

*Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in  
Polypeptiden durch chemische Modifikation und Enzymkatalyse*

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher-Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Biochemiker Dirk Wildemann  
geb. am: 28.06.1973 in Wernigerode

Halle/Saale, Juni 2004

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer      Max-Planck-Forschungstelle für Enzymologie der  
Proteinfaltung, Halle/Saale
2. Prof. Dr. K. Neubert      Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-  
Universität Halle
3. Prof. Dr. T. Kiefhaber      Biozentrum der Universität Basel, Schweiz

Datum der Verteidigung: 16.11.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007737**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007737>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2.</b>	<b>Thioxozeptidbindungen als photoschaltbares Element modifizierter Ribonuklease S</b>	7
2.1	Ribonuklease S	7
2.2	Eigenschaften der Thioxozeptidbindung	11
2.3	Biochemische Auswirkungen der Thioxoamidsubstitution	20
2.4	Spektroskopische Eigenschaften der Thioxozeptidbindung	23
2.5	Thioxozeptidbindungen als photoschaltbares Element der Konformation von Peptiden	24
2.6	Thioxozeptide als Synthons für die Herstellung modifizierter Peptide	26
2.7	Synthese thioxylierter Oligozeptide	27
2.8	Ergebnisse und Diskussion	33
2.8.1	Eine neue Strategie zur Festphasensynthese von Thioxozeptiden	33
2.8.1.1	Suche nach geeigneten Schutzgruppen und polymeren Trägern	33
2.8.1.2	Synthese $N^\alpha$ -Fmoc- geschützter Amino-thioxo-carbonsäure-6-nitrobenzotriazolide (Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-N]-NBt)	41
2.8.1.3	Synthese thioxylierter S-Peptid-Derivate	44
2.8.2	Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion in thioxylierten Derivaten der RNase S mittels isothermer Titrationskalorimetrie	48
2.8.3	Enzymkinetische Charakterisierung thioxylierter Derivate der RNase S	51
2.8.4	Diskussion der Ergebnisse	57
2.8.5	CD-spektroskopische Untersuchungen	68
2.8.6	Thioxozeptidbindungen als photoschaltbare Sonde der Konformation des S-Peptids und der Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S	71
2.8.6.1	Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung der amidischen Thioxozeptidbindung	71
2.8.6.2	Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung der Thioxozeptidbindung des [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptids	73
2.8.6.3	Einfluss der photoinduzierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S	76

<b>3.</b>	<b>Pin1-katalysierte Einzelbindungs-Konformationsänderungen in der Embryogenese von <i>Xenopus laevis</i></b>	80
3.1	Ser(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )/Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro- spezifische PPIasen	80
3.2	Entwicklung und Charakterisierung Pin1-spezifischer Inhibitoren	87
3.3	Biologische Tests	101
3.4	Diskussion	106
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	113
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b>	116
5.1	<b>Thioxylierte Derivate der RNase S</b>	116
5.1.1	Synthese thioxylierter S-Peptide	116
5.1.2	Enzymkinetische Messungen	120
5.1.3	Isotherme Titrationskalorimetrie	122
5.1.4	Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung des [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptids	122
5.1.5	Einfluss der photoinduzierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S	123
5.2	<b>Pin1-spezifische Inhibitoren</b>	124
5.2.1	Synthesen	124
5.2.2	Suche nach hochaffinen Pin1-Liganden durch Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide	125
5.2.3	PPIase-Tests	125
5.2.4	“Far-Western-Blot“-Analysen zum Nachweis der selektiven Bindung von Peptid 15 durch die PPIase-Domäne des <i>hPin1</i>	127
5.2.5	Charakterisierung der Peptid 17/ <i>hPin1</i> -Interaktion mittels ITC	127
5.2.6	Analyse der Stabilität von Peptid 17 mittels Kapillarelektrophorese	128
5.2.7	Zellkultur und Gewinnung von HeLa-Zell- und <i>X. laevis</i> Embryo-Lysat	128
5.2.8	Nachweis der Bindung von Peptid 16 durch authentisches Pin1 aus <i>X. laevis</i> Embryonen ( <i>XlPin1</i> ) und HeLa-Zellen ( <i>hPin1</i> )	128
5.2.9	Einfluss von Peptid 17 auf die Interaktion zwischen MPM-2-Antigenen und <i>hPin1</i>	129
5.2.10	Mutagenese, Klonierung und Überexpression rekombinanter Proteine	129
5.2.11	Mikroinjektion und Fluoreszenzfärbung	130

<b>6.</b>	<b>Analytische Daten</b>	131
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	135

## Abkürzungsverzeichnis

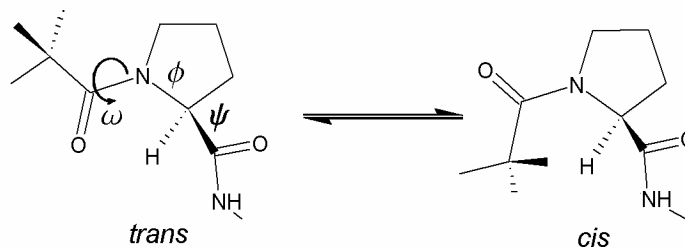
Abz	2-Aminobenzoesäure
ACN	Acetonitril
Aib	Aminoisobuttersäure (2-Amino-2-methyl-propansäure)
2',3'-cCMP	zyklisches Cytidin-2',3'-monophosphat
Cyp18	Cyclophilin 18
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithio-threit (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetracetat (Kaliumsalz)
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FKBP	FK506-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-transferase
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HOAT	<i>N</i> -Hydroxy-7-Azabenzotriazol
HOBT	1-Hydroxy-benzotriazol
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
MALDI-ToF	Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry
MES	Morpholino-ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NH-Np	Np bedeutet 4-Nitrophenyl (NH-Np entspricht pNA: para-Nitroanilid)

NMI	<i>N</i> -Methyl-imidazol
NMM	<i>N</i> -Methyl-morpholin
NP-40	Nonidet <sup>®</sup> P40 (NonylPhenyl-Polyetherglucose)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzo-5-sulfonyl
pGlu	Pyroglutaminsäure
Pip	Piperidin
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
POD	Peroxidase (Meerrettich)
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
PyNOP	(6-NitroBenzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
RP-HPLC	Reverse-phase high performance liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	“Reverse Transcriptase“-PCR
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tis	Triisopropylsilan
t <sub>R</sub>	HPLC-Retentionszeit
Trt	Trityl
V5	Peptidsequenz aus einem Hüllprotein des SV40-Virus (GKIPNPLLGLDST), erleichtert die Reinigung eines rekombinaten Proteins (Affinitätschromatographie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers)
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

# *Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Polypeptiden durch chemische Modifikation und Enzymkatalyse*

## 1. Einleitung

Peptide sind u. a. in Form von Hormonen, Transmittern und Modulatoren an der Steuerung wichtiger Funktionen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie des Immun-, Verdauungs- und Herz-Kreislauf-Systems beteiligt. Durch Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren nehmen Peptide direkten Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation, den Stoffwechsel, die Schmerzregulation, die Reproduktion und die Immunabwehr. Darüber hinaus sind Peptide in Form von Toxinen, Alkaloiden, Insektiziden und Antibiotika von Bedeutung. Die Konformation des Peptidrückgrats stellt dabei einen entscheidenden Faktor der biologischen Aktivität des Peptids dar (1). Als besonders wichtig in diesem Zusammenhang haben sich kovalente Bindungen des Peptidrückgrats mit intrinsisch hoher Rotationsbarriere herausgestellt (2, 3). Konformationsänderungen, die sich infolge der Rotation um solche kovalenten Bindungen ergeben, können darüber hinaus einen großen Einfluss auf die Kinetik der Faltung und Entfaltung von Polypeptidketten haben (4-8) und verlaufen dabei in der Regel kinetisch entkoppelt zu den anderen Strukturänderungen. Auf Grund fehlender spektroskopischer Signale, sind sie allerdings auf direktem Wege nur schwer zu verfolgen. Eine indirekte Detektion gelingt für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung, in dem der Einfluss einer spezifischen Beschleunigung der Einstellung des in **Abbildung 1** gezeigten Konformationsgleichgewichts durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) auf die biologische Aktivität eines entsprechenden Peptids oder Polypeptids bzw. auf die Kinetik der Faltung einer Polypeptidkette analysiert wird (4, 9, 10).

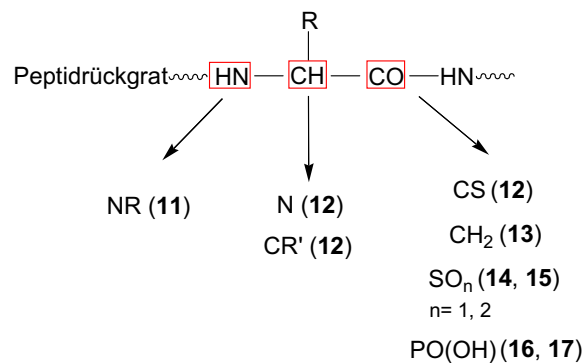


**Abbildung 1:** *cis/trans*-Gleichgewicht einer Peptidyl-Prolyl-Bindung  
Eine Peptidbindung liegt in Folge der Resonanzstabilisierung in einer planaren Struktur vor, die zwei durch unterschiedliche Winkel  $\omega$  gekennzeichnete Konformationen zulässt, das *cis*- ( $\omega = 0^\circ$ ) und das *trans*- ( $\omega = 180^\circ$ ) Konformer.

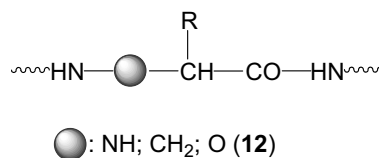
Eine direkte Messung der *cis/trans*-Isomerisierung im Ensemble der restlichen Peptidbindungen eines Polypeptids, sollte durch chemische Modifizierung bzw. durch Einführung von Peptidbindungsmimetika gelingen.

Als Peptidmimetika werden Verbindungen bezeichnet, welche die Struktur und/oder die biologische Wirkung eines Peptids auf Rezeptorebene imitieren, ohne die komplette chemische Signatur eines Peptids zu enthalten. Häufig lässt ihre chemische Struktur die Beziehung zu Peptiden nicht mehr erkennen. Als Rückgrat-modifizierte Peptide bezeichnet man Peptidderivate, bei denen eine oder mehrere Peptidbindungen gegen andere Formen der kovalenten Bindung ausgetauscht wurden bzw. das Grundgerüst einer oder mehrerer Aminosäurereste (nicht die Seitenketten) chemisch verändert wurden. In **Abbildung 2** sind die wichtigsten Formen von Rückgrat-Modifikationen, die mit Hilfe der chemischen Synthese in Peptide und Proteine eingeführt wurden, dargestellt.

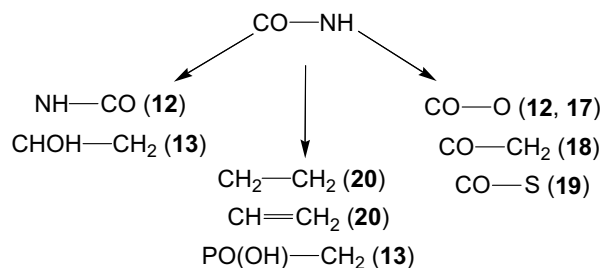
#### Substitutionen im Grundgerüst eines Aminosäurerests



#### Verlängerung der Peptidkette



#### Austausch der Peptidbindung



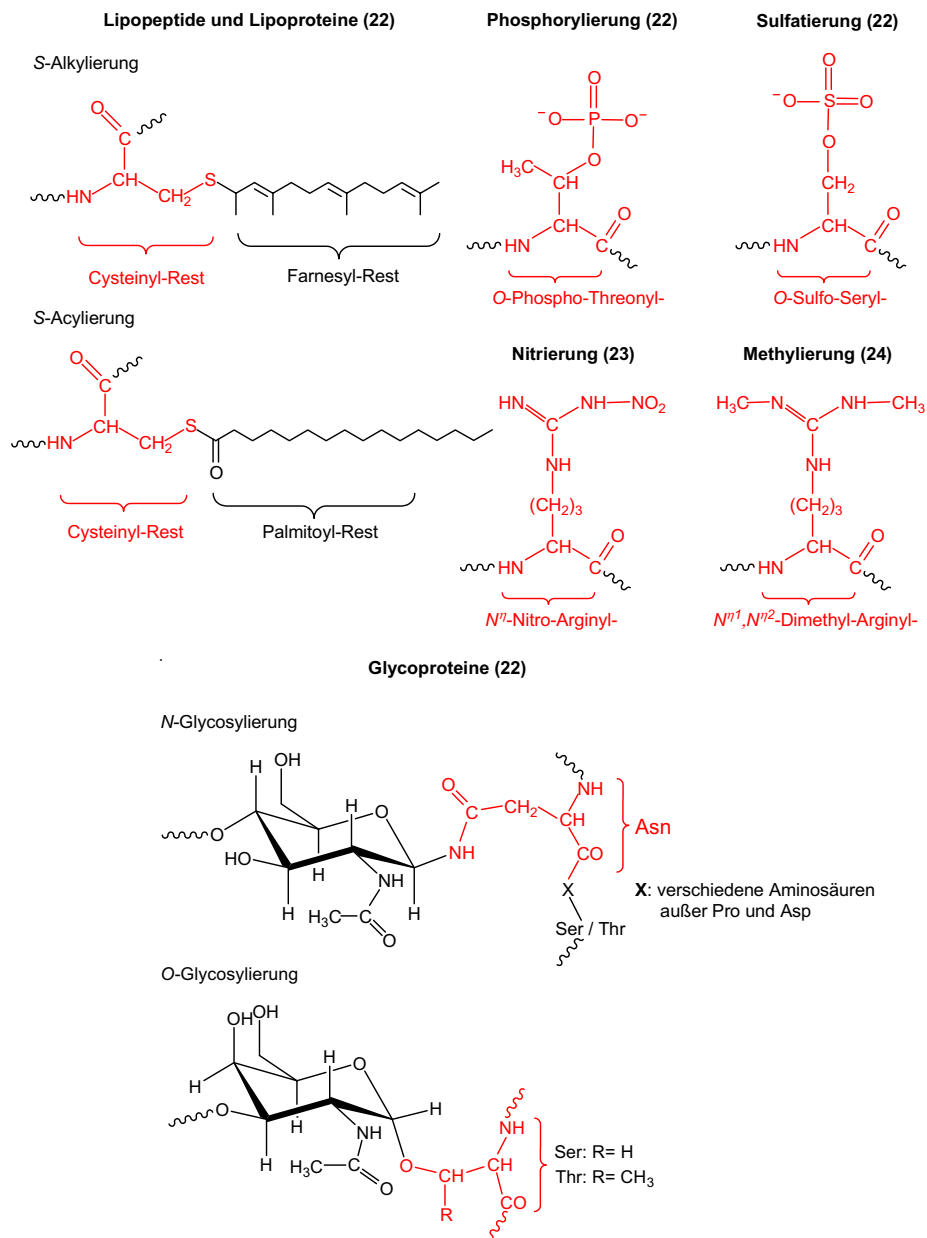
**Abbildung 2:** Möglichkeiten der Modifikation des Rückgrats in chemisch synthetisierten Peptiden und Proteinen  
Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den Literaturstellen



Modifizierte Peptide ermöglichen gezielte Untersuchungen zur Bedeutung einzelner Aminosäuren oder einzelner Peptidbindungen für die Erkennung des Peptids durch einen Rezeptor oder ein Enzym bzw. ermöglichen Aussagen über Katalysemechanismen. Durch Austausch einer Peptidbindung (-CO-NH-) gegen eine Esterbindung (-CO-O-), eine Ketomethylen-Gruppe (-CO-CH<sub>2</sub>-) oder Einbau einer N<sup>α</sup>-methylierten Aminosäure erhält man Peptid-derivate, die an der entsprechenden Position als Akzeptor, jedoch auf Grund des fehlenden Amidprotons nicht mehr als Donor einer Wasserstoffbrückenbindung fungieren können. Die Akzeptoreigenschaften des Carbonylsauerstoffatoms einer Peptidbindung für eine Wasserstoffbrückenbindung, lassen sich durch Substitution der Peptidbindung gegen ein sekundäres Amin (-CH<sub>2</sub>-NH-) ausschalten.

Kurze Peptide und entfaltete Polypeptide existieren in Lösung in einer Vielzahl von Konformeren, die sich miteinander im Gleichgewicht befinden. Modifikationen des Peptidrückgrats haben häufig eine starke Auswirkung auf die Flexibilität der Peptidkette bzw. das Konformerengleichgewicht und können somit einen großen Einfluss auf die Affinität des Enzyms oder Rezeptors zum Peptid haben. So wird durch den Austausch der Peptidbindung, die auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters in einer Z-planaren Konformation vorliegt, gegen ein sekundäres Amin (-CH<sub>2</sub>-NH-), eine hoch flexible σ-Bindung eingeführt. Der Einbau von N<sup>α</sup>-Methylaminosäuren begünstigt die Ausbildung von Schleifenstrukturen (β-Turns). Häufig können Peptidsubstrate durch eine Modifikation des Peptidrückgrats in Inhibitoren eines Enzyms umgewandelt werden. So stellen Thiopeptide, bei denen das Sauerstoffatom der in die Enzymkatalyse involvierten Peptidbindung gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde, sehr häufig kompetitive Inhibitoren von Proteasen und Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen dar.

In der lebenden Zelle spielt die posttranslationale Modifikation von Peptiden und Proteinen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Kommunikation, dem zielgerichteten Proteintransport und der Synthese von Strukturproteinen (21). In **Abbildung 3** sind die wichtigsten Formen der posttranslationalen Modifikation, die auch mit Hilfe der chemischen Synthese in Peptide und Proteine eingeführt werden können, zusammengefasst. Die chemische Modifikation von Proteinen (Einbau nichtproteinogener Aminosäuren, Rückgrat- und Seitenkettenmodifizierung) wird häufig unter dem Aspekt der Aufklärung eines Katalysemechanismus, der Untersuchung einer Protein/Protein- oder Protein/Ligand-Wechselwirkung, der Dynamik von Proteinfaltungsvorgängen oder der Veränderung der Proteinstabilität vorgenommen.



**Abbildung 3:** Wichtigste Formen der posttranslationalen Seitenkettenmodifikation von Aminosäureresten in Peptiden und Proteinen  
Die dargestellten Seitenkettenmodifikationen können auch mit Hilfe der chemischen Synthese in Peptide und Proteine eingeführt werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese chemisch modifizierter Peptide, mit deren Hilfe eine Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Polypeptiden erfolgen und deren Bedeutung bei der Steuerung fundamentaler Lebensprozesse in der Zelle untersucht werden sollte. Infolge ihres Bioreaktivitäts-bestimmenden Charakters, wurde der *cis/trans*-Isomerisierung amidischer und imidischer Peptid bzw. Thioxopeptidbindungen besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Die Thioxozeptidbindung stellt aus mehreren Gründen, die in den nächsten Kapiteln näher erläutert werden, eine besonders interessante Form der Rückgratmodifizierung von Peptiden und, wie in der Arbeit gezeigt werden soll, auch von Proteinen dar. Thioxozeptide können auf Grund der erhöhten Reaktivität der Thioxozeptidbindung für die Einführung verschiedener Rückgratmodifikationen verwendet werden. Da das *cis/trans*-Konformerengleichgewicht einer Thioxozeptidbindung photoinduziert in Richtung des *cis*-Konformeren verschoben und die Dunkelreaktion (Wiedereinstellung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts) UV- und CD-spektroskopisch verfolgt werden kann, eignet sich die Thioxozeptidbindung hervorragend als Sonde zur Untersuchung von Konformationsänderungen. Auf Grund der Tatsache, dass die *cis/trans*-Isomerisierung einer Thioxozeptidbindung deutlich langsamer verläuft als die Isomerisierung einer Peptidbindung, sollte sich die Thioxozeptidbindung als photoschaltbares Element von biologisch relevanten Proteinaktivitäten eignen.

Da bis zum heutigen Zeitpunkt weder natürliche, noch chemisch synthetisierte Proteine mit einer Thioxozeptidbindung bekannt sind, wurde als Modellsystem für die Synthese solcher Proteine die Ribonuklease S (RNase S) ausgewählt. Die RNase S eignet sich hervorragend als Modellsystem für die Einführung chemischer Modifikationen in Proteine und nachfolgender Analyse der Auswirkungen auf die Proteinstabilität und enzymatische Aktivität. RNase S wird aus Ribonuklease A (RNase A, Rinderpankreas) durch limitierte Proteolyse mittels Subtilisin (Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 20 und 21) gewonnen. Eine Hydrolyse dieser Peptidbindung führt zu keinen wesentlichen Änderungen in der Struktur bzw. katalytischen Aktivität des Enzyms. Das kleine Fragment (entspricht den Aminosäuren 1-20 der RNase A), das als S-Peptid bezeichnet wird, kann jedoch leicht vom zweiten Fragment, dem S-Protein (Aminosäuren 21-124 der RNase A) abgetrennt werden und durch ein chemisch modifiziertes S-Peptid ersetzt werden.

Die Entwicklung einer neuen Strategie für die Synthese thioxylierter Oligozeptide sollte die Darstellung Thioxoamid-substituierter Derivate des S-Peptids ermöglichen, mit deren Hilfe anschließend, durch Rekombination mit dem S-Protein, thioxylierte Derivate der RNase S erhalten werden können. Da Aminosäuren des S-Peptids an der Ausbildung eines Sekundärstrukturelements ( $\alpha$ -Helix) sowie an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sind, ist die RNase S ein ideales Modellsystem für Untersuchungen zum Einfluss der Thioxoamid-substitution auf die Stabilität sowie die enzymatische Aktivität eines Proteins. Die thermodynamische Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion erfolgte dabei mittels isothermer Titrationskalorimetrie. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die speziellen spektroskopischen Eigenschaften einer Thioxozeptidbindung möglicherweise als Sonde für

Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Proteinen geeignet sind, mit deren Hilfe der Prozess der Proteinfaltung durch Visualisierung der Konformationsänderung im Bereich einer einzelnen Peptidbindung untersucht werden kann. Da sich amidische Thiopeptidbindungen als photoschaltbare Sonde der *cis/trans*-Isomerisierung in thioxylierten Dipeptiden eignen, sollte des weiteren versucht werden, die Konformation der Thiopeptidbindung eines thioxylierten Derivats des S-Peptids photoinduziert zu schalten und die Dunkelreaktion spektroskopisch und kinetisch zu charakterisieren. Abschließend wurde der Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung einer Thiopeptidbindung auf die Aktivität der RNase S untersucht.

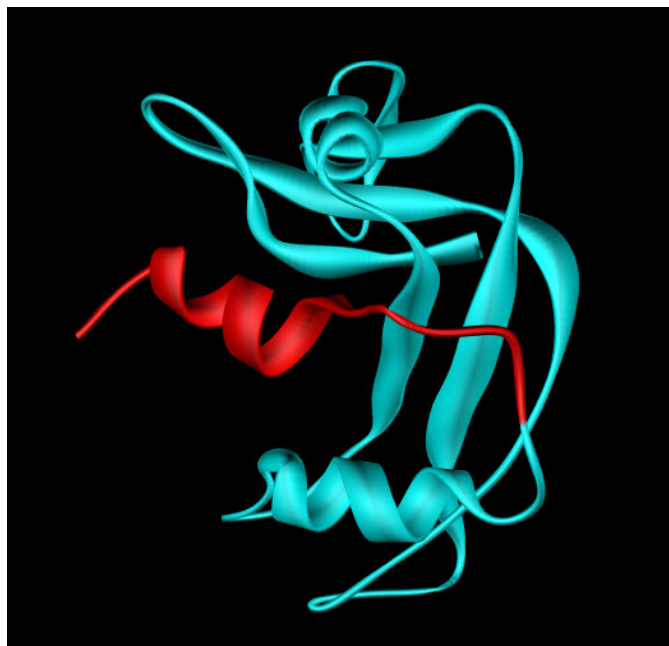
Die Bedeutung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen für die Steuerung wichtiger Lebensfunktionen in der Zelle wurde mit Hilfe inhibitorisch auf die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1 wirkender Peptide untersucht. Dabei erfolgte die Entwicklung hochaffiner Pin1-Liganden durch Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide, deren Struktur von Phosphopeptidsubstraten des Pin1 abgeleitet wurde. Durch Verwendung nichtproteinogener und D-Aminosäuren bei der Synthese, konnten Pin1-Liganden erhalten werden, die eine hohe Stabilität in zytosolischen Extrakten besitzen und sich deshalb hervorragend für *in vivo* Experimente eignen. Da Pin1 aus einer katalytischen- (PPIase) und einer WW- Domäne besteht, die beide spezifisch Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motive binden, wurde ein besonderer Wert auf die Entwicklung inhibitorisch wirkender Peptide gelegt, die eine selektive Hemmung der PPIase- Aktivität des Pin1 bewirken, ohne die Funktion der WW- Domäne zu beeinflussen. Solche Pin1-Inhibitoren sollten spezifisch nur solche Konformationsänderungen auf die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion zurückfallen lassen, die an der Peptidbindung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motiven ablaufen. Damit wird die biologische Funktion dieser Einzelbindungs-Konformationsänderung zugänglich. Da diese Liganden selektiv die PPIase-Aktivität des Enzyms inhibieren, ohne die Bindungsfähigkeit der WW-Domäne gegenüber ihren natürlichen Phosphoprotein-substraten zu beeinflussen, sind sie geeignet, die Bedeutung der PPIase-Aktivität des Pin1, getrennt von der biologischen Funktion der WW-Domäne, zu verifizieren. Diese Inhibitoren ermöglichen, die Auswirkungen der Katalyse der Rotation einer einzelnen Bindung, die Peptidbindung eines Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Restes, *in vivo* zu messen.

Als biologische Funktion, die in diesem Zusammenhang analysiert werden sollte, haben wir die Steuerung des Zellteilungszyklus bei der Embryonalentwicklung in *Xenopus laevis* ausgewählt, da die Mikroinjektion in *X. laevis* Embryonen routinemäßig für Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus und der Embryonalentwicklung durchgeführt wird.

## 2. Thiopeptidbindungen als photoschaltbares Element modifizierter Ribonuklease S

### 2.1 Ribonuklease S

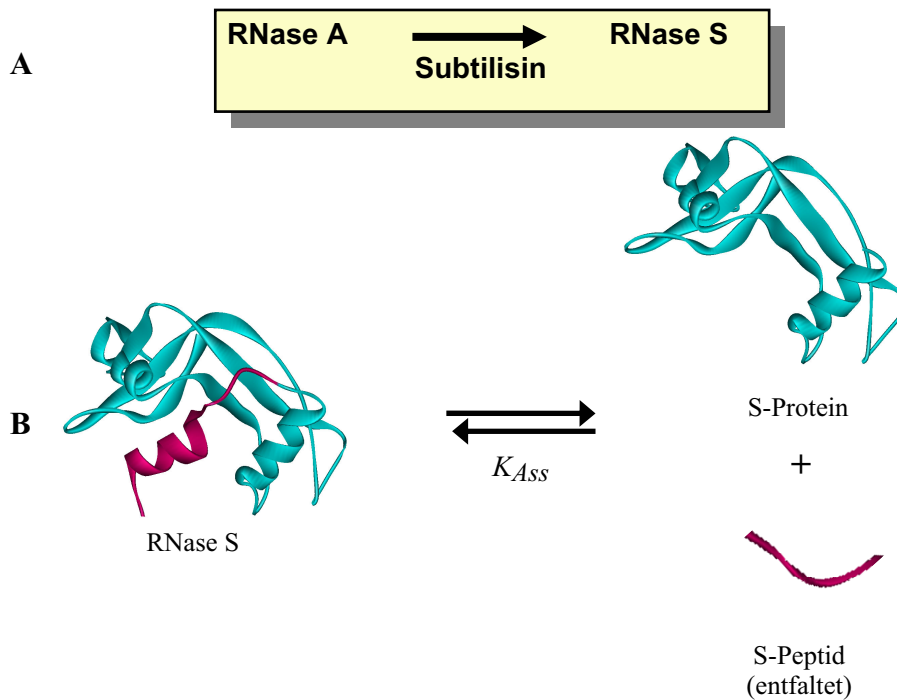
Die RNase S ist ein nahezu ideales Modellsystem für Untersuchungen zur Proteinfaltung und Proteinstabilität (25-28). Sie wird durch limitierte Proteolyse aus Ribonuklease A (Rinderpankreas) mittels Subtilisin gewonnen. RNase A aus Rinderpankreas (EC.3.1.27.5) gehört zur Gruppe der Endonucleasen und bevorzugt die Spaltung einzelsträngiger Ribonukleinsäuren, die in der P<sub>1</sub>-Position Pyrimidinbasen aufweisen. Das Enzym besteht aus einer 124 Aminosäuren enthaltenden Polypeptidkette (13,683 kDa). Die dominanten Sekundärstrukturelemente der RNase A sind eine zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur und drei  $\alpha$ -Helices (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Struktur der RNase A. Das nach der Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren der Positionen 20 und 21 mittels Subtilisin erhaltene Protein wird als RNase S bezeichnet. Die RNase S ist ein Komplex aus dem S-Peptid (rote Farbe, Aminosäuren 1 bis 20 der RNase S) und dem S-Protein (blaue Farbe, Aminosäuren 21-124 der RNase S).

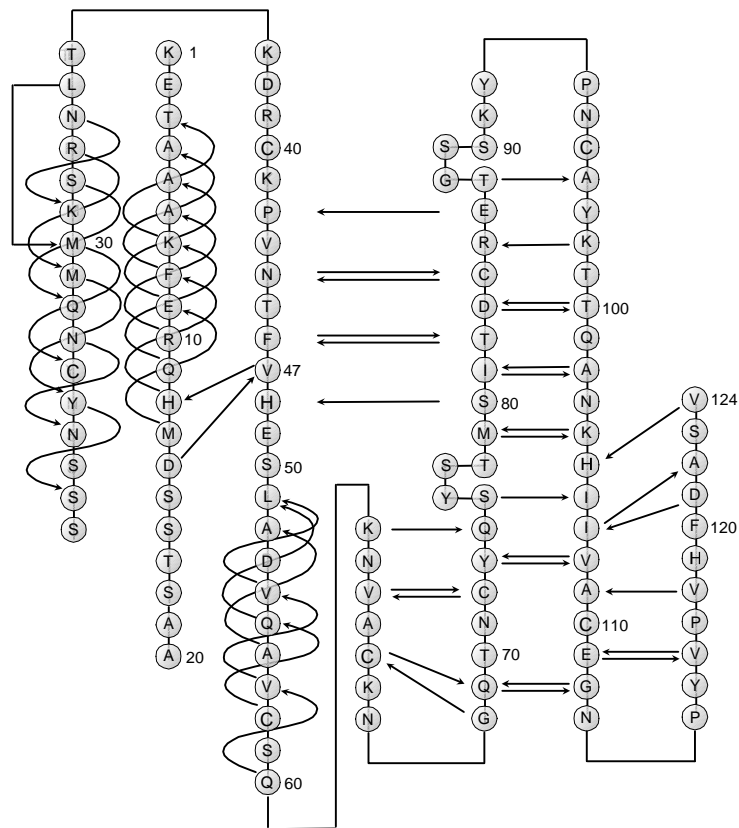
Das Protein enthält vier Disulfidbrücken, die für die Stabilität der nativen RNase A essentiell sind (29, 30). RNase A weist im nativen Zustand zwei *cis*-Proline (Tyr<sup>92</sup>-Pro<sup>93</sup> und Asn<sup>113</sup>-Pro<sup>114</sup>) und zwei *trans*-Proline (Lys<sup>41</sup>-Pro<sup>42</sup> und Val<sup>116</sup>-Pro<sup>117</sup>) auf (31). Die Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Alanin<sup>20</sup> und Serin<sup>21</sup> der RNase A durch Subtilisin hat keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Enzyms (32). Die Kristallstrukturen von

RNase A und RNase S sind sehr ähnlich (33). Die Ribonuclease S hat jedoch eine geringere Stabilität bei niedrigem pH-Wert (34), bei der thermischen Denaturierung (35-37) und ist wesentlich empfindlicher gegenüber weiterem proteolytischen Abbau als die RNase A (38). Die RNase S kann durch Erniedrigung des pH-Werts (pH 2) in zwei Komponenten, dem S-Peptid (Aminosäuren 1-20) und dem S-Protein (Aminosäuren 21-124), getrennt werden. Gibt man das S-Peptid und das S-Protein bei pH-Werten von 4 bis 9 zusammen, so rekombinieren beide Fragmente wieder unter Bildung der enzymatisch aktiven Ribonuclease S (Abb. 5).

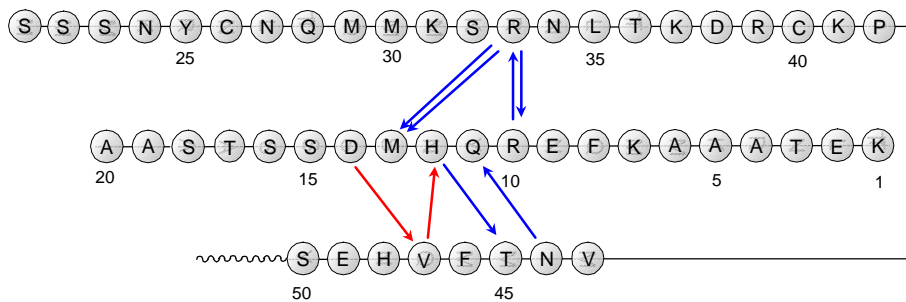


**Abbildung 5:** **A)** Die aus RNase A mittels Subtilisin-Behandlung erhaltene RNase S zerfällt bei niedrigem pH-Wert in zwei Fragmente, dem S-Peptid (Aminosäuren 1-20) und dem S-Protein (Aminosäuren 21-124). **B)** Bei pH-Werten von 4 bis 9 rekombinieren das S-Peptid und das S-Protein mit einer von den experimentellen Bedingungen abhängigen Assoziationskonstante ( $K_{Ass}$ ) unter Bildung der enzymatisch aktiven Ribonuclease S.

Die Bindung des S-Peptids an das S-Protein der RNase S erfolgt mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen (39, 40) und hydrophoben Wechselwirkungen (25, 41-44). In **Abbildung 6** sind die Sequenz und Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrats der Ribonuclease S dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Aminosäuren 3 bis 13 des S-Peptids in der RNase S eine  $\alpha$ -Helix bilden (39, 45). Wasserstoffbrückenbindungen, die in der Ribonuclease S zwischen dem S-Peptid und dem S-Protein ausgebildet werden, sind von entscheidender Bedeutung für die Stabilität des Proteins (**Abb. 6 u. 7**).



**Abbildung 6:** Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrats der RNase S. Die Pfeile führen vom Donor ( $\alpha$ -NH-Gruppe) zum Akzeptor ( $\alpha$ -CO-Gruppe) der Wasserstoffbrückenbindung.



**Abbildung 7:** Stabilisierung der RNase S durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen S-Peptid und S-Protein. Die blauen Pfeile kennzeichnen Wasserstoffbrückenbindungen, deren Akzeptor das  $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatom und deren Donor die Seitenkettenfunktion einer Aminosäure ist (Pfeilspitze zeigt zum Akzeptor). Die roten Pfeile zeigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen  $\alpha$ -NH- und  $\alpha$ -CO-Gruppen verschiedener Aminosäuren an.

Da sich das S-Peptid mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese relativ leicht synthetisieren lässt und Aminosäuren des S-Peptids sowohl an der Substratbindung, der Katalyse und der Ausbildung eines Sekundärstrukturelements ( $\alpha$ -Helix) beteiligt sind, kann man durch Aminosäureaustausch, Substitution mit nichtproteinogenen Aminosäuren oder Rückgratmodifizierungen die Bedeutung verschiedener Aminosäuren des S-Peptids für die Substratbindung, den Katalysemechanismus (44, 46-48) oder die Proteinestabilität (44, 49) untersuchen. Ein sehr bedeu-

tender Vorteil des RNase S Modellsystems ist die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Röntgenkristallstrukturen in Datenbanken (z.B. SwissProt PDB). Hier sind neben Strukturen des Enzyms mit gebundenen Inhibitoren, Aktivatoren oder Produkten der enzymkatalysierten Reaktion auch Röntgenkristallstrukturen von Komplexen des S-Proteins mit verschiedenen modifizierten S-Peptiden zu finden (A4Aib-; F8M-; F8A-; M13F,G,V,L,I- RNase S).

Untersuchungen zur thermodynamischen Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion erfolgen vorzugsweise mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC). Da bei dieser Methode eine direkte Messung von Enthalpieänderungen erfolgt, ist eine vollständige thermodynamische Charakterisierung des Bindungsprozesses ohne Modifizierung (z.B. Fluoreszenzmarkierung) oder Immobilisierung eines Interaktionspartners möglich (**50-52**). Die RNase S ist für ITC-Experimente aus mehreren Gründen besonders gut geeignet. Sowohl die RNase S als auch das S-Protein sind gut lösliche Proteine. Die Auswertung und Interpretation der erhaltenen Messergebnisse ist relativ einfach, da die Rekombination des S-Peptids und des S-Proteins in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 erfolgt. Während das S-Peptid bei 25 °C vollständig entfaltet vorliegt (**25, 42, 53**), ist das S-Protein unter identischen Bedingungen (Temperatur und Puffer) immer gleich strukturiert (**41, 54, 55**). Dies ist eine ganz entscheidende Voraussetzung, wenn man beabsichtigt, thermodynamische Konstanten der Interaktion des S-Proteins mit modifizierten S-Peptid-Derivaten zu vergleichen. Die Affinität des natürlichen, nichtmodifizierten S-Peptids liegt in einem für ITC- Messungen optimalen Bereich (**25, 41, 51**). Auf Grund der großen Signale (starke Enthalpieänderung), die man bei der Titration des S-Proteins mit dem S-Peptid erhält, sind die Fehler der thermodynamischen Konstanten die sich aus den Titrationskurven ergeben, relativ gering (**25**).



## 2. 2

### Eigenschaften der Thiopeptidbindung

Der Austausch des Sauerstoffatoms einer Peptidbindung gegen ein Schwefelatom hat, wie im Folgenden näher erläutert, einen definierten Einfluss auf verschiedene wichtige Eigenschaften der Peptidbindung (**Tab. 1**). Röntgenkristallstruktur-(**56-59**), IR-, CD- (**60, 61**) und NMR-(**60-63**) spektroskopische Untersuchungen sowie quantenmechanische Berechnungen (**64-67**) haben gezeigt, dass die Thiopeptidbindung in Analogie zur normalen Peptidbindung in einer Z- planaren Konformation vorliegt. Die C=S Bindung ist jedoch mit einer Bindungslänge von 1,65Å im Vergleich zur normalen Peptidbindung um 0,4 Å gestreckt.

**Tabelle 1:** Vergleich der Eigenschaften von Amid und Thioxoamidbindungen

Amid	Thioxoamid
C=O Bindungslänge: 1,24 Å	1,65 Å
C=O Bindungsenergie: ca. 170 kcal/mol	ca. 130 kcal/mol
kovalenter Radius des Sauerstoffatoms: ca. 0,73 Å	kovalenter Radius des Schwefelatoms: ca. 1,02 Å
Van-der-Waals Radius des Sauerstoffatoms: ca. 1,4 Å	Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms: ca. 1,85 Å
Elektronegativität des Sauerstoffatoms: ca. 3,5	Elektronegativität des Schwefelatoms: ca. 2,4
pk <sub>a</sub> des NH: ca. 17	11-13

Die Verwendung des Thioxoamidchromophors als Sonde für Konformationsänderungen des Rückgrats in Peptiden und Proteinen setzt voraus, dass diese Substitution in biologisch relevanten Peptidkonformationen oder Sekundärstrukturelementen akzeptiert wird. Dabei spielt vor allem die Fähigkeit zur Ausbildung intra- und intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen eine entscheidende Rolle. Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen unter Beteiligung einer Thiopeptidbindung werden in drei Klassen unterteilt (**61**):

1. NH-C=O----HN-C=S : mixed intramolecular hydrogen bonds (MIH)
2. NH-C=S----HN-C=O : inverse mixed intramolecular hydrogen bonds (IMIH)
3. NH-C=S----HN-C=S : thioamide thioamide intramolecular hydrogen bonds (TTIH)

Auf Grund einer im Vergleich zur Peptidbindung größeren Azidität der NH- Gruppe der Thiopeptidbindung (**68, 69**), sind Wasserstoffbrückenbindungen vom Typ MIH in der Regel stabiler. Die größere NH-Acidität ist jedoch nicht die Folge einer stärkeren Positivie-

nung des Wasserstoffatoms der Thioxoamidgruppe. So zeigen Ergebnisse theoretischer Berechnungen von Aláman (64), dass die positive Partiaalladung des Amidwasserstoffatoms einer normalen Amidbindung sogar größer ist als beim Thioxoamid (Tab. 2). Die größere NH-Acidität der Thioxoamidbindung ist vermutlich die Folge einer effektiveren Resonanzstabilisierung der nach Deprotonierung am Stickstoff vorliegenden negativen Ladung.

**Tabelle 2:** Quantenmechanisch berechnete Partiaalladungen der einzelnen Atome einer Amid- und Thioxoamidgruppe

Amid		Thioxoamid	
Atom	Partiaalladung	Atom	Partiaalladung
N	- 0,519	N	- 0,199
H	0,321	H	0,269
C	0,781	C	0,280
O	- 0,615	S	- 0,429

Die Berechnungen erfolgten unter Verwendung des *N*-Methylthio- bzw. *N*-Methylacetamids als Modellschubstanzen (nach C. Alemán, 64).

Wasserstoffbrückenbindungen bei denen das Schwefelatom eines Thioxoamids der Akzeptor ist (IMIH-Typ), sind in der Regel weniger stabil als Wasserstoffbrückenbindungen normaler Peptidbindungen (70, 71). Aus der Literatur sind nur wenige Beispiele für Wasserstoffbrückenbindungen des IMIH-Typs bekannt, die eine vergleichbare oder sogar etwas höhere Stabilität als Wasserstoffbrückenbindungen normaler Peptidbindungen aufweisen (72, 73). Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Form der Wasserstoffbrückenbindung eine geringere Stabilität aufweist, weil das Schwefelatom eines Thioxoamids auf Grund seiner geringeren Basizität ein schwächerer Akzeptor ist (70, 71). Neue Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass das Schwefelatom eine höhere Protonenaffinität als das Sauerstoffatom einer Amidgruppe hat. So konnte mit Hilfe theoretischer Berechnungen unter Verwendung von Formamid und Thioxoformamid als Modellverbindungen eine höhere Protonenaffinität für das Schwefelatom berechnet werden (65). Durch Analyse der thermodynamischen Stabilität von Wasserstoffbrückenbindungen mittels IR-Spektroskopie konnten Min et al. (74) auch experimentell eine höhere Protonenaffinität des Schwefelatoms im *N,N*-Dimethylthioformamid als für das Sauerstoffatom im *N,N*-Dimethylformamid nachweisen. Es zeigte sich, dass die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung unter Beteiligung des Schwefelatoms als Akzeptor von einer günstigeren Enthalpieänderung begleitet wird. Würde man nur die Enthalpieänderung berücksichtigen, wäre die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Schwefelatom einer Thioxoamidbindung als Akzeptor thermodynamisch günstiger. Häufig ist

die Gleichgewichtskonstante für die Ausbildung dieser Form der Wasserstoffbrückenbindung jedoch geringer. Die Ursache ist in einer etwas ungünstigeren Entropieänderung bei Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des IMIH-Typs zu sehen, die meistens durch die etwas günstigere Enthalpieänderung nicht kompensiert werden kann. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung ist mit einer negativen (thermodynamisch ungünstigen) Entropieänderung  $\Delta S$  verbunden. Dabei werden jedoch zahlreiche Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen aufgehoben, es erfolgt eine Umstrukturierung der Solvensmoleküle. Da dieser Prozess mit einer Zunahme der Unordnung verknüpft ist, wird er von einer positiven und somit günstigen Änderung der Entropie ( $\Delta S$ ) begleitet. Die aus beiden Ereignissen resultierende Gesamtentropieänderung ist negativ und somit für die Gesamtreaktion thermodynamisch ungünstig. Die Intensität der Gesamtentropieänderung hängt jedoch von der Stärke der Wechselwirkung der Substanzmoleküle mit den Solvensmolekülen ab. Je intensiver die Wechselwirkungen zwischen den Substanzmolekülen und den Solvensmolekülen sind, umso günstiger ist die Gesamtentropieänderung bei Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung. Das Lösungsmittel hat damit einen großen Einfluss auf die Stabilität der Wasserstoffbrückenbindung. Wie man den Daten der theoretischen Berechnungen von Alemán (64) entnehmen kann, haben Thioxoamide ein höheres Dipolmoment als die entsprechenden Oxoanaloge (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Quantenmechanisch berechnete Dipolmomente ( $\mu_{aq}$ ) und Änderungen der freien Energie der Solvatisierung ( $\Delta G_{Solv}$ ) einer Amid- und Thioxoamidgruppe in wässriger Lösung

Gruppe	$\Delta G_{Solv}$ (kcal/mol)	$\mu_{aq}$ (Debyes)
Amid	-9,4	5,41
Thioxoamid	-7,6	7,06

Die Berechnungen erfolgten unter Verwendung des *N*-Methylthio- bzw. *N*-Methylacetamids als Modellschubstanzen (nach Alemán, 64).

Man würde daher erwarten, dass sie in wässriger Lösung stärker solvatisiert sind. Tatsächlich errechneten die Autoren jedoch eine günstigere Änderung von  $\Delta G_{Solv}$  für das *N*-Methylacetamid, das somit stärker solvatisiert wird. Sie fanden jedoch eine direkte Korrelation von  $\Delta G_{Solv}$  mit den in Tabelle 2 aufgeführten Partiaalladungen der einzelnen Atome des *N*-Methylthio- bzw. *N*-Methylacetamids. Auf Grund der schwächeren Solvatisierung ist die Gesamtentropieänderung bei Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung mit dem Schwefelatom des *N*-Methylthioacetamids als Akzeptor ungünstiger als mit dem Sauerstoffatom des *N*-Methylacetamids. Die ungünstigere Entropieänderung überwiegt die bereits erwähnte für das *N*-Methylthioacetamid gefundene thermodynamisch günstigere Enthalpieänderung, so

dass die Wasserstoffbrückenbindung mit dem Schwefelatom des *N*-Methylthioacetamids als Akzeptor weniger stabil ist als mit dem Sauerstoffatom des *N*-Methylacetamids.

Ein weiterer sehr bedeutender Unterschied zwischen Amiden und Thioxoamiden ist die Höhe der Energiebarriere, die für die Rotation um die C-N-Bindung beobachtet wird. Die Rotation ist in Thioxoamiden erschwert (75-77). In einer systematischen Studie fanden Leopardi et al. (78) eine lineare Beziehung für die Höhe der Rotationsbarriere um die C-N-Bindung zwischen *N,N*-disubstituierten Amiden und Thioxoamiden in unpolaren Lösungsmitteln ( $\Delta G^\ddagger_{\text{Thioxoamid}} = a + b\Delta G^\ddagger_{\text{Amid}}$ ;  $a = 1,13$  u.  $b = 1,11$ ;  $\Delta G^\ddagger$  in kcal/mol). Obwohl die Höhe der Rotationsbarriere abhängig von der Polarität des Lösungsmittels (79) und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (80) ist, besitzt diese Gleichung auch Gültigkeit für die *cis/trans*-Isomerisierung von Thioxozeptiden (Xaa-Ψ[CS-N]-Pro-haltige Peptide, Xaa: verschiedene Aminosäuren) in wässriger Lösung (81-83, Tab. 4).

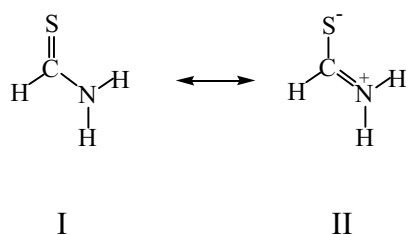
**Tabelle 4:** Thermodynamische Charakterisierung der *cis/trans*-Isomerisierung einer Aminoacyl-Prolyl-Peptidbindung und Aminoacyl-Prolyl-Thioxozeptidbindung

Peptid	$\Delta H^\ddagger$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (cal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\ddagger$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
<b>H-Ala-Pro-NH-Np</b>	18,9 ± 0,05	-1,46 ± 0,03	19,3 ± 0,05
<b>H-Ala-Ψ[CS-N]-Pro-NH-Np</b>	15,6 ± 0,21	-21,8 ± 1,6	22,0 ± 0,22

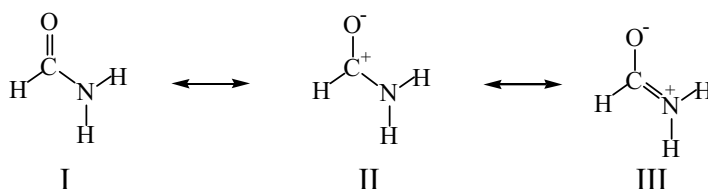
Die Aktivierungsparameter wurden mit Hilfe von Messungen in 35 mM Hepes-Puffer (pH 7,8) erhalten (81).

Die Energiebarriere der Rotation kann bei Thioxoamiden (84, 85) aber auch bei Thioxozeptiden (86, 87) so hoch sein, dass eine Trennung von *cis/trans*-Isomeren möglich wird. Zur Erklärung der erhöhten Rotationsbarriere hat sich heute ein Modell durchgesetzt, bei dem von einem engen Zusammenhang zwischen der Energiebarriere der Rotation und der Amidresonanz ausgegangen wird. Die Überlegungen, die diesem Modell zu Grunde liegen, beruhen vor allem auf quantenmechanischen Berechnungen (66, 67, 88-91). Berücksichtigt man nur die Elektronegativitäten eines Sauerstoff- (EN= 3,5) und eines Schwefelatoms (EN= 2,5) so würde man bei Amiden eine höhere Rotationsbarriere als bei Thioxoamiden erwarten. Die im Vergleich zum Schwefelatom höhere Elektronegativität des Sauerstoffatoms müsste beim Amid zu einem stärkeren Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung und somit zu einer höheren Energiebarriere der Rotation als bei Thioxoamiden führen. Die theoretischen Berechnungen ergaben jedoch für Thioxoamide einen höheren partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung als bei Amiden. Begründet wurden diese Ergebnisse mit der Größe des Schwefelatoms. Auf Grund der sehr ähnlichen Elektronegativitäten eines Schwefel- (EN= 2,5) und eines Kohlenstoffatoms (EN= 2,4), ist die Thiocarbonylbindung nur

wenig polarisiert und die Elektronendichte am Schwefelatom der Thioxoamidbindung relativ gering. Infolge dessen ist das Schwefelatom in der Lage einen großen Anteil der  $\pi$ -Elektronenladungsdichte vom Stickstoffatom der Thioxoamidbindung zu akkumulieren. Dieser  $\pi$ -Elektronentransfer wird durch die Größe des Schwefelatoms begünstigt, da sich die Ladungsdichte am Schwefelatom somit nicht so stark erhöht. Das die Größe des Schwefelatoms einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Höhe der Rotationsbarriere hat, zeigen Ergebnisse theoretischer Berechnungen an verschiedenen vom Formamid abgeleiteten Modellsubstanzen, bei denen das Sauerstoffatom des Formamids gegen ein Schwefel-, Selen- oder Telluratom ausgetauscht wurde. Dabei findet man eine Korrelation zwischen der Größe des Heteroatoms und der Höhe der Rotationsbarriere (67, 90). Die Ergebnisse der theoretischen Berechnungen lassen darauf schließen, dass die elektronischen Verhältnisse in einem Thioxoamid sehr gut durch die folgenden zwei Resonanzstrukturen beschrieben werden können:



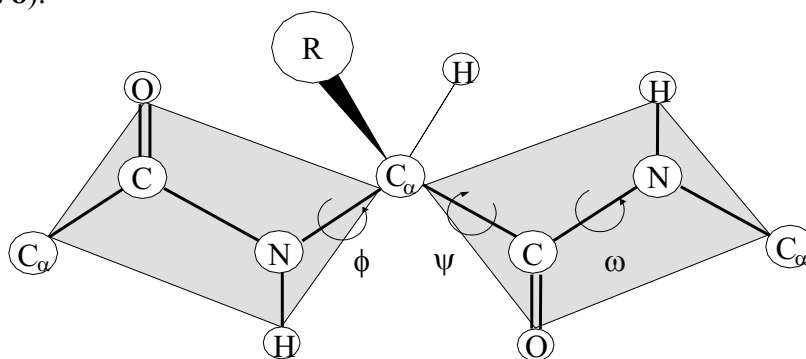
Im Formamid ist die C-O-Doppelbindung infolge der hohen Elektronegativität des Sauerstoffatoms stark polarisiert. Das Carbonylkohlenstoffatom ist sehr stark positiviert, während am Sauerstoffatom eine hohe negative Partialladungsdichte vorliegt (92). Die theoretischen Berechnungen ergaben, dass sich die C-O-Bindungslänge und die Ladungsdichte am Sauerstoffatom während der Rotation nur wenig ändern. Es wird daher während der Rotation kaum Ladung vom Amidstickstoff- oder vom Carbonylkohlenstoffatom auf das Sauerstoffatom übertragen. Während der Rotation um die C-N-Bindung erfolgt bei Amiden der  $\pi$ -Elektronenladungstransfer vor allem zwischen dem Amidstickstoff- und dem Carbonylkohlenstoffatom. Ein weiterer Ladungstransfer auf das Sauerstoffatom der Amidbindung wäre sehr energieaufwendig, da das Sauerstoffatom im Vergleich zum Schwefelatom relativ klein ist und durch seine Elektronegativität bereits eine hohe negative Partialladungsdichte hat. Die elektronischen Verhältnisse beim Formamid werden am besten durch die drei folgenden Resonanzstrukturen beschrieben:



Die Resonanzstruktur II spielt beim Thioxoformamid praktisch keine Rolle. Ein beträchtlicher Teil des Energiebetrags der Rotationsbarriere ist jedoch unabhängig von der  $\pi$ -Konjugation und somit nicht an die Amidresonanz geknüpft (**93**). Dieser Energiebetrag ist die Folge der Wechselwirkung zwischen dem freien Elektronenpaar am Stickstoff und dem positivierten Carbonylkohlenstoffatom. Diese Hyperkonjugation ist bei Amiden intensiver, da das Carbonylkohlenstoffatom hier stärker positiviert ist. Bei Thioxoamiden wird die schwächere Hyperkonjugation jedoch von der im Vergleich zu Amiden effektiveren  $\pi$ -Konjugation überkompensiert.

Aufgrund der Ladungsverschiebungen zwischen dem Stickstoff- und dem Schwefelatom haben Thioxoamide ein deutlich größeres Dipolmoment als die entsprechenden nichtthioxylierten Derivate (**Tab. 3**). Da sich darüber hinaus die Dipolmomente während der Rotation ändern, haben dipolare Wechselwirkungen zwischen den Substanz- und Lösungsmittelmolekülen ebenfalls einen großen Einfluss auf die Höhe der Rotationsbarriere. So konnten Wiberg et al. zeigen, dass die Rotationsbarrieren des *N,N*-Dimethylthioxoformamids und des *N,N*-Dimethylthioxoacetamids von der Polarität des Lösungsmittels abhängen (**91**). Da bei den thioxylierten und nichtthioxylierten Derivaten das Dipolmoment des Grundzustands stärker ist als im Übergangszustand, wird der Grundzustand der Rotation durch dipolare Wechselwirkungen mit den Lösungsmittelmolekülen stärker stabilisiert als der Übergangszustand. Infolge dessen steigt die Energiebarriere der Rotation mit der Polarität des Lösungsmittels. Die Dipolmomente von Grund- und Übergangszustand unterscheiden sich bei den thioxylierten Verbindungen deutlich stärker als bei den nichtthioxylierten Verbindungen, wodurch die Energiebarriere der Rotation stärker mit der Polarität des Lösungsmittels zunimmt als bei den nichtthioxylierten Derivaten.

Ein lineares Peptid existiert in Lösung in einer Vielzahl von Konformationen, die sich aus den Rückgratwinkeln  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  im Bereich jeder einzelnen Aminosäure bzw. Peptidbindung ergeben (**Abb. 8**).



**Abbildung 8:** Die Rückgratkonformation eines Peptids wird durch die Torsionswinkel  $\phi$ ,  $\psi$  jeder einzelnen Aminosäure und den Winkel  $\omega$  bestimmt.

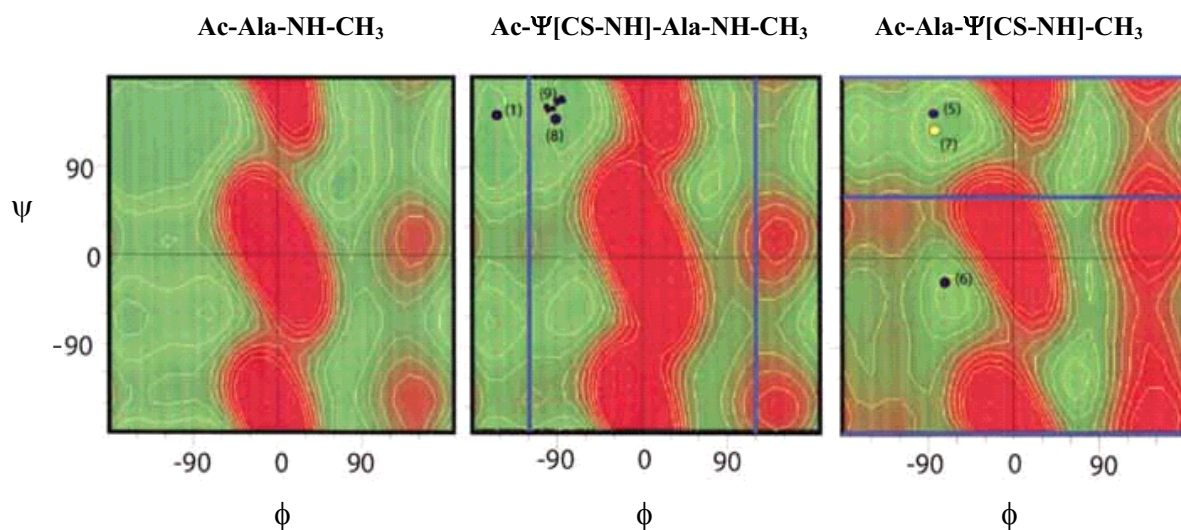
Die Bezeichnung der Torsionswinkel erfolgt dabei entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission von 1969 (94). Im Prinzip könnten die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  jeden Wert zwischen  $-180^\circ$  und  $180^\circ$  annehmen. Die Überlappung der Van-der-Waals Radien von Atomen des Peptidrückgrats bewirkt jedoch eine Einschränkung der möglichen  $\phi$  und  $\psi$  Winkel und damit eine Verringerung der konformativen Freiheitsgrade des Peptids. Ramachandran beschrieb 1968 diese Problematik, indem er unter Annahme definierter Van-der-Waals Radien für die entsprechenden Atome die erlaubten  $\phi$  und  $\psi$  Winkel in einem Diagramm darstellte (95). Ihm zu Ehren bezeichnet man diese Form der Darstellung als Ramachandran-Plot. Mit den heutigen Möglichkeiten der quantenmechanischen Berechnungen, lassen sich den entsprechenden Kombinationen der  $\phi$  und  $\psi$  Winkel definierte Energien zuordnen, die man im Ramachandran-Plot in Form farbiger oder durch Linien begrenzter Energiebereiche darstellen kann.

