

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, LIX<sup>1)</sup>

## Die Raumstruktur der Phallotoxine

Theodor Wieland\*<sup>a</sup>, Barbro Beijer<sup>a</sup>, Annemarie Seeliger<sup>a</sup>,  
Janusz Dabrowski<sup>a</sup>, Giancarlo Zanotti<sup>b</sup>, Alan E. Tonelli<sup>c</sup>, Alfred Gieren<sup>d</sup>,  
Bernhard Dederer<sup>d</sup>, Viktor Lamm<sup>d</sup> und Erich Hädicke<sup>e</sup>

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,  
Abteilung Naturstoff-Chemie und Organische Chemie,  
Jahnstr. 29, D-6900 Heidelberg<sup>a</sup>,

Centro per le studio della Chimica de Farmaco del CNR,  
Universita di Roma<sup>b</sup>,

Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey 07974, USA<sup>c</sup>,

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforchung I,  
Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried<sup>d</sup>,

Ammoniaklaboratorium der BASF-AG, D-6700 Ludwigshafen<sup>e</sup>

Eingegangen am 15. April 1981

Die Thioetherbrücke [CH<sub>2</sub> – S – C(α-indol)] in den Phallotoxinen ist ein inhärent dissymmetrischer Chromophor, der die positiven Cottoneneffekte um 290 nm im CD-Spektrum verursacht. Bei einer früheren Strukturanalyse durch <sup>1</sup>H-NMR konnte die M- oder P-Helizität dieses Strukturelements nicht eindeutig bestimmt werden. Das einfacher gebaute cyclische Thioethertripeptid 2-Mercapto-L-tryptophylglycylcystein-cyclosulfid (1 → 3) (**2a**) weist im CD-Spektrum um 290 nm zu denen der Phallotoxine genau spiegelbildliche negative Cottoneneffekte (Abb. 1) auf. Die Strukturanalyse von **2a** durch <sup>1</sup>H-NMR (360 MHz) führte zu einem Strukturvorschlag mit M-Helizität. Das *N-p*-Brombenzolsulfonylderivat **2c** mit analogem CD-Spektrum bildete mit Aceton Kristalle, die zur Röntgenstrukturanalyse geeignet waren. Die dadurch erhaltene Raumformel zeigt für das fragliche Strukturelement negative M-Helizität. Demnach enthalten die Phallotoxine den spiegelbildlich analogen Chromophor mit positiver P-Helizität. Die Einführung eines weiteren chiralen Zentrums in den Peptidring (**2b**: L-Alanin statt Glycin in **2a**) hat auf die Gestalt des CD-Spektrums keinen Einfluß.

### Components of the Green Deathcap Toadstool (*Amanita phalloides*), LIX<sup>1)</sup>. – The Spatial Structure of Phallotoxins

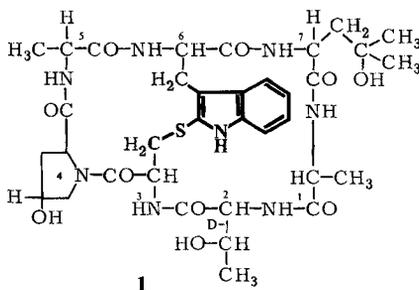
The thioether bridge [CH<sub>2</sub> – S – C(α-indole)] in the phallotoxin molecule is an inherently dissymmetric chromophore responsible for the positive Cotton effects centered around 290 nm in CD spectra. The helicity of this structural element, M- or P-, could not be recognized unambiguously by <sup>1</sup>H-NMR analysis previously performed. A less complex cyclic thioether peptide, 2-mercapto-L-tryptophylglycylcysteine cyclic (1 → 3) sulfide (**2a**) exhibits a CD spectrum showing the Cotton effects around 290 nm nearly exactly in a negative sense as mirror image of those of the phallotoxins (Figure 1). The structural analysis by 360 MHz <sup>1</sup>H-NMR suggested M-helicity of the chromophore. Unquestionable proof was obtained by X-ray structure analysis of the *N-p*-bromo-

Liebigs Ann. Chem. 1981

benzenesulfonyl derivative **2c** (which shows the same Cotton effects as **2a**) resulting in a M-helical thioether moiety of **2c** (and **2a**). Therefore to the phallotoxins with analogous but positive Cotton effects around 290 nm a P-helical thioether structure must be ascribed. The presence of an additional chiral centre in the peptide ring (**2b**: L-alanine instead of glycine in **2a**) does not influence the shape of the CD spectrum.

Die Phallotoxine bilden eine Klasse bicyclischer Heptapeptide, über deren Isolierung aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), deren Strukturaufklärung und Synthesen in dieser Zeitschrift von Anfang an berichtet wurde: 1937 Isolierung des kristallinen Phalloidins<sup>2)</sup>, 1955 Vorschlag seiner Strukturformel<sup>3)</sup>, 1962 Richtigstellung einer Aminosäuresequenz<sup>4)</sup>, 1971 erste Synthese eines giftigen Analogons<sup>5)</sup> und 1977 Totalsynthese des Phalloins<sup>6)</sup> (**1**). Neuere Überblicke sind in Lit.<sup>7,8)</sup> zu finden.

Phalloin (**1**) unterscheidet sich vom Phalloidin nur dadurch, daß es als Baustein 7 anstatt  $\gamma,\delta$ -Dihydroxy-L-leucin nur das einfach hydroxylierte  $\gamma$ -Hydroxy-L-leucin [Leu(OH)] enthält.



Mit den Daten einer eingehenden <sup>1</sup>H-NMR-Analyse und den Ergebnissen von Potential-Energie-Berechnungen ist für die Phallotoxine eine Raumformel aufgestellt worden<sup>9)</sup>. Die Anordnung der charakteristischen Thioetherbrücke zwischen dem Indolring und der  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Cysteins (in **1** fettgedruckt) ist in dieser Raumformel M-helical (siehe später). Die Indolthioethergruppierung ist ein inhärent dissymmetrischer Chromophor, der für die UV-Absorption um 290 nm und für die (positiven) Cotton-Effekte in dieser Region (siehe Abbildung 1) verantwortlich ist.

Die Projektion in Richtung der Indol-Schwefelbindung läßt 4 mögliche Stellungen der  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Cysteins unterscheiden (Abbildung 2). Besäße das Indolsystem mindestens *mm*2(C<sub>2v</sub>)-Symmetrie, wie das z. B. bei Phenylthioethern der Fall ist, könnten Stellung I und III bzw. II und IV in ihren chiroptischen Eigenschaften als identisch betrachtet werden. Im vorliegenden Fall, wo ebenfalls ein aromatisches  $\pi$ -Elektronensystem mit den freien Elektronenpaaren des Schwefels interferiert, müssen jedoch die Stellungen I und II (bei denen der Indol- $\beta$ -Kohlenstoff einbezogen ist) von III und IV (die den Indolstickstoff N1 enthalten) unterschieden werden. Die Helizität des Chromophors ist somit in Stellung I positiv (zu C), P<sub>C</sub>, in II minus, M<sub>C</sub>, in III P<sub>N</sub>, und in IV M<sub>N</sub>. In der Raumformel aus Lit.<sup>9)</sup> liegt M<sub>C</sub>-Helizität vor.

Vor einiger Zeit haben wir bei der Untersuchung von cyclischen Thioetherpeptiden<sup>10)</sup> beobachtet, daß 2-Mercapto-L-tryptophylglycyl-L-cystein-cyclosulfid (1 → 3) (**2a**) ein

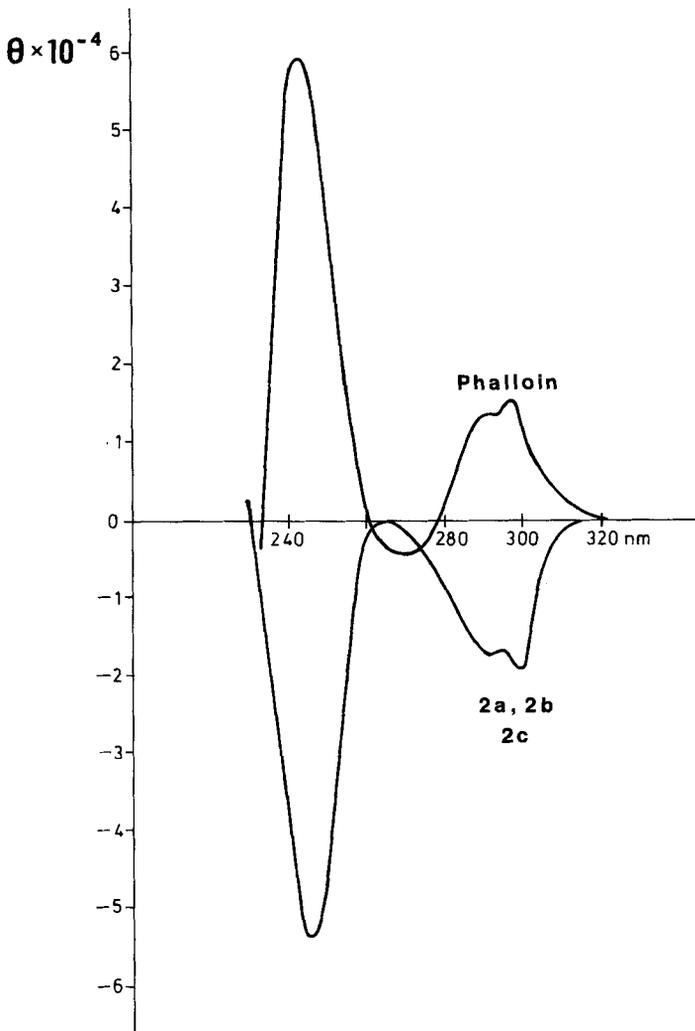


Abb. 1. CD-Spektren (in Methanol) des Phalloins (**1**) (identisch mit dem des Phalloidins) und der cyclischen Thioetherpeptide **2a**, **2b** und **2c**

