	32	10.01, 5.19	0.1	$J_{N,H} = 90$ Hz
COSY	cosydfpplr	4K×256	32	11.02, 5.19	1.6×25.8	2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2plr	2K×512	16	11.02, 5.19	3.2×12.9	32K, exp., LB 0.2
ROESY	roesyplr	2K×512	32	11.02, 5.19	3.2×12.9	1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyplr	2K×512	16	11.02, 5.17	3.2×12.9	$\tau_m = 80$ ms
HSQC	hsqetgpsp	4K×256	32	10.01, 5.13 165.7, 75.0	1.5×97.7	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	hmbcgpplndqf	4K×256	64	10.01, 5.00 222.4, 99.8	1.5×131.1	$\tau_m = 200$ ms
						2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
						$\tau_m = 400$ ms
						2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
						$J_{C,H} = 145$ Hz
						1K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
						$J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 10$ Hz
						2K×1K, sin

Tabelle 114: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(AVPFG) **11**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(AVPFG) <b>11</b>	+ 2 Äq. Ca <sup>2+</sup> in TFE-D <sub>2</sub>					
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	128	10.52, 5.11	0.1	32K, exp, LB 0.3
COSY	cosydfphpr	4K × 256	32	10.52, 5.11	1.5 × 24.6	1K × 1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOSY	dipsi2phpr	4K × 256	16	10.52, 5.11	1.5 × 24.6	$\tau_m = 60$ ms 1K × 1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
ROESY	roesyetgppr	4K × 256	16	10.52, 5.11	1.5 × 24.6	$\tau_m = 200$ ms 1K × 1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K × 512	16	10.52, 5.11	1.5 × 12.3	$\tau_m = 250, 320, 360, \dots, 480$ ms 1K × 1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	hsqcetgpsisp	8K × 512	32	10.52, 5.11 100.0, 50.0	1.5 × 97.7	$J_{C,H} = 145$ Hz 2K × 2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gpplrndqf	4K × 256	180	13.35, 6.01 230.0, 110.0	2.0 × 135.6	$J_{C,H} = 145$ Hz 2K × 2K, sin <sup>2</sup>
DEPT	dept135	64K	5120	238.4, 100.0	0.5	32K, exp, LB 1.0

Tabelle 115: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(LAVPEG) **12**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, $\omega_{1P}$ [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter & Prozessierung
c-(LAVPEG) <b>12</b> in TFE-D <sub>2</sub>						
<sup>1</sup> H	zgpr	64K	32	10.01, 5.17	0.1	32K, exp., LB 0.3
COSY	cosydfp1pr	2K×256	32	10.21, 5.17	3.0×23.9	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2p1pr	2K×512	16	10.21, 5.17	3.0×12.0	$T_m = 80$ ms
ROESY	roesyphpr	2K×512	16	10.21, 5.17	3.0×12.0	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	2K×128	16	10.01, 5.19	3.2×51.7	$T_m = 200$ ms
NOESY	noesyphpr	2K×128	16	10.01, 5.19	3.2×51.7	2K×1K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	2K×128	16	10.01, 5.19	3.2×51.7	$T_m = 100, 150, \dots, 500$ ms
NOESY	noesyphpr	2K×128	16	10.01, 5.19	3.2×51.7	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	2K×128	16	10.01, 5.19	3.2×51.7	$T_m = 400$ ms
NOESY	noesyphpr	4K×512	24	11.02, 5.17	1.6×12.9	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	hsqctgpsisp	4K×512	48	11.02, 5.13	1.6×48.8	$J_{C,H} = 145$ Hz
HMBC	hmbcg1pndqf	4K×512	32	165.7, 75.0	1.6×48.8	2K×2K, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$
				10.01, 5.17	1.5×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz, ${}^nJ_{C,H} = 8$ Hz
				222.4, 99.8	1.5×65.5	4K×1K, sin <sup>2</sup>
<sup>15</sup> N <sup>1</sup> H-HSQC	hsqctt3gpsi	2K×128	128	3.49, 7.50	1.0×21.4	$J_{N,H} = 90$ Hz
				45.0, 115.0	1.0×21.4	2K×256, sin <sup>2</sup> , + $\frac{\pi}{2}$

6.4.1 c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9**Tabelle 116: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in DMSO.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	8.92	3.96	1.34			
Val-2	7.00	4.36	2.17	0.84/0.90		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.02/2.30	3.96	1.48/2.00	1.70/1.85	3.41/3.63
Phe-4	7.87	4.56	2.70/3.34			
Gly-5	8.42	3.67/3.83				
AS	$\delta$ [ppm] C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	173.2	51.6	17.3			
Val-2	170.1	55.0	28.5	16.7/20.2		
<sup>βh</sup> Pro-3	172.0	41.8	57.3	33.3	24.5	47.3
Phe-4	172.1	54.1	36.9			
Gly-5	169.0	44.6				

Tabelle 117: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup> in DMSO.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	8.92	3.96	1.34			
Val-2	6.99	4.35	2.17	0.83/0.90		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.02/2.30	3.95	1.49/1.98	1.70/1.84	3.41/3.62
Phe-4	7.89	4.55	2.70/3.35			
Gly-5	8.42	3.66/3.84				
AS	$\delta$ [ppm] C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	173.3	51.3	17.3			
Val-2	170.1	55.0	28.4	16.7/20.2		
<sup>βh</sup> Pro-3	172.2	42.2	57.4	33.2	25.1	48.1
Phe-4	172.0	54.0	36.9			
Gly-5	169.0	45.2				

Tabelle 118: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup> in DMSO.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	8.91	3.95	1.34			
Val-2	6.98	4.35	2.17	0.85		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.02/2.31	3.96	1.49/1.99	1.70/1.85	3.41/3.62
Phe-4	7.90	4.55	2.70/3.35			
Gly-5	8.42	3.65/3.85				

AS	$\delta$ [ppm] C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	173.1	51.6	16.5			
Val-2	170.0	55.4	28.1	17.7		
<sup>βh</sup> Pro-3	172.3	41.7	57.7	33.0	24.0	47.5
Phe-4	172.0	54.4	36.6			
Gly-5	169.0	44.6				

Tabelle 119: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in TFE.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	7.91	4.17	1.51			
Val-2	7.17	4.52	2.25	0.86/0.99		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.25/2.38	4.07	1.58/2.19	1.80/1.97	3.44/3.61
Phe-4	6.60	4.80	3.04/3.22			
Gly-5	8.50	3.76/3.95				

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	109.4	174.3	52.0	15.3			
Val-2	119.1	170.5	55.7	28.6	17.7		
<sup>βh</sup> Pro-3	n. b.	175.3	42.3	57.3	32.3	23.7	47.2
Phe-4	130.9	173.2	54.6	36.7			
Gly-5	121.0	170.4	43.9				

Tabelle 120: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE.

AS	$\delta$ [ppm]					
	H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	8.41	4.28	1.54			
Val-2	6.95	4.71	2.56	1.05/1.07		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.28/2.56	4.44	1.58/2.27	1.87/2.03	3.46/3.72
Phe-4	7.62	4.59	3.03			
Gly-5	7.41	3.48/3.99				
AS	$\delta$ [ppm]					
	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	176.8	52.5	15.2			
Val-2	176.3	58.2	27.0	15.0/18.2		
<sup>βh</sup> Pro-3	176.3	41.5	56.8	30.3	24.3	48.6
Phe-4	172.4	55.8	36.3			
Gly-5	173.6	42.8				

Tabelle 121: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE (Signalsatz A).

AS	$\delta$ [ppm]					
	H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	8.36	4.39	1.55			
Val-2	7.18	4.84	2.55	1.05/1.08		
<sup>βh</sup> Pro-3		2.27/2.29	4.42	1.56/2.26	1.92/2.00	n. b.
Phe-4	7.56	4.60	3.04			
Gly-5	7.33	3.52/3.96				
AS	$\delta$ [ppm]					
	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Ala-1	177.3	52.7	16.0			
Val-2	176.4	58.0	n. b.	15.9/18.9		
<sup>βh</sup> Pro-3	n. b.	n. b.	n. b.	31.1	25.0	n. b.
Phe-4	172.0	55.7	36.3			
Gly-5	188.8	43.8				

Tabelle 122: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **g** mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE (Signalsatz B).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Ala-1	7.81	4.03	1.73			
Val-2	7.60	5.21	1.95	0.92/0.98		
β <sup>h</sup> Pro-3		2.27/2.29	4.42	1.56/2.26	1.92/2.00	n. b.
Phe-4	7.72	4.58	3.15			
Gly-5	7.39	3.56/3.91				

Tabelle 123: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **g** in DMSO.

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	379	417	273	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	269	296	230
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	378	530	271	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	298	328	264
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	246	355	241	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	Val H <sup>α</sup>	269	296	228
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	384	537	325	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	379	417	341
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	461	639	495	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	227	250	237
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	394	433	249	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	393	432	376
Val H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	457	503	403	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	Val H <sup>β</sup>	451	496	438
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	327	360	277	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	329	362	290
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	400	440	348	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	284	312	233
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	251	276	238	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	421	463	372
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	382	420	453	Phe H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	439	483	366
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	292	321	329	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	341	375	281
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	232	255	249	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	357	393	220
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	333	713	263	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	242	266	254
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	270	620	292	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	313	344	267
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	243	580	182	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	305	336	254
Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	361	755	421	Phe H <sup>β3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	495	545	411
Val Q <sup>γ</sup>	Phe H <sup>N</sup>	495	953	454	Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	315	347	218
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	306	337	251	Gly H <sup>α3</sup>	Val H <sup>N</sup>	415	457	382
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	290	319	320	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	332	365	272
β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	434	477	386	Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	354	389	322
β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	273	300	286	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	298	328	228



Tabelle 124: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für  $c\text{-}(AV^{\beta\text{hPFG}}) \mathbf{g}$  in DMSO mit 1 Äq.  $\text{Ca}^{2+}$ .

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala $M^{\beta}$	Ala $H^N$	338	477	268	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\delta 3}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\epsilon}$	268	287	233
Ala $M^{\beta}$	Val $H^N$	352	495	326	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	Val $H^{\alpha}$	261	241	199
Ala $M^{\beta}$	Val $H^{\alpha}$	426	593	495	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\delta}$	281	397	260
Ala $M^{\beta}$	Gly $H^{\alpha 3}$	500	691	484	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\gamma}$	242	354	364
Val $H^N$	Ala $H^N$	333	366	256	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	Val $H^{\alpha}$	322	242	254
Val $H^N$	Gly $H^N$	395	435	353	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\delta}$	290	301	233
Val $H^{\alpha}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	223	245	199	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\gamma}$	390	378	268
Val $H^{\alpha}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	215	236	254	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\gamma 3}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\epsilon}$	344	392	371
Val $H^{\beta}$	Val $H^N$	367	404	359	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\gamma 3}$	Val $H^{\beta}$	411	452	467
Val $H^{\beta}$	Val $H^{\alpha}$	236	260	237	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\gamma 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\alpha}$	325	357	281
Val $H^{\beta}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	236	260	345	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\gamma 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\delta}$	278	306	237
Val $Q^{\delta}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	241	265	283	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\gamma 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\epsilon}$	327	360	268
Val $Q^{\delta}$	Phe $H^N$	433	862	457	Phe $H^N$	Gly $H^N$	386	425	319
Val $Q^{\delta}$	Ala $M^{\beta}$	373	914	486	Phe $H^{\alpha}$	Phe $H^{\beta 3}$	208	229	288
Val $Q^{\delta}$	Val $H^N$	300	665	292	Phe $H^{\alpha}$	Gly $H^N$	328	361	229
Val $Q^{\delta}$	Val $H^{\alpha}$	254	596	288	Phe $H^{\beta 3}$	Phe $H^N$	429	472	228
Val $Q^{\delta}$	Val $H^{\beta}$	236	570	182	Phe $H^{\beta 3}$	Phe $H^{\alpha}$	197	217	288
Val $Q^{\delta}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 2}$	340	724	528	Phe $H^{\beta 2}$	Phe $H^N$	288	317	343
Val $Q^{\delta}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 3}$	387	794	465	Phe $H^{\beta 2}$	Gly $H^N$	405	445	268
Val $Q^{\delta}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\epsilon 2}$	370	769	445	Gly $H^{\alpha 3}$	Ala $H^N$	294	323	221
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 2}$	Val $H^{\alpha}$	432	475	480	Gly $H^{\alpha 3}$	Val $H^N$	394	433	398
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\epsilon}$	435	478	386	Gly $H^{\alpha 3}$	Gly $H^N$	334	367	255
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 2}$	Phe $H^N$	265	291	225	Gly $H^{\alpha 2}$	Ala $H^N$	303	333	334
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 2}$	Gly $H^N$	468	515	527	Gly $H^{\alpha 2}$	Val $H^N$	430	473	475
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\alpha 3}$	Phe $H^N$	444	488	337	Gly $H^{\alpha 2}$	Gly $H^N$	287	316	231
$\beta^{\text{h}}\text{Pro } H^{\delta 2}$	$\beta^{\text{h}}\text{Pro } Q^{\epsilon}$	241	314	233					

Tabelle 125: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **9** in DMSO mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	379	417	275	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	434	477	387
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	373	410	343	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	273	300	280
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	378	530	272	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	322	354	285
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	246	355	240	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	243	267	373
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	384	537	324	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	298	328	264
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	461	639	497	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	Val H <sup>α</sup>	211	232	225
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	394	433	239	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	Val H <sup>α</sup>	269	296	265
Val H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	457	503	470	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	379	417	372
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	327	360	276	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	227	250	237
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	400	440	341	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	393	432	376
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	251	276	239	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	Val H <sup>β</sup>	451	296	443
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	302	332	342	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	335	368	273
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	382	420	463	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	329	362	290
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	292	321	342	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	284	312	234
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	232	255	257	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	314	345	285
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	333	713	258	Phe H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	439	483	367
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	270	620	292	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	341	375	282
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	243	580	181	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	357	393	218
Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	351	740	632	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	242	266	264
Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	361	755	425	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	313	344	299
Val Q <sup>γ</sup>	Phe H <sup>N</sup>	495	953	457	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>α</sup>	305	336	249
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	Val H <sup>α</sup>	458	504	471	Phe H <sup>β2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	495	545	336
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	306	337	279	Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	315	347	220
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	412	453	371	Gly H <sup>α3</sup>	Val H <sup>N</sup>	415	457	379
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	290	319	218	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	332	365	277
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	Phe H <sup>α</sup>	412	453	426	Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	354	389	322
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	526	579	515	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	298	328	229
β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	344	378	442					

Tabelle 126: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **g** in TFE.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	257	283	265	βhPro H <sup>β</sup>	βhPro Q <sup>γ</sup>	239	385	250
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	285	313	331	βhPro H <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	249	274	284
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	270	387	266	βhPro Q <sup>δ</sup>	βhPro Q <sup>γ</sup>	213	475	227
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	256	282	276	βhPro Q <sup>ε</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	254	532	226
Val H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	310	341	356	βhPro Q <sup>ε</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	245	519	226
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>β</sup>	247	272	246	βhPro Q <sup>γ</sup>	βhPro H <sup>α2</sup>	249	398	242
Val H <sup>α</sup>	βhPro H <sup>ε3</sup>	319	351	207	βhPro Q <sup>γ</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	198	455	227
Val H <sup>α</sup>	βhPro H <sup>ε2</sup>	228	251	231	Phe H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	295	324	236
Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>N</sup>	302	429	323	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	256	282	284
Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>β</sup>	241	348	235	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	256	282	267
Val M <sup>γ1</sup>	Phe H <sup>N</sup>	329	465	424	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	278	306	262
Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>β</sup>	273	390	238	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	286	315	263
βhPro H <sup>α2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	227	250	220	Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	215	237	218
βhPro H <sup>α3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	294	323	335	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	291	320	257
βhPro H <sup>β</sup>	βhPro H <sup>α2</sup>	264	290	265	Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	265	292	307
βhPro H <sup>β</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	266	419	338	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	251	276	260

Tabelle 127: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PFG) **g** in TFE mit 1 Åq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	279	307	275	βhPro H <sup>β</sup>	βhPro H <sup>δ2</sup>	296	326	366
Ala H <sup>α</sup>	Ala M <sup>β</sup>	244	268	242	βhPro H <sup>β</sup>	βhPro H <sup>γ3</sup>	288	317	294
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	311	342	343	βhPro Q <sup>δ</sup>	βhPro Q <sup>γ</sup>	235	259	228
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	241	265	271	βhPro Q <sup>ε</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	249	274	226
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	315	347	318	βhPro Q <sup>γ</sup>	βhPro Q <sup>δ</sup>	229	252	228
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	269	296	249	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	287	316	274
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	327	360	281	Phe H <sup>α</sup>	Phe Q <sup>β</sup>	244	268	253
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>β</sup>	276	304	239	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	219	241	212
Val H <sup>α</sup>	Val M <sup>γ2</sup>	299	329	353	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	231	254	233
Val H <sup>α</sup>	βhPro Q <sup>ε</sup>	263	289	223	Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	348	383	395
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	228	251	268	Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	276	304	318
βhPro H <sup>α3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	219	241	288	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	234	257	221
βhPro H <sup>α2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	271	298	215	Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	217	239	214
βhPro H <sup>β</sup>	βhPro H <sup>α3</sup>	228	251	241	Gly H <sup>α3</sup>	Val H <sup>N</sup>	358	394	387
βhPro H <sup>β</sup>	βhPro H <sup>α2</sup>	247	272	277	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	276	304	274

Tabelle 128: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PF<sub>6</sub>) **g** in TFE mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup> (Signalsatz A).

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	285	314	204	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	229	252	283
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	287	316	317	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	281	309	288
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	338	372	370	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	219	241	276
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	297	327	304	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	232	255	266
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	327	360	279	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	226	249	252
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	261	287	251	Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	228	251	246
Val H <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	263	289	332	Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	271	298	324
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	237	261	272	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	242	266	221
Val Q <sup>γ</sup>	Phe H <sup>N</sup>	331	364	422	Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	219	241	209
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	265	291	291	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	274	301	267
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	213	234	183					

Tabelle 129: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AV<sup>βh</sup>PF<sub>6</sub>) **g** in TFE mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup> (Signalsatz B).

Atom 1	Atom 2	r [pm]				
		exp	max	RMD1	RMD2	RMD3
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	208	229	211	259	223
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	260	373	340	270	296
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	214	312	237	243	239
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	219	319	291	325	285
Val Q <sup>γ1</sup>	Val H <sup>N</sup>	276	395	314	336	378
Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	254	279	283	282	269
Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	200	220	214	223	213
Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	219	361	259	319	245
Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	234	378	254	221	254
Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	269	422	408	343	398
Gly H <sup>α3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	229	252	305	209	248
Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	209	230	269	270	276
Gly H <sup>α2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	217	239	205	302	225

6.4.2 c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10**Tabelle 130: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** TFE (Signalsatz A).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Leu-1	7.37	4.35	1.65/1.74	1.73	0.93/1.00	
Ala-2	7.52	4.57	1.45			
Val-3	6.93	4.24	2.00	0.96/1.04		
<sup>βh</sup> Pro-4		2.63/2.92	4.44	2.03/2.11	1.94	3.42/3.50
Phe-5	7.82	4.71	3.03			
Gly-6	7.48	3.40/3.97				

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Leu-1	123.1	173.5	55.1	38.1	24.5	20.1/21.0	
Ala-2	117.7	173.1	48.0	16.3			
Val-3	119.3	173.0	58.2	30.9	17.2/17.4		
<sup>βh</sup> Pro-4	n. b.	172.3	40.7	55.3	31.2	20.6	46.0
Phe-5	125.4	172.6	54.8	37.9			
Gly-6	111.1	171.2	43.4				

Tabelle 131: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** TFE (Signalsatz B).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Leu-1	7.49	4.09	1.73/1.82	1.66	0.96/1.01	
Ala-2	7.58	4.12	1.53			
Val-3	7.04	4.67	1.97	0.91/0.96		
<sup>βh</sup> Pro-4		2.30	4.25	1.64/2.20	1.87/1.96	3.52/3.68
Phe-5	6.80	4.78	3.02/3.33			
Gly-6	8.17	3.88/4.37				

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Leu-1	117.7	173.8	55.1	38.1	24.5	20.1/21.0	
Ala-2	118.9	173.0	50.9	15.4			
Val-3	113.0	171.1	55.7	31.9	16.3/17.9		
<sup>βh</sup> Pro-4	n. b.	n. b.	43.1	55.6	32.5	23.4	47.8
Phe-5	119.7	172.9	54.7	36.1			
Gly-6	107.4	170.8	41.9				

Tabelle 132: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Leu-1	7.76	4.35	1.67/1.75	1.71	0.95/1.00	
Ala-2	7.64	4.22	1.57			
Val-3	7.09	4.62	2.18	0.89/1.02		
<sup>βh</sup> Pro-4		2.51	4.62	1.65/2.25	1.95/2.01	3.54/3.77
Phe-5	7.65	4.54	3.04/3.14			
Gly-6	7.08	3.94/4.25				

AS	$\delta$ [ppm] C	C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	C <sup>ε</sup>
Leu-1	n. b.	54.8	39.3	24.4	n. b.	
Ala-2	n. b.	52.1	15.6			
Val-3	n. b.	n. b.	29.0	n. b.		
<sup>βh</sup> Pro-4	n. b.	40.7	54.3	30.9	23.5	48.3
Phe-5	n. b.	56.7	35.9			
Gly-6	n. b.	40.9				

Tabelle 133: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE.