Auf Grund des größeren kovalenten (96) und Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms (97) sowie der größeren Länge der Thiocarbonylbindung sind die möglichen  $\phi$  und  $\psi$  Winkel einer thioxylierten Aminosäure stärker eingeschränkt (92, 93, 98-101). Dies hat eine große Bedeutung wenn man beabsichtigt, die Thioxoamidsubstitution in typische Sekundärstrukturelemente von Proteinen ( $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen) einzuführen. Theoretische Berechnungen haben gezeigt, dass die Thioxoamidsubstitution innerhalb von  $\beta$ -Faltblatt- und Schleifenstrukturen sowie  $\alpha$ -Helices toleriert wird (92, 98-101). Mit Hilfe verschiedener Methoden der Strukturaufklärung (NMR, IR, Röntgenstrukturanalyse) an thioxoamidsubstituierten Oligopeptiden konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Schleifen durch das Schwefelatom nicht gestört wird (57, 102-106). Lediglich die Ausbildung einer  $\beta$ -Schleife vom Typ II wird durch den größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms behindert, wenn sich dieser in der Position  $i+1$  der  $\beta$ -Schleife befindet. Nur wenn sich in der Position  $i+2$  ein Glycin befindet, wird die Thioxoamidsubstitution in der Position  $i+1$  der  $\beta$ -Schleife vom Typ II akzeptiert (98, 105, 106). In **Tabelle 5** sind die wichtigsten in Proteinen vorkommenden Sekundärstrukturelemente und die dazu gehörigen idealen Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  zusammengefasst (21, 98).

In **Abbildung 9** wurden die Ergebnisse der quantenmechanischen Berechnungen des Energiegehaltes von **Ac-Ala-NH-CH<sub>3</sub>**, **Ac- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-NH-CH<sub>3</sub>** und **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** als Funktion der Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  dargestellt. Besonders deutlich ist in diesen Abbildungen die Einschränkung der möglichen  $\phi$  und  $\psi$  Winkel bei den thioxylierten Verbindungen zu erkennen (rot gekennzeichnete Bereiche).

**Tabelle 5:** Typische Sekundärstrukturelemente von Proteinen und dazu gehörige Idealwinkel für  $\phi$  und  $\psi$

Sekundärstrukturelement	Torsionswinkel	
	$\phi$	$\psi$
<b><math>\beta</math>-Faltblattstruktur</b>		
parallel	$-119^\circ$	$+113^\circ$
antiparallel	$-139^\circ$	$+135^\circ$
<b><math>\alpha</math>-Helix</b>		
rechtsgängig	$-57^\circ$	$-47^\circ$
linksgängig	$+57^\circ$	$+47^\circ$
<b><math>\beta</math>-Turn Typ 1</b>		
Position i+1	$-60^\circ$	$-30^\circ$
Position i+2	$-90^\circ$	$0^\circ$
<b><math>\beta</math>-Turn Typ 2</b>		
Position i+1	$-60^\circ$	$+120^\circ$
Position i+2	$+90^\circ$	$0^\circ$



**Abbildung 9:** Quantenmechanisch berechneter Energiegehalt der Substanzen **Ac-Ala-NH-CH<sub>3</sub>**, **Ac-Ψ[CS-NH]-Ala-NH-CH<sub>3</sub>** und **Ac-Ala-Ψ[CS-NH]-CH<sub>3</sub>** in Abhängigkeit von den Winkeln  $\phi$  und  $\psi$  des Alanins bzw. Thioalanins (nach Tran et al.: 100). Bereiche niedriger Energie (günstige Konformationen) sind in grüner, Bereiche hoher Energie (ungünstige oder verbotene Konformationen) sind in roter Farbe dargestellt. Die weißen Linien grenzen Areale gleichen Energiegehalts ab. Das im Zentrum eines grünen Bereiches liegende Areal hat den niedrigsten Energiegehalt. Das durch eine weitere weiße Linie begrenzte umgebende Areal hat einen jeweils um 1 kcal/mol höheren Energiegehalt. Die nummerierten Punkte entsprechen Kombinationen von  $\phi$  und  $\psi$  Winkeln, die experimentell mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse gefunden wurden. Punkt 1: **Boc-Gly-Ψ[CS-NH]-Ala-Aib-OMe**, Punkt 5: **Ac-Ala-Ψ[CS-NH]-CH<sub>3</sub>**, Punkt 6: **Boc-Gly-Ala-Ψ[CS-NH]-Aib-O-Me**, Punkt 7: **Boc-Ala-Ψ[CS-NH]-CH<sub>3</sub>**, Punkt 8: **Ac-Ψ[CS-NH]-Gly-Ala-Aib-O-Me** und Punkt 9: **Ac-Ψ[CS-NH]-Ala-NH-CH<sub>3</sub>**. Die blauen Linien sind visuelle Hilfen um Bereiche, die infolge der Thioamidsubstitution einen höheren Energiegehalt besitzen, hervorzuheben.



So bewirkt eine Thioxylierung eine deutliche Energieerhöhung, wenn die nachfolgende Aminosäure  $\phi$ -Winkel in der Nähe von  $-120^\circ$  und  $+120^\circ$  annimmt. Man erkennt dies sehr gut anhand des Ramachandran-Plots, der für die Verbindung **Ac- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-NH-CH<sub>3</sub>** erhalten wurde. Bei einem Winkel von  $\phi = +120^\circ$  ergibt sich eine Überlappung zwischen dem Schwefelatom und der  $C^\alpha$ -Methylgruppe des Alanins. Der Kontakt des Schwefelatoms mit dem  $C^\alpha$ -H-Atom des Alanins erschwert die Ausbildung von Konformationen bei denen  $\phi$  im Bereich von  $-120^\circ$  liegt. Eine Thioxylierung vor dem Alanin verbietet aber auch  $\phi$ -Winkel im Bereich von  $0^\circ$ , da es in diesem Fall in Abhängigkeit vom  $\psi$ -Winkel zum Kontakt des Schwefelatoms mit dem Carbonylsauerstoff- bzw. dem Carbonylkohlenstoffatom des Alanins oder dem Amidstickstoff- bzw. Amidwasserstoffatom der *N*-Methylamidgruppe kommt. Im **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** werden die  $\phi$  und  $\psi$  Winkel noch stärker eingeschränkt. Auf Grund der Überlappung des Schwefelatoms mit der  $C^\alpha$ -Methylgruppe bzw. dem Stickstoffatom des Alanins sind Konformationen mit einem  $\psi$ -Winkel in der Nähe von  $+60^\circ$  und  $+180^\circ$  sehr unwahrscheinlich.

Die quantenmechanischen Berechnungen zeigen, dass der Einbau einer thioxylierten Aminosäure in eine  $\alpha$ -Helix theoretisch möglich ist. Es wurde jedoch zunächst angenommen, dass die Thioxoamidsubstitution nur kompatibel mit den letzten vier Aminosäuren einer  $\alpha$ -Helix ist, da somit nur die NH-Gruppe der Thioxo-peptidbindung als Donor in die Wasserstoffbrückenbindungen der  $\alpha$ -Helix eingebunden ist. In anderen Positionen der  $\alpha$ -Helix würde das Schwefelatom auf Grund der Verlängerung der C-S...N-H-Wasserstoffbrückenbindung (von ca. 2,1 auf 2,7Å) zu einer Unterbrechung der helicalen Struktur führen (**98, 107**). Miwa et al. konnten jedoch experimentell beweisen, dass entgegen den theoretischen Berechnungen die Thioxoamidsubstitution sogar zu einer Zunahme der Stabilität einer  $\alpha$ -Helix führen kann (**73**). Im Gegensatz zu den theoretischen Berechnungen konnten sie zeigen, dass die Thioxo-peptidbindung im Bereich des C-Terminus oder in der Mitte einer  $\alpha$ -Helix ohne Abnahme der Helixstabilität toleriert wird.

### 2.3 Biochemische Auswirkungen der Thioxoamidsubstitution

Thioxopeptide wurden häufig mit dem Ziel einer gesteigerten Proteolyseresistenz bei gleichzeitigem Erhalt der biologischen Wirkung synthetisiert. Aus der Literatur sind nur wenige Beispiele bekannt die zeigen, dass Thioxopeptide durch Proteasen schneller abgebaut werden als die entsprechenden nichtmodifizierten Peptide. So wird ein thioxyliertes Derivat des "Thyrotropin releasing hormone" (TRH, **pGlu-His-Pro-Ψ[CS-NH]-H**) in humanem Plasma dreimal schneller als das natürliche Hormon (**108**) abgebaut. Meistens erfolgt die enzymatische Hydrolyse thioxylierter Peptide mit einer deutlich geringeren Geschwindigkeit als der proteolytische Abbau natürlicher Peptidsubstrate. Ergebnisse systematischer Studien zum Einfluss der Thioxylierung von Peptidsubstraten auf die Aktivität verschiedener Proteasen [Aminopeptidase P (**81**), Dipeptidylpeptidase IV (**81, 109**), Papain (**109**), Prolyl oligopeptidase (**110, 82**),  $\alpha$ -Chymotrypsin (**109, 83**) und Carboxypeptidase A (**111-114**)] deuten darauf hin, dass die meisten Proteasen nicht in der Lage sind, eine Thioxoamidbindung zu spalten. Ausnahmen bilden die Enzyme Dipeptidylpeptidase IV und Carboxypeptidase A, die eine Thioxoamidbindung in Analogie zur Peptidbindung unter Bildung einer Thioxoamidsäure und eines Amins hydrolysieren können. In der Regel führt eine Thioxylierung der Peptidbindung in der P<sub>1</sub>- bzw. P<sub>2</sub>- Position der Proteasesubstrate zu einer deutlichen Abnahme des  $k_{cat}$ -Werts (bzw. zu einem nichthydrolysierbaren Derivat), während sich die  $K_m$ -Werte oft nur wenig ändern. Eine Ausnahme bildet auch hier die Dipeptidylpeptidase IV, bei der die Thioxylierung eines Substrats in der P<sub>2</sub>-Position eine deutliche Erhöhung des  $K_m$ -Werts bewirkte.

Häufig ist es möglich, das Substrat einer Protease durch Thioxylierung der zu spaltenden Peptidbindung in einen kompetitiven Inhibitor umzuwandeln (**115**). Auf diese Weise konnten Inhibitoren der HIV-1-Protease entwickelt werden. Die HIV-1 Protease ist aus medizinischer Sicht ein besonders interessantes Enzym, da Inhibitoren dieses Enzyms in Kombination mit anderen Medikamenten bereits zur Behandlung der HIV-Erkrankung eingesetzt werden. Das Enzym katalysiert die Spaltung von Phe-Phe-Peptidbindungen und ist für den Vermehrungszyklus des Virus von entscheidender Bedeutung (**116**). Die Thioxylierung einer beliebigen Position innerhalb des Peptidsubstrates **H-Ala-Ala-Phe-Phe-Val-Val-OMe** führte zu kompetitiven Inhibitoren der HIV-1 Protease (**117**).

Während die Thioxoamidsubstitution oft wie erwartet zu einer Erhöhung der Proteolysestabilität führt, sind die Effekte der Thioxylierung auf die Aktivität von Peptiden, die ihre biologische Funktion durch Wechselwirkung mit einem Rezeptor entfalten, nicht vorher

zusagen. So kann die Thioxylierung biologisch aktiver Peptide zu Derivaten mit deutlich gesteigerter, unveränderter oder stark verringerter biologischer Aktivität führen. Als erstes wurde die biologische Aktivität eines am C-Terminus thioxoamidsubstituierten Oxytocinderivats untersucht, welches im Vergleich zum nichtmodifizierten Derivat eine deutlich verringerte Oxytocin- und Vasopressin-Aktivität aufweist (118). Die Thioxylierung eines zyklischen Oxytocinderivats führte zu einer deutlichen Steigerung der Affinität gegenüber dem Oxytocin- und Vasopressinrezeptor (119).

Thioxoamid-substituierte Derivate des "Thyrotropin releasing hormone" (TRH, **pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>**) besitzen mit Ausnahme eines dithioxylierten Derivats eine dem natürlichen Peptidhormon vergleichbare Aktivität (120-123). Bei zwei der thioxylierten TRH-Analoga wurde eine Präferenz entweder für den Hypophysen- oder den Nebennierenrinden-TRH-Rezeptor gefunden (123).

Aus der Wurzel der *Rubia Akane* können antiproliferativ und gegenüber Tumorzellen zytotoxisch wirkende zyklische Peptide isoliert werden. Eine Thioxylierung dieser Peptide führte zu Derivaten, die zum Teil eine deutlich gesteigerte zytotoxische Aktivität gegenüber lymphatischen Leukämiezellen der Maus und Tumorzellen eines epidermalen Nasopharynxkarzinoms besitzen (124).

Im **Kapitel 2. 2** wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Energiebarriere der Isomerisierung einer Thioxozeptidbindung so hoch sein kann, dass eine Trennung der *cis/trans*-Isomere eines Peptids möglich ist. Es ergibt sich somit die Möglichkeit, durch minimale Veränderungen eines Moleküls (*O/S*-Austausch) die Konformerspezifität von Rezeptoren oder anderer Proteine für pharmakologisch interessante Substanzen zu ermitteln. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (2) zeigen, dass die beiden Endomorphine **H-Tyr-Ψ[CS-N]-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>** und **H-Tyr-Ψ[CS-N]-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>** ( $\mu$ -Opioidrezeptor-selektive Endomorphinderivate) in ihrer biologisch aktiven Konformation eine Tyr-Ψ[CS-N]-Pro-Peptidbindung in der *cis*-Konformation aufweisen. Dies ist ein sehr interessantes Ergebnis, da die Anwendung von Opiaten in der Medizin als stärkste bekannte Antianalgetika weit verbreitet ist. Die antianalgetische Wirkung der Opiate und die bekannten Nebenwirkungen (Atemdepression, Abhängigkeit) werden vermutlich von verschiedenen Subtypen der Opiatrezeptoren vermittelt. Deshalb helfen Untersuchungen zur Konformationsspezifität dieser Rezeptoren bei der Suche nach neuen und selektiver wirkenden Schmerzmedikamenten.

Mit Hilfe thioxylierter Peptidsubstrate konnte die Konformerspezifität des intestinalen H<sup>+</sup>/Peptid-Symporters PEPT1 nachgewiesen werden. Der intestinale H<sup>+</sup>/Peptid-Symporter PEPT1, mit dessen Hilfe die Aufnahme von Di- und Tripeptiden im Dünndarm erfolgt, bindet

das Thioxozeptid **H-Ala-Ψ[CS-N]-Pro-OH** mit einer für **Ala-Xaa** Dipeptide vergleichbaren Affinität (Xaa: verschiedene Aminosäuren), wenn die Thioxozeptidbindung in der *trans*-Konformation vorliegt. Das *trans*-Konformer wird im Gegensatz zum *cis*-Konformer mit Hilfe des PEPT1-Symporters in die Zelle transportiert (3).

Nach dem heutigen Stand der Erkenntnis sind Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen nicht in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung einer Thioxoacyl-Prolyl-Peptidbindung zu katalysieren, obwohl thioxylierte Peptidsubstratanaloga als kompetitive Inhibitoren von den Isomerasen gebunden werden (83, 125). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass das von einem Substrat abgeleitete Thioxozeptid **H-Ala-Gly-Ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np** einen kompetitiven Inhibitor des cytosolischen humanen Cyclophilins18 (Cyp18) darstellt, welches in Form des *cis*- Isomers deutlich fester an das Enzym bindet als das *trans*- Konformer ( $K_i^{cis} = 82 \mu\text{M}$ ;  $K_i^{trans} = 2500 \mu\text{M}$ ; 83).

Interessante Ergebnisse wurden mit thioxoamidsubstituierten Cyclosporin A- Derivaten erzielt. Cyclosporin A (CsA) ist ein zyklisches Oligopeptid, das zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen eingesetzt wird. CsA entfaltet seine biologische Wirkung durch Bindung an Cyp18, welches in Form des Cyp18/CsA-Komplexes die Proteinphosphatase Calcineurin (CaN) in T-Zellen inhibiert. Die Langzeitbehandlung eines Patienten mit Cyclosporin A wird von zahlreichen Nebenwirkungen begleitet. Deshalb gilt der Suche nach selektiver wirkenden CsA-Derivaten besonderes Interesse. Die Thioxylierung des CsA führte zu Derivaten mit verringerter immunsuppressiver Aktivität (126, 127), die vermutlich auf Konformationsänderungen bzw. veränderten Wasserstoffbrückenbindungen im Komplex zurückzuführen sind. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Inhibierung des rekombinanten humanen Cyp18 von der Position der Thioxylierung im CsA-Molekül (125). Dabei besaß das [<sup>4</sup>Ψ<sup>5</sup>CSNH][<sup>7</sup>Ψ<sup>8</sup>-CSNH]-CsA eine etwas stärkere Affinität zum Cyp18. Alle getesteten Cyp18/ThioxoCsA-Komplexe bewirkten eine stärkere Hemmung des Calcineurins, erwiesen sich jedoch als weniger immunsuppressiv. Die Bestrahlung der thioxylierten CsA-Derivate mit Laserlicht führte zu Konformationsänderungen, die sich in einer veränderten Affinität des CsA-Derivats gegenüber Cyp18 bzw. einer Änderung der Inhibierung des Calcineurins durch den Cyp18/CsA-Komplex manifestierten.

## 2.4 Spektroskopische Eigenschaften der Thiopeptidbindung

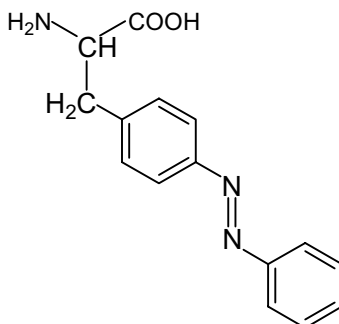
Die Thiopeptidbindung unterscheidet sich in ihren UV- und CD- spektroskopischen Eigenschaften grundlegend von einer Peptidbindung und stellt eine Sonde für Untersuchungen von Konformationsänderungen in Peptiden dar. Das Absorptionsmaximum einer Peptidbindung im Bereich von  $\sim 190$  nm ( $\epsilon$ :  $\sim 7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ist auf  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$  Übergänge zurückzuführen, während Absorptionsbanden im Bereich von  $\sim 220$  nm ( $\epsilon$ :  $\sim 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )  ${}^1n\text{-}{}^3\pi^*$  Übergängen zugeordnet werden (**128**). Die Substitution des Sauerstoffatoms der Peptidbindung gegen ein Schwefelatom führt zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$  Übergangs in den Bereich von 250 bis 285 nm ( $\epsilon$ :  $\sim 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und des  ${}^1n_s\text{-}{}^3\pi^*$  Übergangs in den Bereich von 300 bis 350 nm ( $\epsilon$ :  $\sim 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Dabei werden mit  $n_s$  die nichtbindenden Orbitale des Schwefelatoms bezeichnet (**62, 129-132**).

Im  ${}^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum erscheint das Thiocarbonylkohlenstoffatom der Thiopeptidbindung bei 200-206 ppm und ist somit gegenüber dem Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung um ca. 30 ppm Tieffeld verschoben. Das Amidwasserstoffatom der Thiopeptidbindung ist im  ${}^1\text{H}$  NMR-Spektrum im Vergleich zur Peptidbindung um ca. 1,5-2 ppm Tieffeld verschoben (**62**).

Peptidbindungen und Thiopeptidbindungen unterscheiden sich auch in ihren IR-spektroskopischen Eigenschaften. Die IR-Spektroskopie ist eine besonders gut geeignete Methode, um Wasserstoffbrückenbindungen in Peptiden und Proteinen oder Strukturänderungen, die unter Veränderungen von Wasserstoffbrückenbindungen verlaufen, zu charakterisieren (**128**). Die Amid-A-Bande (N-H-Streckschwingung) der Thiopeptidbindung erscheint, wenn die Messungen in unpolaren Lösungsmitteln erfolgen, bei einer Wellenzahl von  $\sim 3400\text{-}3420 \text{ cm}^{-1}$  und bei der Peptidbindung im Bereich von  $\sim 3430\text{-}3460 \text{ cm}^{-1}$ . Die Amid-A-Bande ist besonders sensitiv für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und wird dabei zu einer niedrigeren Wellenzahl verschoben (**61, 102**).

## Thioxozeptidbindungen als photoschaltbares Element der Konformation von Peptiden

Bei der Entwicklung von Methoden zur photoinduzierten Schaltung der Struktur und damit der biologischen Aktivität von Proteinen, Peptiden oder Proteinliganden werden chemische Modifizierungen verwendet, die eine lichtinduzierte Strukturänderung im Molekül bewirken können. Bereits 1977 gelang Aizawa et al. (133) die Darstellung Spiropyran-modifizierter Enzyme, deren biologische Aktivität mit Hilfe von Licht kontrolliert werden konnte. Willner et al. (134) beschrieben ein Azobenzol-modifiziertes Papain, dessen Aktivität mit Hilfe von UV-Licht geschaltet werden konnte. In beiden zitierten Beispielen erfolgte die Modifizierung des Proteins jedoch nicht zielgerichtet, sondern durch chemische Reaktion an Aminosäureseitenketten des Enzyms. Die zielgerichtete Modifizierung eines Proteins mit einem photoschaltbaren Element gelang Hamachi et al. (135) bzw. Liu et al. (136) durch Austausch von Aminosäuren des S-Peptids der RNase S gegen Phenylazophenylalanin, dessen Struktur in der **Abbildung 10** dargestellt ist. Ein großer Nachteil der erwähnten photoschaltbaren Gruppen bei der Modifizierung von Proteinen liegt in ihrer Größe begründet, da auf Grund der Packungsdichte der Atome im Inneren eines Proteins eine Modifizierung nur an der Proteinoberfläche erfolgen kann.



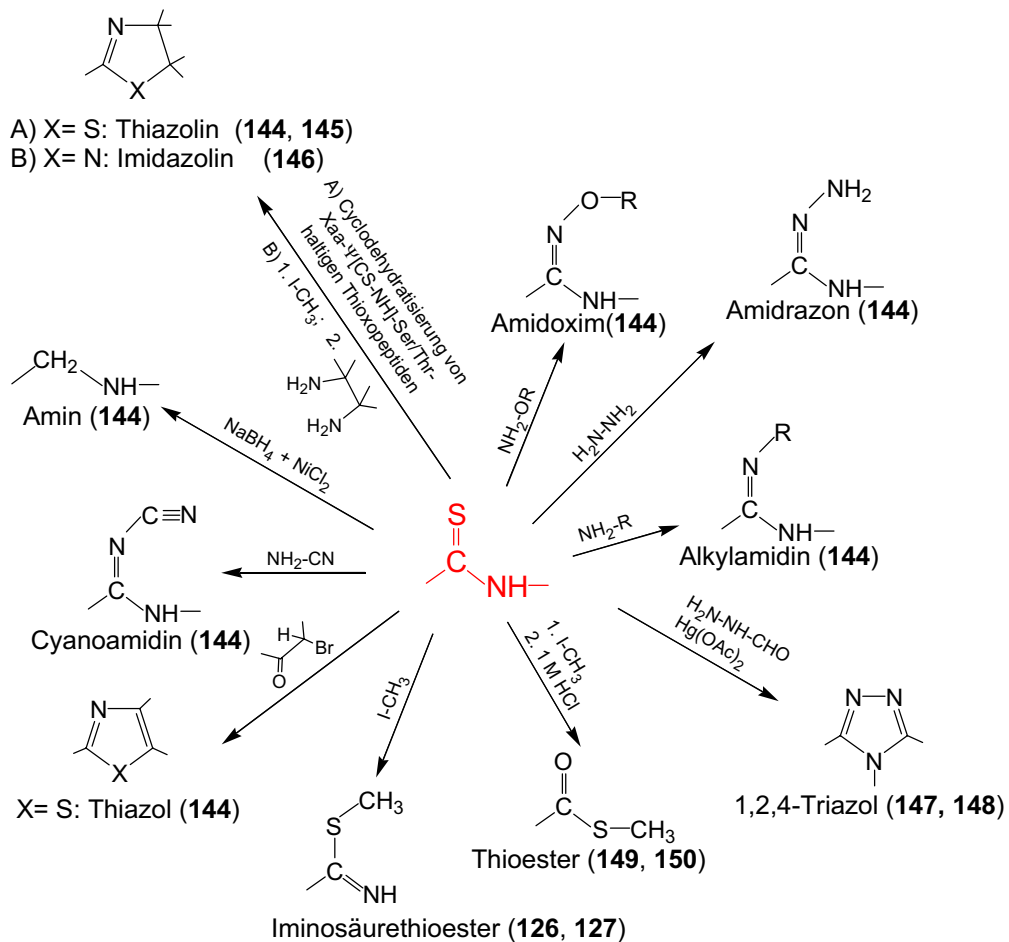
**Abbildung 10:** Struktur des Phenylazophenylalanins

Kato et al. (132) konnten in den UV-Spektren wässriger Lösungen des *N*-Methylthioacetamids nach Bestrahlung mit UV-Licht einer Hg-Lampe ( $\lambda = 253,7$  nm) eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima um 5 nm, verbunden mit einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten um ca. 10 % beobachten, die auf eine Erhöhung des Gehalts an *cis*-Konformer zurückgeführt werden konnten. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde eine Relaxation zu den Ausgangsspektren beobachtet. Diese Ergebnisse erweckten die Hoffnung, mit der Thioxozeptidbindung ein besonders gut geeignetes photoschaltbares Element in Peptide bzw. Proteine einführen zu können, mit deren Hilfe die Konformation und damit möglicherweise

auch die biologische Aktivität lichtinduziert geschaltet werden kann. Durch Anregung des  $^1n_s-^3\pi^*$ -Übergangs der Thioxoamidbindung zweier thioxylierter Endomorphinderivate mittels  $N_2$ -Laser bei 337 nm, gelang die reversible Photoisomerisierung von Thioxoacyl-Prolyl-Peptidbindungen (Anreicherung des *cis*-Konformer) und die Trennung der Isomere mittels präparativer HPLC (86), die anschließend bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht wurden (Abschnitt 2. 3). Der Prozess der Photoisomerisierung und die isolierten Konformere konnten anschließend UV-, NMR- und CD-spektroskopisch charakterisiert werden. Da die Untersuchungen zur Photoisomerisierung des *N*-Methylthioxoacetamids zu einer Photozersetzung führten, wurde bisher angenommen, dass die Thioxoamidsubstitution nur für die Photoisomerisierung von Thioxoacyl-Prolyl-Peptidbindungen geeignet ist (132, 137). Neue Ergebnisse zeigen jedoch, dass unter geeigneten Bedingungen eine reversible Photoisomerisierung durch Anregung des  $^1\pi-^1\pi^*$ -Übergangs der sekundären Thioxoamid Peptidbindung ohne Photozersetzung möglich ist (138). Dies ist ein sehr bedeutendes Ergebnis, da es bis zum heutigen Zeitpunkt keine isostere Rückgratmodifizierung eines Peptids oder Proteins gibt, die neben der Thioxoamidsubstitution als Kandidat für eine photoschaltbare Sonde der Konformationsänderung in Frage kommt und gleichzeitig eine Charakterisierung der Dynamik der lichtinduzierten reversiblen Strukturänderung mit einfachen Methoden der UV-, CD- oder NMR-Spektroskopie erlaubt. Die Anwesenheit einer Peptidbindung in der *cis*-Konformation kann einen großen Einfluss auf die Proteinstruktur und auf die Kinetik der Proteinfaltung haben. Die *cis/trans*-Isomerisierung von sekundären und tertiären Amid Peptidbindungen ist häufig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinfaltung (4, 5). In einigen Proteinen wurden im nativen Zustand sekundäre Amid *cis*-Peptidbindungen gefunden (139-143). Demzufolge ist für das Verständnis der Dynamik der Proteinfaltung unter anderem auch eine genaue kinetische und thermodynamische Charakterisierung der *cis/trans*-Isomerisierung von sekundären und tertiären Amid Peptidbindungen nötig. Möglicherweise eignet sich daher die photoschaltbare Thioxoamidbindung besonders gut für Untersuchungen der Dynamik und des Mechanismus von Proteinfaltungsvorgängen.

## 2. 6 Thiopeptide als Synthons für die Herstellung modifizierter Peptide

Thiopeptide können als Synthons für die Herstellung verschiedener Rückgrat-modifizierter Peptide verwendet werden. Das Schwefelatom der Thioxoamidbindung weist auf Grund seines nucleophilen Charakters eine beachtliche Reaktionsfähigkeit bezüglich von  $S_N$ -Reaktionen auf. Die Elektrophilie des Kohlenstoffatoms der Thioxoamidbindung kann durch Quecksilber-II-Ionen gesteigert werden, so dass eine gezielte Modifizierung des Peptidrückgrats durch Angriff eines Nucleophils auf das Thiocarbonylkohlenstoffatom möglich wird. In **Abbildung 11** sind einige Beispiele für die gezielte Modifizierung von Peptiden unter Ausnutzung der erhöhten Reaktivität der Thiopeptidbindung zusammengefasst.



**Abbildung 11:** Modifizierungsmöglichkeiten von Thiopeptiden

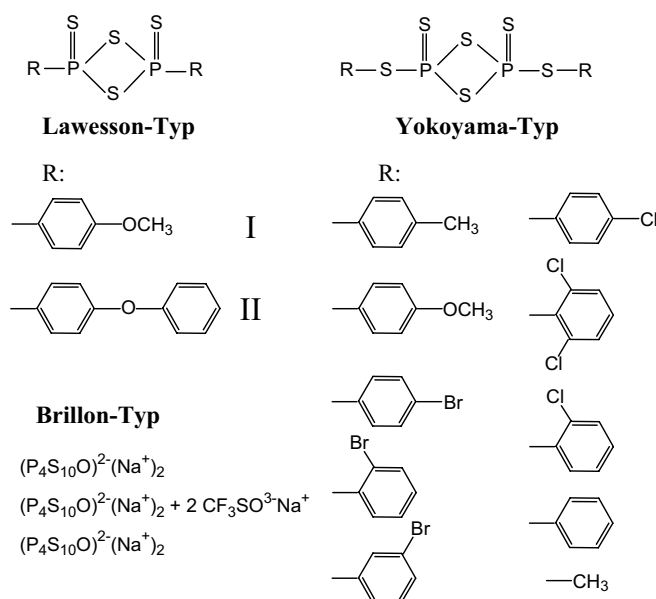
Mit Hilfe der Thioxoamidbindung können chemische Modifikationen in definierte Positionen des Peptidrückgrats eingeführt werden (Literaturstellen in Klammern).



## 2. 7

## Synthese thioxylierter Oligopeptide

Die Synthese eines thioxylierten Oligopeptids ist prinzipiell schwierig, insbesondere wenn es trifunktionelle Aminosäuren (reaktive Seitenketten) enthält. Man unterscheidet zwei Synthesestrategien. Bei der ersten Strategie, die als **“globale Thioxylierung“** bezeichnet werden soll, wird ein vollständig geschütztes Peptid mit einem Thioxylierungsreagenz umgesetzt. Dabei wird das Sauerstoffatom der Peptidbindung gegen ein Schwefelatom ausgetauscht. In **Abbildung 12** sind die wichtigsten Thioxylierungsreagenzien dargestellt, die bereits erfolgreich für die Synthese thioxylierter Peptide verwendet wurden.



**Abbildung 12:** Die bekanntesten Thioxylierungsreagenzien sind die Verbindungen vom Lawesson-, Brillon- und Yokoyama-Typ.

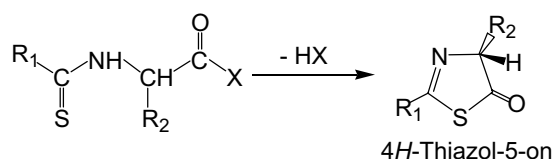
Die erste erfolgreiche Thioxylierung eines Aminosäurederivats, welches der Darstellung eines Thioxoamid-substituierten Oligopeptids (Oxytocin-Analoga) diene, gelang Jones et al. (118) durch Reaktion von Z-Gly-NH<sub>2</sub> mit P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>. Frühere Versuche der Thioxylierung verschiedener Peptide mittels P<sub>4</sub>S<sub>10</sub> blieben erfolglos (151), da die freie Aminogruppe der verwendeten Peptide (oder andere im Reaktionsansatz vorhandene Nucleophile) diese Reaktion hemmen (152). Mit dem **2,4-Bis(4-Methoxyphenyl)-2,4-dithioxo-1,3,2,4-dithiadiphosphetan** (Abb. 12, Struktur I), welches von Lecher et al. (153) erstmalig beschrieben und von Lawesson et al. (154) systematisch auf seine Eignung zur Synthese verschiedener Thiocarbonylverbindungen untersucht wurde, konnte erstmals ein thioxyliertes Dipeptid erhalten werden (155). Das **2,4-Bis(4-Methoxyphenyl)-2,4-dithioxo-1,3,2,4-dithiadiphosphetan** ist heute auch unter dem Namen **“Lawesson-Reagenz“** bekannt. Mit dem Lawesson-Reagenz chemisch eng verwandt sind die in **Abbildung 12** aufgeführten Thioxylierungsreagenzien vom

Yokoyama-Typ. Diese wurden von Yokoyama et al. 1984 (156) erstmals beschrieben und besitzen eine dem Lawesson-Reagenz vergleichbare Reaktivität. Die verschiedenen Arten von Thioxylierungsreagenzien des Lawesson- und Yokoyama-Typs der **Abbildung 12**, die sich bezüglich des Substituenten R unterscheiden, wurden mit dem Ziel einer besseren Löslichkeit, Reaktivität und Regiospezifität (bevorzugte Thioxylierung einer bestimmten Position des Oligopeptids) synthetisiert. Die Synthese eines thioxylierten Oligopeptids durch Reaktion eines Peptids mit einem Thioxylierungsreagenz ist jedoch schwierig, da der Reaktionsverlauf (Position und Anzahl der thioxylierten Peptidbindungen) nicht vorhersehbar ist und die Bedingungen für jedes gewünschte Thioxozeptid optimiert werden müssen. Das größte Problem stellt die Reinigung des gewünschten Thioxozeptids dar, da das Reaktionsgemisch in Folge von mehrfach und in der Position variierenden Thioxylierungen eine große Anzahl verschiedener Reaktionsprodukte enthält (62, 105). Aus der Literatur sind nur wenige Beispiele bekannt, in denen durch aufwendige Optimierung der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel, Art des Thioxylierungsreagenz), die Synthese von in definierten Positionen thioxoamidsubstituierter Peptide gelang. So konnten Lajoie et al. (157) mit dem von ihnen entwickelten Thioxylierungsreagenz (**Abb. 12, Struktur II**) bemerkenswert hohe Selektivitäten bei der Thioxylierung verschiedener Tri- und Tetrapeptide erreichen. Es zeigte sich, dass vor allem sterische Effekte und somit die Sequenz des Peptids einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktivität einzelner Peptidbindungen gegenüber dem Thioxylierungsreagenz haben. Besonders leicht erfolgte unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine Thioxylierung im Bereich eines Glycins. Eine sehr geringe Reaktivität wurde gegenüber Aminoacyl-Prolyl-Peptidbindungen (Xaa-Pro-Peptidbindungen) beobachtet. Der Einfluss sterischer Effekte auf die Reaktivität einer Peptidbindung gegenüber einem Thioxylierungsreagenz konnte von Kessler et al. (105) bestätigt werden. Bei ihren Versuchen zur Darstellung zyklischer Thioxozeptide zeigte sich eine starke Abhängigkeit der bevorzugten Thioxylierungsposition von der Konformation des zyklischen Peptids.

Neben den in **Abbildung 12** gezeigten Verbindungen sind noch Thioxylierungsreagenzien auf der Basis Silizium-haltiger Verbindungen bekannt, die sich durch eine erhöhte Reaktivität gegenüber Carbonylverbindungen (Amide, Ketone, Ester) auszeichnen (158, 159).

Eine Möglichkeit, die erwähnten Nachteile der Strategie der „**globalen Thioxylierung**“ zu umgehen, ist die Synthese eines thioxylierten Dipeptids, das anschließend mit anderen Fragmenten zu längeren thioxylierten Oligopeptiden verknüpft wird (160, 161). Bei der Synthesepaltung muss jedoch beachtet werden, dass die Verlängerung eines thioxylierten Dipeptids nur *N*-terminal ohne Probleme möglich ist (58, 82, 83, 118, 157, 160-164), da die

für eine C-terminale Verlängerung notwendige Aktivierung des thioxylierten Dipeptids zur Bildung eines 4*H*-Thiazol-5-ons führt (**Abb. 13**). Diese Reaktion wird von einer Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure des thioxylierten Dipeptids begleitet (**165, 166**).

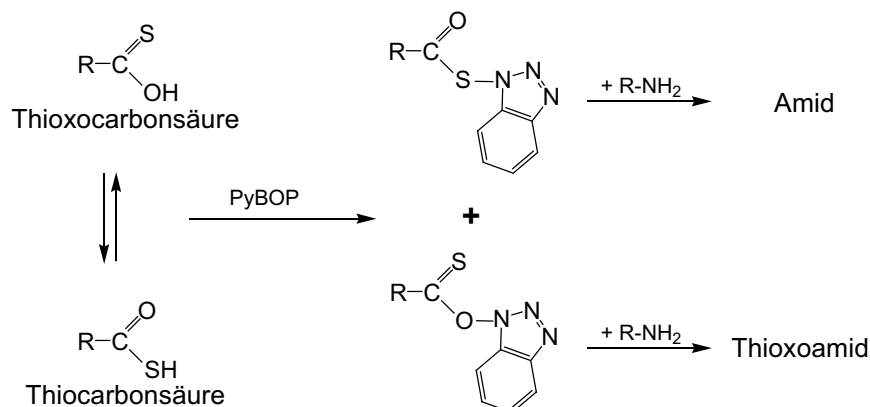


**Abbildung 13:** Die Aktivierung eines thioxylierten Dipeptids führt zur Bildung eines 4*H*-Thiazol-5-ons und Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure (HX: z.B. *N*-Hydroxysuccinimid oder *N*-Hydroxybenzotriazol).

Das 4*H*-Thiazol-5-on kann zwar aminolytisch unter Bildung eines Thioxoamids gespalten werden, seine Reaktivität ist allerdings sehr gering (**157, 165**). Auf Grund der Gefahr der Epimerisierung sollte diese Strategie auf thioxylierte Dipeptide, die C-terminal ein Glycin oder Prolin aufweisen, beschränkt bleiben.

Die zweite Strategie, bei der die Synthese der thioxylierten Oligopeptide in Analogie zur konventionellen Peptidsynthese durch schrittweisen Aufbau der Peptidkette erfolgt, erfordert die Verfügbarkeit aktivierter oder aktivierbarer thioxylierter Aminosäurederivate (Thioxoacylierungsbausteine). Die thioxylierten Analoga der klassischen Acylierungsreagenzien der Peptidchemie (Aminosäurehalogenide und Aminosäureanhydride) sind nicht verfügbar, da ihre Stabilität zu gering ist (**167-170**). Die ersten erfolgreichen Thioxo-peptidsynthesen, die unter Verwendung von Thioxoacylierungsbausteinen durchgeführt wurden, erfolgten mit Hilfe von  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäure- (**171, 172**) bzw. -dithiocarbonsäureestern (**161**). Diese konnten sich jedoch auf Grund ihrer geringen Reaktivität und der beobachteten Epimerisierung der thioxylierten Aminosäure des erhaltenen Thioxo-peptids nicht durchsetzen (**164**). Die Verwendung von *N*-terminal geschützten  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäurederivaten in Kombination mit herkömmlichen, in der Peptidchemie verwendeten Kupplungsreagenzien (**PyBOB, PyNOP**) ist nur zur Synthese kurzer thioxylierter Peptide geeignet, da das in **Abbildung 14** dargestellte Gleichgewicht zwischen der Thio- und der Thioxocarbonsäure zur Bildung von zwei reaktiven Spezies führt, die nicht getrennt werden können und die bei Reaktion mit einem Amin sowohl das entsprechende Amid als auch das Thioxoamid ergeben (**173-177**). Längere Thioxo-peptide können mit dieser Methode nicht erhalten werden, da eine Trennung des Thioxo- und des Oxopeptids nicht mehr möglich ist. In den vergangenen Jahren wurden jedoch verschiedene Thioxoacylierungsbausteine entwickelt, mit deren Hilfe eine effiziente Synthese von Thioxo-peptiden ohne Epimerisierung der thioxylierten Aminosäure möglich ist.

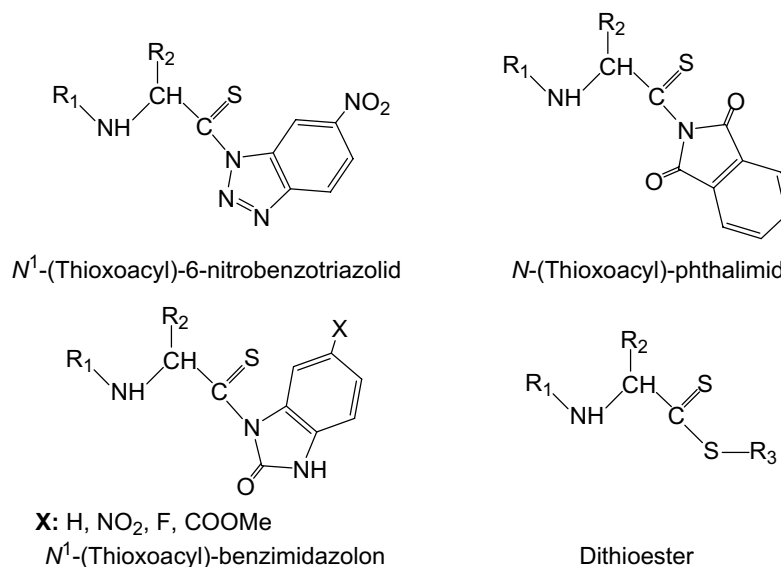
Diese Verbindungen zeichnen sich durch eine genügend hohe Stabilität aus, so dass ihre Reinigung und Lagerung ohne Probleme möglich ist.



**Abbildung 14:** Das Gleichgewicht zwischen einer Thio- und einer Thioxocarbonsäure führt bei der *in situ* Aktivierung (z.B. mittels PyBOB) zur Bildung von zwei reaktiven Spezies, die bei Reaktion mit einem Amin ein Gemisch aus Amid und Thioxoamid ergeben.

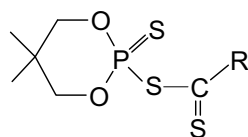
Zunächst wurden die Thioxoacylbenzimidazolone verschiedener Aminosäurederivate (**178**, **179**) bekannt, mit denen die Synthese verschiedener einfach thioxylierter Analoga des Thymopentins (**Arg-Lys-Asp-Val-Tyr**, **180**) und Tuftsins (**Thr-Lys-Pro-Arg**, **178**) gelang. Eine Vereinfachung der Synthese dieser Thioxoacylierungsbausteine erfolgte mit der Einführung der in Position 6 substituierten Thioxoacylbenzimidazolone (**Abb. 15**), die sich durch eine höhere Reaktivität und geringen Neigung zur Epimerisierung während der Thioxoacylierung auszeichnen (**181**). Der einzige Nachteil ist die Notwendigkeit der Verwendung von Phosgen bei ihrer Synthese.

Die von Shalaby et al. (**182**) beschriebenen 6-Nitrobenzotriazolide *N*-terminal geschützter  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäurederivate (**Abb. 15**) ermöglichen die Einführung der Thioxoamidsubstitution in Peptide unter besonders schonenden Bedingungen. Diese Thioxoacylierungsbausteine sind relativ einfach zu synthetisieren und bei -20 °C gelagert über mehrere Monate stabil. Sie ermöglichen die epimerisierungsfreie Synthese von Thioxozeptiden. Ein Nachteil dieser neuen Thioxoacylierungsbausteine liegt in ihrer Synthese begründet, denn die Notwendigkeit der Zyklisierung der Vorstufe (eines  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäure-2-amino-5-nitroanilids) zum entsprechenden 6-Nitrobenzotriazolid mittels NaNO<sub>2</sub> in Essigsäure schließt die Verwendung von stark säureempfindlichen oder oxidierbaren Aminosäurederivaten (z.B. Methionin) aus. Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung eines geeigneten Thioxoacylierungsbausteins ergibt die Reaktion *N*-terminal geschützter  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäureamide mit Phthalsäuredichlorid (**183**). Die dabei gebildeten  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäure-*N*-phthalimide (**Abb. 15**) eignen sich ebenfalls sehr gut für die Thioxozeptidsynthese (**145**).



**Abbildung 15:** Struktur verschiedener Thioxoacylierungsbausteine

Die Verwendung von  $N$ -terminal geschützten  $\alpha$ -Aminosäuredithioestern (**Abb. 15**) zur Thioxoacylierung ist problematisch, da ihre Reaktivität gering ist und eine Epimerisierung der thioxylierten Aminosäure des erhaltenen Peptidderivats beobachtet wurde (**161, 164, 165**). Durch Zusatz von Cäsiumsalzen und Dimethylaminopyrrolidon zum Reaktionsansatz, konnten Le et al. (**184**) das Problem der Epimerisierung lösen und somit die Verwendung der  $\alpha$ -Aminosäuredithioester zur Synthese von Thioxopeptiden ermöglichen. Mit Hilfe der in **Abbildung 15** dargestellten neuen Thioxoacylierungsreagenzien sollte auch die Synthese von längeren Oligopeptiden, die an einer definierten Position thioxyliert sind, möglich sein. Die kürzlich in der Literatur beschriebenen  $S$ -Thioacyl-dithiophosphate (**Abb. 16**) stellen interessante Thioxoacylierungsbausteine dar, die leicht herstellbar und über eine ausreichende Stabilität verfügen (**185, 186**). Es bestehen jedoch mit ihnen noch keine Erfahrungen in der Thioxopeptidsynthese.



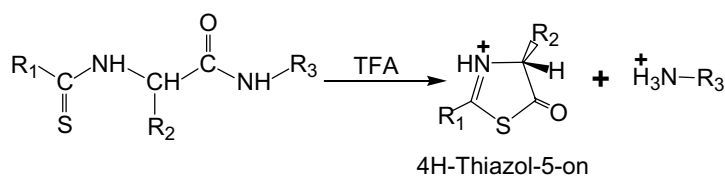
**Abbildung 16:** Die  $S$ -Thioacyl-dithiophosphate stellen Thioxoacylierungsreagenzien mit hoher Stabilität gegenüber Sauerstoff und Wasser dar.

Besonders problematisch bei der Synthese thioxylierter Oligopeptide ist die Auswahl geeigneter Schutzgruppenkombinationen, da die Bedingungen, die zur Abspaltung der in der Peptidchemie üblichen  $\alpha$ -Aminoschutzgruppen nötig sind, die Synthese längerer Thioxopeptide unmöglich machen. Auch die in der Festphasenpeptidsynthese zur temporären

Blockierung der  $\alpha$ -Aminogruppe sehr häufig verwendete Fluorenyl-9-methoxycarbonyl- (Fmoc) Schutzgruppe scheint ungeeignet zu sein, da die Thioxozeptidbindung gegenüber nucleophilen Reagenzien empfindlich ist (187). So führte die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe zu unbefriedigenden Ausbeuten bei der Synthese thioxylierter Peptide (176, 178). Auch der Gebrauch des nichtnucleophilen Reagenzes DBU zur Deblockierung der Fmoc-Schutzgruppe führte zu keiner höheren Ausbeute (176). Die Verwendung von Allyl- oder Benzylschutzgruppen ergaben ebenfalls unbefriedigende Ergebnisse, da der Schwefel die zur Abspaltung nötigen Katalysatoren durch Komplexbildung deaktiviert (176, 188, 189).

Aus diesen Problemen wird ersichtlich, dass für den schrittweisen Aufbau längerer thioxylierter Oligopeptide, wie dem S-Peptid (20 Aminosäuren), eine besonders schonende Methode für die Deblockierung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe gefunden werden muss, die auch nach mehreren Abspaltungszyklen den Erhalt der Thioxozeptidbindung garantiert.

Aber nicht nur die während der Synthese notwendige wiederholte Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe, sondern auch die finale Deblockierung des Peptids, bei der neben der *N*-terminalen auch alle Seitenkettenschutzgruppen synchron abgespalten werden, gestaltet sich bei Thioxozeptiden äußerst schwierig. Für die abschließende Schutzgruppenabspaltung verwendet man normalerweise sehr starke Säuren (z.B. TFA, TFMSA, HBr in Eisessig usw.). Die Verwendung dieser starken Säuren führt bei Thioxozeptiden entsprechend des in **Abbildung 17** aufgeführten Mechanismus zum Bruch der Peptidkette und Bildung eines 4*H*-Thiazol-5-ons (160, 162).



**Abbildung 17:** Die azidolytische Abspaltung temporärer  $\alpha$ -Aminoschutzgruppen oder die finale Deblockierung eines synthetisierten Thioxozeptids führen zur Spaltung der Peptidkette unter Bildung eines 4*H*-Thiazol-5-ons.

## 2. 8

## Ergebnisse und Diskussion

### 2. 8. 1 Eine neue Strategie zur Festphasensynthese von Thioxozeptiden

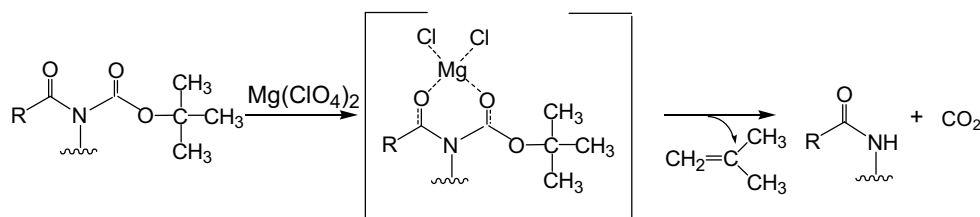
#### 2. 8. 1. 1 Suche nach geeigneten Schutzgruppen und polymeren Trägern

Die Synthese thioxylierter Oligopeptide ist nur mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese mit vertretbarem Aufwand möglich. Deshalb musste zunächst eine neue Strategie entwickelt werden, die es erlaubt, längere Thioxozeptide mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese zu erhalten. Aufgrund der in **Abschnitt 2. 7** beschriebenen Probleme bei der Thioxozeptid-synthese musste diese neue Strategie folgende Anforderungen erfüllen:

- da die Thioxozeptidbindung empfindlich gegenüber basischen oder sauren Bedingungen ist, müssen für die sich während der Synthese wiederholende Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe besonders milde Bedingungen gefunden werden
- die wiederholte Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe darf zu keiner vorzeitigen Deblockierung der Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren führen
- die Bindung zwischen dem Peptid und der Ankergruppe des polymeren Trägers muss unter den Bedingungen der sich wiederholenden Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe stabil sein
- die Bedingungen für die finale Deblockierung und Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger müssen mit der Thioxozeptidbindung kompatibel sein.

Stafford et al. (190) konnten zeigen, dass die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von *N*-Acyl-*N*-*tert*.-butyl-carbamatn mittels  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in Acetonitril und daher ohne die gewöhnlich für eine Boc-Abspaltung verwendeten starken Säuren möglich ist. Dabei bewirkt das Magnesiumchlorid als Lewisäure eine Komplexierung der Verbindung und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nach dem in **Abbildung 18** gezeigten Mechanismus. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt nur, wenn ein zusätzlicher Acylrest an das Stickstoffatom des Carbamats gebunden ist. Eine einzelne Boc-Schutzgruppe, die sich an der  $\alpha$ -Aminogruppe eines Aminosäurederivats befindet, ist unter diesen Bedingungen stabil. Damit ist zwar eine Verwendung der Boc-Schutzgruppe zur temporären Blockierung der  $\alpha$ -Aminogruppe während der Synthese eines Thioxozeptids in Kombination mit  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  als Abspaltreagenz ungeeignet, jedoch ist es theoretisch

möglich, dass andere, besonders säureempfindliche Schutzgruppen unter diesen Abspaltungsbedingungen selektiv und unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden können.



**Abbildung 18:** Abspaltung der Boc-Schutzgruppe eines *N*-Acyl-*N*-*tert*-butyl-carbamats mittels  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in Acetonitril (50 °C)

Frühere Untersuchungen zur Stabilität der Thiopeptidbindung gegenüber verschiedenen Lewisäuren haben gezeigt, dass mit Hilfe von Zinn-IV-chlorid ( $\text{SnCl}_4$ ) in ACN eine effiziente Abspaltung der Boc- Schutzgruppe und von Seitenkettenschutzgruppen des *tert*-Butanol-Typs unter Erhalt der Thiopeptidbindung möglich ist (**191**). Diese Ergebnisse erweckten die Hoffnung, durch Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen, eine besonders schonende, auf Verwendung von Lewisäuren zur Schutzgruppenabspaltung beruhende, Strategie für die Synthese thioxylierter Oligopeptide entwickeln zu können.

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Schutzgruppen, die in der konventionellen Peptidsynthese verwendet werden, auf ihre Stabilität gegenüber verschiedenen Lewisäuren unter verschiedenen Abspaltungsbedingungen (Lösungsmittel, Temperatur) untersucht. Um eine möglichst große Selektivität des Abspaltungsreagenzes bezüglich der *N*-terminalen und der Seitenkettenschutzgruppen zu erreichen, wurden für die  $\alpha$ -Aminogruppe die extrem säurelabile 2-(4-Biphenyl)propyl-2-oxycarbonyl- (**Bpoc**) und die 2-(3,5-Dimethoxyphenyl)-propyl-2-oxycarbonyl- (**Ddz**) Schutzgruppe in Betracht gezogen (**Abb. 19**).



2-(*p*-Biphenyl)isopropoxyloxycarbonyl     $\alpha,\alpha$ -Dimethyl-3,5-Dimethoxyphenyloxycarbonyl

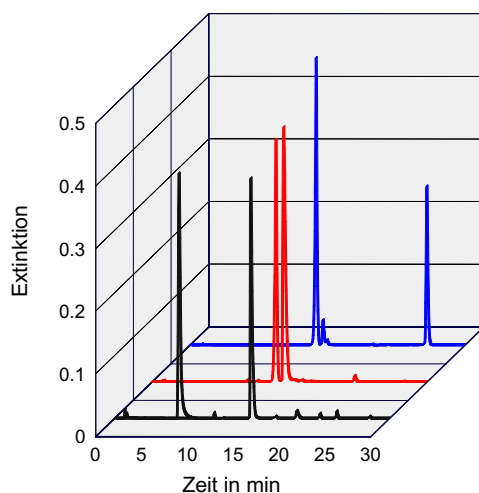
**Abbildung 19:** Die Bpoc- und die Ddz-Schutzgruppe zeichnen sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber Säuren aus. Sie lassen sich bereits mit stark verdünnten Säuren (z.B. 1 %iger TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) abspalten.

Die Bpoc- Schutzgruppe, die von Sieber erstmals beschrieben wurde, hat eine große historische Bedeutung in der Peptidchemie, da mit ihrer Hilfe die erste Totalsynthese des humanen Insulins gelang (**192-195**). Hervorzuheben ist ihre besonders hohe Empfind-



lichkeit gegenüber Säuren, die es erlaubt, sie unter besonders milden, schwach aciden Bedingungen unter Erhalt von Seitenkettenschutzgruppen des *tert.*-Butanol-Typs (Boc, OtBu) abzuspalten (193, 196, 197). Bpoc- geschützte Aminosäurederivate eignen sich sehr gut für die Festphasenpeptidsynthese. Sie müssen jedoch auf Grund ihrer äußerst geringen Stabilität gegenüber Säuren als Pentafluorphenylester eingesetzt oder unmittelbar vor der Verwendung aus ihren Dicyclohexylaminsalzen freigesetzt werden, da bereits die Acidität der Carboxylgruppe des Aminosäurederivats zur Abspaltung der Bpoc- Schutzgruppe führen kann (198). Die Stabilität der von Birr et al. (199) beschriebenen Ddz- Schutzgruppe (Abb. 19) gegenüber Säuren ist größer als die Stabilität der Bpoc-, jedoch deutlich geringer als die Stabilität der Boc- Schutzgruppe. Sie lässt sich auch photolytisch durch Bestrahlung mit UV-Licht (Quecksilberdampflampe) abspalten. Die Ddz-Schutzgruppe wurde wie die Bpoc-Schutzgruppe sowohl bei der Synthese von Peptiden in Lösung (200) als auch bei der Festphasenpeptidsynthese (201) erfolgreich eingesetzt.

Um die Eignung der Bpoc- Schutzgruppe für unsere neue Synthesestrategie zu überprüfen, wurde zunächst das Peptid **Bpoc-Ala-Ala-Ala-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np** synthetisiert, mit dessen Hilfe die Stabilität der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe und der Thiopeptidbindung gegenüber verschiedenen Lewissäuren und Abspaltungsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel) überprüft werden sollte. Um gleichzeitig die Stabilität der in der Peptidchemie zur temporären Blockierung der  $\alpha$ -Aminogruppe oder zur Blockierung der Seitenkettenfunktion trifunktioneller Aminosäuren häufig verwendeten Schutzgruppen des *tert.*-Butanol-Typs (Boc, tBu, OtBu) überprüfen zu können, erfolgte die Synthese eines weiteren Peptids, dessen *N*-terminale Aminogruppe durch die Boc-Schutzgruppe blockiert ist (**Boc-Gly-Pro-NH-Np**). Anschließend wurde die Stabilität der Boc- und Bpoc-Schutzgruppe gegenüber verschiedenen Lewissäuren ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnI}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{SnBr}_4$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{Sn}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ ,  $\text{Cs}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ , Titan(IV)isopropylat,  $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{Et-O-Et}$ ) und unterschiedlichen Bedingungen (verschiedene Lösungsmittel: ACN,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF, DMF; jeweils bei RT und 50 °C) untersucht. Bemerkenswert ist, dass nur die Verwendung von Aluminium-III-salzen zu einer langsamen Zerstörung der Thiopeptidbindung führte. Unter allen anderen oben genannten Bedingungen, selbst bei erhöhter Temperatur (50 °C), blieb die Thiopeptidbindung stabil. Als einzige zur selektiven Deblockierung der Bpoc- Schutzgruppe geeignete Kombination, unter denen die Boc-Schutzgruppe stabil ist, erwies sich  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in Acetonitril bei 50 °C (Abb. 20).



**Abbildung 20:** HPLC-Chromatogramme eines Gemisches der Peptide **Bpoc-Ala-Ala-Ala-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np** und **Boc-Gly-Phe-NH-Np**

- blaues Chromatogramm: Gemisch der Peptide **Bpoc-Ala-Ala-Ala-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np** ( $t_R = 25,8$  min) und **Boc-Gly-Phe-NH-Np** ( $t_R = 13,8$  min)
- rotes Chromatogramm: nach Behandlung mit  $Mg(ClO_4)_2$  in ACN (30 min bei  $50\text{ }^\circ C$ ), HPLC-Peaks: **H-Ala-Ala-Ala-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np** ( $t_R = 14,5$  min) und **Boc-Gly-Phe-NH-Np** ( $t_R = 13,8$  min)
- schwarzes Chromatogramm: nach Behandlung mit  $ZnCl_2 \cdot Et-O-Et$  (2,2 M in  $CH_2Cl_2$ , 30 min bei RT), HPLC-Peaks: **H-Ala-Ala-Ala-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np** ( $t_R = 14,8$  min) und **H-Gly-Phe-NH-Np** ( $t_R = 7,1$  min)

Die Analysen wurden unter Verwendung eines HPLC-Systems der Firma SYCAM in Kombination mit einer HPLC-Säule der Firma Merck (LiChroCART<sup>®</sup> 125×4, Säulenmaterial: LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-8) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Gradienten von 20-100 % ACN (0,1 % TFA) in 30 min (Flußrate: 1ml/min). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 220 nm.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass mit  $Mg(ClO_4)_2$  in ACN bei  $50\text{ }^\circ C$  eine selektive Abspaltung der  $N^\alpha$ -Bpoc- in Gegenwart der Boc- Aminoschutzgruppe eines Peptids möglich ist. Als besonders effektiv bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erwies sich die bei Fluka erhältliche 2,2 M Lösung des Zinkchlorid-Diethylether-Komplexes ( $ZnCl_2 \cdot Et-O-Et$ ) in Dichlormethan.