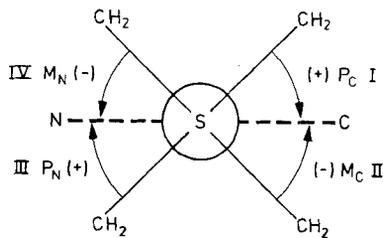
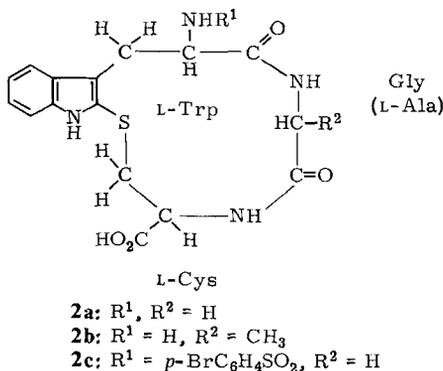


Abb. 2. Projektion der S-CH<sub>2</sub>-Bindung eines 2-Indolylthioethers in Richtung der S-( $\alpha$ -Indol)-Bindung läßt 4 mögliche Stellungen unterscheiden

CD-Spektrum aufweist, das recht genau spiegelbildlich zu dem der Phallotoxine verläuft, also negative Cottoneffekte enthält (Abbildung 1). Da für das Vorzeichen der Elliptizität die Helizität des inhärenten dissymmetrischen Chromophors verantwortlich ist, konnte eine unzweideutige räumliche Zuordnung dieses Strukturelements im Modellpeptid Aufklärung über die Konformation in den Phallotoxinen bringen.



### Ermittlung der Struktur in Lösung

Hierzu wurde das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **2a** in [D<sub>6</sub>]DMSO bei 360 MHz gemessen und eine Zuordnung sämtlicher Signale vorgenommen (Tabelle 1). Aus den so gewonnenen Daten wurden mögliche Torsionswinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  abgeleitet. Da die NMR-Messungen in der Regel für einen bestimmten Torsionswinkel mehrere Werte erlauben, wurde das wahrscheinlichste Modell an Hand von Potential-Energie-Berechnungen ausgewählt. In diesem trat die Thioetherbrücke in M<sub>N</sub>-Helizität in Erscheinung, ein Molekül mit P<sub>N</sub>-Helizität ließ sich unter Benutzung der vorliegenden Daten nur mit Mühe herstellen.

Tab. 1. Chemische Verschiebung ( $\delta$ -Werte) und Kopplungskonstanten  $J$ [Hz] aller relevanten Protonen von **2a** und **2c** in [D<sub>6</sub>]DMSO (Referenz: TMS). A = Tryptophan-, B = Glycin- und C = Cysteinprotonen

		CH <sub><math>\alpha</math></sub>	CH <sub><math>\beta'</math></sub>	CH <sub><math>\beta''</math></sub>	NH	$J_{CH_{\alpha},NH}$	$J_{CH_{\alpha},CH_{\beta'}}$	$J_{CH_{\alpha},CH_{\beta''}}$	$J_{CH_{\beta'},CH_{\beta''}}$
<b>2a</b>	A	3.949	3.549	2.969	—	—	11.7	3.6	11.4
<b>2c</b>	A	3.906	3.323	2.571	8.452	7.4	11.8	2.6	14.2
<b>2a</b>	B	3.733	—	—	9.553	$\approx 3.0$	14.7 <sup>a)</sup>	—	—
		3.403				5.0			
<b>2c</b>	B	3.758			8.368	5.8	14.7 <sup>a)</sup>		
		2.940				5.8			
<b>2a</b>	C	4.432	3.805	2.778	7.872	7.7	2.7	4.0	12.8
<b>2c</b>	C	4.667	3.571	3.031	7.746	8.1	3.2	4.7	14.2

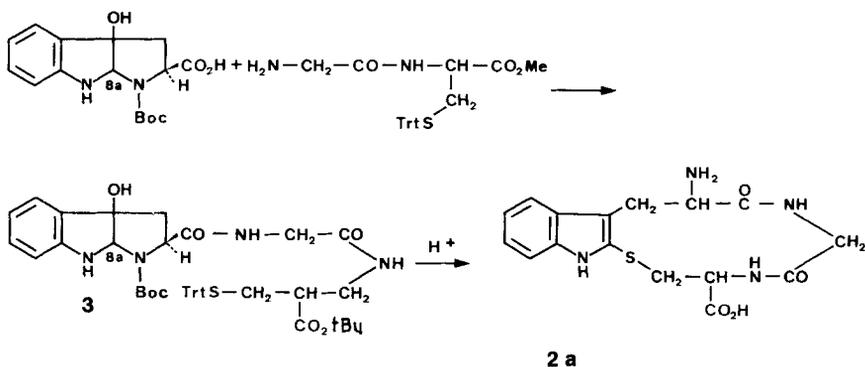
a)  $J_{\alpha',\alpha''}$ .

In Tabelle 2 werden die auf diese Weise erhaltenen Torsionswinkel mit den röntgenographisch am Kristall von **2c** ermittelten Werte verglichen. Auch eine Betrachtung des räumlichen Ablaufs der Synthese von **2a** machte das Auftreten einer M<sub>N</sub>-helikalen Thioetherbrücke plausibel.

Tab. 2. Vergleich der aus  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen und Potential-Energie-Berechnungen für **2a** ableitbaren Torsionswinkel des Zwölfrings an den Bindungen mit „freier“ Drehbarkeit mit den röntgenographisch bei **2c** bestimmten Werten

	Torsionswinkel [°]	<b>2a</b>	<b>2c</b>
	C1 – C2 – C16 – C15	–120	–112
$\chi_{\text{Trp}}$	C2 – C16 – C15 – N4	180	–165
$\Psi_{\text{Trp}}$	N4 – C15 – C14 – N3	–150	139
$\Phi_{\text{Gly}}$	C14 – N3 – C13 – C12	–170	–84
$\Psi_{\text{Gly}}$	N3 – C13 – C12 – N2	60	64
$\Phi_{\text{Cys}}$	C12 – N2 – C10 – C11	–150	–155
$\chi_{\text{Cys}}^1$	N2 – C10 – C9 – S1	60	59
$\chi_{\text{Cys}}^2$	C10 – C9 – S1 – C1	–120	–107
	C9 – S1 – C1 – N1	–60	–51

Schema 1.



Die Synthese von **2a** war durch intramolekulare Thioethersynthese in einer *Savigne-Fontana-Reaktion*<sup>11)</sup> des Peptids Hpi-Glycyl-(*S*-trityl)-*L*-cystein-*tert*-butylester (**3**) erfolgt (Hpi = *L*-3a-Hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-2-carboxyl). In Gegenwart von Trifluoressigsäure wurden der Tritylrest, der *tert*-Butylrest und der Boc-Rest abgespalten und der Pyrrolidinring unter Thioetherbildung geöffnet. Da im Hpi-Rest die Peptidkette auf einer Seite der Ringebene liegt, ist – wie an Hand von Modellbetrachtungen gezeigt werden kann – der Angriff der Thiolgruppe des Cysteins auf die Verknüpfungsstelle der beiden heterocyclischen Ringe von dieser Seite her zu erwarten. Das führt bei der *S*-Konfiguration von Hpi zu einem  $M_N$ -helikalen Thioether.

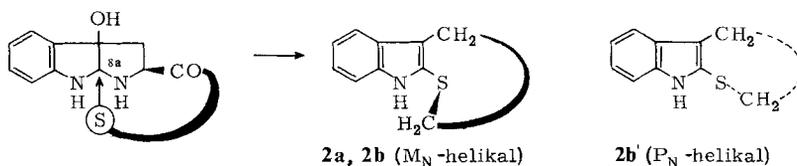
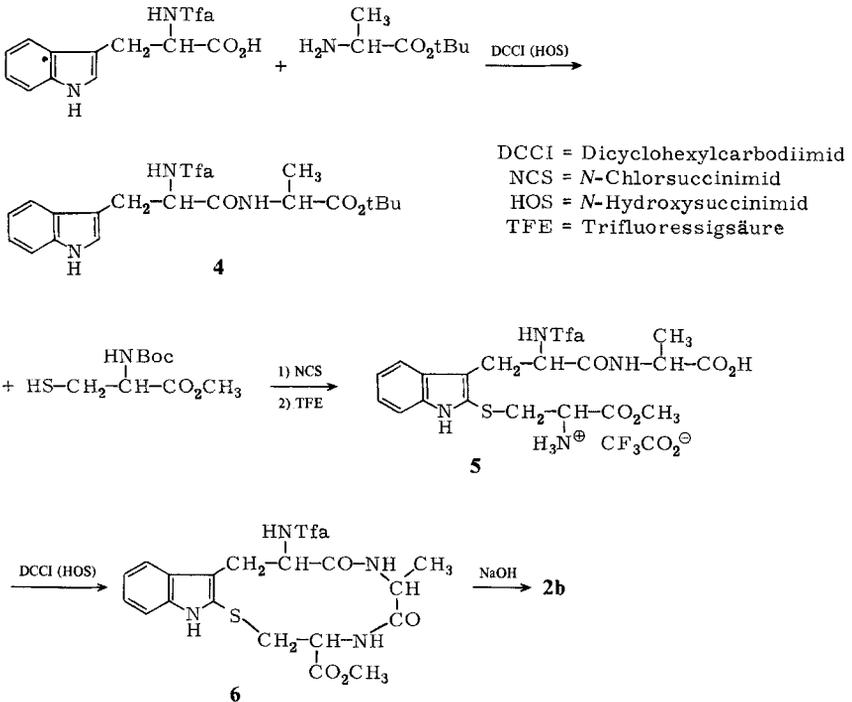