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup>
Leu-1	7.75	4.36	1.67/1.76	n. b.	0.96/1.00	
Ala-2	7.69	4.26	1.57			
Val-3	7.08	4.64	2.20	1.03		
<sup>βh</sup> Pro-4		2.52	4.58	1.65	1.95/2.01	3.54/3.80
Phe-5	7.63	4.55	3.05/3.16			
Gly-6	7.13	3.97/4.25				

Tabelle 134: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAV)<sup>βh</sup>PF<sub>6</sub> **10** in TFE (Signalsatz A).

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	295	325	265	Val M <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	288	411	349
Leu H <sup>α</sup>	Leu H <sup>N</sup>	263	289	270	Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>N</sup>	315	446	301
Leu H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	290	319	329	Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>α</sup>	300	426	321
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	296	326	320	Val M <sup>γ1</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	375	526	381
Leu M <sup>δ1</sup>	Leu H <sup>α</sup>	372	521	392	β <sup>h</sup> Pro H <sup>α2</sup>	Val H <sup>α</sup>	264	290	375
Leu M <sup>δ2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	281	401	299	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	295	455	254
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	261	287	284	β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	Val H <sup>α</sup>	290	319	257
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	234	257	226	β <sup>h</sup> Pro H <sup>α3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	269	296	251
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	318	450	290	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	260	286	235
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	243	351	240	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	332	365	223
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	311	441	370	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	261	287	265
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	273	300	277	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	314	345	281
Val H <sup>α</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	196	216	176	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	238	262	215
Val H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	362	398	328	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	241	387	256
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	274	301	243	Gly H <sup>α2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	274	301	269
Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>N</sup>	406	567	317	Gly H <sup>α3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	249	274	219
Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>α</sup>	309	438	299					

Tabelle 135: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE (Signalsatz B).

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	399	439	429	Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>N</sup>	309	438	334
Leu H <sup>α</sup>	Leu H <sup>N</sup>	227	250	272	Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>α</sup>	286	408	290
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	321	353	326	Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>N</sup>	369	518	337
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>α</sup>	263	289	243	Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>α</sup>	264	378	314
Leu H <sup>β3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	330	363	332	Val M <sup>γ1</sup>	Phe H <sup>N</sup>	422	587	585
Leu H <sup>β2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	292	321	241	<sup>βh</sup> Pro Q <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	236	382	280
Leu H <sup>β2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	261	287	280	<sup>βh</sup> Pro H <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	307	338	235
Leu H <sup>β2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	335	368	376	<sup>βh</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	<sup>βh</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	245	269	271
Leu M <sup>δ1</sup>	Leu H <sup>α</sup>	297	423	376	<sup>βh</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	Val H <sup>α</sup>	225	367	215
Leu M <sup>δ2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	279	399	301	<sup>βh</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	<sup>βh</sup> Pro H <sup>β</sup>	226	249	234
Leu H <sup>γ</sup>	Leu H <sup>N</sup>	309	340	242	<sup>βh</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	<sup>βh</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	325	357	319
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	208	229	207	<sup>βh</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	<sup>βh</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	295	324	306
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	267	294	296	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	274	301	216
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	298	424	338	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	301	331	221
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	225	328	242	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	296	326	314
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	336	474	382	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	220	242	276
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	261	287	291	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	267	294	263
Val H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	373	410	400	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>α</sup>	181	199	242
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	250	275	282	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	294	323	273
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	302	332	253	Gly H <sup>α3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	246	271	267
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	242	266	256	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	285	314	262



Tabelle 136: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAV)<sup>βh</sup>PGF **10** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H <sup>α</sup>	Leu H <sup>N</sup>	259	285	250	Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	235	569	275
Leu H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	239	263	212	Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	225	554	182
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	199	219	254	Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	322	846	585
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>α</sup>	240	264	234	Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	302	668	424
Leu H <sup>β3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	284	312	294	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	286	439	396
Leu H <sup>β2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	237	261	247	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	251	528	226
Leu H <sup>β2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	252	277	241	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	273	427	319
Leu H <sup>γ</sup>	Leu H <sup>α</sup>	266	293	309	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	239	385	233
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	231	254	212	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	248	396	256
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	229	333	312	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	281	437	325
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	264	378	317	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	255	280	274
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	289	318	354	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	247	272	247
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	245	270	324	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>α</sup>	232	255	285
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	217	239	252	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	233	256	246
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	294	655	275	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	227	250	243
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	196	511	182	Gly H <sup>N</sup>	Leu H <sup>N</sup>	306	337	327
Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	332	862	585	Gly Q <sup>α</sup>	Leu H <sup>N</sup>	221	363	270
Val Q <sup>γ</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	306	674	463	Gly Q <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	230	374	247

Tabelle 137: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAV<sup>βh</sup>PFG) **10** in TFE mit 2 Åq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H <sup>α</sup>	Leu H <sup>N</sup>	264	290	283	Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>β</sup>	234	339	236
Leu H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	252	277	336	Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>N</sup>	237	343	275
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>α</sup>	255	280	269	Val M <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	370	519	470
Leu H <sup>β3</sup>	Leu H <sup>N</sup>	238	262	278	Val M <sup>γ2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	312	442	387
Leu H <sup>β3</sup>	Ala H <sup>N</sup>	275	303	245	Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	263	289	264
Leu H <sup>β2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	246	271	264	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	229	373	252
Leu H <sup>β2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	227	250	229	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	203	340	258
Leu H <sup>β2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	252	277	280	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	394	576	415
Leu M <sup>δ1</sup>	Leu H <sup>N</sup>	373	522	439	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	360	396	330
Leu M <sup>δ2</sup>	Leu H <sup>α</sup>	282	389	321	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	257	283	230
Leu M <sup>δ2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	366	514	478	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	251	276	232
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	242	266	274	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	303	333	375
Ala H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	307	338	344	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>ε</sup>	295	325	230
Ala M <sup>β</sup>	Leu H <sup>N</sup>	324	458	472	β <sup>h</sup> Pro H <sup>δ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>δ</sup>	255	281	275
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	222	323	242	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	Val H <sup>α</sup>	222	244	203
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	241	348	269	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	Val H <sup>α</sup>	257	283	261
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	270	387	306	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ3</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	228	251	235
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	266	293	235	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro Q <sup>α</sup>	217	358	241
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	302	332	353	β <sup>h</sup> Pro H <sup>γ2</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>β</sup>	268	295	271
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	259	285	324	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	263	289	277
Val H <sup>β</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	227	250	248	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	217	239	222
Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>α</sup>	295	420	285	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>α</sup>	250	275	284
Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>β</sup>	209	306	239	Phe H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	251	276	248
Val M <sup>γ1</sup>	Val H <sup>N</sup>	307	436	347	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>α</sup>	240	264	246
Val M <sup>γ1</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε2</sup>	340	479	440	Phe H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	235	259	228
Val M <sup>γ1</sup>	β <sup>h</sup> Pro H <sup>ε3</sup>	300	426	417	Gly H <sup>α3</sup>	Gly H <sup>N</sup>	250	275	284
Val M <sup>γ2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	376	527	516	Gly H <sup>α2</sup>	Leu H <sup>N</sup>	244	268	283
Val M <sup>γ2</sup>	Ala H <sup>N</sup>	351	494	495	Gly H <sup>α2</sup>	Gly H <sup>N</sup>	247	272	246
Val M <sup>γ2</sup>	Val H <sup>α</sup>	324	458	370					

6.4.3 c-(AVPFG) **11**Tabelle 138: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz A).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>
Ala-1	7.19	4.58	1.40		
Val-2	6.79	4.16	2.10	0.90/0.96	
Pro-3		4.50	2.14	1.64/1.85	3.54/3.65
Phe-4	7.15	4.74	2.99/3.13		
Gly-5	7.88	3.39/4.20			

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>
Ala-1	126.1	172.1	49.4	13.9		
Val-2	116.4	172.2	57.5	31.1	16.8/16.9	
Pro-3	n. b.	172.1	61.6	30.8	21.2	46.6
Phe-4	119.5	173.5	54.4	37.2		
Gly-5	112.7	171.7	44.4			

Tabelle 139: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz B).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>
Ala-1	7.50	4.01	1.43		
Val-2	6.69	4.31	1.91	0.95	
Pro-3		4.53	1.37/2.26	1.76/1.80	3.58/3.82
Phe-4	6.06	4.43	3.10/3.28		
Gly-5	8.13	3.90/4.13			

AS	$\delta$ [ppm] C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>
Ala-1	177.4	53.8	14.2		
Val-2	n. b.	57.8	29.9	n. b.	
Pro-3	172.5	62.1	30.8	22.3	47.0
Phe-4	n. b.	58.5	n. b.		
Gly-5	170.4	41.2			

Tabelle 140: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AVPFG) **11** mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE.

AS	$\delta$ [ppm]					
	H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>	H <sup><math>\epsilon</math></sup>
Ala-1	7.82	5.00	1.61			
Val-2	7.45	4.26	2.41	1.06/1.10		
Pro-3		4.45	1.90/2.11	2.13/2.33	3.60/3.87	
Phe-4	7.58	4.13	3.27			
Gly-5	8.30	3.96/4.25				
AS	$\delta$ [ppm]					
	C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>	C <sup><math>\epsilon</math></sup>
Ala-1	n. b.	n. b.	13.2			
Val-2	n. b.	66.6	26.8	17.0/18.6		
Pro-3	n. b.	62.0	27.1	24.2	46.8	
Phe-4	n. b.	56.3	33.8			
Gly-5	n. b.	44.2				

Tabelle 141: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(AVPFG) **11** mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup> in TFE.

AS	$\delta$ [ppm]					
	H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>	
Ala-1	7.83	4.99	1.60			
Val-2	7.43	4.24	2.39	1.06/1.09		
Pro-3		4.44	2.10/2.31	1.89/2.08	2.10/2.31	
Phe-4	7.52	4.11	3.26			
Gly-5	8.27	3.95/4.29				
AS	$\delta$ [ppm]					
	C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>	
Ala-1	175.6	48.7	13.2			
Val-2	171.1	66.5	26.6	16.9/18.5		
Pro-3	172.8	62.0	27.1	24.2	46.8	
Phe-4	174.2	56.2	33.7			
Gly-5	171.8	44.1				

Tabelle 142: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz A).

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	258	371	238	Pro Q <sup>β</sup>	Pro H <sup>α</sup>	218	359	240
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	307	436	274	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	258	538	226
Ala H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	375	413	381	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro H <sup>α</sup>	283	439	364
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	316	351	279	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	246	271	262
Val H <sup>α</sup>	Pro H <sup>α</sup>	190	209	182	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	233	256	216
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	283	311	256	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	220	362	241
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	292	653	271	Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	275	430	368
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	364	759	326	Gly Q <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	230	374	280
Val Q <sup>γ</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	346	886	558	Gly Q <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	236	382	242

Tabelle 143: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AVPFG) **11** in TFE (Signalsatz B).

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	293	322	280	Pro Q <sup>β</sup>	Pro H <sup>α</sup>	201	338	238
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	325	459	270	Pro Q <sup>δ</sup>	Val H <sup>α</sup>	220	362	399
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	358	503	366	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	253	530	226
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	324	356	199	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro H <sup>α</sup>	289	447	364
Val H <sup>α</sup>	Phe H <sup>α</sup>	223	245	251	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	293	322	228
Val H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	301	331	357	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	314	477	331
Val H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	313	344	359	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	267	420	221
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	285	642	297	Gly Q <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	265	418	284
Val H <sup>N</sup>	Ala H <sup>N</sup>	303	333	301	Gly Q <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	319	484	241

Tabelle 144: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AVPFG) **11** in TFE mit 1 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	310	440	239	Pro H <sup>β2</sup>	Pro H <sup>δ3</sup>	366	403	380
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	257	370	275	Pro H <sup>β2</sup>	Pro H <sup>δ2</sup>	276	304	300
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	231	335	250	Pro H <sup>β2</sup>	Pro H <sup>γ3</sup>	226	249	276
Ala M <sup>β</sup>	Pro H <sup>δ3</sup>	282	402	422	Pro H <sup>β2</sup>	Phe H <sup>N</sup>	308	339	234
Ala M <sup>β</sup>	Pro H <sup>δ2</sup>	227	330	307	Pro H <sup>δ3</sup>	Val H <sup>N</sup>	270	297	271
Ala H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	260	286	256	Pro H <sup>δ3</sup>	Pro H <sup>α</sup>	305	335	374
Val H <sup>α</sup>	Val Q <sup>γ</sup>	244	581	249	Pro H <sup>γ3</sup>	Pro H <sup>α</sup>	313	344	333
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	276	304	277	Pro H <sup>γ3</sup>	Pro H <sup>δ2</sup>	248	273	230
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	258	284	273	Pro H <sup>γ3</sup>	Pro H <sup>δ3</sup>	264	290	281
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	231	254	240	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	229	252	219
Val H <sup>β</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	227	371	277	Phe H <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	263	289	257
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	193	506	183	Phe Q <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	282	438	451
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	252	611	342	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	218	359	253
Pro H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	221	243	224	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>N</sup>	289	447	319
Pro H <sup>β3</sup>	Pro H <sup>α</sup>	217	239	227	Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	186	320	226
Pro H <sup>β3</sup>	Phe H <sup>N</sup>	314	345	323	Gly Q <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	307	469	298
Pro H <sup>β2</sup>	Pro H <sup>α</sup>	247	272	272	Gly Q <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	235	381	238

Tabelle 145: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(AVPFG) **11** in TFE mit 2 Äq. Ca<sup>2+</sup>.

Atom 1	Atom 2	r [pm]			Atom 1	Atom 2	r [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Ala H <sup>N</sup>	Gly H <sup>N</sup>	334	367	252	Pro H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	218	240	221
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	288	411	272	Pro Q <sup>β</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	243	516	345
Ala M <sup>β</sup>	Ala H <sup>α</sup>	238	345	238	Pro Q <sup>δ</sup>	Pro H <sup>α</sup>	306	468	367
Ala M <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	254	365	262	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro H <sup>α</sup>	283	439	368
Val H <sup>α</sup>	Val H <sup>N</sup>	274	301	280	Pro Q <sup>γ</sup>	Pro Q <sup>β</sup>	290	582	226
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>N</sup>	265	292	251	Pro Q <sup>γ</sup>	Phe H <sup>N</sup>	365	541	481
Val H <sup>β</sup>	Val H <sup>α</sup>	277	305	277	Phe H <sup>α</sup>	Phe H <sup>N</sup>	263	289	207
Val H <sup>β</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	228	372	255	Phe Q <sup>β</sup>	Ala H <sup>N</sup>	310	473	480
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>N</sup>	311	681	347	Phe Q <sup>β</sup>	Phe H <sup>α</sup>	260	411	256
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>α</sup>	230	561	249	Phe Q <sup>β</sup>	Gly H <sup>N</sup>	219	361	233
Val Q <sup>γ</sup>	Val H <sup>β</sup>	245	584	183	Gly Q <sup>α</sup>	Gly H <sup>N</sup>	229	373	239
Val Q <sup>γ</sup>	Pro H <sup>α</sup>	337	720	587	Gly Q <sup>α</sup>	Ala H <sup>N</sup>	330	497	294
Val Q <sup>γ</sup>	Pro Q <sup>δ</sup>	296	803	421					

6.4.4 c-(LAVPFG) **12**Tabelle 146: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAVPFG) **12** TFE (Signalsatz A).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>
Leu-1	7.55	4.14	1.67/1.75	n. b.	0.94/1.01
Ala-2	7.14	4.62	1.41		
Val-3	6.92	3.85	1.98	0.96/1.10	
Pro-4		4.62	1.93/2.20	1.70	3.29/3.43
Phe-5	8.56	4.75	3.17		
Gly-6	7.53	3.44/4.07			

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>
Leu-1	124.7	174.9	54.6	39.3	n. b.	19.5/21.4
Ala-2	120.8	172.7	47.3	14.2		
Val-3	118.6	n. b.	58.5	30.6	16.9/17.2	
Pro-4	n. b.	172.1	61.7	30.3	20.5	46.5
Phe-5	126.7	172.7	53.9	35.6		
Gly-6	110.0	171.8	43.0			

Tabelle 147: NMR-Resonanzfrequenzen von c-(LAVPFG) **12** TFE (Signalsatz B).

AS	$\delta$ [ppm] H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>
Leu-1	7.38	4.38	1.68	n. b.	0.96/1.00
Ala-2	7.59	4.05	1.58		
Val-3	7.31	4.63	2.19	0.64/1.00	
Pro-4		4.07	1.84/2.14	1.90	3.56/3.69
Phe-5	7.23	4.20	3.32/3.41		
Gly-6	8.12	3.61/4.34			

AS	$\delta$ [ppm] N	C	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C <sup><math>\beta</math></sup>	C <sup><math>\gamma</math></sup>	C <sup><math>\delta</math></sup>
Leu-1	121.8	n. b.	53.8	38.4	n. b.	20.4/20.7
Ala-2	121.7	172.0	51.3	14.9		
Val-3	109.0	n. b.	55.9	n. b.	14.7/19.9	
Pro-4	n. b.	n. b.	62.4	28.4	24.8	47.3
Phe-5	120.9	n. b.	56.5	34.1		
Gly-6	n. b.	170.2	43.0			

Tabelle 148: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAVPGF) **12** in TFE (Signalsatz A).

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H $^{\alpha}$	Leu H $^N$	252	277	281	Ala M $^{\beta}$	Val H $^N$	327	462	322
Leu H $^{\alpha}$	Ala H $^N$	217	239	212	Val H $^{\beta}$	Val H $^N$	303	333	235
Leu Q $^{\beta}$	Leu H $^{\alpha}$	225	368	255	Val Q $^{\gamma}$	Val H $^N$	300	665	329
Leu Q $^{\beta}$	Leu H $^N$	253	402	273	Val Q $^{\gamma}$	Gly Q $^{\alpha}$	332	862	636
Leu Q $^{\beta}$	Ala H $^N$	300	460	363	Val Q $^{\gamma}$	Pro Q $^{\delta}$	245	719	405
Leu Q $^{\delta}$	Leu H $^{\alpha}$	289	649	345	Val H $^N$	Ala H $^N$	287	316	334
Ala H $^{\alpha}$	Ala H $^N$	251	276	205	Pro Q $^{\beta}$	Pro H $^{\alpha}$	246	394	251
Ala H $^{\alpha}$	Val H $^N$	293	322	335	Pro Q $^{\delta}$	Val H $^{\alpha}$	227	371	216
Ala M $^{\beta}$	Ala H $^{\alpha}$	252	363	239	Phe Q $^{\beta}$	Phe H $^{\alpha}$	255	404	255
Ala M $^{\beta}$	Ala H $^N$	310	440	346	Gly Q $^{\alpha}$	Leu H $^N$	232	376	264

Tabelle 149: Zusammenfassung der gemessenen NOE-Distanzen (exp), der korrigierten NOE-Maximaldistanzen (max) und den während der RMD beobachteten mittleren Abstände (RMD) für c-(LAVPGF) **12** in TFE (Signalsatz B).

Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]			Atom 1	Atom 2	$r$ [pm]		
		exp	max	RMD			exp	max	RMD
Leu H $^{\alpha}$	Leu H $^N$	289	318	264	Val H $^{\beta}$	Val H $^N$	334	367	327
Leu H $^{\alpha}$	Ala H $^N$	357	393	349	Val M $^{\gamma 1}$	Val H $^{\alpha}$	313	443	280
Leu H $^{\alpha}$	Val H $^N$	425	467	454	Val M $^{\gamma 1}$	Val H $^N$	391	546	288
Leu H $^{\beta 2}$	Leu H $^N$	297	327	284	Val M $^{\gamma 1}$	Pro H $^{\alpha}$	272	389	386
Leu H $^{\beta 2}$	Ala H $^N$	343	377	265	Val M $^{\gamma 2}$	Ala H $^{\alpha}$	339	478	445
Leu H $^{\beta 3}$	Leu H $^N$	314	345	226	Val M $^{\gamma 2}$	Val H $^{\alpha}$	305	434	366
Leu M $^{\delta 1}$	Leu H $^{\alpha}$	292	416	313	Val M $^{\gamma 2}$	Val H $^N$	317	449	284
Leu M $^{\delta 1}$	Leu H $^N$	432	600	396	Pro H $^{\alpha}$	Phe H $^N$	362	398	323
Leu M $^{\delta 2}$	Leu H $^{\alpha}$	339	478	326	Pro H $^{\beta 2}$	Pro H $^{\alpha}$	282	299	269
Leu M $^{\delta 2}$	Leu H $^N$	438	609	449	Pro Q $^{\beta}$	Pro H $^{\alpha}$	246	394	241
Ala H $^{\alpha}$	Ala H $^N$	287	316	281	Pro Q $^{\beta}$	Pro H $^{\delta 3}$	319	484	370
Ala H $^{\alpha}$	Val H $^N$	251	276	218	Pro H $^{\delta 2}$	Phe H $^N$	368	405	403
Ala M $^{\beta}$	Ala H $^{\alpha}$	254	365	239	Pro Q $^{\gamma}$	Pro H $^{\delta 2}$	326	493	245
Ala M $^{\beta}$	Ala H $^N$	314	444	276	Phe H $^{\alpha}$	Phe H $^N$	332	365	278
Ala M $^{\beta}$	Val H $^N$	403	562	415	Phe H $^{\alpha}$	Gly H $^N$	244	268	224
Ala M $^{\beta}$	Phe Q $^{\beta}$	369	667	557	Phe Q $^{\beta}$	Phe H $^N$	326	493	287
Ala H $^N$	Leu H $^N$	300	330	286	Phe Q $^{\beta}$	Gly H $^N$	376	555	418
Val H $^{\alpha}$	Val H $^N$	298	328	252	Gly H $^{\alpha 2}$	Leu H $^{\alpha}$	367	404	428
Val H $^{\alpha}$	Pro H $^{\alpha}$	196	216	191	Gly H $^{\alpha 2}$	Gly H $^N$	258	284	280
Val H $^{\alpha}$	Phe H $^N$	329	362	300	Gly H $^{\alpha 3}$	Leu H $^N$	235	258	298
Val H $^{\alpha}$	Gly H $^N$	370	407	405	Gly H $^N$	Phe H $^N$	423	465	368



# 7

## Zusammenfassung

Die biologische Aktivität und Spezifität eines Wirkstoffs ist abhängig von dessen Struktur. Struktur- und Konformationsanalyse sind daher für eine gezielte Derivatisierung oder Mimikrysynthese unverzichtbar. Neben der Röntgenkristallographie liefert die NMR-Spektroskopie in Kombination mit molekularmechanischen Rechnungen entscheidende Beiträge zur Strukturaufklärung auf atomarer Ebene. Zusätzlich zu den strukturellen Informationen enthalten die NMR-Spektren Daten, die das dynamische Verhalten des Moleküls in Lösung beschreiben. Die Berücksichtigung dieser Strukturdaten während molekulardynamischer Rechnungen resultiert in einem detaillierten Molekülmodell, das sowohl die bevorzugte Konformation als auch dynamische Prozesse darstellt.

Die fruchtbare Symbiose von NMR-Spektroskopie mit molekularmechanischen Rechnungen ist Basis dieser Arbeit. Zusätzlich wurden Konformationsstudien mit vibrationsspektroskopischen und chiroptischen Methoden (FT/IR, CD und VCD) durchgeführt und mit den Ergebnissen der NMR-basierten Strukturanalysen verglichen.

Die Efraeptine werden als Gemisch von Sequenzanaloga des Pilzes *Tolypocladium niveum* und anderen Vertretern dieser Spezies produziert (siehe Tabelle 150). Sie enthalten

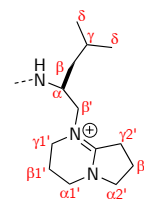
neben einem hohen Anteil nichtproteinogener Aminosäuren wie Aib, Pip und  $^{\beta}$ Ala eine von Leucinol abgeleitete kationische Kopfgruppe X. Die Efrapeptide inhibieren die  $F_0F_1$ -ATPase kompetitiv und dadurch die Photophosphorylierung in Pflanzen und Bakterien, sowie die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien und einigen Bakterien. Des Weiteren ist eine insektizide Wirkung eingehend untersucht worden, und sie zeigen Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Anti-proliferative Eigenschaften wurden ebenfalls kürzlich festgestellt.

Die Konformationsanalyse des Efrapeptin C stellte eine große Herausforderung dar. Die in der vorausgegangenen Diplomarbeit durchgeführten Studien an Efrapeptin C in TFE wurden zunächst in DMSO als Lösungsmittel wiederholt, um den Einfluss einer eher polaren Umgebung auf das Peptaibiotika zu untersuchen. Der hohe Anteil nichtproteinogener Aminosäuren wie Pip, Aib und  $^{\beta}$ Ala in Efrapeptin C erschwert die Gewinnung konformationsrelevanter NMR-Parameter entscheidend, und starke Signalüberlagerungen im Verschiebungsbereich von Methylprotonen reduzieren die Anzahl der NOE-Distanzen zusätzlich. Die Konformationsanalyse in DMSO zeigte, dass das Peptid eine  $3_{10}$ -helikale Konformation zwischen den Aminosäuren Aib-12 und Aib-15 bevorzugt und dass eine  $\beta'$ -Schleife mit Aib-4 in  $i+1$  Position die Bildung einer Sekundärstruktur ähnlich einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt induziert. Die geringe Rigidität des N-terminalen Bereichs resultiert vornehmlich aus der geringen Anzahl an *restraints* während der MD-Simulationen. Aussagen über die Konformation des zentralen Segments zwischen Leu-6 und Aib-9 können mit diesen Studien nicht getroffen werden.

Ein Versuch, die Anzahl der Konformationsparameter zu erhöhen, war eine partielle Deuterierung einzelner Aib-Rest im Efrapeptin C. Dies sollte die spezifische Zuordnung der Aib  $\beta$ -Methylgruppen ermöglichen und so die Stringenz der NOE-*restraints* erhöhen.

Tabelle 150: Sequenzen der Efrapeptide C bis G und die schematische Darstellung der Kopfgruppe X.

Efrapeptin	Sequenz
C	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X
D	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
E	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Iva-X
F	Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X
G	Ac-Pip-Aib-Pip-Iva-Aib-Leu- $^{\beta}$ Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Ala-Leu-Iva-X



Bei der Auswertung der NMR-Spektren stellte sich jedoch heraus, dass der Isotopieeffekt zu einer ausgeprägten Signalverbreiterung und Verschiebung der Resonanzfrequenzen führt und zusätzlich Restsignale der deuterierten Aib aufgrund einer unzureichenden Deuterierung deutlich zu erkennen waren. Dennoch konnten in einigen Fällen spezifische Resonanzfrequenzen den Methylgruppen zugeordnet werden.

Die Messung von dipolaren Restkopplungen ermöglicht die Gewinnung zusätzlicher hochsensitiver Konformationsparameter. Mit Hilfe eines Ausrichtungsmediums wird das Molekül partiell orientiert, und Kopplungskonstanten verändern sich in Abhängigkeit der Orientierung des Vektors zwischen diesen beiden Atomen. In Analogie zu der eher unpolaren Bindungstasche des Efraeptin C in der  $F_0F_1$ -ATPase wurde PDMS als Ausrichtungsmedium in DCM gewählt. Die Zahl der NOE-*restraints* konnte so drastisch erhöht werden. Die Konformationsanalysemethode (DG/SA) musste für die Berücksichtigung der RDC-Daten modifiziert werden, doch konnte so die Konformation von Efraeptin C sehr genau bestimmt werden. Es findet sich ein  $\beta$ -Schleifenstrang bzw. eine  $3_{10}$ -Helix am N-Terminus zwischen Pip-1 und Leu-6. Diesem Bereich folgt eine ungeordnete Struktur zwischen  $\beta$ Ala-7 und Aib-9. Zwischen den Aminosäuren Aib-10 und der kationischen Kopfgruppe liegt eine stabile  $3_{10}$ -helikale Struktur vor. Die helixunterbrechenden Eigenschaften der Aminosäure Gly-13 bewirken eine erhöhte Flexibilität im C-terminalen Bereich, so dass sich die finale Helixwindung häufig aufweitet und eine  $\alpha$ -Helix oder eine ungeordnete Struktur entsteht. Die zentrale Struktur der höchst populierten Clusterfamilie ist in Abbildung 123 dargestellt.

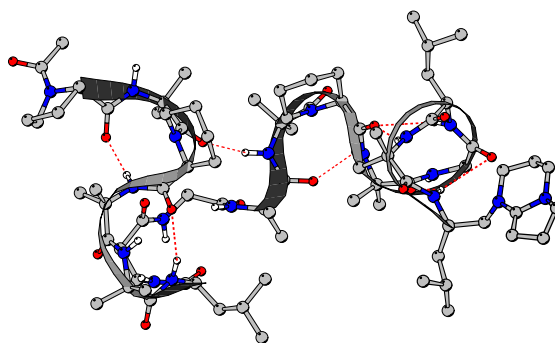


Abbildung 123: Zentrale Struktur des höchst populierten Clusters von Efraeptin C in DCM.

Ein Vergleich der berechneten Konformationen mit der extrahierten Röntgenstruktur anhand der RMSD-Werte der Rückgrat-atome zeigt, dass aufgrund des flexiblen Bereichs zwischen Leu-6 und Aib-9 die Sekundärstrukturen deutlich voneinander abweichen. Werden bei der Berechnung der RMSD-Werte lediglich die helikalen Bereiche zwischen Pip-1 und Aib-5 sowie Aib-10 und Aib-15 berücksichtigt, findet sich eine gute Korrelation mit der Röntgenstruktur. Dies ist aufgrund der entropiegetriebenen Bindung des Efrapeptin C an die ATPase nicht überraschend, und es kann davon ausgegangen werden, dass der flexible Bereich während der Bindung für eine exakte Ausrichtung der Helices in der Bindungstasche sorgt.

Die verwendeten Kraftfeldmodellierungsmethoden favorisieren die Bildung einer  $\alpha$ -Helix gegenüber einer  $3_{10}$ -Helix. Die Unterscheidung dieser Helix Typen gelang nur durch die dipolaren Restkopplungen als zusätzliche experimentelle Randbedingungen. Interessant wäre hier für weitere Untersuchungen die Verwendung von verschiedenen *ab initio* Methoden. Zusätzlich könnte so der konformationelle Einfluss der Aminosäure Pip studiert werden, da Aib sowohl links- als auch rechtsgängige Helices stabilisiert. Während der MD-Simulationen konnte ausschließlich die rechtsgängige Helix für Efrapeptin C beobachtet werden, was gegebenenfalls auf die Chiralität der Aminosäuren Pip und Leu zurückzuführen ist. Der gezielte synthetische Austausch von Pip gegen Pro oder gegen D-Pip könnte auch hier entscheidende Hinweise liefern. Die Verwendung  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierter Aminosäuren könnte die NMR-Analyse drastisch vereinfachen und ließe das Studium der Konformation im Komplex mit der ATPase zu.

In Kooperation mit Syngenta Crop Protection Research wurde aufgrund der Erfahrung mit den Efrapeptinen eine Sequenzanalyse neuartiger Neo-Efrapeptine durchgeführt. Die Neo-Efrapeptine sind Sequenzanaloge der Efrapeptine, enthalten jedoch unter anderem statt Aib die sehr seltene Aminosäure Acc in Position 9 (siehe Abbildung 124).

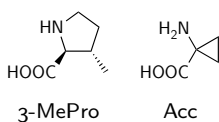


Abbildung 124: Schematische Darstellung von 3-MePro und Acc.

Hauptmotivation für diese Arbeit waren identische MS-Spektren der isomeren Neo-Efrapeptine A und F bzw. B und I. Diese Spektren ließen den Schluss zu, dass sich diese Neo-Efrapeptine lediglich durch eine isobare Aminosäuren unterscheiden. Die Identifikation dieser isobaren Aminosäure mittels NMR-Spektroskopie war von entscheidender Bedeutung. Durch Auswertung zahlreicher NMR-Spektren konnte in Neo-Efrapeptin F die sel-

tene Aminosäure 3-MePro in Position 11 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 124). Eine *trans*-Konfiguration der Protonen  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  gilt aufgrund der Kopplungskonstanten und NOE-Distanzen als wahrscheinlich und konnte später durch Fredenhagen *et al.* mittels GC/MS-Analysen der Dansylderivate absolut (*2S,3S*) festgelegt werden. Weigelt konnte später durch die Synthese der Aminosäure 3-MePro mit *cis*- und *trans*-Konfiguration sowie der Neo-Efrapeptine A und F ebenfalls zur Analyse beitragen. Die Sequenzanalyse der Neo-Efrapeptine erwies sich aufgrund der fehlenden  $H^N$ - bzw.  $H^\alpha$ -Protonen bei den Aminosäuren Pip bzw. Aib als schwierig, weshalb für das Neo-Efrapeptin A mittels NMR lediglich die Existenz von drei Sequenzsegmenten nachgewiesen werden konnte. Dieser Nachteil konnte durch Kombination mit MS/MS-Spektren ausgeglichen werden, so dass nun vollständige Sequenzdaten für diese beiden Neo-Efrapeptine vorliegen.

Die Wahl eines geeigneten Verfahrens zur Generierung von Startstrukturen ist ein entscheidendes Projekt dieser Arbeit. Die Startstruktur beeinflusst unmittelbar das Ergebnis einer Konformationsanalyse und ein ungeeigneter Algorithmus zur Generierung von Startstrukturen führt immer wieder zu nicht sinnvollen Strukturvorschlägen. In Kapitel 5 wurden aus diesem Grund verschiedene Methoden der Konformationsanalyse basierend auf einer automatisch generierten und vollständig gestreckten Konformation verglichen. Als Verfahren wurden die systematische Durchsuchung des Konformationsraums, die Distanzgeometrie, das *ab initio* bzw. *random simulated annealing*, die *local elevation* RMD und die 4D-RMD gewählt. Die Analyse der so generierten Strukturen erfolgte vorwiegend durch Clustering nach den Rückgratstorsionswinkeln  $\varphi$  und  $\psi$  sowie bei Anwesenheit einer  $\beta$ -Aminosäure zusätzlich  $\mu$ . Abweichend davon wurden von der systematischen Suche die fünf energetisch günstigsten Konformationen und von der 4D-RMD die finale Struktur gewählt. Abschließend wurde mit jeder so gewonnenen Konformation eine RMD simuliert und analysiert.

Als System für diesen Vergleich fungierten die konformationell gut untersuchten zyklischen RGD-Peptide c-(RGDfV), c-(RGDfVG), c-(RGDf $\beta$ A), c-(RGDf $\beta$ L) und c-(RGDfV $\beta$ A). Während für die Peptide c-(RGDfV) und c-(RGDfVG) jeweils eine Referenzstruktur aus der Literatur vorlag, ist die Flexibilität des Peptidrückgrats durch die  $\beta$ -Aminosäuren bei den Peptiden c-(RGDf $\beta$ A), c-(RGDf $\beta$ L) und c-(RGDfV $\beta$ A) stark erhöht, so dass mehrere Referenzstrukturen für diese Peptide beschrieben wurden. Das Peptid c-(RGDf $\beta$ A) bildet

in Lösung keine Vorzugskonformation, so dass dieses eine Analyse der Größe des durchsuchten Konformationsraums ermöglichte. Ein weiterer relevanter Punkt für die Auswahl dieser Peptide war die unterschiedliche Ringgröße und die verschiedenen präsentierten Sekundärstrukturelemente.

Ein entscheidendes Kriterium zur Bewertung der Qualität des verwendeten Verfahrens der Konformationsanalyse sind die NOE-Verletzungen, deren Anzahl und Größe für jede zentrale Clusterstruktur ermittelt wurde. Als zusätzliches, jedoch nicht entscheidendes Kriterium fungieren RMSD-Werte zum Vergleich mit den bereits veröffentlichten Strukturvorschlägen.

Der Vergleich aller verwendeten Methoden zeigt, dass die Distanzgeometrie in Kombination mit einem *simulated annealing* für alle Peptide sinnvolle Strukturvorschläge mit geringen NOE-Verletzungen liefert. Die gute Korrelation mit den Referenzstrukturen und geringen notwendigen Rechenleistungen belegen zusätzlich die Überlegenheit dieser Methode. Die abschließende RMD-Simulation wurde bei diesem Verfahren dahingehend variiert, dass der Einfluss von zeitabhängigen NOE-*restraints* während der RMD analysiert werden konnte. Mit Ausnahme des Peptids c-(RGDFV) konnte hier eine Verbesserung der Konformationsanalyse durch niedrigere NOE-Verletzungen und eine erhöhte Korrelation mit den Referenzstrukturen beobachtet werden. Die Konformationsanalysen mit NMR und molekularmechanischen Rechnungen wurden deshalb ausschließlich mit der hier etablierten DG/SA-Methode durchgeführt.

Durch die konsequente Auswahl der fünf energetisch niedrigsten Startstrukturen wurden die subjektiven Einflüsse bei der systematischen Durchsuchung des Konformationsraums vermieden. Die Analyse der anschließenden RMD-Simulationen ergab für alle zyklischen Peptide Strukturvorschläge mit hohen NOE-Verletzungen und eine eher schlechte Korrelation mit den Referenzstrukturdaten. Ein zusätzliches *simulated annealing* zur Strukturverfeinerung vor der abschließenden RMD-Simulation vermochte die Korrelation mit den Referenzdaten für die Peptide c-(RGDFV) und c-(RGDFVG) mit dieser Methode zu verbessern, doch gilt dies leider nicht generell.

Das *simulated annealing* wurde auch in zwei unterschiedlichen Variationen, dem *ab initio* und dem *random SA*, zur Generierung von Startstrukturen verwendet. Das *ab initio* Verfahren startet bei jedem Zyklus mit derselben Konformationsvorlage, während

das *random SA* zufallsbasierte Konformationen als Vorlagen nutzt. Die Fähigkeiten des *random simulated annealing* entfalteteten sich jedoch erst bei den Peptiden *c*-(RGDFVG) und *c*-(RGDFV<sup>βA</sup>) und ergaben recht niedrige NOE-Verletzungen und gute Korrelationen mit den Referenzstrukturen. Die geringere Anzahl an Ringatomen bei den restlichen Peptiden führte zu größeren NOE-Verletzungen, der *ab initio* Algorithmus war hier entscheidend überlegen. Im Allgemeinen fanden sich gute Korrelationen der SA generierten Strukturen mit den bereits publizierten Strukturvorschlägen.