Um die Eignung der Bpoc-Schutzgruppe für die Synthese thioxylierter Oligopeptide nachzuweisen, musste anschließend die Stabilität verschiedener Seitenkettenschutzgruppen trifunktioneller Aminosäuren gegenüber  $Mg(ClO_4)_2$  in ACN ( $50\text{ }^\circ C$ ) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der Festphasensynthese verschiedene Peptide der Struktur **Fmoc-Ala-Ala-Xaa-Ala-Ala-OH** (mit **Xaa= Ser(tBu), Thr(tBu), Glu(OtBu), Asp(OtBu), Gln(Trt), Asn(Trt), His(Trt), His(Boc), Arg(Pbf), Arg(Pmc), Trp(Boc), Lys(Boc)** und **Tyr(tBu)**) am 2-Chlor-trityl-chloridharz synthetisiert. Dieses Harz erlaubt auf Grund seiner besonders hohen Empfindlichkeit gegenüber Säuren eine Abspaltung der Peptide ohne Deblockierung der Seitenkettenschutzgruppen (202). Die

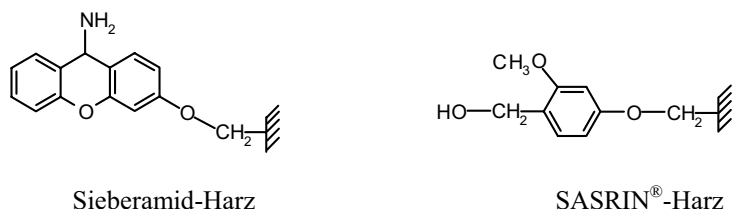
Stabilität der Seitenkettenschutzgruppen der verschiedenen Derivate trifunktioneller Aminosäuren gegenüber  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in ACN (50 °C) wurde anschließend mittels HPLC und Massenspektrometrie untersucht. Es zeigte sich, dass die Seitenkettenschutzgruppen aller Aminosäurederivate stabil gegenüber  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in ACN (50 °C) sind. Die Kombination  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  in ACN (50 °C) eröffnet somit die Möglichkeit der wiederholten selektiven Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe ohne Deblockierung der Seitenkettenschutzgruppen oder Zerstörung der Thiopeptidbindung. Auch nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurde keine Deblockierung der Seitenkettenschutzgruppen oder Zerstörung der Thiopeptidbindung beobachtet. Da, wie bereits erwähnt, die Lösung des Zinkchlorid-Diethylether-Komplexes in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  besonders gut zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe geeignet ist, wurde anschließend die Stabilität verschiedener Seitenkettenschutzgruppen gegenüber diesem Reagenz untersucht. Die Verwendung dieses Abspaltungsreagenzes führte bei allen Peptidderivaten, mit Ausnahme der Trt-, Pbf- und Pmc-geschützten Derivate, innerhalb von drei Stunden zu einer vollständigen Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen. Dabei wurde weder die Bildung unerwünschter Nebenprodukte (z.B. *tert.*-Butylierung des Trp), noch eine Zerstörung der Thiopeptidbindung beobachtet. Um die universelle Verwendbarkeit des Zinkchlorid-Diethylether-Komplexes für die finale Schutzgruppenabspaltung zu gewährleisten, mussten für die Aminosäuren Asn, Gln und Arg alternative Schutzgruppen gefunden werden, die sich mit diesem Reagenz deblockieren lassen. Dabei erwiesen sich die Tmob- bzw. Dod-geschützten Aminosäurederivate des Glutamins und Asparagins (**Abb. 21**) bzw. das in der Seitenkette durch zwei Boc-Gruppen geschützte Aminosäurederivat **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH** als geeignet.



**Abbildung 21:** Die Tmob- und Dod-Schutzgruppe eignen sich auf Grund ihrer Instabilität gegenüber  $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{Et-O-Et}$ -Komplexlösung in DCM als Seitenkettenschutzgruppen des Glutamins und Asparagins bei der Synthese thioxylierter Oligopeptide.

Für die Festphasensynthese längerer thioxylierter Oligopeptide unter Verwendung unserer neuen Synthesestrategie mussten abschließend noch geeignete polymere Träger (Harze) gefunden werden, die unter den Bedingungen der wiederholten Abspaltung der  $N^\alpha$ -Bpoc-Aminoschutzgruppe stabil sind, jedoch eine leichte Abspaltung des Thiopeptids vom

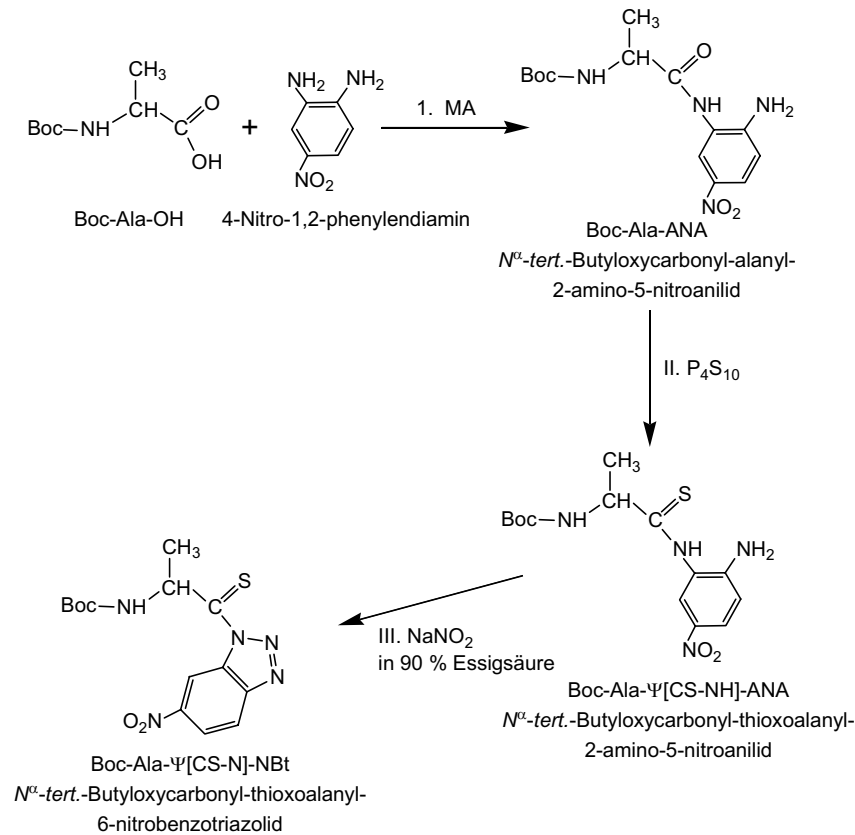
Harz unter gleichzeitiger Deblockierung der Seitenkettenschutzgruppen und Erhalt der Thioxozeptidbindung ermöglichen. Dabei erwiesen sich das Sieberamidharz zur Darstellung thioxylierter Peptidamide und das SASRIN<sup>®</sup>-Harz der Firma Bachem für die Synthese C-terminal freier Thioxozeptide als geeignet. Die Ankergruppen des SASRIN<sup>®</sup>- und Sieberamid-Harzes, die der Bindung des Peptids an den polymeren Träger während der Synthese dienen, sind in **Abbildung 22** dargestellt (203-205).



**Abbildung 22:** Für die Synthese von Thioxozeptidamiden und C-terminal freien Thioxozeptiden eignen sich das Sieberamid bzw. SASRIN<sup>®</sup>-Harz der Firma Bachem.

Um mit Hilfe unserer neuen Synthesestrategie Thioxozeptide synthetisieren zu können, mussten anschließend entsprechende Bpoc- geschützte Thioxoacylierungsbausteine synthetisiert werden. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits Erfahrungen in der Synthese und Verwendung der  $\alpha$ -Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole bestanden, wurde zunächst versucht, nach der von Shalaby et al. (182) für die Darstellung der 6-Nitrobenzotriazole  $N^\alpha$ -Boc-geschützter Aminothioxocarbonsäurederivate entwickelten Synthesevorschrift (Syntheschema in **Abb. 23**) die entsprechenden Bpoc-geschützten Derivate zu erhalten. Da die Thioxylierung des Zwischenprodukts **Bpoc-Xaa-ANA** mittels  $P_4S_{10}$  zur Abspaltung der Bpoc- Schutzgruppe führt, musste für die Thioxylierung das Lawesson-Reagenz verwendet werden, welches bei niedriger Temperatur in kleinen Portionen zum Reaktionsansatz gegeben wurde. Problematisch gestaltete sich auch die anschließende Zyklisierung des **Bpoc-Xaa- $\Psi$ [CS-NH]-ANA**, da die Bpoc-Schutzgruppe in 90 %-iger Essigsäure langsam abgespalten wird. Es waren daher nur Gesamtausbeuten von 10 bis 15 % zu erreichen. Mit den  $N^\alpha$ -Bpoc- geschützten Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazoliden (**Bpoc-Xaa- $\Psi$ [CS-N]-NBt**) des Prolins, Tyrosins, Leucins und Serins konnten die in **Tabelle 6** aufgeführten Thioxozeptide unter Verwendung der in **Abbildung 24** dargestellten Synthesestrategie hergestellt werden. Mit Hilfe der Atom-Emissions-Spektroskopie, die freundlicherweise von Herrn Dr. T. Schumann vom Chemischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Thioxozeptide nach der Reinigung mittels präparativer HPLC

keinen erhöhten Zinkgehalt aufweisen. Dieser Nachweis ist erforderlich, da Zinkionen in der Lage sind, Komplexe mit Peptiden auszubilden (206-208).

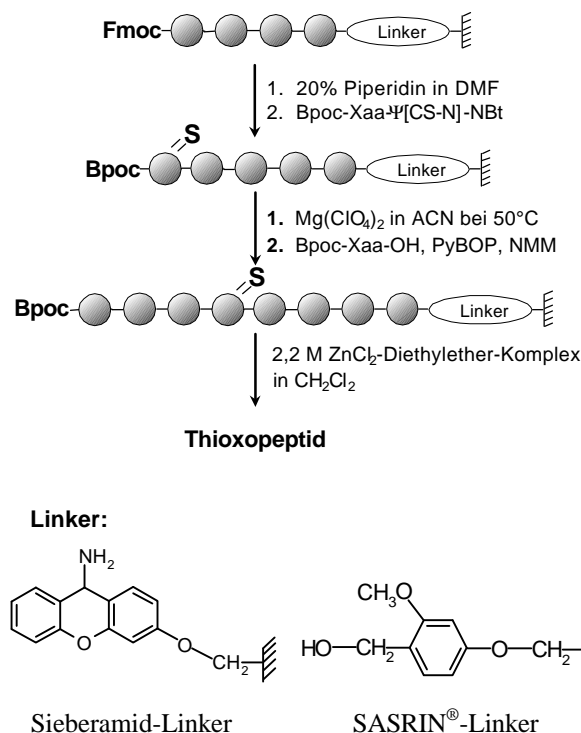


**Abbildung 23:** Syntheschema der Darstellung des Thiooxylierungsbausteins **Boc-Ala-Ψ[CS-N]-NBt** (*N*<sup>tert</sup>-Butyloxycarbonyl-thioalanyl-6-nitrobenzotriazolid) entsprechend der von Shalaby et al. beschriebenen Synthesestrategie (182). Die Synthese des Zwischenprodukts **Boc-Ala-ANA** erfolgte mit Hilfe der „Mischanhydridmethode“ (MA: mixed anhydride).

**Tabelle 6**

Thiopeptid	Ausbeute (%)	[M+H] <sup>+</sup>	
		berechnet	gefunden
H-Tyr-Pro-Ψ[CS-NH]-Phe-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> (I)	87	595,29	595,1 <sup>a</sup>
H-Tyr-Ψ[CS-N]-Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub> (II)	74	588,28	588,5 <sup>a</sup>
H-Gly-Gly-Ser-Leu-Ψ[CS-NH]-Tyr-Ser-Phe-Gly-Leu-NH <sub>2</sub> (III)	71	915,45	915,5 <sup>a</sup>
H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ψ[CS-N]-Pro-Phe-Arg-OH (IV)	62	1076,56	1076,2 <sup>b</sup>
H-Arg-Pro-Ψ[CS-N]-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH (V)	68	1076,56	1076,1 <sup>b</sup>
Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Ψ[CS-N]-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-NH <sub>2</sub>	72	1143,63	1143,7 <sup>a</sup>

Die Thiooxypeptide wurden mit Hilfe der in **Abbildung 24** dargestellten Strategie synthetisiert, mittels präparativer HPLC gereinigt und mit Hilfe der ESI- (a) bzw. MALDI-ToF-Massenspektrometrie (b) charakterisiert. Die Peptide stellen thioxylierte Derivate des β-Casomorphin-(1-5)-amids aus Rind (I), des Endomorphins-2 (II), eines Allatostatins (III) und des Bradykinins (IV, V) dar.

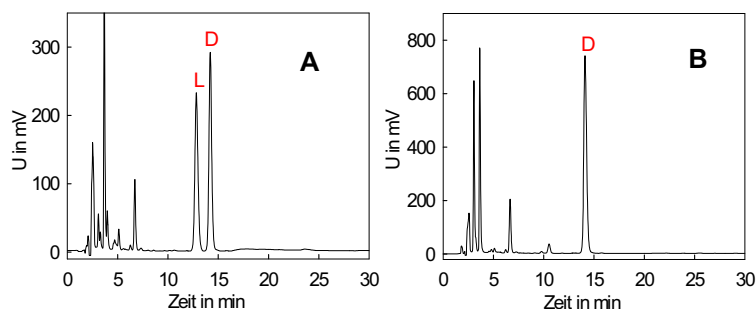


**Abbildung 24:** Syntheschema für die Darstellung thioxylierter Oligopeptide unter Verwendung verschiedener Lewissäuren, die eine für die Thiopeptidbindung besonders schonende Abspaltung der Schutzgruppen ermöglichen.

Da bei der Synthese der  $N^\alpha$ -Bpoc- geschützten Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole nur sehr unbefriedigende Ausbeuten erzielt werden konnten, wurde versucht, die Peptide **IV** und **V** der **Tabelle 6** unter Verwendung der Fmoc-Strategie zu synthetisieren. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Thiopeptidbindung unter den zur Fmoc-Abspaltung verwendeten Bedingungen (Piperidin, DBU) nicht stabil ist (**176**, **178**, **209**), wurden für die Abspaltung der Fmoc- Schutzgruppe besonders schonende Bedingungen verwendet, die aus der Festphasensynthese von Peptidthioestern bekannt sind. Dabei erfolgt die Abspaltung der temporären  $N^\alpha$ -Fmoc- Schutzgruppe mittels 0,7 % Piperidin/1 % HOBT in DMF (v/w/v, **210**). Beide Thiopeptide konnten mit einer Ausbeute von 68 bzw. 63 % erhalten werden. Die zur Abspaltung der Fmoc- Schutzgruppe und die finale Deblockierung verwendeten Bedingungen erlauben die Synthese von Thiopeptiden ohne Epimerisierung (**Abb. 25 A** u. **B**). Die von Miwa et al. (**73**, **103**, **211**) beschriebene Synthesestrategie, bei der mit Hilfe der Fmoc- Strategie unter Verwendung von 20 %-igem Piperidin in DMF als Abspaltreagenz thioxylierte Oligopeptide erhalten wurden, führte nicht zum Erfolg.

Da die Synthese der  $N^\alpha$ -Fmoc- geschützten Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole, wie in **Abschnitt 2. 8. 1. 2** näher beschrieben wird, im Gegensatz zu den Bpoc-

geschützten Derivaten keine größeren Probleme bereitete, erfolgte die Synthese der thioxylierten S-Peptidderivate mit Hilfe der Fmoc-Strategie. Zu diesem Zweck mussten zunächst die entsprechenden Thioxoacylierungsbausteine synthetisiert werden.

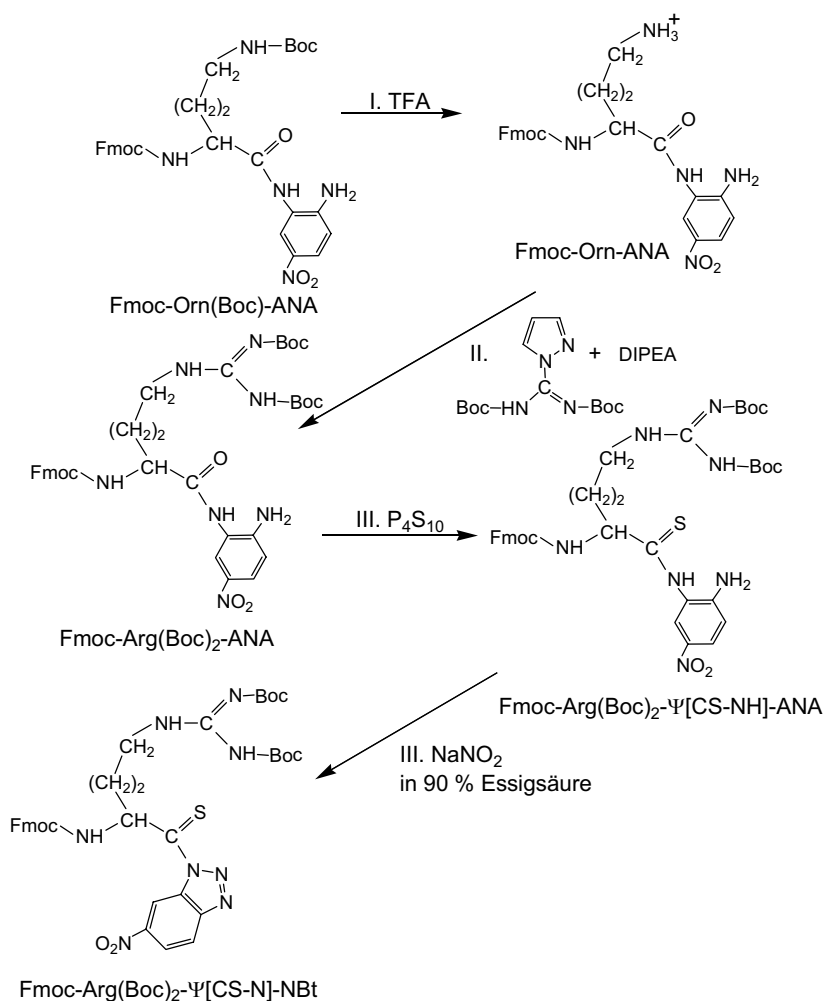


**Abbildung 25:** **A)** HPLC-Chromatogramm eines Gemisches der Peptide **Phe-Ψ[CS-NH]-Ser (L)** und **D-Phe-Ψ[CS-NH]-Ser (D)**. Die Zuordnung der Verbindungen zu den Peaks erfolgte mit Hilfe der HPLC- Analyse unter Verwendung der reinen Peptide und der Massenspektrometrie. **B)** **D-Phe-Ψ[CS-NH]-Ser** nach zwölfmal einstündiger Inkubation des mit **Boc-D-Phe-Ψ[CS-NH]-Ser(tBu)**- beladenen SASRIN<sup>®</sup>- Harzes mit 0,7 % Piperidin/1 % HOBT/DMF (v/w/v) und anschließender Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger mittels 2,2 M Zinkchlorid-Diethylether-Komplex in DCM. Die Identität des Peptids wurde mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Synthese der Peptide erfolgte unter Verwendung der Thioxoacylierungsbausteine **Boc-Phe-Ψ[CS-N]-NBt** bzw. **Boc-D-Phe-Ψ[CS-N]-NBt** am Ser(tBu)- beladenen SASRIN<sup>®</sup>- Harz. Die Analysen wurden unter Verwendung eines HPLC- Systems von Pharmacia in Kombination mit einer HPLC- Säule von Merck (LiChroCART 250 × 4, LiChrospher 100, RP18) durchgeführt. Die Elution erfolgte isokratisch (17 % ACN, 0,1 % TFA) bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

### 2. 8. 1. 2                    **Synthese $N^{\alpha}$ -Fmoc- geschützter Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole (Fmoc-Xaa-Ψ[CS-N]-NBt)**

Die Darstellung der für die Einführung der Thioxoamidbindung benötigten Fmoc-geschützten Thioxoacylierungsbausteine erfolgte entsprechend der von Shalaby et al. (182) für die Synthese der  $N^{\alpha}$ -Boc- geschützten Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole beschriebenen Synthesevorschrift. Die Synthese der  $N^{\alpha}$ -Fmoc- geschützten Bausteine **Fmoc-Xaa-Ψ[CS-N]-NBt**, wobei **Xaa** den Aminosäureresten **Lys(Boc)**, **Glu(OtBu)**, **Asp(OtBu)**, **Thr(tBu)**, **Ser(tBu)**, **Ala**, **Phe** und **Norleucin** entspricht, bereiteten keine Schwierigkeiten und erfolgten analog des in **Abbildung 23** gezeigten Syntheschemas. Die Zwischenprodukte **Fmoc-Arg(Boc)2-Ψ[CS-NH]-ANA** und **Fmoc-His(Boc)-Ψ[CS-NH]-ANA** sind nach dieser Vorschrift nicht zugänglich. Im Falle des Argininderivats ist

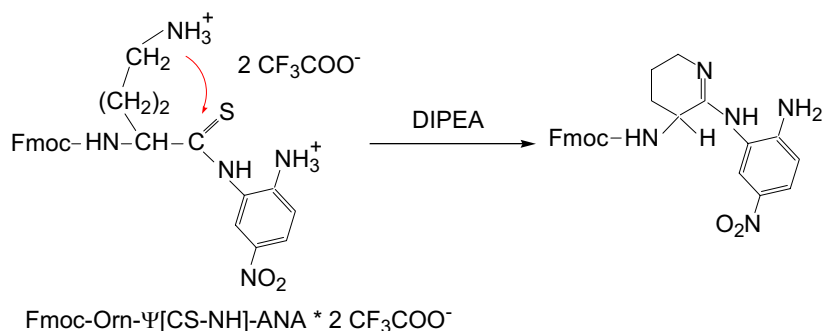
die Bindungsknüpfung zwischen **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH** und dem **4-Nitro-1,2-phenylen-diamin** mittels Mischanhydridtechnik unmöglich. Auch andere Aktivierungsmethoden führten nicht zum Erfolg. Die Darstellung gelang jedoch mit Hilfe des Ornithins, da Ornithin leicht mittels *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol in Arginin überführt werden kann (**212**, **213**). Die Synthese des **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Ψ[CS-N]-NBt** ist in **Abbildung 26** dargestellt.



**Abbildung 26:** Syntheschema für die Darstellung des Thiooxylierungsbausteins **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Ψ[CS-N]-NBt**

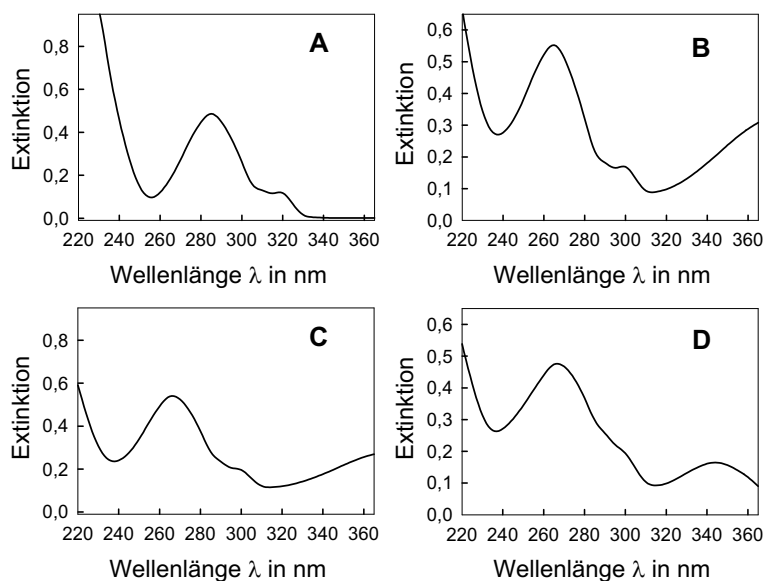
Die Synthese des **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Ψ[CS-N]-NBt** gelingt nur, wenn die Thioxylierung auf der Stufe des **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-ANA** erfolgt. Bei einer Thioxylierung auf der Stufe des **Fmoc-Orn(Boc)-ANA** führt der Versuch der Guanidinylierung des **Fmoc-Orn-Ψ[CS-NH]-ANA** zum nucleophilen Angriff der δ-Aminogruppe des Thioxoornithins auf das Thiocarbonylkohlenstoffatom. Die Struktur des dabei gebildeten, in **Abbildung 27** dargestellten heterozyklischen Ringsystems, konnte mittels NMR-Spektroskopie und mit Hilfe der massenspektrometrischen Fragmentierung bestätigt werden.





**Abbildung 27:** Die für eine Guadininylierung des **Fmoc-Orn-Ψ[CS-NH]-ANA** benötigten basischen Bedingungen führen zum nucleophilen Angriff der  $\delta$ -Aminogruppe des Thioxoornithins auf das Thiocarbonylkohlenstoffatom und Bildung eines heterozyclischen Ringsystems, welches sich vom **3, 4, 5, 6-Tetrahydropyridin** ableitet. Die Struktur dieses Ringsystems wurde mittels NMR-Spektroskopie und massenspektrometrischer Fragmentierung bestätigt.

Auch die Synthese der Verbindung **Fmoc-His(Boc)-ANA** bereitete zunächst Probleme, da mittels Mischanhydridtechnik keine Bindungsknüpfung zwischen dem Aminosäurederivat **Fmoc-His(Boc)-OH** und dem 4-Nitro-1,2-phenylendiamin zu erreichen war. Hier führte die Verwendung des Aktivierungsreagenzes Diphenylphosphinsäurechlorid zum Erfolg. **Fmoc-His(Boc)-Ψ[CS-NH]-ANA** konnte anschließend ohne Probleme zum 6-Nitrobenzotriazolid umgesetzt werden. Die gewünschten Produkte der einzelnen Schritte der Synthese der Thioxoacylierungsbausteine lassen sich sehr leicht anhand der Verschiebung der HPLC-Retentionszeiten (**Tab. 15, Seite 131**) und der charakteristischen UV-Spektren (**Abb. 28**) identifizieren, eine massenspektrometrische Analyse der Zwischenprodukte ist deshalb nicht nötig.



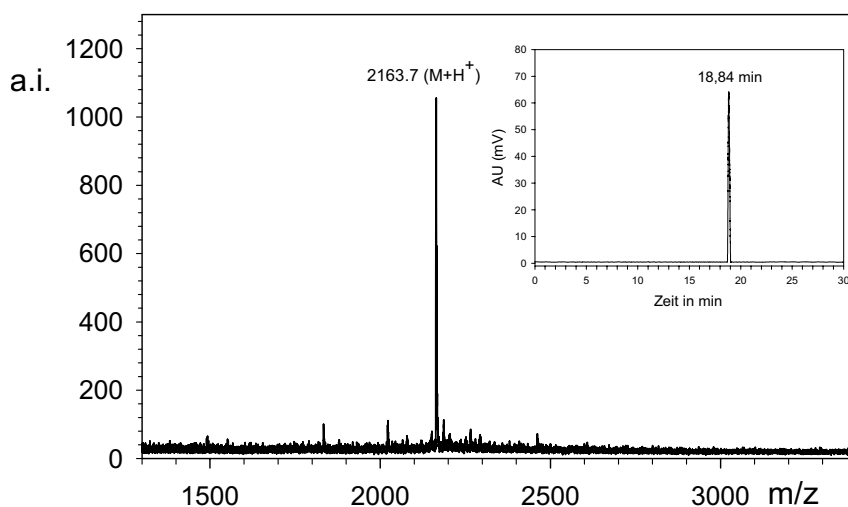
**Abbildung 28:** UV-Spektren des **Fmoc-Ala-OH** (A), **Fmoc-Ala-ANA** (B), **Fmoc-Ala-Ψ[CS-NH]-ANA** (C) und **Fmoc-Ala-Ψ[CS-N]-NBt** (D). Die Spektren wurden bei der HPLC-analytischen Reaktionskontrolle mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors erhalten.

### 2. 8. 1. 3

### Synthese thioxylierter S-Peptid-Derivate

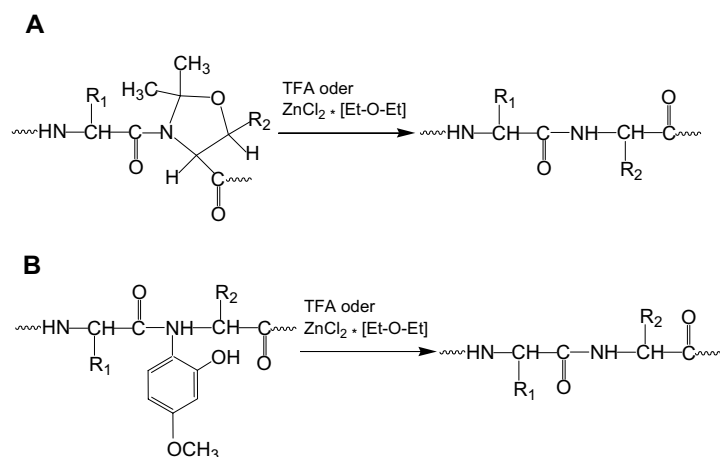
Die Synthese des S-Peptids der RNase S (**Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Ser-Thr-Ser-Ala-Ala**) bereitet vor allem auf Grund des Methionins<sup>13</sup> Probleme, da es während der finalen Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen sehr leicht oxidiert wird (**214**, **215**). Die Oxidation des Schwefelatoms in der Seitenkette des Methionins durch NaNO<sub>2</sub>/Eisessig, das zur Synthese der für die Thioxylierung benötigten Thioxyamino-6-nitrobenzotriazole benötigt wird, führt zum Sulfon und ist irreversibel. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass das Methionin<sup>13</sup> des S-Peptids der RNase S ohne größeren Einfluss auf die Struktur, Stabilität und Aktivität des Proteins gegen Norleucin ausgetauscht werden kann (**42**). Aus diesem Grund enthalten alle von mir synthetisierten S-Peptid-Derivate die Aminosäure Norleucin in der Position 13. Dieser Aminosäureaustausch ist immer vorhanden und wird deswegen bei der Bezeichnung der von mir synthetisierten S-Peptidderivate nicht mehr extra benannt. Die Synthese der thioxylierten S-Peptide erfolgte mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung des Sasrin<sup>®</sup>- Harzes. Die Abspaltung der temporären N<sup>α</sup>-Fmoc- Schutzgruppe erfolgte beginnend mit der Position der thioxylierten Aminosäure mit Hilfe von 0,7 % Piperidin/1 % HOBT/DMF (v/w/v).

Für die Thioxyamidsubstitution wurden nur die Aminosäuren 1 bis 15 des S-Peptids berücksichtigt, da nur diese Aminosäuren wichtig für die Ausbildung der RNase S sind (**25**). Die thioxylierten S-Peptid-Derivate konnten mit Ausbeuten von 5-11% (bezogen auf die Menge des eingesetzten polymeren Trägers) erhalten werden (**Abb. 29**).



**Abbildung 29:** MALDI-ToF-Spektrum des [ThioxyAla<sup>6</sup>]-S-Peptids (berechnete Monoisotopenmasse [M+H<sup>+</sup>]= 2163,8). Eingefügtes Diagramm: HPLC-analytische Reinheitskontrolle. Die HPLC-Bedingungen werden in **Tabelle 16** (Seite 133) beschrieben.

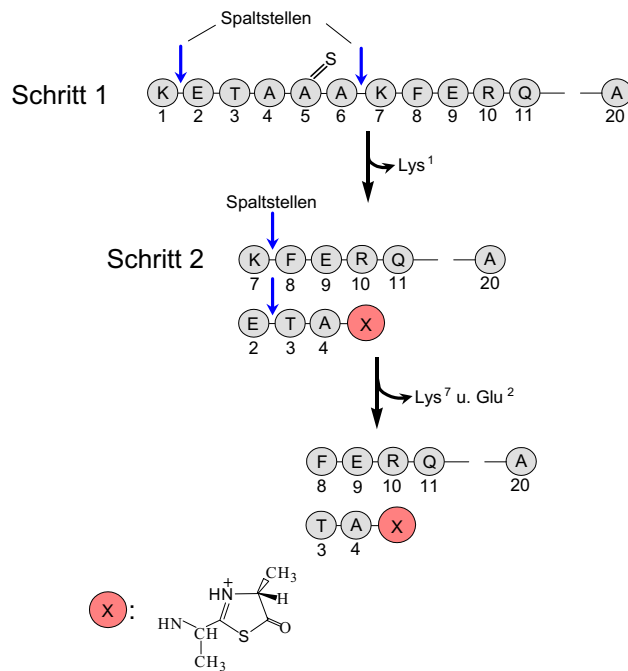
Auch die Verwendung der Oxazolidine (“Pseudoproline“) bzw. der  $N^\alpha$ -Fmoc- $N^\alpha$ -2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)- modifizierten Aminosäurederivate führte zu keiner Erhöhung der Ausbeute. Beide Formen von Aminosäurederivaten sind mit unserer neuen Synthesestrategie kompatibel (**Abb. 30**) und werden bei der Festphasensynthese von Peptiden, die während der Synthese zur Aggregation neigen verwendet (**216-220**).



**Abbildung 30:** Die Verwendung der Oxazolidine (“Pseudoproline“, **A**) bzw. der  $N^\alpha$ -2-Hydroxy-4-methoxybenzyl- (HMB, **B**) Gruppe zur Unterdrückung der Aggregation der Peptidketten während der Synthese, ist mit unserer neuen Strategie kompatibel, führte jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung der Ausbeute an thioxylierten S-Peptiden.

Die Verwendung der von Miwa et al. (**73, 103, 211**) beschriebenen Synthese, bei der mit Hilfe der Fmoc-Strategie und abschließender finaler Deblockierung der Peptide mittels TFA/Scavenger-Gemischen thioxylierte Oligopeptide erhalten wurden, führte bei den thioxylierten S-Peptiden nicht zum Erfolg.

Die analytische Reinheitskontrolle der thioxylierten S-Peptide erfolgte mittels HPLC, MALDI-ToF-Massenspektrometrie (**Tab. 16**, Seite 133) und der Sequenzanalyse (Nachweis der exakten Sequenz und der angegebenen Position der Thioxoamidbindung im S-Peptid). Auf Grund der Säureempfindlichkeit der Thioxoamidbindung, kann mit Hilfe des Edman- Abbaus nicht nur die Sequenz sondern auch die Position der Thioxoamidsubstitution innerhalb des thioxylierten S-Peptids bestätigt werden. Dabei führt die nach Reaktion der  $N$ -terminalen Aminogruppe mit Phenylisothiozyanat zur Abspaltung und zum Nachweis der ersten Aminosäure des Peptids notwendige Einwirkung von TFA auch zu einer Spaltung der Peptidbindung, die in Richtung des  $C$ -Terminus unmittelbar auf die Thioxoamidbindung folgt. Mit Beginn des nachfolgenden Sequenzierschritts führt das Vorhandensein von nun zwei freien  $N$ - Termini zum Nachweis von zwei verschiedenen Aminosäuren. Die Ergebnisse der Sequenzierung ermöglichen eine genaue Bestimmung der Position der Thioxoamidsubstitution im S-Peptid (**Abb. 31**).



	Sequenzierschritt					
	1	2	3	4	5	6
Aminosäure	Lys <sup>1</sup>	Lys <sup>7</sup>	Phe <sup>8</sup>	Glu <sup>9</sup>	Arg <sup>10</sup>	Gln <sup>11</sup>
		Glu <sup>2</sup>	Thr <sup>3</sup>	Ala <sup>4</sup>	/	/

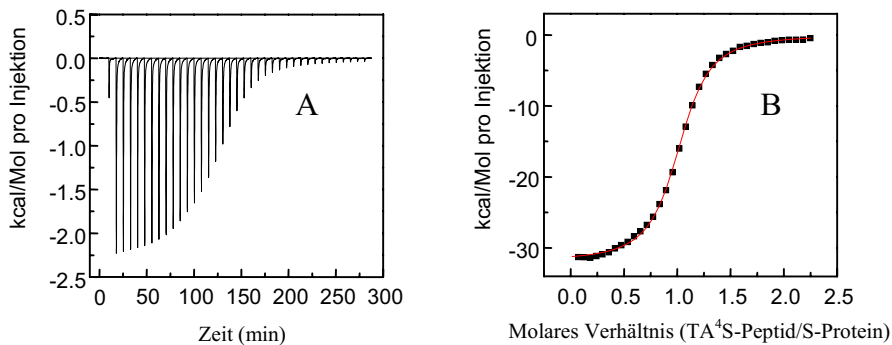
**Abbildung 31:** Bestimmung der Position der Thioxoamidsubstitution in einem thioxylierten S-Peptid. Die nach der Reaktion des freien *N*-Terminus mit Phenylisothiozyanat zur Abspaltung und zum Nachweis der ersten Aminosäure des Peptids notwendige Einwirkung von TFA führt unter Bildung eines **4H-Thiazol-5-ons** zum Bruch der Peptidkette. Die dabei entstehenden Peptidfragmente werden in den nachfolgenden Sequenzierschritten parallel analysiert. Die Ergebnisse ermöglichen anschließend eine Bestimmung der Position der Thioxoamidsubstitution.

Die Sequenzierung und Bestimmung der Position der Thioxoamidsubstitution ist bei allen thioxylierten S-Peptiden mit Ausnahme des [ThioxoLys<sup>1</sup>]-S-Peptids ohne Probleme möglich. Das [ThioxoLys<sup>1</sup>]-S-Peptid sowie das Produkt der Reaktion mit Phenylisothiozyanat zeigen eine erhöhte Stabilität gegenüber TFA, so dass während der Zeit der Einwirkung der TFA im Proteinsequenzer keine Spaltung erfolgt. Die erhöhte Stabilität des [ThioxoLys<sup>1</sup>]-S-Peptids ist vom Vorhandensein der positiven Ladung der *N*-terminalen Aminogruppe abhängig. Durch eine Acetylierung des *N*-Terminus wird die erhöhte Stabilität des [ThioxoLys<sup>1</sup>]-S-Peptids gegenüber TFA aufgehoben. Die Reaktion der *N*-terminalen Aminogruppe des Lysins<sup>1</sup> mit Formaldehyd führt zur Bildung eines Azomethins. Hier bleibt jedoch die erhöhte Stabilität des S-Peptidderivats gegenüber TFA erhalten, da die Azomethingruppe bei niedrigem pH-Wert protoniert und somit positiv

geladen vorliegt. Die erhöhte Stabilität der *N*-terminalen Thiopeptidbindung gegenüber TFA scheint ein generelles Phänomen zu sein, da sie, wie anhand verschiedener Thiopeptide gezeigt wurde, nicht an das Vorhandensein der Aminosäure Lysin in Position 1 gebunden ist.

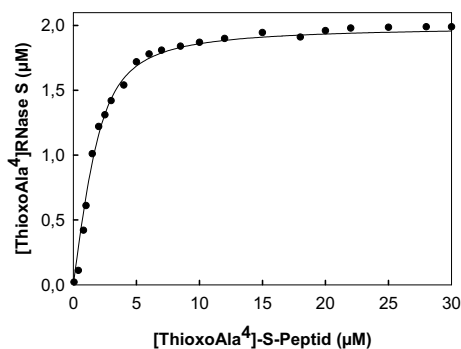
## 2. 8. 2 Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion in thioxylierten Derivaten der RNase S mittels isothermer Titrationskalorimetrie

Die Bindung verschiedener thioxylierter S-Peptide an das S-Protein wurde mit Hilfe der isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert. **Abbildung 32** zeigt als Beispiel eine Kurve, die bei Titration des S-Proteins mit dem [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid erhalten wurde.



**Abbildung 32:** Bestimmung der thermodynamischen Parameter ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) der Bindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids an das S-Protein mittels isothermer Titrationskalorimetrie (Titrationskurve: **A**). Die Auswertung erfolgte nach einem Einseitenbindungsmodell mit Hilfe des Programms ORIGIN von MicroCal (**B**).

Die Bindung des [ThioxoPhe<sup>8</sup>]- bzw. des [ThioxoHis<sup>12</sup>]-S-Peptids an das S-Protein kann nicht mittels ITC analysiert werden, da ihre Affinität zum S-Protein zu gering ist. Um die Assoziationskonstanten näherungsweise bestimmen zu können, erfolgte die Titration des S-Proteins mit dem [ThioxoPhe<sup>8</sup>]- bzw. [ThioxoHis<sup>12</sup>]-S-Peptid mit Hilfe enzymkinetischer Messungen in Analogie zur **Abbildung 33**.



**Abbildung 33:** Titration des S-Proteins mit dem [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid. Die Titration erfolgte mit Hilfe enzymkinetischer Messungen. Die Konzentration des S-Proteins betrug 2 µM. Die Messungen erfolgten unter Verwendung des Substrates 2',3'-cCMP (0,2 mM) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6; 0,1 M NaCl) bei 25 °C.

Die mit Hilfe dieser Titrationskurven bestimmten Assoziationskonstanten sind in **Tabelle 7** zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Bestimmung der Assoziationskonstanten  $K_{Ass}$  der Rekombination des S-Proteins mit verschiedenen S-Peptid-Derivaten

S-Peptid	$K_{Ass}$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ (kJ/mol)
ThioxoPhe <sup>8</sup>	$(6,1\pm 0,8)\times 10^3$	-21,6±2,8
ThioxoHis <sup>12</sup>	$(2,04\pm 0,4)\times 10^3$	-18,9±3,7
[ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptid	$(1,62\pm 0,16)\times 10^6$	-35,4±3,5

Die Titration des S-Proteins mit dem entsprechenden S-Peptid-Derivat wurde analog **Abbildung 33** durchgeführt. Die Bestimmung der Assoziationskonstanten  $K_{Ass}$  erfolgte mittels nichtlinearer Regression aus den erhaltenen Titrationskurven. Die angegebenen Fehler sind das Ergebnis der Regressionsanalyse der Messdaten der Titrationskurve. Es wurde jeweils eine Titrationskurve bestimmt.  $\Delta G$  wurde mit Hilfe der Gleichung  $\Delta G = -RT \cdot \ln K_{Ass}$  berechnet.

Die Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen sind in den **Tabellen 8** und **9** bzw. in den **Abbildungen 34 A-C** zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Kalorimetrische Bestimmung der thermodynamischen Parameter der S-Peptid/S-Protein-Rekombination bei Ausbildung verschiedener Derivate der RNase S

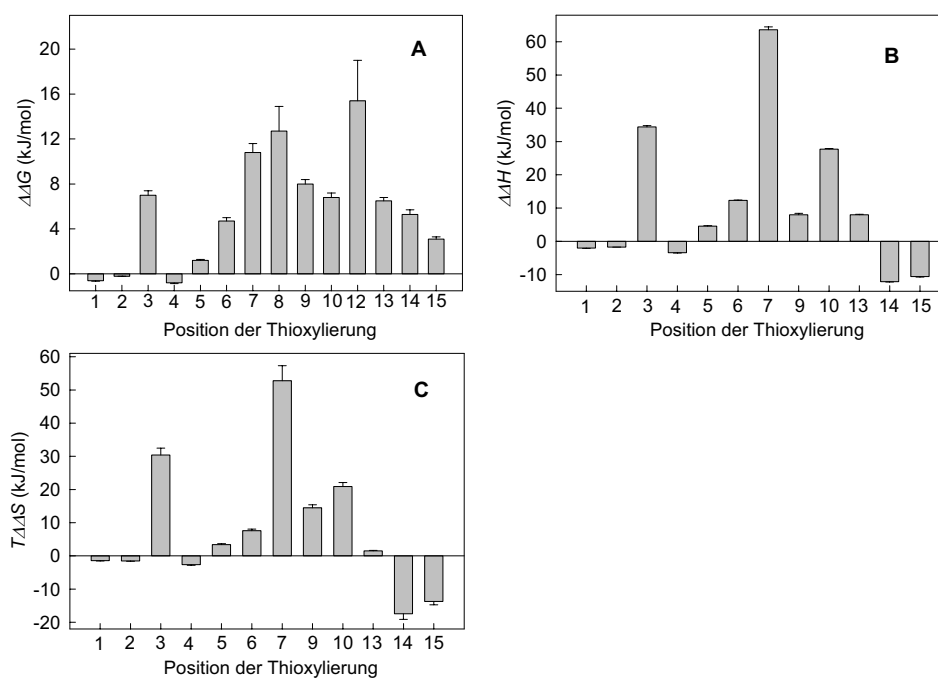
S-Peptid	N	$K_{Ass}$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)
ThioxoLys <sup>1</sup>	1,004	$(1,3\pm 0,06)\times 10^6$	-34,9±1,6	-134,4±0,6	-99,5±5,0
ThioxoGlu <sup>2</sup>	1,007	$(1,1\pm 0,03)\times 10^6$	-34,5±0,9	-134,1±0,4	-99,6±2,9
ThioxoThr <sup>3</sup>	1,008	$(6,1\pm 0,1)\times 10^4$	-27,3±0,44	-95,0±0,6	-67,7±1,5
ThioxoAla <sup>4</sup>	1,002	$(1,4\pm 0,04)\times 10^6$	-35,1±1,0	-135,8±0,4	-100,7±3,2
ThioxoAla <sup>5</sup>	1,003	$(6,2\pm 0,15)\times 10^5$	-33,1±0,8	-127,8±0,4	-94,7±2,6
ThioxoAla <sup>6</sup>	1,002	$(1,5\pm 0,26)\times 10^5$	-29,6±0,5	-120,1±0,4	-90,5±1,8
ThioxoLys <sup>7</sup>	1,01	$(1,3\pm 0,04)\times 10^4$	-23,5±0,7	-68,8±0,7	-45,3±1,8
ThioxoPhe <sup>8(2)</sup>	/	$(6,1\pm 0,8)\times 10^3$	-21,6±2,8	/	/
ThioxoGlu <sup>9</sup>	1,009	$(4,0\pm 0,5)\times 10^4$	-26,3±0,34	-109,9±0,3	-83,6±1,3
ThioxoArg <sup>10</sup>	1,001	$(6,5\pm 0,08)\times 10^4$	-27,5±0,3	-104,7±0,2	-77,2±1,0
ThioxoHis <sup>12(2)</sup>	/	$(2,04\pm 0,4)\times 10^3$	-18,9±3,7	/	/
ThioxoNle <sup>13</sup>	1,005	$(7,5\pm 0,08)\times 10^4$	-27,8±0,3	-124,4±0,3	-96,6±1,3
ThioxoAsp <sup>14</sup>	1,005	$(1,2\pm 0,05)\times 10^5$	-29,0±1,2	-144,5±1,5	-115,5±6,0
ThioxoSer <sup>15</sup>	1,002	$(2,9\pm 0,07)\times 10^5$	-31,2±0,7	-143,0±0,5	-111,8±2,9
Oxo-S-Peptid <sup>(1)</sup>	1,001	$(1,0\pm 0,04)\times 10^6$	-34,3±1,4	-132,4±0,5	-98,1±4,4

Die Abkürzung Ass bedeutet Assoziation. Die Konstanten in der Tabelle sind daher Assoziationskonstanten. Die Messungen erfolgten in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6; 0,1 M NaCl) bei 25 °C. Der Parameter N ist der ermittelte stöchiometrische Faktor der S-Peptid/S-Protein-Rekombination. <sup>(1)</sup> Das Oxo-S-Peptid entspricht dem synthetisierten nichtthioxylierten S-Peptid. <sup>(2)</sup>  $\Delta G$  der Assoziationsreaktion entspricht dem Wert der **Tabelle 7**.

**Tabelle 9:** Differenz der thermodynamischen Parameter der S-Peptid/S-Protein-Rekombination

S-Peptid	$\Delta\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta H$ (kJ/mol)	T $\Delta\Delta S$ (kJ/mol)
ThioxoLys <sup>1</sup>	-0,6±0,05	-2,0±0,02	-1,4±0,13
ThioxoGlu <sup>2</sup>	-0,2±0,01	-1,7±0,01	-1,5±0,11
ThioxoThr <sup>3</sup>	7,0±0,40	37,4±0,40	30,4±2,1
ThioxoAla <sup>4</sup>	-0,8±0,06	-3,4±0,02	-2,6±0,2
ThioxoAla <sup>5</sup>	1,2±0,08	4,6±0,03	3,4±0,3
ThioxoAla <sup>6</sup>	4,7±0,3	12,3±0,1	7,6±0,5
ThioxoLys <sup>7</sup>	10,8±0,8	63,6±0,9	52,8±4,5
ThioxoPhe <sup>8</sup>	12,7±2,2	/	/
ThioxoGlu <sup>9</sup>	8,0±0,4	22,5±0,2	14,5±0,9
ThioxoArg <sup>10</sup>	6,8±0,4	27,7±0,2	20,9±1,2
ThioxoHis <sup>12</sup>	15,4±3,6	/	/
ThioxoNle <sup>13</sup>	6,5±0,3	8,0±0,1	1,5±0,1
ThioxoAsp <sup>14</sup>	5,3±0,4	-12,1±0,1	-17,4±1,7
ThioxoSer <sup>15</sup>	3,1±0,2	-10,6±0,1	-13,7±1,0

Die Differenz der thermodynamischen Parameter errechnet, sich unter Verwendung der Daten der **Tabelle 8**, nach folgender Formel:  $\Delta\Delta J = \Delta J_{\text{Thioxopeptid}} - \Delta J_{\text{Oxo-S-Peptid}}$ .

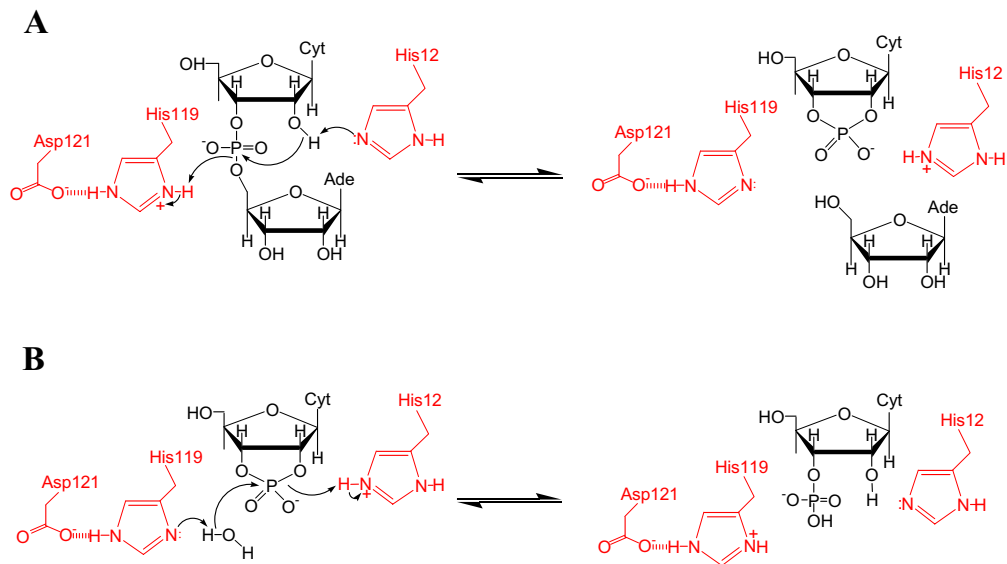


**Abbildung 34 A-C:** Differenz  $\Delta\Delta J = \Delta J_{\text{Thioxopeptid}} - \Delta J_{\text{Oxo-peptid}}$  der thermodynamischen Konstanten  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  und T $\Delta S$  (**Tab. 8**) der S-Peptid/S-Protein-Rekombination in Abhängigkeit von der Thioxylierungsposition im S-Peptid. Die Sequenz des Oxo-S-Peptids lautet: Lys<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>-Ala<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Ala<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Glu<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Gln<sup>11</sup>-His<sup>12</sup>-Nle<sup>13</sup>-Asp<sup>14</sup>-Ser<sup>15</sup>-Ser<sup>16</sup>-Thr<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Ala<sup>19</sup>-Ala<sup>20</sup>.



### 2. 8. 3 Enzymkinetische Charakterisierung thioxylierter Derivate der RNase S

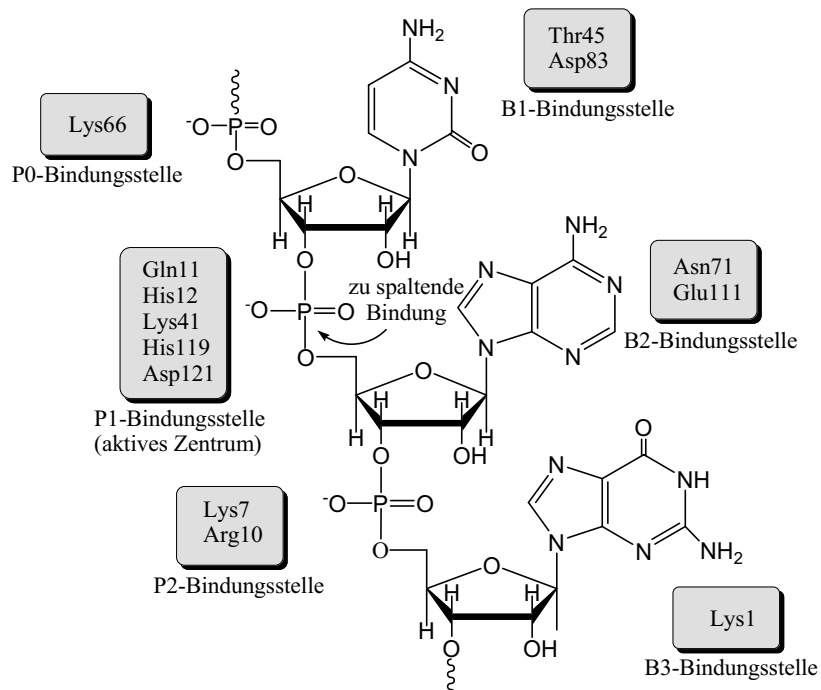
Die RNase A aus Rinderpankreas (EC. 3.1.27.5) gehört zur Gruppe der Endonukleasen und katalysiert die Spaltung einzelsträngiger Ribonukleinsäuren (RNA). In **Abbildung 35** ist der Mechanismus der Ribonuklease A- katalysierten Hydrolyse des Substrats CpA (Cytidyl(3'-5')Adenosin) dargestellt. Die Spaltung des Substrats erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt (Transphosphorylierung) wird zunächst ein zyklisches 2',3'-Cytidinmonophosphat (2',3'-cCMP) gebildet, dass im zweiten Schritt zum 3'-Cytidinmonophosphat (3'-CMP) umgesetzt wird (221).



**Abbildung 35:** Mechanismus der RNase A- katalysierten Hydrolyse des Substrats CpA. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt (**A**) erfolgt zunächst die Bildung eines zyklischen 2',3'-Cytidinmonophosphats, dass im zweiten Schritt (**B**) zum 3'-Cytidinmonophosphat hydrolysiert wird.

In der Transphosphorylierungsreaktion (**Abb. 35 A**) unterstützt das Histidin<sup>12</sup> als Base den nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose auf die Phosphordiestergruppe (222, 223). Gleichzeitig wird diese Reaktion durch die Aminosäure Histidin<sup>119</sup>, die als Säure agiert, gefördert (222-224). In der sich anschließenden Hydrolysereaktion (**Abb. 35 B**), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt, fungiert die Aminosäure Histidin<sup>12</sup> als Säure und die Aminosäure Histidin<sup>119</sup> als Base (225, 226). Entsprechend der Nomenklatur für die RNase A bezeichnet man die Bindungsstelle für die Phosphodiestergruppe im Bereich der Spaltstelle mit P1. Die Bindungsstellen für die Ribose und die Nukleobase an der Spaltstelle werden mit R1 bzw. B1 und im Bereich

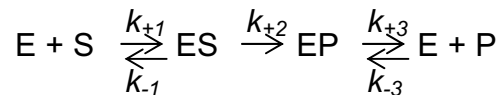
benachbarter Nucleotide analog, jedoch mit einer der Position entsprechenden Nummer bezeichnet (**Abb. 36**).



**Abbildung 36:** Bindung einer RNA durch Ribonuklease A. Die Abkürzungen B und P kennzeichnen die Bindungsstellen für die Nucleobase bzw. die Phosphodiestergruppe. Die Phosphodiesterbindung, deren Hydrolyse durch das Enzym katalysiert wird, befindet sich in der P1- Bindungsstelle. Ribonuklease A bevorzugt Pyrimidin- in der B1- und Purinnucleobasen in der B2- Position.

Ribonuklease A spaltet bevorzugt hinter Pyrimidinnucleotiden. Sie hat daher eine Präferenz für die Nucleobasen Cytosin oder Uracil in der B1- Position. In der B2- und der B3- Position bevorzugt RNase A Purinbasen (Adenin oder Guanin) (**227**).

Für die enzymkinetische Charakterisierung der thioxylierten Derivate der RNase S wurde der von Crook et al. entwickelte Standardtest verwendet, bei dem die enzymkatalysierte Hydrolyse des zyklischen Cytidin-2',3'-monophosphats (2',3'-cCMP) zum Cytidin-3'-monophosphat (3'-CMP) spektrophotometrisch analysiert wird (**228**). Um die enzymkinetischen Konstanten der RNase S- katalysierten Substrathydrolyse ermitteln zu können, ist die genaue Kenntnis der Konzentration des aktiven Enzyms im Reaktionsansatz erforderlich. Da ein S-Protein-Molekül bei Rekombination mit dem S-Peptid ein Molekül der aktiven RNase S ergibt, wurden die kinetischen Messungen bei einer S-Peptid-Konzentration durchgeführt, bei der das S-Protein möglichst vollständig in Form der RNase S vorliegt. Für die Hydrolyse des Substrats 2',3'-cCMP durch RNase S gilt folgendes kinetisches Modell (**229-230**):



Da das Cytidin-3'-monophosphat (3'-CMP), das bei der enzymkatalysierten Hydrolyse des 2',3'-cCMP entsteht, ein kompetitiver Inhibitor der RNase S ist (231, 232), erfolgte die enzymkinetische Charakterisierung der thioxylierten Derivate der RNase S durch drei Konstanten:

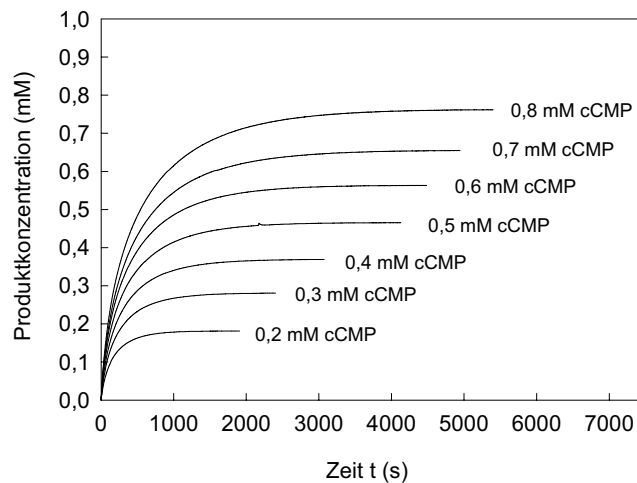
$K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat:  $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$

$K_p$ : Dissoziationskonstante des Enzym/3'-CMP-Komplexes:  $k_{+3}/k_{-3}$

$k_{+2}$ : Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion

Da gilt,  $k_{+1}, k_{-1}, k_{+3}, k_{-3} \gg k_{+2}$ , stellt die Hydrolyse des Substrats im ES-Komplex den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar und  $K_m$  und  $K_p$  entsprechen den Dissoziationskonstanten des Enzym/Substrat- bzw. Enzym/Produkt-Komplexes.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde nach Wang et al. (233) mit Hilfe der Progresskurven der enzymkatalysierten Reaktion durchgeführt. (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Produkt/Zeit- Kurven der RNase S- katalysierten Hydrolyse des Substrats 2',3'- cCMP

Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M MES- Puffer (pH 6, 0,1 M NaCl) bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Die RNase S wurde durch Rekombination des S-Proteins mit dem nichtthioxylierten S-Peptid (Oxo-S-Peptid) erhalten.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der integrierten und speziell für enzymkatalysierte Reaktionen mit Produktinhibierung gültigen Form der Michaelis-Menten-Gleichung (**Gleichung 1** und **2**).