Abb. 3. Intramolekularer Angriff der Thiolgruppe auf Position 8a des (*S*)-Hpi-Peptids läßt die Bildung eines  $M_N$ -helikalen Thioethers voraussehen

Vor der Strukturaufklärung des Peptids **2a** durch Röntgenstrukturanalyse prüften wir, ob ein zusätzliches chirales Zentrum einen Einfluß auf das CD-Spektrum hat. Hierzu wurde ein zu **2a** analoges cyclisches Tripeptid **2b** hergestellt, das anstelle von Glycin-L-Alanin als Baustein enthält. Das CD-Spektrum der auf analogem Weg erhaltenen Verbindung stimmte mit dem von **2a** weitgehend überein. Ein weiterer Versuch hatte zum Ziel, das mit Modellbausteinen durchaus auch konstruierbare Konformere **2b'** zu erhalten, das einen P<sub>N</sub>-helikalen Thioetheranteil aufweist. Dieses Isomere sollte sich neben dem beschriebenen Produkt **2b** bilden, wenn die Cyclisierungsreaktion nicht stereoselektiv verläuft, sondern die Ausbildung beider Thioetherhelizitäten zuläßt. Dies ist z. B. bei dem Reaktionsweg der Fall, bei dem die Thioethergruppe nach der älteren Methode (Reaktion eines Sulfenylchlorids mit dem Indolteil<sup>12)</sup> aufgebaut wird und die Cyclisierung durch eine Peptidverknüpfung erfolgt. Wir haben so *N*-Trifluoracetyl-L-tryptophan mit *L*-Alanin-*tert*-butylester zum Dipeptidester **4** gekuppelt und daran mit *N*-Boc-L-Cystein-methylester über das *S*-Chlorid die Synthese zum Thioether **5** ausgeführt. Aus dem Ansatz der abschließenden Cyclisierung ließ sich mit über 60% Ausbeute nur ein Trifluoracetylcysteinylester (**6**) erhalten, der nach alkalischer Behandlung das oben beschriebene Tripeptid mit *negativen* Cottonwirkungen (Verbindung **2b**) ergab. Von den beiden helikalen Konformeren entsteht offenbar nur das M<sub>N</sub>-helikale. Es läßt sich durch Modellbetrachtung zeigen, daß im P<sub>N</sub>-Konformeren **2b'** die Ammoniumgruppe des Tryptophans zu nahe am Indolring stehen würde.

Schema 2.



## Röntgenstrukturanalyse

Die Struktur von **2a** sollte durch die Röntgenstrukturanalyse eines geeigneten Derivats eindeutig bestimmt werden. Als ein solches stellte sich die *N-p*-Brombenzolsulfonylverbindung **2c** heraus, die aus Methanol nach Zusatz von Aceton in farblosen Kristallen erhalten wurde. Diese bestehen aus einem 1:1-Addukt, in dem Aceton äußerst fest mit dem Peptid verbunden ist. Selbst mehrstündiges Erhitzen auf 80 °C im Hochvakuum vermag das gebundene Aceton nicht auszutreiben. Die Brosylverbindung **2c** zeigt wie **2a** negative Cottoneffekte im CD-Spektrum, muß also dieselbe helikale Konformation haben. Auch die in Tabelle 1 aufgeführten <sup>1</sup>H-NMR-Daten lassen eine enge konformative Verwandtschaft von **2c** mit **2a** erkennen. Die Verbindung **2c** kristallisiert mit einem Molekül Aceton pro Peptid in der orthorhombischen, azentrischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit 4 Formeleinheiten pro Elementarzelle (eine Formeleinheit pro asymmetrischer Einheit). Von einem Kristall mit Kantenlängen von  $0.3 \times 0.3 \times 0.45$  mm wurden – wie im experimentellen Teil näher ausgeführt – mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung (Graphitmonochromator) im Bereich  $0^\circ < 2\Theta \leq 115^\circ$  die Intensitäten von 1941 unabhängigen Reflexen gemessen<sup>\*)</sup>. Die Struktur von **2c** wurde unter Verwendung des SHELXTL-Programmsystems<sup>13)</sup> mit einem ECLIPSE-S/200-Rechner gelöst und ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

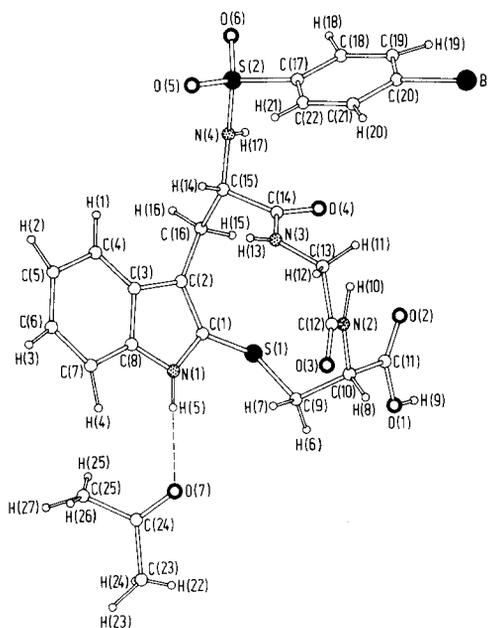


Abb. 4. Molekülstruktur von **2c** mit Atombezeichnungen

\*) Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Energie Physik Mathematik, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD 50107 des Autors und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

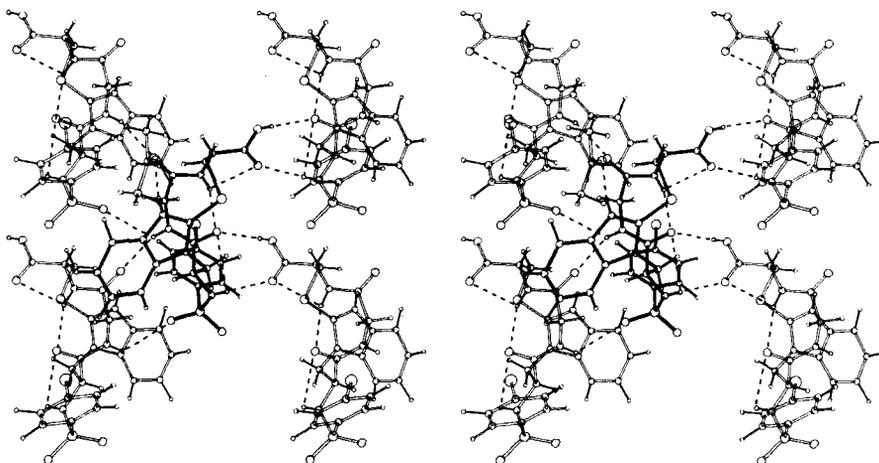


Abb. 5. Stereoskopische Darstellung der inner- und zwischenmolekularen Wasserstoffbrücken in der Kristallstruktur von **2c**

Das cyclische Tripeptid ist nicht kovalent an das Acetonmolekül gebunden, sondern über eine starke Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Gruppe des Indols und dem Carbonylsauerstoff des Acetons.

Der N...O-Abstand beträgt 2.95 Å. Die durch Nichtwasserstoffatome definierten Bindungsabstände und -winkel von **2c** sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3. Bindungsabstände und Bindungswinkel der Nichtwasserstoffatome in **2c**. In Klammern die Standardabweichungen in Einheiten der letzten Stelle

a) Bindungsabstände (Å)											
C1-C2	1.40 (2)	C10-C11	1.51 (2)	C17-C22	1.35 (2)	C6-C7-C8	115 (2)	C18-C17-S2	118 (1)		
C1-N1	1.37 (2)	C10-N2	1.43 (2)	C17-S2	1.78 (1)	C3-C8-C7	122 (2)	C22-C17-S2	120 (1)		
C1-S1	1.74 (1)	C11-O1	1.31 (2)	C18-C19	1.40 (2)	C3-C8-N1	108 (1)	C17-C18-C19	117 (2)		
C2-C3	1.45 (2)	C11-O2	1.22 (2)	C19-C20	1.38 (3)	C7-C8-N1	129 (2)	C18-C19-C20	119 (2)		
C2-C16	1.48 (2)	C12-C13	1.54 (2)	C20-C21	1.38 (3)	C10-C9-S1	113 (1)	C19-C20-C21	123 (1)		
C3-C4	1.37 (2)	C12-N2	1.35 (2)	C20-Br	1.90 (1)	C9-C10-C11	113 (1)	C19-C20-Br	118 (1)		
C3-C8	1.40 (2)	C12-O3	1.21 (2)	C21-C22	1.38 (2)	C9-C10-N2	113 (1)	C21-C20-Br	118 (1)		
C4-C5	1.39 (3)	C13-N3	1.44 (2)	C23-C24	1.49 (4)	C11-C10-N2	107 (1)	C20-C21-C22	117 (2)		
C5-C6	1.37 (3)	C14-C15	1.52 (2)	C24-C25	1.43 (4)	C10-C11-O1	112 (1)	C21-C22-C17	121 (2)		
C6-C7	1.40 (3)	C14-N3	1.33 (2)	C24-O7	1.21 (2)	C10-C11-O2	123 (1)	C23-C24-C25	119 (2)		
C7-C8	1.40 (2)	C14-O4	1.24 (2)	S2-N4	1.61 (1)	O1-C11-O2	125 (1)	C23-C24-O7	122 (2)		
C8-N1	1.37 (2)	C15-C16	1.55 (2)	S2-O5	1.44 (1)	C13-C12-N2	114 (1)	C25-C24-O7	119 (2)		
C9-S1	1.83 (2)	C15-N4	1.48 (2)	S2-O6	1.43 (1)	C13-C12-O3	123 (1)	C1-N1-C8	109 (1)		
C9-C10	1.51 (2)	C17-C18	1.39 (2)			N2-C12-O3	124 (1)	C10-N2-C12	122 (1)		
						C12-C13-N3	112 (1)	C13-N3-C14	123 (1)		
						C15-C14-N3	116 (1)	C15-N4-S2	123 (1)		
						C15-C14-O4	122 (1)	C1-S1-C9	103 (1)		
						N3-C14-O4	122 (1)	C17-S2-N4	109 (1)		
						C14-C15-C16	108 (1)	C17-S2-O5	107 (1)		
						C14-C15-N4	113 (1)	C17-S2-O6	108 (1)		
						C16-C15-N4	108 (1)	N4-S2-O5	107 (1)		
						C2-C16-C15	113 (1)	N4-S2-O6	105 (1)		
						C18-C17-C22	122 (1)	O5-S2-O6	121 (1)		
b) Bindungswinkel (°)											
C2-C1-N1	110 (1)	C2-C3-C4	133 (1)								
C2-C1-S1	127 (1)	C2-C3-C8	107 (1)								
N1-C1-S1	122 (1)	C4-C3-C8	120 (1)								
C1-C2-C3	105 (1)	C3-C4-C5	119 (2)								
C1-C2-C16	129 (1)	C4-C5-C6	120 (2)								
C3-C2-C16	126 (1)	C5-C6-C7	123 (2)								