Die 4D- und *local elevation* (LE) Methoden basieren auf molekulardynamischen Simulationen. Das LE ist eine spezielle Methode, die zur Durchsuchung des Konformationsraums entwickelt wurde, stellt jedoch hohe Ansprüche an die verwendeten Simulationsparameter, auf deren Optimierung für jedes Peptid in dieser Arbeit verzichtet wurde. Die Simulation im Kontinuum erwies sich ebenfalls als Nachteil dieser Methode, da sich stabile H-Brücken zwischen Seitenketten und Peptidrückgrat bildeten, deren Existenz in Lösung fraglich erscheint. Die durch Clustering der LE-RMD-Trajektorie ermittelten Startstrukturen konnten aufgrund der stabilisierenden H-Brücken das lokale Energieminimum nicht verlassen und sind durch hohe NOE-Verletzungen charakterisiert.

Dem System wird während einer 4D-RMD-Simulation zeitweise eine zusätzliche Dimension zur Überwindung von Energiebarrieren zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse dieser Konformationsanalysen zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit von der Ringgröße der zyklischen Peptide. So findet sich eine schlechte Korrelation mit den Referenzstrukturdaten und erhöhte NOE-Verletzungen bei den kleineren Peptiden *c*-(RGDFV) und *c*-(RGDF<sup>βL</sup>), während die RMD-Simulationen der größeren wie *c*-(RGDFVG) und *c*-(RGDFV<sup>βA</sup>) sehr gut mit den Referenzstrukturen korrelieren, und niedrige NOE-Verletzungen besitzen. Entscheidend hierbei könnte die Verwendung der zusätzlichen Dimension ausschließlich für nichtbindende Interaktionen sein, die für eine Überwindung der Energiebarrieren in zyklischen Peptiden mit kleiner Ringgröße nicht ausreicht.

Die zyklischen Modellpeptide *c*-(AVPFG), *c*-(AV<sup>βh</sup>PFG), *c*-(LAVPFG) und *c*-(LAV<sup>βh</sup>PFG) besitzen trotz ihrer geringen Polarität eine kationenabhängige Konformation. Es konnte durch Malešević mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass diese Konformationsänderungen für das Kation Ca<sup>2+</sup> maximal sind. Aufgrund der hohen biologischen Verfügbarkeit des Calciums in Organismen ist das Studium dieser strukturellen Variationen

mit Hilfe der NMR-Spektroskopie von besonderer Bedeutung für das Wirkstoffdesign. Calciumbindende Wirkstoffe könnten aufgrund einer Komplexbildung mit Calcium oder anderen Kationen die gewünschte Aktivität oder Spezifität verlieren und so für die Anwendung unbrauchbar werden.

Anfängliche Konformationsanalysen mit NMR von  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG)$  in DMSO zeigten, dass in diesem Lösungsmittel die Konformation nicht durch Calcium beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden die Studien in TFE als Lösungsmittel durchgeführt. Die so erstellten Konformationsstudien ergaben sinnvolle Strukturvorschläge, die weitestgehend mit den experimentellen Daten korrelieren. Das Peptid  $c\text{-}(LAVPFG)$  bildete jedoch bedingt durch die für die NMR-Spektroskopie benötigten hohen Konzentrationen Aggregate, so dass Strukturuntersuchungen auf atomarer Ebene mit dieser Methode ausgeschlossen sind.

Die  $Ca^{2+}$ -Ionen wirken sich auf die Konformation von  $c\text{-}(LAV^{\beta h}PFG)$  eher gering aus, und es kann nur die Unterdrückung der *cis*-Konfiguration der  $Xaa\text{-}\beta hPro$ -Peptidbindung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu werden für die Peptide  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG)$  und  $c\text{-}(AVPFG)$  drastische Konformationsänderungen beobachtet. Exemplarisch sind die Hauptkonformere von  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG)$  in Gegenwart von 0 bzw. 1 Äquivalent  $Ca^{2+}$  in Abbildung 125 dargestellt. In Abwesenheit der Kationen nimmt das  $\beta hPro$  in TFE die  $i+1$  Position einer  $\Psi\beta$ -Schleife bzw. zentrale Position einer  $\Psi\gamma$ -Schleife ein. Die Zugabe von einem Äquivalent  $Ca^{2+}$  induziert eine  $\beta II'$ -Schleife mit Gly in  $i+1$  Position. Diese Konformation entspricht dem im Lösungsmittel DMSO gefundenen Hauptkonformer. Das Peptid  $c\text{-}(AVPFG)$  besitzt in Lösung keine stabile Sekundärstruktur und verhält sich sehr flexibel. Durch die Zugabe von  $Ca^{2+}$ -Kationen können hoch populierte Clusterfamilien gefunden werden, die eine  $\beta II'$ -Schleife mit Phe in  $i+1$  Position als stabiles Sekundärstrukturelement besitzen.

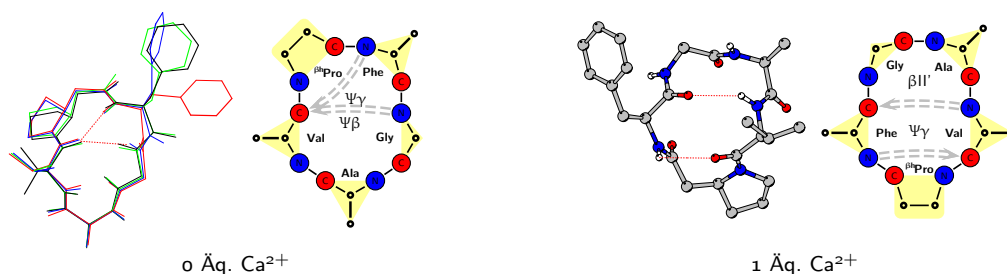


Abbildung 125: Strukturvorschläge für  $c\text{-}(AV^{\beta h}PFG)$  **9** in TFE.



Eine Bestimmung der absoluten Position des Calciums in diesen Komplexen schlug bislang fehl und könnte im Folgenden durch eine Titration mit paramagnetischen Kationen wie  $\text{Ce}^{3+}$  gelingen. Es sollte durch Messung der Relaxationszeit möglich sein, Distanzen zwischen dem Kation und einzelnen Atomen des Peptid zu bestimmen, die anschließend als Randbedingungen in molekularmechanischen Rechnungen berücksichtigt werden könnten.

Die strukturinduzierende Wirkung des  $\beta^{\text{h}}$ Pro konnte ebenfalls eingehend studiert werden. So besetzt es in Gegenwart einer *trans*-Konfiguration der Xaa- $\beta^{\text{h}}$ Pro-Peptidbindung bevorzugt die  $i+1$  Position einer  $\Psi\beta$ -Schleife, während es bei einer *cis*-Konfiguration in  $i+2$  Position einer  $\Psi\beta$ -Schleife zu finden ist.



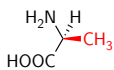
# A

## Aminosäuren

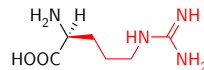
### A.1 proteinogene Aminosäuren



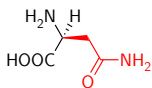
$\alpha$ -L-Aminosäure Xaa X



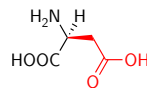
Alanin Ala A



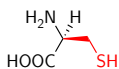
Arginin Arg R



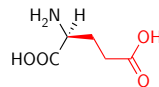
Asparagin Asn N



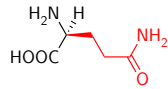
Aspartat Asp D



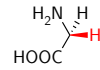
Cystein Cys C



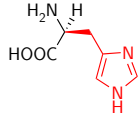
Glutamat Glu E



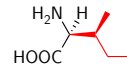
Glutamin Gln Q



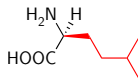
Glycin Gly G



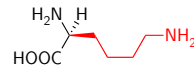
Histidin His H



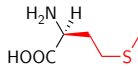
Isoleucin Ile I



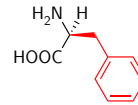
Leucin Leu L



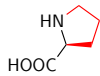
Lysin Lys K



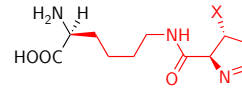
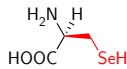
Methionin Met M



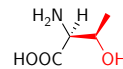
Phenylalanin Phe F



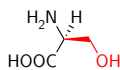
Prolin Pro P

Pyrrolysin Pyl O  
X=CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> oder OH

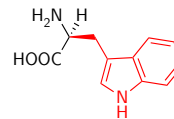
Selenocystein Sec U



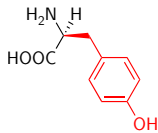
Serin Ser S



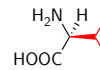
Threonin Thr T



Tryptophan Trp W

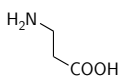
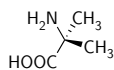
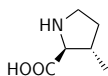
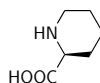
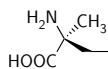


Tyrosin Tyr Y



Valin Val V

## A.2 sonstige relevante Aminosäuren

 $\beta$ -Alanin $\beta$ Ala2-Aminoiso-  
buttersäure  
Aib*trans*-3-Methylprolin  
*trans*-3-MeProPipicolinsäure  
Pip1-Aminocyclopropan-  
carbonsäure  
Acc

Isovalin

Iva



# B

## Sekundärstrukturelemente

### B.1 $\beta$ -Faltblattstrukturen

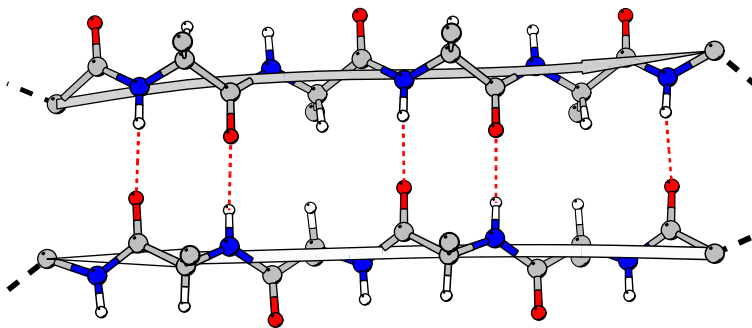
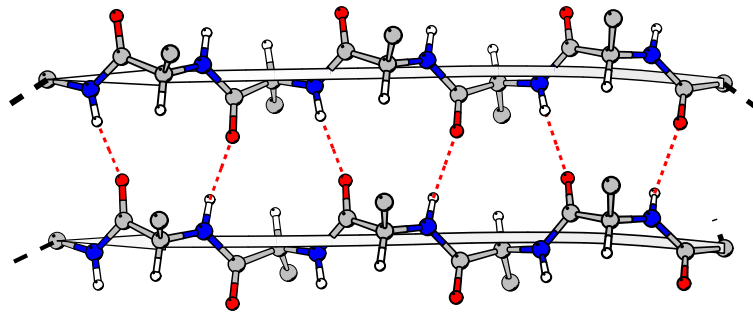
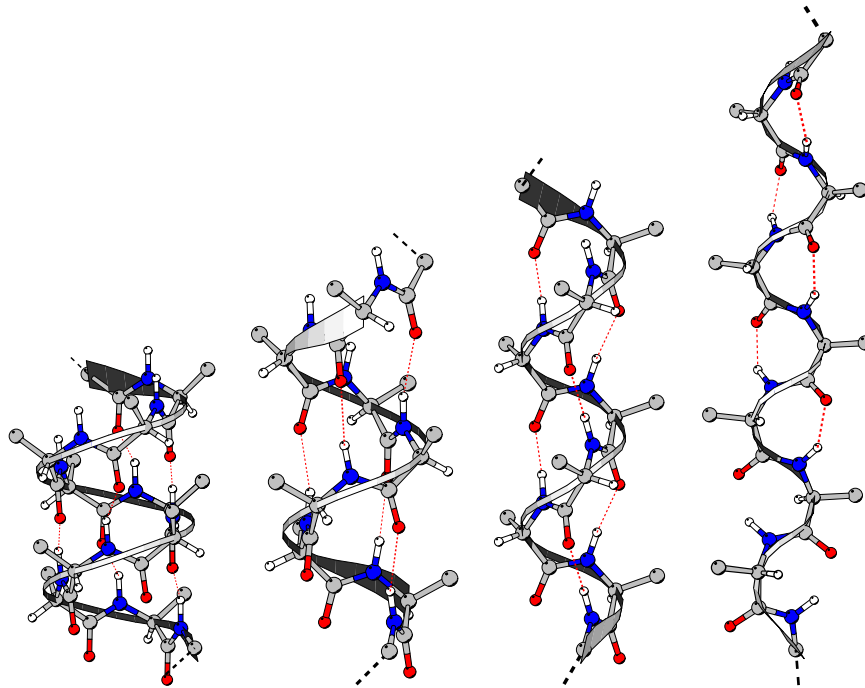


Abbildung 126: Darstellung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts

Abbildung 127: Darstellung eines parallelen  $\beta$ -Faltblatts

## B.2 Helikale Strukturen

Abbildung 128: Darstellung einer  $\pi$ -Helix,  $\alpha$ -Helix,  $3_{10}$ -Helix und eines 2.27-Bandes (von links nach rechts)



## B.3 Schleifen

### B.3.1 $\alpha$ -Schleifen

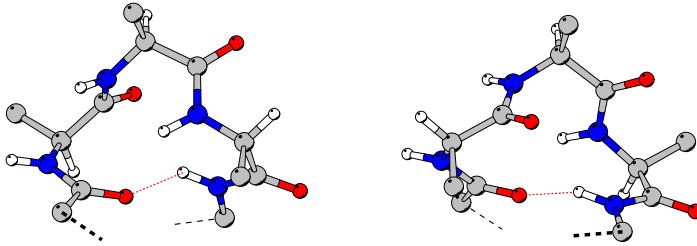


Abbildung 129: Darstellung einer I- $\alpha_{RS}$ -Schleife (links), I- $\alpha_{LS}$ -Schleife (rechts)

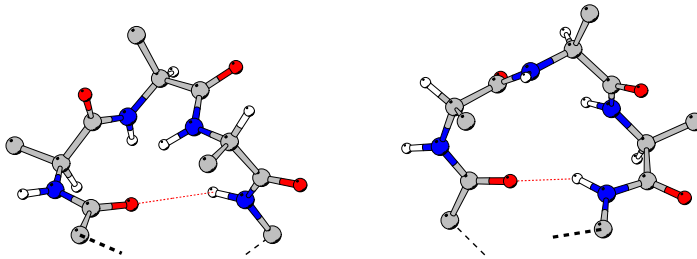


Abbildung 130: Darstellung einer II- $\alpha_{RS}$ -Schleife (links) und II- $\alpha_{LS}$ -Schleife (rechts)

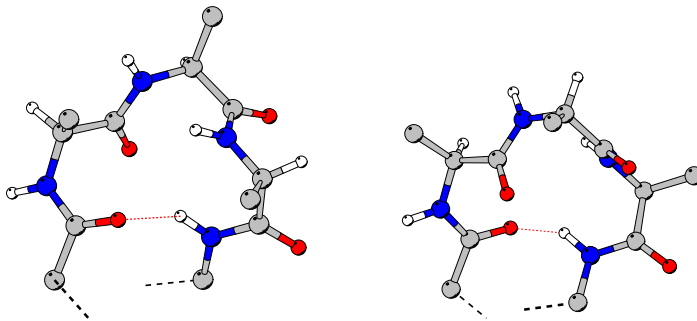


Abbildung 131: Darstellung einer I- $\alpha_{RU}$ -Schleife (links) und I- $\alpha_{LU}$ -Schleife (rechts)

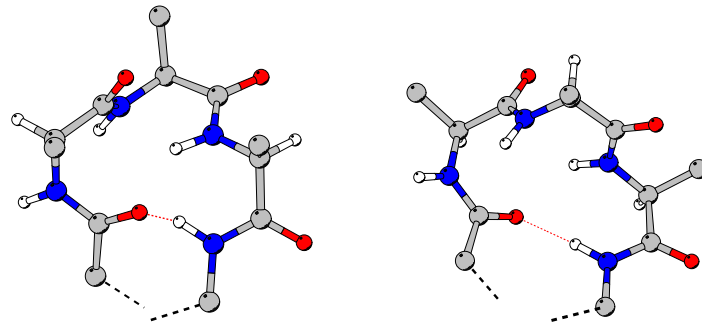


Abbildung 132: Darstellung einer II- $\alpha_{RU}$ -Schleife (links), II- $\alpha_{LU}$ -Schleife (rechts)

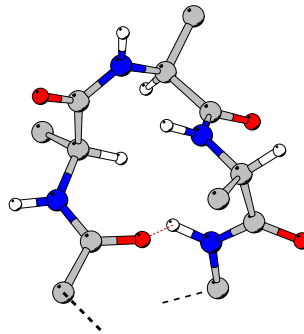


Abbildung 133: Darstellung einer I- $\alpha_C$ -Schleife

### B.3.2 $\beta$ -Schleifen

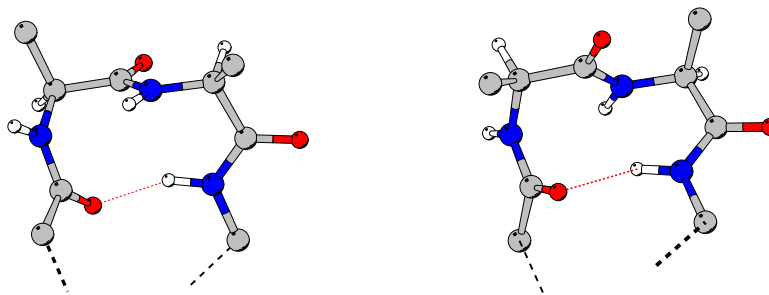
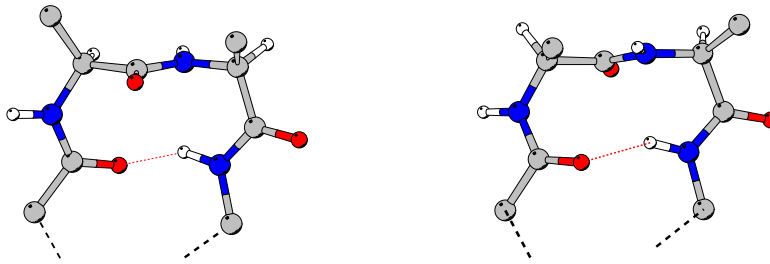
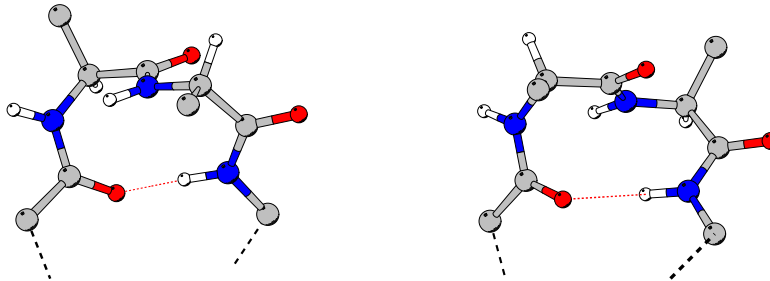
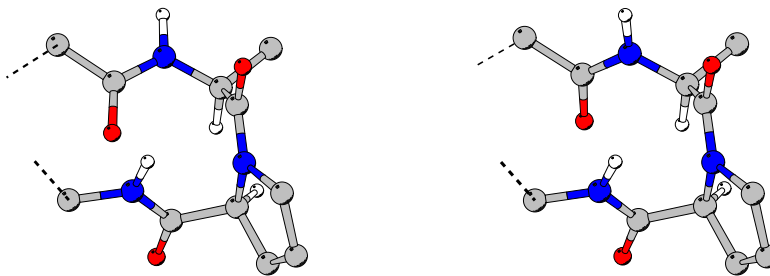