Michaelis-Menten-Gleichung unter Berücksichtigung einer Produktinhibierung:

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m * \left(1 + \frac{[S_0] - [S]}{K_p}\right) + [S]} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

integrierte und linearisierte Form:

$$t = \left(1 + \frac{[S_0]}{[K_p]}\right) * \frac{K_m}{V_{\max}} * \ln \frac{[S_0]}{[S_0] - [P]} + \frac{1}{V_{\max}} * \left(1 - \frac{[K_m]}{[K_p]}\right) * [P] \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Diese Beziehung lässt sich entsprechend **Gleichung 3** vereinfachen:

$$t = \alpha * \ln \frac{[S_0]}{[S_0] - [P]} + \beta * [P] \quad \text{(Gleichung 3)}$$

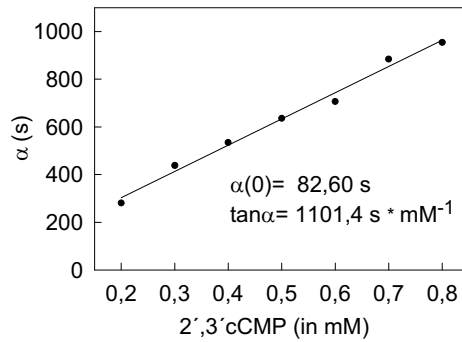
Mittels nichtlinearer Regressionsanalyse lassen sich  $\alpha$  und  $\beta$  aus den Progresskurven der enzymkatalysierten Substrathydrolyse berechnen. Mit  $\beta$  und durch Sekundärauftragung von  $\alpha$  als Funktion der Substratkonzentration ist es möglich, die kinetischen Konstanten  $K_m$ ,  $K_p$  und  $V_{\max}$  mit Hilfe der **Gleichungen 4** und **5** zu ermitteln.

$$\alpha = \left(1 + \frac{[S_0]}{[K_p]}\right) * \frac{K_m}{V_{\max}} \quad \beta = \frac{1 - \frac{[K_m]}{[K_p]}}{V_{\max}} \quad \text{(Gleichung 4 u. 5)}$$

Die Sekundärauftragung von  $\alpha$  als Funktion der Substratkonzentration ergibt eine Gerade (**Abb. 38**), die durch folgende Parameter gekennzeichnet ist:

Anstieg der Geraden:  $\tan \alpha = \frac{K_m}{V_{\max} * K_p} \quad \text{(Gleichung 6)}$

Ordinatenschnittpunkt:  $\alpha(0) = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad \text{(Gleichung 7)}$

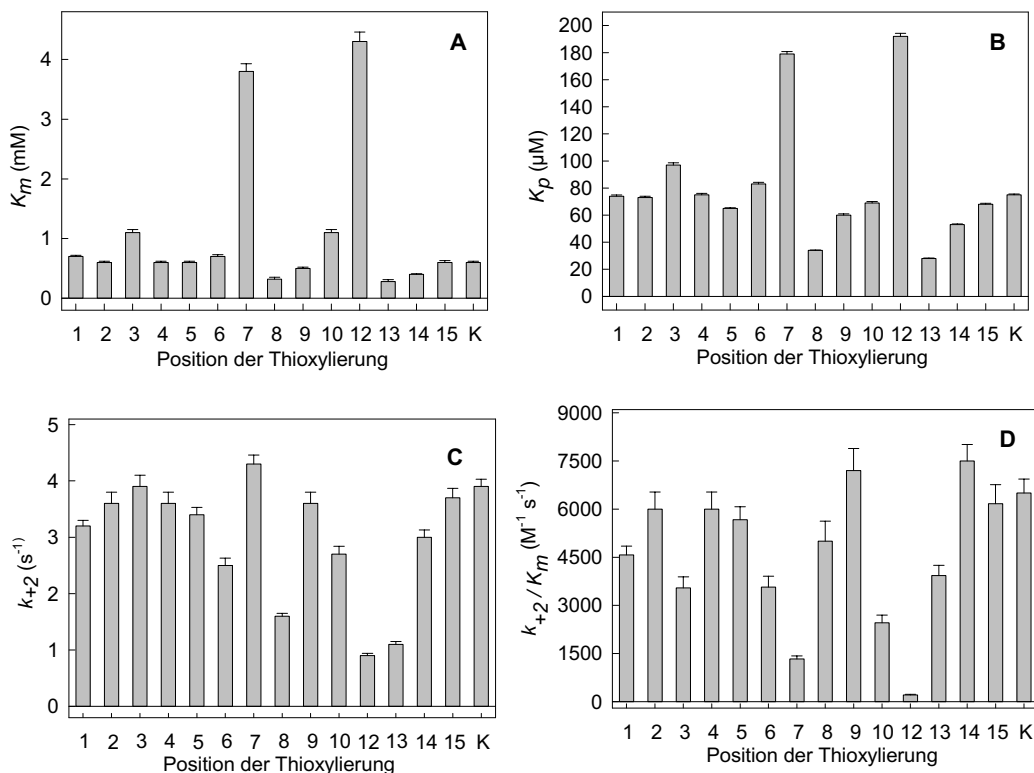


**Abbildung 38:** Sekundärauftragung zur Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten  $K_m$ ,  $K_p$  und  $V_{max}$  der RNase S- katalysierten Hydrolyse des Substrats 2',3'-cCMP

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{+2}$  ergibt sich aus der Beziehung:

$$V_{max} = k_{+2} * [\text{RNase S}] \quad (\text{Gleichung 8})$$

Die Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen sind in den **Abbildungen 39 A-D** bzw. **Tabelle 10** zusammengefasst.



**Abbildung 39:** Enzymkinetische Konstanten der RNase S katalysierten Hydrolyse des Substrats 2',3'-cCMP in Abhängigkeit von der Thioxylierungsposition im S-Peptid  
Die enzymkinetischen Konstanten, die für das nichtthioxylierte S-Peptid gefunden wurden, sind ebenfalls dargestellt (K= Kontrollpeptid). Die kinetischen Konstanten entsprechen den Werten der **Tabelle 10**. Die Sequenz des Oxo-S-Peptids lautet: Lys<sup>1</sup>-Glu<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>-Ala<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Ala<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Glu<sup>9</sup>-Arg<sup>10</sup>-Gln<sup>11</sup>-His<sup>12</sup>-Nle<sup>13</sup>-Asp<sup>14</sup>-Ser<sup>15</sup>-Ser<sup>16</sup>-Thr<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Ala<sup>19</sup>-Ala<sup>20</sup>.

**Tabelle 10:** Enzymkinetische Parameter der RNase S katalysierten Hydrolyse des zyklischen Cytidin-2',3'-monophosphats in Abhängigkeit von der Thioxylierungsposition im S-Peptid

S-Peptid <sup>(1)</sup>	Sättigung des S-Proteins (%) <sup>(2)</sup>	$K_m$ (mM)	$K_p$ ( $\mu$ M)	$k_{+2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{+2}/K_m$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )
ThioxoLys <sup>1</sup> (100 $\mu$ M)	99,2	0,7 $\pm$ 0,02	74 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 0,1	4571 $\pm$ 273
ThioxoGlu <sup>2</sup> (100 $\mu$ M)	99,0	0,6 $\pm$ 0,02	73 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,2	6000 $\pm$ 533
ThioxoThr <sup>3</sup> (1,5 mM)	99,0	1,1 $\pm$ 0,05	97 $\pm$ 1,6	3,9 $\pm$ 0,2	3545 $\pm$ 342
ThioxoAla <sup>4</sup> (100 $\mu$ M)	99,3	0,6 $\pm$ 0,02	75 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,2	6000 $\pm$ 533
ThioxoAla <sup>5</sup> (200 $\mu$ M)	99,2	0,6 $\pm$ 0,02	65 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,13	5667 $\pm$ 406
ThioxoAla <sup>6</sup> (600 $\mu$ M)	98,9	0,7 $\pm$ 0,03	83 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 0,13	3571 $\pm$ 339
ThioxoLys <sup>7</sup> (3,1 mM)	98	3,8 $\pm$ 0,13	179 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 0,16	1332 $\pm$ 95
ThioxoPhe <sup>8</sup> (5 mM)	97	0,32 $\pm$ 0,03	34 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,05	5000 $\pm$ 625
ThioxoGlu <sup>9</sup> (1,8 mM)	98,7	0,5 $\pm$ 0,02	60 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 0,2	7200 $\pm$ 688
ThioxoArg <sup>10</sup> (1,5 mM)	99,0	1,1 $\pm$ 0,05	69 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 0,14	2455 $\pm$ 239
ThioxoHis <sup>12</sup> (8 mM)	94,0	4,3 $\pm$ 0,16	192 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 0,04	209 $\pm$ 17
ThioxoNle <sup>13</sup> (1,4 mM)	99,0	0,28 $\pm$ 0,03	28 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,05	3928 $\pm$ 600
ThioxoAsp <sup>14</sup> (600 $\mu$ M)	98,6	0,4 $\pm$ 0,01	53 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,13	7500 $\pm$ 513
ThioxoSer <sup>15</sup> (600 $\mu$ M)	99,4	0,6 $\pm$ 0,03	68 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 0,17	6167 $\pm$ 592
Oxo-S-Peptid <sup>(3)</sup> (200 $\mu$ M)	99,5	0,6 $\pm$ 0,02	75 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,13	6500 $\pm$ 433

Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M MES-Puffer (0,1 M NaCl, pH 6) unter Verwendung des Substrats 2',3'-cCMP durchgeführt. <sup>1)</sup> Angegeben ist die Konzentration des S-Peptids im Messansatz. <sup>2)</sup> Die Berechnung der Sättigung des S-Proteins mit dem S-Peptidderivat erfolgte mit Hilfe der Assoziationskonstanten  $K_{ASS}$  der **Tabelle 8**. <sup>3)</sup> Das Oxo-S-Peptid entspricht dem synthetisierten nichtthioxylierten S-Peptid.

Die für das nichtthioxylierte S-Peptid (Oxozeptid) erhaltenen Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen stimmen sehr gut mit den aus der Literatur bekannten Werten überein (**233**).

## 2. 8. 4

## Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion der Ergebnisse der enzymkinetischen und ITC-Messungen erfolgt mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturen des RNase S/3'-CMP-Komplexes bzw. der [Nle<sup>13</sup>]-RNase S. Die Röntgenkristallstrukturen findet man in der PDB Protein Daten Bank ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)) unter den ID-Nummern 1RPF (234) bzw. 2RLN (42). Für die Berechnung der Rückgrattorsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  der Aminosäuren 1 bis 15 der RNase S (Tabelle 11) wurde das Programm "Swiss PDB Viewer" (unter [www.expasy.ch/spdbv/](http://www.expasy.ch/spdbv/) erhältlich) verwendet.

**Tabelle 11:** Rückgrattorsionswinkel der Aminosäuren 1 bis 15 des S-Peptids der RNase S

Aminosäure im S-Peptid	$\phi$ (Grad)	$\psi$ (Grad)
Lys <sup>1</sup>	/	/
Glu <sup>2</sup>	-92	125
Thr <sup>3</sup>	-77	167
Ala <sup>4</sup>	-65	-35
Ala <sup>5</sup>	-69	-44
Ala <sup>6</sup>	-61	-44
Lys <sup>7</sup>	-61	-42
Phe <sup>8</sup>	-58	-45
Glu <sup>9</sup>	-63	-51
Arg <sup>10</sup>	-60	-40
Gln <sup>11</sup>	-82	-29
His <sup>12</sup>	-122	-13
Nle <sup>13</sup> (1)	-99	128
Asp <sup>14</sup>	-140	76
Ser <sup>15</sup>	-125	-145

Die Aminosäuren 16 bis 20 des S-Peptids der RNase S sind in der Röntgenkristallstruktur nicht sichtbar, da ihre Flexibilität zu groß ist. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  wurden mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur der [Nle<sup>13</sup>]-RNase S und des Programms "Swiss PDB Viewer" berechnet. <sup>1)</sup> Die Abkürzung Nle bedeutet Norleucin.

### [ThioxoLys<sup>1</sup>]- und [ThioxoGlu<sup>2</sup>]-RNase S

Aus der Röntgenkristallstruktur der RNase S wird ersichtlich, dass sich die Aminosäuren Lys<sup>1</sup> und Glu<sup>2</sup> an der Proteinoberfläche befinden und keine Wasserstoffbrückenbindungen

mit anderen Aminosäuren des S-Peptids oder des S-Proteins ausbilden. Die Salzbrücke zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Glu<sup>2</sup> und Arg<sup>10</sup> bewirkt eine zusätzliche Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids und damit auch der RNase S (**235**). Eine Thioxylierung der Aminosäuren Lys<sup>1</sup> oder Glu<sup>2</sup> des S-Peptids der RNase S führt zu keinen wesentlichen Änderungen der enzymkinetischen Konstanten (**Tab. 10**) oder der Stabilität der RNase S (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Rückgrattorsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  der Aminosäure Glu<sup>2</sup> des S-Peptids der RNase S (**Tab. 11**) befinden sich in einem für die Thioxoamidsubstitution günstigen Bereich (**Abb. 9**). Die Thioxylierung des Lys<sup>1</sup> oder Glu<sup>2</sup> induziert offensichtlich keine Strukturänderungen, die einen Einfluss auf die Substratbindung, die Katalyse oder die Proteinstabilität haben könnten.

### **[ThioxoThr<sup>3</sup>]-RNase S**

Die Thioxylierung der Aminosäure Thr<sup>3</sup> bewirkt eine leichte Erhöhung der enzymkinetischen Konstanten  $K_m$  und  $K_P$  (**Tab. 10**) sowie eine Abnahme der Stabilität der RNase S (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  wird um den Faktor 16 geringer. Die Aminosäure Thr<sup>3</sup> bildet den *N*-Terminus der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids (**39**). Das Carbonylsauerstoffatom des Thr<sup>3</sup> der RNase S ist Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung dieser  $\alpha$ -Helix, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des Lys<sup>7</sup> ist (**Abb. 6**). Strukturveränderungen im S-Peptid, die möglicherweise von einer Störung der Ausbildung oder Abschwächung dieser Wasserstoffbrückenbindung begleitet werden, könnten die beobachtete Abnahme der Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  und die Änderung der enzymkinetischen Konstanten bewirken. Diese Strukturänderungen sind möglicherweise die Folge von sterischen Spannungen, die sich aus der größeren Länge der Thiocarbonylbindung und dem größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms ergeben. Die Kombination der Winkel  $\phi$  und  $\psi$  ( $-77^\circ$ ,  $167^\circ$ ), die für die Aminosäure Thr<sup>3</sup> mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur berechnet wurde (**Tab. 11**), liegt in einem für die Thioxoamidsubstitution energetisch ungünstigeren Bereich. Wie der **Abbildung 9** zu entnehmen ist, führten quantenmechanische Berechnungen des Energiegehalts der Verbindung **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** zu einem höheren Energiegehalt bei  $\psi$ -Winkeln in der Nähe von  $+180^\circ$  (Überlappung des Schwefelatoms mit der  $\alpha$ -NH-Gruppe des Thioxoalanins). Entsprechend den Energiekonturlinien des Ramachandran-Diagramms der Verbindung **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** berechnet sich für die Winkelkombination des Thr<sup>3</sup> der RNase S ein Energiegehalt, der um ca. 1-2 kcal/mol (4-8 kJ/mol) höher liegt als der Energiegehalt des angrenzenden lokalen



Minimums. In diesen Bereich fällt auch der  $\Delta\Delta G$ -Wert bei Thioxylierung des Thr<sup>3</sup> der RNase S (**Tab. 9**).

### **[ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S**

Die Aminosäure Ala<sup>4</sup> ist Bestandteil der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids der RNase S und befindet sich an der Proteinoberfläche, in einem Bereich geringer Packungsdichte von Atomen. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur für die Aminosäuren Ala<sup>4</sup> und Ala<sup>5</sup> ermittelt wurden, befinden sich in einem für die Thioxylierung des Ala<sup>4</sup> günstigen Bereich (**Tab. 11, Abb. 9**). Eine Thioxylierung des Ala<sup>4</sup> bewirkt keine bemerkenswerten Änderungen der enzymkinetischen Konstanten (**Tab. 10**). Ein Vergleich der  $\Delta G$ -Werte zeigt, dass die Thioxylierung des Ala<sup>4</sup> des S-Peptids zu einer Erhöhung der Stabilität der RNase S um 0,8 kJ/mol führt (**Tab. 8, 9, Abb. 34 A-C**). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Miwa et al. (73) überein, die zeigen konnten, dass im Gegensatz zu den theoretischen Berechnungen die Einführung der Thioxo-peptidbindung in zentrale Bereiche einer  $\alpha$ -Helix sogar eine Erhöhung der Helixstabilität verursachen kann. Das von ihnen verwendete Thioxo-peptid bildet in wässriger Lösung eine  $\alpha$ -Helix aus, bei der die Thioxo-peptidbindung sowohl Donor (NH-Gruppe) als auch Akzeptor (Schwefelatom) einer entsprechenden Wasserstoffbrückenbindung ist. Im Fall der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S ist die Thioxo-peptidbindung (Schwefelatom) jedoch lediglich der Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des Phe<sup>8</sup> ist (**Abb. 6**). Damit existiert mit der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S das erste Beispiel in dem gezeigt wird, dass entgegen den theoretischen Berechnungen die  $\alpha$ -Helix eines Peptids durch Thioxylierung einer Peptidbindung, die lediglich als Akzeptor im Netzwerkwerk der Wasserstoffbrückenbindungen einer  $\alpha$ -Helix agiert, gesteigert werden kann.

### **[ThioxoAla<sup>5</sup>]-RNase S**

Die Thioxylierung des Ala<sup>5</sup> der RNase S bewirkt keine nennenswerten Änderungen der enzymkinetischen Konstanten (**Tab. 10**). Sie führt jedoch zu einer geringfügigen Destabilisierung der RNase S um 1,2 kJ/mol. Dabei wird der ungünstigere Wert, der für  $\Delta H$  bestimmt wurde ( $\Delta\Delta H = 4,6$  kJ/mol), durch eine etwas günstigere Entropieänderung ( $T\Delta\Delta S = 3,4$  kJ/mol) teilweise kompensiert (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Aminosäure Ala<sup>5</sup> ist nicht nur Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung im S-Peptid der RNase S (Donor:  $\alpha$ -NH-Gruppe des Glu<sup>9</sup>), sondern stabilisiert die RNase S auch als Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Pro<sup>117</sup> des S-Proteins (**39**). Diese Wasserstoff-

brückenbindung wird über ein Wassermolekül vermittelt. Möglicherweise wird die Stabilität dieser Wasserstoffbrückenbindungen infolge der Thioxoamidsubstitution verringert. Das Carbonylsauerstoffatom des Ala<sup>5</sup> der RNase S befindet sich in einem Bereich höherer Packungsdichte von Atomen. Der Abstand des Carbonylsauerstoffatoms des Ala<sup>5</sup> zum C<sup>β</sup>-Wasserstoffatom und zum C<sup>β</sup>-Kohlenstoffatom des Phe<sup>8</sup> (diese Aminosäure ist für die Stabilität der RNase S von entscheidender Bedeutung) beträgt in der Röntgenkristallstruktur (2RLN) nur 2,63 Å bzw. 3,49 Å. Addiert man die Van-der-Waals Radien eines Wasserstoff-(1,2 Å) bzw. Kohlenstoffatoms (2,0 Å) mit dem eines Schwefelatoms (1,85 Å), so ergibt sich ein Wert von 3,05 Å bzw. 3,85 Å. Die Abstände liegen somit unterhalb der Summe der Van-der-Waals Radien. Damit verbundene Abstoßungskräfte verringern die Bindungsenergie zwischen S-Peptid und S-Protein und könnten somit ebenfalls die beobachtete Abnahme der Stabilität der RNase S bewirken. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die für das Ala<sup>5</sup> und Ala<sup>6</sup> berechnet wurden, liegen in einem für die Thioxylierung des Ala<sup>5</sup> günstigen Bereich (**Tab. 11, Abb. 9**).

### [ThioxoAla<sup>6</sup>]-RNase S

Bei einer Thioxylierung des Ala<sup>6</sup> der RNase S verringert sich die enzymkinetische Konstante  $k_{+2}$  um ca. 36 %, während die Konstanten  $K_m$  und  $K_p$  nahezu unverändert bleiben (**Tab. 10**). Die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  für die Bildung der RNase S verringert sich um den Faktor 7 (**Tab. 8**). Eine Thioxylierung des Ala<sup>6</sup> bewirkt eine Abnahme des Betrags von  $\Delta H$  um 12,3 kJ/mol, die durch die günstigere Entropieänderung ( $T\Delta\Delta S = 7,6$  kJ/mol) teilweise kompensiert wird. Der Betrag von  $\Delta G$  verringert sich damit um 4,7 kJ/mol (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Das Carbonylsauerstoffatom des Ala<sup>6</sup> ist Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung in der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids der RNase S, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des Arginins<sup>10</sup> ist (**Abb. 6**). Die Verringerung der Stabilität dieser Wasserstoffbrückenbindung infolge der Thioxoamidsubstitution könnte die beobachtete Destabilisierung der RNase S erklären. Des Weiteren ist es möglich, dass die Überlappung der Van-der-Waals Radien des Schwefelatoms und benachbarter Atome eine weitere Abnahme der Stabilität des Komplexes verursachen. Die Abstände zwischen dem Carbonylsauerstoffatom des Ala<sup>6</sup> und dem C<sup>β</sup>-Wasserstoff- bzw. C<sup>β</sup>-Kohlenstoffatom des Glu<sup>9</sup> betragen nur 2,64 Å bzw. 3,48 Å. Sie liegen damit deutlich unterhalb der Summe der Van-der-Waals Radien eines Wasserstoff- und Schwefel- (3,05 Å) bzw. Kohlenstoff- und Schwefelatoms (3,85 Å). Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  des Ala<sup>6</sup> bzw. Lys<sup>7</sup> befinden sich in einem für die Thioxylierung des Ala<sup>6</sup> günstigen Bereich (**Tab. 11, Abb. 9**).

### [ThioxoLys<sup>7</sup>]-RNase S

Wie der **Tabelle 10** zu entnehmen ist, führt die Thioxylierung der Aminosäure Lys<sup>7</sup> zu einer Vergrößerung der Konstanten  $K_m$  und  $K_p$  um den Faktor 6 bzw. 3. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{+2}$  wird durch die Thioxylierung des Lys<sup>7</sup> kaum beeinflusst. Dies bedeutet, dass die räumliche Lage der Seitenkette des Lys<sup>7</sup> kaum verändert wird, denn ihre positive Ladung induziert in der RNase S eine für die effiziente Katalyse notwendige Abnahme des pKa- Werts des Imidazolringsystems der Aminosäure His<sup>12</sup> (**236, 237**). Die Thioxoamidsubstitution bewirkt möglicherweise eine Änderung der räumlichen Lage der Aminosäure Gln<sup>11</sup>, denn die  $\alpha$ -NH-Gruppe des Gln<sup>11</sup> ist in der RNase S Donor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Akzeptor das Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure Lys<sup>7</sup> ist (**Abb. 6**). Gln<sup>11</sup> unterstützt die Substratbindung und die Katalyse durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu einem Sauerstoffatom der negativ geladenen Phosphodiestergruppe des Substrats an der Spaltstelle (**238**). Eine geringfügige Abweichung der räumlichen Anordnung der Seitenkette des Gln<sup>11</sup> bei Thioxylierung des Lys<sup>7</sup>, könnte die Länge oder den Winkel dieser Wasserstoffbrückenbindung verändern und somit die beobachteten Änderungen der katalytischen Konstanten verursachen. Die Thioxylierung des Lys<sup>7</sup> bewirkt eine Destabilisierung der RNase S um 10,8 kJ/mol (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Eine Strukturänderung und Destabilisierung der RNase S bei Thioxylierung des Lys<sup>7</sup> wird möglicherweise durch die größere Länge der Thiocarbonylbindung und den größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms induziert, da die Abstände des Carbonylsauerstoffatoms des Lys<sup>7</sup> zum C <sup>$\gamma$</sup> -Wasserstoffatom mit 2,47 Å, zum C <sup>$\gamma$</sup> -Kohlenstoffatom mit 3,3 Å und zum C <sup>$\beta$</sup> - Kohlenstoffatom der Seitenkette der Aminosäure Gln<sup>11</sup> mit 3,44 Å deutlich unterhalb der Summe der Van-der-Waals Radien eines Wasserstoff- und Schwefel- bzw. Kohlenstoff- und Schwefelatoms liegen (3,05 Å bzw. 3,85 Å). Eine weitere Destabilisierung des Komplexes in Folge überlappender Van-der-Waals Radien ergibt sich aus den Abständen des Carbonylsauerstoffatoms des Lys<sup>7</sup> zum C <sup>$\gamma$</sup> -Kohlenstoffatom des Lys<sup>7</sup> (3,3 Å) und dem C <sup>$\beta$</sup> -Kohlenstoffatom des Lys<sup>7</sup> (3,3 Å). Die daraus resultierenden Abstoßungskräfte könnten neben einer Abnahme der Bindungsenergie auch eine Strukturänderung bewirken. Darüber hinaus ist die unmittelbar benachbarte Aminosäure Phe<sup>8</sup> von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der RNase S. Damit verursacht eine durch die Thioxylierung des Lys<sup>7</sup> möglicherweise hervorgerufene Störung der exakten räumlichen Anordnung der Seitenkette des Phe<sup>8</sup> eine Destabilisierung der RNase S. Die Aminosäure Phe<sup>8</sup> der RNase S bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem His<sup>12</sup> des aktiven Zentrums aus (**Abb. 6**). Somit könnte sich eine in Folge der Thioxylierung des Lys<sup>7</sup>

induzierte Änderung der räumlichen Lage des Phe<sup>8</sup> auf das aktive Zentrum und damit auf die katalytischen Konstanten auswirken. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  des Lys<sup>7</sup> und Phe<sup>8</sup> liegen in einem für die Thioxylierung des Lys<sup>7</sup> energetisch günstigen Bereich (**Tab. 11, Abb. 9**).

### [ThioxoPhe<sup>8</sup>]-RNase S

Bei einer Thioxylierung des Phe<sup>8</sup> verringern sich die Konstanten  $K_m$ ,  $K_p$  und  $k_{+2}$  etwa um die Hälfte (**Tab. 10**). Die Destabilisierung der RNase S infolge der Thioxylierung des Phe<sup>8</sup> ist so groß, dass eine thermodynamische Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Rekombination mittels ITC nicht möglich ist. Die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  kann jedoch, wie in **Abschnitt 2. 8. 2** beschrieben wurde, mit Hilfe enzymkinetischer Messungen näherungsweise bestimmt werden. Dem entsprechend, führt die Thioxylierung des Phe<sup>8</sup> zu einer Abnahme der Stabilität der RNase S um 12,7 kJ/mol (**Tab. 7, 9; Abb. 34 A**). Die Aminosäure Phe<sup>8</sup> des S-Peptids ist für die Stabilität der RNase S von entscheidender Bedeutung, da hydrophobe und Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen der Seitenkette des Phe<sup>8</sup> und dem S-Protein einen bedeutenden Anteil der Bindungsenergie der Wechselwirkung zwischen S-Peptid und S-Protein ergeben (**27, 44**). Die Seitenkette des Phe<sup>8</sup> der RNase S befindet sich in einer hydrophoben Tasche, welche durch die Aminosäuren Val<sup>47, 54, 57, 108</sup>, Ile<sup>81, 106</sup>, Leu<sup>51</sup>, Met<sup>79</sup>, Pro<sup>117</sup> und Phe<sup>120</sup> des S-Proteins gebildet wird (**239**). Eine Wechselwirkung zwischen dem Phenylringsystem des Phe<sup>8</sup> und dem Imidazolringsystem des His<sup>12</sup> bewirkt eine zusätzliche Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids und somit auch der RNase S (**240**). Die Packungsdichte der Atome im Bereich des Phe<sup>8</sup> der RNase S ist sehr hoch (**241**). Die geringen Abstände des Carbonylsauerstoffatoms des Phe<sup>8</sup> der RNase S zu verschiedenen Atomen der Seitenketten des His<sup>12</sup> ( $C^\beta$ -Atom: 3,4 Å,  $C^\beta$ -H-Atom: 2,75 Å, C-Atom des Imidazolringsystems: 3,48 Å, H-Atom des Imidazolringsystems: 2,89 Å) und des Phe<sup>8</sup> (C-Atome des Phenylrings: 3,32 Å und 3,45 Å,  $C^\beta$ -Atom: 3,35 Å) würden bei einem Austausch des Carbonylsauerstoffatoms der Aminosäure Phe<sup>8</sup> gegen ein Schwefelatom auf Grund der größeren Länge der C=S-Bindung sowie des erhöhten Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms zu einer Überlappung der Van-der-Waals Radien verschiedener Atome mit dem Schwefelatom führen. Die sich daraus ergebenden Abstoßungskräfte sollten eine Destabilisierung der RNase S bewirken. Insbesondere die Überlappung der Van-der-Waals Radien des Schwefelatoms und verschiedener Atome in der Seitenkette des His<sup>12</sup>, könnte sich störend auf die exakte Anordnung des am Katalysemechanismus beteiligten Imidazolringsystems des His<sup>12</sup> und damit auf die katalytischen Konstanten auswirken. Das Carbonylsauerstoffatom des Phe<sup>8</sup> ist in der RNase S

Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des His<sup>12</sup> (aktives Zentrum) ist (**Abb. 6**). Eine in Folge der Thioxylierung auftretende Veränderung der Länge oder des Winkels dieser Bindung wirkt sich möglicherweise ebenfalls auf die räumliche Lage des His<sup>12</sup> im Protein aus. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur (**Tab. 11**) für das Phe<sup>8</sup> und Glu<sup>9</sup> berechnet wurden, liegen in einem für Thioxylierung des Phe<sup>8</sup> günstigen Bereich (**Abb. 9**).

### [ThioxoGlu<sup>9</sup>]-RNase S

Die Thioxylierung der Aminosäure Glu<sup>9</sup> bewirkt eine Abnahme der Assoziationskonstanten  $K_{Ass}$  der S-Peptid/S-Protein-Rekombination um den Faktor 25. Verursacht wird der Stabilitätsverlust durch eine deutliche Abnahme des Betrags von  $\Delta H$  um 22,5 kJ/mol. Die günstigere Entropieänderung ( $T\Delta S=14,5$  kJ/mol) kann dies teilweise kompensieren, so dass die Abnahme des Betrags von  $\Delta G$  bei Thioxylierung der Aminosäure Glu<sup>9</sup> 8.0 kJ/mol beträgt (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Aminosäure Glu<sup>9</sup> ist in der RNase S Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des für die Stabilität der RNase S sehr wichtigen Nle<sup>13</sup> ist (**39, Abb. 6**). Darüber hinaus führt die Ausbildung einer über ein Wassermolekül vermittelten Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Sauerstoffatom der Seitenkette der Aminosäure Glu<sup>9</sup> ( $O^{\epsilon 2}$ ) und dem  $N^{\epsilon 2}$ -Stickstoffatom der Seitenkette des Gln<sup>55</sup> zu einer zusätzlichen Stabilisierung der RNase S (**39**). Die Destabilisierung dieser Wasserstoffbrückenbindungen in Folge der Thioxylierung des Glu<sup>9</sup> könnte den deutlich ungünstigeren Wert von  $\Delta H$  erklären. Das Carbonylsauerstoffatom der  $\alpha$ -CO-Funktion der Aminosäure Glu<sup>9</sup> befindet sich in einem Bereich höherer Packungsdichte von Atomen. In der Röntgenkristallstruktur der RNase S (2RLN) betragen die Abstände zum  $C^{\beta}$ -Wasserstoff- und  $C^{\beta}$ -Kohlenstoffatom des Nle<sup>13</sup> 2,62 Å bzw. 3,45 Å, zu einem Stickstoffatom ( $N^{\eta 1}$ ) der Guanidinfunktion des Arg<sup>33</sup> 3,45 Å. In Folge der Überlappung der Van-der-Waals Radien führt die Thioxoamidsubstitution zu einer Destabilisierung der RNase S. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur (**Tab. 11**) für das Glu<sup>9</sup> und Arg<sup>10</sup> berechnet wurden, liegen in einem für die Thioxylierung des Glu<sup>9</sup> günstigen Bereich (**Abb. 9**).

### [ThioxoArg<sup>10</sup>]-RNase S

Die deutliche Abnahme der Stabilität der RNase S in Folge der Thioxylierung des Arg<sup>10</sup> ( $\Delta \Delta G= 6,8$  kJ/mol) wird von einer Abnahme des Betrags von  $\Delta H$  um 27,7 kJ/mol verursacht, die durch die günstigere Entropieänderung ( $T\Delta S= 20,9$  kJ/mol) nicht

kompensiert werden kann (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Aminosäure Arg<sup>10</sup> ist als Donor ( $\alpha$ -NH-Gruppe) einer Wasserstoffbrückenbindung im S-Peptid (Akzeptor:  $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatom des Ala<sup>6</sup>) und als Akzeptor ( $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatom) einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor das N<sup>n1</sup>-Stickstoffatom in der Seitenkette der Aminosäure Arg<sup>33</sup> des S-Proteins ist, sehr wichtig für die Stabilität der RNase S (**39, Abb. 6, 7**). Eine weitere, die RNase S stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung, wird zwischen der Guanidinfunktion des Arg<sup>10</sup> (Donor: N<sup>n1</sup>-Stickstoffatom) und dem Carbonylsauerstoffatom des Arg<sup>33</sup> ausgebildet (**39**). Die Abnahme der Stabilität der RNase S ist möglicherweise auf eine Abschwächung dieser Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Aus der Röntgenkristallstruktur der RNase S (2RNL) wird ersichtlich, dass die Packungsdichte der Atome im Bereich des  $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatoms des Arg<sup>10</sup> sehr hoch ist (Abstände zu benachbarten Atomen: C <sup>$\beta$</sup> -H-Atom des Arg<sup>33</sup>: 2,68 Å; C <sup>$\delta$</sup> -H-Atom des Arg<sup>33</sup>: 2,78 Å; C <sup>$\beta$</sup> -Atom des Arg<sup>33</sup>: 3,44 Å; C <sup>$\delta$</sup> -Atom des Arg<sup>33</sup>: 3,47 Å; C <sup>$\gamma$</sup> -Atom des Arg<sup>10</sup>: 3,14 Å; C <sup>$\delta$</sup> -H-Atom des Arg<sup>10</sup>: 2,76 Å). Auf Grund der Größe des Schwefelatoms und der längeren Thiocarbonylbindung, kommt es zu einer Überlappung der Van-der-Waals Radien dieser Atome und des Schwefelatoms der Thiopeptidbindung. Dies könnte neben einer Destabilisierung der RNase S auch eine Strukturveränderung bewirken, die zu den in **Tab. 7** aufgeführten geringfügigen Änderungen der enzymkinetischen Konstanten führt. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur (**Tab. 11**) für das Arg<sup>10</sup> und Gln<sup>11</sup> berechnet wurden, liegen in einem für Thioxylierung des Arg<sup>10</sup> günstigen Bereich (**Abb. 9**).

### [ThioHis<sup>12</sup>]-RNase S

Die Thioxylierung der Aminosäure His<sup>12</sup> des S-Peptids der RNase S führt zu einer Erhöhung der enzymkinetischen Konstanten  $K_m$ - und  $K_p$  um den Faktor 7 bzw. 2,5. Der  $k_{+2}$ -Wert verringert sich um den Faktor 4. Das His<sup>12</sup> ist für die Funktion der RNase S essentiell, da das Imidazolringsystem an der Substratbindung (**234, 242**) sowie am Katalysemechanismus beteiligt ist (**46, 48, 223, 225, 231, 243**). Der Austausch des Sauerstoffatoms der Peptidbindung gegen ein Schwefelatom induziert offensichtlich eine Strukturänderung, die sich auf die Anordnung der Seitenkette des Histidins im Protein und damit auf die Substratbindung und Katalyse auswirkt. Einen besonders dramatischen Effekt hat die Thioxylierung des His<sup>12</sup> auf die Stabilität der RNase S. Die Destabilisierung der RNase S ist so groß, dass eine thermodynamische Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Rekombination mittels ITC nicht möglich ist. Die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  wurde

deshalb mit Hilfe enzymkinetischer Messungen bestimmt (**Abschnitt 2. 8. 2**). Die Thioxylierung des His<sup>12</sup> führt zu einer Destabilisierung der RNase S um 15,4 kJ/mol (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A**). Die Aminosäure His<sup>12</sup> hat eine große Bedeutung für die Stabilität der RNase S. Wie bereits erwähnt wurde, führt die Wechselwirkung zwischen den Ringssystemen der Seitenketten des Phe<sup>8</sup> und His<sup>12</sup> zu einer zusätzlichen Stabilisierung der RNase S. His<sup>12</sup> stabilisiert die RNase S durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (Akzeptor:  $\alpha$ -CO-Funktion des His<sup>12</sup>) mit dem S-Protein (Donor:  $\alpha$ -NH-Gruppe des Val<sup>47</sup>). Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen dem Imidazolringssystem des His<sup>12</sup> (Donor: N <sup>$\delta$ 1</sup>-Stickstoffatom) und dem Carbonylsauerstoffatom des Thr<sup>45</sup> ausgebildet (**39, Abb. 7**). Die Abschwächung dieser Wasserstoffbrückenbindungen infolge der Thioxylierung könnte die deutliche Abnahme der Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  bewirken. Auf Grund der relativ dichten Packung der Atome innerhalb des Proteins (Abstände des  $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatoms des His<sup>12</sup> zu benachbarten Atomen: 2,58 Å zum C <sup>$\alpha$</sup> -H-Atom des Phe<sup>46</sup>; 2,95 Å zum  $\beta$ -C-Atom des His<sup>12</sup>), wird die größere Länge der Thio-carbonylbindung und der größere Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms die exakte Anordnung des His<sup>12</sup> bzw. von räumlich benachbarten Atomen oder Atomgruppen im Protein stören. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die aus der Röntgenkristallstruktur der RNase S (**Tab. 11**) für die Aminosäure His<sup>12</sup> ermittelt wurden, liegen mit  $-122^\circ$  und  $-13^\circ$  in einem für die Thioxoamidsubstitution sehr ungünstigen Bereich. Theoretische Berechnungen unter Verwendung der Modellverbindung **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** haben gezeigt, dass diese Winkelkombination einen Energiegehalt ergibt, der um mindestens 3 kcal/mol (ca. 12 kJ/mol) höher liegt als das angrenzende Energieminimum (**Abb. 9**). Dies sollte zu einer deutlichen Destabilisierung und möglicherweise auch zu Strukturänderungen in der RNase S führen.

### **[ThioxoNle<sup>13</sup>]-RNase S**

Die Thioxylierung des Nle<sup>13</sup> führt zu einer Verkleinerung der enzymkinetischen Konstanten  $K_m$ ,  $K_p$  und  $k_{+2}$  um den Faktor 2 bis 4 (**Tab. 10**). Die Abnahme der Stabilität der RNase S bei Thioxylierung des Nle<sup>13</sup>, die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  sinkt um den Faktor 13, ist auf einen um 8,0 kJ/mol ungünstigeren Wert von  $\Delta H$  zurückzuführen, während sich  $T\Delta S$  nur geringfügig ändert (**Tab. 8, 9; Abb. 34 A-C**). Die Aminosäure Nle<sup>13</sup> hat, wie das Phe<sup>8</sup>, eine besondere Bedeutung für die Stabilität der RNase S, da hydrophobe und Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten beider Aminosäuren und hydrophoben Bereichen des S-Proteins einen großen Anteil der Bindungsenergie

zwischen S-Peptid und dem S-Protein in der RNase S ergeben (**25, 41, 43**). Die Aminosäure Nle<sup>13</sup> bildet als Donor einer Wasserstoffbrückenbindung (Akzeptor:  $\alpha$ -Carboxylsauerstoffatom des Glu<sup>9</sup>) den C-Terminus der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids der RNase S (**Abb. 6**). Zwei Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Carbonylsauerstoffatom des Nle<sup>13</sup> als Akzeptor und der Guanidinofunktion des Arg<sup>33</sup> als Donor ( $N^{\eta 1}$  und  $N^{\eta 2}$ -Stickstoffatom) ausgebildet werden, bewirken eine zusätzliche Stabilisierung (**39, Abb. 7**). Die in Folge der Thioxylierung beobachtete Abnahme des Betrags von  $\Delta H$  könnte durch eine Abschwächung dieser Wasserstoffbrückenbindungen verursacht werden. Eine weitere Destabilisierung und möglicherweise Strukturänderung wird vermutlich durch Abstoßungskräfte in Folge der größeren Länge der Thiocarbonylbindung und des größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms bewirkt, da sich die Aminosäure Nle<sup>13</sup> der RNase S in einem Bereich höherer Packungsdichte von Atomen befindet. Der geringe Abstand des Carbonylsauerstoffatoms des Nle<sup>13</sup> der RNase S zum  $C^{\zeta}$ -Kohlenstoffatom der Guanidinogruppe des Arg<sup>33</sup> (3,33 Å) führt zur Überlappung der Van-der-Waals Radien dieses Atoms und des Schwefelatoms der Thiopeptidbindung. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die für die Aminosäuren Nle<sup>13</sup> und Asp<sup>14</sup> mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur berechnet wurden (**Tab. 11**) liegen in einem für die Thioxylierung des Nle<sup>13</sup> energetisch ungünstigeren Bereich (**Abb. 9**). Für die  $\phi$ - $\psi$ -Winkelkombinationen des Nle<sup>13</sup> und des Asp<sup>14</sup> ergeben die Ramachandran-Diagramme der Verbindung **Ac-Ala- $\Psi$ [CS-NH]-CH<sub>3</sub>** bzw. **Ac- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-NH-CH<sub>3</sub>** Energiegehalte, die jeweils 1kcal/mol (4,19 kJ/mol) oberhalb des angrenzenden Energieminimums liegen.

### **[ThioxoAsp<sup>14</sup>]-RNase S und [ThioxoSer<sup>15</sup>]-RNase S**

Während in der Röntgenkristallstruktur der RNase S keine Wasserstoffbrückenbindungen für die Aminosäure Ser<sup>15</sup> angezeigt werden, stabilisiert die Aminosäure Asp<sup>14</sup> die RNase S als Donor ( $\alpha$ -NH-Gruppe) einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Akzeptor die Aminosäure Val<sup>47</sup> ( $\alpha$ -Carboxylsauerstoffatom) des S-Proteins ist (**39, Abb. 6, 7**). Die Aminosäuren 16 bis 20 des S-Peptids sind in der Röntgenkristallstruktur der RNase S nicht sichtbar, da dieser Bereich zu flexibel ist. Die Werte für  $\Delta H$ , die für die Bindung des [ThioxoAsp<sup>14</sup>]- und des [ThioxoSer<sup>15</sup>]-S-Peptids an das S-Protein ermittelt wurden, sind mit -144,5 und -143,0 kJ/mol deutlich günstiger als der Wert, der für das nichtthioxylierte S-Peptid (-132,4 kJ/mol) bestimmt wurde. Dies deutet auf Ausbildung zusätzlicher, bindender Wechselwirkungen hin. Der deutlich ungünstigere Wert, der für  $T\Delta S$  ermittelt wurde, könnte bedeuten, dass diese zusätzlichen Wechselwirkungen die Flexibilität der

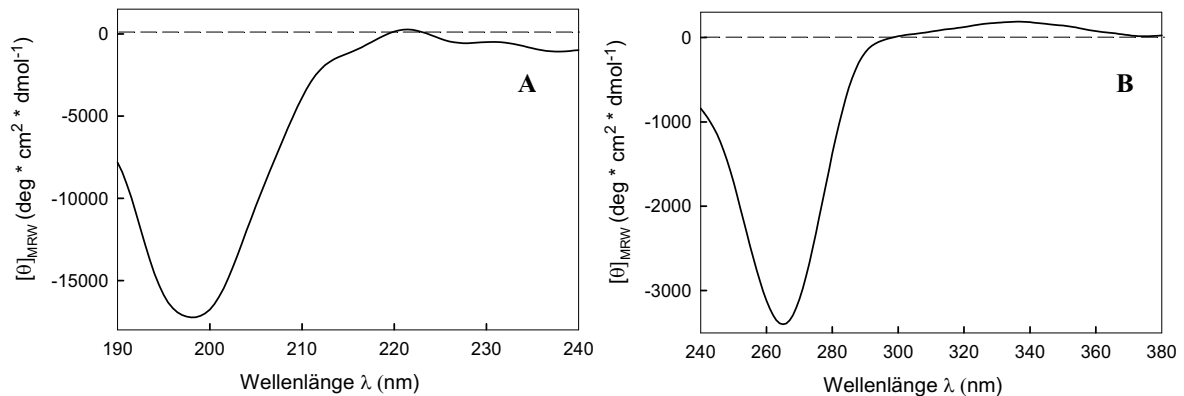


Aminosäuren 16-20 im S-Peptid der RNase S verringern. Denkbar wäre die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung mit den Aminosäuren Ser<sup>16</sup>, Thr<sup>17</sup> oder Ser<sup>18</sup> des S-Peptids. Die hohe Flexibilität in diesem Bereich des S-Peptids und die laut Röntgenkristallstruktur der RNase A (hier sind die Aminosäuren 16-20 sichtbar) geeigneten Abstände von Atomgruppen (z.B der  $\beta$ -OH-Gruppe des Thr<sup>17</sup> oder des Ser<sup>18</sup>) könnten die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung bei einer Thioxylierung des Asp<sup>14</sup> bzw. Ser<sup>15</sup> bewirken. Die Winkel  $\phi$  und  $\psi$ , die für die Aminosäuren Asp<sup>14</sup> und Ser<sup>15</sup> mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur ermittelt wurden, liegen mit  $-139,7^\circ$  und  $+76^\circ$  bzw.  $-125,0^\circ$  und  $-145,0^\circ$  in einem Bereich sehr hoher Energie. Diese Winkelkombinationen sind, wie man der **Abbildung 9** entnehmen kann, sehr unwahrscheinlich.

## 2. 8. 5

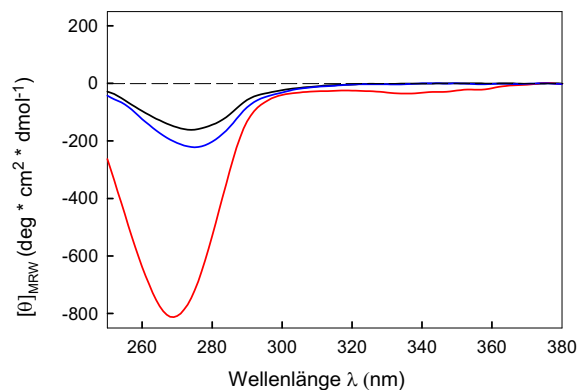
## CD-spektroskopische Untersuchungen

Die CD-Spektren (Nah- und Fern-UV) des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids sowie die CD-Spektren (Nah-UV-Bereich) des S-Proteins, der RNase S und [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S sind in den **Abbildungen 40** und **41** dargestellt.



**Abbildung 40:** CD-spektroskopische Charakterisierung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids

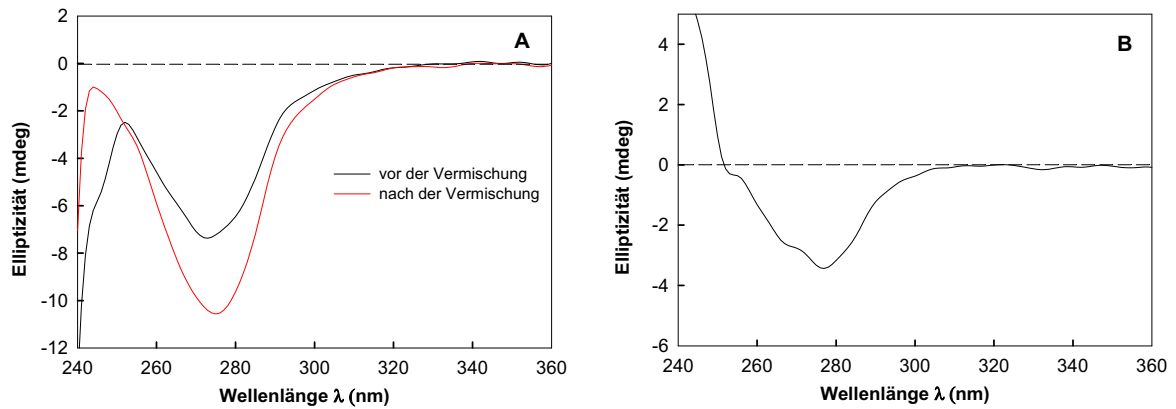
Die Aufnahme des CD-Spektrums im Fern-UV-Bereich (A) erfolgte in Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,2) bei einer Schichtdicke von 1 mm und einer Konzentration des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids von 47,9 μM. Das CD-Spektrum im Nah-UV-Bereich (B) wurde in Analogie zu den ITC-Messungen in Natriumacetatpuffer (50 mM, 100 mM NaCl, pH 6,0) bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Konzentration des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids von 60 μM erhalten. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C.



**Abbildung 41:** CD-spektroskopische Charakterisierung des S-Proteins (schwarz), der RNase S (blau) und der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S (rot)

Die CD-Spektren wurden in Analogie zu den ITC-Messungen in Natriumacetatpuffer (50 mM, 100 mM NaCl, pH 6,0) bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Konzentration des S-Proteins von 92,7 μM, der RNase S von 44,73 μM und der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S von 28,07 μM erhalten. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C. Die Konzentration des Oxo-S-Peptids bzw. [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids wurde so hoch gewählt, dass eine vollständige Sättigung des S-Proteins erfolgte. Der Anteil des freien Oxo-S-Peptids bzw. [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids wurde vom Spektrum abgezogen.

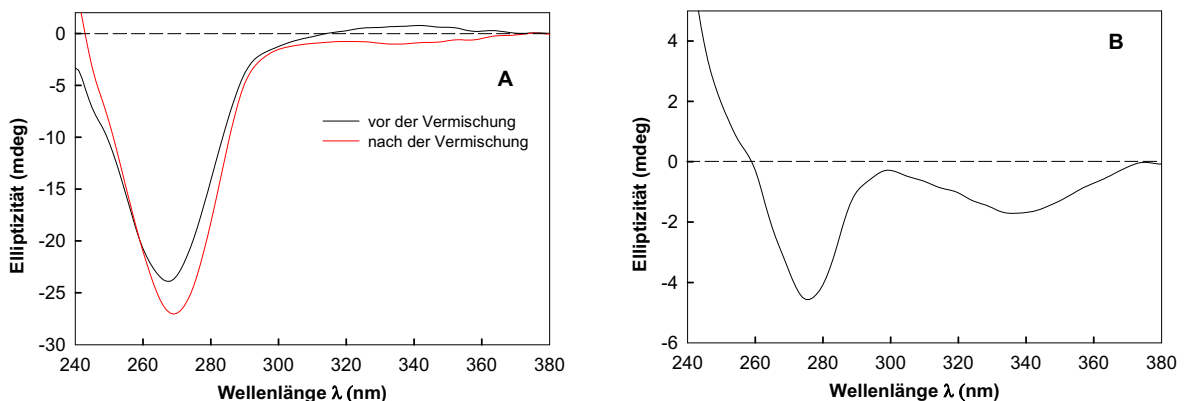
Die Bindung des Oxo-S-Peptids an das S-Protein führt, wie den **Abbildungen 41, 42A und 42B** zu entnehmen ist, zu einer deutlichen Änderung des CD-Spektrums im Bereich von 260 bis 280 nm.



**Abbildung 42:** CD-spektroskopische Charakterisierung der Rekombination zwischen Oxo-S-Peptid und S-Protein

Die Aufnahme der unter **A** gezeigten CD-Spektren erfolgte bei 25 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl; pH 6,0) unter Verwendung einer Doppelkammerküvette. Kammer 1 wurde mit einer 90 µM Lösung des S-Proteins und Kammer 2 mit einer 450 µM Lösung des Oxo-S-Peptids gefüllt. Die Schichtdicke einer Kammer beträgt 4,34 mm. Nach Vermischung der Lösungen beider Kammern wurde der Messansatz vor Beginn der Messung zunächst 15 min bei 25 °C inkubiert. In **B** ist das entsprechende Differenzspektrum dargestellt.

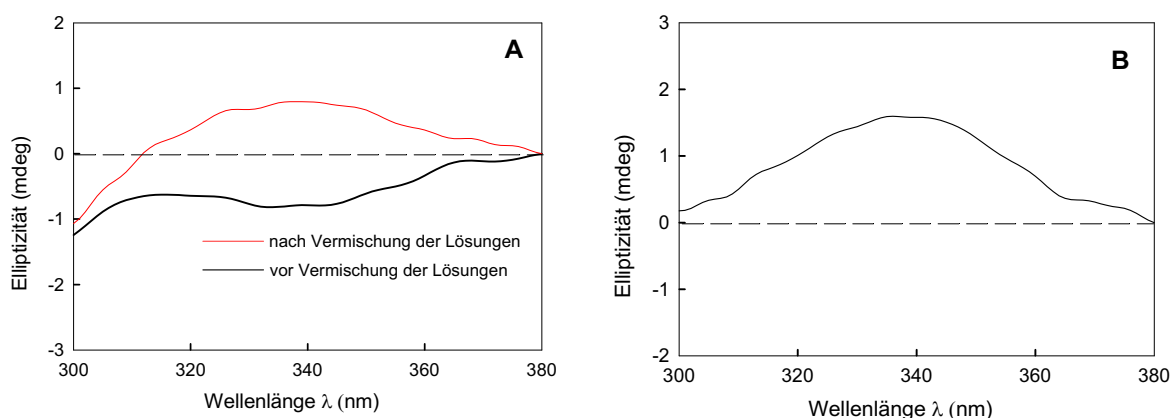
Da die Interaktion zwischen dem Oxo-S-Peptid und dem S-Protein keinen Einfluss auf das CD-Spektrum im Bereich von 340 nm hat, lässt sich die Änderung des CD-Spektrums bei Bindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids an das S-Protein auf eine Veränderung der CD-spektroskopischen Eigenschaften des <sup>1</sup>n<sub>S</sub>-<sup>3</sup>π\*-Übergangs der Thioxozeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids zurück führen (**Abbildungen 40B, 41, 43**).



**Abbildung 43:** CD-spektroskopische Charakterisierung der Rekombination des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids und S-Proteins

Die Aufnahme der unter **A** gezeigten CD-Spektren erfolgte bei 25 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl; pH 6,0) unter Verwendung einer Doppelkammerküvette. Kammer 1 wurde mit einer 90 µM Lösung des S-Proteins und Kammer 2 mit einer 58,5 µM Lösung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids gefüllt. Die Schichtdicke einer Kammer beträgt 4,34 mm. Nach Vermischung der Lösungen beider Kammern wurde der Messansatz vor Beginn der Messung zunächst 15 min bei 25 °C inkubiert. In **B** ist das entsprechende Differenzspektrum dargestellt.

Die Änderungen der CD-spektroskopischen Eigenschaften des  $^1n_s-^3\pi^*$ -Übergangs sind vermutlich die Folge von Konformationsänderungen im Bereich der Thioxozeptidbindung oder Einbindung des Schwefelatoms der Thioxozeptidbindung in das Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen bei Ausbildung der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S. Mit dem in **Abbildung 44** gezeigten Experiment konnte nachgewiesen werden, dass sich der Bereich des  $^1n_s-^3\pi^*$ -Übergangs der Thioxozeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids hervorragend als CD-spektroskopische Sonde eignet, um die Rekombination zwischen S-Peptid und S-Protein bzw. die Dissoziation des Komplexes zu untersuchen. Da die CD-Spektren des S-Proteins und der RNase S in diesem Bereich keine Signale aufweisen (**Abb. 41**), eröffnet die Substitution des Sauerstoffatoms des Alanins<sup>4</sup> des S-Peptids gegen ein Schwefelatom die Möglichkeit, diese Prozesse anhand der Änderungen der CD-spektroskopischen Eigenschaften einer einzelnen Bindung (Thioxozeptidbindung) zu charakterisieren.



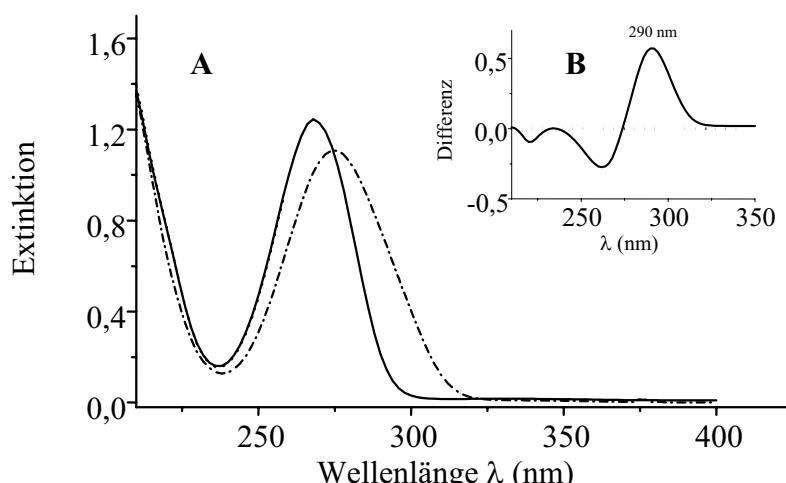
**Abbildung 44:** CD-spektroskopische Charakterisierung des  $^1n_s-^3\pi^*$ -Übergangs der Thioxozeptidbindung bei der Rekombination des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids und S-Proteins bzw. Dissoziation des Komplexes

Die Aufnahme der unter A gezeigten CD-Spektren erfolgte bei 25 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl; pH 6,0) unter Verwendung einer Doppelkammerküvette. Kammer 1 wurde mit einer Lösung gefüllt, die 80,1 μM S-Protein und 58,6 μM [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid enthielt. Kammer 2 wurde mit einer 1,244 mM Lösung des Oxo-S-Peptids gefüllt. Die Schichtdicke einer Kammer beträgt 4,34 mm. In B ist das entsprechende Differenzspektrum dargestellt.

## 2. 8. 6 Thioxozeptidbindungen als photoschaltbare Sonde der Konformation des S-Peptids und der Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S

### 2. 8. 6. 1 Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung der amidischen Thioxozeptidbindung

Neue Ergebnisse haben gezeigt, dass sich neben Thioxoaminoacyl-Prolyl-Peptidbindungen (imidische Thioxozeptidbindungen; **Xaa-Ψ[CS-N]-Pro**, Xaa: verschiedene Aminosäuren) auch amidische Thioxozeptidbindungen (**Xaa-Ψ[CS-NH]-Yaa**, Xaa, Yaa: verschiedene Aminosäuren, Yaa kein Pro) als photoschaltbare Sonde der *cis/trans*-Isomerisierung eignen (138). Die lichtinduzierte Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts erfolgte durch Anregung des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ -Übergangs der Thioxozeptidbindung bei Bestrahlung der Probe mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Die Wiedereinstellung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts in der Dunkelreaktion wurde mittels UV-, CD- und  ${}^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, sowie mit Hilfe der Kapillarelektrophorese kinetisch und thermodynamisch charakterisiert. Die Bestrahlung des Thioxodipeptids **H-Phe-Ψ[CS-NH]-Ala-OH** mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm führte im UV-Spektrum, in Analogie zu den von Ataka et al. (244) für die photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des *N*-Methylthioxoacetamids erhaltenen Ergebnissen, zu einer bathochromen Verschiebung des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ -Übergangs des Thioxoamidchromophors um ca. 8 nm von 267 auf 275 nm (Abb. 45).