Im Pyrrolring des Indolgerüsts ist die der NH-Gruppe gegenüberliegende C-C-Bindung (C2-C3) mit einer Länge von 1.45 Å deutlich länger als die beiden Nachbar-

bindungen im Fünfring mit einer Länge von 1.40 Å. Die vom Schwefelatom des Cysteinrestes ausgehenden formalen C–S-Einfachbindungen sind unterschiedlich lang (1.74 und 1.83 Å), wobei die kürzere Bindung vom aromatischen Indolring ausgeht und einen geringen Doppelbindungsanteil besitzt. Die benachbarten Substituenten an C1 und C2 am Indolring, die Bestandteil des mit diesem kondensierten zwölfgliedrigen Ringes sind, tordieren aufgrund sterischer Wechselwirkungen um die C1–C2-Bindung. Die Torsionswinkel an dieser Bindung, die durch Substituentenatome definiert sind, weisen merkbare Abweichungen von den Idealwerten 0° und 180° auf (Tabelle 4). Daher liegen C16 und S1 nicht mehr in der Ebene des Indolrings, sondern weichen in entgegengesetzter Richtung von dieser ab. Die nicht durch diese Substituenten definierten Torsionswinkel am Indolring zeigen Abweichungen von maximal 4° von den Idealwerten, die zum Teil, auch wenn sie im Bereich der Fehlergrenzen liegen, auf eine leichte Deformation des Indolrings selbst hindeuten und eine Folge der gegenseitigen Torsion der Substituenten sind.

Tab. 4. Ausgewählte Torsionswinkel [°] von 2c

a) zwölfgliedriger Ring	b) Indolring
S1 -C1 -C2 -C16 -11 (2)	N1 -C1 -C2 -C3 -1 (1)
C1 -C2 -C16-C15 -112 (2)	N1 -C1 -C2 -C16 177 (1)
C2 -C16-C15-C14 72 (1)	S1 -C1 -C2 -C3 171 (1)
C16-C15-C14-N3 -101 (1)	C1 -C2 -C3 -C8 1 (1)
C15-C14-N3 -C13 177 (1)	C1 -C2 -C3 -C4 -176 (2)
C14-N3 -C13-C12 -84 (2)	C16-C2 -C3 -C4 5 (2)
N3 -C13-C12-N2 64 (2)	C16-C2 -C3 -C8 -177 (1)
C13-C12-N2 -C10 -176 (1)	C2 -C3 -C8 -N1 -1 (1)
C12-N2 -C10-C9 80 (2)	C4 -C3 -C8 -C7 -2 (2)
N2 -C10-C9 -S1 59 (1)	C2 -C3 -C8 -C7 180 (1)
C10-C9 -S1 -C1 -107 (1)	N1 -C3 -C8 -C4 -177 (1)
C9 -S1 -C1 -C2 137 (1)	C3 -C8 -N1 -C1 0 (2)
<u>cl. sonstige</u>	C7 -C8 -N1 -C1 179 (1)
N1 -C1 -S1 -C9 -51 (1)	C8 -N1 -C1 -C2 1 (2)
C3 -C2 -C16-C15 66 (2)	C8 -N1 -C1 -S1 -172 (1)
N2 -C10-C11-O2 -7 (2)	C5 -C3 -C4 -C8 0 (2)
N2 -C10-C11-O1 178 (1)	C5 -C3 -C4 -C2 -178 (1)
C9 -C10 -C11-O1 -57 (2)	C3 -C4 -C5 -C6 1 (2)
C9 -C10-C11-O2 119 (2)	C4 -C5 -C6 -C7 0 (3)
C16-C15-N4 -S2 162 (1)	C5 -C6 -C7 -C8 -2 (3)
C14-C15-N4 -S2 -79 (1)	C6 -C7 -C8 -C3 3 (2)
C15-N4 -S2 -O6 -175 (1)	C6 -C7 -C8 -N1 -177 (2)
C15-N4 -S2 -O7 78 (1)	
C15-N4 -S2 -C17 70 (1)	
N4 -S2 -C17-C18 88 (1)	
N4 -S2 -C17-C22 -91 (1)	

Die Konformation des mit dem Pyrrolring kondensierten zwölfgliedrigen Ringes, der die beiden Peptidbindungen des Tripeptids enthält, wird durch die in Tabelle 4 zusammengestellten Torsionswinkel beschrieben. Die beiden Peptidbindungen sind *trans*-konfiguriert. Der Zwölfring enthält drei Bindungen, deren Konformation durch den Bindungszustand vorgegeben ist. Dies sind *anti*-periplanare Konformationen an den Peptidbindungen und eine *syn*-periplanare an der mit dem Indolring gemeinsamen Bindung C1–C2. Bezüglich der Konformationen an den verbleibenden neun Bindungen mit „freier“ Drehbarkeit ist erwähnenswert, daß hier ausschließlich synklinale und antiklinale partielle Konformationen auftreten.

Das im Hinblick auf die Konformation der Phallotoxine besonders interessierende chirale Strukturelement N1–C1–S1–C9 (Torsionswinkel –51°) hat M<sub>N</sub>-Helizität

(IV, Abbildung 2). Die im Bereich seiner UV-Absorption (um 290 und 240 nm) liegenden Cottoneffekte erhalten dadurch ihren negativen Sinn. Die Konformation des 12gliedrigen, die 2 Peptidbindungen enthaltenden Ringes ist links helikal.

Die Konformation des Zwölfringes wird sowohl durch inner- wie zwischenmolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert. Alle in der Struktur vorkommenden NH- und OH-Gruppen wirken in H-Brücken als Protonendonatoren und alle Carbonylgruppen und ein Sauerstoffatom der SO<sub>2</sub>-Gruppe als Akzeptoren. Die Geometrien der H-Brücken sind in Tabelle 5 zusammengestellt und in Abbildung 5 verdeutlicht. Die Peptid-NH-Gruppe (N2-H10) des Cysteins bildet innermolekular eine gegabelte Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe des Tryptophans (C14-O4) und zum Carbonylsauerstoff (O2) der Carbonylgruppe des vom Cystein gebildeten C-Terminus. Hierbei wird ein Sieben- und ein Fünfring geschlossen. Durch diese H-Brücken wird der Zwölfring gewissermaßen durch eine H-Brückenverstrebung auf der dem Tryptophanrest abgewandten Seite stabilisiert. Außerdem besteht eine schwache H-Brücke zwischen dem Carbonylsauerstoff (O4) des Tryptophans und der NH-Gruppe des vom Tryptophan gebildeten N-Terminus. – Eine schwache H-Wechselwirkung kann man auch zwischen dem Carbonylsauerstoff der freien Carboxylgruppe und ihrer OH-Gruppe annehmen [(O1-)H9...O2: 2.3(2) Å]. Zwischenmolekular ist jedes Tripeptid mit weiteren vier benachbarten Tripeptiden über jeweils zwei H-Brücken und mit dem Kristallaceton über eine H-Brücke verbunden. Wie Tabelle 5 zeigt, werden zwischenmolekular 5 kristallographisch unabhängige H-Brücken gebildet, nämlich drei starke N-H...O-Brücken und eine starke O-H...O-Brücke, während im Vergleich hierzu die N-H...O-Brücke zu einem Sauerstoff der SO<sub>2</sub>-Gruppe schwach ist.