Abbildung 134: Darstellung einer  $\beta_I$ -Schleife (links) und  $\beta_{I'}$ -Schleife (rechts)

Abbildung 135: Darstellung einer  $\beta$ II-Schleife (links) und  $\beta$ II'-Schleife (rechts)Abbildung 136: Darstellung einer  $\beta$ III-Schleife (links) und  $\beta$ III'-Schleife (rechts)Abbildung 137: Darstellung einer  $\beta$ VIa1-Schleife (links) und  $\beta$ VIa2-Schleife (rechts)

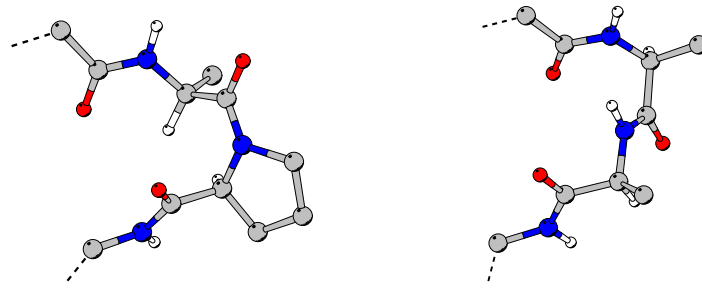


Abbildung 138: Darstellung einer  $\beta$ VIb-Schleife (links) und  $\beta$ VIII-Schleife (rechts)

### B.3.3 $\gamma$ -Schleifen

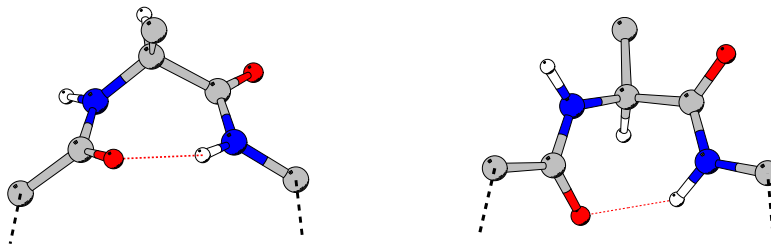


Abbildung 139: Darstellung einer  $\gamma$ -Schleife (links) und  $\gamma^i$ -Schleife (rechts)

# C

## Zusätzliche Analysedaten

### C.1 Konformere von c-(RGDFV) **4** und c-(RGDFVG) **5**

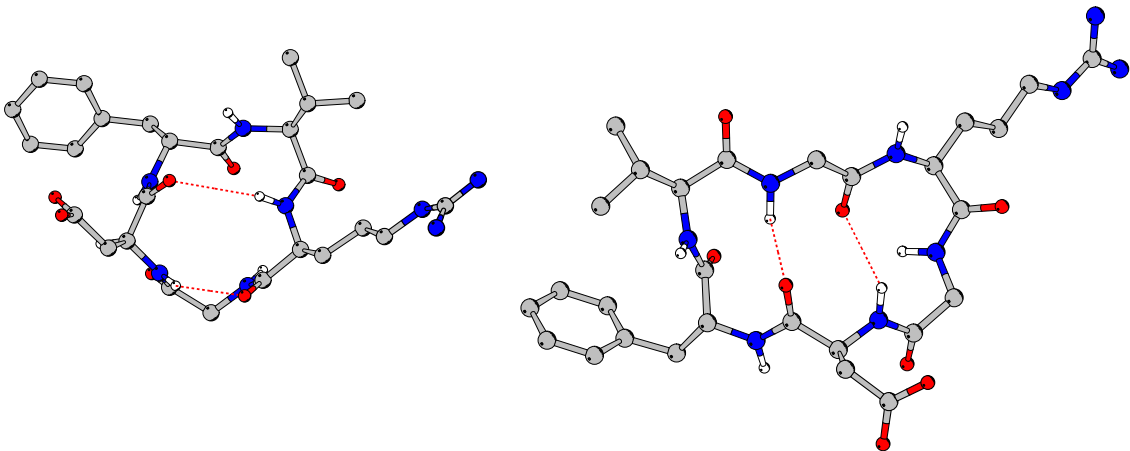


Abbildung 140: Darstellung der von Müller berechneten Hauptkonformere von c-(RGDFV) **4** (links) und c-(RGDFVG) **5** (rechts).<sup>[289]</sup>

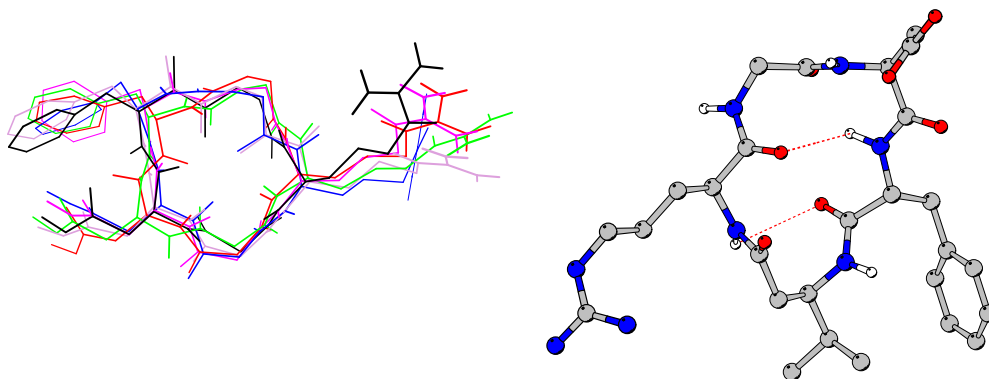
C.2 Konformere von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6**, c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> L) **7** und c-(RGDFV <sup>$\beta$</sup> A) **8**

Abbildung 141: Darstellung der von Schumann berechneten Konformere von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6** als Überlagerung (links) und c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> L) **7** K1 (rechts).<sup>[139]</sup>

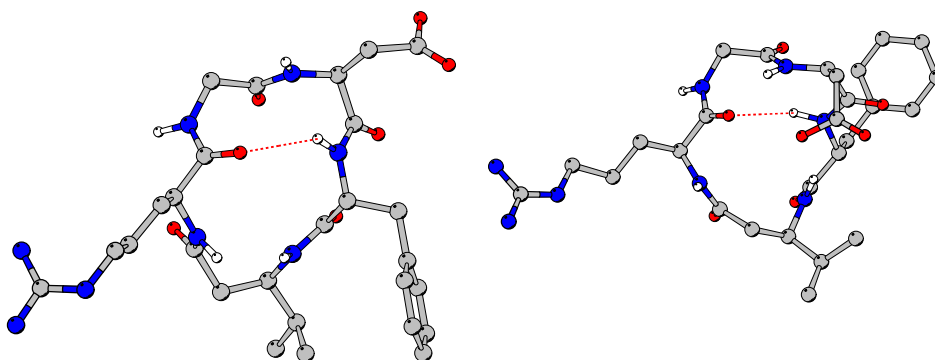


Abbildung 142: Darstellung der von Schumann berechneten Konformere von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> L) **7** (links K2, rechts K3).<sup>[139]</sup>

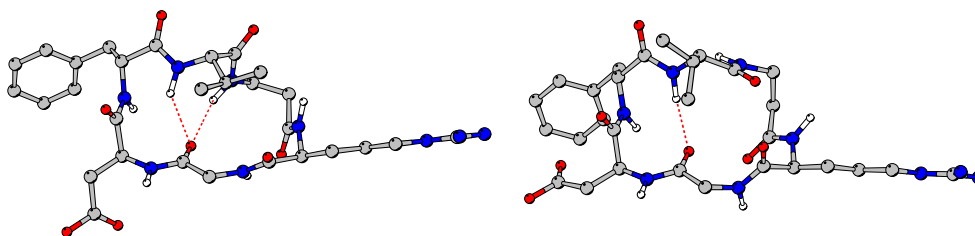


Abbildung 143: Darstellung der von Schumann berechneten Konformere von c-(RGDFV <sup>$\beta$</sup> A) **8** (links K1, rechts K2).<sup>[139]</sup>

C.3 Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDFV) **4**Tabelle 153: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der SS-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	ss1	ss2	ss3	ss4	ss5
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	1.8	70.1	13.3	1.4	27.9
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	22.2	20.6	5.4	21.0	45.0
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	0.8	0.6	0.8	2.4	1.4
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.3	0.5	0.5	0.9	0.2
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	3.0	6.4	0.0	3.4	1.9

Tabelle 154: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der SS/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	SSSA1	SSSA2	SSSA3	SSSA4	SSSA5
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	12.9	12.8	4.4	15.0	11.4
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	25.6	31.1	20.1	35.2	21.3
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	2.5	1.8	0.9	3.5	1.3
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	1.1	0.2	0.3	0.5	0.5
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	2.7	3.4	4.2	2.3	5.6

Tabelle 155: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	DG/SA1
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	0.8
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	16.7
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	1.3
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	2.3
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	7.1

Tabelle 156: Wasserstoffbrücken und deren Population während der *nr*RMD von c-(RGDFV) **4** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	DG/SA1
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	51.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	69.3
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	4.5
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	0.0

Tabelle 157: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der *ab initio* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	ASA1
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	6.3
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	26.0
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	0.2
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.1
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	1.4

Tabelle 158: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der *random* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	RSA1
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	0.9
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	18.2
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	0.2
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.3
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	5.2



Tabelle 159: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der LE-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]			
		Referenz	LE1	LE2	LE3
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	0.0	0.0	0.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	14.2	11.5	18.2
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	0.7	0.2	0.6
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.2	0.0	0.6
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	9.1	6.2	27.5

Tabelle 160: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV) **4** nach der 4D-RMD-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	4D
Arg H <sup>N</sup>	Asp O	47	8.6
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	89	18.4
Gly H <sup>N</sup>	Val O	33	1.9
Gly H <sup>N</sup>	D-Phe O	22	0.2
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	43	1.7

## C.4 Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDFVG) **5**

Tabelle 161: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der SS-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	0.0	3.5	0.0	46.0	38.5
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	0.0	3.0	0.0	7.1	9.8
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	0.0	5.0	0.0	5.9	5.3
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	1.0	5.5	3.6	3.2	5.9
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	1.6	11.4	1.4	24.9	17.8

Tabelle 162: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der SS/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	SSSA1	SSSA2	SSSA3	SSSA4	SSSA5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	49.1	0.8	0.0	42.5	44.2
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	7.5	0.0	0.0	11.0	3.6
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	3.6	0.0	0.0	3.8	5.0
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	4.9	7.2	6.2	4.6	6.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	27.2	1.4	1.7	0.0	19.6

Tabelle 163: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	DG/SA1	DG/SA2	DG/SA3	DG/SA4	DG/SA5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	37.9	0.0	50.1	42.0	46.5
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	8.3	0.0	6.4	9.1	7.8
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	2.2	0.0	5.3	2.7	2.7
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	9.1	8.2	4.0	4.6	8.1
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	21.1	1.0	18.5	39.8	29.4

Tabelle 164: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der DG/SA-Methode mit anschließender ntRMD.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	DG/SA1	DG/SA2	DG/SA3	DG/SA4	DG/SA5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	0.0	0.1	73.3	65.7	75.2
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	0.0	0.0	3.8	7.0	14.2
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	3.5	0.0	5.0	6.6	2.0
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	18.2	0.3	1.9	4.8	5.9
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	0.0	1.3	28.7	25.4	21.4

Tabelle 165: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der *ab initio* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	ASA1	ASA2	ASA3	ASA4	ASA5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	45.3	19.8	20.6	61.1	48.5
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	6.2	2.4	12.2	6.2	9.9
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	3.4	6.8	1.4	4.2	3.0
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	7.2	5.4	1.1	8.6	8.2
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	33.6	9.2	25.4	17.0	28.5

Tabelle 166: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der *random* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz	RSA1	RSA2	RSA3	RSA4	RSA5
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	37.1	38.1	51.4	38.6	21.0
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	18.2	11.5	7.4	10.6	5.0
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	4.2	2.9	3.6	1.7	1.3
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	9.8	5.1	8.4	3.9	7.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	17.2	17.3	26.3	34.4	7.7

Tabelle 167: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der LE-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]			
		Referenz	LE1	LE2	LE3
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	0.0	0.7	0.9
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	13.2	0.0	14.9
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	0.0	0.1	0.0
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	0.2	1.3	0.2
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	0.1	3.4	0.1

Tabelle 168: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFVG) **5** nach der 4D-RMD-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]	
		Referenz	4D
Gly-6 H <sup>N</sup>	Asp O	79	48.9
Asp H <sup>N</sup>	Gly-6 O	6	14.7
Gly-2 H <sup>N</sup>	Gly-6 O	56	3.0
Gly-6 H <sup>N</sup>	D-Phe O	52	3.4
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12	26.2

## C.5 Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6**

Tabelle 169: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6** nach der SS-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		ss1	ss2	ss3	ss4	ss5
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	11.6	0.3	1.4	4.5	16.8
Gly H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala O	3.8	23.9	8.1	7.3	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	19.5	35.9	37.1	37.3	3.2
$\beta$ Ala H <sup>N</sup>	Asp O	7.0	3.5	0.0	0.0	17.3

Tabelle 170: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF <sup>$\beta$</sup> A) **6** nach der SS/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		SSSA1	SSSA2	SSSA3	SSSA4	SSSA5
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	19.7	11.4	11.3	3.8	13.4
Gly H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala O	0.2	4.2	4.1	5.7	3.5
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	1.4	19.4	5.7	18.7	4.2
$\beta$ Ala H <sup>N</sup>	Asp O	12.3	9.5	11.9	9.8	16.5

Tabelle 171: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]			
		DG/SA1	DG/SA2	DG/SA3	DG/SA4
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	10.1	21.8	26.1	16.5
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	4.8	2.2	3.0	3.5
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	8.0	2.2	3.1	8.6
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	15.2	8.0	16.6	8.6

Tabelle 172: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der DG/SA-Methode mit anschließender ntRMD.

Donor	Akzeptor	Population [%]			
		DG/SA1	DG/SA2	DG/SA3	DG/SA4
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	4.2	9.4	16.5	18.6
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	4.1	4.2	7.7	1.5
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	17.5	6.2	2.9	1.2
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	17.7	6.1	13.0	11.8

Tabelle 173: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der *ab initio* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		ASA1	ASA2	ASA3
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	29.5	10.6	12.5
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	1.4	4.2	3.3
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	0.5	11.7	9.2
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	19.7	6.3	3.6

Tabelle 174: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der *random SA*-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		RSA1	RSA2	RSA3
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	14.6	4.2	5.1
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	1.7	5.5	6.3
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	15.8	23.0	4.4
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	0.3	6.0	7.8

Tabelle 175: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der *LE*-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]			
		LE1	LE2	LE3	LE4
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	12.6	7.5	19.0	0.0
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	2.2	5.2	2.1	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	24.6	36.5	1.6	7.1
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	0.5	0.5	33.6	0.6

Tabelle 176: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βA</sup>) **6** nach der *4D-RMD*-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]
		4D
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	15.4
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	2.7
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	3.4
βAla H <sup>N</sup>	Asp O	25.7

C.6 Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDF<sup>β</sup>L) 7Tabelle 177: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) 7 nach der SS-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]							
		Referenz			ss1	ss2	ss3	ss4	ss5
		κ1	κ2	κ3					
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	41.1	1.3	0.7	0.5	18.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	0.3	13.3	19.6	17.8	8.5
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.0	0.0	0.3	0.0	0.3
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	0.0	0.6	0.4	0.1	2.6

Tabelle 178: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) 7 nach der SS/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]							
		Referenz			SSSA1	SSSA2	SSSA3	SSSA4	SSSA5
		κ1	κ2	κ3					
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	0.9	0.2	2.2	2.2	0.0
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	15.7	24.0	13.4	12.4	21.1
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	0.8	0.1	4.0	0.2	0.0

Tabelle 179: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) 7 nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		Referenz			DG/SA1	
		κ1	κ2	κ3		
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	0.5	
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	17.9	
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.2	
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	2.5	

Tabelle 180: Wasserstoffbrücken und deren Population während der *nr*MD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) **7** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		Referenz			DG/SA1	
		κ1	κ2	κ3		
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	0.1	
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	13.2	
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.0	
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	0.0	

Tabelle 181: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) **7** nach der *ab initio* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz			ASA1	ASA2	ASA3
		κ1	κ2	κ3			
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	1.1	1.8	0.8
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	18.5	14.2	11.3
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.4	0.0	0.0
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	3.0	0.0	0.1

Tabelle 182: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>β</sup>L) **7** nach der *random* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz			RSA1	RSA2	RSA3
		κ1	κ2	κ3			
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	3.8	0.6	20.6
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	8.8	18.2	9.2
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.2	0.0	0.1
Asp H <sup>N</sup>	βLeu O	0	0	0	1.3	0.0	0.4



Tabelle 183: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βL</sup>) **7** nach der LE-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]					
		Referenz			LE1	LE2	LE3
		κ1	κ2	κ3			
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	25.3	0.0	22.6
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	9.4	19.3	4.9
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.2	0.0	0.0
Asp H <sup>N</sup>	<sup>β</sup> Leu O	0	0	0	1.8	0.0	0.4

Tabelle 184: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDF<sup>βL</sup>) **7** nach der 4D-RMD-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		Referenz			4D	
		κ1	κ2	κ3		
D-Phe H <sup>N</sup>	Arg O	9	94	37	0.9	
Asp H <sup>N</sup>	Arg O	80	0	0	16.1	
Arg H <sup>N</sup>	D-Phe O	0	0	13	0.0	
Asp H <sup>N</sup>	<sup>β</sup> Leu O	0	0	0	0.0	

## C.7 Populationen der Wasserstoffbrücken von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8**

Tabelle 185: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8** nach der SS-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]						
		Referenz		ss1	ss2	ss3	ss4	ss5
		κ1	κ2					
<sup>β</sup> Ala H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	9.4	10.2	0.5	7.9	8.7
Gly H <sup>N</sup>	<sup>β</sup> Ala O	18	4	4.0	0.6	3.3	3.9	4.7

Tabelle 186: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV <sup>$\beta$</sup> A) **8** nach der SS/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]						
		Referenz		SSSA1	SSSA2	SSSA3	SSSA4	SSSA5
		$\kappa 1$	$\kappa 2$					
$\beta$ Ala H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	0.0	6.2	2.6	0.0	27.4
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	0.0	7.7	13.8	0.0	38.6
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	0.2	1.4	1.8	5.2	0.4
Gly H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala O	18	4	1.2	2.2	7.0	0.2	2.8

Tabelle 187: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV <sup>$\beta$</sup> A) **8** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		Referenz		DG/SA1
		$\kappa 1$	$\kappa 2$	
$\beta$ Ala H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	59.4
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	41.1
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	0.1
Gly H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala O	18	4	21.8

Tabelle 188: Wasserstoffbrücken und deren Population während der nRMD von c-(RGDFV <sup>$\beta$</sup> A) **8** nach der DG/SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		Referenz		DG/SA1
		$\kappa 1$	$\kappa 2$	
$\beta$ Ala H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	87.8
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	23.1
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	0.0
Gly H <sup>N</sup>	$\beta$ Ala O	18	4	21.6

Tabelle 189: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8** nach der *ab initio* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		Referenz		ASA1
		κ1	κ2	
βAla H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	26.9
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	21.4
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	4.5
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	18	4	14.9

Tabelle 190: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8** nach der *random* SA-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		Referenz		RSA1	RSA2	RSA3
		κ1	κ2			
βAla H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	50.9	0.0	0.0
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	44.4	0.0	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	0.1	9.0	3.0
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	18	4	19.9	16.2	4.6

Tabelle 191: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8** nach der LE-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]				
		Referenz		LE1	LE2	LE3
		κ1	κ2			
βAla H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	0.0	0.0	0.0
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	0.0	0.0	0.0
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	0.0	0.0	0.0
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	18	4	0.0	0.0	0.0

Tabelle 192: Wasserstoffbrücken und deren Population während der RMD von c-(RGDFV<sup>βA</sup>) **8** nach der 4D-RMD-Methode.