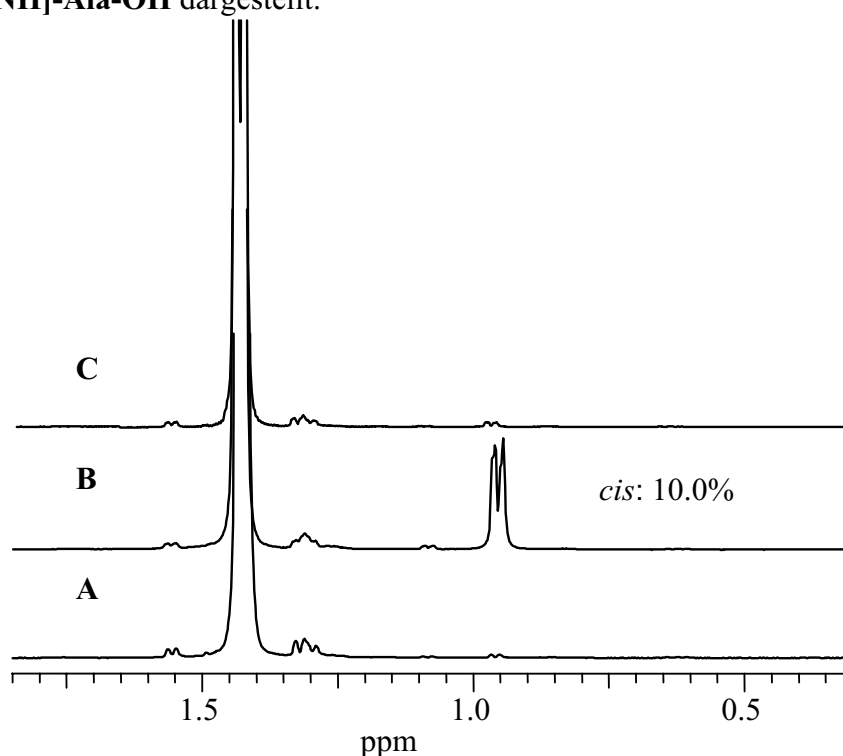


**Abbildung 45:** Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des Thioxodipeptids **H-Phe-Ψ[CS-NH]-Ala-OH**

**A)** UV-Spektrum des Peptids vor (schwarze Linie) und nach drei minütiger Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254 \text{ nm}$  und einer Bestrahlungsstärke von  $2,6 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (gestrichelte Linie). Das Thioxodipeptid ( $104 \text{ } \mu\text{M}$ ) wurde in  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer ( $\text{pH } 7,0$ ) gelöst. **B)** Aus den UV-Spektren der Abbildung A resultierendes Differenzspektrum. Die Spektren wurden bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Verwendung eines Perkin Elmer UV/Vis- Zweistrahlenspektrometers erhalten

Der isosbestische Punkt, der durch Überlagerung der UV-Spektren vor bzw. nach Bestrahlung des Thiopeptids erhalten wurde, befindet sich bei 274 nm und stimmt ebenfalls mit dem bei der Photoisomerisierung des *N*-Methylthioacetamids erhaltenen isosbestischen Punkt überein. Die Bestrahlung führte auch nach mehreren Bestrahlungs-Äquilibrierungszyklen zu keiner Zersetzung des Thiopeptids.

Der Beweis, dass es sich bei den beobachteten Änderungen in den UV-Spektren um eine photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung der Thiopeptidbindung handelt, erfolgte mit Hilfe der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie. Dabei wurde die Dunkelreaktion nach der photoinduzierten Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts nach der von Scherer et al. (245) für die *cis/trans*-Isomerisierung amidischer Peptidbindungen beschriebenen Methode kinetisch charakterisiert. Dem entsprechend kann das *cis/trans*-Konformerenverhältnis des Peptids **H-Ala-Phe-OH** aus dem Verhältnis der Signalflächen des  $\beta$ -H-Atoms der Methylgruppe des Alanins des *trans*-Konformers (1,491 ppm) und des *cis*-Konformers (0,91 ppm) bestimmt werden. In **Abbildung 46** ist dieser Bereich des  $^1\text{H}$  NMR-Spektrums für das Thiopeptid **H-Phe- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-OH** dargestellt.



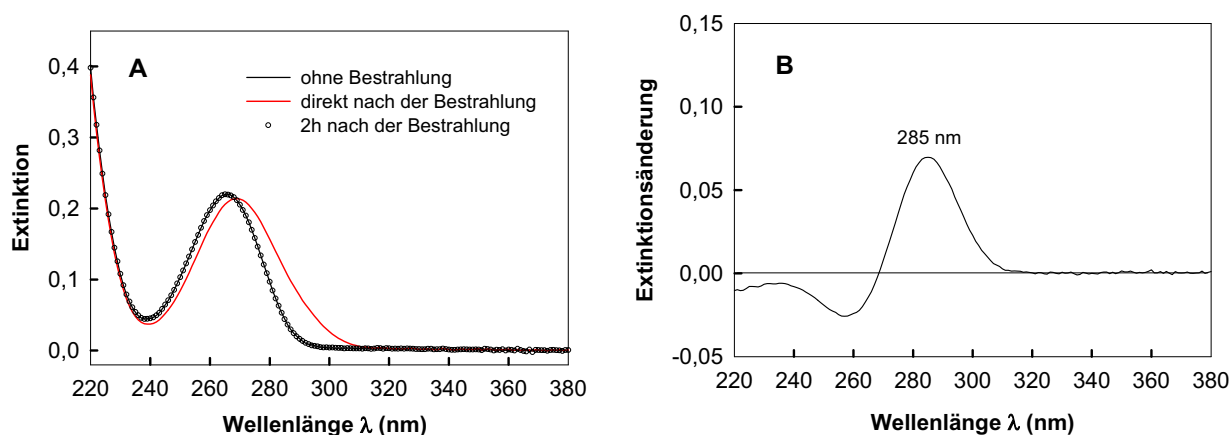
**Abbildung 46:** Untersuchung der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung des Thiopeptids **H-Phe- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-OH** mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie  
Dargestellt ist das  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des Thiopeptids **H-Phe- $\Psi$ [CS-NH]-Ala-OH** vor der Bestrahlung (A), nach 45- minütiger Bestrahlung des Thiopeptids mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und einer Bestrahlungsstärke von  $2,6 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (B) und 240 min nach Abschluss der Bestrahlung (C). Alle Messungen wurden bei einem pH- Wert von 7,5 und einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Das *cis/trans*-Konformerenverhältnis wurde aus dem Verhältniss der Signalflächen des  $\beta$ -H-Atoms der Methylgruppe des Alanins im *trans*-Konformer (1,412 ppm) und im *cis*-Konformer (0,956 ppm) bestimmt.

Die Dunkelreaktion (Wiedereinstellung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts nach Abschluss der Bestrahlung) erfolgt mit einer Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung von  $k_{c/t} = 3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 5 °C und  $k_{c/t} = 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 10 °C (pH 7). Die Konstante  $k_{c/t}$  ist dabei die Summe aus den Geschwindigkeitskonstanten der *cis* nach *trans* und *trans* nach *cis* Isomerisierung. Der *cis*-Gehalt im photostationären Zustand wurde durch Extrapolation unter Berücksichtigung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{c/t}$  ermittelt und beträgt 10,9 %. **Abbildung 45** ist zu entnehmen, dass die größte Differenz zwischen den UV-Spektren vor und nach Bestrahlung des **H-Phe-Ψ[CS-NH]-Ala-OH** bei 290 nm beobachtet wurde. Die kinetische Charakterisierung der Dunkelreaktion nach der photoinduzierten Auslenkung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts durch Analyse der Extinktionsänderung bei 290 nm ergab Geschwindigkeitskonstanten von  $k_{c/t} = 3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 5 °C und  $k_{c/t} = 5,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 10 °C, die sehr gut mit den durch NMR-Messungen gefundenen Konstanten übereinstimmen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in **Abbildung 45** gezeigten Veränderungen in den UV-Spektren auf eine reversible, photoinduzierte Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts zurückzuführen sind.

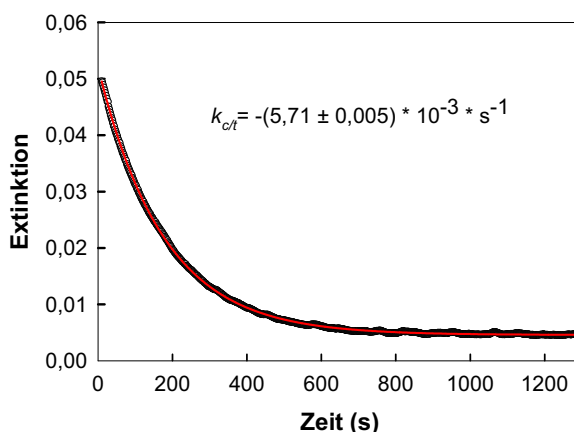
#### 2. 8. 6. 2 Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung der Thiooxopeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids

Die Bestrahlung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids mit UV-Licht (260 nm) führt, wie in **Abbildung 47 A** zu sehen ist, zu einer bathochromen Verschiebung des <sup>1</sup>π-<sup>1</sup>π\*-Übergangs der Thiooxopeptidbindung von 266 nach 269 nm. Der isosbestische Punkt befindet sich bei 268 nm. Das Differenzspektrum besitzt ein Absorptionsmaximum bei 285 nm (**Abbildung 47 B**). Da die Bestrahlung des nichtthioxylierten S-Peptids (Oxopeptid) zu keiner Änderung des UV-Spektrums führt, die durch eine photoinduzierte Anregung des aromatischen Systems des Phe<sup>8</sup> induziert werden könnte, ist die beobachtete Änderung des UV-Spektrums auf eine Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts zurückzuführen.

Um einen möglichst hohen Anteil des *cis*-Konformeren durch eine bevorzugte Anregung des <sup>1</sup>π-<sup>1</sup>π\*-Übergangs des *trans*-Konformeren zu erreichen, erfolgte die Bestrahlung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids generell in allen Experimenten bei 260 nm, im Bereich des Minimums des Differenzspektrums der **Abbildung 47 B**. Die Dunkelreaktion wurde anschließend mit Hilfe der UV-Spektroskopie kinetisch charakterisiert (**Abb. 48**).



**Abbildung 47:** Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids. In **A** ist das UV-Spektrum einer 36,6  $\mu\text{M}$  Lösung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6, 0,1 M NaCl) vor bzw. nach 5- minütiger Bestrahlung (photostationärer Zustand) mit UV-Licht der Wellenlänge 260 nm (Bestrahlungsstärke:  $32 \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) dargestellt (Schichtdicke: 0,5 cm). Das Ausgangsspektrum wird auch nach mehreren Bestrahlungs- Reäquilibrierungszyklen wieder erhalten. In **B** ist das entsprechende Differenzspektrum gezeigt. Die Bestrahlung und alle Messungen erfolgten bei 10 °C. Die Spektren wurden unter Verwendung eines Perkin Elmer UV/Vis- Zweistrahlenspektrometers erhalten.



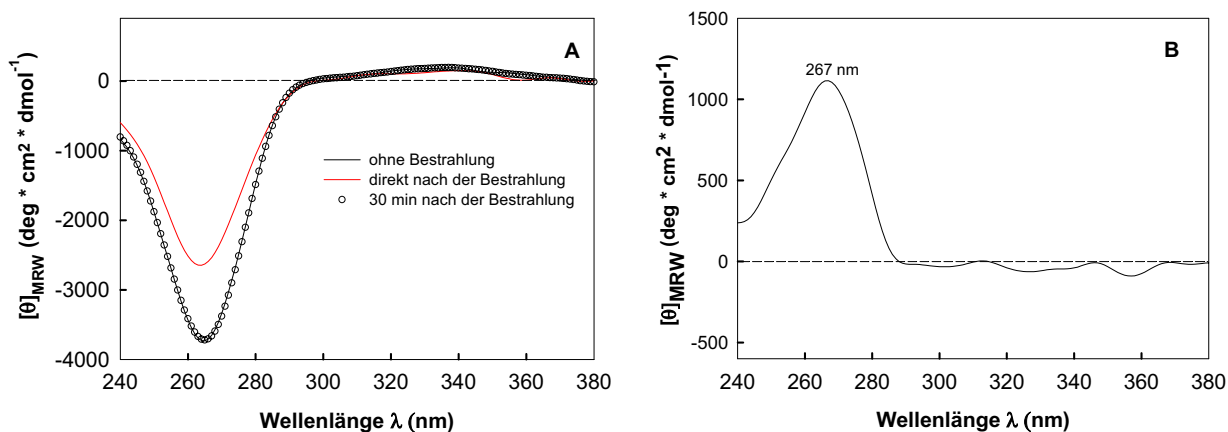
**Abbildung 48:** Kinetische Charakterisierung der Dunkelreaktion nach einer photoinduzierten Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts der Thioxozeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids. Das thioxylierte Peptid (37,4  $\mu\text{M}$ ) wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6, 0,1 M NaCl) gelöst und anschließend 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 260 nm bestrahlt. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der *cis/trans*-Isomerisierung erfolgte UV-spektroskopisch (Perkin Elmer UV/Vis- Zweistrahlenspektrometer) bei einer Wellenlänge von 287 nm und einer Temperatur von 10 °C.

Die Geschwindigkeitskonstante der *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids  $k_{ct}$  beträgt bei 10 °C  $5,71 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Durch Beobachtung der Extinktion des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids bei 287nm konnte sichergestellt werden, dass die Einstrahlung des UV-Lichts des Spektrometers unter den experimentellen Bedingungen zu keiner Extinktionsänderung führt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass  $k_{ct}$  unabhängig von der Konzentration des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids (untersuchter Bereich: 5-150  $\mu\text{M}$ ) ist. Dies schließt einen Einfluss einer möglichen Aggregation der Peptidketten aus.

Die CD-Spektren im Bereich des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ - und  ${}^1n\text{-}{}^3\pi^*$ - Übergangs der Thioxozeptidbindung vor und unmittelbar nach der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung sind in **Abbildung 49**

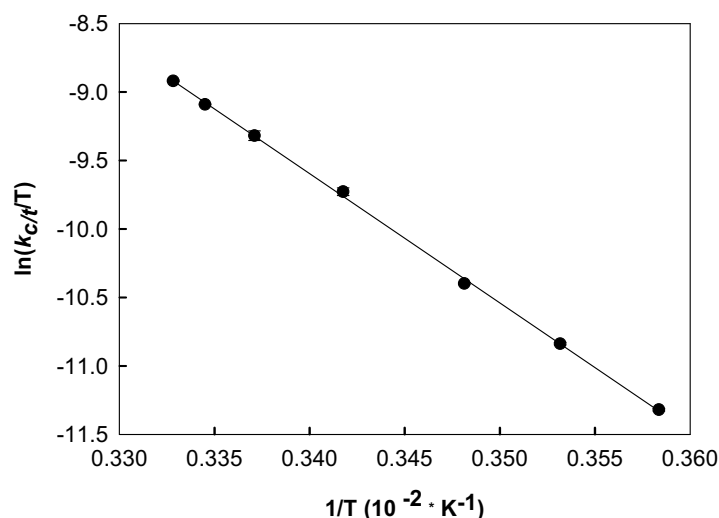


dargestellt. Die photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung führt zu einer Abnahme der Amplitude des CD-Signals des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ - Übergangs der Thioxopeptidbindung. Die maximale Signaländerung wird bei 267 nm beobachtet und beträgt unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ca. 30,5 % der Gesamte elliptizität. Die mittels CD-Spektroskopie durch Beobachtung der Elliptizität bei 267 nm erhaltene Geschwindigkeitskonstante ist identisch mit der UV-spektroskopisch ermittelten Konstante.



**Abbildung 49:** CD-spektroskopische Untersuchung des  ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ - und  ${}^1n_s\text{-}{}^3\pi^*$ - Übergangs bei der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids. Das Thioxopeptid (71,5  $\mu\text{M}$ ) wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl, pH 6) gelöst. Die Photoisomerisierung erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 260 nm (Bestrahlungsstärke: 32  $\mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 5 min). Die Bestrahlung und alle Messungen wurden bei 10 °C durchgeführt (Schichtdicke: 5 mm).

Durch Messung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten konnten mit Hilfe der Eyring-Auftragung die Aktivierungsparameter der *cis/trans*-Isomerisierung bestimmt werden (**Abb. 50**). Für die *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids wurde unter den verwendeten experimentellen Bedingungen eine Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  von  $78,5 \pm 0,05 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  und eine Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  von  $-1,26 \pm 0,01 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  gefunden. Die kleine negative Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  weist, wie für die *cis/trans*-Isomerisierung erwartet, auf eine unimolekulare Reaktion hin. Der sehr geringe Betrag von  $\Delta S^\ddagger$  lässt darauf schließen, dass offensichtlich kaum Änderungen in der Solvatisierung des Übergangszustand relativ zum Grundzustand statt finden. Die mit Hilfe von  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  bei 298 K berechnete freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  beträgt  $78,9 \pm 0,7 \text{ kJ/mol}$ . Dieser Wert stimmt mit der Rotationsbarriere, die von Wieberg et al. (**88**) für das Thioxoformamid mit Hilfe theoretischer Berechnungen ermittelt wurde (78,8 kJ/mol), überein.

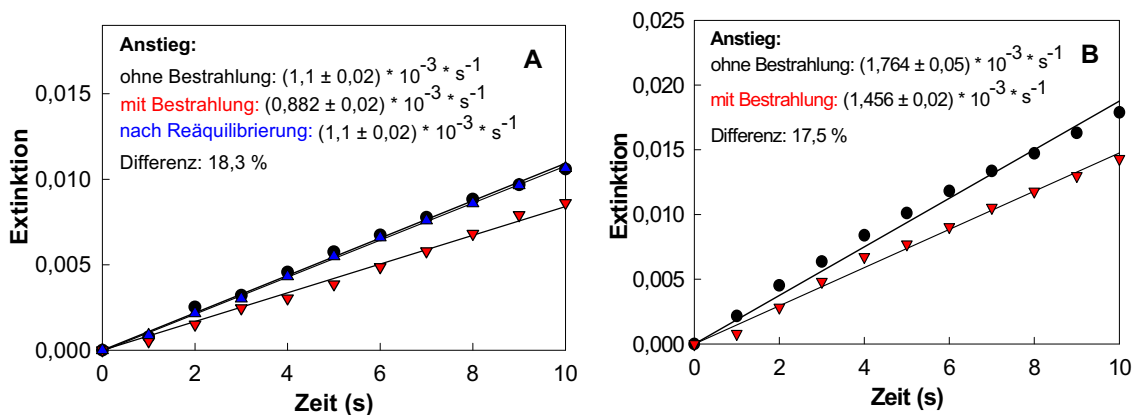


**Abbildung 50:** Bestimmung der Aktivierungsparameter  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  der *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids. Das Thioxopeptid (37,4  $\mu$ M) wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6, 0,1 M NaCl) gelöst. Die Aktivierungsparameter wurden mit Hilfe der Eyring-Auftragung aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{c/t}$  ermittelt. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte nach Bestrahlung der Probe mit UV-Licht ( $\lambda = 260$  nm) durch UV-spektroskopische Untersuchung der Extinktionsabnahme bei 287 nm analog zur **Abbildung 48**.

### 2. 8. 6. 3 Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S

Wie bereits erwähnt, besitzt das [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid eine hohe Affinität zum S-Protein, so dass bereits bei einer relativ geringen Konzentration des S-Proteins eine nahezu vollständige Bindung des S-Peptids an das S-Protein gewährleistet ist. Darüber hinaus ist das Ala<sup>4</sup> der RNase S weder im Bereich des aktiven Zentrums noch im Bereich der Kontaktstelle zwischen S-Peptid und S-Protein lokalisiert. Das Ala<sup>4</sup> befindet sich an der Proteinoberfläche und ist als zweite Aminosäure der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids der Akzeptor ( $\alpha$ -Carbonylsauerstoffatom) einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des Phe<sup>8</sup> des S-Peptids ist. Das Phe<sup>8</sup> ist, wie bereits beschrieben, von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der RNase S. Darüber hinaus ist das Phe<sup>8</sup> der Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe des an der Katalyse beteiligten His<sup>12</sup> des S-Peptids ist. Strukturänderungen, in Folge der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids, könnten sich somit auf die Stabilität des Komplexes und auf das katalytische Zentrum auswirken. Auch eine generelle Destabilisierung der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids wäre denkbar.

In **Abbildung 51 A** und **B** ist der Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids auf die Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S dargestellt. Die Messungen wurden bei einem S-Peptid/S-Protein-Verhältnis von 1:1 (**Abb. 51 A**) bzw. einem hohen Überschuss des S-Proteins (**Abb. 51 B**) durchgeführt.

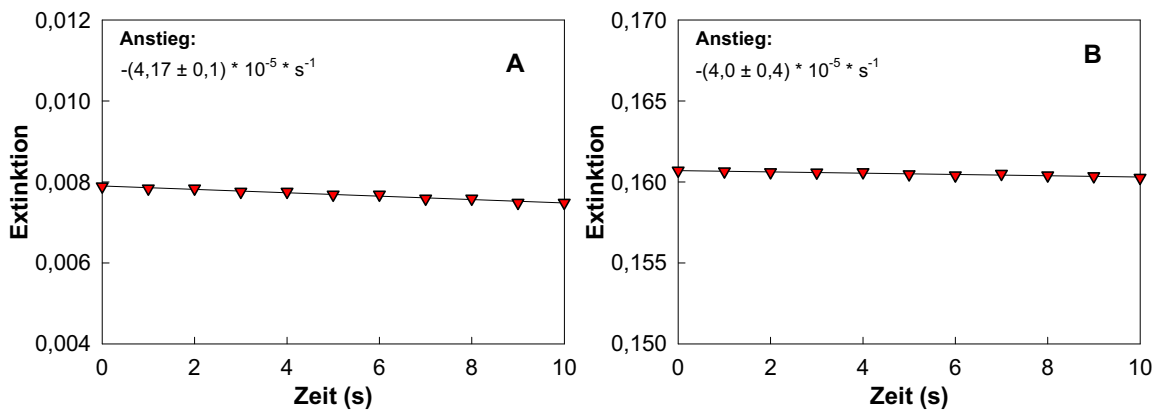


**Abbildung 51:** Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung auf die Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S

Die Messungen erfolgten bei 10 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl, pH 6), bei einer Konzentration des Substrats 2',3'-cCMP von 100 µM, einer S-Peptidkonzentration von 2 µM und einer S-Proteinkonzentration von 2 (A) bzw. 60 µM (B). Die enzymkinetischen Messungen wurden durch Zugabe des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids gestartet. Die Bestrahlung einer 37,4 µM Lösung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids erfolgte vor Zugabe zum S-Protein mittels UV-Licht bei 260 nm ( $32 \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 5 min). Jede Gerade ist das Resultat einer kontinuierlichen Messung, bei der pro Sekunde ein Datenpunkt aufgezeichnet wurde. Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines PerkinElmer-Zweistrahlenspektrometers bei 290 nm.

Die Messungen erfolgten spektrophotometrisch bei 290 nm unter Verwendung des Substrats 2',3'-cCMP. Eine enzymkinetische Messung im Bereich des isobestischen Punktes bei 268 nm, der sich bei Überlagerung der UV-Spektren des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids vor und nach der Bestrahlung ergibt (**Abb. 47**), ist nicht möglich, da der enzymkinetische Test in diesem Bereich eine zu geringe Empfindlichkeit besitzt. Der isobestische Punkt der UV-Spektren des 2',3'-cCMP und des Hydrolyseprodukts 3'-CMP befindet sich bei 266 nm (**228**).

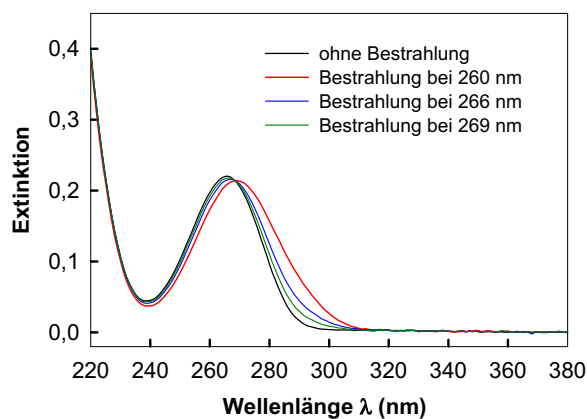
In einem anschließenden Kontrollexperiment (**Abb. 52 A** u. **B**) wurde der Einfluss der Dunkelreaktion nach erfolgter photoinduzierter Auslenkung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts auf die Extinktion bei 290 nm in Abwesenheit des Substrats untersucht. Alle weiteren experimentellen Bedingungen entsprachen denen der **Abbildungen 51 A** und **B**. Die in den **Abbildungen 52 A** und **B** beobachtete geringfügige Abnahme der Extinktion muss bei der Bewertung der Ergebnisse zur photoinduzierten Schaltung der Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S beachtet werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse beträgt die Abnahme des Anfangsanstiegs in **Abbildung 51 A** nach der Bestrahlung 16 % und im Fall der Messung bei einem hohen Überschuss des S-Proteins 15,2 % (**Abb. 51 B**).



**Abbildung 52:** Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxoalanyl-Alanin-Peptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids auf die Extinktion bei 290 nm. Die Messungen erfolgten bei 10 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl, pH 6), bei einer Konzentration des S-Peptids von 2 µM und einer S-Proteinkonzentration von 2 (A) bzw. 60 µM (B). Die Messung wurde durch Zugabe des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids gestartet. Die Bestrahlung einer 37,4 µM Lösung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids erfolgte vor Zugabe zum S-Protein mittels UV-Licht bei 260 nm ( $32 \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 5 min). Jede Gerade ist das Resultat einer kontinuierlichen Messung, bei der pro Sekunde ein Datenpunkt aufgezeichnet wurde.

Unter der Annahme, dass das *cis*-Konformer des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids nicht in der Lage ist mit dem S-Protein einen enzymatisch aktiven Komplex auszubilden bzw. dass die [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S mit einer *cis*-Thioxopeptidbindung inaktiv ist, muss der *cis*-Gehalt im Konformerengleichgewicht nach erfolgter Bestrahlung, unter den verwendeten experimentellen Bedingungen, mindestens 15 % betragen.

**Abbildung 53** ist zu entnehmen, dass der *cis*-Gehalt im photostationären Zustand von der Wellenlänge des zur Anregung verwendeten UV-Lichts abhängig ist. Die Ergebnisse der **Abbildung 53** korrelieren mit den in der **Tabelle 12** gezeigten Resultaten enzymkinetischer Messungen, in denen der Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung durch Anregung der Thioxopeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids mittels UV-Licht verschiedener Wellenlängen auf die enzymatische Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S untersucht wurde. Die Ergebnisse von **Abbildung 53** und **Tabelle 12** verdeutlichen den Zusammenhang zwischen dem *cis*-Anteil der Thioxopeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids im Konformerengleichgewicht und der enzymatischen Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S.



**Abb. 53:** Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids bei Anregung mit UV-Licht verschiedener Wellenlängen

Dargestellt sind die UV-Spektren einer 36,6 μM Lösung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6, 0,1 M NaCl) vor bzw. nach Bestrahlung (photostationärer Zustand) mit UV-Licht verschiedener Wellenlängen (Schichtdicke: 0,5 cm).

**Tabelle 12:** Einfluss der Wellenlänge des zur photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids verwendeten UV-Lichts auf die enzymatische Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S

UV-Licht ( $\lambda$ in nm)	Aktivität (%)
260	84,8
266	91
269	97

Die Messungen erfolgten analog den **Abbildungen 51** und **52** bei einer S-Proteinkonzentration von 60 μM.

### 3. Pin1-katalysierte Einzelbindungs-Konformationsänderungen in der Embryogenese von *Xenopus laevis*

#### 3.1 Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- spezifische PPIasen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen an Ser/Thr-Pro- Motiven spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung elementarer biologischer Funktionen in der Zelle und dient u. a. der Regulation der Transkription, der Zelldifferenzierung, Proliferation und Organisation des Cytoskeletts (10, 246-252). Der Phosphorylierungsstatus der entsprechenden Proteine wird dabei durch das Zusammenspiel Ser/Thr-Pro- spezifischer Kinasen und Phosphatasen kontrolliert. Nach dem heutigen Stand der Erkenntnis sind Proteinkinasen und Proteinphosphatasen nur dann in der Lage ihre enzymatische Aktivität zu entfalten, wenn die entsprechenden Ser/Thr-Pro- bzw. Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen in der *trans*-Konformation vorliegen (10, 253). Auf Grund ihrer relativ geringen Geschwindigkeit hat die *cis/trans*-Isomerisierung dieser Peptidbindungen einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und damit auf die zeitabhängige biologische Aktivität des entsprechenden Proteins in der Zelle. Darüber hinaus führt die *cis/trans*-Isomerisierung der Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motive zu verschiedenen Formen eines Proteins, die sich in Folge des reversiblen Charakters der *cis/trans*-Isomerisierung langsam, bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands, in einander umwandeln. Die verschiedenen Formen des Proteins unterscheiden sich strukturell oft nur innerhalb lokal begrenzter Bereiche, besitzen jedoch häufig eine unterschiedliche biologische Aktivität (Enzymaktivität oder Affinität gegenüber einem Interaktionspartner, 254-258). Somit ist die Konzentration der biologisch aktiven Form des entsprechenden Proteins in der Zelle nicht nur von dessen Phosphorylierungsstatus, sondern auch von der Lage des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts abhängig. Eine zeitlich exakt abgestimmte Aktivierung und Deaktivierung dieser Proteine, wie sie z.B. bei der Steuerung des Zellteilungszyklus oder bei der Signaltransduktion unerlässlich ist, wird daher nur durch eine Kontrolle der *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit der Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindung möglich. Mit dem humanen Pin1 (*hPin1*, EC 5.2.1.8) wurde 1996 von Lu et al. (259) ein Enzym entdeckt, das mit hoher Effizienz die *cis/trans*-Isomerisierung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen katalysieren kann. Dabei ist eine Katalyse sowohl im denaturierten als auch im nativen (gefalteten) Zustand der Polypeptidkette möglich (10, 260, 261).

Homologe Proteine, die eine vergleichbare Spezifität für Phosphoproteine besitzen und die biologische Funktion des *hPin1* komplementieren können, wurden in *Saccharomyces cerevisia* (ESS1/PTF1) (262-264), *Drosophila melanogaster* (Dodo) (265), *Neurospora grassa* (Ssp1) (266), verschiedenen Pflanzen (Par13) (267-269) und *Xenopus laevis* (270) gefunden.

Das humane Pin1 (163 Aminosäuren, 18,2 kDa) besteht aus einer *N*-terminalen WW-Domäne (Aminosäuren 5-39) und einer *C*-terminalen katalytischen Domäne (Aminosäuren 51-163). Die Struktur und die Aminosäuresequenz des *hPin1* sind in **Abbildung 54** dargestellt (271).



	10	20	30	40	50	60
MADEEKLPPG	WEKRMSRSSG	RVYYFNHITN	ASQWERPSGN	SSSGGKNGQG	EPARVRCSHL	
70	80	90	100	110	120	
LVKHSQRRP	SSWRQEKITR	TKEEALELIN	GYIQKIKSGE	EDFESLASQF	SDCSSAKARG	
130	140	150	160			
DLGAFSRGQM	QKPFEDASFA	LRTGEMSGPV	FTDSGIHIIL	RTE		

**Abbildung 54:** Struktur und Aminosäuresequenz des humanen Pin1 (*hPin1*)  
Die PPIase-Domäne (Aminosäuren 51-163) ist in roter, die WW-Domäne (Aminosäuren 5-39) in grüner Farbe dargestellt.

Die entsprechenden homologen, in verschiedenen eukaryontischen Organismen gefundenen Proteine, haben einen ähnlichen Aufbau und besitzen, mit Ausnahme der in Pflanzen gefundenen Vertreter, neben der PPIase-Domäne ebenfalls eine WW-Domäne am *N*-Terminus.

Auf Grund von Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz und der Tatsache, dass die PPIase-Aktivität dieser Proteine nicht durch Cyclosporin A (Inhibition von PPIasen des Cyclophilin-Typs) oder FK506 (Inhibition von PPIasen des FKBP-Typs) inhibiert werden kann, wurden das *hPin1* und die entsprechenden homologen Proteine, der Parvulin-Familie der PPIasen zugeordnet. Im Gegensatz zu den PPIasen des Pin1-Typs, besitzen die anderen Vertreter der Parvuline keine *N*-terminale WW-Domäne und sind nicht in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen zu katalysieren. Somit nehmen die PPIasen des Pin1-Typs, auf Grund ihrer Substratspezifität, eine besondere Stellung innerhalb der Familie der PPIasen ein. Eine WW-Domäne ist ein Modul, das der Erkennung und Bindung eines Interaktionspartners (Protein/Protein-Wechselwirkung) dient (272). Dabei wird zwischen fünf verschiedenen Typen der WW-Domäne unterschieden. Die Typen I-III binden selektiv an Prolin-reiche Motive entsprechender Interaktionspartner, während WW-Domänen vom Typ IV, zu denen auch die WW-Domäne des Pin1 und homologer Proteine zählt, selektiv an Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motive binden (273-275). WW-Domänen vom Typ V bevorzugen Pro-Arg- Motive (276).

Die PPIase-Domäne des *hPin1* besitzt als zentrales Strukturelement ein viersträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblattmotiv, das von vier Helices umgeben ist. Die Aminosäuren Lys63, Arg69 und Arg69 bilden eine Triade basischer Aminosäuren, die in Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/ Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- spezifischen Parvulinen konserviert ist. Sie dient der Erkennung und Bindung der Phosphatgruppe entsprechender Substrate. Auch Aminosäuren, die an der Bindung des Prolin-Ringsystems (Phe134, Met130, Leu122) und am Katalysemechanismus (His59, Cys113, His157) beteiligt sind, sind in diesen Proteinen konserviert. Die WW-Domäne enthält ein dreisträngiges  $\beta$ -Faltblattmotiv als dominantes Sekundärstrukturelement und vermittelt als Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Bindungsmodul die Interaktion zwischen *hPin1* und den entsprechenden Substraten in der Zelle (274).

Die biologische Funktion des Pin1 und der entsprechenden homologen Proteine ist sehr vielfältig. Sie sind u. a. an der Regulation des Zellzyklus (10, 259, 270, 277-280), der Transkription (251, 278, 281) und der Steuerung von DNA-Reparaturmechanismen (276, 282) beteiligt. In dieser Funktion nimmt Pin1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen ein. Pin1 fördert darüber hinaus die Dephosphorylierung des hyperphosphorylierten Tau-Proteins und wirkt damit der Entstehung der Alzheimer Erkrankung entgegen. Eine Hyperphosphorylierung dieses Proteins führt, als eine der Ursachen der Alzheimer Erkrankung, zur Entstehung unlöslicher Proteinfilamente im Nervengewebe (283-286).



In vielen eukaryontischen Organismen ist Pin1 bzw. das entsprechende homologe Protein essentiell für die Progression des Zellzyklus. Die Depletion des humanen Pin1 (*hPin1*) in menschlichen Tumorzellen bzw. des entsprechenden homologen Proteins in Hefezellen (ESS1), führte zu einer Arretierung der Zellen in der Mitosephase (M-Phase) des Zellzyklus (259). Dieses Verhalten ist die Folge eines verfrühten Eintritts der Zellen in die M-Phase, denn *hPin1* und die entsprechenden homologen Proteine eukaryontischer Organismen, übernehmen eine wichtige Kontrollfunktion beim Übergang der Zellen von der G2- zur M-Phase des Zellzyklus (270). Dabei konnte unter Verwendung des Krallenfroschs *Xenopus laevis* gezeigt werden, dass die Kontrollfunktion des Pin1 am G2→M-Übergang des Zellzyklus an dessen PPIase-Aktivität geknüpft ist. Die Depletion des Pin1 homologen Proteins der Hefe (ESS1) oder die Verminderung der Pin1-Konzentration in HeLa-Zellen durch Antisense-Technik, verursachten ein verfrühtes Einleiten der Mitose mit nachfolgendem Mitosearrest und führten letztlich zur Kernfragmentierung und Apoptose. Im Gegensatz dazu unterdrückt eine Überexpression des *hPin1* bzw. homologer Proteine den Übergang von der G2- zur M-Phase des Zellzyklus (279, 280). Pin1 übernimmt eine wichtige Kontrollfunktion am Replikationscheckpoint, der den Übergang in die M-Phase an eine korrekt abgeschlossene DNA-Replikationsphase (S-Phase) koppelt. Zellen, denen Pin1 fehlt, verlieren diese Kopplung und werden auch bei nicht abgeschlossener oder fehlerhafter Replikation in die M-Phase getrieben, die aber nicht mehr erfolgreich abgeschlossen werden kann (270).

Das humane Pin1 spielt eine wichtige Rolle bei der Onkogenese und Progression von Krebserkrankungen. Es gewinnt in jüngster Zeit zunehmende Aufmerksamkeit als prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf und die Entwicklung potentieller Medikamente zur Behandlung von Tumorerkrankungen (287). Pin1 ist in verschiedenen Formen des Lungen-, Brust-, Prostata- und Darmkarzinoms, sowie verschiedenen Sarkomen (Lymphom, Melanom) überexprimiert (277, 278, 288, 289). Bei Brust- und Prostatakarzinomen korreliert die Stärke seiner Überexpression mit dem Stadium der Erkrankung und kann als prognostischer Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf (Remissionsrate) verwendet werden (290).

Pin1 greift an verschiedenen Stellen in das Netzwerk der Signalkaskaden, welche die Onkogenese und das Wachstum der Tumorzellen steuern, ein und bewirkt dabei durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Jun,  $\beta$ -Catenin) eine Überexpression verschiedener Aktivatoren der Zellteilung (z.B. Cyclin D1, Cdc25, 277, 278, 281, 287, 291). Beispielsweise führt bei der Entstehung von Brustkrebs eine Überexpression von Pin1 über multiple Mechanismen zu einer übermäßigen Aktivierung des Zellzyklusregulators

Cyclin D1 (292, 293). Eine Verstärkung der Expression des Zellteilungsaktivators Cyclin D1 ist typisch für die meisten Formen von Brustkrebs.

Das humane Pin1 könnte aus mehreren Gründen besonders gut als Target zur Behandlung von Krebserkrankungen geeignet sein. Eine Depletion des *hPin1* in mehreren Tumorzelllinien bewirkte eine Arretierung in der Mitosephase und nachfolgende Apoptose (259, 294, 295). Die einzigartige Substratspezifität des *hPin1* eröffnet die Möglichkeit, Inhibitoren zu finden, die keinen Einfluss auf die biologische Funktion von Vertretern anderer Familien der PPIasen ausüben. Chemotherapeutica auf der Basis selektiver *hPin1*- Inhibitoren könnten möglicherweise die gewöhnlich in der Tumorbehandlung eingesetzten DNA- schädigenden Substanzen, die eine große Toxizität für Zellen des gesamten Organismus besitzen, ersetzen. Es besteht die Hoffnung, dass selektive Inhibitoren des *hPin1* nur eine geringe allgemeine Toxizität für den menschlichen Organismus besitzen. Diese Hoffnung wird durch Experimente unter Verwendung transgener Mäuse gestützt, bei denen das *hPin1* auf Genebene deletiert wurde. Diese Tiere zeigen nur geringfügige Abnormalitäten bei der Entwicklung der Brustdrüse und der Keimzellproliferation bzw. nur bei älteren Tieren zu beobachtende, geringfügige Veränderungen im Nervensystem (259, 296-298). Auch die Deletion des Gens *dodo*, welches in *Drosophila melanogaster* das Pin1- homologe Protein Dodo kodiert, führte zu lebensfähigen und fortpflanzungsfähigen Tieren (299), die jedoch Störungen in der Oogenese zeigen (265).

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zur Letalität der Depletion des Pin1- homologen Proteins (ESS1) in den Hefen *Candida albicans* (300) und *Saccharomyces cerevisia* (262). In höheren eukaryontischen Organismen könnten daher vielleicht andere, möglicherweise noch unbekannte Vertreter aus der Familie der PPIasen, einen Teil der biologischen Funktion des depletierten Pin1 übernehmen. Dies könnte erklären, warum die Depletion des Pin1 in Mäusen bzw. des Pin1-homologen Proteins Dodo von *Drosophila melanogaster* nur relativ geringfügige phänotypische Veränderungen bewirken.

Das Vertreter anderer Familien der PPIasen verschiedene Aufgaben Pin1-homologer Proteine übernehmen können, wurde unter Verwendung des Temperatur-sensitiven Stamms *ess1<sup>ts</sup>* von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt. In diesen Hefezellen trägt das Pin1-homologe Protein ESS1 eine Mutation, die zu einer Destabilisierung des Proteins führt. Während diese Hefezellen bei 30 °C normales Wachstum zeigen, ist diese Mutation bei 37 °C letal. Nur bei einer verstärkten Expression des Cyp18-Gens *CPRI* oder des FKBP12-Gens *FPRI* sind diese Hefezellen lebensfähig (301). Die PPIasen Cyp18 und FKBP12 können somit wichtige biologische Funktionen des Pin1-homologen Proteins ESS1 übernehmen. Wie bereits erwähnt, sind

Hefezellen in denen das Pin1-homologe Protein ESS1 deletiert wurde, normalerweise nicht lebensfähig. Überraschenderweise konnten jedoch von Fujimori et al. (302) vitale Hefezellen isoliert werden, in denen das Gen *ess1* deletiert war. Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Cyp18-Gen in diesen Zellen verstärkt expremiert wird, und wichtige biologische Funktionen des ESS1 übernehmen kann. Mit Hilfe der "Real-Time-PCR" wurde festgestellt, dass in embryonischen Fibroblasten Pin1 depletierter Mäuse die PPIase Par14 überexprimiert ist (303) und somit möglicherweise verschiedene biologische Funktionen des Pin1 übernehmen kann. Par14 repräsentiert, neben Pin1, einen weiteren Vertreter der Parvulin-Familie der PPIasen in eukaryontischen Organismen (304, 305). Dieses Enzym ist jedoch, wie alle anderen bekannten, nicht zu Pin1 homologen PPIasen, nicht in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen zu katalysieren (260). Darüber hinaus besitzt es keine N-terminale WW-Domäne, welche für die meisten Vertreter Pin1-homologer Proteine typisch ist.

Auf Grund der verschiedenen Resultate, die Untersuchungen zur Bedeutung der PPIase-Aktivität des Pin1 und homologer Proteine (Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen) für die Regulation des Zellzyklus unter Verwendung gentechnisch modifizierter Zellen erbrachten, gilt der Suche nach spezifischen Inhibitoren der PPIase-Aktivität des Pin1 ein besonderes Interesse. Nur mit Hilfe solcher Inhibitoren, die zu verschiedenen Zeitpunkten einem Organismus appliziert werden könnten, wäre eine exakte Analyse der Bedeutung des Pin1 oder der entsprechenden homologen Proteine für die Steuerung des Zellteilungszyklus oder die Entwicklung des Organismus möglich.

Juglon (5-Hydroxy-1,4-Naphtochinon), das einen irreversiblen Inhibitor des Pin1 (306) darstellt, ist jedoch auf Grund seiner geringen Spezifität für solche Experimente ungeeignet. Die Behandlung menschlicher Tumorzellen mit Juglon führt, wie die Depletion des Pin1 mit Hilfe gentechnischer Methoden, zum mitotischen Arrest und nachfolgender Apoptose (294). Der genaue Mechanismus über den Juglon diese Wirkung entfaltet ist jedoch unklar, da es als Thiolgruppen-modifizierendes Reagenz mit vielen verschiedenen Proteinen reagiert. So verhindert Juglon beispielsweise, über einen noch unbekanntem Mechanismus, die Ausbildung des Präinitiationskomplexes der Transkription. Darüber hinaus bewirkt es eine Modifikation der RNA Polymerase II (307), die ihrerseits ein Substrat des Pin1 bzw. homologer Proteine darstellt (308-310).

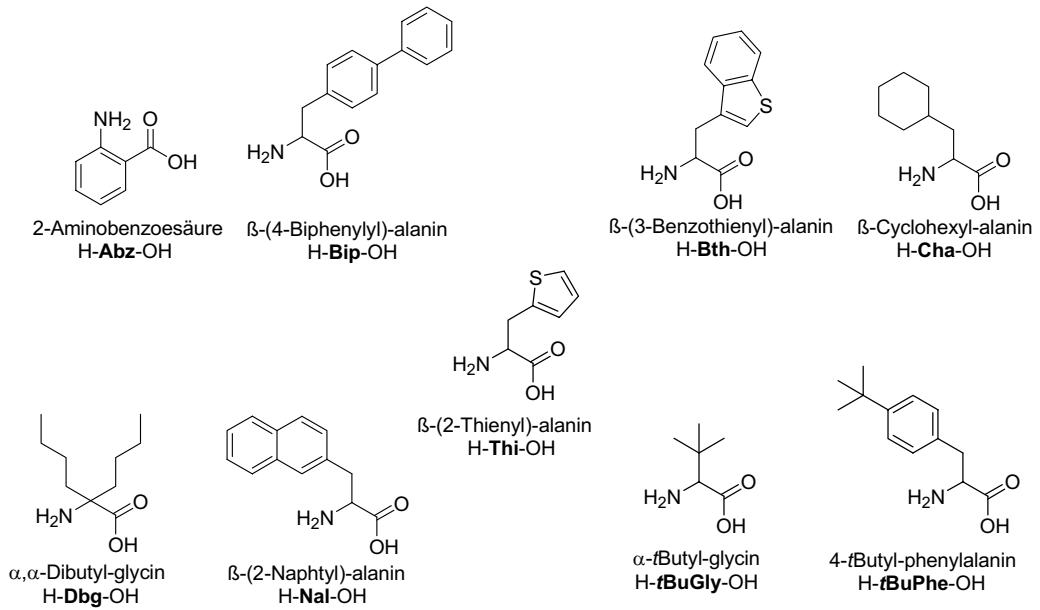
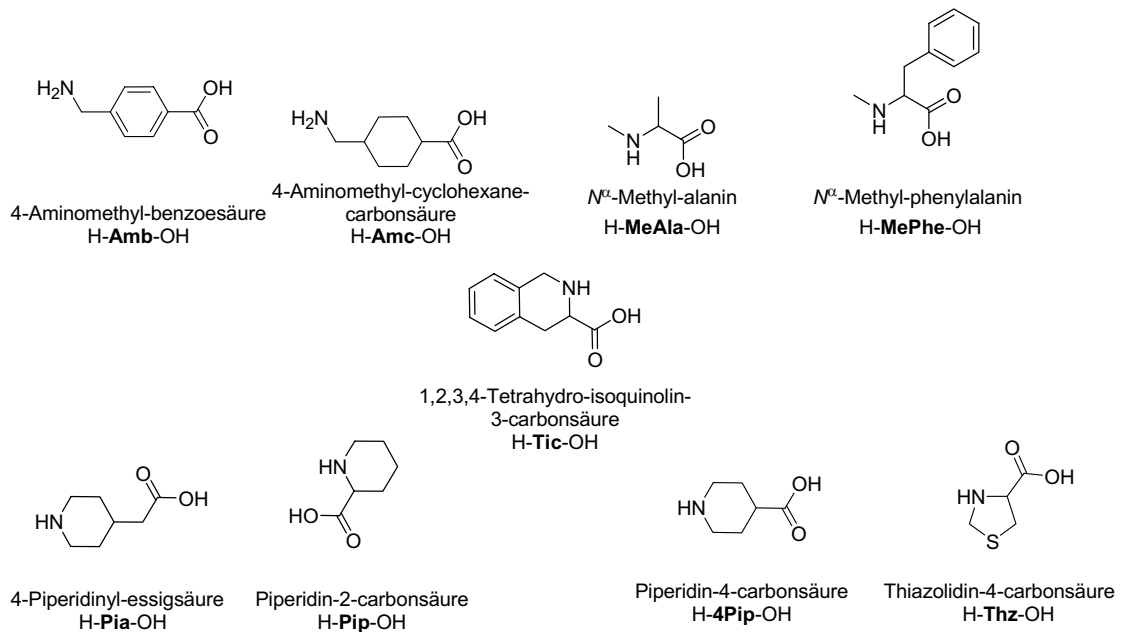
Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie wurden Inhibitoren auf der Basis aromatischer Dicarbonsäureimide entwickelt, die eine Hemmung der PPIase-Aktivität des *hPin1* mit *IC*<sub>50</sub>-

Werten im unteren  $\mu$ -molaren Bereich bewirkten **(303)**. Die Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit diesen Inhibitoren führte zu einer Hemmung der Proliferation mit vergleichbaren  $IC_{50}$ -Werten. Diese Inhibitoren sind allerdings nicht spezifisch für *hPin1*, da *hPar14* mit vergleichbaren  $IC_{50}$ -Werten gehemmt wird. Es ist daher nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die beobachteten Effekte durch eine Inhibierung des *hPin1* oder in Folge einer gleichzeitigen Hemmung der Aktivität des *hPin1* und *hPar14* auftreten. Außerdem wurde nicht untersucht, ob die WW-Domäne des *hPin1* ebenfalls eine Affinität gegenüber diesen Inhibitoren besitzt.

### 3.2 Entwicklung und Charakterisierung Pin1-spezifischer Inhibitoren

Die für das Screening bezüglich hochaffiner Pin1-Liganden verwendete Bibliothek wurde mit Hilfe der automatisierten Spotsynthese erhalten und bestand aus 1000 Cellulosemembran-gebundenen Phosphopeptiden der allgemeinen Struktur Ac-Xaa-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Yaa-Zaa-NHCH((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH-Linker)COOH (Xaa, Yaa, Zaa: variable Bausteine). Die Synthese erfolgte mit Hilfe eines Standardprotokolls unter Verwendung der Fmoc-Strategie. Den C-Terminus der Grundstruktur bildet ein N<sup>ε</sup>-alkylierter Glutaminrest. Dieser entsteht bei der Synthese durch Kondensation der ungeschützten Carboxylgruppe der Seitenkette des Aminosäurederivats Fmoc-Glu-OtBu mit der freien Aminogruppe des Matrix-gebundenen β-Alanyl-Alanin-Linkers. Für die Positionen Xaa und Zaa wurden neben Phenylalanin neun nichtproteinogene, hydrophobe Aminosäuren ausgewählt. Die Variation in der Position Yaa erfolgte unter Verwendung von acht N-Alkylaminosäuren. Die Auswahl von hydrophoben Aminosäuren in den Positionen Xaa bzw. Zaa und N-Alkylaminosäuren in Position Yaa entspricht der bekannten Aminosäurepräferenz der PPIase-Domäne des hPin1 für Peptidsubstrate bezüglich der P2- und P2'-Position bzw. ihrer Spezifität für Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Motive im Bereich der P1/P1'-Position (**260, 311**). Die Strukturen der in den variablen Positionen verwendeten nichtproteinogenen Amino- bzw. N-Alkylaminosäuren sind in **Abbildung 55** zusammengefasst. Darüber hinaus wurde durch den Einbau der 4-Aminomethyl-cyclohexancarbonsäure und 4-Aminomethyl-benzoesäure in der Position Yaa analysiert, ob Pin1 in der P1'-Position sechsgliedrige Ringe akzeptiert, wenn diese nicht über eine imidische, wie es bei N<sup>α</sup>-Alkylaminosäuren der Fall wäre, sondern über eine amidische Peptidbindung mit dem O<sup>γ</sup>1-Phosphothreonylrest verbunden sind. Die Verwendung von nichtproteinogenen Amino- bzw. N-Alkylaminosäuren in den variablen Positionen sollte gewährleisten, dass mit Hilfe des Screenings Pin1-Liganden gefunden werden, die sich für *in vivo* Untersuchungen eignen. Dies setzt voraus, dass sie in Zell-extrakten bzw. im Cytosol eine hohe Stabilität besitzen und demzufolge von zellulären Proteasen und Phosphatasen möglichst nicht als Substrate akzeptiert werden.

Da sowohl die PPIase- als auch die WW-Domäne des hPin1 spezifisch an Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Motive entsprechender Zielproteine binden und beabsichtigt wurde, Pin1-Liganden zu finden, die ausschließlich mit der PPIase-Domäne wechselwirken, ohne die Funktion der WW-Domäne zu beeinflussen, erfolgte das Screening unter Verwendung der isolierten PPIase-Domäne.

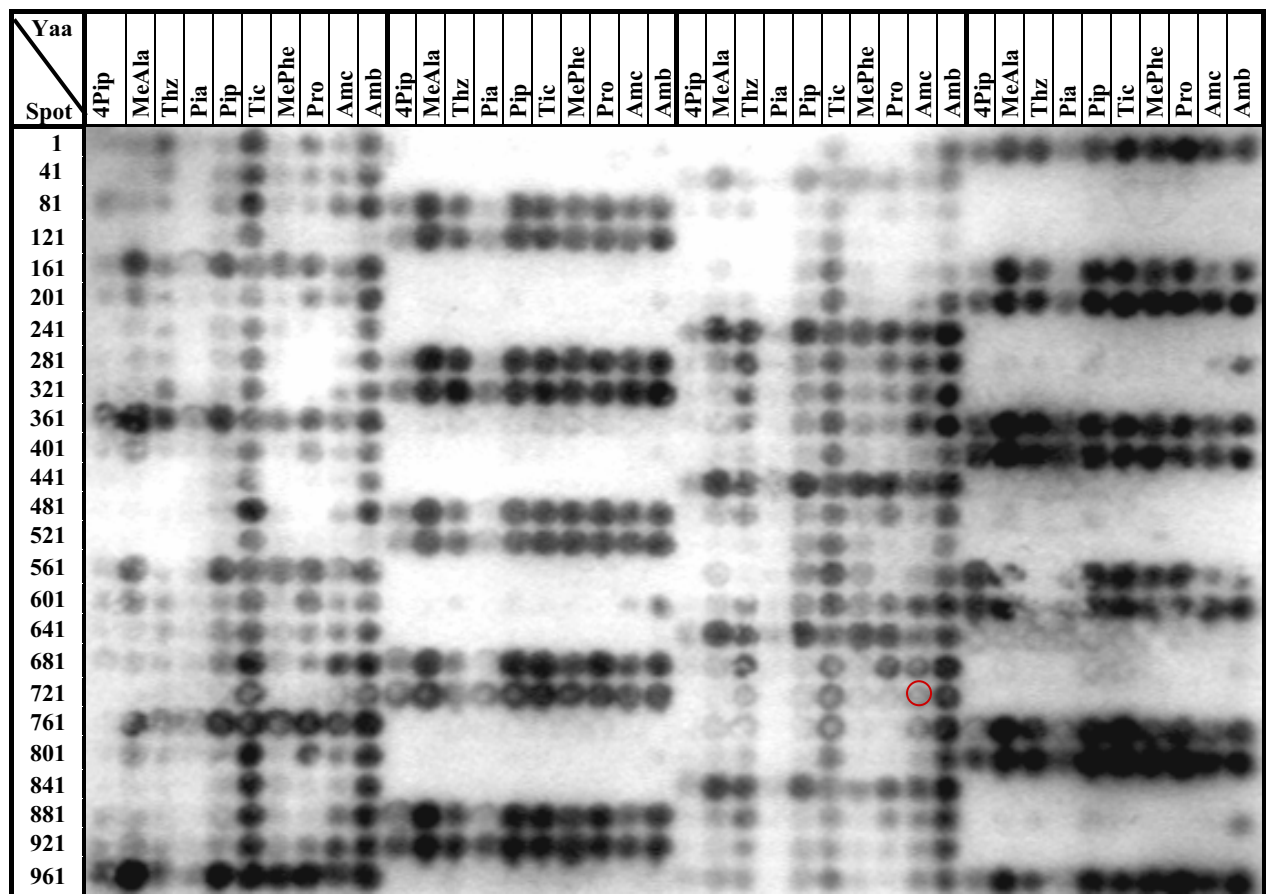
**A****B**

**Abbildung 55:** Strukturen der für die variablen Position Xaa und Zaa (**A**) bzw. Yaa (**B**) in der Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide verwendeten Amino- bzw. *N*-Alkylaminosäuren

Die Visualisierung der gebundenen PPIase-Domäne erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen PPIase-Domänen-spezifischen Antiserums (Kaninchen). **Abbildung 56 A** ist zu entnehmen, dass die PPIase-Domäne des *hPin1* in Position Yaa das gesamte Spektrum der verwendeten *N*-Alkylaminosäuren sowie die Aminosäuren 4-Aminomethyl-cyclohexan-carbonsäure und 4-Aminomethyl-benzoesäure akzeptiert. Die Bindung der PPIase-Domäne an entsprechende Phosphopeptide der Bibliothek wird in entscheidendem Maße vom

Aminosäurerest der Position Zaa beeinflusst, während sie in Position Xaa das gesamte Spektrum der verwendeten hydrophoben Aminosäuren toleriert. Gegenüber Phosphopeptiden der Bibliothek mit den Aminosäureresten des  $\alpha$ -*tert*Butyl-glycins,  $\alpha,\alpha$ -Dibutyl-glycins und der 2-Aminobenzoessäure hat die PPIase-Domäne des *hPin1* eine besonders geringe Affinität, während sie offensichtlich eine Präferenz für die Aminosäuren  $\beta$ -(4-Biphenyl)-alanin,  $\beta$ -(3-Benzothienyl)-alanin und  $\beta$ -(2-Naphtyl)-alanin besitzt.

A



**B**

Xaa \ Zaa	Zaa										
	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
1- 100	tBuPhe										
101- 200	tBuGly										
201- 300	Thi										
301- 400	Bth										
401- 500	Cha										
501- 600	Dbg										
601- 700	Bip										
701- 800	Abz										
801- 900	Phe										
901-1000	Nal										

**Abbildung 56:** Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide auf potentielle *hPin1*-Liganden

**A)** Die Bibliothek wurde mit Hilfe der automatisierten Spotsynthese an einer Cellulosemembran synthetisiert und besteht aus 1000 Peptiden mit der Grundstruktur Ac-Xaa-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Yaa-Zaa-NHCH((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH-Linker)COOH. Das Screening erfolgte durch Inkubation der Membran mit der rekombinanten PPIase-Domäne des *hPin1* und anschließendem Elektroblothing des Proteins auf eine Nitrocellulosemembran. Detektiert wurde das Protein mit Hilfe eines *hPin1* PPIase-Domänen spezifischen Antiserums (Kaninchen, primärer Antikörper) und einen POD-konjugierten sekundären Antikörper. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des SuperSignal®-Substrats von Pierce. Die Zahlen an der linken Seite der Abbildung representieren die Nummer des ersten Spots innerhalb einer Zeile. Der zu einem Phosphopeptid (Spot) gehörige Baustein Yaa kann an der oberen Seite der **Abbildung 56A** abgelesen werden (zB. Spot 749, markiert durch roten Kreis, Yaa= Amc).

**B)** Mit Hilfe der **Abbildung 56B** können einem Spot die entsprechenden Bausteine der Position Xaa und Zaa zugeordnet werden. Xaa kann mit Hilfe einer horizontalen Linie, ausgehend vom entsprechenden Hunderter-Bereich (dargestellt an der linken Seite der Abbildung) in dem sich der Spot befindet, ermittelt werden. Da sich Spot 749 im Bereich von 701-800 befindet, resultiert für Xaa die Aminosäure Abz. Zaa kann mit Hilfe einer vertikalen Linie ausgehend vom entsprechenden Zehner-Bereich (dargestellt im Tabellenkopf), zu dem der Spot gehört, ermittelt werden. Spot 749 gehört zum Zehner-Bereich 41-50, daraus folgt: Zaa= Cha.