Tab. 5. Abstände [Å] und Winkel [°] von inner- und zwischenmolekularen Wasserstoffbrücken in 2c. In Klammern die Standardabweichungen in Einheiten der letzten Stelle

Abstände		Winkel	
<i>a) innermolekular</i>			
(N2-)H10...O2	2.5 (1)	N2-H10...O2	89 (9)
		H10...O2-C11	86 (3)
(N2-)H10...O4	2.1 (1)	N2-H10...O4	149 (12)
		H10...O4-C14	98 (4)
(N4-)H17...O4	2.8 (1)	N4-H17...O4	92 (11)
		H17...O4-C14	73 (2)
<i>b) zwischenmolekular</i>			
(O1-)H9...O4 (x + 0.5, -y + 1.5, -z)	2.0 (2)	O1-H9...O4	168 (19)
O1...O4	2.69 (2)	H9...O4-C14	143 (6)
(N4-)H17...O2 (x - 0.5, -y + 1.5, -z)	2.2 (1)	N4-H17...O2	165 (12)
N4...O2	2.88 (2)	H17...O2-C11	120 (3)
(N3-)H13...O3 (x - 0.5, -y + 2.5, -z)	2.2 (1)	N3-H13...O3	147 (10)
N3...O3	2.94 (1)	H13...O3-C12	152 (3)
(N1-)H5...O7 (-x + 0.5, -y + 2, z + 0.5)	2.1 (1)	N1-H5...O7	171 (14)
N1...O7	2.95 (2)	H5...O7-C24	126 (4)
(N3-)H13...O5 (x + 0.5, -y + 2.5, -z)	2.6 (1)	N3-H13...O5	125 (10)
N3...O5	3.17 (2)	H13...O5-S2	165 (3)

In Tabelle 2 wird die aus  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen und den Potential-Energie-Berechnungen für **2a** abgeleitete Konformation des Zwölfringes mit der röntgenographisch für **2c** bestimmten verglichen. Während die übrigen Konformationswinkel eine gute Übereinstimmung aufweisen, tritt eine sehr deutliche Differenz bei den Torsionswinkeln  $\text{N4-C15-C14-N3}$  und  $\text{C14-N3-C13-C12}$  auf. Bei den stark unterschiedlichen Torsionswinkeln handelt es sich um Torsionen um benachbarte Bindungen mit „freier“ Drehbarkeit, die eine Peptidbindung einschließen. Durch diese Torsionswinkeländerung wird die zwischen diesen beiden Bindungen eingespannte  $\text{C(O)-N(H)}$ -Gruppe der Peptidbindung zwischen Tryptophan und Glycin verdreht, wobei aber ihr C- und N-Atom im Ring ihre Lage nur relativ geringfügig ändern und gleichfalls die restliche Ringkonformation nicht stark beeinflusst wird. Die Annahme einer im angesprochenen Bereich unterschiedlichen Konformation für **2a** in Lösung und **2c** im kristallinen Zustand wird gestützt durch  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen. Während die Kopplungskonstanten für  $^3J_{\text{CH,NH(Gly)}}$  3.0 und 5.0 Hz bei **2a** betragen, findet man bei **2c**  $J$ -Werte von 5.8 und 5.8 Hz (Tabelle 1). Diese Messungen sind im Einklang mit einem Torsionswinkel  $\text{C14-N3-C13-C12}$  von  $-170^\circ$  für **2a** und  $-84^\circ$  für **2c**. Hieraus ergibt sich zwangsläufig bei **2a** ein  $\text{N4-C15-C14-N3}$ -Torsionswinkel von ca.  $-150^\circ$  und für **2b** ein solcher von ca.  $140^\circ$ , wenn bis auf die beiden angesprochenen Torsionswinkel die übrigen bei **2a** und **2c** annähernd gleich sind. – Anhand der  $^1\text{H-NMR}$ -Daten kann nicht zwischen  $\text{N4-C15-C14-N3} = -150^\circ$  (**2a**) und  $139^\circ$  (**2c**) unterschieden werden.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen erlauben daher den Schluß, daß die Konformationen von **2c** im kristallinen und gelösten Zustand sehr ähnlich sind, während im angesprochenen Ringfragment Konformationsunterschiede zu **2a** in Lösung bestehen. Diese Annahme findet auch eine Stütze durch  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzmessungen. In einem 360-MHz-Kernresonanzspektrum in DMSO-Lösung findet man für die Carbonylkohlenstoffe C14, C12 und C11 Resonanzen bei  $\delta = 173.16, 172.19$  und  $168.55$  für **2a** und solche bei  $171.41, 170.87$  und  $168.69$  für **2c**. Das jeweils bei höchstem Feld liegende Signal könnte dem Kohlenstoff der Carbonylgruppe zugeordnet werden, die beiden Signale bei niedrigem Feld den  $\text{C(O)}$ -Kohlenstoffen C12 und C14. Diese beiden Signale sind bei **2c** im

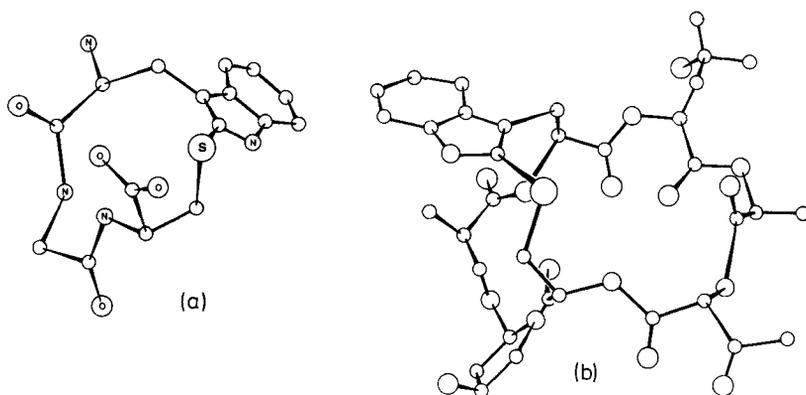


Abb. 6. Räumliche Strukturen (a) des cyclischen Thioetherpeptids **2a** ( $\text{M}_\text{N}$ -helikal) und (b) des Phalloins ( $\text{P}_\text{N}$ -helikal)

Mittel um 1.5 ppm zu höherem Feld verschoben. Da die Carbonylkohlenstoffe C12 und C14 bei **2a** in einer *trans*- und bei **2c** näherungsweise in einer *gauche*-Anordnung zueinander stehen, sollten die Resonanzsignale dieser Kohlenstoffatome, wie auch gefunden wurde, bei **2c** zu höherem Feld verschoben sein<sup>14,15</sup>.

Wie eine Modellbetrachtung und auch Potential-Energie-Berechnungen zeigen, ist die Konformation **2c** sterisch günstiger als **2a**.

Wie oben erwähnt, zeigen alle Phallotoxine sehr ähnliche CD-Spektren, die, verglichen mit den cyclischen Modell-Thioetherpeptiden **2a** – **c**, einen weitgehend spiegelbildlichen Verlauf aufweisen. Dies läßt den Schluß zu, daß sie bezüglich der Helizität ihres Thioetheranteils und der Konformation des vom Tryptophan ausgehenden Peptidrings spiegelbildliche, nämlich P<sub>N</sub>-Helizität, besitzen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der durch die Analyse von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren abgeleiteten Raumformel für die Phallotoxine<sup>9</sup>), die eine M<sub>C</sub>-Helizität vorschlug.

## Experimenteller Teil

Zur Reinheitskontrolle der Substanzen diente die Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel-60-F-254-Platten (Merck). Das jeweilige Laufmittel ist beim Präparat angegeben. Die Sichtbarmachung erfolgte entweder durch Betrachten im UV-Licht, durch das Chlorreagenz, mit Ninhydrin oder Zimtaldehyd/HCl-Gas. Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Merck) verwendet.

Die CD-Spektren wurden an einem Diograph (Modell CD 185, Roussel-Jouan, Paris) gemessen. – Die NMR-Analysen wurden bei 360 MHz mit Hilfe eines HX-360-Fourier-Transformerspektrometers der Firma Bruker durchgeführt. Die Speicherkapazität von 16 K ergab bei einer Spektrenbreite von 4 kHz eine digitale Auflösung von 0.5 Hz. Die Lorentz-Gauss-Transformation wurde zur Auflösungsverbesserung angewendet. Die Lösungen in [D<sub>6</sub>]DMSO wurden bei 293 K gemessen.

**Abkürzungen:** iBCCl = Isobutylcarbonylchlorid, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DCCl = Dicyclohexylcarbodiimid, Ddz =  $\alpha, \alpha$ -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzoyloxycarbonyl, Hpi = L-3-*a*-Hydroxy-1,2,3,3*a*,8,8*a*-hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-2-carboxyl, MA = Mischanhydrid(methode), NMM = *N*-Methylmorpholin, Tfa = Trifluoracetyl, Trt = Trityl.

***N*-Boc-L-Cystein-methylester:** Eine Lösung von 3.43 g (20.0 mmol) L-Cystein-methylester-hydrochlorid in (30 ml Dioxan + 15 ml Wasser) wird unter Durchperlen von N<sub>2</sub> oder Ar mit 2.78 ml (20.0 mmol) Triethylamin versetzt. Dann werden 4.8 g (22 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben; es wird ca. 12 h bei 8 °C gerührt und i. Vak. eingeeengt. Die Lösung des Rückstands in 50 ml Wasser wird bei 0 °C mit 0.5 N KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 2.5 gebracht und 2mal mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Man erhält 3.8 g (80%) eines farblosen Öls, das bei der DC einheitlich mit R<sub>F</sub> = 0.9 in 1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) wandert.

**2-Mercapto-L-tryptophylglycyl-L-cystein-cyclosulfid (1 → 3) (2a):** Die Verbindung wird nach der in Lit.<sup>10</sup>) beschriebenen Methode über Verbindung **3** hergestellt.

***N*-Brosyl-2a:** Zur Lösung von 452 mg (0.78 mmol) **2a** in 25 ml 0.1 N Natronlauge gibt man unter Rühren die Lösung von 350 mg (1.1 Äquivalente) *p*-Brombenzolsulfonylchlorid in 7.5 ml Aceton. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 0.1 N Natronlauge bei 8–9 gehalten. Nach 10 min bringt man durch Zugabe einiger Tropfen 0.1 N Natronlauge alles bis auf einen geringen Niederschlag in Lösung, der abfiltriert wird. Die Lösung wird 2mal mit Essigester extrahiert, dann mit

Schwefelsäure auf pH 2 gebracht und die z. T. ausfallende Brosylverbindung in Essigester aufgenommen. Der Abdampfrückstand der getrockneten Lösung ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) wird aus wenig 80proz. Ethanol umkristallisiert: 265 mg vom Schmp. 258–260°C (Zers.). Durch vorsichtige Zugabe von Wasser zur Mutterlauge erhält man weitere 170 mg reine Substanz, so daß die Gesamtausbeute 435 mg (60%) beträgt.  $R_F = 0.74$  [1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)].