Donor	Akzeptor	Population [%]		
		Referenz		4D
		κ1	κ2	
βAla H <sup>N</sup>	Gly O	42	14	29.5
Val H <sup>N</sup>	Gly O	19	7	54.8
D-Phe H <sup>N</sup>	Gly O	11	65	3.0
Gly H <sup>N</sup>	βAla O	18	4	23.2

# D

## Programme

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Makropaket  $\text{\LaTeX}$  für  $\text{\TeX}$  auf dem Editor XEMACS auf einem Debian GNU/Linux-System geschrieben.<sup>[314,315]</sup>

Die Grafiken wurden mit PSTricks und die Abbildungen der Peptidstrukturen mit MOLSCRIPT bzw. BOBSCRIPT erstellt.<sup>[316–319]</sup>

Zur Darstellung der Strukturkoordinaten wurden die Programme VMD, PyMOL und VMDXPLORE verwendet.<sup>[293,320,321]</sup> Die chemischen Strukturformeln wurden mit CHEMDRAW von CambridgeSoft gesetzt.

Die grafischen Darstellungen von Datenwerten wurden mit Gnuplot prozessiert und direkt eingebunden.

Die Akquisition und Prozessierung der NMR-Spektren erfolgte mit dem Programm XWINNMR und TOPSPIN von Bruker. Das Programm SPARKY wurde in der Version 3.110 für die Zuordnung der Resonanzfrequenzen und Integration der NOE- bzw. ROE-Kreuzsignale verwendet.<sup>[225]</sup>



## Literaturverzeichnis

- [1] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Recommendations 1983, *Biochem. J.* **1984**, *219*(2), 345–372.
- [2] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, The Structure of the Mouse Glutathione Peroxidase Gene: The Selenocysteine in the Active Site is Encoded by the ‘Termination’ Codon TGA, *EMBO J.* **1986**, *5*(6), 1221–1227.
- [3] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Böck, Cotranslational Insertion into Formate Dehydrogenase from *Escherichia coli* Directed by a UGA Codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(10), 3156–3160.
- [4] J. F. Atkins, R. Gesteland, Biochemistry. The 22<sup>nd</sup> Amino Acid, *Science* **2002**, *296*(5572), 1409–1410.
- [5] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA, *Science* **2002**, *296*(5572), 1459–1462.
- [6] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, A New UAG-Encoded Residue in the Structure of a Methanogen Methyltransferase, *Science* **2002**, *296*(5572), 1462–1466.
- [7] J. A. Soares, L. Zhang, R. L. Pitsch, N. M. Kleinholz, R. B. Jones, J. J. Wolff, J. Amster, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, The Residue Mass of L-Pyrrolysine in Three Distinct Methylamine Methyltransferases, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(44), 36962–36969.
- [8] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, WILEY-VCH, Weinheim, 1. Auflage **2002**.

- [9] F. Wold, *In vivo* Chemical Modification of Proteins (Post-Translational Modification), *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 783–814.
- [10] H. Kleinkauf, H. von Döhren, Nonribosomal Biosynthesis of Peptide Antibiotics, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*(1), 1–15.
- [11] M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis, *Chem. Rev.* **1997**, *97*(7), 2651–2674.
- [12] M. A. Marahiel, Protein Templates for the Biosynthesis of Peptide Antibiotics, *Chemistry & Biology* **1997**, *4*(8), 561–567.
- [13] G. Ebert, *Biopolymere*, Teubner, Stuttgart **1993**.
- [14] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, The Structure of Proteins; Two Hydrogen-Bonded Helical Conformations of the Polypeptide Chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, *37*(4), 205–211.
- [15] L. Pauling, R. B. Corey, Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, *37*(5), 235–240.
- [16] L. Pauling, R. B. Corey, The Structure of Synthetic Polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, *37*(5), 241–250.
- [17] C. Ramakrishnan, G. N. Ramachandran, Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations. II. Allowed Conformations for a Pair of Peptide Units, *Biophys. J.* **1965**, *5*(6), 909–933.
- [18] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, Conformation of Polypeptides and Proteins, *Adv. Prot. Chem.* **1968**, *23*, 283–438.
- [19] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1. korr. Nachdruck der 1. Auflage **1994**.
- [20] K.-C. Chou, Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins, *Anal. Biochem.* **2000**, *286*(1), 1–16.
- [21] V. Pavone, G. Gaeta, A. Lombardi, F. Natri, O. Maglio, Discovering Protein Secondary Structures: Classification and Description of Isolated  $\alpha$ -Turns, *Biopolymers* **1996**, *38*(6), 705–721.
- [22] G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler,  $\beta$ VI Turns in Peptides and Proteins: A Model Peptide Mimicry, *Proteins: Struct., Funct., and Genetics* **1993**, *15*(3), 235–251.
- [23] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, Chain Reversals in Proteins, *Biochem. Biophys. Acta* **1973**, *303*(2), 211–229.



- [24] L. D. Barron, A. F. Bell, R. S. Bhatnagar, A. K. Dunker, G. D. Fasman, C. A. Gough, D. M. Gray, L. Hecht, M. Hollósi, W. C. Johnson, Jr., N. R. Kallenbach, T. A. Keiderling, D. Keller, K. Kuwajima, P. Lyu, W. L. Mattice, A. Perczel, E. S. Stevens, J. C. Sutherland, L. Tilstra, S. Y. Venyaminov, R. W. Woody, J. T. Yang, H. Zhou, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York **1996**.
- [25] G. Snatzke, Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I, *Chem. in uns. Zeit* **1981**, *15*(3), 78–87.
- [26] M. B. Robin, *Higher Excited States of Polyatomic Molecules*, Band 2, S. 122–160, Academic Press, New York **1975**.
- [27] M. C. Manning, R. W. Woody, Theoretical CD Studies of Polypeptide Helices: Examination of Important Electronic and Geometric Factors, *Biopolymers* **1991**, *31*(5), 569–586.
- [28] N. Sreerama, R. W. Woody, Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra, *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 318–351.
- [29] N. Sreerama, R. W. Woody, On the Analysis of Membrane Protein Circular Dichroism Spectra, *Protein Sci.* **2004**, *13*(1), 100–112.
- [30] A. Y. Woody, R. W. Woody, Individual Tyrosine Side-Chain Contributions to Circular Dichroism of Ribonuclease, *Biopolymers* **2003**, *72*(6), 500–513.
- [31] P.-O. Freskgård, L.-G. Mårtensson, P. Jonasson, B.-H. Jonsson, U. Carlsson, Assignment of the Contribution of the Tryptophan Residues to the Circular Dichroism Spectrum of Human Carbonic Anhydrase II, *Biochemistry* **1994**, *33*(47), 14281–14288.
- [32] D. H. Boxer, H. Zhang, D. G. Gourley, W. N. Hunter, S. M. Kelly, N. C. Price, Sensing fo Remote Oxyanion Binding at the DNS Binding Domain of the Molybdate-Dependent Transcriptional Regulator, ModE, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*(19), 2829–2837.
- [33] L. A. Andersson, J. A. Peterson, Active-Site Analysis of Ferric P450 Enzymes: Hydrogen-Bonding Effects on the Circular Dichroism Spectra, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *211*(2), 389–395.
- [34] R. G. Alden, E. Johnson, V. Nagarajan, W. W. Parson, C. J. Law, R. J. Cogdell, Calculations of Spectroscopic Properties of the LH2 Bacterio-Chlorophyll-Protein Antenna Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*, *J. Phys. Chem.* **1997**, *B101*, 4667–4680.

- [35] W. Gerlach, O. Stern, Der experimentelle Nachweis des magnetischen Moments des Silberatoms, *Z. f. Physik A Hadrons and Nuclei* **1922**, 8(1), 110–111.
- [36] W. Gerlach, O. Stern, Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld, *Z. f. Physik A Hadrons and Nuclei* **1922**, 9(1), 349–352.
- [37] W. Gerlach, O. Stern, Das magnetische Moment des Silberatoms, *Z. f. Physik A Hadrons and Nuclei* **1922**, 9(1), 353–355.
- [38] R. Frisch, O. Stern, Über die magnetische Ablenkung von Wasserstoffmolekülen und das magnetische Moment des Protons. I, *Z. f. Physik A Hadrons and Nuclei* **1933**, 85(1-2), 4–16.
- [39] R. Frisch, O. Stern, Über die magnetische Ablenkung von Wasserstoffmolekülen und das magnetische Moment des Protons. II, *Z. f. Physik A Hadrons and Nuclei* **1933**, 85(1-2), 17–24.
- [40] I. I. Rabi, S. Millman, P. Kusch, J. R. Zacharias, The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Moments, *Phys. Rev.* **1939**, 55(6), 526–535.
- [41] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, Nuclear Induction, *Phys. Rev.* **1946**, 69(3-4), 127.
- [42] D. Adams, *The Hitchhiker's Guide to the Galaxy*, Band 1–4, Pan Books, London **1979**.
- [43] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid, *Phys. Rev.* **1946**, 69(1-2), 37–38.
- [44] F. Bloch, Nuclear Induction, *Phys. Rev.* **1946**, 70(7-8), 460–474.
- [45] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, The Nuclear Induction Experiment, *Phys. Rev.* **1946**, 70(7-8), 474–485.
- [46] B. Jacobson, W. A. Anderson, J. T. Arnold, A Proton Magnetic Resonance Study of the Hydration of Deoxyribonucleic Acid, *Nature* **1954**, 173(4408), 772–773.
- [47] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature* **1953**, 171(4356), 737–738.
- [48] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, Oxford **1961**.
- [49] R. R. Ernst, W. A. Anderson, Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, 37(1), 93–102.

- [50] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford **1987**.
- [51] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, WILEY-VCH, Weinheim, 4. Auflage **2006**.
- [52] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Band 19 von *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Pergamon, Oxford **1999**.
- [53] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts. IUPAC Recommendations 2001, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2002**, *22*(4), 458–483.
- [54] R. Riek, *BioNMR in Drug Research*, Band 16 von *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Kapitel TROSY: Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy, S. 227–241, WILEY-VCH, Weinheim, 1. Auflage **2003**.
- [55] Ě. Kupĉe, R. Freeman, Projection-Reconstruction of Three-Dimensional NMR Spectra, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(46), 13958–13959.
- [56] Ě. Kupĉe, R. Freeman, Projection-Reconstruction Technique for Speeding up Multidimensional NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(20), 6429–6440.
- [57] S. Hiller, F. Fiorito, K. Wüthrich, G. Wider, Automated Projection Spectroscopy (APSY), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*(31), 10876–10881.
- [58] F. Fiorito, S. Hiller, G. Wider, K. Wüthrich, Automated Resonance Assignment of Proteins: 6D APSY-NMR, *J. Biomol. NMR* **2006**, *35*(1), 27–37.
- [59] P. T. F. Williamson, M. Ernst, B. H. Meier, *BioNMR in Drug Research*, Band 16 von *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Kapitel MAS Solid-State NMR of Isotopically Enriched Biological Samples, S. 243–282, WILEY-VCH, Weinheim, 1. Auflage **2003**.
- [60] J. Perlo, V. Demas, F. Casanova, C. A. Meriles, J. Reimer, A. Pines, B. Blümich, High-Resolution NMR Spectroscopy with a Portable Single-Sided Sensor, *Science* **2005**, *308*(5726), 1279.
- [61] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, Attenuated  $T_2$  Relaxation by Mutual Cancellation of Dipole-Dipole Coupling and Chemical Shift Anisotropy Indicates an Avenue to NMR Structures of Very Large Biological Macromolecules in Solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*(23), 12366–12371.
- [62] T. Schulte-Herbrüggen, O. W. Sørensen, Clean TROSY: Compensation for Relaxation-Induced Artifacts, *J. Magn. Reson.* **1999**, *144*(1), 123–128.

- [63] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, A Wiley-Interscience Publication, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore **1986**.
- [64] Biological Magnetic Resonance Data Bank, URL: <http://www.bmrb.wisc.edu> **2006**.
- [65] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, Relationship Between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and Protein Secondary Structure, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*(2), 311–333.
- [66] M. Schubert, D. Labudde, H. Oschkinat, P. Schmieder, A Software Tool for the Prediction of Xaa-Pro Peptide Bond Conformations in Proteins Based on  $^{13}\text{C}$  Chemical Shift Statistics, *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*(2), 149–154.
- [67] N. Sewald, J. Riede, P. Bissinger, K. Burger, A New Convenient Synthesis of 2-Trifluoromethyl Substituted Aspartic Acid and its Isopeptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1992**, S. 267–274.
- [68] J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford **1995**.
- [69] G. Wagner, K. Wüthrich, Amide Proton Exchange and Surface Conformation of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor in Solution, *J. Mol. Biol.* **1982**, *160*(2), 343–361.
- [70] M. Karplus, Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*(1), 11–15.
- [71] M. Karplus, Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(18), 2870–2871.
- [72] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, Skalare Kopplungen – ihre Analyse und ihre Verwendung zur Strukturaufklärung, *Angew. Chem.* **1995**, *107*(16), 1813–1838.
- [73] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, The XPLOR-NIH NMR Molecular Structure Determination Package, *J. Magn. Reson.* **2003**, *160*(1), 65–73.
- [74] D. S. Garrett, J. Kuszewski, T. J. Hancock, P. J. Lodi, G. W. Vuister, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, The Impact of Direct Refinement against Three-Bond  $\text{HN-C}^\alpha\text{H}$  Coupling Constants on Protein Structure Determination by NMR, *J. Magn. Reson. Series B* **1994**, *104*(1), 99–103.
- [75] I. Solomon, Relaxation Processes in a System of Two Spins, *Phys. Rev.* **1955**, *99*(2), 259–281.

- [76] A. Bax, D. G. Davis, Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*(1), 207–213.
- [77] E. W. Guthöhrlein, *Effiziente Konformationsanalyse von Peptiden*, Dissertation, Universität Bielefeld **2006**.
- [78] A. Glättli, W. F. van Gunsteren, Are NMR-Derived Model Structures for  $\beta$ -Peptides Representative for the Ensemble of Structures Adopted in Solution?, *Angew. Chem.* **2004**, *116*(46), 6472–6476.
- [79] C. Griesinger, R. R. Ernst, Frequency Offset Effects and Their Elimination in NMR Rotating-frame Cross-Relaxation Spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*(2), 261–271.
- [80] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, Recommendations for the Presentation of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids, *J. Biom. NMR* **1998**, *12*, 1–23.
- [81] IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and Symbols for the Description of the Conformation of Polypeptide Chains. Tentative Rules (1969), *Biochemistry* **1970**, *9*(18), 3471–3479.
- [82] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich **1996**.
- [83] C. Gayathri, A. A. Bothner-By, P. C. M. van Zijl, C. MacLean, Dipolar Magnetic Field Effects in NMR Spectra of Liquids, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *87*(2), 192–196.
- [84] E. W. Bastiaan, C. MacLean, P. C. M. van Zijl, A. A. Bothner-By, High-Resolution NMR of Liquids and Gases: Effects of Magnetic-Field-Induced Molecular Alignment, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1987**, *19*, 35–77.
- [85] G. M. Clore, M. R. Starich, C. A. Bewley, M. Cai, J. Kuszewski, Impact of Residual Dipolar Couplings on the Accuracy of NMR Structures Determined from a Minimal Number of NOE Restraints, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(27), 6513–6514.
- [86] A. Saupe, G. Englert, High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*(10), 462–464.
- [87] A. Saupe, Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen. Teil I, *Z. Naturforsch.* **1964**, *19*(2), 161–171.
- [88] F. Kramer, M. V. Deshmukh, H. Kessler, S. J. Glaser, Residual Dipolar Coupling Constants: An Elementary Derivation of Key Equations, *Conc. Magn. Res. A* **2004**, *21A*(1), 10–21.

- [89] E. de Alba, N. Tjandra, NMR Dipolar Couplings for the Structure Determination of Biopolymers in Solution, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, *40*(2), 175–197.
- [90] W. Kremer, B. Schuler, S. Harrieder, M. Geyer, W. Gronwald, C. Welker, R. Jaenicke, H. R. Kalbitzer, Solution NMR Structure of the Cold-Shock Protein From the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*(9), 2527–2539.
- [91] D. Yang, A. Mittermaier, Y.-K. Mok, L. E. Kay, A Study of Protein Side-Chain Dynamics From new  $^2\text{H}$  Auto-Correlation and  $^{13}\text{C}$  Cross-Correlation NMR Experiments: Application to the N-Terminal SH<sub>3</sub> Domain From drk, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*(5), 939–954.
- [92] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, Validation of Protein Structure From Anisotropic Carbonyl Chemical Shifts in a Dilute Liquid Crystalline Phase, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(27), 6836–6837.
- [93] N. Tjandra, J. G. Omichinski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, A. Bax, Use of Dipolar  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Couplings in the Structure Determination of Magnetically Oriented Macromolecules in Solution, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*(9), 732–738.
- [94] F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, J. Faraone-Mennella, A. Rosato, The Solution Structure of Oxidized *Escherichia coli* Cytochrome  $b_{562}$ , *Biochemistry* **1999**, *38*(27), 8657–8670.
- [95] F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, K. van der Wetering, M. Czisch, R. Kaptein, The Auto-Orientation in High Magnetic Fields of Oxidized Cytochrome  $b_{562}$  as Source of Constraints for Solution Structure Determination, *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*(4), 295–304.
- [96] A. Bonincontro, A. De Francesco, G. Onori, Temperature-Induced Conformational Changes of Native Lysozyme in Aqueous Solution Studied by Dielectric Spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *301*(1-2), 189–192.
- [97] C. R. Sanders, J. P. Schwonek, Characterization of Magnetically Orientable Bilayers in Mixtures of Dihexanoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylcholine by Solid-State NMR, *Biochemistry* **1992**, *31*(37), 8898–8905.
- [98] G. M. Clore, M. R. Starich, A. M. Gronenborn, Measurement of Residual Dipolar Couplings of Macromolecules Aligned in the Nematic Phase of a Colloidal Suspension of Rod-Shaped Viruses, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(40), 10571–10572.
- [99] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, Tunable Alignment of Macromolecules by Filamentous Phage Yields Dipolar Coupling Interactions, *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*(12), 1065–1074.

- [100] H. J. Sass, F. Cordier, A. Hoffmann, M. Rogowski, A. Cousin, J. G. Omichinski, H. Lowen, S. Grzesiek, Purple Membrane Induced Alignment of Biological Macromolecules in the Magnetic Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(10), 2047–2055.
- [101] B. W. König, J.-S. Hu, M. Ottiger, S. Bose, R. W. Hendler, A. Bax, NMR Measurement of Dipolar Couplings in Proteins Aligned by Transient Binding to Purple Membrane Fragments, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(6), 1385–1386.
- [102] C. Aroulanda, V. Boucard, F. Guibé, J. Courtieu, D. Merlet, Weakly Oriented Liquid-Crystal NMR Solvents as a General Tool to Determine Relative Configurations, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*(18), 4536–4539.
- [103] L. Verdier, P. Sakhaii, M. Zweckstetter, C. Griesinger, Measurement of Long Range H,C Couplings in Natural Products in Orienting Media: A Tool for Structure Elucidation of Natural Products, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*(2), 353–359.
- [104] B. Bendiak, Sensitive Through-Space Dipolar Correlations between Nuclei of Small Organic Molecules by Partial Alignment in a Deuterated Liquid Solvent, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(50), 14862–14863.
- [105] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, Eine einfache und skalierbare Methode für die partielle Orientierung organischer Moleküle zur Messung dipolarer Restkopplungen (RDCs), *Angew. Chem.* **2004**, *116*(9), 1112–1114.
- [106] J. C. Freudenberger, P. Spittler, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(dimethylsiloxane) Gels as NMR Alignment Media for Apolar and Weakly Polar Organic Solvents: An Ideal Tool for Measuring RDCs at Low Molecular Concentrations, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(45), 14690–14691.
- [107] J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(vinyl acetate) Gels as NMR Alignment Media for the Measurement of Residual Dipolar Couplings in Polar Organic Solvents, *Angew. Chem.* **2005**, *117*(3), 427–430.
- [108] E. de Alba, N. Tjandra, *BioNMR in Drug Research*, Band 16 von *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Kapitel Orientational Restraints, S. 179–205, WILEY-VCH, Weinheim, 1. Auflage **2003**.
- [109] E. Brunner, Residual Dipolar Couplings in Protein NMR, *Conc. Magn. Res.* **2001**, *13*(4), 238–259.
- [110] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, Two-Dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*(5), 2229–2246.