Anschließend wurden ausgewählte Sequenzen der Bibliothek in Form löslicher Phosphopeptide synthetisiert und deren Einfluss auf die PPIase-Aktivität des *hPin1* mit Hilfe enzymkinetischer Messungen bestimmt. Dabei wurden sowohl Sequenzen der Bibliothek zu denen die PPIase-Domäne des *hPin1* offensichtlich eine hohe Affinität besitzt (schwarz gefärbte Spots) als auch Sequenzen bezüglich derer die PPIase-Domäne scheinbar nur eine geringe Affinität aufweist (graue bzw. nicht gefärbte Spots) ausgewählt. Damit ist eine Verifizierung der Ergebnisse des Screenings durch Vergleich mit den Resultaten der enzymkinetischen Messungen möglich.

Auf Grund von Experimenten, die sich an die erhoffte Entdeckung eines hochaffinen *Pin1*-Liganden anschließen sollten (Nachweis der Bindung des *Pin1*-Liganden durch authentisches *Pin1* als Voraussetzung für *in vivo* Experimente, Analyse der Selektivität der Ligandbindung



bezüglich der Phosphopeptid-spezifischen PPIase- und WW-Domäne, Untersuchung der Lokalisation eines Pin1-Liganden nach Applikation in der Zelle), wurden die löslichen Phosphopeptide *N*-terminal um einen Biotin-konjugierten Linker verlängert. Die Bestimmung der Inhibierung der PPIase-Aktivität des *h*Pin1 durch die erhaltenen biotinylierten Phosphopeptide erfolgte unter Verwendung des Protease-freien PPIase Tests (**312**, **313**). Die Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen sind in **Tabelle 13** zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Inhibierung der PPIase-Aktivität des *h*Pin1 durch verschiedene Phosphopeptide

Peptid	Position			<i>IC</i> <sub>50</sub> (μM)
	Xaa	Yaa	Zaa	
1	<i>t</i> BuPhe	Pro	Nal	30
2	Thi	Pro	Bip	22
3	Bth	Pro	Cha	>50
4	Bth	Pro	Nal	20
5	Bip	Pro	Bth	15
6	Bip	Pro	Nal	18
7	Nal	Pro	<i>t</i> BuGly	>50
8	Nal	Pro	Cha	>50
9	<i>t</i> BuPhe	MeAla	Nal	10
10	Thi	MeAla	Nal	15
11	Cha	MeAla	Nal	7
12	Phe	MeAla	Bth	20
13	<i>t</i> BuPhe	Tic	Bth	8
14	Cha	Tic	Nal	25
15	Bth	Pip	Nal	0,21

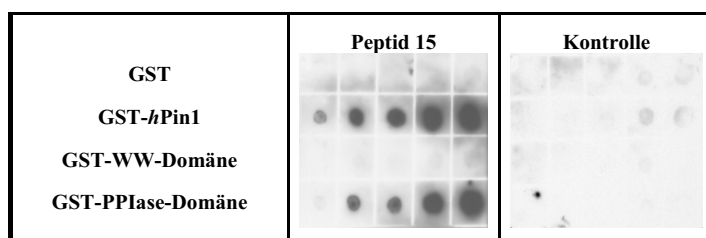
Die allgemeine Struktur der untersuchten Peptide lautet: Ac-Lys(*N*<sup>ε</sup>-Biotinoyl)-Ala-Ala-Xaa-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Yaa-Zaa-Gln-NH<sub>2</sub>. Die Messungen erfolgten in Hepes-Puffer (35 mM, pH 7,8) bei 10 °C unter Verwendung des Protease-freien PPIase Tests (Substrat: H-Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-NH-Np).

Peptide der **Tabelle 13**, deren Strukturen von Vertretern der Bibliothek abgeleitet sind, die beim Screening ein schwaches Signal ergaben (**Peptide 3, 7, 8**), zeichnen sich durch einen relativ hohen *IC*<sub>50</sub>- Wert der Inhibierung des *h*Pin1 aus. Im Gegensatz dazu bewirken Phosphopeptide der **Tabelle 13**, die sich von Strukturen der Bibliothek ableiten, die beim

Screening offensichtlich bevorzugt durch die PPIase-Domäne erkannt wurden (schwarzgefärbte Spots), eine relativ starke Hemmung der Enzymaktivität. Der niedrigste  $IC_{50}$ -Wert wurde für **Peptid 15** (Ac-Lys( $N^{\epsilon}$ -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-Thr( $PO_3H_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH<sub>2</sub>) gefunden und beträgt etwa 200 nM. Der Austausch der Piperidin-2-carbonsäure in Position P1' von **Peptid 15** gegen Prolin (**Peptid 4**), bei dem lediglich ein sechs- durch ein fünfgliedriges Ringsystem ersetzt wurde, führte zu einer Zunahme des  $IC_{50}$ -Werts um den Faktor 100. Wie für die Substratspezifität des Enzyms erwartet, bewirkt das unphosphorylierte Derivat von **Peptid 15** keine Hemmung der PPIase-Aktivität.

Da sowohl die PPIase- als auch die WW-Domäne eine Bindungsstelle für Ser( $PO_3H_2$ )/Thr( $PO_3H_2$ )-Pro- Motive entsprechender Substratproteine aufweisen, wurde im nächsten Schritt analysiert, durch welche *hPin1*-Domäne **Peptid 15** bevorzugt gebunden wird. Die Lösung dieser Fragestellung erfolgte mittels "Far-Western-Blot"- Analyse. Zu diesem Zweck wurden GST-*hPin1* bzw. seine mit GST fusionierten einzelnen Domänen auf eine Nitrocellulosemembran gespottet und anschließend mit **Peptid 15** inkubiert. Der Nachweis einer spezifischen Bindung von **Peptid 15** durch das entsprechende GST-Fusionsprotein erfolgte mit Hilfe des POD-konjugierten Streptavidins. Streptavidin ist ein Protein, das Biotin mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Somit kann dessen Bindung an den biotinylierten Linker von **Peptid 15** leicht über die POD-Aktivität in einer Farbreaktion beobachtet werden. **Abbildung 57A** ist zu entnehmen, dass **Peptid 15** ausschließlich durch GST-*hPin1* und die mit GST fusionierte PPIase-Domäne gebunden wird.

Analoge Experimente unter Verwendung verschiedener *hPin1*-Varianten, bei denen Aminosäurereste in der PPIase-Domäne, die offensichtlich für die Substratbindung bzw. den Katalysemechanismus von Bedeutung sind, substituiert wurden (K63A-; S67E-; R68,69R-, C113A-; H59A- und S154F-*hPin1*) zeigen, dass die Affinität einer Variante des GST-*hPin1* gegenüber **Peptide 15** im engen Zusammenhang mit seiner PPIase Aktivität steht (**Abb. 57B**). Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Bindung des *Pin1*- Liganden **Peptid 15** auf ähnliche Art und Weise erfolgt wie die Substratbindung. Darüber hinaus ist es möglich, dass es sich bei **Peptid 15** nicht um einen Inhibitor sondern um ein Substrat handelt, dass mit dem Substrat, dessen *cis/trans*-Isomerisierung im PPIase-Assay verfolgt wird, um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum der PPIase-Domäne konkurriert. Der Austausch der Aminosäure Ser<sup>16</sup>, die sich in der WW-Domäne befindet, gegen Glu, führt zu einer *hPin1*-Variante, bei der die WW-Domäne nicht mehr in der Lage ist, ihre natürlichen Phosphoproteinsubstrate zu binden (**295**). Sie hat jedoch erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Affinität des *hPin1* gegenüber **Peptid 15**.



**Abbildung 57A:** Analyse der Selektivität der Bindung von **Peptid 15** durch *hPin1* bezüglich der PPIase- und WW-Domäne. Eingesetzt wurden 1; 5; 10; 52,5; 105 pmol (beginnend von links) GST, GST-*hPin1* sowie der GST-fusionierten PPIase bzw. WW-Domäne auf den Nitrocellulosemembranen. Die Membranen wurden anschließend mit einer 1  $\mu$ M Lösung des **Peptids 15** bzw. 50  $\mu$ M Lösung seines unphosphorylierten Derivats (Kontrolle) inkubiert. Der Nachweis des spezifisch gebundenen **Peptids 15** erfolgte mit Hilfe des POD-konjugierten Streptavidins in Kombination mit einer Chemielumineszenzreaktion.

<b>Peptid 15 (pmol)</b>	<b><i>hPin1</i>-Variante</b>	<b>PPIase Aktivität (%)</b>
1    5    10    52,5    105		
	GST- <i>hPin1</i>	100 <sup>1)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Lys63Ala	0,2 <sup>1)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Ser67Glu	0,3 <sup>1)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Arg68,69Ala	0,4 <sup>1)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Cys113Ala	6,0 <sup>1)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Ser16Glu	100 <sup>3)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> His59Ala	5,7 <sup>2)</sup>
	GST- <i>hPin1</i> Ser154Phe	35 <sup>1)</sup>

**Abbildung 57B:** Analyse der Bindung von **Peptid 15** durch verschiedene Varianten des GST-*hPin1*. Die angegebenen Mengen des **Peptids 15** wurden auf eine Nitrocellulosemembran gespottet und anschließend mit dem entsprechenden Protein inkubiert. Detektiert wurde das gebundene Protein mit Hilfe eines für die PPIase-Domäne des *hPin1* spezifischen Antiserums und einem POD-konjugierten sekundären Antikörper. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung des SuperSignal<sup>®</sup>-Substrats von Pierce. Angegebene Restaktivitäten beziehen sich auf die Aktivität ( $k_{cat}/K_m$ -Wert) des Wildtyps (GST-*hPin1*). <sup>1); 2)</sup> Die PPIase-Aktivitäten wurden von Zhou et al. bzw. Yaffe et al. (10, 260) bestimmt. <sup>3)</sup> Aktivitätsmessungen unter Verwendung der Ser16Glu- Variante des *hPin1* erfolgten mit Hilfe des Protease-freien Tests.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Inversion des  $C^\alpha$ -Stereozenentrums (Austausch einer L- gegen eine D-Aminosäure) in der P1-Position von PPIase-Substraten zu Derivaten führen, gegenüber denen das entsprechende Enzym keine bzw. eine deutlich ver-

minderte Aktivität besitzt. Dieser Effekt wird vermutlich von einer sterischen Hinderung bei der Ausbildung des Übergangszustands der Katalyse verursacht, die auf eine Änderung der räumlichen Anordnung der Aminosäureseitenkette in der P1-Position zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist, dass diese Verbindungen häufig mit einer dem Substrat vergleichbaren oder höheren Affinität im aktiven Zentrum der PPIasen gebunden werden (**314**). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, führte der Austausch des  $O^{\gamma 1}$ -Phosphothreonins von **Peptid 15** gegen die entsprechende phosphorylierte D-Aminosäure (**Peptid 16**), zu einer Abnahme des  $K_i$ -Werts der Inhibierung des *h*Pin1 von 183 auf 1,2 nM (**Tab. 14**).

**Tabelle 14:**  $K_i$ -Werte der Inhibierung der PPIase-Aktivität des *h*Pin1 und *X*Pin1 durch verschiedene Phosphopeptide

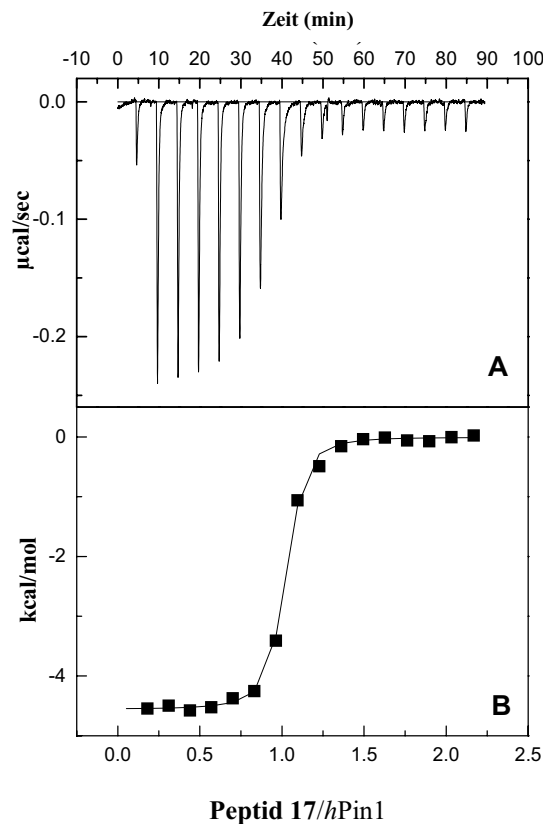
Peptid	Sequenz	$K_i$ (nM)
<b>15</b>	Ac-Lys( $N^{\epsilon}$ -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-Thr( $PO_3H_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	183 ± 2 <sup>a)</sup>
<b>16</b>	Ac-Lys( $N^{\epsilon}$ -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-D-Thr( $PO_3H_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	1,2 ± 0,6 <sup>c)</sup>
<b>17</b>	Ac-Phe-D-Thr( $PO_3H_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	28,2 ± 3,6 <sup>a)</sup> /34,4 ± 1 <sup>b)</sup>

Die  $K_i$ -Werte der Inhibierung der PPIase-Aktivität des *h*Pin1<sup>a)</sup> und *X*Pin1<sup>b)</sup> wurden mittels Protease-freiem Test unter Verwendung des Substrats H-Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-NH-Np bestimmt. <sup>c)</sup> Die Messung des  $K_i$ -Werts erfolgte im Protease-gekoppelten Assay unter Verwendung des Substrats Ac-Ala-Ala-Ser( $PO_3H_2$ )-Pro-Arg-NH-Np und Trypsin als isomerspezifischer Protease. Alle Messungen wurden bei 10 °C in Hepes-Puffer (35 mM, pH 7,8) durchgeführt.

Für die geplanten *in vivo* Experimente, in denen durch Mikroinjektion eines Pin1-Liganden der Einfluss einer selektiven Inhibierung der PPIase-Aktivität des Pin1 auf den Zellzyklus und die Embryonalentwicklung von *X. laevis* untersucht werden sollte, musste die Molmasse von **Peptid 16** (1376,5 g/mol) durch eine Verkleinerung des Moleküls verringert werden (Erhöhung des Diffusionskoeffizienten des Pin-Liganden). Dadurch ist gewährleistet, dass sich die injizierte Substanz im viskosen Zytosol des Embryos möglichst schnell verteilt. Das resultierende **Peptid 17** (Ac-Phe-D-Thr( $PO_3H_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH<sub>2</sub>, Mm: 823,8 g/mol) bewirkt eine Hemmung der PPIase-Aktivität des *h*Pin1 und *X*Pin1 mit  $K_i$ -Werten im nanomolaren Bereich (**Tab. 14**).

Der Nachweis, dass **Peptid 17** in Analogie zu **Peptid 15** selektiv durch die PPIase-Domäne der beiden Phosphopeptid-spezifischen Domänen des Pin1 gebunden wird, erfolgte mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (**Abb. 58**). Der mit Hilfe des ITC-Experiments bestimmte  $K_D$ -Wert liegt mit 19,3 nM im selben Bereich wie der in **Tabelle 14** für **Peptid 17** aufgeführte, mittels Protease-freiem Assay bestimmte  $K_i$ -Wert. Aus der Titrationskurve lässt

sich ableiten, dass **Peptid 17** durch *hPin1* in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebunden wird.



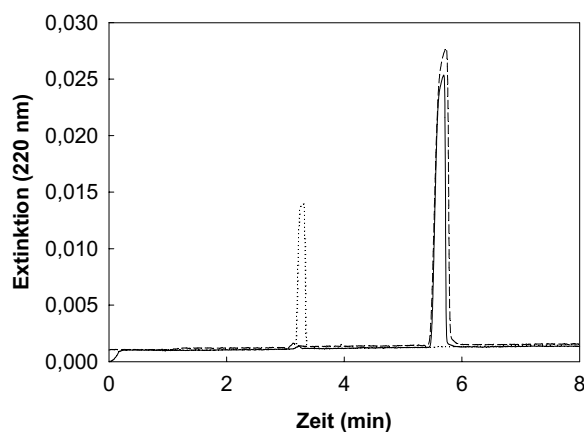
**Abbildung 58:** Thermodynamische Charakterisierung der Bindung von **Peptid 17** durch *hPin1* mittels isotherme Titrationskalorimetrie

**A:** Die Peaks representieren die bei einem Injektionsschritt freigesetzte Wärme. Nach der 11. Injektion wird nur noch die Verdünnungswärme beobachtet. Die Titration erfolgte bei 10 °C in HEPES-Puffer (35 mM, pH 7,8).

**B:** Die Flächen der in **A** dargestellten Peaks wurden gegen das molare Verhältnis von **Peptid 17** zu *hPin1* aufgetragen. Die Titrationskurve (schwarze Linie) wurde mit Hilfe der nichtlinearen Regression unter Verwendung eines Einseitenbindungsmodells erhalten und lieferte folgende Konstanten:  $\Delta H = -19,1 \pm 0,15$  kJ/mol,  $T\Delta S = 22,8 \pm 2,2$  kJ/mol,  $N = 0,96$  (Stöchiometrie der Assoziation) und  $K_{Ass} = 5,18 \times 10^7 \pm 7 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> (Assoziationskonstante). Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde mit Hilfe der Gleichung  $K_D = 1/K_{Ass}$  ermittelt und beträgt  $19,3 \pm 2,6$  nM.

Darüber hinaus ergab die ITC-Messung unter Verwendung der PPIase-Domäne des *hPin1* (Protein enthält keine WW-Domäne) identische thermodynamische Konstanten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass **Peptid 17**, wie für **Peptid 15** mittels “Far-Western Blot“-Analysen ermittelt, spezifisch durch die PPIase-Domäne gebunden wird. Somit führt die Inversion des C<sup>α</sup>-Stereozyentrums in der P1-Position zu keiner Änderung in der Selektivität der Bindung der Peptide bezüglich der beiden Phosphopeptid-spezifischen Domänen des *hPin1*. Die Verwendung eines Phosphopeptids für *in vivo* Experimente setzt voraus, dass es eine hohe Stabilität gegenüber zellulären Phosphatasen und Proteasen besitzt. Die Stabilität der **Peptide 15, 16 und 17** in zytoplasmatischen Extrakten von HeLa-Zellen wurde mit Hilfe der Kapillar-

elektrophorese bzw. MALDI-ToF- Massenspektrometrie untersucht. Bei der Inkubation von **Peptid 15** mit HeLa-Zellysat, nachfolgender Extraktion der Biotin- konjugierten Moleküle mittels Streptavidin-Sepharose und anschließender massenspektrometrischer Analyse zeigte sich, dass **Peptid 15** eine sehr hohe Stabilität gegenüber Proteasen besitzt. Es wird jedoch von den im Zellysat vorhandenen Phosphatasen dephosphoryliert und ist, da das dephosphorylierte Derivat von **Peptid 15** keine Hemmung der PPIase-Aktivität des *hPin1* bewirkt, für *in vivo* Experimente ungeeignet. Analoge Untersuchungen zeigten, dass die zellulären Phosphatasen nicht in der Lage sind eine Dephosphorylierung des D-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pip- Motivs von **Peptid 16** zu katalysieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Daten zur Stabilität D-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- haltiger Peptide gegenüber Phosphatasen (313). Die Stabilität von **Peptid 17** in HeLa-Zellysat wurde mit Hilfe der Kapillarelektrophorese nachgewiesen (Abb. 59).

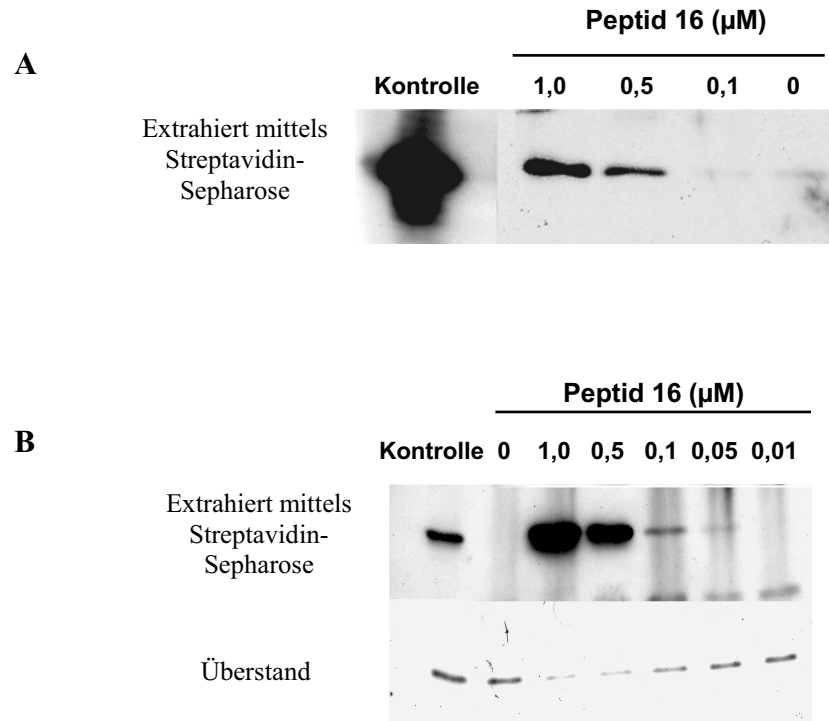


**Abbildung 59:** Analyse der Stabilität von **Peptid 17** gegenüber zellulären Proteasen und Phosphatasen

**Peptid 17** wurde in Abwesenheit von Protease- und Phosphataseinhibitoren 3 h in HeLa-Zellysat inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend mittels Kapillarelektrophorese analysiert (gestrichelte Linie). Als Referenzen dienten das unbehandelte **Peptid 17** (schwarze Linie) bzw. das unphosphorylierte Derivat (gepunktete Linie). Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Analysen wurden bei 16 °C unter Verwendung eines 50 mM Natriumphosphatpuffers als Trennpuffer durchgeführt.

Da beabsichtigt wurde, die **Peptide 16** und **17** für *in vivo* Untersuchungen zu benutzen und alle bisher beschriebenen Experimente unter Verwendung rekombinanter Proteine durchgeführt wurden, musste nachgewiesen werden, dass die Peptide von authentischem (intrazellulärem) Pin1 gebunden werden. Zu diesem Zweck wurde **Peptid 16** mit HeLa-Zell bzw. *Xenopus laevis* Embryolysat inkubiert. Die Extraktion möglicher **Peptid 16**/Protein-Komplexe erfolgte anschließend mittels Streptavidin-Sepharose. **Abbildung 60** verdeutlicht,

dass authentisches Pin1 aus HeLa-Zellen (*hPin1*) und *X. laevis* Embryonen (*XIPin1*) konzentrationsabhängig durch **Peptid 16** aus den Zellysaten extrahiert wurde.



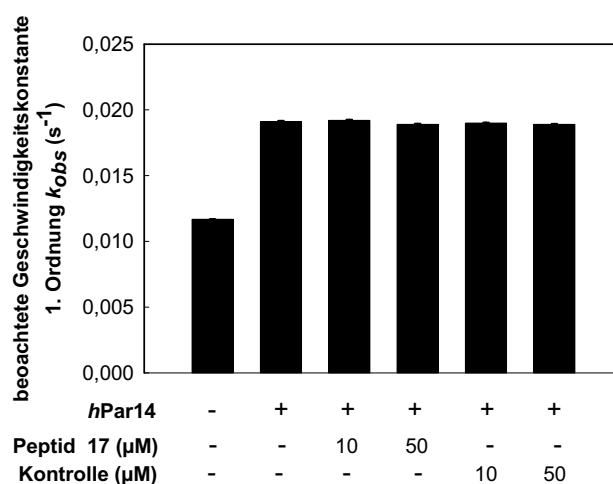
**Abbildung 60:** Nachweis der Bindung von **Peptid 16** durch authentisches *XIPin1* (A) und *hPin1* (B)

**Peptid 16** wurde mit *X. laevis* Embryo- bzw. HeLa-Zellysat in Abwesenheit von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren inkubiert. Die Extraktion des entsprechenden **Peptid 16**/Pin1- Komplexes erfolgte mittels Streptavidin-Sepharose. Der Nachweis des coextrahierten *XIPin1* bzw. *hPin1* erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse. Als Kontrolle wurde das unbehandelte Zellysat verwendet. Detektiert wurde das *XIPin1* bzw. *hPin1* mit Hilfe eines *hPin1* PPIase-Domänen spezifischen Antiserums (primärer Antikörper, Kaninchen) in Kombination mit einem POD- konjugierten sekundären Antikörper. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemielumineszenzreaktion unter Verwendung des SuperSignal<sup>®</sup>-Substrats von Pierce. In **B** wurde zusätzlich der Überstand des mit **Peptid 16** behandelten Zellysats aufgetragen.

Die sehr ähnlichen  $K_i$ - Werte, die für eine Hemmung der PPIase-Aktivität des *hPin1* und *XIPin1* durch **Peptid 17** gefunden wurden (**Tab. 14**), stehen im Einklang mit der hohen Sequenzhomologie zwischen beiden Proteinen. Aminosäuren im aktiven Zentrum des *hPin1*, die an der Substratbindung beteiligt sind, sind im *XIPin1* ebenfalls konserviert. *hPin1* besitzt 89 % Sequenzidentität zu *XIPin1* und kann das *XIPin1* in *X. laevis* Embryonen funktional ersetzen (**279, 280**).

In humanen Zellen repräsentiert das Parvulin 14 (*hPar14*, 13810 Da) einen weiteren Vertreter aus der Parvulin-Familie der PPIasen. Western-Blot-Analysen haben gezeigt, dass ein für rekombinantes *hPar14* generiertes Antiserum spezifisch ein 15 kDa schweres Protein in *Xenopus* Embryolysat erkennt. Der Sequenzvergleich unter Verwendung einer *Xenopus laevis*

cDNA-Bank (EST-Genbank BG578450) und *hPar14* führte zum Auffinden einer cDNA, die sich mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem zum *hPar14* homologen Protein ableitet (75 % Übereinstimmung in 128 überlappenden Aminosäuren). Da aus der Literatur Inhibitoren des *hPin1* bekannt sind, die auch zu einer Hemmung der Aktivität des *hPar14* führen (304), wurde der Einfluss von **Peptid 17** auf die PPIase-Aktivität des *hPar14* untersucht. **Abbildung 61** verdeutlicht, dass weder **Peptid 17** noch das unphosphorylierte Derivat die Aktivität des *hPar14* beeinflussen.



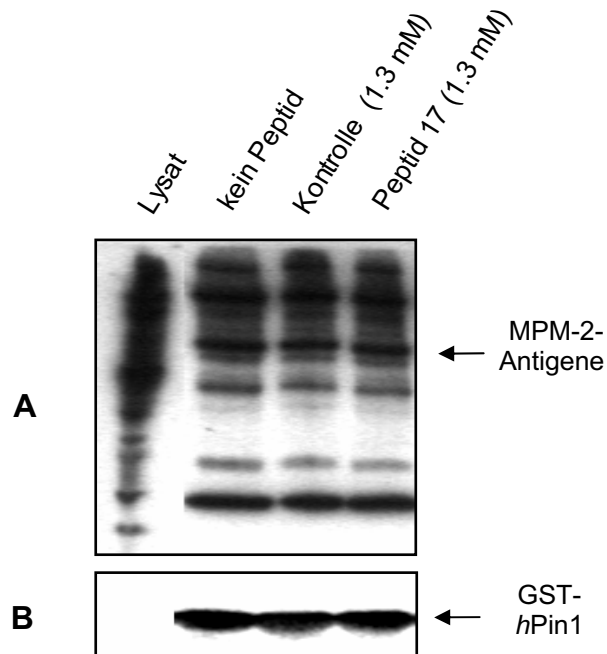
**Abbildung 61:** Einfluss von **Peptid 17** auf die Aktivität des *hPar14*  
 Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der *cis* → *trans* Isomerisierung der Arginyl-Prolyl- Peptidbindung des Substrats Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-NH-Np wurde mit Hilfe des Protease- gekoppelten Tests unter Verwendung von  $\alpha$ -Chymotrypsin als isomerspezifische Protease ermittelt. Alle Messungen erfolgten bei 10 °C in Hepes-Puffer (35 mM, pH 7,8). Als Kontrolle diente das unphosphorylierte Derivat von **Peptid 17**.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass **Peptid 17** bzw. das unphosphorylierte Derivat zu keiner Hemmung der Aktivität anderer Vertreter der PPIasen (*hCyp18*, FKBP12) und verschiedenen Phosphatasen (Proteinphosphatase 2A bzw. 2B und Alkalische Phosphatase) führt. Diese Enzyme sind ebenfalls in die Regulation des Zellzyklus involviert.

Um sicher zu gehen, dass **Peptid 17** ausschließlich die PPIase-Aktivität des *hPin1* inhibiert, wurde anschließend analysiert, ob dessen Bindung an die PPIase-Domäne die Wechselwirkung zwischen der WW-Domäne und ihren natürlichen Interaktionspartnern beeinflusst. Dieser Nachweis ist erforderlich um Ergebnisse von *in vivo* Experimenten, die unter Verwendung von **Peptid 17** erfolgen sollten, eindeutig einer Inhibierung der PPIase-Aktivität des *Pin1* zuordnen zu können. Bei den natürlichen Interaktionspartnern handelt es sich um eine Vielzahl verschiedener mitotischer Phosphoproteine, zu denen auch Vertreter der MPM-



2- Antigene gehören. Als MPM-2- Antigene bezeichnet man mitotische Phosphoproteine, welche Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motive enthalten, die spezifisch vom MPM-2- Antikörper erkannt werden. Zu ihnen zählen Proteine, die an der Regulation der Mitose beteiligt sind, wie z.B. Myt1, Wee1, Cdc25, Topoisomerase II und Cdc27 (**10, 279, 315**).



**Abbildung 62:** Einfluss von **Peptid 17** auf die Interaktion zwischen MPM-2- Antigenen und *hPin1*

**Peptide 17** bzw. das unphosphorylierte Derivat (Kontrolle) wurden mit einer 8  $\mu$ M Lösung von GST-*hPin1* inkubiert. Nach Zugabe von Zellysat, das aus mitotischen HeLa-Zellen gewonnen wurde, erfolgte die Extraktion des GST-*hPin1* aus der entsprechenden Mischung mittels Glutathion-Sepharose. Der Nachweis des extrahierten GST-*hPin1* (**B**) und copräzipitierter MPM-2- Antigene (**A**) erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse. Das unbehandelte Lysat wurde auf der 1. Bahn (links) aufgetragen. Die Detektion der MPM-2- Antigene erfolgte mit Hilfe des monoklonalen MPM-2- Antikörpers (primärer Antikörper, Maus). GST-*hPin1* wurde mittels eines für die PPIase-Domäne spezifischen Antiserums (Kaninchen) detektiert. Als sekundäre Antikörper kamen Maus- bzw. Kaninchen-spezifische POD-konjugierte Antikörper zum Einsatz. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung des SuperSignal<sup>®</sup>-Substrats von Pierce.

Zur Durchführung des erforderlichen Experiments wurden die HeLa-Zellen einer Zellkultur durch Zugabe von Nocodazol zum Nährmedium in der Mitosephase des Zellzyklus konserviert. Nocodazol zählt zu den Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen und blockiert damit die Ausbildung der für die Chromosomensegregation in der Mitose benötigten Kernspindeln. Zum Lysat der mitotischen HeLa-Zellen wurde anschließend GST-konjugiertes *hPin1* (GST-*hPin1*), das zuvor mit **Peptid 17** inkubiert wurde, gegeben. Die Extraktion des

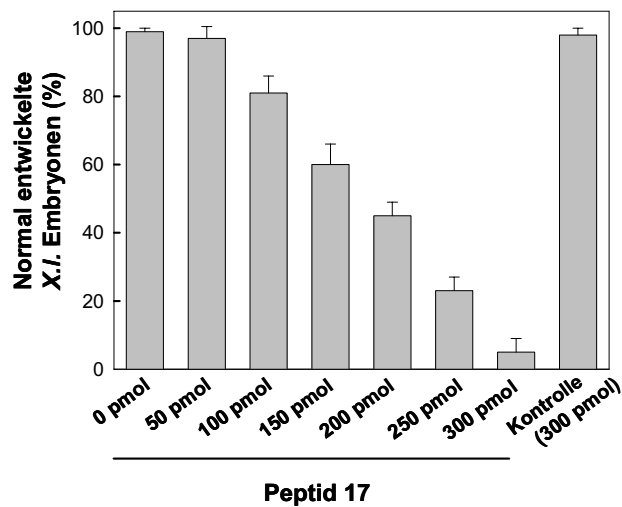
GST-*hPin1*, das nun als Komplex mit **Peptid 17** (gebunden an der PPIase-Domäne) und möglichen Substratproteinen (gebunden an der WW-Domäne) vorliegt, erfolgte mittels Glutathion-Sepharose. Coextrahierte MPM-2-Antigene wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Western-Blot-Analyse nachgewiesen. **Abbildung 62** ist zu entnehmen, dass die Bindung von **Peptid 17** an die PPIase-Domäne offensichtlich keinen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen GST-*hPin1* und MPM-2-Antigenen ausübt. Dieses Ergebnis ist, in Zusammenhang mit den bereits erwähnten Resultaten der Untersuchungen zum Einfluss von **Peptid 17** auf die Aktivität verschiedener anderer PPIasen und Phosphatasen, eine entscheidende Voraussetzung für *in vivo* Experimente zum Nachweis der biologischen Bedeutung der PPIase-Aktivität des *hPin1*.

### 3.3

### Biologische Tests

(durchgeführt von Frau Dr. B. Hernandez Alvarez)

Da **Peptid 17** nicht in der Lage ist die Zellmembran zu passieren, erfolgten die *in vivo* Experimente, in denen die Auswirkung einer selektiven Inhibierung der PPIase-Aktivität des Pin1 auf den Zellzyklus untersucht werden sollte, mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik. Als Modellorganismus wurde der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ausgewählt, da die Mikroinjektion in *X. laevis* Embryonen routinemäßig für Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus und der Embryonalentwicklung verwendet wird (316-318). **Peptid 17** wurde zunächst in verschiedenen Mengen (50 bis 300 pmol, gelöst in jeweils 10 nl PBS-Puffer) in den animalen Pol von *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden, injiziert. Nach 5 h, die Embryonen befanden sich nun im Entwicklungsstadium 8-9, erfolgte eine Bewertung der biologischen Effekte der Injektion durch eine mikroskopische Untersuchung des resultierenden Phänotyps (**Abb. 63**).

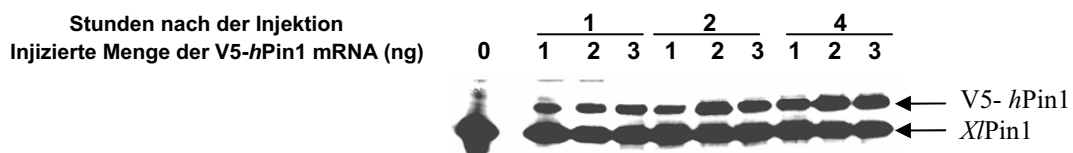


**Abbildung 63:** Die Applikation von **Peptid 17** führt zu Störungen in der Zellteilung und Embryonalentwicklung von *X. laevis* Embryonen  
50-300 pmol des **Peptids 17** bzw. seines unphosphorylierten Derivats (Kontrolle) gelöst in je 10 nl PBS-Puffer wurden in den animalen Pol von *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden, injiziert. Embryonen, die im Bereich der Injektionsstelle apoptisch oder unnatürlich groß erscheinende Zellen aufweisen, wurden 5 h nach der Injektion (Entwicklungsstadium 8-9) gezählt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der vitalen Embryonen, die keine phänotypischen Abnormalitäten zeigen, bezogen auf die Gesamtanzahl der pro Experiment eingesetzten Embryonen. Dabei wurden pro Experiment 30 Embryonen eingesetzt. Zur statistischen Absicherung wurden alle Experimente viermal wiederholt. Demnach entspricht ein Wert für den prozentualen Anteil der normal entwickelten Embryonen dem Durchschnittswert von vier unabhängigen Experimenten.

**Abbildung 63** verdeutlicht, dass die Anzahl der Embryonen, die Defekte in der Zellteilung und embryonalen Entwicklung aufweisen, mit der Dosierung des injizierten **Peptids 17** steigt. Bei Injektion von 300 pmol des **Peptids 17** liegt die Anzahl normal entwickelter Embryonen bei 5 %. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung des unphosphorylierten Derivats von **Peptid 17** bei gleicher Dosierung zu keiner Störung der Embryonalentwicklung.

Zum Nachweis, dass die beobachteten Effekte von **Peptid 17** auf die Zellteilung und Embryonalentwicklung die Konsequenz einer selektiven Inhibierung der PPIase-Aktivität des *XIPin1* sind, wurde **Peptid 17** zusammen mit der mRNA verschiedener Varianten des V5-konjugierten *hPin1* (*V5-hPin1*) in *X. laevis* Embryonen injiziert. Da *hPin1* die biologische Funktion des *XIPin1* in *X. laevis* Embryonen übernehmen kann, sollte die zusätzliche Expression des *V5-hPin1* den Anteil der Embryonen senken, die nach einer Injektion von **Peptid 17** Defekte in der Embryonalentwicklung zeigen.

Zunächst wurde jedoch in einem vorangehenden Experiment gezeigt, dass die injizierte mRNA der entsprechenden Variante des *V5-hPin1* in den Zellen des *X. laevis* Embryos translatiert wird. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mengen der entsprechenden mRNA in *X. laevis* Embryonen (Stadium 2) injiziert und die Embryonen nach 1, 2 bzw. 4 h lysiert. Die Detektion des resultierenden Proteins im erhaltenen Zellysate erfolgte mittels Western-Blot-Analyse (**Abb. 64**). Bereits 1 h nach Injektion der mRNA konnte das entsprechende Protein im Embryozellysate neben dem *XIPin1* nachgewiesen werden.

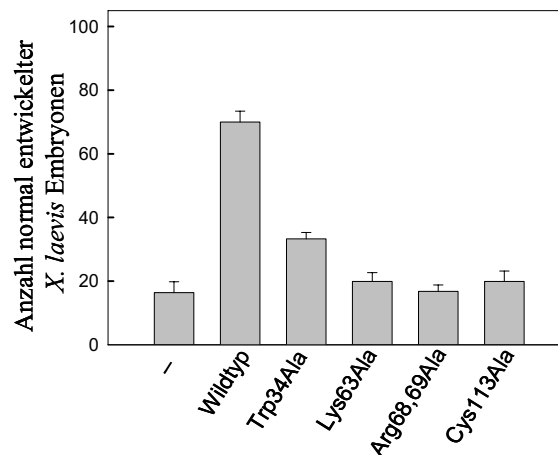


**Abbildung 64:** Zeitabhängigkeit der Expression des *V5-hPin1* in *X. laevis* Embryonen

Die Expression des *V5-hPin1* wurde 1, 2 und 4 h nach Injektion der entsprechenden mRNA (1, 2 bzw. 3 ng, Injektionsvolumen: jeweils 10 nl) durch Aufschluss der Embryonen in Gegenwart von Protease- und Phosphataseinhibitoren mittels SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion des *V5-hPin1* und des endogenen *XIPin1* erfolgten mit Hilfe eines Antiserums, das spezifisch die PPIase-Domäne des *Pin1* erkennt (primärer Antikörper) und eines POD-konjugierten sekundären Antikörpers. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung des SuperSignal®-Substrats von Pierce.

Die Varianten Lys63Ala und Arg68,69Ala des *hPin1* sind durch eine stark reduzierte PPIase-Aktivität gekennzeichnet (**Abb. 57B**). In diesen Proteinvarianten wurden Aminosäuren, deren Seitenketten an der Substratbindung beteiligt sind gegen Alanin ausgetauscht. Eine Coexpression der Lys63Ala bzw. Arg68,69Ala Variante des *V5-hPin1* ist, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht in der Lage die von **Peptid 17** verursachten Störungen in der Zellteilung und

daraus resultierende Defekte in der Embryonalentwicklung zu verhindern (**Abb. 65**). Die Cys113Ala Variante des *hPin1* ist ebenfalls durch eine stark verminderte PPIase-Aktivität gekennzeichnet und ist ebenfalls nicht in der Lage, die Wirkung von **Peptid 17** effizient zu unterdrücken. Cys113Ala-*hPin1* besitzt jedoch, wie der Wildtyp des *hPin1*, eine sehr große Affinität gegenüber **Peptid 17** (persönliche Mitteilung von Sebastian Daum).



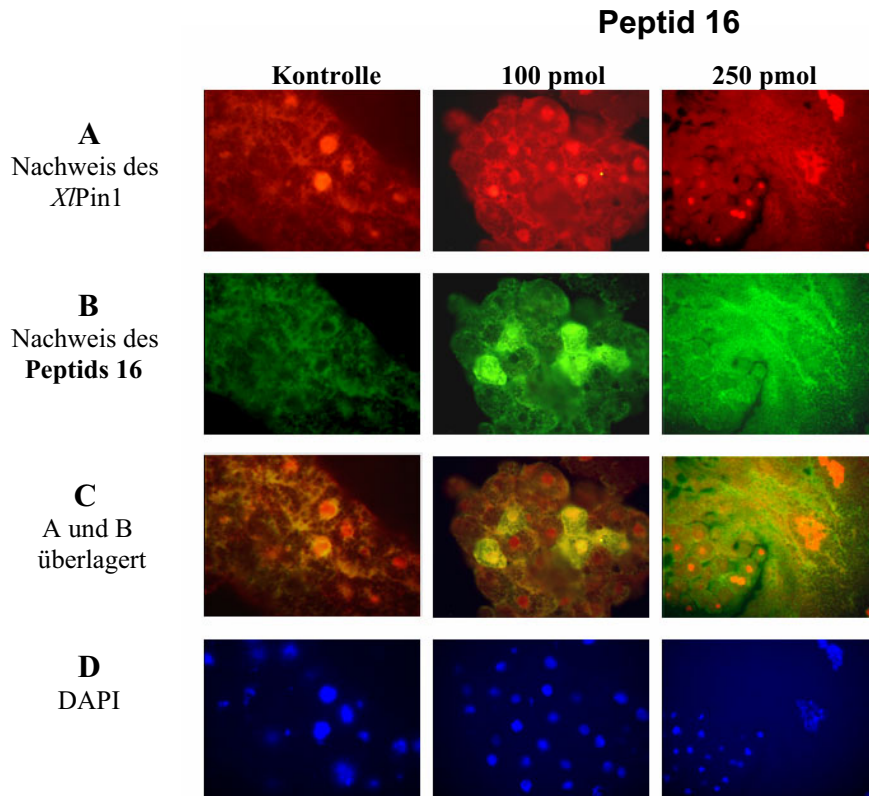
**Abbildung 65:** Einfluss einer Coexpression verschiedener Varianten des V5-*hPin1* auf die durch **Peptid 17** verursachten Störungen in der Zellteilung und Embryonalentwicklung von *X. laevis* Embryonen

250 pmol des **Peptids 17** wurden zusammen mit 2 ng der entsprechenden V5-*hPin1* mRNA in den animalen Pol von jeweils 30 *X. laevis* Embryonen (Entwicklungsstadium 2) injiziert (Injektionsvolumen jeweils 10 nl). 5 h nach der Applikation (Entwicklungsstadium 8-9) wurden die Embryonen mikroskopisch untersucht und der Anteil der Embryonen, die keine apoptotischen oder unnatürlich großen Zellen im Bereich der Injektionsstelle aufweisen, bestimmt. Der in der Abbildung dargestellte prozentuale Anteil der normal entwickelten Embryonen ist ein Durchschnittswert, der mit Hilfe der Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten berechnet wurde.

Bei der Trp34Ala- Variante des *hPin1* (intakte PPIase-Domäne) ist die WW-Domäne nicht mehr in der Lage mit den natürlichen Substraten zu interagieren. Im Vergleich zum Wildtyp ist ihre Fähigkeit, die Wirkung von **Peptid 17** zu unterdrücken deutlich vermindert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Pin1 seine biologische Funktion nur bei intakter PPIase- und WW-Domäne vollständig entfalten kann.

Abschließend wurde untersucht, ob eine Veränderung der Lokalisation des *XPin1* als Ursache für die beobachteten Effekte einer Inhibierung der PPIase-Aktivität des Enzyms auf die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* in Frage kommt. Der Biotinoylrest in der Lysinseitenkette von **Peptid 16** ermöglicht mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung, eine Bestimmung der Lokalisation des freien bzw. *XPin1*-gebundenen **Peptids 16** in Zellen des Embryos. 100 bzw. 250 pmol des **Peptids 16** wurden in *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der

Embryonalentwicklung befanden, injiziert. 4 h nach der Injektion (Stadium 8) wurden die Embryonen fixiert und ein Kryoschnitt angefertigt. Die Färbung der Schnitte erfolgte unter Verwendung des Oregon Green™ 488-konjugierten NeutrAvidin-Biotin-bindenden Proteins (Detektion von **Peptid 16**). Parallel dazu wurde die Lokalisation des *X*Pin1 mit Hilfe eines monoklonalen *h*Pin1-spezifischen Antikörpers (Maus) und Alexa Flour546™-konjugierten sekundären Antikörpers bestimmt (**Abb. 66**).



**Abbildung 66:** Colokalisation von **Peptid 16** und *X*Pin1 in *X. laevis* Embryonen  
100 bzw. 250 pmol des **Peptids 16** gelöst in je 10 nl PBS-Puffer wurden in *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden injiziert. Als Kontrolle erfolgte die Injektion von 10 nl des reinen PBS-Puffers. Im Stadium 8 der Entwicklung wurden Kryoschnitte von den Embryonen angefertigt. **Peptid 16** erscheint, gefärbt mit Hilfe des Oregon Green™ 488-konjugierten NeutrAvidin-Biotin-bindenden Proteins in grüner Farbe (**A**). Endogenes *X*Pin1 wurde unter Verwendung eines monoklonalen *h*Pin1-spezifischen Antikörpers (Maus) und Alexa Flour546™-konjugierten sekundären Antikörpers detektiert (rote Farbe, **B**). Zum Nachweis der Colokalisation von **Peptid 16** und *X*Pin1 erfolgte eine Überlagerung der Abbildungen **A** und **B**. Zellkerne wurden unter Verwendung von DAPI gefärbt.

Die Färbung der Zellkerne erfolgte unter Verwendung des Farbstoffes DAPI. *X*Pin1 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, kann aber auch im Zytoplasma, wo es diffus verteilt vorliegt, nachgewiesen werden. Das NeutrAvidin-Biotin-bindende Protein ist bei Abwesenheit von **Peptid 16** hauptsächlich im Bereich der Zytoplasmamembran zu finden. Während bei Injektion von 100 pmol des **Peptids 16** eindeutig eine Colokalisation von **Peptid 16** und

XlPin1, vor allem im Bereich der Zellkerne nachgewiesen werden konnte, führte die Injektion von 250 pmol zu einer Veränderung des embryonalen Gewebes, die sich im Auftreten unnatürlich großer Zellen mit fragmentierten Zellkernen manifestierten.

Die Depletion des Pin1 bzw. entsprechender homologer Proteine eukaryontischer Organismen kann dramatische Effekte auf verschiedene physiologische Prozesse haben (252). Aus der Literatur sind jedoch keine *in vivo* Studien bekannt, in denen unter Verwendung spezifischer Inhibitoren, die Bedeutung der katalytischen Aktivität dieser Enzyme für die Steuerung des Zellzyklus und die Entwicklung eines Organismus untersucht wurden. Auf Grund der Bedeutung des *hPin1* bei der Onkogenese und Progression von Tumorzellen, könnten diese Inhibitoren möglicherweise in der Krebstherapie Verwendung finden (293).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese von Pin1-Liganden, die eine spezifische Hemmung der PPIase-Aktivität des *hPin1* bzw. *XIPin1* bewirken (Peptid 15, 16, 17). Die Mikroinjektion der Peptide 16 und 17 in *Xenopus laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden, führte zu einer Blockade des Zellzyklus und letztlich zum Absterben der Embryonen. Diese Ergebnisse deuten auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen der PPIase-Aktivität des Pin1 und der Regulation des Zellzyklus hin. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde für die *in vivo* Experimente ausgewählt, da er sich als Modellorganismus für Untersuchungen zur Steuerung des Zellteilungszyklus und der Embryonalentwicklung etabliert hat und die Mikroinjektion Membran-impermeabler Substanzen (z.B. Phosphopeptide, RNA, Proteine, monoklonale Antikörper) in *X. laevis* Oozyten bzw. Embryonen routinemäßig durchgeführt wird (279, 319-323).

Das Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide mit der allgemeinen Sequenz Ac-Xaa-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Yaa-Zaa-Gln-NH<sub>2</sub> (Xaa, Yaa, Zaa: variable Bausteine), die aus der Substratpräferenz des *hPin1* abgeleitet wurde, erwies sich als geeignet, um einen Pin1-Liganden zu finden (Peptid 15), der mit hoher Affinität und Selektivität an die PPIase-Domäne der beiden Phosphopeptid-spezifischen Domänen des *hPin1* bindet (Abb. 57A, Tab. 14).

In Anlehnung an die Ergebnisse von Untersuchungen zum Einfluss einer Stereo inversion der Aminosäure in der P1-Position von Substraten auf die Bindung im katalytischen Zentrum von PPIasen (314), bewirkte eine Inversion des C<sup>α</sup>-Stereo zentrums des O<sup>γ</sup><sup>1</sup>-Phosphothreonins von Peptid 15, die zu Peptid 16 führte, eine deutliche Erhöhung der Affinität des Pin1-Liganden um den Faktor 150 ( $K_i = 1,2$  nM, Tab. 14).

Der Pin1-Ligand Peptid 17, der im Gegensatz zu Peptid 16 keinen Biotin-konjugierten Linker aufweist, eignet sich auf Grund seiner relativ geringen Molmasse besonders gut für Mikroinjektionsexperimente. Peptid 17 wird vom *hPin1* und *XIPin1* mit einer vergleichbaren



Affinität gebunden und führte zu einer Inhibierung der PPIase-Aktivität beider Enzyme mit einem  $K_i$ -Wert von 28 bzw. 34 nM (**Tab. 14**). Da die unphosphorylierten Derivate der hochaffinen Pin1-Liganden **Peptid 16** und **17** keine Inhibierung der PPIase-Aktivität des Pin1 bewirkten, konnten sie als Referenzpeptide in entsprechenden biologischen Experimenten benutzt werden (**Abb. 57, 59, 61-63**).

Unter Verwendung der isothermen Titrationskalorimetrie, mit deren Hilfe eine Charakterisierung der Bindung von **Peptid 17** an *h*Pin1 (**Abb. 58**) bzw. dessen isolierter PPIase-Domäne erfolgte, konnte nachgewiesen werden, dass die Inversion des  $C^\alpha$ -Stereozyentrums des  $O^{\gamma 1}$ -Phosphothreonins von **Peptid 15** keinen Einfluss auf die Selektivität der Bindung des Pin1-Liganden bezüglich der beiden Phosphoprotein-spezifischen Domänen des *h*Pin1 hat. Dementsprechend ergaben die ITC-Experimente identische  $K_D$ -Werte für die Bindung von **Peptid 17** an *h*Pin1 bzw. dessen isolierter PPIase-Domäne und ein stöchiometrisches Verhältnis für die Ausbildung der entsprechenden Komplexe von 1:1.

Wie von den Ergebnissen einer Untersuchung zur Stabilität D-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-haltiger Peptide gegenüber Phosphatasen (**313**) und der Verwendung nichtproteinogener Aminosäuren bei der Synthese der Pin1-Liganden erwartet wurde, zeichnen sich die **Peptide 16** und **17** durch eine hohe Stabilität in Zellysaten aus (**Abb. 59**) und sind deshalb hervorragend für *in vivo* Experimente geeignet.

**Peptid 16** erlaubt, auf Grund des vorhandenen Biotin-konjugierten Linkers in Kombination mit Steptavidin-Sepharose, eine Extraktion von Proteinen aus Zellysaten. Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass der Pin1-Ligand **Peptid 16** auch vom authentischen *h*Pin1 bzw. *X*Pin1 gebunden wird und eine Extraktion dieser Proteine aus Zellysaten ermöglicht.

Die Injektion von **Peptid 17** in *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden, verursachte eine Blockade des Zellteilungszyklus im Bereich der Injektionsstelle, die letztlich zum Absterben der Embryonen führte (**Abb. 63**). Eine Expression des *h*Pin1 in *X. laevis* Embryonen, die durch Coinjektion unterschiedlicher Mengen der entsprechenden mRNA erreicht wurde, führte zu einer Unterdrückung der Wirkung des injizierten **Peptids 17** (**Abb. 65**). Im Gegensatz dazu sind die drei *h*Pin1-Varianten Lys63Ala, Arg68,69Ala und Cys113Ala, die eine stark verminderte PPIase-Aktivität besitzen, nicht in der Lage, einer durch **Peptid 17** verursachten Hemmung der Zellteilung entgegen zu wirken. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu Experimenten in denen gezeigt wurde, dass die *X*Pin1-Variante Cys109Ala, die ebenfalls eine stark verminderte PPIase-Aktivität besitzt, nicht in der Lage ist, die Blockade des Zellteilungs-

zyklus in Pin1-depletierten Zellen von *X. laevis* Embryonen zu verhindern (270). Da Cys113Ala-*hPin1* selbst eine hohe Affinität gegenüber **Peptid 17** besitzt, wird deutlich, dass die PPIase Aktivität des *hPin1* für eine Erhöhung der Anzahl vitaler Embryonen nach Coinjektion der entsprechenden mRNA essentiell ist und die alleinige Konkurrenz des *hPin1* um die Bindung von **Peptid 17** im Embryo nicht genügt, um den biologischen Effekt einer Injektion des **Peptids 17** zu unterdrücken.

Die Effizienz, mit der die *hPin1*-Variante Trp34Ala die Wirkung von **Peptid 17** unterdrückt, ist deutlich vermindert. Diese Punktmutation bewirkt, dass die WW-Domäne nicht mehr in der Lage ist, mit ihren natürlichen Substraten zu interagieren (274). Aus diesem Grund ist diese Variante des *hPin1* selbst nicht in der Lage, die biologische Funktion des *XPin1* in der Zelle vollständig zu übernehmen. Damit wird verständlich, warum die Coexpression der Trp34Ala-Variante des *hPin1*, im Vergleich zum Wildtyp des *hPin1*, nur eine relativ geringfügige Erhöhung der Anzahl vitaler Embryonen bewirkt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt repräsentiert das Parvulin 14 das einzige strukturell zu Pin1 homologe Protein in menschlichen Zellen (304). Die dreidimensionale Struktur im Proteinzentrum des *hPar14* besitzt eine sehr große Ähnlichkeit zur PPIase-Domäne des *hPin1*, obwohl sich beide Enzyme grundlegend in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die Triade, positiv geladener Aminosäuren, die am Eingang des postulierten aktiven Zentrums aller Vertreter der Pin1-homologen Proteine zu finden ist, ist im *Par14* gegen negativ geladene Aminosäuren ausgetauscht. Darüber hinaus ist die Aminosäure, die wahrscheinlich direkt am Katalysemechanismus beteiligt ist, im *hPin1* entspricht dies der Aminosäure Cys113, im *hPar14* gegen Asparaginsäure substituiert. Diese Unterschiede sprechen für eine differente Substratspezifität beider Proteine.

Uchida et al. konnten mit Hilfe Pin1-depletierter Zellen nachweisen, dass *hPar14* die biologische Funktion des Pin1 in Fibroblasten aus Mäuseembryonen übernehmen kann (303). Da wir zeigen konnten, dass eine zu *hPar14* homologe EST-Sequenz (Genbank: BG578450) in *Xenopus laevis* exprimiert wird und aus der Literatur Inhibitoren bekannt sind, die ihre biologische Wirkung durch gleichzeitige Hemmung des *hPin1* und *hPar14* entfalten, war der Nachweis notwendig, dass **Peptid 17** keinerlei Einfluss auf die PPIase-Aktivität des *hPar 14* besitzt (**Abb. 61**). Auf Grund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass **Peptid 17** mit hoher Wahrscheinlichkeit, keinen Einfluss auf die Aktivität des zu *hPar14*-homologen Proteins in *Xenopus* hat.

Allgemein wird angenommen, dass Pin1 seine physiologische Funktion über zwei verschiedene Mechanismen, die sich möglicherweise ergänzen, entfaltet.

In einem Modell wird davon ausgegangen, dass Pin1 an der Regulation des Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine beteiligt ist, deren biologische Aktivität durch eine reversible Phosphorylierung an entsprechenden Ser/Thr-Pro- Motiven gesteuert wird. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung dieser Proteine wird mit Hilfe von Ser/Thr-Pro- spezifischen Kinasen bzw. Phosphatasen kontrolliert. Da beide Enzyme in der Lage sind, nur das *trans*-Konformer umzusetzen, unterstützt Pin1 die Dephosphorylierungsreaktion eines Phosphoproteinsubstrats durch Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung einer entsprechenden Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindung, die somit nicht mehr den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Dephosphorylierungsreaktion darstellt (10).

Im zweiten Modell entfaltet Pin1 seine biologische Funktion als reines Bindungsprotein, in dem es mit Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Motiven verschiedener Phosphoproteine interagiert (293). Mit Hilfe einer PatMatch Analyse wurden 757 bzw. 249 im Hefegenom codierte, potentielle Interaktionspartner der PPIase-Domäne bzw. WW-Domäne gefunden (302).

Als ein Schlüsselexperiment zur Aufklärung der Fragestellung, über welche der beiden Mechanismen **Peptid 17** seine biologische Wirkung entfaltet, diente ein **Peptid 17**/MPM-2 Konkurrenzexperiment, unter Verwendung mitotischer HeLa-Zellen. *hPin1* ist sowohl in der Lage mitotische Phosphoproteine aus Extrakten von HeLa- als auch Embryonalzellen von *X. laevis* zu binden (279). Eine Vielzahl dieser Proteine wird vom monoklonalen Antikörper MPM-2 erkannt und gehört damit zu den MPM-2-Antigenen (260, 274, 279, 280). Die Bindung von **Peptid 17** durch die PPIase-Domäne des *hPin1* hat scheinbar keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen MPM-2-Antigenen und der WW-Domäne des *hPin1* in HeLa-Zellen (Abb. 62).

Die WW-Domäne des *hPin1* gehört zum Typ IV der WW-Domänen, die als spezifische Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Bindungsmodule fungieren. Die Funktion der WW-Domäne des *hPin1* wird durch eine reversible Phosphorylierung des Ser16 während bestimmter Phasen des Zellzyklus reguliert (295). Die Phosphorylierung dieser Aminosäure unterdrückt die Fähigkeit der WW-Domäne entsprechende Interaktionspartner zu binden und beeinflusst darüber hinaus die Lokalisation des Proteins in der Zelle (295).

Der Austausch der Aminosäure Ser16 gegen Glu, der einen analogen Effekt auf die Funktion der WW-Domäne ausübt (295), hat keinen sichtbaren Effekt auf die Bindung des Pin1-Liganden durch die PPIase-Domäne des *hPin1* (Abb. 57B). Im Gegensatz dazu bewirkt der Austausch bestimmter Aminosäuren in der PPIase-Domäne des *hPin1*, der zu *hPin1*-Varianten mit deutlich verringerter PPIase-Aktivität führt, eine deutliche Abnahme der Affinität des Proteins gegenüber dem Pin1-Liganden.

In Zusammenhang mit den Resultaten die zeigen, das **Peptid 17** keinen Einfluss auf die Funktion der WW-Domäne ausübt (**Abb. 62**), lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Eigenschaften der WW-Domäne für den Effekt, den **Peptid 17** auf den Zellzyklus ausübt, unbedeutend sind.