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrN}_4\text{O}_6\text{S}_2$  (581.5) Ber. C 45.44 H 3.64 N 9.64 Gef. C 44.96 H 4.02 N 9.14

Die zur Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle des Acetonaddukts erhält man auf folgende Weise: 100 mg Brosyl-2a werden unter Erwärmen bis zum Siedepunkt in 2–3 ml Methanol gelöst. Zur heißen Lösung fügt man auf einmal 2 ml Aceton und läßt im Verlauf von 10–20 h erkalten. Die in fast quantitativer Ausbeute ausgeschiedenen Kristalle enthalten auch nach Trocknen bei 80°C i. Vak. 1 mol Aceton.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BrN}_4\text{O}_7\text{S}_2$  (639.4) Ber. C 46.96 H 4.26 N 8.71 Gef. C 47.11 H 4.29 N 8.42

### 2-Mercapto-L-tryptophyl-L-alanyl-L-cystein-cyclosulfid (1 → 3) (2b)

#### a) Durch Savige-Fontana-Reaktion (analog Schema 1)

*Ddz-L-Alanyl-(S-Trt)-L-cystein-methylester*: Zur Lösung von 2.9 g (9.3 mmol) Ddz-L-Alanin in 30 ml Dichlormethan gibt man unter Rühren bei  $-10^\circ\text{C}$  0.57 g (9.30 mmol) iBCCl und 1.13 g (11.2 mmol) NMM. Nach 10 min wird die Lösung von 5.65 g (15.0 mmol) S-Trt-L-Cystein-methylester in 50 ml Dichlormethan zugegeben und der Ansatz 2 h bei Raumtemp. weitergerührt. Dann wird mit 0.5 M  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, 10proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in Ether an 240 g Kieselgel (Säule: 3.0 × 70 cm) chromatographiert. Die 20-ml-Fractionen 16–25 enthalten 2.85 g (45%) öliges Peptid.  $R_F = 0.8$  (Ether),  $[\alpha]_D = +87.2$  ( $c = 3.1$  in  $\text{CHCl}_3$ ).

*Boc-Hpi-L-Alanyl-(S-Trt)-L-cystein-methylester*: Zur Lösung von 1.34 g (4.18 mmol) BocHpi<sup>10</sup> in 25 ml THF gibt man unter Rühren bei  $-10^\circ\text{C}$  0.57 g (4.18 mmol) iBCCl und 0.51 g (5.00 mmol) NMM. Zu dieser MA-Lösung gibt man nach 10 min die Lösung der Aminkomponente, die folgendermaßen hergestellt wird: Die Lösung von 2.8 g (4.18 mmol) des oben genannten Ddz-Dipeptidesters in 130 ml Dichlormethan wird nach Zusatz von 3.2 ml absol. Trifluoressigsäure bei Raumtemp. stehengelassen und nach 30 min mit 4.6 ml NMM neutralisiert. Nach Vermischen mit der kalten MA-Lösung rührt man 2 h bei Raumtemp., dampft i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf, wäscht die Lösung mit 1 M HCl, 10proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser, trocknet mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und verdampft das Lösungsmittel. Der Rückstand wird in Ether/Essigester (8:2) an 150 g Kieselgel (Säule 3 × 30 cm) chromatographiert. Die 20-ml-Fractionen 10–25 enthalten 2.8 g (89%) einheitlichen Tripeptidester mit  $R_F = 0.65$  [Ether/Essigester (85:15)].

*Boc-Hpi-L-Alanyl-(S-Trt)-L-cystein*: Eine Lösung von 2.8 g (3.73 mmol) des oben genannten Methylesters in 110 ml Dioxan und 37 ml 0.2 M NaOH wird nach 1 h durch Vakuumdestillation vom Dioxan befreit. Die alkalische, wäßrige Lösung wird mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser ausgeschüttelt, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man erhält 2.05 g (75%) Tripeptid mit  $R_F = 0.8$  [Essigester/Eisessig (95:5)].

*Cyclisierung*: Eine Lösung von 2.0 g des oben genannten Boc-Tripeptids in 100 ml absol. Trifluoressigsäure bleibt 2 h bei Raumtemp. stehen. Dann wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand zur Entfernung der Säure mehrmals mit Ether digeriert und mit 0.004 M Ammoniaklösung an Sephadex LH-20 (Säule: 2 × 150 cm) chromatographiert. Die 10-ml-Fractionen 50–62 werden i. Vak. eingedampft, zum Ende gefriergetrocknet. Man erhält 0.46 g (24%) farbloses, lockeres Pulver mit  $R_F = 0.36$  [1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)].  $E_{293,4} = 10605$ ;  $[\alpha]_D = -118$  ( $c = 0.6$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ). Das CD-Spektrum ist nicht von dem des cyclischen Thioethers 2a (Abbildung 1) zu unterscheiden.

*b) Durch Thioethersynthese via Sulfonylchlorid (Schema 2)*

*Tfa-L-Tryptophyl-L-alanin-tert-butylester (4)*: In 30 ml THF werden 300 mg (3.00 mmol) *N*-Tfa-L-Tryptophan, 435 mg (3.00 mmol) *L*-Alanin-*tert*-butylester und 600 mg (6.00 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid gelöst. Nach Abkühlen auf  $-25^{\circ}\text{C}$  tropft man innerhalb von 10 min eine Lösung von 740 mg (3.60 mmol) DCCI in 5 ml THF zu, rührt 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und läßt ca. 12 h bei Raumtemp. stehen. Dann wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, i. Vak. abgedampft und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Lösung wird mit kalter 0.5 M  $\text{KHSO}_4^-$ , gesättigter NaCl-, 10proz.  $\text{NaHCO}_3^-$  sowie NaCl-Lösung gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol an Sephadex LH-20 (Säule:  $3 \times 250$  cm) chromatographiert, wobei das Dipeptid **4** als erstes eluiert wird. Man erhält 800 mg (62%) farblose, feste Substanz mit  $R_F = 0.80$  [Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)].

*Tfa-2-Mercapto-L-tryptophyl-L-alanin-L-cystein-methylester-sulfid (5)*: Zur Lösung von 3.99 g (30.0 mmol) *N*-Chlorsuccinimid in 120 ml Eisessig gibt man bei Raumtemp. eine Lösung von 9.4 g (25 mmol) Boc-Cystein-methylester in 60 ml Eisessig. Nach 2.5 min, wenn sich die Gelbfärbung nicht weiter verstärkt, wird eine Lösung von 5.7 g (13.3 mmol) Dipeptid **4** in 60 ml Eisessig zugegeben und 30 min gerührt. Nach Abdampfen i. Vak. wird der Rückstand in 100 ml absol. Trifluoressigsäure gelöst und nach 2 h i. Vak. eingedampft (gegen Ende unter Zusatz von Toluol zur Beseitigung restlicher Trifluoressigsäure), bis kein Geruch mehr wahrnehmbar ist. Der Rückstand wird dann mit Methanol an Sephadex LH-20 chromatographiert (Säule:  $5 \times 300$  cm). Die Hauptfraktion wird eingedampft und erneut mit Wasser an Sephadex LH-20 ( $5 \times 300$  cm) chromatographisch getrennt. Man erhält als einheitliche Hauptfraktion 4.92 g (60%) DC-homogenen, farblosen Thioether **5** als Trifluoressigsäure mit  $R_F = 0.14$  (Laufmittel wie oben).

*Tfa-2-Mercapto-L-tryptophyl-L-alanyl-L-cystein-methylester-cyclosulfid (1 → 3) (6)*: Zur Lösung von 372 mg (0.60 mmol) des Trifluoressigsäureacetats **5** in 375 ml absol. THF gibt man 60.6 mg (0.60 mmol) Triethylamin, dann 138 mg (1.20 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, rührt 15 min und kühlt dann auf  $-10^{\circ}\text{C}$  ab. Jetzt tropft man bei dieser Temperatur eine Lösung von 135 mg (0.66 mmol) DCCI in einigen ml THF zu, entfernt das Kühlbad und rührt 24 h. Nach dem Abdampfen wird der Rückstand mit wenig Essigester versetzt, vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und nach Eindampfen der Lösung in Dichlormethan/Essigester (1:1) an Kieselgel chromatographiert. Die 6-haltigen Fraktionen (DC-Kontrolle) ergeben nach Abdampfen 183 mg (63%) **6** als lockere, feste Substanz mit  $R_F = 0.81$  [1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)]. – MS:  $m/e = 486$  ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ ).

Zur Abspaltung der Schutzgruppen werden 50 mg **6** in 5 ml Dioxan mit 2 ml 0.2 M NaOH 3 h stehengelassen, dann wird das Dioxan i. Vak. entfernt, die wäßrige Lösung mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht, mit Ammoniaklösung auf pH 8 eingestellt und die Lösung mit 0.004 M  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  an Sephadex LH-20 (Säule:  $3 \times 150$  cm) chromatographiert. Die Hauptfraktion besteht aus 30 mg (79%) eines cyclischen Thioethers (UV-Spektrum), der mit dem auf anderem Weg gewonnenen **2b** z. B. im  $R_F$ -Wert [0.36, 1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)] und im CD-Spektrum übereinstimmt.

*N-Brosyl-2b*: Die Umsetzung von **2b** mit *p*-Brombenzolsulfonylchlorid erfolgt wie für **2a** beschrieben. Aus 113 mg erhält man aus der angesäuerten Wasserphase nach 4 h bei  $5^{\circ}\text{C}$  98 mg Fällung, die in Methanol an Sephadex LH-20 chromatographiert wird.  $R_F = 0.79$  [1-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)].

$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{BrN}_4\text{O}_6\text{S}_2$  (595.5) Ber. C 46.38 H 3.89 N 9.41  
Ber. C 45.03 H 4.10 N 9.13 (mit 1 mol Kristallwasser)  
Gef. C 44.96 H 4.12 N 8.88

Gewichtsverlust beim Trocknen über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bei  $50^{\circ}\text{C}$ : 3.7% (ber. für 1 mol  $\text{H}_2\text{O}$ : 2.9%).