- [111] M. R. Hansen, M. Rance, A. Pardi, Observation of Long-Range  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Distances in Solution by Dipolar Coupling Interaction, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(43), 11210–11211.
- [112] F. Tian, P. J. Bolon, J. H. Prestegard, Intensity-Based Measurement of Homonuclear Residual Dipolar Couplings From CT-COSY, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(33), 7712–7713.
- [113] F. Tian, C. A. Fowler, E. R. Zartler, J. F. A. Jenney, M. W. Adams, J. H. Prestegard, Direct Measurement of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Dipolar Couplings in Proteins: A Complement to Traditional NOE Measurements, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*(1), 23–31.
- [114] N. Tjandra, A. Bax, Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium, *Science* **1997**, *278*(5340), 1111–1114.
- [115] M. Ottiger, A. Bax, Characterization of Magnetically Oriented Phospholipid Micelles for Measurement of Dipolar Couplings in Macromolecules, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*(3), 361–372.
- [116] H. Wang, M. Eberstadt, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. W. Fesik, A Liquid Crystalline Medium for Measuring Residual Dipolar Couplings Over a Wide Range of Temperatures, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*(3), 443–446.
- [117] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, Measurement of  $J$  and Dipolar Couplings From Simplified Two-Dimensional NMR Spectra, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*(2), 373–378.
- [118] M. Ottiger, F. Delaglio, J. L. Marquardt, N. Tjandra, A. Bax, Measurement of Dipolar Couplings for Methylene and Methyl Sites in Weakly Oriented Macromolecules and Their Use in Structure Determination, *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*(2), 365–369.
- [119] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, N. Tjandra, Direct Structure Refinement against Residual Dipolar Couplings in the Presence of Rhombicity of Unknown Magnitude, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*(1), 159–162.
- [120] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Bax, A Robust Method for Determining the Magnitude of the Fully Asymmetric Alignment Tensor of Oriented Macromolecules in the Absence of Structural Information, *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*(1), 216–221.
- [121] M. Zweckstetter, A. Bax, Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(15), 3791–3792.



- [122] J. J. Warren, P. B. Moore, A Maximum Likelihood Method for Determining  $D_a^{PQ}$  and R for Sets of Dipolar Coupling Data, *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*(2), 271–275.
- [123] J. Meiler, N. Blomberg, M. Nilges, C. Griesinger, A New Approach for Applying Residual Dipolar Couplings as Restraints in Structure Elucidation, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*(3), 245–252.
- [124] M. Nilges, A. M. Gronenborn, A. T. Brünger, G. M. Clore, Determination of Three-Dimensional Structures of Proteins by Simulated Annealing with Interproton Distance Restraints: Application to Crambin, Potato Carboxypeptidase Inhibitor and Barley Serine Proteinase Inhibitor 2, *Protein Eng., Des. Sel.* **1988**, *2*(1), 27–38.
- [125] N. Tjandra, S.-i. Tate, A. Ono, M. Kainosho, A. Bax, The NMR Structure of a DNS Dodecamer in an Aqueous Dilute Liquid Crystalline Phase, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(26), 6190–6200.
- [126] L. Trantirek, M. Urbášek, R. Štefl, J. Feigon, V. Sklenár, A Method for Direct Determination of Helical Parameters in Nucleic Acids Using Residual Dipolar Couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(42), 10454–10455.
- [127] A. Vermeulen, H. Zhou, A. Pardi, Determining Global Structure and DNS Bending by Application of NMR Residual Dipolar Couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(40), 9638–9647.
- [128] M. J. Lohse, The Future of Pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, *19*(6), 198–200.
- [129] M. Tintelnot, P. Andrews, Geometries of Functional Group Interactions in Enzyme-Ligand Complexes: Guides for Receptor Modelling, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1989**, *3*(1), 67–84.
- [130] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, Conformation of Cyclic Peptides, Principle Concepts and the Design of Selectivity and Superactivity in Bioactive Sequences by ‘Spatial Screening’, *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*(6), 1201–1205.
- [131] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins für eine neuartige Krebstherapie, *Angew. Chem.* **1997**, *109*(13-14), 1440–1456.
- [132] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *N*-Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective  $\alpha_v\beta_3$  Integrin Antagonists, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*(16), 3033–3040.

- [133] M. Heller, M. Sukopp, N. Tsomaia, M. John, D. F. Mierke, B. Reif, H. Kessler, The Conformation of cyclo(-D-Pro-Ala4-) as a Model for Cyclic Pentapeptides of the DL4 Type, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(42), 13806–13814.
- [134] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *N*-Methylated Cyclic Pentaalanine Peptides as Template Structures, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(47), 15164–15172.
- [135] H. Kessler, Detection of Hindered Rotation and Inversion by NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*(3), 219–235.
- [136] H. Kessler, U. Anders, M. Schudok, An Unexpected *cis* Peptide Bond in the Minor Conformation of a Cyclic Hexapeptide Containing only Secondary Amide Bonds, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*(16), 5908–5916.
- [137] M. Malešević,  *$\beta$ -Amino Acids as Secondary Structure Inducers in Peptides*, Dissertation, Universität Bielefeld **2002**.
- [138] F. Schumann, A. Müller, M. Kokschi, G. Müller, N. Sewald, Are  $\beta$ -Amino Acids  $\gamma$ -Turn Mimetics? Exploring a New Design Principle for Bioactive Cyclopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(48), 12009–12010.
- [139] F. Schumann, *Modifizierung cyclischer RGD-Peptide durch  $\beta$ -Aminosäuren: Konformationsanalyse mittels NMR-Spektroskopie und Molecular Modeling*, Dissertation, Universität Leipzig **1999**.
- [140] M. Malešević, Z. Majer, E. Vass, T. Huber, U. Strijowski, M. Hollósi, N. Sewald, Spectroscopic Detection of Pseudo-Turns in Homodetic Cyclic Penta- and Hexapeptides Comprising  $\beta$ -Homoproline, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2006**, *12*(2), 165–177.
- [141] V. J. Merluzzi, K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C. K. Smith, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, A. S. Rosenthal, R. Faanes, F. J. Eckner, R. A. Koup, J. L. Sullivan, Inhibition of HIV-1 Replication by a Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, *Science* **1990**, *250*(4986), 1411–1413.
- [142] H. J. Bohm, LUDI: Rule-Based Automatic Design of New Substituents for Enzyme Inhibitor Leads, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*(6), 593–606.
- [143] M. C. Lawrence, P. C. Davis, CLIX: A Search Algorithm for Finding Novel Ligands Capable of Binding Proteins of Known Three-Dimensional Structure, *Proteins: Struct., Funct., and Genetics* **1992**, *12*(1), 31–41.
- [144] G. Lauri, P. A. Bartlett, CAVEAT: A Program to Facilitate the Design of Organic Molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*(1), 51–66.
- [145] E. R. J. A. Schrödinger, An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules, *Phys. Rev.* **1926**, *28*(6), 1049–1070.

- [146] M. Born, J. R. Oppenheimer, Zur Quantentheorie der Molekeln, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1927**, *84*(20), 457–484.
- [147] R. G. Parr, W. Yang, Density-Functional Theory of the Electronic Structure of Molecules, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 701–728.
- [148] J. Gasteiger, M. Marsili, Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity – A Rapid Access to Atomic Charges, *Tetrahedron* **1980**, *36*(22), 3219–3228.
- [149] B. J. Alder, T. E. Wainwright, Phase Transition for a Hard Sphere System, *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*(5), 1208–1209.
- [150] B. J. Alder, T. E. Wainwright, Studies in Molecular Dynamics. I. General Method, *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*(2), 459–466.
- [151] J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, Dynamics of Folded Proteins, *Nature* **1977**, *267*(5612), 585–590.
- [152] L. Verlet, Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules, *Phys. Rev.* **1967**, *159*(1), 98–103.
- [153] R. W. Hockney, The Potential Calculation and Some Applications, in B. Alder and S. Fernbach and M. Rotenberg (Herausgeber), *Methods in Computational Physics*, Band 9 von *Plasma Physics*, Academic Press, New York, London **1970**.
- [154] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*(8), 3684–3690.
- [155] W. F. van Gunsteren, in *AIP Conference Proceedings, Advances in Biomolecular Simulations*, Band 239, American Institute of Physics, R. Lavery, J.-L. Rivail, J. Smith, New York **1991** S. 131–146.
- [156] H. C. Andersen, Rattle: A ‘Velocity’ Version of the SHAKE Algorithm for Molecular Dynamics Calculations, *J. Comput. Phys.* **1983**, *52*(1), 24–34.
- [157] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of *n*-Alkanes, *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*(3), 327–341.
- [158] B. J. Leimkuhler, R. D. Skeel, Symplectic Numerical Integrators in Constrained Hamiltonian Systems, *J. Comput. Phys.* **1994**, *112*(1), 117–125.
- [159] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*(9), 2325–2327.

- [160] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, L. Demchik, Total Structures of Cryptophycins, Potent Antitumor Depsipeptides from the Blue-Green Alga *Nostoc* sp. Strain GSV224, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(11), 4729–4737.
- [161] D. W. Roberts, *Toxins of Entomopathogenic Fungi*, Kapitel Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980, S. 441–446, Academic Press, H. D. Burges, London **1981**.
- [162] S. H. Gellman, Foldamers: A Manifesto, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*(4), 171–180.
- [163] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman,  $\beta$ -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of  $\beta$ -Amino Acid Oligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(51), 13071–13072.
- [164] D. H. Appella, J. J. Barchi, Jr., S. R. Durell, S. H. Gellman, Formation of Short, Stable Helices in Aqueous Solution by  $\beta$ -Amino Acid Hexamers, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(10), 2309–2310.
- [165] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado,  $\beta$ -Peptides: From Structure to Function, *Chem. Rev.* **2001**, *101*(10), 3219–3232.
- [166] J. J. Barchi, Jr., X. Huang, D. H. Appella, L. A. Christianson, S. R. Durell, S. H. Gellman, Solution Conformations of Helix-Forming  $\beta$ -Amino Acid Homooligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(12), 2711–2718.
- [167] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, M. R. Richards, D. R. Powell, S. H. Gellman, Synthesis and Structural Characterization of Helix-Forming  $\beta$ -Peptides: *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid Oligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(33), 7574–7581.
- [168] S. Krauthäuser, L. A. Christianson, D. R. Powell, S. H. Gellman, Antiparallel Sheet Formation in  $\beta$ -Peptide Foldamers: Effects of  $\beta$ -Amino Acid Substitution on Conformational Preference, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(48), 11719–11720.
- [169] L. Whitmore, B. A. Wallace, The Peptaibol Database: A Database for Sequences and Structures of Naturally Occurring Peptaibols, *Nuc. Acids Res.* **2004**, *32*(Database issue), D593–D594.
- [170] D. Wade, J. Englund, Synthetic Antibiotic Peptides Database, *Prot. Pept. Lett.* **2002**, *9*(1), 53–57.
- [171] C. Toniolo, E. Benedetti, Structures of Polypeptides from  $\alpha$ -Amino Acids Disubstituted at the  $\alpha$ -Carbon, *Macromolecules* **1991**, *24*(14), 4004–4009.

- [172] V. Pavone, B. Di Blasio, A. Santini, E. Benedetti, C. Pedone, C. Toniolo, M. Crisma, The Longest, Regular Polypeptide  $3_{10}$  Helix at Atomic Resolution, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*(3), 633–635.
- [173] C. Toniolo, M. Crisma, G. M. Bonora, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, A. Santini, Preferred Conformation of the Terminally Blocked (Aib) $_{10}$  Homo-Oligopeptide: A Long, Regular  $3_{10}$ -Helix, *Biopolymers* **1991**, *31*(1), 129–138.
- [174] C. Toniolo, G. M. Bonora, V. Barone, A. Vavosa, E. Benedetti, B. Di Blasio, P. Grimaldi, F. Lelj, V. Pavone, C. Pedone, Conformation of Pleionomers of  $\alpha$ -Aminoisobutyric Acid, *Macromolecules* **1985**, *18*(5), 895–902.
- [175] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, Control of Peptide Conformation by the Thorpe-Ingold Effect ( $C^{\alpha}$ -Tetrasubstitution), *Biopolymers* **2001**, *60*(6), 396–419.
- [176] M. Crisma, A. Moretto, M. De Zotti, F. Formaggio, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, C. Toniolo, Turn Stabilization in Short Peptides by  $C^{\alpha}$ -Methylated  $\alpha$ -Amino Acids, *Biopolymers* **2005**, *80*(2-3), 279–293.
- [177] I. L. Karle, J. Flippen-Anderson, M. Sukumar, P. Balaram, Conformation of a 16-Residue Zervamicin IIA Analog Peptide Containing Three Different Structural Features:  $3_{10}$ -Helix,  $\alpha$ -Helix, and  $\beta$ -Bend Ribbon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(15), 5087–5091.
- [178] C. Soto, Protein Misfolding and Disease; Protein Refolding and Therapy, *FEBS Lett.* **2001**, *498*(2-3), 204–207.
- [179] E. Benedetti, V. Barone, A. Bavoso, B. Di Blasio, F. Lelj, V. Pavone, C. Pedone, G. M. Bonora, C. Toniolo, M. T. Leplawy, K. Kaczmarek, A. S. Redlinski, Structural Versatility of Peptides from  $C^{\alpha,\alpha}$ -Dialkylated Glycines. I. A Conformational Energy Computation and X-Ray Diffraction Study of Homo-Peptides from  $C^{\alpha,\alpha}$ -Diethylglycine, *Biopolymers* **1988**, *27*(3), 357–371.
- [180] J. Nagao, S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama, K. Sonomoto, Lantibiotics: Insight and Foresight for new Paradigm, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *102*(3), 139–149.
- [181] G. C. Patton, W. A. van der Donk, New Developments in Lantibiotic Biosynthesis and Mode of Action, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*(5), 543–551.
- [182] G. Weber, K. Schorgendorfer, E. Schneider-Scherzer, E. Leitner, The Peptide Synthetase Catalyzing Cyclosporine Production in *Tolypocladium niveum* is Encoded by a Giant 45.8-Kilobase Open Reading Frame, *Curr. Genet.* **1994**, *26*(2), 120–125.

- [183] T. Stein, J. Vater, V. Krufft, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panico, R. McDowell, H. R. Morris, The Multiple Carrier Model of Nonribosomal Peptide Biosynthesis at Molecular Multienzyme Templates, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*(26), 15428–15435.
- [184] R. E. W. Hancock, D. S. Chapple, Peptide Antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*(6), 1317–1323.
- [185] V. Matha, A. Jegorov, M. Kiess, H. Brückner, Morphological Alterations Accompanying the Effect of Peptaibiotics, Alpha-Aminoisobutyric Acid-Rich Secondary Metabolites of Filamentous Fungi, on *Culex pipiens* Larvae, *Tissue and Cell* **1992**, *24*(4), 559–564.
- [186] D. S. Cafiso, Alamethicin: A Peptide Model for Voltage Gating and Protein-Membrane Interactions, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 141–165.
- [187] J. K. Chugh, B. A. Wallace, Peptaibols: Models for Ion Channels, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*(4), 565–570.
- [188] S. B. Krasnoff, S. Gupta, Identification and Directed Biosynthesis of Efraeptins in the Fungus *Tolypocladium geodes* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes), *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*(10), 1991.
- [189] S. B. Krasnoff, S. Gupta, Efraeptin Production by *Tolypocladium* Fungi (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Intra- and Interspecific Variation, *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*(10), 1727–1741.
- [190] D. A. Bullough, G. G. Jackson, P. J. F. Henderson, R. B. Beechey, E. Linnett, The Isolation and Purification of the Elvapeptins: A Family of Peptide Inhibitors of Mitochondrial ATPase Activity, *FEBS Lett.* **1982**, *145*(2), 258–262.
- [191] M. V. Uma, R. Sudha, P. Balaram, Spermidine as a Potential Biosynthetic Precursor to the 1,5-Diazabicyclo[4:3:0]nonene Residue in the Efraeptins, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*(5), 375–380.
- [192] Gatto, Jr., G. J., M. T. Boyne, II., N. L. Kelleher, C. T. Walsh, Biosynthesis of Pipecolic Acid by RapL, a Lysine Cyclodeaminase Encoded in the Rapamycin Gene Cluster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(11), 3838–3847.
- [193] S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, Structures of the Efraeptins: Potent Inhibitors of Mitochondrial ATPase from the Fungus *Tolypocladium niveum*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*(2), 707–709.
- [194] E. Benedetti, R. Iacovino, M. Saviano, J. Kamphuis, M. Crisma, F. Formaggio, V. Moretto, C. Toniolo, Crystal-State Structure of the C-Terminal Pentapeptide of the Antibiotic Efraeptin c, *Protein Pept. Lett.* **1996**, *3*(4), 283–288.

- [195] S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, Structure of Efrapeptins from the Fungus *Tolyposcladium niveum*: Peptide Inhibitors of Mitochondrial ATPase, *J. Org. Chem.* **1992**, 57(8), 2306–2313.
- [196] J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raaij, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, The Structure of Bovine F<sub>1</sub>-ATPase Complexed with the Peptide Antibiotic Efrapeptin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93(18), 9420–9424.
- [197] H. A. Lucero, R. A. Ravizzini, R. H. Vallejos, Inhibition of Spinach Chloroplasts Photophosphorylation by the Antibiotics Leucinostatin and Efrapeptin, *FEBS Lett.* **1976**, 68(1), 141–144.
- [198] P. E. Linnett, R. B. Beechey, Inhibitors of the ATP Synthetase Systems, *Methods Enzymol.* **1979**, 55, 472–518.
- [199] J. G. Wise, T. M. Duncan, L. Richardson, D. N. Cox, A. E. Cox, Properties of F<sub>1</sub>-ATPase from the uncD<sub>412</sub> mutant of *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **1983**, 215(2), 343–350.
- [200] V. Matha, J. Weiser, J. Olejnicek, The Effect of Tolypin in *Tolyposcladium niveum* Crude Extract Against Mosquito and Blackfly Larvae in the Laboratory, *Folia Parasitol.* **1988**, 35(4), 379–381.
- [201] A. R. Bandani, B. P. S. Khambay, J. L. Faull, R. Newton, M. Deadman, T. M. Butt, Production of Efrapeptins by *Tolyposcladium* Species and Evaluation of Their Insecticidal and Antimicrobial Properties, *Mycol. Res.* **2000**, 104(5), 537–544.
- [202] G. Nagaraj, M. V. Uma, M. S. Shivayogi, H. Balaram, Antimalarial Activities of Peptide Antibiotics Isolated from Fungi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45(1), 145–149.
- [203] M. Jost, J. Greie, N. Stemmer, S. D. Wilking, K. Altendorf, N. Sewald, Die erste Totalsynthese von Efrapeptin C, *Angew. Chem.* **2002**, 114(22), 4438–4440.
- [204] M. Jost, *Synthese von Efrapeptin C und Efrapeptin-Analoga*, Dissertation, Universität Bielefeld **2003**.
- [205] A. Perczel, M. Hollósi, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Kapitel Turns, S. 286–367, Plenum Press, New York **1996**.
- [206] G. Yoder, T. A. Keiderling, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, Characterization of  $\beta$ -Bend Ribbon Spiral Forming Peptides Using Electronic and Vibrational CD, *Biopolymers* **1995**, 35(1), 103–111.
- [207] M. Goodman, F. Naider, C. Toniolo, Circular Dichroism Studies of Isoleucine Oligopeptides in Solution, *Biopolymers* **1971**, 10(9), 1719–1730.