Die Depletion des *XlPin1* von *X. laevis* verursachte einen verfrühten Eintritt in die Mitose mit nachfolgendem Mitosearrest, der von einer Hyperphosphorylierung des Cdc25 und Aktivierung des Cdc2/cyclin B- Komplexes begleitet wird (**270**). Ähnliche Ergebnisse ergaben Experimente mit HeLa-Zellen, in denen eine Depletion des *hPin1* ebenfalls zu einem Arrest in der Mitosephase des Zellzyklus führte, der von einer Chromatinkondensation und Auflösung des Kernlamins, das der Stabilisierung der Kernmembran dient, begleitet wurde (**259**). Die beschriebenen Effekte einer Depletion des Pin1 in verschiedenen Zellen, stehen im Einklang mit der nach Applikation von **Peptid 17** beobachteten Hemmung des Zellteilungszyklus in *X. laevis* Embryonen (**Abb. 63**). Embryonen, denen das unphosphorylierte Derivat von **Peptid 17**, das nicht von Pin1 gebunden wird, appliziert wurde, entwickelten sich normal. Die Lokalisation des *XlPin1* in der Zelle (**Abb. 66**), entspricht dem bekannten Verteilungsmuster des *hPin1* in HeLa-Zellen (**259**). Demnach ist der überwiegende Teil des *hPin1* bzw. *XlPin1* im Zellkern lokalisiert. Die Injektion des Biotin-konjugierten Pin1-Liganden **Peptid 16** bewirkt keine Veränderungen im Verteilungsmuster des *XlPin1*. Darüber hinaus sind **Peptid 16** und *XlPin1* in der Zelle gleich lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass mit Hilfe der Fluoreszenz- und Immunofluoreszenzfärbung der **Peptid 16/XlPin1**-Komplex nachgewiesen wurde.

Da eine Depletion des *hPin1* in HeLa-Zellen bzw. die Deletion des Gens *ess1*, welches in Hefezellen das zu Pin1-homologe Protein ESS1 kodiert, lethal ist und in *Xenopus laevis* Embryonen eine Hemmung der PPIase-Aktivität des Pin1 für eine Blockierung des Zellzyklus genügt, ist unklar, warum Pin1 bzw. entsprechende homologe Proteine in anderen Organismen (Maus, *D. melanogaster*) nicht essentiell für das Überleben des Organismus sind. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte darin bestehen, dass noch andere, derzeit noch unbekannte Vertreter von PPIasen existieren, die in der Lage sind wichtige Funktionen des Pin1 bzw. homologer Proteine zu übernehmen. Es wurde nachgewiesen, dass *hPin1*, *XlPin1* und das zu Pin1-homologe Protein Dodo von *D. melanogaster* in der Lage sind, dass Pin1-homologe Protein von Hefezellen ESS1 funktional zu ersetzen (**259, 270, 324**). Diese Ergebnisse sind das Resultat einer hohen Sequenz- und strukturellen Homologie zwischen Pin1 und entsprechenden homologen Proteinen verschiedener eukaryontischer Organismen und geben Anlass zur Vermutung, dass diese Proteine in verschiedenen Organismen die gleiche

Funktion erfüllen. *X*Pin1 und *h*Pin1 besitzen eine Sequenzidentität von 89 %, wobei bestimmte Aminosäuren im Bereich des postulierten aktiven Zentrums hoch konserviert sind. Es wäre somit durchaus denkbar, dass in einem eukaryontischen Organismus, in dem eine Depletion des Pin1 bzw. entsprechenden homologen Proteins nicht letal ist noch unbekannte Vertreter Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- spezifischer Isomerasen existieren, die das entsprechende Protein funktional ersetzen könnten.

Da mit Hilfe eines „Pull-Down“-Assays unter Verwendung des Biotin-konjugierten **Peptids 16** gezeigt werden konnte, dass unsere Pin1-Liganden vom authentischen *X*Pin1 des *X. laevis* Embryolysats gebunden werden und eine Injektion von **Peptid 17** in *Xenopus laevis* Embryonen eine besonders effiziente Blockade des Zellzyklus bewirkt, darf vermutet werden, dass *X. laevis* unter den verwendeten experimentellen Bedingungen, keine weitere Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- spezifische PPIase, die *X*Pin1 funktional ersetzen könnte, exprimiert.

Auf Grund der Ergebnisse von Gen-Deletionsexperimenten wird vermutet, dass Cyp18 und FKBP12 bzw. Par14, welche die prototypischen Vertreter der jeweiligen Enzymfamilie darstellen, die biologische Funktion des Pin1 bzw. entsprechenden homologen Proteins in Hefezellen bzw. Mäusefibroblasten übernehmen können (301-303). Bisher wurden zwei FKBP, *X*FKBP63 und *X*FKBP12, die beide in frühen Phasen der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* detektiert werden können, beschrieben (325, 326). Darüber hinaus wurden zwei Fragmente Cyclophilin-ähnlicher Sequenzen (TREMBL: Q7ZTM1 und Q7ZZW0) und einige FKBP-homologe ESTs (Genbank: BF427009, BE509398, BE508244, AF232672) identifiziert. Es gibt jedoch, wie bereits für *h*Par14 diskutiert, keinen experimentellen Beweis, dass Vertreter der Cyclophiline oder FKBP eine *cis/trans*-Isomerisierung von Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)/Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen katalysieren können (260).

In Zusammenhang mit den Ergebnissen die zeigen, dass die Bindung von **Peptid 17** an Pin1 offensichtlich keinen Einfluss auf die biologische Funktion der WW-Domäne hat, dass **Peptid 17** keine Auswirkungen auf die Aktivität von Vertretern aus anderen Familien der PPIasen (Cyp18, FKBP12) oder Proteinphosphatasen besitzt und zu keiner Veränderung im Verteilungsmuster des *X*Pin1 in der Zelle führt, kann vermutet werden, dass die Hemmung des Zellteilungszyklus und die daraus resultierenden phänotypischen Veränderungen der *X. laevis* Embryonen von einer spezifischen Hemmung der PPIase-Aktivität des *X*Pin1 durch **Peptid 17** verursacht werden. Die phänotypischen Veränderungen werden allerdings erst nach Ablauf von drei weiteren Teilungszyklen, daher im Stadium 5 der Embryonalentwicklung, sichtbar.

Dieses Verhalten lässt sich mit der relativ geringen Diffusionsgeschwindigkeit einer injizierten Verbindung im viskosen Zytosol der *Xenopus* Embryonen erklären (327).

#### 4.

### Zusammenfassung

Unter Verwendung geeigneter Schutzgruppen in Kombination mit Lewissäuren zur Schutzgruppenabspaltung bzw. finalen Deblockierung, konnte eine neue Strategie für die Festphasensynthese thioxylierter Oligopeptide entwickelt werden. Diese neue Strategie ermöglicht die Festphasensynthese von Peptiden, ohne die gewöhnlich zur Abspaltung der temporären  $N^{\alpha}$ -Aminoschutzgruppe bzw. finalen Deblockierung des Peptids benötigten basischen bzw. sauren Bedingungen. Sie könnte daher nicht nur für die Synthese thioxylierter Oligopeptide geeignet sein, sondern auch die Synthese von Peptiden ermöglichen, die auf Grund Säure- oder Base-empfindlicher Modifikationen mit Hilfe herkömmlicher Synthesestrategien nicht zugänglich sind.

Die Synthese thioxylierter Derivate des S-Peptids ermöglichten Untersuchungen zum Einfluss der Thioxoamidsubstitution auf die enzymatische Aktivität und Stabilität der RNase S. Bei Aminosäuren, die sich im Bereich der Proteinoberfläche befinden (Lys<sup>1</sup>, Glu<sup>2</sup>, Ala<sup>4</sup>, Ala<sup>5</sup>, Ala<sup>6</sup>, Asp<sup>14</sup> und Ser<sup>15</sup>), führt die Thioxoamidsubstitution zu keiner signifikanten Änderung der enzymkinetischen Konstanten. Ursache für die beobachteten Änderungen der katalytischen Konstanten bei Thioxylierung einzelner Aminosäuren, die sich im Inneren der RNase S (daher im Bereich großer Packungsdichte von Atomen) befinden (z.B. His<sup>12</sup>, Phe<sup>8</sup>, Nle<sup>13</sup>), könnten Strukturveränderungen infolge des größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms und der größeren C=S-Bindungslänge sein. Die Veränderungen der katalytischen Konstanten, die bei Thioxylierung der Aminosäure Thr<sup>3</sup> oder Lys<sup>7</sup> beobachtet wurden, sind vermutlich auf Strukturänderungen im S-Peptid infolge veränderter Wasserstoffbrückenbindungen (Geometrie, Bindungslänge) zurückzuführen. Das Carbonylsauerstoffatom dieser Aminosäuren ist in der RNase S Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung, deren Donor die  $\alpha$ -NH-Gruppe von Aminosäuren ist, die wichtig für die Substratbindung oder Katalyse sind.

Untersuchungen zum Einfluss der Thioxoamidsubstitution auf die Stabilität der RNase S erfolgten durch Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion mittels isothermer Titrationskalorimetrie. Auf Grund der größeren Länge der Thiocarbonylbindung und des größeren Van-der-Waals Radius des Schwefelatoms führt der Austausch des Sauerstoffatoms der Peptidbindung gegen ein Schwefelatom zu einer deutlichen Abnahme der Stabilität der RNase S, wenn sich die entsprechende Aminosäure im Inneren der RNase S und damit im Bereich einer höheren Packungsdichte von Atomen befindet, bzw., wenn die  $\phi$ - und  $\psi$ -

Winkel der entsprechenden oder benachbarten Aminosäure ungünstig für die Thioamidsubstitution sind.

Im Gegensatz dazu bewirkte der Austausch des Carbonylsauerstoffatoms des Alanins<sup>4</sup> gegen ein Schwefelatom eine leichte Erhöhung der Stabilität der RNase S. Diese Aminosäure befindet sich an der Oberfläche der RNase S und ist als Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung Bestandteil der  $\alpha$ -Helix des S-Peptids der RNase S. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Austausch des Sauerstoffatoms einer Peptidbindung, welcher als Akzeptor im Ensemble der Wasserstoffbrückenbindungen einer  $\alpha$ -Helix fungiert, gegen ein Schwefelatom, im Gegensatz zu den theoretischen Berechnungen, real zu einer Erhöhung der Stabilität einer  $\alpha$ -Helix führen kann.

Der Bereich des  ${}^1n_s$ - ${}^3\pi^*$ -Übergangs der Thiopeptidbindung des [ThioAla<sup>4</sup>]-S-Peptids eignet sich als CD-spektroskopische Sonde um die Rekombination zwischen S-Peptid und S-Protein bzw. die Dissoziation des Komplexes zu untersuchen. Die Substitution des Alanin<sup>4</sup>-Sauerstoffatoms des S-Peptids gegen ein Schwefelatom eröffnet daher die Möglichkeit, diese Prozesse anhand der Änderung der CD-spektroskopischen Eigenschaften einer einzelnen Bindung (Thiopeptidbindung) zu charakterisieren.

Die Bestrahlung des [ThioAla<sup>4</sup>]-S-Peptids mit UV-Licht (260 nm) führte zu einer photoinduzierten Verschiebung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts der Thiopeptidbindung zu Gunsten des *cis*-Konformeren. Die Dunkelreaktion konnte anschließend unter Ausnutzung der besonderen UV- und CD-spektroskopischen Eigenschaften der Thiopeptidbindung kinetisch charakterisiert werden. Dabei beträgt die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung  $k_{c/t}$ , die für die Wiedereinstellung des *cis/trans*-Konformerengleichgewichts in der Dunkelreaktion beobachtet wurde  $5,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei 10 °C. Durch Messung der Temperaturabhängigkeit von  $k_{c/t}$  wurde für die Rotationsbarriere der *cis/trans*-Isomerisierung dieser Thiopeptidbindung ein Wert von 78,9 kJ/mol ermittelt. Ergebnisse zum Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung der Thiopeptidbindung des [ThioAla<sup>4</sup>]-S-Peptids auf die Aktivität der RNase S lassen die Schlussfolgerung zu, dass der *cis*-Gehalt im photostationären Zustand, unter den verwendeten experimentellen Bedingungen, mindestens 15 % betragen muss.

Die Bedeutung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen für die Steuerung wichtiger Lebensfunktionen in der Zelle, wurde mit Hilfe spezifischer Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1 untersucht. Durch Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide konnte ein hochaffiner Pin1-Inhibitor gefunden werden, der eine Hemmung



der PPIase-Aktivität des Pin1 mit  $K_i$ -Werten im unteren nanomolaren Bereich bewirkte, ohne die biologische Funktion der WW-Domäne des Enzyms zu beeinflussen. Auf Grund seiner hohen Stabilität in zytosolischen Extrakten, konnte dieser Inhibitor für *in vivo* Experimente verwendet werden. Die Mikroinjektion in Embryonen des Krallenfroschs *Xenopus laevis* bewirkte, in Abhängigkeit von der applizierten Menge des Pin1-Inhibitors, eine Hemmung der Zellteilung im Bereich der Injektionsstelle. Die daraus resultierende Störung der Embryonalentwicklung führte letztlich zum Absterben der Embryonen. Dieser Effekt konnte durch Coexpression des *hPin1* deutlich vermindert werden. Dabei ist die Fähigkeit des *hPin1*, die biologische Wirkung des Pin1-Inhibitors während der Embryonalentwicklung von *X. laevis* zu unterdrücken, an dessen PPIase-Aktivität geknüpft. In Zusammenhang mit Experimenten die zeigen, dass dieser Pin1-Inhibitor keine Auswirkungen auf die Aktivität verschiedener Proteinphosphatasen bzw. auf die Aktivität von Vertretern aus anderen Familien der PPIasen ausübt und eine Hemmung der PPIase-Aktivität zu keiner Veränderung im Verteilungsmuster des *XPin1* in der Zelle führt, darf vermutet werden, dass die beobachteten biologischen Effekte einer Mikroinjektion dieses Pin1-Inhibitors die Folge einer spezifischen Hemmung der PPIase-Aktivität des *XPin1* sind.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Thioxylierte Derivate der RNase S

#### 5.1.1 Synthese thioxylierter S-Peptide

##### Vorbemerkungen

Alle Lösungsmittel und Chemikalien sind kommerziell erhältlich (Produkte der Firmen: Fluka, Merck, Aldrich, Sigma, Bachem, Novabiochem, Advanced ChemTech). Alle Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden getrocknet und vor ihrer Verwendung destilliert (328). Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte zum einen an einem VG-BIO-Q Triple Quadrupole Tandem Elektrospray-Massenspektrometer der Firma Fisons Instruments bzw. an einem Esquire-LC-Ionenfallen Massenspektrometer der Firmen Bruker und Hewlett Packard. Die Sequenzanalyse der thioxylierten S-Peptide erfolgte mit Hilfe eines ABI 476A Protein Sequencers der Firma Applied Biosystems. Zur dünn-schichtchromatographischen Analyse wurden DC-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60) in folgenden Laufmittelsystemen verwendet:

DC-System (v/v):

BAA	Benzen/Aceton/Essigsäure	20:10:0,5
C	Chloroform/Methanol/Essigsäure	9:1:0,5
P <sub>S</sub>	Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser	90:15:4,5:8,3
BEWE	Butanol/Essigester/Essigsäure/Wasser	1:1:1:1
A	<i>sec</i> -Butanol/Ameisensäure/Wasser	75:15:10
P <sub>L</sub>	Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser	30:20:6:24

Die Detektion der Verbindungen erfolgte zunächst mittels UV-Licht (254 nm). Danach wurden die Chromatogramme mit Ninhydrinlösung (0,2 % in Aceton) angefärbt und anschließend für ca. 20 min in eine Chloratmosphäre eingebracht. Nach Abblasen überschüssigen Chlors erfolgte die Entwicklung der DC's durch Besprühen mit einer Kaliumiodid-Stärke-Lösung. Die Reinheit aller Zwischen- und Endprodukte wurde darüber hinaus mittels HPLC überprüft. Dabei kam eine HPLC-Anlage der Firma SYKAM (Deutschland) in Verbindung mit einer LiChrospher 100 RP-8 Säule (125 × 4, Partikelgröße 5

$\mu\text{M}$ ) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Die analytischen Läufe wurden bei Raumtemperatur und einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Diodenarray-Detektors. Die Elution erfolgte mit variablen Gradienten aus Wasser und Acetonitril (jeweils mit 0,05 % TFA). Präparative HPLC-Trennungen wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage der Firma Abimed unter Verwendung einer präparativen Säule der Firma Merck (LiChrosorb RP-select B, 250 × 25, Partikelgröße 7 $\mu\text{m}$ ) durchgeführt. Die Elution erfolgte ebenfalls mit variablen Gradienten aus Wasser und Acetonitril (jeweils mit 0,05 % TFA).

### **Synthese der Thioxyacylierungsbausteine**

Die Darstellung der für die Synthese thioxylierter Oligopeptide benötigten  $N^\alpha$ -Fmoc-geschützten Amino-thioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole erfolgte entsprechend den folgenden Vorschriften:

#### **Synthese $N^\alpha$ -Fmoc-geschützter Amino-thioxocarbonsäure-2-amino-5-nitro-anilide (Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-NH]-ANA)**

Die Synthese von **Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-NH]-ANA** (mit Xaa= **Lys(Boc)**, **Glu(OtBu)**, **Thr(tBu)**, **Ala**, **Phe**, **Nle**, **Asp(OtBu)**, **Ser(tBu)**) erfolgte entsprechend der von Shalaby et al. für die Synthese der Boc-geschützten Derivate entwickelten Vorschrift (182):

25 mmol des Aminosäurederivats **Fmoc-Xaa-OH** werden in ca. 300 ml absolutem THF gelöst und nach Abkühlung auf -15 °C mit je einem Äquivalent *N*-Methylmorpholin und Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach einer Aktivierungszeit von 10 min bei -15 °C gibt man ein Äquivalent 4-Nitro-1,2-phenylen-diamin zum Reaktionsansatz. Man lässt 1 h bei -15 °C und weiter bei Raumtemperatur über Nacht rühren (Kontrolle des Reaktionsverlaufs mittels DC und HPLC). Anschließend gibt man ein Äquivalent des Thioxylierungsreagenzes  $\text{P}_4\text{S}_{10}$  zum Reaktionsansatz und lässt 1 h bei Raumtemperatur rühren. Ist nach Ablauf dieser Reaktionszeit noch Ausgangstoff nachweisbar (DC, HPLC), so gibt man zusätzlich ein halbes Äquivalent des Thioxylierungsreagenzes zum Reaktionsansatz.

„**Übliche Aufarbeitung**“: Ist der Umsatz vollständig, so wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Anschließend wird viermal mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und viermal mit Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird der Essigester i. Vak. verdampft und das Produkt mittels Säulen-

chromatographie (Kieselgel 60, Eluent: Essigester/Dichlormethan im Verhältnis 1:9 bis 2:9) gereinigt.

### **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Ψ[CS-NH]-ANA**

#### **A) Fmoc-Orn-ANA**

**Fmoc-Orn(Boc)-ANA** wurde wie oben beschrieben synthetisiert und „wie üblich“ aufgearbeitet.

Nach der azidolytischen Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppe mittels Trifluoressigsäure wurde das Aminosäurederivat **Fmoc-Orn-ANA\*2TFA** durch Zugabe von Diisopropylether gefällt und direkt für die folgenden Syntheseschritte verwendet.

#### **B) Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Ψ[CS-NH]-ANA**

7,5 mmol **Fmoc-Orn-ANA\*2TFA** werden in 10 ml eines Acetonitril/Wasser-Gemischs (66 % ACN) gelöst und über einen Zeitraum von 1 h zu einer Lösung von zwei Äquivalenten *N*-Ethyldiisopropylamin und einem Äquivalent *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol in 20 ml 66 %-igem Acetonitril getropft. Nach Beendigung der Reaktion (HPLC, DC) wird das Lösungsmittel i. Vak. verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und der Ansatz „wie üblich“ aufgearbeitet. **Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-ANA** wird in 100 ml trockenem THF gelöst, mit 7,5 mMol P<sub>4</sub>S<sub>10</sub> versetzt, 1h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend „wie üblich“ aufgearbeitet.

#### **Fmoc-His(Boc)-Ψ[CS-NH]-ANA**

Die Synthese von **Fmoc-His(Boc)-Ψ[CS-NH]-ANA** erfolgte wie oben beschrieben, jedoch unter Verwendung von Diphenylphosphinsäurechlorid als Aktivierungsreagenz.

### ***N*<sup>α</sup>-Fmoc-geschützte Aminothioxocarbonsäure-6-nitrobenzotriazole**

#### **Fmoc-Xaa-Ψ[CS-N]-NBt**

10 mmol **Fmoc-Xaa-Ψ[CS-NH]-ANA** werden in 50 ml 95 % Essigsäure gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 5 min werden unter Rühren 15 mmol NaNO<sub>2</sub> zum Reaktionsansatz gegeben. Nach 30 min wird der Ansatz auf Eis geschüttet, das

ausgefallene Produkt abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen. Das feuchte Produkt wird eingefroren und anschließend lyophilisiert. Man erhält das gewünschte Nitrobenzotriazolid in Form eines orangen Pulvers.

Die so hergestellten Thioxoacylierungsbausteine sind bei -20 °C gelagert über mehrere Monate stabil und können direkt für die Synthese thioxylierter Oligopeptide verwendet werden.

Die analytischen Daten der Zwischen- und Endprodukte und die erzielten Ausbeuten sind in der **Tabelle 15** (Seite 131-132) zusammengefasst.

### **Durchführung der Festphasensynthese**

Die Synthese thioxylierter S-Peptide erfolgte mit Hilfe des Peptid Synthesizers Syro II (MultiSynTech, Germany). Die Peptide wurden dabei unter Verwendung der Fmoc-Strategie am SASRIN<sup>®</sup>- Harz synthetisiert.

Folgende Aminosäurederivate kamen zum Einsatz:

**Fmoc-Xaa-OH** mit **Xaa: Ala, Arg(Boc)<sub>2</sub>, Asp(OtBu), Gln(Dod), Gln(Tmob), Glu(OtBu), His(Boc), Lys(Boc), Nle, Phe, Ser(tBu), Thr(tBu).**

Der schrittweise Aufbau der Peptide erfolgte unter Verwendung des folgenden Synthesesyklus:

1. Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe zunächst mittels 20%-igem Piperidin in DMF, beginnend mit der Position der thioxylierten Aminosäure mittels 0,7 % Piperidin/1 % HOBT/DMF (v/w/v)
2. waschen mit DMF (6 mal)
3. Knüpfung der Peptidbindung (Kupplungsschritt)
4. Wiederholung von Schritt 3
5. Waschen mit DMF (6 mal)

Das Aminosäurederivat **Fmoc-Xaa-OH** und das Kupplungsreagenz PyBOP<sup>®</sup> wurden während des Kupplungsschritts in vierfachem, die Base *N*-Methylmorpholin in achtfachem Überschuss eingesetzt. Die Thioxoacylierung erfolgte nicht in DMF sondern in Dichlormethan, da die *N*<sup>α</sup>-Fmoc-geschützten Thioxoaminosäure-6-nitrobenzotriazolide in DMF keine ausreichende Stabilität besitzen. Zu diesem Zweck wurden 4 Äquivalente des Nitrobenzotriazolids in möglichst wenig DCM gelöst und anschließend zum Harz gegeben. Beginnend mit der Position der thioxylierten Aminosäure erfolgte die Abspaltung der Fmoc-



**Bestimmung von Assoziationskonstanten  $K_{Ass}$  für die Bildung der [ThioxoPhe<sup>8</sup>]-, [ThioxoHis<sup>12</sup>]- bzw. [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S unter Verwendung enzymkinetischer Messungen**

Die Messungen wurden, wie die ITC-Experimente, bei 25 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6; 0,1 M NaCl) durchgeführt. Das entsprechende Derivat der RNase S wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge des thioxylierten S-Peptids zum Reaktionsansatz, in dem bereits das S-Protein (Endkonzentration: 2µM) vorhanden war, erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Messung durch Substratzugabe (Endkonzentration: 0,2 mM für das [ThioxoAla<sup>4</sup>]- und [ThioxoPhe<sup>8</sup>]-S-Peptid bzw. 0,5 mM für das [ThioxoHis<sup>12</sup>]-S-Peptid) gestartet und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 290$  nm spektroskopisch verfolgt. Die Gleichgewichtskonzentration der RNase S wurde mit Hilfe der Anfangsanstiege der erhaltenen Messkurven ermittelt. Dabei entspricht der Maximalanstieg einer Konzentration der RNase S von 2 µM. Die Bestimmung der Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 5.0 aus der erhaltenen Titrationskurve.

Für die Dissoziationskonstante  $K_D$  gilt:

$$K_D = \frac{[\text{S - Peptid}] * [\text{S - Protein}]}{[\text{RNase S}]} \quad \text{Gleichung 9}$$

Ersetzt man die Gleichgewichtskonzentrationen des S-Peptids und des S-Proteins durch die Differenz aus der Ausgangskonzentration und der Konzentration der enzymatisch aktiven RNase S, so erhält man **Gleichung 10**.

$$K_D = \frac{([\text{S - Peptid}]^0 - [\text{RNase S}]) * ([\text{S - Protein}]^0 - [\text{RNase S}])}{[\text{RNase S}]} \quad \text{Gleichung 10}$$

Durch Analyse der Titrationskurve mittels nichtlinearer Regression entsprechend **Gleichung 11** erhält man die Dissoziationskonstante  $K_D$ . Diese lässt sich mit Hilfe der **Gleichung 12** in die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  umrechnen.

$$[\text{RNase S}] = \frac{[\text{S - Peptid}]^0 + [\text{S - Protein}]^0 + K_D}{2} \quad \text{Gleichung 11}$$

$$\sqrt{\left( \frac{[\text{S - Peptid}]^0 + [\text{S - Protein}]^0 + K_D}{2} \right)^2 - [\text{S - Peptid}]^0 * [\text{S - Protein}]^0}$$

$$K_{Ass} = \frac{1}{K_D}$$

Gleichung 12

### 5. 1. 3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Bestimmung der thermodynamischen Konstanten der S-Peptid/S-Protein-Interaktion erfolgte mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie unter Verwendung eines ITC-VP Mikrokalorimeters von MicroCal. Alle Experimente wurden bei 25 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6; 0,1 M NaCl) durchgeführt. Lösungen des S-Proteins und des entsprechenden S-Peptids wurden zuvor gegen den angegebenen Puffer dialysiert und die Konzentration spektrophotometrisch (Abschnitt 5. 1. 2) bestimmt. Die S-Peptid-Lösung wurde in die 250 µl Spritze des Kalorimeters überführt. Die Referenzzelle des Kalorimeters wurde mit Wasser, die Messzelle mit der S-Protein-Lösung gefüllt. Nach einer bestimmten Equilibrierungszeit zur Stabilisierung der Basislinie erfolgte die Titration. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 µl der S-Peptid-Lösung (Injektionsdauer 20 s) zur S-Protein-Lösung titriert. Als Equilibrierungszeit zwischen zwei Injektionen wurden 6,6 min gewählt. Darüber hinaus wurden sowohl der Puffer in die S-Protein-Lösung als auch die S-Peptid-Lösung in den Puffer injiziert. Die bei diesen Kontrollexperimenten beobachteten Verdünnungswärmen wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Die Bestimmung der thermodynamischen Konstanten  $\Delta H$ ,  $K_{Ass}$  und des stöchiometrischen Faktors N erfolgte aus der erhaltenen Titrationskurve unter Verwendung des Analyseprogramms ORIGIN von MicroCal nach einem Einseitenbindungsmodell. Die Konstanten  $\Delta G$  und  $T\Delta S$  wurden mit Hilfe der Gleichungen  $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_{Ass}$  und  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  berechnet.

### 5. 1. 4 Photoinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids

UV-Licht der entsprechenden Wellenlänge wurde mit Hilfe einer Quecksilberdampf Lampe in Verbindung mit einem Monochromator erhalten. Das [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl; pH 6) gelöst und mit UV-Licht bei 10 °C bis zum Erreichen des photostationären Zustands bestrahlt. Dabei wurde immer das Gesamtvolumen der Thioxopeptidlösung bestrahlt. UV-Spektren wurden mit Hilfe eines PERKIN-ELMER



UV/Vis-Zweistrahlenspektrometers und CD-Spektren mit Hilfe eines Jasco-710 Spectropolarimeters erhalten.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der *cis/trans*-Isomerisierung  $k_{c/t}$  wurde die Dunkelreaktion nach der Bestrahlung UV-spektroskopisch bei 287 nm verfolgt. Die Bestimmung von  $k_{c/t}$  erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse aus der erhaltenen Messkurve. Die Aktivierungsparameter  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  wurden mit Hilfe der Eyring-Auftragung (**Gleichung 13**) aus der Temperaturabhängigkeit von  $k_{c/t}$  erhalten.

$$\ln \frac{k_{c/t}}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} * \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \text{Gleichung 13}$$

Dabei entspricht  $k_B$  der Boltzmann Konstante ( $1,38066 * 10^{-23} * \text{J} * \text{K}^{-1}$ ) und  $h$  dem Planckschen Wirkungsquantum ( $6,62618 * 10^{-34} * \text{J} * \text{s}$ ).

### 5. 1. 5 Einfluss der photoinduzierten *cis/trans*-Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla<sup>4</sup>]-RNase S

Die Messungen erfolgten bei 10 °C in 50 mM Natriumacetatpuffer (0,1 M NaCl; pH 6) unter Verwendung des Substrats 2',3'-cCMP (0,1 mM). Dabei wurde das Substrat erst unmittelbar vor Zugabe des [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptids in den Messansatz gegeben. Die [ThioxoAla<sup>4</sup>]-S-Peptid- Lösung (37,4 µM) wurde 5 min mit UV-Licht (260 nm; Bestrahlungsstärke: 32 µJ \* cm<sup>-2</sup> \* s<sup>-1</sup>) bei 10 °C bestrahlt und anschließend zum Messansatz, der das S-Protein in der entsprechenden Konzentration und das Substrat enthielt, gegeben. Die Reaktion wurde bei 290 nm spektroskopisch verfolgt.

## 5.2

## Pin1-spezifische Inhibitoren

### 5.2.1

### Synthesen

#### Vorbemerkungen:

Dibenzyl-diisopropyl-phosphoramidit, *N*-Methylanilin-trifluoracetat, *tert*-Butyl-hydroperoxid and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> wurden von Aldrich, Sigma oder Fluka bezogen. Alle verwendeten Fmoc-geschützten Aminosäurederivate mit Ausnahme des Fmoc-D-Thr(PO(OBzl)OH)-OH sind kommerziell erhältlich (Bachem, Advanced Chemtech, NovaBiochem, Fluka, Senn Chemicals AG). *N*<sup>α</sup>-Fmoc-geschützte Derivate trifunktioneller Aminosäuren kamen unter Verwendung folgender Seitenkettenschutzgruppen zum Einsatz: Gln(Trt), Thr(OtBu), D-Thr(OtBu), D-Thr(Trt), Thr(PO(OBzl)OH) and D-Thr(PO(OBzl)OH). Peptidsynthesen erfolgten an Whatman 540 Cellulosemembranen bzw. am Rink Amid MBHA Harz (NovaBiochem) unter Verwendung von PyBOP/HOBT (NovaBiochem) oder HATU/HOAT (Perseptive Biosystems) als Kupplungsreagenzien.

#### Synthese der Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide

Die Bibliothek wurde durch automatisierte Spotsynthese unter Verwendung eines Auto-Spot Robot ASP 222 Synthesizers (Gilson) mit Hilfe eines Standardsyntheseprotokolls erhalten (330-332). Die Verankerung der Phosphopeptide an der Cellulosemembran erfolgte, indem im ersten Syntheseschritt das in der Seitenkette ungeschützte Aminosäurederivat Fmoc-Glu-OtBu verwendet wurde. Dabei führt die Reaktion der Carboxylgruppe der Seitenkette des Glutaminsäurederivats mit der freien Aminogruppe des β-Alanyl-β-Alanin-Linkers der Cellulosemembran zur Ausbildung einer sekundären Amidbindung. Die finale Deblockierung der Cellulose-gebundenen Phosphopeptide erfolgte mittels 90 % TFA/1 % H<sub>2</sub>O/ 9 % DCM (2 h).

#### Synthese löslicher Peptide

Die löslichen Peptide wurden mittels Fmoc-Strategie unter Verwendung eines Standardprotokolls der Festphasenpeptidsynthese erhalten. Die Aktivierung der geschützten Thr und D-Thr-Derivate (einschließlich der phosphorylierten Derivate) erfolgte mittels HATU/HOAT.

Fmoc-D-Thr(PO(OBzl)OH)-OH wurde entsprechend der Methode von Vorher & Bannwarth synthetisiert (333). Die finale Deblockierung und Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte mittels 94,5 % TFA/2,5 % H<sub>2</sub>O/2,5 % EDT/1 % TIS. Die Reinigung der Peptide wurde mittels präparativer HPLC (5. 1. 1) und die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Die analytischen Daten der wichtigsten Peptide sind in **Tabelle 16** (Seite 133) aufgeführt.

### 5. 2. 2 **Suche nach hochaffinen Pin1-Liganden durch Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide**

Vor dem Screening wurde die Bibliothek Cellulose- gebundener Phosphopeptide zunächst zweimal (je 10 min) mit Methanol und danach viermal mit Bindungspuffer A (25 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 7,2 mM KCl, 2 % Glycerol, 1 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurde die Bibliothek 1h bei 4 °C mit der rekombinaten PPIase-Domäne des *hPin1* (40 nM in Bindungspuffer A) inkubiert. Nach vier Waschschritten bei 4 °C in Bindungspuffer A wurde die spezifisch an Phosphopeptide der Bibliothek gebundene PPIase-Domäne durch ElektrobloTTing (“semi dry“- Verfahren) unter Verwendung eines Tris/HCl-Transferpuffers (75 mM, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 3 % BSA) bei 96 mA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Detektiert wurde das Protein mit Hilfe eines Antiserums (Kaninchen), das spezifisch die PPIase-Domäne des *hPin1* erkennt (primärer Antikörper). Als sekundärer Antikörper kam ein Kaninchen-spezifisches Antiserum (Ziege), welches POD-konjugierte Antikörper enthält, zum Einsatz. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des SuperSignal<sup>®</sup>-Substrats von Pierce.

### 5. 2. 3 **PPIase-Tests**

Proteinkonzentrationen wurden bei 280 nm unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten 21030 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup> für *hPin1*, 6979 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup> für die PPIase-Domäne des *hPin1*, 21030 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup> für *XPin1* und 8250 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup> für *hPar14* bzw. *hCyp18* bestimmt. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des Programms ProtParam Tool von ExpASy (erhältlich unter: <http://www.expasy.org/>). Alle Messungen erfolgten bei 10 °C in Hepes-Puffer (35 mM, pH 7,8).

### Protease-freier Test

Die Messung der kinetischen Konstanten erfolgte mit Hilfe eines Hitachi F-3010 Fluoreszenzspektrometers unter Verwendung des Substrats H-Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-NH-Np (**313**). Das Substrat (12 mM) wurde in wasserfreiem Trifluorethanol/0,55 M LiCl gelöst und die Messung nach Zugabe der Substratstammlösung (Endkonzentration: 10  $\mu$ M) zu einer vorinkubierten (15 min) Mischung, bestehend aus der PPIase (8,8 nM *hPin1* bzw. 7,1 nM *XPin1*) und dem entsprechenden inhibitorischen Phosphopeptid, gestartet. Die Anregung erfolgte bei 320 nm (Bandweite: 3 nm). Die Fluoreszenzemission wurde bei 420 nm (Bandweite: 10 nm) detektiert.

### Protease-gekoppelter Test

Die Messungen erfolgten entsprechend Fischer et al. (**9**) und Zhang et al. (**313**) mit Hilfe eines Hewlett-Packard 8452A Dioden-Array Spektrophotometers. Die PPIase-Aktivität des *hPar14* wurde unter Verwendung des Substrats Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-NH-Np (Konz. i. A. 75  $\mu$ M) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (Konz. i. A. 60  $\mu$ M) als isomerspezifische Protease gemessen. PPIase-Aktivitäten des *hCyp18* und FKBP12 wurden mit Hilfe des Substrats Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np (Konz. i. A. 16  $\mu$ M) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (Konz. i. A. 60  $\mu$ M) als isomerspezifische Protease bestimmt. Messungen der PPIase-Aktivität des *hPin1* erfolgten unter Verwendung des Substrats Ac-Ala-Ala-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Arg-NH-Np (Konz. i. A. 10  $\mu$ M) und Trypsin (Konz. i. A. 60  $\mu$ M) als isomerspezifische Protease. Die Konzentrationen der PPIasen im Messansatz betragen 1,7  $\mu$ M für *hPar14*, 4 nM für *hPin1*, 7 nM für FKBP12 und 9,7 nM für *hCyp18*. Entsprechende Konzentrationen des **Peptids 16** oder **17** bzw. des unphosphorylierten Derivats von **Peptid 17** wurden 15 min mit der entsprechenden PPIase inkubiert und die Messung anschließend durch Zugabe des Substrats und der Protease gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde bei 390 nm verfolgt.

Die Auswertung (Berechnung von  $k_{obs}$ ) erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung des Programms SigmaPlot 5.0 (Jandel) aus der entsprechenden Progresskurve einer Messung. Dabei entspricht  $k_0$  einer Geschwindigkeitskonstanten, die für eine Messung in Abwesenheit der entsprechenden PPIase ermittelt wurde. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{enz}$  erfolgte mit Hilfe der Gleichung  $k_{enz} = k_{obs} - k_0$ .  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte wurden durch Auftragung von  $k_{enz}$  gegen die Konzentration des entsprechenden

inhibitorischen Peptids mittels nichtlinearer Regression nach Schutkowski et al. (334) bzw. unter Verwendung eines Modells für "tight binding"- Inhibitoren (335) ermittelt.

#### 5. 2. 4 "Far-Western-Blot"-Analysen zum Nachweis der selektiven Bindung von Peptid 15 durch die PPIase-Domäne des *hPin1*

Die verschiedenen Varianten des GST-*hPin1* sowie die GST-fusionierte WW- bzw. PPIase-Domäne des *hPin1*, wurden entsprechend Ranganathan et al. bzw. Zhou et al. erhalten (10, 311). Die angegebene Menge des entsprechenden Proteins wurde auf eine Nitrocellulosemembranen gespottet und die Membranen anschließend für 1h bei 4 °C in Bindungspuffer A, der zusätzlich 5 % Milchpulver enthielt, inkubiert (Blockierung auf der Membran verbliebener Bindungsstellen). Nach mehrmaligem Waschen der Membranen (Bindungspuffer A) wurden diese in einer 1 µM Lösung des **Peptids 15** bzw. einer 50 µM Lösung des unphosphorylierten Derivats in Bindungspuffer A inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in Bindungspuffer A, erfolgte der Nachweis des spezifisch an das entsprechende Protein gebundenen **Peptids 15** mit Hilfe des POD-konjugierten Streptavidins (Chemilumineszenzreaktion, SuperSignal®-Substrat von Pierce).

Zur Analyse der Bindung von **Peptid 15** durch verschiedene Varianten des GST-*hPin1*, wurden verschiedene Mengen des Peptids auf Nitrocellulosemembranen gespottet. Nach dem blockieren der noch freien Bindungsstellen auf der Membran und anschließendem Waschen (siehe oben), wurden die Membranen mit der entsprechenden Variante des GST-*hPin1* (40 nM, Bindungspuffer A, 1 h, 4 °C) inkubiert. Der Nachweis des spezifisch an **Peptid 15** gebundenen Proteins erfolgte wie unter 5. 2. 2 beschrieben.

#### 5. 2. 5 Charakterisierung der Peptid 17/*hPin1*-Interaktion mittels ITC

Die ITC-Messungen wurden in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7,8) bei 10 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration in der Messzelle betrug 6,5 µM (1,4 ml). Die Injektionsspritze des Kalorimeters wurde mit 300 µl einer 250 µM Lösung des Peptid 15 gefüllt. Die Messungen und die Auswertung erfolgte wie unter 5. 1. 3 beschrieben.

### 5. 2. 6 Analyse der Stabilität von Peptid 17 mittels Kapillarelektrophorese

**Peptid 17** wurde zunächst 3 h in HeLa-Zellysat inkubiert. Analysen erfolgten anschließend mit Hilfe eines P/ACE MDQ Kapillarelektrophoresesystems (Beckman Coulter, Palo Alto, CA) unter Verwendung einer 40 cm Kapillare (50  $\mu$ M, „fused silica“) bei 20 kV. Als Referenzen wurden das unbehandelte **Peptid 17** und das unphosphorylierte Derivat verwendet. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch bei 3,45 kPa (10 s). Alle Analysen wurden mit Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) als Trennpuffer bei 16 °C durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

### 5. 2. 7 Zellkultur und Gewinnung von HeLa-Zell- und *X. laevis* Embryo-Lysat

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GicoBRL), das mit 10 % fötalem Kälberserum versetzt war (37 °C, Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>). Mitotische Zellen konnten, 12 h nachdem einer HeLa-Zellkultur 0,1  $\mu$ g/ml Nocodazol zugesetzt wurde, geerntet werden. Die Gewinnung von Zellysaten erfolgte bei 4 °C durch Zugabe von Lysispuffer (25 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 7,2 mM KCl, 0,5 % NP-40, 2 % Glycerol, 1 mM DTT) zu den geernteten Zellen bzw. Embryonen und anschließender Ultraschallbehandlung und Zentrifugation bei 13000 U/min. Je nach Experiment erfolgte die Herstellung der Lysate in Abwesenheit oder in Gegenwart von Phosphatase- (10 mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,5  $\mu$ M Okadasäure) und Proteaseinhibitoren (1 mM EDTA, 1mM EGTA und Proteaseinhibitor-Mixtur von Roche).

### 5. 2. 8 Nachweis der Bindung von Peptid 16 durch authentisches Pin1 aus *X. laevis* Embryonen (*XIPin1*) und HeLa-Zellen (*hPin1*)

**Peptid 16** wurde 1 h bei 4 °C in HeLa-Zell- bzw. *X. laevis* Embryolysat inkubiert. Die Extraktion der **Peptid 16**/Pin1- Komplexe aus der erhaltenen Mischung erfolgte anschließend mit Hilfe von Streptavidin-Sepharose. Nach dreimaligem Waschen mit Lysispuffer wurde die Streptavidin-Sepharose in SDS-Lauf-Puffer überführt und auf 95 °C erhitzt. Der Nachweis des mit **Peptid 16** coextrahierten *hPin1* bzw. *XIPin1* erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Western-Blot-Analyse. Die Proteine wurden wie unter 5. 2. 2 beschrieben detektiert.

### 5. 2. 9

### **Einfluss von Peptid 17 auf die Interaktion zwischen MPM-2- Antigenen und *hPin1***

**Peptid 17** bzw. dessen unphosphoryliertes Derivat (jeweils 1,3 mM) wurden 2 h bei 4 °C in einer 8 µM Lösung des GST-*hPin1* in Lysispuffer inkubiert. Nach Zugabe von Zellysat, das aus mitotischen HeLa-Zellen gewonnen wurde, wurde die Mischung eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Glutathion-Sepharose versetzt. Nach einstündiger Inkubation der Mischung bei 4 °C wurde die Glutathion-Sepharose dreimal mit Lysispuffer gewaschen und nach Zugabe von SDS-Probenpuffer auf 95 °C erwärmt. Der Nachweis des mittels Glutathion-Sepharose extrahierten GST-*hPin1* und der coprezipitierten MPM-2-Antigene erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse. Die Detektion der Proteine wurde unter Verwendung des monoklonalen MPM-2- Antikörpers (primärer Antikörper, Maus) bzw. mittels eines für die PPIase-Domäne des *hPin1* spezifischen Antiserums (Kaninchen) durchgeführt. Als sekundäre Antikörper kamen Maus- bzw. Kaninchen-spezifische POD-konjugierte Antikörper zum Einsatz. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung des SuperSignal<sup>®</sup>-Substrats von Pierce.

### 5. 2. 10 Mutagenese, Klonierung und Überexpression rekombinanter Proteine

Punktmutanten des V5-*hPin1* wurden unter Verwendung des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenese Kits (Stratagene) und V5-*hPin1* in pcDNA 3.1/GS (Invitrogen) als Template generiert. GST-*hPin1* und die entsprechenden Varianten wurden nach Zhou et al. (10) konstruiert. Das *XPin1*-Gen wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von *X. laevis* mRNA und spezifischen Oligonukleotiden als Primer (5'-CGCGGATCCATGGCGGACGAGGAGAAGC-3' and 5'-CGCCTCGAGTCACTCAGTG CGGAGG-3') amplifiziert. Die Amplifikation des Genabschnitts, der die PPIase-Domäne des *hPin1* codiert (Gly45-Glu163), erfolgte durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotidprimer 5'-CTCTCCATGGGCAAAAACGGGCAGG-3' und 5'-CCGAAGCTTGACTCAGTGCGGAGGATG-3') und DNA des (His)<sub>6</sub>*hPin1* als Template (259). Die Genfragmente des *XPin1* und der PPIase-Domäne des *hPin1* wurden anschließend in die Vektoren pGEX-4T-1 (Amersham-Pharmacia) bzw. pET28a (Novagen) kloniert. Zur Überexpression des rekombinanten GST-*XPin1* und der PPIase-Domäne des *hPin1* wurden die Vektoren anschließend in die *E.coli*-Stämme JM109 und BL21(DE3) transformiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellkultur durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Reinigung des rekombinanten GST-*XPin1* und die anschließende Abspaltung des GST

erfolgten unter Verwendung von Glutathion-Sepharose4B bzw. Thrombin als Protease. Die rekombinante PPIase-Domäne des *hPin1* wurde mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (Novagen) entsprechend den Angaben des Herstellers gereinigt.

### 5. 2. 11 Mikroiinjektion und Fluoreszenzfärbung

Die Gewinnung der mRNA der verschiedenen Varianten des V5-*hPin1* erfolgte mit Hilfe der entsprechenden cDNA (pcDNA 3.1/GS, Invitrogen) als Template unter Verwendung des mMESSAGING mMACHINE™ T7 Kit von Ambion.

Für die Microinjektion wurde die entsprechende mRNA in DEPC- behandeltem Wasser gelöst. Peptide wurden in PBS-Puffer gelöst. Die Injektion erfolgte in den animalen Pol von *X. laevis* Embryonen, die sich im Stadium 2 der Embryonalentwicklung befanden. Das injizierte Volumen betrug jeweils 10 nl.

Fluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten der *X. laevis* Embryonen erfolgten im Stadium 8 der Embryonalentwicklung. Dem entsprechend wurden 10 µm Kryoschnitte angefertigt und zur Detektion des *XIPin1* unter Verwendung eines monoklonalen *hPin1*-spezifischen Antikörpers (Maus) und Alexa Flour546™-konjugierten sekundären Antikörpers (Ziege) gefärbt. Die Detektion des **Peptids 16** erfolgte mit Hilfe des Oregon Green™ 488-konjugierten NeutrAvidin-Biotin- bindenden Proteins. Zellkerne wurden unter Verwendung von DAPI gefärbt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe eines Axioplan Epifluoreszenzmikroskops unter Verwendung von Fluoreszin- und Cy3- selektiven Filtern und einer 768 x 576 CCD Kamera (Sony Corp., Tokyo, Japan). Die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Adobe Photoshop durchgeführt.



## 6.

## Analytische Daten

Tabelle 15: Analytische Daten zur Synthese der Thiooxacylierungsbausteine **Fmoc-Xaa-Ψ[CS-N]-NBt**

$X_{AA}$	<b>Fmoc-Xaa- ANA</b>	<b>Fmoc-Xaa-Ψ[CS-NH]-ANA</b>	<b>Fmoc-Xaa-Ψ[CS-N]-NBt</b>	<b>Fmoc-Xaa-Ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np</b>
Ala	Mm: 446,2 g/mol $t_R$ : 14,33 min	Mm: 462,2 g/mol $t_R$ : 15,67 min	Mm: 473,2 g/mol $t_R$ : 18,36 min Ausbeute: 49,6%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 595,23 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 595,1 g/mol $t_R$ : 20,15 min
Arg(Boc) <sub>2</sub>	Mm: 731,5 g/mol $t_R$ : 20,48 min	Mm: 747,5 g/mol $t_R$ : 21,77 min	Mm: 758,5 g/mol $t_R$ : 23,79 min Ausbeute: 17,3%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 880,39 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 880,5 g/mol $t_R$ : 23,95 min
Asp(OtBu)	Mm: 446,3 g/mol $t_R$ : 17,80 min	Mm: 562,3 g/mol $t_R$ : 18,86 min	Mm: 573,3 g/mol $t_R$ : 20,71 min Ausbeute: 22%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 695,25 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 695,1 g/mol $t_R$ : 22,16 min
Glu(OtBu)	Mm: 560,3 g/mol $t_R$ : 17,85 min	Mm: 576,3 g/mol $t_R$ : 19,42 min	Mm: 587,3 g/mol $t_R$ : 20,87 min Ausbeute: 29,3%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 709,23 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 709,60 g/mol $t_R$ : 21,94 min
Gly	Mm: 432,2 g/mol $t_R$ : 14,495min	Mm: 448,2 g/mol $t_R$ : 15,894min	Mm: 459,2 g/mol $t_R$ : 17,58 min Ausbeute: 26%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 581,22 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 581,39 g/mol $t_R$ : 19,03 min
His(Boc)	Mm: 612,4 g/mol $t_R$ : 15,22 min	Mm: 628,4 g/mol $t_R$ : 18,80 min	Mm: 639,4 g/mol $t_R$ : 20,09 min Ausbeute: 28%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 761,30 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 761,3 g/mol $t_R$ : 21,71 min
Ile	Mm: 488,3 g/mol $t_R$ : 17,07 min	Mm: 504,3 g/mol $t_R$ : 19,76 min	Mm: 515,3 g/mol $t_R$ : 21,66 min Ausbeute: 55%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 637,27 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 637,2 g/mol $t_R$ : 23,11 min
Lys (Boc)	Mm: 603,4 g/mol $t_R$ : 17,41 min	Mm: 619,4 g/mol $t_R$ : 18,80 min	Mm: 630,4 g/mol $t_R$ : 20,15 min Ausbeute: 26%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 752,33 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 752,40 g/mol $t_R$ : 21,87 min
Nle	Mm: 488,3 g/mol $t_R$ : 16,2 min	Mm: 504,3 g/mol $t_R$ : 18,75 min	Mm: 515,3 g/mol $t_R$ : 20,71 min Ausbeute: 83%	$[M+H^+]_{berechnet}$ : 637,25 g/mol $[M+H^+]_{gefunden}$ : 637,60 g/mol $t_R$ : 21,88 min

$X_{AA}$	<b>Fmoc-Xaa-ANA</b>	<b>Fmoc-Xaa-<math>\Psi</math>[CS-NH]-ANA</b>	<b>Fmoc-Xaa-<math>\Psi</math>[CS-N]-NBt</b>	<b>Fmoc-Xaa-<math>\Psi</math>[CS-NH]-Phe-NH-Np</b>
Orn(Boc)	Mm: 589,4 g/mol $t_R$ : 17,57 min	/	/	/
Phe	Mm: 522,3 g/mol $t_R$ : 17,57 min	Mm: 538,3 g/mol $t_R$ : 18,75 min	Mm: 549,3 g/mol $t_R$ : 20,71 min Ausbeute: 58,2%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 671,26 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 671,26 g/mol $t_R$ : 21,88 min
Pro	Mm: 472,2 g/mol $t_R$ : 15,56 min	Mm: 488,2 g/mol $t_R$ : 17,96 min	Mm: 499,2 g/mol $t_R$ : 19,08 min Ausbeute: 41,1%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 621,26 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 621,40 g/mol $t_R$ : 21,21 min
Ser (OtBu)	Mm: 518,3 g/mol $t_R$ : 17,24 min	Mm: 534,3 g/mol $t_R$ : 18,97 min	Mm: 545,3 g/mol $t_R$ : 20,65 min Ausbeute: 46,3%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 667,29 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 667,2 g/mol $t_R$ : 22,82 min
Thr (OtBu)	Mm: 532,3 g/mol $t_R$ : 18,75 min	Mm: 548,3 g/mol $t_R$ : 20,04 min	Mm: 559,3 g/mol $t_R$ : 22,22 min Ausbeute: 51,4%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 681,31 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 681,2 g/mol $t_R$ : 23,51 min
Trp (Boc)	Mm: 661,4 g/mol $t_R$ : 20,371 min	Mm: 677,4 g/mol $t_R$ : 21,99 min	Mm: 688,4 g/mol $t_R$ : 22,89 min Ausbeute: 44,6%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 810,33 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 810,1 g/mol $t_R$ : 24,01 min
Tyr (tBu)	Mm: 594,4 g/mol $t_R$ : 18,92 min	Mm: 610,4 g/mol $t_R$ : 20,26 min	Mm: 621,4 g/mol $t_R$ : 22,16 min Ausbeute: 64,5%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 743,48 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 743,1 g/mol $t_R$ : 23,11 min
Val	Mm: 474,3 g/mol $t_R$ : 16,79 min	Mm: 490,3 g/mol $t_R$ : 18,92 min	Mm: 501,3 g/mol $t_R$ : 20,763 min Ausbeute: 41,5%	$[M+H]^+$ <sub>berechnet</sub> : 623,27 g/mol $[M+H]^+$ <sub>gefunden</sub> : 623,3 g/mol $t_R$ : 21,49 min

Die HPLC-Retentionszeiten  $t_R$  wurden mit Hilfe einer HPLC-Anlage der Firma SYKAM unter Verwendung einer RP 8 Säule von Merck (120×4 mm, LiChrospher 100, 5  $\mu$ m) mittels Gradientenelution (Wasser/ACN jeweils mit 0,05% TFA, 20-100% ACN in 30 min) erhalten. Angegeben sind nur die Ausbeuten der Verbindungen **Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-N]-NBt** (bezogen auf den Ausgangsstoff **Fmoc-Xaa-OH**), da die Zwischenprodukte nicht isoliert wurden. Die erhaltenen Nitrobenzotriazolide wurden anschließend durch Reaktion mit **H-Phe-NH-Np** bezüglich ihrer Reaktionsfähigkeit untersucht und das Reaktionsprodukt **Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np** an Hand des Massenspektrums identifiziert.

**Tabelle 16: HPLC-analytische und massenspektrometrische Charakterisierung der thioxylierten S-Peptide**

S-Peptid	HPLC- Retentionszeit	Masse M berechnet	Masse M+H <sup>+</sup> gemessen	Ausbeute
[ThioxoLys <sup>1</sup> ]-S-Peptid	18,81 min	2163,038	2164,3	10%
[ThioxoGlu <sup>2</sup> ]-S-Peptid	18,84 min	2163,038	2164,1	8%
[ThioxoThr <sup>3</sup> ]-S-Peptid	18,78 min	2163,038	2164,7	5%
[ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptid	18,86 min	2163,038	2164,6	11%
[ThioxoAla <sup>5</sup> ]-S-Peptid	18,87 min	2163,038	2163,8	9%
[ThioxoAla <sup>6</sup> ]-S-Peptid	18,84 min	2163,038	2164,1	6%
[ThioxoLys <sup>7</sup> ]-S-Peptid	18,80 min	2163,038	2163,8	7%
[ThioxoPhe <sup>8</sup> ]-S-Peptid	18,82 min	2163,038	2164,1	7%
[ThioxoGlu <sup>9</sup> ]-S-Peptid	18,84 min	2163,038	2164,3	11%
[ThioxoArg <sup>10</sup> ]-S-Peptid	18,85 min	2163,038	2163,8	10%
[ThioxoHis <sup>12</sup> ]-S-Peptid	18,85 min	2163,038	2164,3	5%
[ThioxoNle <sup>13</sup> ]-S-Peptid	18,86 min	2163,038	2163,7	10%
[ThioxoAsp <sup>14</sup> ]-S-Peptid	18,79 min	2163,038	2164,1	9%
[ThioxoSer <sup>15</sup> ]-S-Peptid	18,83 min	2163,038	2164,4	8%
Oxo-S-Peptid	18,85 min	2147,061	2148,4	45%

Die HPLC-Retentionszeiten  $t_R$  wurden mit Hilfe einer HPLC-Anlage der Firma SYKAM unter Verwendung einer RP 8 Säule (Merck 120×4 mm, LiChrospher 100, 5µm) mittels Gradientenelution (Wasser/ACN jeweils mit 0,05% TFA, 5-35% ACN in 30min) erhalten. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die maximal mögliche Peptidmenge, die durch die Beladung des polymeren Trägers bestimmt wird. Die berechnete Masse M entspricht der Monoisotopenmasse. Die weitere Charakterisierung und Reinheitskontrolle der Peptide erfolgte mit Hilfe der Sequenzanalyse (Seite 46).

**Tabelle 17: HPLC-analytische und massenspektrometrische Charakterisierung**

Peptid	HPLC-Retentionszeit (min)	Massenspektrometrie	Molekulargewicht (g/mol)
Ac-Lys( <i>N</i> <sup>c</sup> -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-Thr-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	13,6	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 1296,5 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 1296,6	1296,6
Ac-Lys( <i>N</i> <sup>c</sup> -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	11,5	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 1376,5 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 1376,6	1376,6
Ac-Lys( <i>N</i> <sup>c</sup> -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-D-Thr-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	13,3	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 1296,5 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 1296,6	1296,6
Ac-Lys( <i>N</i> <sup>c</sup> -Biotinoyl)-Ala-Ala-Bth-D-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	11,1	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 1376,9 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 1376,6	1376,6
Ac-Phe-D-Thr-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	12,8	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 744,4 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 744,4	743,9
Ac-Phe-D-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pip-Nal-Gln-NH <sub>2</sub>	11,6	[M+H] <sup>+</sup> gefunden: 824,5 [M+H] <sup>+</sup> berechnet: 824,3	823,8

Die HPLC-Retentionszeiten wurden mit Hilfe einer HPLC-Anlage der Firma SYKAM unter Verwendung einer RP 8 Säule (Merck 120 × 4 mm, LiChrospher 100, 5µm) mittels Gradientenelution (Wasser/ACN jeweils mit 0,05% TFA, 5-100 % ACN in 30min) erhalten. [M+H]<sup>+</sup> berechnet entspricht der berechneten Monoisotopenmasse des einfach protonierten Moleküls.