Im Gegensatz zu Brosyl-**2a** bildet die Verbindung mit Aceton keine in Methanol schwerlöslichen Kristalle.

### Röntgenstrukturanalyse von **2c**

Der gemessene Kristall von **2c** hatte die Kantenlängen  $0.3 \times 0.3 \times 0.45$  mm. Die Bestimmung der Gitterkonstanten erfolgte mit einem Syntex- $P2_1$ -Einkristalldiffraktometer über eine genaue Winkelbestimmung von 25 Reflexen und eine „Kleinste-Quadrate-Anpassung“ der Gitterkonstanten an diese Meßwerte. Sie betragen:  $a = 10.456$  (1),  $b = 11.694$  (1),  $c = 23.093$  (2) Å;  $V_z = 2823.6$  Å<sup>3</sup>,  $\rho_{\text{exp.}} = 1.49$  g cm<sup>-3</sup>,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.504$  g cm<sup>-3</sup>. Auf dem gleichen Einkristalldiffraktometer wurden mit Cu- $K\alpha$ -Strahlung (Graphitmonochromator) im Bereich  $0^\circ < 2\theta \leq 115^\circ$  die Intensitäten von 1941 unabhängigen Reflexen gemessen ( $\Theta/2\Theta$ -Abtastung, Abtastbreite  $3^\circ$ , Abtastgeschwindigkeit  $2 - 30^\circ$  min<sup>-1</sup>). 22 Reflexe waren unbeobachtet ( $I < 2\sigma_I$ ). Um die Reflexbreite zu bestimmen, wurden die Reflexprofile nach dem *Lehmann-Larson-Algorithmus*<sup>16)</sup> mit einem Programm von Schwarzenbach<sup>17)</sup> analysiert. Nach einer Lorentz-Polarisations- und einer empirischen Absorptionskorrektur ( $\mu = 37.8$  cm<sup>-1</sup>), für die die Korrekturparameter aus  $\Psi$ -Abtastungen 23 ausgewählter Reflexe gewonnen wurden, wurde die Struktur unter Verwendung des SHELXTL-Programmsystems<sup>13)</sup> an einem ECLIPSE-S/200-Rechner gelöst.

Mit direkten Methoden wurden von den 228 Reflexen mit den höchsten  $E$ -Werten ( $E \geq 1.4$ ) unter Verwendung von 2001 Tripelprodukten Phasen bestimmt und verfeinert. Dabei wurden 1024 Phasensätze berechnet (über „magic integers“ wurden die Phasen von 9 Reflexen permutiert).

Die Sätze mit den besten Gütekriterien NQUEST<sup>18)</sup> (über die 100 stärksten negativen Quartetts berechnet) und  $R_\alpha^{19)$  wurden auf 443 Phasen ( $E \geq 1.2$ ) erweitert und verfeinert. Die  $E$ -Fouriersynthese, berechnet mit dem Phasensatz mit dem niedrigsten NQUEST- und dem niedrigsten  $R_\alpha$ -Wert, erbrachte eine Teilstruktur. Diese wurde durch eine automatische Prozedur erweitert, bei der jeweils nach 2 Verfeinerungszyklen (kleinste Quadrate) der Besetzungsdichten eine Fouriersynthese verbesserte Atomlagen lieferte. Nach drei derartigen Rechenschritten konnten unter den 44 höchsten Elektronendichtemaxima der letzten Fouriersynthese 32 Nichtwasserstoffatome von insgesamt 39 lokalisiert werden. Durch sukzessive Verfeinerungen der Atompositionen und der isotropen Temperaturfaktoren der C-, N- und O-Atome (bei Br und S wurden die Temperaturfaktoren anisotrop verfeinert) mit anschließenden Differenz-Fourier-Synthesen wurden alle Nichtwasserstoffatome aufgefunden.

Die folgenden Rechnungen wurden im wesentlichen unter Verwendung einer modifizierten Version<sup>20)</sup> des X-Ray-67-Programmsystems<sup>21)</sup> mit einer Siemens-4004/150-Anlage ausgeführt. Die Strukturverfeinerung (Einheitsgewichte) wurde zunächst mit isotropen Temperaturfaktoren für C- N- und O-Atome, dann mit anisotropen Temperaturfaktoren für alle Nichtwasserstoffatome fortgesetzt. Im Laufe der Verfeinerung mit anisotropen Temperaturfaktoren wurden in Differenz-Fourier-Synthesen alle H-Atome aufgefunden und mit isotropen Temperaturfaktoren in die Verfeinerung einbezogen. Die Verfeinerung mit dem ORFLS-Programm des X-Ray-67-Programmsystems<sup>21)</sup> erfolgte wegen der großen Zahl der Variablen in drei überlappenden Teilzyklen für einen Vollzyklus. Die Temperaturfaktoren von drei H-Atomen (H24, H25 und H27) der CH<sub>3</sub>-Gruppen des Kristallacetons wurden hierbei auf einen plausiblen Wert gesetzt und nicht verfeinert. Von der Möglichkeit der gesonderten Behandlung der unbeobachteten Reflexe wurde Gebrauch gemacht. Diese wurden nur dann zur Berechnung der Parameterverschiebungen herangezogen, wenn  $|F_o| - |F_c| < 0$  war, wobei  $|F_o| = 4\sigma_F$  gesetzt wurde. In den letzten Verfeinerungsschritten wurden Reflexe mit  $|\Delta F| = ||F_o| - |F_c|| > 5$  nicht mehr zur Berechnung der Parameterverschiebungen herangezogen. Im letzten Verfeinerungszyklus waren dies 26 Reflexe. Die Verfeinerung konvergierte bei einem  $R$ -Wert ( $R = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$ ) von 0.041 bezogen auf die beobachteten Reflexe. Berücksichtigt man bei der Berechnung des  $R$ -Wertes die 26 Reflexe mit

$|\Delta F| > 5$  nicht, dann beträgt dieser 0,033. Die Atomformfaktoren für Br, S, N, O und C wurden den International Tables for X-Ray Crystallography<sup>22)</sup> entnommen, diejenigen für H stammen von Stewart, Davidson und Simpson<sup>23)</sup>. Die Atomkoordinaten und Temperaturparameter sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Die in der Tabelle aufgeführten Lageparameter beziehen sich auf ein Rechtssystem und geben die absolute Konfiguration des Tripeptids wieder. Diese konnte aufgrund der Kenntnis der absoluten Konfiguration der L-Aminosäuren festgelegt werden.

Tab. 6. Relative Atomkoordinaten und Temperaturparameter von 2c. Standardabweichungen in Einheiten der letzten Stelle. Die anisotropen Temperaturfaktoren sind definiert nach  $T = \exp[-1/4(B_{11}h^2a^{*2} + B_{22}k^2b^{*2} + B_{33}l^2c^{*2} + 2B_{12}hka^*b^* + 2B_{13}hla^*c^* + 2B_{23}klb^*c^*)]$