- [208] G. Holzwarth, P. Doty, The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*(2), 218–228.
- [209] P. I. Haris, D. Chapman, The Conformational Analysis of Peptides Using Fourier Transform IR Spectroscopy, *Biopolymers* **1995**, *37*(4), 251–263.
- [210] E. Vass, M. Hollósi, F. Besson, R. Buchet, Vibrational Spectroscopic Detection of Beta- and Gamma-Turns in Synthetic and Natural Peptides and Proteins, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(5), 1917–1954.
- [211] A. M. Dwivedi, S. Krimm, B. R. Malcolm, Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. XXIV. Conformation of Poly( $\alpha$ -Aminoisobutyric Acid), *Biopolymers* **1984**, *23*(10), 2025.
- [212] M. Hollósi, M. Kajtár, L. Gráf, Studies on the Conformation of  $\beta$ -Endorphin and its Constituent Fragments in Water and Trifluoroethanol by CD Spectroscopy, *FEBS Lett.* **1977**, *74*(2), 185–189.
- [213] T. A. Keiderling, R. A. G. D. Silva, G. Yoder, R. K. Dukor, Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy of Selected Oligopeptide Conformations, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*(1), 133–141.
- [214] S. Weigelt, *Synthese isotopenmarkierter Efrapeptin C-Fragmente*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2003**.
- [215] S. Weigelt, N. Sewald, Synthesis of  $^2\text{H}$ -Labelled  $\alpha$ -Azidoisobutyryl Chloride ( $\text{D}_6$ -Azib-Cl) as  $^2\text{H}_6$ -Aib Equivalent Building Block in Peptide Synthesis, *SYNLETT* **2004**, *4*, 726–728.
- [216] S. B. Nabuurs, C. A. E. M. Spronk, G. Vriend, G. W. Vuister, Concepts and Tools for NMR Restraint Analysis and Validation, *Conc. Magn. Res. A* **2004**, *22A*, 90–105.
- [217] M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, Improved Spectral Resolution in COSY  $^1\text{H}$  NMR Spectra of Proteins via Double Quantum Filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*(2), 479–485.
- [218] A. Bax, D. G. Davis, MLEV-17-based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*(2), 355–360.
- [219] A. J. Shaka, C. J. Lee, A. Pines, Iterative Schemes for Bilinear Operators; Application to Spin Decoupling, *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*(2), 274–293.
- [220] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*(2), 323–327.



- [221] L. Müller, Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*(16), 4481–4484.
- [222] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, Correlation of Proton and Nitrogen-15 Chemical Shifts by Multiple Quantum NMR, *J. Magn. Reson.* **1969**, *55*(2), 301–315.
- [223] A. Bax, M. F. Summers,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Assignments from Sensitivity-Enhanced Detection of Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity by 2D Multiple Quantum NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*(8), 2093–2094.
- [224] A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(3), 811–813.
- [225] T. D. Goddard, D. G. Kneller, SPARKY3, University of California, San Francisco.
- [226] J. Yan, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, E. R. Zartler, A Novel Method for the Determination of Stereochemistry in Six-Membered Chairlike Rings Using Residual Dipolar Couplings, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*(5), 1786–1795.
- [227] A. T. Brünger, *XPLOR - A System for X-Ray Crystallography and NMR*, The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven **1996**.
- [228] L. D. Schuler, X. Daura, W. F. van Gunsteren, An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase, *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*(11), 1205–1218.
- [229] D. P. Geerke, C. Oostenbrink, N. F. A. van der Vegt, W. F. van Gunsteren, An Effective Force Field for Molecular Dynamics Simulations of Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfoxide-Water Mixtures, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*(4), 1436–1445.
- [230] M. Christen, P. H. Hünenberger, D. Bakowies, R. Baron, R. Bürgi, D. P. Geerke, T. N. Heinz, M. A. Kastenholz, V. Kräutler, C. Oostenbrink, C. Peter, D. Trzestniak, W. F. van Gunsteren, The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*(16), 1719–1751.
- [231] C. M. Fletcher, D. N. M. Jones, R. Diamond, D. Neuhaus, Treatment of NOE Constraints Involving Equivalent or Nonstereoassigned Protons in Calculations of Biomacromolecular Structures, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*(3), 292–310.
- [232] F. Sanger, The Free Amino Groups of Insulin, *Biochem. J.* **1945**, *39*(5), 507–515.
- [233] W. R. Gray, B. S. Hartley, A Fluorescent End-Group Reagent for Proteins and Peptides, *Biochem. J.* **1963**, *89*(1), 59P.

- [234] S. Blackburn, *Amino Acid Determination*, M. Dekker, New York **1978**.
- [235] G. C. Barrett, *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Chapman & Hall, London **1985**.
- [236] P. Edman, A Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides, *Arch. Biochem. Biophys.* **1949**, *22*(2), 475–476.
- [237] P. Edman, G. Begg, A Protein Sequenator, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*(1), 80–91.
- [238] R. W. Hewick, M. W. Hundapiller, L. E. Hood, W. J. Dreyer, A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*(15), 7990–7997.
- [239] R. A. Laursen, M. J. Horn, A. G. Bonner, Solid-Phase Edman Degradation, the Use of *p*-Phenyl Diisothiocyanate to Attach Lysine- and Arginine-Containing Peptides to Insoluble Resins, *FEBS Lett.* **1972**, *21*(1), 67–70.
- [240] P. Schlack, W. Kumpf, Über eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1926**, *154*(1), 125–170.
- [241] G. R. Stark, Sequential Degradation of Peptides from their Carboxyl Termini with Ammonium Thiocyanate and Acetic Anhydride, *Biochemistry* **1968**, *7*(5), 1796–1807.
- [242] V. L. Boyd, M. Bozzini, G. Zon, R. L. Noble, R. J. Mattaliano, Sequencing of Peptides and Proteins from the Carboxy Terminus, *Anal. Biochem.* **1992**, *206*(2), 334–343.
- [243] J. M. Bailey, N. R. Shenoy, M. Ronk, J. E. Shively, Automated Carboxy-Terminal Sequence Analysis of Peptides, *Protein Sci.* **1992**, *154*(1), 68–80.
- [244] G. Siuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, San Diego **1996**.
- [245] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons, *Anal. Chem.* **1988**, *60*(20), 2299–2301.
- [246] J. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science* **1989**, *246*(4926), 64–71.
- [247] M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaave, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann, Femtomole Sequencing of Proteins from Polyacrylamide Gels by Nano-Electrospray Mass Spectrometry, *Nature* **1996**, *379*(6564), 466–469.
- [248] A. Shevchenko, A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens, K. G. Standing, MALDI Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Proteomic Research, *Anal. Chem.* **2000**, *72*(9), 2132–2141.

- [249] E. de Hoffmann, Tandem Mass Spectrometry: A Primer, *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*(2), 129–137.
- [250] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, An Introduction to Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*(8), 849–865.
- [251] H. Steen, B. Küster, M. Fernandez, A. Pandey, M. Mann, Detektion of Tyrosine Phosphorylated Peptides by Precursor Ion Scanning Quadrupole TOF Mass Spectrometry in Positive Ion Mode, *Anal. Chem.* **2001**, *73*(7), 1440–1448.
- [252] D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer, Protein Sequencing by Tandem Mass-Spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*(17), 6233–6237.
- [253] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(13), 3265–3266.
- [254] A. J. Liska, A. Shevchenko, Expanding the Organismal Scope of Proteomics: Cross-Species Protein Identification by Mass Spectrometry and its Implications, *Proteomics* **2003**, *3*(1), 19–28.
- [255] A. J. Liska, A. Shevchenko, Combining Mass Spectrometry with Database Interrogation Strategies in Proteomics, *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*(4), 291–298.
- [256] G. Wagner, Prospects for NMR of Large Proteins, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*(4), 375–385.
- [257] L. E. Kay, K. H. Gardner, Solution NMR Spectroscopy Beyond 25 kDa, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*(4), 564–570.
- [258] H. Buholzer, M. L. Frischknecht, D. Kaeding, R. (CIBA-GEIGY AG, Basel, Schweiz), Synergistic Compositions with Diafenthion, EP 0 736 252 (A2) **1996**.
- [259] A. Fredenhagen, L.-P. Molleyres, B. Böhlendorf, G. Laue, Structure Determination of Neofrapeptins A to N: Peptides with Insecticidal Activity Produced by the Fungus *Geotrichum candidum*, *J. Antibiot.* **2006**, *59*(5), 267–280.
- [260] L.-P. Molleyres, A. Fredenhagen, T. C. Schuez, B. Boehlendorf, S. Neff, Y. (Syngenta Participations AG, Basel, Schweiz), Biologisch wirksame Neo-Efrapeptine, Offenlegungsschrift DE 103 61 201 (A1) **2003**.
- [261] G. M. Crippen, Distance Geometry and Conformational Calculations, in *Chemo-metrics Research Studies Series 1*, John Wiley & Sons, New York **1981**.

- [262] G. M. Crippen, T. F. Havel, Distance geometry and molecular conformation, in *Chemometrics Research Studies Series 15*, John Wiley & Sons, New York **1988**.
- [263] M. Saunders, Stochastic Exploration of Molecular Mechanics Energy Surfaces. Hunting for the Global Minimum, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*(10), 3150–3152.
- [264] D. M. Ferguson, D. J. Raber, A new Approach to Probing Conformational Space with Molecular Mechanics: Random Incremental Pulse Search, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*(12), 4371–4378.
- [265] Z. Q. Li, H. A. Scheraga, Monte-Carlo-Minimization Approach to the Multiple-Minima Problem in Protein Folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(19), 6611–6615.
- [266] G. Chang, W. C. Guida, W. C. Still, An Internal Coordinate Monte Carlo Method for Searching Conformational Space, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*(12), 4379–4386.
- [267] S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, Jr., M. P. Vecchi, Optimization by Simulated Annealing, *Science* **1983**, *220*(4598), 671–680.
- [268] M. Nilges, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, Determination of Threedimensional Structures of Proteins from Interproton Distance Data by Dynamical Simulated Annealing from a Random Array of Atoms. Circumventing Problems Associated with Folding, *FEBS Lett.* **1988**, *239*(1), 129–136.
- [269] M. Nilges, J. Habazettl, A. T. Brünger, T. A. Holak, Relaxation Matrix Refinement of the Solution Structure of Squash Trypsin Inhibitor, *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*(3), 499–510.
- [270] T. Huber, A. E. Torda, W. F. van Gunsteren, Local Elevation: A Method for Improving the Searching Properties of Molecular Dynamics Simulation, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, *8*(6), 695–708.
- [271] A. S. Smellie, S. D. Kahn, S. L. Teig, Analysis of Conformational Coverage. 1. Validation and Estimation of Coverage, *J. Chem. Inf. Model.* **1995**, *35*(2), 285–294.
- [272] A. S. Smellie, S. L. Teig, P. Towbin, Poling: Promoting Conformational Variation, *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*(2), 171–187.
- [273] R. C. van Schaik, H. J. C. Berendsen, A. E. Torda, W. F. van Gunsteren, A Structure Refinement Method Based on Molecular Dynamics in Four Spatial Dimensions, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*(3), 751–762.
- [274] G. M. Crippen, T. F. Havel, Global Energy Minimization by Rotational Energy Embedding, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1990**, *30*(3), 222–227.

- [275] G. M. Crippen, Why Energy Embedding Works, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*(25), 6341–6343.
- [276] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 5. Auflage **2003**.
- [277] R. O. Hynes, Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, *Cell* **2002**, *110*(6), 673–687.
- [278] R. O. Hynes, Integrins: A Family of Cell Surface Receptors, *Cell* **1987**, *48*(4), 549–554.
- [279] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand, *Science* **2002**, *296*(5565), 151–155.
- [280] J. M. de Pereda, G. Wiche, R. C. Liddington, Crystal Structure of a Tandem Pair of Fibronectin Type III Domains from the Cytoplasmic Tail of Integrin  $\alpha_6\beta_4$ , *EMBO J.* **1999**, *18*(15), 4087–4095.
- [281] L. T. Duong, G. A. Rodan, Integrin-Mediated Signaling in the Regulation of Osteoclast Adhesion and Activation, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, d757–768.
- [282] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , *Science* **2001**, *294*(5541), 339–345.
- [283] J. A. Eble, K. Kühn, *Integrin-Ligand Interaction*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest **1997**.
- [284] E. Ruoslahti, RGD and Other Recognition Sequences for Integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [285] S. Huang, R. I. Endo, G. R. Nemerow, Upregulation of Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  on Human Monocytes and T Lymphocytes Facilitates Adenovirus-Mediated Gene Delivery, *J. Virol.* **1995**, *69*(4), 2257–2263.
- [286] S. Lea, R. Abu-Ghazaleh, W. Blakemore, S. Curry, E. Fry, T. Jackson, A. King, D. Logan, J. Newman, D. Stuart, Structural Comparison of two Strains of Foot-And-Mouth Disease Virus Subtype O1 and a Laboratory Antigenic Variant, G67, *Structure* **1995**, *3*(6), 571–580.
- [287] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins, *Science* **1987**, *238*(4826), 491–497.

- [288] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, Pharmacophore Refinement of gpIIb/IIIa Antagonists Based on Comparative Studies of Antiadhesive Cyclic and Acyclic RGD Peptides, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*(6), 709–730.
- [289] G. Müller, *Molecular Modelling Techniken zum Studium von Konformations-Aktivitätsbeziehungen im Rahmen eines zielgerichteten Wirkstoffdesigns*, Dissertation, Technische Universität München **1992**.
- [290] W. R. P. Scott, A. E. Mark, W. F. van Gunsteren, On Using Time-Averaging Restraints in Molecular Dynamics Simulation, *J. Biom. NMR* **1998**, *12*, 501–508.
- [291] A. P. Nanzer, W. F. van Gunsteren, A. E. Torda, Parametrisation of Time-Averaged Distance Restraints in MD Simulations, *J. Biom. NMR* **1995**, *6*, 313–320.
- [292] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, Peptidfaltung: Wenn die Simulation das Experiment erreicht, *Angew. Chem.* **1999**, *111*(12), 249–253.
- [293] W. L. DeLano, *The PyMOL User's Manual*, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA **2002**.
- [294] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart, 2. Auflage **1995**.
- [295] E. Carafoli, Biogenesis: Plasma Membrane Calcium ATPase: 15 Years of Work on the Purified Enzyme, *FASEB J.* **1994**, *8*(13), 993–1002.
- [296] Y. Hiraoka, T. Segawa, K. Kuwajima, S. Sugai, N. Murai,  $\alpha$ -Lactalbumin: A Calcium Metalloprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*(3), 1098–1104.
- [297] M. J. Kronman, Metal-Ion Binding and the Molecular Conformational Properties of Alpha Lactalbumin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*(6), 565–667.
- [298] K. Kuwajima, The Molten Globule State of Alpha-Lactalbumin, *FASEB J.* **1996**, *10*(1), 102–109.
- [299] K. Kuwajima, M. Ikeguchi, T. Sugawara, Y. Hiraoka, S. Sugai, Kinetics of Disulfide Bond Reduction in Alpha-Lactalbumin by Dithiothreitol and Molecular Basis of Superreactivity of the Cys6-Cys120 Disulfide Bond, *Biochemistry* **1990**, *29*(36), 8240–8249.
- [300] A. L. Swain, R. H. Kretsinger, E. L. Amma, Restrained Least Squares Refinement of Native (Calcium) and Cadmium-Substituted Carp Parvalbumin Using X-Ray Crystallographic Data at 1.6-Å Resolution, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*(28), 16620–16628.

- [301] K. Harata, Y. Abe, M. Muraki, Crystallographic Evaluation of Internal Motion of Human Alpha-Lactalbumin Refined by Full-Matrix Least-Squares Method, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*(2), 347–358.
- [302] D. I. Stuart, K. R. Acharya, N. P. C. Walker, S. G. Smith, M. Lewis, D. C. Phillips,  $\alpha$ -Lactalbumin Possesses a Novel Calcium Binding Loop, *Nature* **1986**, *324*(6092), 84–87.
- [303] J. S. Evans, ‘Apples’ and ‘Oranges’: Comparing the Structural Aspects of Biomineral- and Ice-interaction Proteins, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*(1), 48–54.
- [304] D. Volkmer, M. Fricke, T. Huber, N. Sewald, Acidic Peptides Acting as Growth Modifiers of Calcite Crystals, *Chem. Commun.* **2004**, *16*, 1872–1873.
- [305] R. D. Shannon, Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides, *Acta Crystallogr. A.* **1976**, *A32*(5), 751–767.
- [306] W. Horrocks, D. R. Sudnick, Lanthanide Ion Luminescence Probes of the Structure of Biological Macromolecules, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*(12), 384–392.
- [307] I. Bertini, C. Luchinat, NMR of Paramagnetic Substances, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1–292.
- [308] I. Bertini, M. B. Janik, Y. M. Lee, C. Luchinat, A. Rosato, Magnetic Susceptibility Tensor Anisotropies for a Lanthanide Ion Series in a Fixed Protein Matrix, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*(18), 4181–4188.
- [309] N. D’Amelio, E. Gaggelli, N. Gaggelli, F. Mancini, E. Molteni, D. Valensin, G. Valensin, The Structure of the Ce(III)-Angiotensin II Complex as Obtained from NMR Data and Molecular Dynamics Calculations, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*(2-3), 225–229.
- [310] F. Bernardi, E. Gaggelli, E. Molteni, E. Porciatti, D. Valensin, G. Valensin,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR and Molecular Dynamics Studies of Cyclosporin A Interacting with Magnesium(II) or Cerium(III) in Acetonitrile. Conformational Changes and *cis-trans* Conversion of Peptide Bonds, *Biophys. J.* **2006**, *90*(4), 1350–1361.
- [311] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, Two-Dimensional Chemical Exchange and Cross-Relaxation Spectroscopy of Coupled Nuclear Spins, *J. Magn. Res.* **1981**, *43*(2), 259–281.
- [312] M. Fioroni, K. Burger, A. E. Mark, D. Roccatano, A New 2,2,2-Trifluoroethanol Model for Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*(51), 12347–12354.

- [313] S. Weigelt, *Efrapeptine und Adenozeptin – Peptide mit interessanten Eigenschaften als synthetische Herausforderung*, Dissertation, Universität Bielefeld **2007**.
- [314] L. Lamport, *L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X. A Document Preparation System*, Addison Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts **1986**.
- [315] D. Knuth, *The T<sub>E</sub>Xbook*, Addison Wesley Publishing Company, Reading, Menlo Park, Don Mills, Wokingham, Amsterdam, Mexico City, San Juan, Bogotá, Sydney, Santiago, Singapore, Tokyo, Milan, Paris **1986**.
- [316] H. Voß, *PSTricks*, Dante, Berlin, 3. Auflage **2006**.
- [317] P. J. Kraulis, MOLSCRIPT: A Programm to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures, *J. Appl. Cryst.* **1991**, *24*, 946–950.
- [318] R. M. Esnouf, An Extensively Modified Version of MOLSCRIPT that Includes Greatly Enhanced Coloring Capabilities, *J. Mol. Graphics Modell.* **1997**, *15*(2), 132–134.
- [319] R. M. Esnouf, Further Additions to MOLSCRIPT Version 1.4, Including Reading and Contouring of Electron-Density Maps, *Acta Cryst. D* **1999**, *55*(4), 938–940.
- [320] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual Molecular Dynamics, *J. Mol. Graphics Modell.* **1996**, *14*(1), 33–38.
- [321] C. D. Schwieters, G. M. Clore, The VMD-XPLOR Visualization Package for NMR Structure Refinement, *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*(2), 239–244.



**READY.**  
■