ATOM	x	y	z	B <sub>11</sub>	B <sub>22</sub>	B <sub>33</sub>	B <sub>12</sub>	B <sub>13</sub>	B <sub>23</sub>
Br	-0.0734(2)	1.0628(2)	-0.2784(1)	7.3(1)	11.5(1)	4.8(1)	-0.8(1)	1.1(1)	0.1(1)
S(1)	0.1117(4)	0.9060(3)	0.1307(1)	5.0(2)	3.7(2)	4.3(1)	0.6(2)	0.6(1)	0.2(1)
S(2)	-0.4157(4)	0.115(3)	-0.036(1)	3.2(1)	5.1(2)	4.2(1)	-0.1(2)	0.0(1)	-0.7(1)
O(1)	0.3946(13)	0.7758(11)	0.0390(5)	5.6(6)	4.1(6)	6.4(6)	1.6(6)	-1.7(5)	-0.9(5)
O(2)	0.2360(10)	0.7801(7)	0.0060(5)	5.4(5)	3.4(5)	5.9(3)	0.4(5)	-1.0(5)	-0.5(4)
O(3)	0.2706(9)	1.1822(8)	0.0126(5)	3.7(4)	3.2(4)	8.9(4)	-1.0(5)	0.1(5)	-0.6(5)
O(4)	-0.0600(9)	0.9450(7)	-0.0343(3)	3.6(4)	3.0(4)	6.2(4)	-0.3(4)	0.5(3)	-0.4(3)
O(5)	-0.4511(10)	1.1250(9)	-0.0623(4)	4.7(5)	5.3(5)	5.3(5)	1.4(5)	-0.4(4)	-0.6(4)
O(6)	-0.5102(9)	0.9259(11)	-0.0623(4)	4.2(5)	8.3(7)	5.4(5)	-1.5(6)	0.1(4)	-1.6(5)
O(7)	0.2182(10)	0.8723(9)	-0.2902(4)	6.1(5)	6.8(6)	4.9(5)	0.1(5)	0.6(4)	-0.2(4)
N(1)	0.0523(12)	1.1145(11)	0.1746(5)	4.9(6)	4.9(6)	4.4(5)	0.3(6)	-1.0(5)	-0.9(5)
N(2)	0.1970(11)	1.0008(9)	0.0081(5)	4.2(6)	2.8(5)	5.0(6)	-0.2(5)	0.4(5)	-0.3(4)
N(3)	-0.0421(11)	1.1508(10)	-0.1014(5)	3.8(6)	2.5(5)	3.8(5)	-0.2(6)	0.5(4)	-0.2(4)
N(4)	-0.3270(12)	0.9594(12)	-0.0003(5)	3.9(6)	3.6(6)	4.4(6)	-0.3(7)	0.4(5)	-0.3(5)
C(1)	0.0198(14)	1.0262(12)	0.1409(5)	5.3(7)	4.2(7)	3.0(5)	0.7(7)	0.7(5)	-0.3(5)
C(2)	-0.111(15)	1.0404(11)	0.2121(7)	4.7(7)	3.9(6)	3.1(5)	0.0(7)	-0.1(5)	-0.2(5)
C(3)	-0.1524(14)	1.1460(12)	0.1905(5)	5.1(7)	4.3(7)	3.1(5)	1.8(7)	0.4(5)	0.4(5)
C(4)	-0.2678(19)	1.2013(16)	0.1921(6)	7.0(11)	6.5(10)	3.1(6)	1.6(10)	-0.5(7)	0.0(7)
C(5)	-0.2791(22)	1.3017(18)	0.1839(7)	8.7(12)	7.9(12)	4.4(8)	4.1(12)	-1.1(8)	-0.4(8)
C(6)	-0.1748(27)	1.3450(17)	0.2127(8)	13.1(18)	5.1(10)	5.7(9)	3.6(13)	-1.4(11)	-1.9(9)
C(7)	-0.0540(20)	1.2929(15)	0.2121(7)	8.4(11)	5.3(9)	4.8(7)	1.3(10)	-1.4(8)	-1.0(7)
C(8)	-0.0473(13)	1.1901(13)	0.1811(6)	5.8(8)	4.5(7)	3.7(6)	1.0(8)	-0.7(6)	-0.6(6)
C(9)	0.2643(15)	0.9682(15)	0.0484(7)	4.4(7)	4.6(9)	5.4(8)	0.6(8)	-0.3(6)	-1.3(7)
C(10)	0.2926(13)	0.9519(12)	0.0481(6)	3.1(6)	3.4(6)	5.7(7)	0.0(6)	0.2(6)	-0.4(6)
C(11)	0.3098(13)	0.8272(12)	0.0287(6)	4.2(7)	4.1(7)	4.4(6)	0.6(7)	0.4(6)	-0.4(6)
C(12)	0.1928(15)	1.1138(12)	-0.0040(7)	4.0(7)	3.2(7)	5.2(7)	0.3(7)	1.5(6)	0.0(6)
C(13)	0.0766(14)	1.1489(11)	-0.0407(6)	4.6(7)	2.8(6)	4.3(6)	-0.3(7)	0.5(6)	0.2(5)
C(14)	-0.1025(14)	1.0308(12)	-0.0091(5)	4.1(7)	3.6(7)	3.1(5)	0.3(7)	-0.1(5)	0.2(5)
C(15)	-0.2231(14)	1.0254(13)	0.0272(5)	3.5(7)	3.2(7)	3.7(6)	0.1(6)	-0.1(5)	-0.4(5)
C(16)	-0.1897(14)	0.9671(13)	0.0893(5)	4.8(7)	4.8(7)	3.0(5)	0.5(8)	0.7(5)	0.5(5)
C(17)	-0.3220(13)	1.0273(13)	-0.1143(5)	3.9(6)	4.8(7)	3.9(6)	-0.1(7)	-0.3(5)	0.1(5)
C(18)	-0.3150(13)	0.9342(15)	-0.1518(6)	4.9(7)	6.3(9)	4.6(7)	-0.7(8)	0.1(6)	-0.9(7)
C(19)	-0.2400(16)	0.9463(17)	-0.2017(6)	5.2(8)	6.6(10)	4.9(7)	0.6(9)	0.3(6)	-1.2(7)
C(20)	-0.1772(14)	1.0489(17)	-0.2111(6)	4.4(7)	7.7(10)	4.0(7)	0.6(9)	0.3(6)	0.8(7)
C(21)	-0.1840(17)	1.1399(16)	-0.1733(7)	5.4(9)	6.3(9)	4.4(7)	-1.0(9)	-0.8(7)	0.4(7)
C(22)	-0.2397(16)	1.1266(14)	-0.1247(6)	5.7(9)	4.8(9)	4.2(7)	0.5(8)	-0.1(6)	0.2(6)
C(23)	0.0975(26)	0.8985(33)	-0.1635(13)	12.8(24)	11.4(20)	9.3(19)	2.6(22)	5.6(19)	1.2(17)
C(24)	0.2185(17)	0.8942(13)	-0.1986(7)	7.4(10)	4.5(7)	5.5(8)	-0.1(8)	0.6(8)	-0.6(6)
C(25)	0.3363(38)	0.8263(38)	-0.1704(14)	14.1(23)	15.4(32)	10.9(18)	-5.0(23)	-6.5(16)	5.9(20)

WASSERSTOFFATOME									
ATOM	x	y	z	B(Å <sup>2</sup> )	ATOM	x	y	z	B(Å <sup>2</sup> )
H(1)	-0.338(13)	1.188(13)	0.130(6)	6(4)	H(15)	-0.140(11)	0.895(10)	0.075(5)	4(3)
H(2)	-0.365(17)	1.350(15)	0.173(7)	8(5)	H(16)	-0.266(11)	0.948(10)	0.104(5)	3(2)
H(3)	-0.166(16)	1.415(14)	0.231(7)	6(4)	H(17)	-0.313(13)	0.899(9)	-0.005(5)	2(3)
H(4)	0.039(26)	1.318(24)	0.228(11)	18(10)	H(18)	-0.377(14)	0.898(12)	-0.138(6)	7(4)
H(5)	0.123(14)	1.125(13)	0.176(6)	6(4)	H(19)	-0.218(16)	0.868(14)	-0.227(7)	7(4)
H(6)	0.333(15)	0.930(14)	0.126(6)	6(4)	H(20)	-0.136(13)	1.204(12)	-0.186(6)	5(4)
H(7)	0.294(14)	1.050(13)	0.118(6)	5(4)	H(21)	-0.264(13)	1.194(11)	-0.102(5)	4(3)
H(8)	0.364(11)	0.989(9)	0.038(5)	2(3)	H(22)	0.047(17)	0.868(18)	-0.185(7)	7(5)
H(9)	0.407(20)	0.724(13)	0.048(7)	9(5)	H(23)	0.082(18)	0.800(19)	-0.130(8)	10(3)
H(10)	0.132(14)	0.965(12)	-0.017(6)	6(4)	H(24)	0.114(14)	0.925(11)	-0.145(6)	5(4)
H(11)	0.079(11)	1.104(9)	-0.076(4)	3(2)	H(25)	0.374(13)	0.902(11)	-0.172(6)	5(4)
H(12)	0.092(11)	1.234(9)	-0.047(4)	4(3)	H(26)	0.334(19)	0.769(13)	-0.165(8)	2(4)
H(13)	-0.075(11)	1.189(9)	0.000(5)	2(3)	H(27)	0.367(12)	0.829(12)	-0.128(5)	5(4)
H(14)	-0.291(10)	1.099(9)	0.030(4)	2(2)					

58. Mitteilung: Th. Wieland, A. Deboben und H. Faulstich, Liebigs Ann. Chem. **1980**, 416.
- F. Lynen und U. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **533**, 93 (1938).
- Th. Wieland und W. Schön, Liebigs Ann. Chem. **593**, 157 (1955).
- Th. Wieland und H. W. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **657**, 225 (1962).
- F. Fahrenholz, H. Faulstich und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **743**, 83 (1971).
- E. Munkata, H. Faulstich und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **1977**, 1758.
- Th. Wieland und H. Faulstich, Crit. Rev. Biochem. **5**, 185 (1978).
- Th. Wieland und H. Faulstich, Frontiers in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology, S. 97 (Herausgeber Yu. A. Ovchinnikov und M. N. Kolosov), Elsevier/North Holland Bio-medical Press, Amsterdam, Oxford, New York 1979.

- <sup>9)</sup> D. J. Patel, A. E. Tonelli, P. Pfaender, H. Faulstich und Th. Wieland, *J. Mol. Biol.* **79**, 185 (1973).
- <sup>10)</sup> G. Zanotti, Ch. Birr und Th. Wieland, *Int. J. Pept. Protein Res.* **12**, 204 (1978).
- <sup>11)</sup> W. E. Savige und A. Fontana, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1976**, 600; *Int. J. Pept. Protein Res.* **15**, 102 (1980).
- <sup>12)</sup> Th. Wieland, Ch. Jochum und H. Faulstich, *Liebigs Ann. Chem.* **727**, 138 (1969).
- <sup>13)</sup> G. M. Sheldrick und E. Oeser, SHELXTL-System, *Rev.* 1.6 (Februar 1979).
- <sup>14)</sup> A. E. Tonelli, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7635 (1980).
- <sup>15)</sup> A. E. Tonelli und F. C. Schilling, *Acc. Chem. Res.* **14**, 233 (1981).
- <sup>16)</sup> R. H. Blessing, P. Coppens und P. Becker, *J. Appl. Crystallogr.* **7**, 488 (1971).
- <sup>17)</sup> D. Schwarzenbach, private Mitteilung.
- <sup>18)</sup> G. T. De Titta, J. W. Edmonds, D. A. Langs und H. Hauptmann, *Acta Crystallogr., Sect. A* **31**, 472 (1975).
- <sup>19)</sup> P. J. Roberts, R. C. Pettersen, G. M. Sheldrick, N. W. Isaacs und O. Kennard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **1973**, 1978.
- <sup>20)</sup> W. Hoppe, J. Gassmann und K. Zechmeister, *Crystallographic Computing*, S. 26 (Herausgeber F. R. Ahmed), Munksgaard, Copenhagen 1970.
- <sup>21)</sup> J. M. Stewart, X-Ray-67 Program System for X-ray Crystallography, Computer Science Centre, Univ. of Maryland (College Park) 1967.
- <sup>22)</sup> *International Tables for X-ray Crystallography*, Bd. III, Tabelle 3.3.1A, Kynoch Press, Birmingham 1962.
- <sup>23)</sup> R. F. Stewart, E. R. Davidson und W. T. Simpson, *J. Chem. Phys.* **42**, 3275 (1965).

[70/81]