## 7.

## Literaturverzeichnis

1. Jakubke, H. D., Peptide: Chemie und Biologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1996
2. Frank, R., Untersuchungen zur Synthese, den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der biologischen Aktivität von Thioxopeptiden. Dissertation: Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999
3. Brandsch, M., Thuncke, F., Küllertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G., Neubert, K., Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H<sup>+</sup>/Peptide symporter, *PEPT1*. *J. Biol. Chem.* 273: 3861-3864, 1998
4. Brandts, J. F., Halverson, H. R., Brennan, M., Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry* 14: 4953-4963, 1975
5. Odefey, C., Mayr, L. M., Schmidt, F. X., Nonprolyl *cis-trans* peptide bond isomerization as a rate-determining step in protein unfolding and refolding. *J. Mol. Biol.* 245: 69-78, 1995
6. Lang, K., Schmid, F. X., Fischer, G., Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 329: 268-270, 1987
7. Schönbrunner, E. R., Mayer, S., Tropschug, M., Fischer, G., Takahashi, N., Schmid, F. X., Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.* 266: 3630-3635, 1991
8. Kern, G., Kern, D., Schmid, F. X., Fischer, G., A kinetic analysis of the folding of human carbonic anhydrase II and its catalysis by cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 270: 740-745, 1995
9. Fischer, G., Bang, H. and Mech, C., Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* 43: 1101-1111, 1984
10. Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K. P., Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol. Cell* 6: 873-883, 2000
11. Chang, C. F., Zehfus, M. H., Effects of Backbone Modification on Helical Peptides: The Reduced Carbonyl Modification. *Biopolymers* 46: 181-93, 1998
12. Ganthe, J., Peptidmimetica-Maßgeschneiderte Enzyminhibitoren. *Angew. Chem.* 106: 1780-1802, 1994
13. Dreyer, G. B., Metcalf, B. W., Tomaszek, T. A., Carr, T. J., Chandler, A. C., Hyland, L., Fakhoury, S. A., Magaard, V. W., Moore, M. L., Strickler, J. E., Inhibition of Human Immunodeficiency Virus 1 Protease in Vitro: Rational Design of Substrate Analogue Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9752-9756, 1989
14. Merricks, D., Sammes, P. G., Walker, E. R. H., Henrick, K., McPartlin, M. M., Some Studies on Peptide Analogues Involving the Sulphinamide Group. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2169-2176, 1991
15. Moree, W. J., van Gent, L. C., van der Marel, G. A., Liskamp, R. M. J., Synthesis of Peptides Containing a Sulfinamide or a Sulfonamide Transition-State Isostere. *Tetrahedron* 49: 1133-1150, 1993
16. McLeod, D. A., Brinkworth, R. I., Ashley, J. A., Janda, K. D., Wirsching, P., Phosphoramidates and Phosphoramidate Esters as HIV-1 Protease Inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1: 653-658, 1991
17. Baca, M., Kent, S. B. H., Protein Backbone Engineering through Total Chemical Synthesis: New Insight into the Mechanism of HIV-1 Protease Catalysis. *Tetrahedron* 56: 9503-9513, 2000
18. Almquist, R. G., Chao, W. R., Ellis, M. E., Johnson, H. L., Synthesis and Biological Activity of a Ketomethylene Analogue of a Tripeptide Inhibitor of Angiotensin Converting Enzyme. *J. Med. Chem.*

23: 1392-1398, 1980

19. Baca, M., Kent, S. B. H., Catalytic Contribution of Flap-Substrate Hydrogen Bonds in HIV-1 Protease Explored by Chemical Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11638-11642, 1993
20. Lygo, B., Use of an Alanine Derived  $\beta$ -Ketosulfone in the Synthesis of Peptide Isosteres. Use of an Alanine Derived  $\beta$ -Ketosulfone in the Synthesis of Peptide Isosteres. *Synlett* 10: 793-795, 1992
21. Voet, D., Voet, J. G., Lehrbuch der Biochemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim 1994
22. Houben-Weyl: Methods of Organic Chemistry. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2003
23. Mayer, B., Pfeiffer, Schrammel, A., Koesling, D., Schmidt, K., Brunner, F., A New Pathway of Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling Involving S-Nitrosoglutathione. *J. Biol. Chem.* 273: 3264-3270, 1998
24. Lee, J., Cheng, D., Bedford, M. T., Techniques in protein methylation. *Methods Mol. Biol.* 284:195-208, 2004
25. Connelly, P. R., Varadarajan, R., Sturtevant, J. M., Richards, F. M., Thermodynamics of protein-peptide interactions in the ribonuclease S system studied by titration calorimetry. *Biochemistry* 29: 6108-6114, 1990
26. Goldberg, J. M. & Baldwin, R. L., Kinetic mechanism of a partial folding reaction. 2. Nature of the transition state. *Biochemistry* 37: 2556-2563, 1998
27. Ratnaparkhi, G. S. & Varadarajan, R., Thermodynamic and structural studies of cavity formation in proteins suggests that loss of packing interaction rather than the hydrophobic effect dominates the observed energetics. *Biochemistry* 39: 12365-12374, 2000
28. Goldberg, J. M. & Baldwin, R. L., Kinetic mechanism of a partial folding reaction. 1. Properties of the reaction and effects of denaturants. *Biochemistry* 37: 2546-2555, 1998
29. Blackburn, P. & Moore, S., in: The Enzymes (Boyer, P. D., Ed.) 3<sup>rd</sup> ed., p 317, Academic Press, New York, 1982
30. Richards, F. M. & Wyckoff, H. W., in: The Enzymes (Boyer, P. D., Ed.) Vol. 4., p 647, Academic Press, New York, 1971
31. Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjölin, L., Gilliland, G. L., Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26Å. *Biochemistry* 27: 2705- 2717, 1988
32. Richards, F. M. & Vithayathil, P. J., The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. *J. Biol. Chem.* 234: 1459-1465, 1959
33. Wyckoff, H. W., Tsernoglou, D., Hanson, A. W., Knox, J. R., Lee, B., Richards, F. M., The three-dimensional structure of ribonucleases-S. *J. Biol. Chem.* 245: 305-328, 1970
34. Takahashi, T., Irie, M., Ukita, T., A Comparative study on enzymatic activity of bovine pancreatic ribonuclease A, ribonuclease S, and ribonuclease S'. *J. Biochem. (Tokio)* 65: 55, 1969
35. Sherwood, L. M. & Potts, J. T., Conformational studies of pancreatic ribonuclease and its subtilisin-produced derivatives. *J. Biol. Chem.* 240: 3799-3805, 1965
36. Catanzano, F., Giancola, C., Graziano, G., Barone, G., Temperatur-induced denaturation of ribonuclease S: A thermodynamic study. *Biochemistry* 35: 13378-13385, 1996
37. Stelea, S. D. & Keiderling, T. A., Pretransitional structural changes in the thermal denaturation of ribonuclease S and S protein. *Biophysical Journal* 83: 2259-2269, 2002
38. Allende, J. E. & Richards, F. M., The action of trypsin of ribonuclease-S. *Biochemistry* 1: 295-304, 1962

39. Kim, E. E., Varadarajan, R., Wyckoff, H. W., Richards, F. M., Refinement of the crystal structure of ribonuclease S. Comparison with and between the various ribonuclease A structures. *Biochemistry* 31: 12304-12314, 1992
40. González, C., Santoro, J., Rico, M., NMR solution structures of ribonuclease A and its complexes with mono- and dinucleotides. *Ribonucleases: structures and functions*; Academic Press New York 1997, edited by Alessio, G. D. and Riordan, J. F., pages 343-381
41. Varadarajan, R., Connelly, P. R., Sturtevant, J. M., Richards, F. M., Heat capacity changes for protein-peptide interactions in the ribonuclease S system. *Biochemistry* 31: 1421-1426, 1992
42. Thomson, J., Ratnaparkhi, G. S., Varadarajan, R., Sturtevant, J. M., Richards, F. M., Thermodynamic and structural consequences of changing a sulfur atom to a methylene group in the M13Nle mutation in ribonuclease-S. *Biochemistry* 33: 8587-8593, 1994
43. Varadarajan, R. & Richards, F. M., Crystallographic structures of ribonuclease S variants with nonpolar substitution at position 13: Packing and cavities. *Biochemistry* 31: 12315-12327, 1992
44. Borin, G., Filippi, B., Moroder, L., Santoni, C., Marchiori, F., Kinetic and conformational studies on some partially synthetic ribonuclease S analogues modified in position 8. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 10: 27-38, 1977
45. Bastos, M., Pease, J. H. B., Wemmer, D. E., Murphy, K. P., Connelly, P. R., Thermodynamics of the helix-coil transition: Binding of S15 and a hybrid sequence, disulfide stabilized peptide to the S-protein. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 42: 523-530, 2001
46. Hofmann, K. & Bohn, H., Studies on Polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 88: 5914-5919, 1966
47. Finn, F. M. & Hofmann, K., Studies on Polypeptides. 33 Enzymatic properties of partially synthetic ribonucleases. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 645-651, 1965
48. Hofmann, K., Visser, J. P., Finn, F. M., Studies on polypeptides. XLIV. Potent synthetic S-peptide antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* 92: 2900-2909, 1970
49. Strehlow, K. G., Robertson, A. D., Baldwin, R. L., Proline for alanine substitutions in the C-peptide helix of ribonuclease A. *Biochemistry* 30: 5810-5814, 1991
50. Ladbury, J. E. & Chowdhry, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to the thermodynamic studies of bimolecular interactions. *Chem. Biol.* 3: 791- 801, 1996
51. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J., Lin, L., Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179: 131-137, 1989
52. Jelesarov, I. & Bosshard, H. R., Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* 12: 3-18, 1999
53. Ratnaparkhi, G. S., Awasthi, S. K., Rani, P., Balaram, P., Varadarajan, R., Structural and thermodynamic consequences of introducing  $\alpha$ -aminoisobutyric acid in the S peptide of ribonuclease S. *Protein Engineering* 13: 697-702, 2000
54. Tsong, T. Y., Hearn, R. P., Wrathall, D. P., Sturtevant, J. M., A calorimetric study of thermally induced conformational transition of ribonuclease A and certain of its derivatives. *Biochemistry* 9: 2666-2677, 1970
55. Hearn, R. P., Richards, F. M., Sturtevant, J. M., Watt, G. D., Thermodynamics of the binding of S-peptide to S-protein to form ribonuclease S. *Biochemistry* 10: 806-817, 1971
56. LaCour, T. F. M., Hansen, H. A. S., Clausen, K., Lawesson, S. O., The geometry of the thiopeptide unit. *Int. J. Peptide Protein Res.* 22: 509-512, 1983

57. Jensen, O. E., Lawesson, S. O., Bardi, R., Piazzesi, A. M., Toniolo, C., Studies on amino acids and peptides VIII. Synthesis and crystal structure of two monothiated analogues of Boc-Gly-S-Ala-Aib-OMe. *Tetrahedron* 41: 5595-5606, 1985
58. Bardi, R., Piazzesi, A. M., Toniolo, C., Jensen, O. E., Andersen, T. P., Senning, A., Molecular and crystal structures of two  $\beta$ -bend forming monothiated analogues of melanostatin. *Tetrahedron* 44: 761-769, 1988
59. Bardi, R., Piazzesi, A. M., Toniolo, C., Jensen, O. E., Omar, R. S., Senning, A., Molecular and crystal structures of three monothiated analogues of the terminally blocked ala-aib-ala sequence of peptaibol antibiotics. *Biopolymers* 27: 747-762, 1988
60. Kajtar, M., Hollosi, M., Kajtar, T., Majer, Z., Kover, K. E., Chiroptical properties and solution conformations of protected endothiodipeptide esters. *Tetrahedron* 42: 3931-3942, 1986
61. Hollosi, M., Zewdu, M., Kollat, E., Majer, Z., Kajtar, M., Batta, G., Kover, K., Sandor, P., Mixed intramolecular H-bonds of secondary thioamides. *Tetrahedron* 44: 195-202, 1988
62. Brown, D. W., Campbell, M. M., Walker, C. V., Endothiopeptides. *Tetrahedron* 39: 1075-1083, 1983
63. Maziak, L., Lajoie, G., Belleau, B. J., Productive conformations in the bound state and hydrolytic behavior of thiopeptide analogues of angiotensin-converting enzyme substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 182-183, 1986
64. Alemán, C. J., On the ability of modified peptide links to form hydrogen bonds. *J. Phys. Chem. A* 105: 6717-6723, 2001
65. Ou, M. C. & Chu, S. Y., Protonation sites and rotational barriers calculation for formamide and thioformamide. *J. Phys. Chem.* 99: 556-562, 1995
66. Lauvergnat, D. & Hiberty, C. P., Role of conjugation in the stabilities and rotational barriers of formamide and thioformamide. An ab initio valence-bond study. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9478-9482, 1997
67. Prasad, B. V., Uppal, P., Bassi, P., Barrier to C-N rotation in selenoformamide: An ab initio study. *Chem. Phys. Lett.* 276: 31-38, 1997
68. Jensen, K. A., *Arch. Pharm. Chem. Sci.* 9: 93-97, 1981
69. Dudeck, E. P. & Dudeck, G., The proton magnetic resonance spectra of thiocarboxamides. *J. Org. Chem.* 32: 823-824, 1967
70. Abboud J. L. M., Roussel, C., Gentric, E., Sradi, K., Lauransan, J., Guiheneuf, G., Kamlet, M. J., Taft, R., Studies on amphiprotic compounds 3. Hydrogen-binding basicity of oxygen and sulfur compounds. *J. Org. Chem.* 53: 1545-1550, 1988
71. Laurence, C., Berthelot, M., Lequestel, J. Y., Elghomari, M. J., Hydrogen-bond basicity of thioamides and thioureas. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions II* 11: 2075-2079, 1995
72. Hollosi, M., Zewdu, M., Kollat, E., Majer, Z., Kajtar, M., Batta, G., Kover, K., Sandor, P., Intramolecular H-bonds and thioamide rotational isomerism in thiopeptides. *Int. J. Pept. Prot.Res.* 36: 173-181, 1990
73. Miwa, J. H., Pallivathucal, L., Gowda, S., Lee, K. E., Conformational stability of helical peptides containing a thioamide linkage. *Org Lett.* 4: 4655-4657, 2002
74. Min, B. K., Lee, H., Choi, Y. S., Park, J., Yoon, C., Yu, J., A comparative study on the hydrogen bonding ability of amide and thioamide using near IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 471: 283-288, 1998
75. Stewart, W. F., Siddal, T. H., Nuclear magnetic resonance studies of amides. *Chem Rev.* 70: 517-551, 1970



76. Schaumann, E., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 13: 350, 1974
77. Doepke, W., Bartholme, B., Gross, T., *Z. Chem.* 16: 327-328, 1976
78. Leopardi, C. P., Fabre, O., Zimmermann, D., Reisse, J., Cornea, F., Fulea, C., *Can. J. Chem.* 55: 2649-2655, 1977
79. Jackman, L. M., Kavanogh, T. E., Haddon, R. C., *Org. Magn. Reson.* 1: 109-123, 1969
80. Berg, U., *Acta. Chem. Scand. Ser. B B30*: 695-704, 1978
81. Schutkowski, M., Neubert, K., Fischer, G., Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thioaminoacyl-prolyl peptide bond. *Eur. J. Biochem.* 221: 455-461, 1994
82. Schutkowski, M., Jakob, M., Landgraf, G., Born, I., Neubert, K., Fischer, G., Probing substrate backbone function in prolyl oligopeptidase catalysis-large positional effects of peptide bond monothioxylation. *Eur. J. Biochem.* 245: 381-385, 1997
83. Schutkowski, M., Wöllner, S., Fischer, G., Inhibition of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity by substrate analog structures: Thioxo tetrapeptide-4-nitroanilids. *Biochemistry* 34: 13016-13026, 1995
84. Mannschreck, A., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 4: 985, 1965
85. Walter, W., Schaumann, E., *Chem. Ber.* 104: 985, 1965
86. Frank, R., Jakob, M., Thunecke, F., Fischer, G., Schutkowski, M., Thioxylation as one-atom-substitution generates a photoswitchable element within the peptide backbone. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 39: 1120-1122, 2000
87. Meyer, S., Jabs, A., Schutkowski, M., Fischer, G., Separation of *cis/trans* isomers of a prolyl peptide bond by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 15: 1151-1157, 1994
88. Wiberg, K. B. & Rablen, P. R., Why does thioformamide have a larger rotational barrier than formamide? *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2201-2209, 1995
89. Lumbroso, H., Amato, M. E., Lombardo, G. M., Grassi, A., Mesomeric and pi-moments in some hetero-conjugated compounds. *J. Mol. Struct.* 442: 183-194, 1998
90. Glendening, E. D. & Hrabal, J. A., Resonance in formamide and its chalcogen replacement analogues: A natural population analysis/natural resonance theory viewpoint. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 12940-12946, 1997
91. Wiberg, K. B. & Rush, D. J., Solvent effects on the thioamide rotational barrier: An experimental and theoretical study., *J. Am. Chem. Soc.* 123: 2038-2046, 2001
92. Balaji, V. N., Profeta, S., Diethrich, S. W., Mean geometry of the thiopeptide unit and conformational features of dithiopeptides and polythiopeptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145: 834-841, 1987
93. Artis, D. R. & Lipton, M. A., Conformations of thioamide-containing dipeptides: A computational study. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 12200-12206, 1998
94. IUPAC-IUB Commission on Biochemistry Nomenclature, *Biochemistry* 9: 3471, 1970
95. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V., Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 23: 283-437, 1968
96. Walter, W. & Voss, J. in: The chemistry of amides. (Zabicky, J., ed.): 383-475, Interscience, New York, 1970
97. Bondi, A., Van der waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* 68: 441-451, 1964

98. LaCour, T. F. M., Stereochemistry of peptides containing a thioacyl group. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 30: 564-571, 1987
99. Tran, T. T., Treutlein, H., Burgess, A. W., Conformational analysis of thiopeptides: Derivation of  $sp^2$  sulfur parameters for the CFF91 force field. *J. Computational Chem.* 22: 1010-1025, 2001
100. Tran, T. T., Treutlein, H., Burgess, A. W., Conformational analysis of thiopeptides: ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) maps of thio-substituted dipeptides. *J. Computational Chem.* 22: 1026-1037, 2001
101. Tran, T. T., Burgess, A. W., Treutlein, H., Perich, J., Synthesis, X-ray crystallographic structures of thio substituted *N*-acetyl *N*<sup>c</sup>-methylamide alanine and evaluation of  $sp^2$  sulfur parameters of the CFF91 force field. *J. Pept. Res* 58: 67-78, 2001
102. Shaw, R. A., Kollat, E., Hollosi, M., Mantsch, H. H., Hydrogen bonding and isomerization in thioamide peptide derivatives. *Spectrochimica Acta Part A* 51: 1399-1412, 1995
103. Miwa, J. H., Patel, A. K., Vivatrat, N., Popek, S. M., Meyer, A. M., Compatibility of the thioamide functional group with  $\beta$ -sheet secondary structure: Incorporation of a thioamide linkage into a  $\beta$ -haipin peptide. *Org Lett.* 3: 3373-3375, 2001
104. Sherman, D. B., Spatola, A. F., Compatibility of thioamides with reverse turn features: Synthesis and conformational analysis of two model cyclic pseudopeptides containing thioamides as backbone modifications. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 433-441, 1990
105. Kessler, H., Geyer, A., Matter, H., Köck, M., Unusual thionation of a cyclic hexapeptide. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 40: 25-40, 1990
106. Czugler, M., Kálmán, A., Kajtár-Peredy, M., Kollát, E., Kajtár, J., Majer, Z., Farkas, Ö., Hollósi, M., Reverse turn conformation of *N*-thioacetyl thiopropyl glycine *N*- Methylamide in the crystal and in solution. *Tetrahedron* 49: 6661-6668, 1993
107. Tran, T. T., Zeng, J., Treutlein, H., Burgess, A. W., Effects of thioamide substitutions on the conformation and stability of  $\alpha$ - and  $3_{10}$  helices. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 5222-5230, 2002
108. Angyal, R., Strbak, V., Alexandrova, M., Kruszynski, M., TRH analogue with *C*-terminal thioamide group: rapid degradation by plasma and its biological effects *Endocrinol. Exp.* 19: 213-219, 1985
109. Jakob, M., Untersuchungen zur Konformation und proteolytischen Stabilität von thioxylierten Oligopeptiden. Dissertation: Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1998
110. Fischer, G., Heins, J., Barth, A., The conformation around the peptide bond between the  $P_1$  and  $P_2$  positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases. *Biochimica et Biophysica Acta* 742: 452-462, 1983
111. Bartlett, P. A., Spear, K. L., Jacobsen, N. E., A thioamide substrate of Carboxypeptidase A. *Biochemistry* 21: 1608-1611, 1982
112. Bond, M. D., Holmquist, B., Vallee, B. L., Thioamide substrate probes of metal-substrate interactions in Carboxypeptidase A catalysis. *J. Inorg. Biochem.* 28: 97-105, 1986
113. Mock, W. L., Chen, J. T., Tsang, J. W., Hydrolysis of a thiopeptide by cadmium Carboxypeptidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 389-396, 1981
114. Campbell, P., Nashed, N. T., Carboxypeptidase A catalyzed hydrolysis of thiopeptide and thioester analogues of specific substrates. An effect on  $k_{cat}$  for peptide, but not ester, substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 5221-5226, 1982
115. Beatti, R. E., Elmore, D. T., Williams, C. H., Guthrie, D. J. S., The behaviour of leucine aminopeptidase towards thiono-peptides. *Biochem. J.* 245: 285-288, 1987

116. Dreyer, G. B., Lambert, D. M., Meek, T. D., Carr, T. J., Tomaszek, T. A., Fernandez, A. V., Bartus, H., Cacciavillani, E., Hassel, A. M., Minnich, M., Petteway, S. R., Metcalf, B. W., Hydroxyethylene isostere inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease: structure-activity analysis using enzyme kinetics, X-ray crystallography and infected T-cell assays. *Biochemistry* 31: 6646-6659, 1992
117. Yao, S., Zutshi, R., Chmielewski, J., Endothiopeptide inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* 8: 699-704, 1998
118. Jones, W. C., Nestor, J. J., Vigneaud, Synthesis and some pharmacological properties of [1-Deamino,9-thioglycine]oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 5677-5679, 1973
119. Bock, M. G., DiPardo, R. M., Williams, P. D., Pettibone, D. J., Clineschmidt, B. V., Ball, R. G., Veber, D., Freidiger, R. M., Receptor ligands which bind the oxytocin receptor with selectivity and high affinity. Chemical modification of a *Streptomyces silvensis* derived cyclic hexapeptide. *J. Med. Chem.* 33: 2321-2323, 1990
120. Kruszynski, M., Kupryszewski, G., Ragnarrson, U., Alexandrova, M., Strbak, V., Tonon, M. C., Vaudry, H., TRH analogue with C-terminal thioamide group. Synthesis, receptor binding, TSH- releasing activity and alpha-MSH-releasing activity. *Experientia* 41: 1576-1577, 1985
121. Angyal, R., Strbak, V., Alexandrova, M., Kruszynski, M., TRH analogue with C-terminal thioamide group: rapid degradation by plasma and its biological effects *Endocrinol. Exp.* 19: 213-219, 1985
122. Alexandrova, M., Strbak, V., Herman, Z. S., Stachura, Z., Kruszynski, M., Biological activity of TRH thionanalogue and its diastereoisomers. *Endocrinol. Exp.* 21: 43-49, 1987
123. Lankiewicz, L., Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Labroo, V., Cohen, L. A., Vonhof, S., Spatola, A. F., Biological activities of thionated thyrotropin-releasing hormone analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 359-366, 1992
124. Hitotsuyanagi, Y., Suzuki, J., Takeya, K., Itokawa, H., Studies on *Rubia akane* (RA) derivatives. Part 7. Thioamide analogues of RAs: Antitumor cyclic hexapeptides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*: 1887-1889, 1994
125. Zhang, Y., Rational design of cyclosporin A derivatives for selective enzyme inhibition. Dissertation: Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002
126. Eberle, M. K., Hiestand, P., Jutzieme, A. M., Nuninger, F., Cyclosporin A: Regioselective Ring Opening and Fragmentation Reactions via Thioamides. A Route to Semisynthetic Cyclosporins. *J. Org. Chem.* 59: 7249-7258, 1994
127. Seebach, D., Ko, S. Y., Kessler, H., Kock, M., Reggelin, M., Schmieder, P., Walkinshaw, M. D., Bolsterli, J. J., Bevec, D., Thiocyclosporins: Preparation, Solution and Crystal Structure, and Immunosuppressive Activity. *Helvetica Chimica Acta* 74: 1953-1990, 1991
128. Galla, H. J., Spektroskopische Methoden für Biochemiker. *Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York*, 1988
129. Maciejewski, A. & Steer, R. P., The photolysis, physical photochemistry and related spectroscopy of thiocarbonyls. *Chem. Rev.* 93: 67-98, 1993
130. Sugawara, Y., Hamaguchi, H., Harada, I., Shimanouchi, T., Resonance raman spectra of N-Methylthioacetamide. *Chem. Phys. Lett.* 52: 323-326, 1977
131. Barrett, J. & Deghaidy, F. S., *Spectrochim. Acta. Part A* 31: 707-713, 1975
132. Kato, C., Hamaguchi, H. O., Tasumi, M., Transient resonance raman study on the *trans-cis* photoisomerization of N-methylthioacetamide. *J. Phys. Chem.* 89: 407-410, 1985
133. Aizawa, M., Namba, K., Suzuki, S., *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 305, 1977

134. Willner, I., Rubin, S., Riklin, A., Photoregulation of Papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 3321, 1991
135. Hamachi, I., Hiraoka, T., Yamada, Y., Seiji, S., Photoswitching of the enzymatic activity of semisynthetic ribonuclease S' bearing phenylazophenylalanine at a specific site. *Chem. Lett.* 6: 537-538, 1998
136. Liu, D., Karanicolas, J., Yu, C., Zhang, Z., Woolley, A. G., Site-specific incorporation of photoisomerizable azobenzene groups into ribonuclease S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7: 2677-2680, 1997
137. Harada, I & Tasumi, M., Formation of transient *cis* N-methylthioacetamide under ultraviolet laser irradiation. *Chem. Phys. Lett.* 70: 279-282, 1980
138. Zhao, J., Wildemann, D., Jakob, M., Vargas, C., Schiene-Fischer, C., Direct photomodulation of peptide backbone conformations. *Chem. Commun.*: 2810-2811, 2003
139. Creighton, T. E., *Proteins-Structures and Molecular Properties*, 2<sup>nd</sup> ed.; H. Freeman and Co.: New York, NY, 1993
140. Spencer, R. G. S., Halverson, K. J., Auger, M., McDermott, A. E., Griffin, R. G., Lansbury, P. T., An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: Application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure. *Biochemistry* 30: 10382-10387, 1991
141. Weinred, P. H., Jarrett, J. T., Lansbury, P. T., Peptide models of a hydrophobic cluster at the C-terminus of the beta.-Amyloid Protein. *J. Am. Chem.* 116: 10835-10836, 1994
142. Jabs, A., Weiss, M. S., Hilgenfeld, R., Non-proline *cis* peptide bonds in proteins. *J. Mol. Biol.* 286: 291-304, 1999
143. Mayr, L. M., Willbold, D., Rosch, P., Schmid, F. X., Generation of a non-prolyl *cis* peptide bond in ribonuclease T1. *J. Mol. Biol.* 240: 288-293, 1994
144. Hoeg-Jensen, T., Review: Endothiopeptides alias peptide thioamids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* 108: 257-278, 1996
145. Brain, C. T., Hallet, A., Ko, S. Y., N-thioacylation of  $\beta$ -amino alcohols by N-(thioacyl)phthalimides: A facile synthesis of  $\alpha$ -amino acid thiazolines. *Tetrahedron Lett.* 39: 127-130, 1998
146. Gilbert, I., Rees, D. C., Richardson, R. S., Amide bond replacements: Incorporation of a 2,5,5-trisubstituted imidazoline into dipeptides and into a CCK-4 derivative. *Tetrahedron Lett.* 32: 2277-2280, 1991
147. Santus, M., New synthesis of 5-membered heterocyclic compounds. *Liebigs Ann. Chem.*: 179-182, 1988
148. Hitotsuyanagi, Y., Motegi, S., Fukaya, H., Takeya, K., A *cis* amide bond surrogate incorporating 1,2,4-triazole. *J. Org. Chem.* 67: 3266-3271, 2002
149. Harrowven, D. C. & Lucas, M. C., A simple and direct method for converting thioamides into thioester. *Tetrahedron* 55: 1187-1196, 1999
150. Eberle, M. K., Jutzi-Eme, A., Cyclosporin A: Regioselective Ring Opening and Fragmentation Reactions via Thioamides. A Route to Semisynthetic Cyclosporins. *J. Org. Chem.* 59: 7249-7258, 1994
151. Gatewood, E. S. & Johnson, T. B., Thio-amides VI. A preliminary study of some amino acid derivatives containing sulfur in thio-amide combination. *J. Am. Chem. Soc.* 48: 2900-2905, 1926
152. Scheibye, S., Pederson, B. S., Lawesson, S. O., Studies on organophosphorus compounds XXI. The dimer of p-methoxyphenylthionophosphine sulfide as thiation reagent. A new route to thiocarboxamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87: 229-238, 1978

153. Lecher, H. Z., Greenwood, R. A., Whitehouse, K. C., Chao, T. H., The phosphonation of aromatic compounds with phosphorus pentasulfide. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 5018-5022, 1956
154. Pederson, B. S., Scheibye, S., Nilsson, N. H., Lawesson, S. O., Studies on organophosphorus compounds XX. Synthesis of thioketones. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87: 223-228, 1978
155. Clausen K., Thorsen, M., Lawesson, S. O., Studies on amino acids and peptides-I. Synthesis of *N*-benzyloxycarbonylendothiodipeptide esters. *Tetrahedron* 37: 3635-3639, 1981
156. Yokoyama, M., Hasegawa, Y., Hatanaka, H., Kawazoe, Y., Imamoto, T., Improved *O/S* exchange reagents. *Synthesis* 10: 827-829, 1984
157. Lajoie, G., Lépine, F., Maziak, L. Belleau, B., Facile regioselective formation of thiopeptide linkages from oligopeptides with new thionation reagents. *Tetrahedron Lett.* 24: 3815-3818, 1983
158. Smith, D. C., Lee, S. W., Fuchs, P. L., Conversion of amides and lactams to thioamides and thiolactams using hexamethyldisilathiane. *J. Org. Chem.* 59: 348-354, 1994
159. Curphey, T. J., Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane. *J. Org. Chem.* 67: 6461-6473, 2002
160. Clausen K., Thorsen, M., Lawesson, S. O., Spatola, A. F., Studies on amino acids and peptides part 6. Methods for introducing of thioamide bonds into the peptide backbone: Synthesis of the four monothio analogues of leucine enkephaline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 785-798, 1984
161. Thorsen, M., Yde, B., Pedersen, U., Clausen K., Lawesson, S. O., Studies on amino acids and peptides-V. *Tetrahedron* 39: 3429-3435, 1983
162. Brown, D. W., Campbell, M. M., Chambers, M. S. Walker, C. V., Mono- and dithiono peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 28: 2171-2174, 1987
163. Majer, Z., Zewdu, M., Hollosi, M., Seprodi, J., Vadasz, Z., Teplan, I., Solid phase synthesis of a GHRP analog containing *C*-terminal thioamide group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 1017-1020, 1988
164. Jurayj, J. & Cushman, M., Approaches to the synthesis of endothiopeptides: Synthesis of a thioamide-containing *C*-Terminal bombesin nonapeptide. *Tetrahedron* 48: 8601-8614, 1992
165. Unverzagt, C., Geyer, A., Kessler, H., Racemisierungsfreie Kettenverlängerung von Thiodipeptiden mit Proteasen. *Angew. Chem.* 104: 1231-1233, 1992; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 31: 1229-1231, 1992
166. Jensen, O. E., & Senning, A., Studies on amino acids and peptides XII. *Tetrahedron* 42: 6555-6564, 1986
167. Hartke, K., New aspects of dithio and thiono ester. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* 58: 223-253, 1991
168. Brutsche, A., Hartke, K., Synthese von *N*-geschützten, optisch aktiven  $\alpha$ -Aminothionsäureestern. (Synthesis of *N*-protected optically active  $\alpha$ -aminothiono acid ester). *Liebigs Ann. Chem.*: 921-925, 1992
169. Kato, S., Sugino, K., Matzuzawa, Y., Katada, T., Noda, I., Mizuta, M., Goto, M., Ishida, M., The präparation and some reactions of unsymmetrical acyl thioacyl sulfides. *Liebigs Ann. Chem.*: 1789-1811, 1981
170. Kato, S., Shibahashi, H., Katada, T., Tagaki, T., Noda, M., Goto, M., *Liebigs Ann. Chem.*: 1229-1244, 1982
171. Guthri, D. J. S., Williams, C. H., Elmore, D. T., Configuration of thiono peptide bond in solution. *Int J. Pept. Prot. Res.* 28: 208-211, 1986
172. Ried, W. & Schmidt, E., *N*-Acylierte  $\alpha$ -Aminoimidsäureester, Iminodipeptide und Endothiodipeptide. (*N*-acylated  $\alpha$ -aminoimido acid ester, iminodipeptide and endothiodipeptide). *Liebigs Ann. Chem.* 695: 217-225, 1966

173. Hoeg-Jensen, T., Olsen, C. E., Holm, A., Thioacylation achieved by activation of a monothiocarboxylic acid with phosphorus reagents. *J. Org. Chem.* 59: 1257-1263, 1994
174. Hoeg-Jensen, T., Holm, A., Sorensen, H., Peptide thioacylation with high stereochemical preservation. *Synthesis*: 383-387, 1996
175. Hoeg-Jensen, T., Jacobsen, M. H., Olsen, C. E., Holm, A., Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and PyBOP. *Tetrahedron Lett.* 32: 7617-7620, 1991
176. Hoeg-Jensen, T., Spatola, A. F., Holm, A., Amino monothio acids in solid-phase synthesis of peptide thioamides. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 47: 190-200, 1996
177. Hoeg-Jensen, T., Holm, A., Spatola, A. F., Studies towards the generation of endothiopeptide libraries, Peptides 1994, Proceedings of the European Peptide Symposium, H. L. S. Maia, ed. (1995): 487-488.
178. Zacharie, B., Sauvé, G., Penney, C., Thioacylating agents. Use of thiobenzimidazolone derivatives for the präparation of thiotuftsins analogues. *Tetrahedron* 49: 10489-10500, 1993
179. Zacharie, B., In new strategies for the design and synthesis of small immunostimulant molecules. *Recent Res. Devel. in Organic Chem.; Pandalai, S. G., Ed.; Transworld Research Network* 1: 313-335, 1997
180. Zacharie, B., Martel, R., Sauvé, G., Belleau, B., Chemoselective thioacylation of amino acids. Präparation of the four monothio-thymopentin analogues and their biological activity. *Biorg. Med. Chem. Lett.* 3: 619-624, 1993
181. Zacharie, B., Lagraoui, M., Dimarco, M., Penny, C. L., Gagnon, L., Thioamides: Synthesis, stability and immunological activities of thioanalogues of Imreg. Preparation of new thioacylating agents using fluorobenzimidazolone derivatives. *J. Med. Chem.* 42: 2046-2052, 1999
182. Shalaby, M. A., Grote, C. W., Rapoport, H., Thiopeptide synthesis.  $\alpha$ -amino thionoacid derivatives of nitrobenzotriazole as thioacylating agents. *J. Org. Chem.* 61: 9045-9048, 1996
183. Brain, C. T., Hallet, A., Ko, S. Y., Thioamide synthesis: Thioacyl-*N*-phtalimides as thioacylating agents. *J. Org. Chem.* 62: 3808-3809, 1997
184. Le, H. T., Mayer, M., Thoret, S., Michelot, R., Incorporation of thioamide linkages into a growing peptide under Spps conditions improved by salt effects. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 45: 138-144, 1995
185. Doszczak, L. & Rachon, J., New, efficient and chemoselective method of thioacylation, starting from carboxylic acids. *Chem. Commun.*: 2093-2094, 2000
186. Doszczak, L. & Rachon, J., Synthesis of *S*-thioacyl dithiophosphates, efficient and chemoselective thioacylation agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*: 1271-1279, 2002
187. Carpino, L. A. & Han, G. Y., The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base sensitive amino protecting group. *J. Am. Chem. Soc.* 92: 5748-5749, 1970
188. Saheb, R., Dikshit, S. K., Agarwala, U. C., *Ind. J. Chem.* 23A: 204-208, 1984
189. Velkov, Z., Pelova, R., Stoev, S., Golovinski, E., Platinum Complexes. *J. Coord. Chem.* 26, 75-78, 1992
190. Stafford, J. A., Brackeen, M. F., Karanewsky, D. S., Valvano, N. L., A highly selective protocol for the deprotection of BOC-protected amides and carbamates. *Tetrahedron Lett.* 34: 7873-7876, 1995
191. Frank, R. & Schutkowski, M., Extremely mild reagent for Boc deprotection applicable to the synthesis of peptides with thioamide linkages. *Chem. Commun.*: 2509-2510, 1996
192. Sieber, P. & Inselin, B., Peptidsynthesen unter Verwendung der 2-(*p*-Diphenyl)-isopropylloxycarbonyl (Dpoc)-Aminoschutzgruppe. *Helv. Chim. Acta* 51: 622-632, 1968
193. Sieber, P. & Inselin, B., Peptidsynthesen unter Verwendung der 2-(*p*-Diphenyl)-isopropylloxycarbonyl

(Dpoc)-Aminoschutzgruppe. *Helv. Chim. Acta* 51: 614-622, 1968

194. Kamber, B., Riniker, B., Sieber, P., Rittel, W., Synthese von Humaninsulin. III. Aufbau des geschützten zweikettigen Fragments A(14-21)-B(17-30). *Helv. Chim. Acta* 59: 2830-2840, 1976
195. Sieber, P., Kamber, B., Hartmann, A., Joel, A., Riniker, B., Rittel, W., Totalsynthese von Humaninsulin. IV. Beschreibung der Endstufen. *Helv. Chim. Acta* 60: 27-37, 1977
196. Riniker, B., Kamber, B., Sieber, P., Selektive Abspaltung säurelabiler Aminoschutzgruppen von Peptiden in Trifluorethanol. *Helv. Chim. Acta* 58: 1086-1094, 1975
197. Bodanszky, M., Bednarek, M. A., Bodanszky, A., Coupling in the absence of tertiary amines. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 20, 387-395, 1982
198. Carey, R. I., Bordas, L. W., Slaughter, R. A., Meadows, B. C., Wadsworth, J. L., Huang, H., Smith, J. J., Furosjo, E., Preparation and properties of *N*<sup>t</sup>-Bpoc-amino acid pentafluorophenylesters. *J. Pept. Res.* 49: 570-581, 1997
199. Birr, C., Lochinger, W., Stahnke, G., Lang, P., Der  $\alpha,\alpha$ -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl (Ddz)-Rest, eine photo- und säurelabile Stickstoff-Schutzgruppe für die Peptidchemie. *Liebigs Ann. Chem.* 763: 162-172, 1972
200. Birr, C., Nassal, M., Pipkorn, R., Preparative merits of the mixed anhydride (MA) method in the excess use of DDZ-amino acids in the peptide synthesis of biologically active new antamanide analogues. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 13: 287-295, 1979
201. Birr, C., Peptidsynthesen mit 3,5-Dimethoxy( $\alpha,\alpha$ -Dimethyl)benzyloxycarbonyl(Ddz)-Aminosäuren: Merrifieldsynthese des allseits geschützten C-terminalen Dekapeptides der Insulin-A-Kette an einem Polystyrolgel. *Liebigs Ann. Chem.* 763: 1652-1762, 1973
202. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K., Grell, E., A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-Chlorotrityl chlorid resin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 2559, 1994
203. Sieber, P., A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Lett.* 28: 2107, 1987
204. Mergler, M., Tanner, R., Costeli, J., Grogg, P., Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods I. A new very acid-labile anchor group for the solid phase synthesis of fully protected fragments. *Tetrahedron Lett.* 29: 4005-4008, 1988
205. Mergler, M., Nyfeler, R., Tanner, R., Costeli, J., Grogg, P., Peptide synthesis by combination of solid-phase and solution methods II. Synthesis of fully protected peptide fragments on 2-methoxy-4-alkoxybenzyl alcohol resin. *Tetrahedron Lett.* 29: 4009-4012, 1988
206. Martin, B. R. & Edsall, J. T., The association of divalent cations with acylated histidine derivatives. *Org. Biol. Chem.* 82: 1107-1111, 1960
207. Rabenstein, D. L., Daignault, S. A., Isab, A. A., Arnold, A. P., Shoukry, M. M., Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 21. The complexation of Zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 6435-6439, 1985
208. Farkas, E., Sóvágó, I., Gergely, A., Studies on transition-metal-peptide complexes Part 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine containing dipeptides. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*: 1545-1551, 1983
209. Carpino, L. A. & Han, G. Y., The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base sensitive amino protecting group. *J. Am. Chem. Soc.* 92: 5748-5749, 1970
210. Clippingdale, A. B., Barrow, C. J., Wade, J. D., Peptide thioester preparation by Fmoc solid phase peptide synthesis for use in native chemical ligation. *J. Peptide Sci.* 6: 225-234, 2000

211. Miwa, J. H., Margarida, L. A., Meyer, A. E., Improved acidolytic deprotection conditions for the Fmoc-based solid-phase synthesis of thioxo peptides. *Tetrahedron Lett.* 42: 7189-7191, 2001
212. Bernatowicz, M. S., Wu, Y., Matsueda, G. R., Urethane protected derivatives of 1-guanylpyrazole for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* 34: 3389-3392, 1993
213. Drake, B., Patek, M. Lebl, M., A Convenient preparation of monosubstituted *N,N*-di(Boc)-protected guanidines. *Synthesis* 6: 579-582, 1994
214. Hofmann, K., *J. Am. Chem. Soc.* 87: 995, 1965
215. Norris, K., *Acta Chem. Scand.* 25: 995, 1971
216. Haak, T. & Mutter, M., Serine derived oxazolidines as secondary structure disrupting solubilizing building blocks in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 33: 1589-1592, 1992
217. Wöhr, T. & Mutter, M., Pseudo-prolines in peptide synthesis: Direct insertion of serine and threonine derived oxazolidines in dipeptides. *Tetrahedron Lett.* 36: 3847-3848, 1995
218. Dumy, P., Keller, M., Ryan, D. E., Rohwedder, B., Wöhr, T., Mutter, M., Pseudo-prolines as a molecular hinge: Reversible induction of cis amide bonds into peptide backbones. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 918-925, 1997
219. Johnson, T., *N,O*-bisFmoc derivatives of *N*-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-amino acids: Useful intermediates in peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* 1: 11-25, 1995
220. Simmons, R., Use of the Hmb backbone-protecting group in the synthesis of difficult sequences. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 47, 36-41, 1996
221. Raines, R. T., Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98: 1045-1066, 1998
222. Findlay, D., Herries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R., Ross, C. A., The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* 190: 781-784, 1961
223. Thompson, J. E. & Raines, R. T., Value of general acid-base catalysis to ribonuclease A. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 5467-5468, 1994
224. Schultz, W., Qirk, D. J., Raines, R.T., His<sup>65</sup>Asp catalytic dyad of ribonuclease A: Structure and function of the wild-type, D121N, D121A enzymes. *Biochemistry* 37: 8886-8898, 1998
225. Cuchillo, C. M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F., Nogués, M., The role of 2', 3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett.* 333: 207-210, 1993
226. Thompson, J. E., Venegas, F. D., Raines, R. T., Energetics of catalysis by ribonucleases: fate of the 2',3'-cyclic phosphodiester intermediate. *Biochemistry* 33: 7408-7414, 1994
227. Kelemen, B. R., Schultz, W., Sweeney, R. Y., Raines, R. T., Excavating an active site: The nucleobase specificity of ribonuclease A. *Biochemistry* 39: 14487-14494, 2000
228. Crook, E. M., Mathias, A. P., Rabin, B. R., Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem. J.* 74: 234-238, 1960
229. Herris, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R., The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Biochem. J.* 85: 127-134, 1962
230. Erman, J. E. & Hammes, G. G., Relaxation spectra of ribonuclease. IV. The interaction of Ribonuclease with cytidine 2':3'-Cyclic Phosphate. *J. Am Chem. Soc.* 88: 5007-5614, 1966
231. Cai, L, Cao, A., Lai, L., An isothermal titration calorimetric method to determine the kinetic parameters of enzyme catalytic reaction by employing the product inhibition as probe. *Anal. Biochem.* 299:19-23,



232. Davis, F. F. & Allen, F. W., The Action of ribonuclease on synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* 217: 13-22, 1955
233. Wang, M. H., Wang, Z. X., Zhao, K. Y., Kinetics of inactivation of bovine pancreatic ribonuclease A by bromopyruvic acid. *Biochem. J.* 320: 187-192, 1996
234. Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M. H., Poortmans, F., Palmer, R., Wyns, L., The structures of RNase A complexed with 3'-CMP and d(CpA): active site conformation and conserved water molecules. *Protein Sci* 3: 2322-23229, 1994
235. Rico, M., Gallego, E., Santoro, J., Bermejo, F. M., Nieto, J. L., Herranz, J., On the fundamental role of the Glu 2- ..... Arg 10+ salt bridge in the folding of isolated ribonuclease A S-Peptide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 123: 757-763, 1984
236. Fisher, B. M., Ha, J., Raines, R. T., Coulombic forces in protein-RNA interactions: Binding and cleavage by Ribonuclease A and variants at Lys7, Arg10 and Lys66. *Biochemistry* 37: 12121-12132, 1998
237. Fisher, B., Schultz, W., Raines, R. T., Coulombic effects of remote subsites on the active site of Ribonuclease A. *Biochemistry* 37: 17386-17401, 1998
238. DelCardayré, S. B., Ribó, M., Yokel, M., Quirk, D. J., Rutter, W. J., Raines, R. T., Engineering ribonuclease A: production, purification and characterisation of wild-type enzyme and mutants at Gln 11. *Protein Engineering* 8: 261-273, 1995
239. Wyckoff, H. W., Hardman, K. D. Allewell, N. M., Inagani, T., Johnson, L. N., Richards, F. M., The structure of ribonuclease-S at 3.5 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 242: 3984-3988, 1967
240. Shoemaker, K. R., Fairman, R., Schultz, D. A., Robertson, A. D., York, E. J., Stewart, J. M., Baldwin, R. L., Side-chain interactions in the C-Peptide helix: Phe 8  $\cdots$  His 12<sup>+</sup>. *Biopolymers* 29: 1-11, 1990
241. Fleming, P. J. & Richards, F. M., Protein Packing: Dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition. *J. Mol. Biol.* 299: 487-498, 2000
242. Park, C., Schultz, W., Raines, R. T, Contribution of the active site histidine residues of Ribonuclease A to nucleic acid binding. *Biochemistry* 40: 4949-4956, 2001
243. Kubiak, R. J., Yue, X., Hondal, R., J., Mihai, C., Tsai, M. D., Bruzik, K. S., Involvement of the Arg-Asp-His catalytic triad in enzymatic cleavage of the phosphodiester bond. *Biochemistry* 40: 5422-5432, 2000
244. Ataka, S., Takeuchi, H., Harada, I., Tasumi, M., Infrared Studies of the cis form of N-Methylthioacetamide in low-temperature Matrices. *J. Phys. Chem.* 88: 449-451, 1984
245. Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., Reimer, U., Fischer, G., Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 5568-5574, 1998
246. Hall, F. L. & Vulliet, P. R. Proline-directed protein phosphorylation and cell cycle regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 3: 176-184, 1991
247. Lu, K. P., Liou, Y. C., Vincent, I. Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *Bioessays* 25: 174-181, 2003
248. Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22: 153-183, 2001
249. Blume-Jensen, P. & Hunter, T., Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355-365, 2001
250. Hunter, T., [Prolyl Isomerases and Nuclear Function](#). *Cell* 92: 141-143, 1998

251. Kops, O.; Zhou, X. Z.; Lu, K. P., Pin1 modulates the dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by yeast Fcp1. *FEBS Lett.* 513: 305-311, 2002
252. Lu, K. P., Liou, Y. C., Zhou, X. Z., Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol.* 12: 164-172, 2002
253. Weiwad, M., Küllertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G. Evidence that the substrate backbone conformation is critical to phosphorylation by p42 MAP kinase. *FEBS Lett.* 478: 39-42, 2000
254. Pappenberger, G., Bachmann, A., Müller, R., Aygün, H., Engels, J. W. and Kiefhaber, T. Kinetic mechanism and catalysis of a native-state prolyl isomerization reaction. *J. Mol. Biol.* 336: 235-246, 2003
255. Ng, K. K. & Weis, W. I., Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca<sup>2+</sup> binding in a C-type mannose-binding protein. *Biochemistry* 37: 17977-17989, 1998
256. Reimer, U. & Fischer, G., Local structural changes caused by peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerization in the native state of proteins. *Biophys. Chem.* 96: 203-212, 2002
257. Andreotti, A. H., Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch. *Biochemistry* 42: 9515-9524, 2003
258. Fischer G. & Aumüller, T., Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148: 105-150, 2003
259. Lu, K. P., Hanes, S. D., Hunter, T., A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380: 544-547, 1996
260. Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C., Lu, K. P., Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278: 1957-1960, 1997
261. Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, X. Z., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld, J. U., Lu, K. P., Fischer, G., Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry* 37: 5566-5575, 1998
262. Hanes, S. D., Shank, P. R., Bostian, K. A., Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: 55-72, 1989
263. Hani, J., Stumpf, G., Domdey, H., PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett* 365, 198-202, 1995
264. Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K., Rahfeld, J. U., Mutations in a peptidylprolyl-*cis/trans*-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 108-116, 1999
265. Hsu, T., McRackan, D., Vincent, T. S., Gert de Couet, H., *Drosophila* Pin1 prolyl isomerase Dodo is a MAP kinase signal responder during oogenesis. *Nat. Cell Biol.* 3: 538-543, 2001
266. Kops, O., Eckerskorn, C., Hottenrott, S., Fischer, G., Mi, H., Tropschug, M., Ssp1, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 31971-31976, 1998
267. Metzner, M., Stoller, G., Rucknagel, K. P., Lu, K. P., Fischer, G., Luckner, M., Küllertz, G., Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin D1Par13. *J. Biol. Chem.* 276: 13524-13529, 2001
268. Landrieu, I., De Veylder, L., Fruchart, J. S., Odaert, B., Casteels, P., Portetelle, D., Van Montagu, M., Inze, D., Lippens, G., The *Arabidopsis thaliana* PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase. *J. Biol. Chem.* 275: 10577-10581, 2000

269. Yao, J. L., Kops, O., Lu, P. J., Lu, K. P., Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 13517-13523, 2001
270. Winkler, K. E., Swenson, K. I., Kornbluth, S., Means, A. R., Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* 287: 1644-1647, 2000
271. Bayer, E., Goetsch, S., Mueller, J. W., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L. M., Bayer, P., Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 278: 26183-93, 2003
272. Sudol, M., The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem. Sci.* 21: 161-163, 1996
273. Sudol, M. & Hunter, T., New wrinkles for an old domain. *Cell* 103: 1001-1004, 2000
274. Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M., Lu, K. P., Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283: 1325-1328, 1999
275. Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lu, K. P., Hunter, T., Noel, J. P., Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat. Struct. Biol.* 7: 639-643, 2000
276. Bedford, M. T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P., Yaffe, M., A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *J. Biol. Chem.* 275: 10359-10369, 2000
277. Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y. C., Lu, K. P., Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat. Cell. Biol.* 3: 793-801, 2001
278. Wulf, G. M., Ryo, A., Wulf, G. G., Lee, S. W., Niu, T., Petkova, V., Lu, K. P., Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *Embo J.* 20: 3459-3472, 2001
279. Shen, M. H., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W., Lu, K. P., The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 12: 706-720, 1998
280. Crenshaw, D. G., Yang, J., Means, A. R., Kornbluth, S., The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *Embo J.* 17: 1315-1327, 1998
281. Liu, W. F., Youn, H. D., Zhou, X. Z., Lu, K. P., Liu, J. O., Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase Pin1. *FEBS Lett.* 496: 105-108, 2001
282. Wulf, G. M., Liou, Y. C., Ryo, A., Lu, K. P., Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277: 47976-9, 2002
283. Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P., Lu, K. P., The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399: 784-788, 1999
284. Thorpe, J. R., Morley, S. J., Rulten, S. L., Utilizing the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase Pin1 as a probe of its phosphorylated target proteins: Examples of binding to nuclear proteins in a human kidney cell line and to tau in Alzheimer's diseased brain. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 97-107, 2001
285. Lu, K. P., Liou, Y. C., Vincent, I., Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *Bioessays* 25: 174-181, 2003
286. Lu, K. P., Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.* 29:200-209, 2004
287. Lu, K. P., Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer Cell* 4: 175-180, 2003
288. Miyashita, H., Mori, S., Motegi, K., Fukumoto, M., Uchida, T., Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its levels correlate with cyclin D1 overexpression. *Ocology Reports* 10: 455-461, 2003

289. Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P., Wang, D.G., Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am. J. Pathol.* 164: 1727-1737, 2004
290. Wulf, G., Ryo, A., Liou, Y., Lu, K. P., The prolyl isomerase Pin1 in breast development and cancer. *Breast Cancer Research* 5: 76-82, 2003
291. Shaw, P. E., Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep.* 3: 521-526, 2002
292. Yu, Q., Geng, Y., Sicinski, P., Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411: 1017-1021, 2001
293. Ryo, A., Liou, Y. C., Lu, K.P., Wulf, G., Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *J. Cell Sci.* 116: 773-783, 2003
294. Rippmann, J. F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer, M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W. J., Schnapp, A., Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth Differ.* 11: 409-416, 2000
295. Lu, P. J., Zhou, X. Z., Liou, Y. C., Noel, J. P., Lu, K. P., Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J. Biol. Chem.* 277: 2381-2384, 2002
296. Atchison, F. W., Capel, B., Means, A. R., Pin1 regulates the timing of primordial germ cell proliferation. *Development* 130: 3579-3585, 2003
297. Liou, Y. C., Ryo, A., Huang, H. K., Lu, P. J., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T., Lu, K. P., Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 1335-1340, 2002
298. Ryo, A., Liou, Y. C., Wulf, G., Nakamura, M., Lee, S. W., Lu, K. P., PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 22: 5281-5295, 2002.
299. Maleszka, R., Lupas, A., Hanes, S. D., Miklos, G. L. G., The DODO gene family encodes a novel protein involved in signal transduction and protein folding. *Gene* 203: 89-93, 1997
300. Devasahayam, G., Chaturvedi, V., Hanes, S. D., The Ess1 prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics* 160: 37-48, 2002
301. Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M. E., Wu, X., Hanes, S. D., Heitman, J., Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *Embo J.* 19: 3739-3749, 2000
302. Fujimori, F., Gunji, W., Kikuchi, J., Mogi, T., Ohashi, Y., Makino, T., Oyama, A., Okuhara, K., Uchida, T. and Murakami, Y., Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 181-190, 2001
303. Uchida, T., Takamiya, M., Takahashi, M., Miyashita, H., Ikeda, H., Terada, T., Matsuo, Y., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Fujimori, F., Hunter, T., Pin1 and Par14 Peptidyl Prolyl Isomerase Inhibitors Block Cell Proliferation. *Chem. Biol.* 10: 15-24, 2003
304. Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. and Rahfeld, J. U. Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase. *FEBS Lett.* 446: 278-282, 1999
305. Rulten, S., Thorpe, J., Kay, J., Identification of eukaryotic parvulin homologues: A new subfamily of peptidylprolyl *cis/trans* isomerases. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 259: 557-562, 1999
306. Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rucknagel, K. P., Grabley, S., Kullertz, G., Fischer, G., Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry* 37: 5953-5960, 1998
307. Chao, S. H., Greenleaf, A. L., Price, D. H., Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1,

also directly blocks transcription. *Nucleic Acids Res.* 29: 767-773, 2001

308. Wu, X., Wilcox, C. B., Devasahayam, G., Hackett, R. L., Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M. E., Heitman, J., Hanes, S. D., The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *Embo J.* 19: 3727-3738, 2000
309. Albert, A., Lavoie, S., Vincent, M., A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J. Cell Sci.* 112: 2493-2500, 1999
310. Kops, O., Zhou, X. Z., Lu, K. P., Pin1 modulates the dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by yeast Fcp1. *FEBS Lett.* 513: 305-311, 2002
311. Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., Noel, J. P., Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89: 875-886, 1997
312. Garcia-Echeverria, C., Kofron, J. L., Kuzmic, P., Rich, D. H., A continuous spectrophotometric assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 70-75, 1993
313. Zhang, Y., Fussel, S., Reimer, U., Schutkowski, M., Fischer, G., Substrate-based design of reversible Pin1 inhibitors. *Biochemistry* 41: 11868-11877, 2002
314. Schiene, C., Reimer, U., Schutkowski, M., Fischer, G., Mapping the stereospecificity of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett* 432: 202-206, 1998
315. Zhou, X. Z., Lu, P. J., Wulf, G., Lu, K. P., Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 56: 788-806, 1999
316. Dawid, I. B. & Sargent, T. D., *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* 240: 1443-1448, 1988
317. Dunphy, W. G. & Newport, J., Unraveling of mitotic control mechanisms. *Cell* 55: 925- 928, 1988
318. Guille, M., Microinjection into *Xenopus* oocytes and embryos. *Methods Mol. Biol.* 127: 111-123, 1999
319. Garcia, A. M., Rowell, C., Ackermann, K., Kowalczyk, J. J., Lewis, M. D., Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *J. Biol. Chem.* 268: 18415-18418, 1993
320. Manne, V., Yan, N., Carboni, J. M., Tuomari, A. V., Ricca, C. S., Brown, J. G., Andahazy, M. L., Schmidt, R. J., Patel, D., Zahler, R. and et al. Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells. *Oncogene* 10: 1763-1779, 1995
321. Leidenheimer, N. J., Effect of PKG activation on recombinant GABA A receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42: 131-134, 1996
322. Coultrap, S. J., Machu, T. K., Enhancement of 5-hydroxytryptamine<sub>3A</sub> receptor function by phorbol 12-myristate, 13-acetate is mediated by protein kinase C and tyrosine kinase activity. *Receptors Channels* 8: 63-70, 2002
323. Wang, Z., Wilson, G. F., Griffith, L. C., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the *Drosophila* egg potassium channel. *J. Biol. Chem.* 277: 24022-24029, 2002
324. Maleszka, R., Hanes, S. D., Hackett, R. L., de Couet, H. G., Miklos, G. L., The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 447-451, 1996
325. Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Uochi, T., Asashima, M., Yokota, T., *Xenopus* FK 506-binding protein homolog induces a secondary axis in frog embryos, which is inhibited by coexisting BMP 4 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 585-591, 1997
326. Spokony, R. & Saint-Jeannet, J. P., *Xenopus* FK 506-binding protein, a novel immunophilin expressed

- during early development. *Mech. Dev.* 94: 205-208, 2000
327. Hashimoto, H., Suetake, I., Tajima, S., Monoclonal antibody against dnmt1 arrests the cell division of xenopus early-stage embryos. *Exp. Cell Res.* 286: 252-262, 2003
  328. Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum, Wiley-VHC Verlag GmbH Weinheim Deutschland, 20. Auflage, 1999
  329. Fasman, G. D., Handbook of biochemistry and molecular biology, proteins. I, *CRC Press*, 3. Auflage: 183-203, 1976.
  330. Frank, R., Spot-Synthesis: A easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48: 9217-9232, 1992
  331. Kramer, A., Schuster, A., Reineke, U., Malin, R., Volkmer-Engert, R., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tool for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *Methods Comp. Methods Enzymol.* 6: 388-395, 1994
  332. Kramer, A., Schneider-Mergener, J., Synthesis and screening of peptide libraries on cellulose membrane supports. *Methods Mol. Biol.* 87: 25-39, 1998
  333. Vorherr, T., Bannwarth, W., Phospho-serine and phospho-threonine building blocks for the synthesis of phosphorylated peptides by the Fmoc solid phase strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5: 2661-2664, 1995
  334. Schutkowski, M., Wöllner, S., Fischer, G., Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by substrate analogue structures: thioxo tetrapeptide-4-nitroanilids. *Biochemistry* 34: 13016-13026, 1995
  335. Morrison, J. F., Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 185: 269-286, 1969

## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. Fischer danke ich für die Möglichkeit dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen, sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiven Zusammenarbeit.

Dr. Mike Schutkowski danke ich für die praktische Betreuung eines wesentlichen Teils der Arbeit und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeit unseren Chemisch-Technischen Assistentinnen Frau Birgit Hökelmann, Frau Karin Jentsch, Frau Kerstin Stein, Frau Ilona Kunze und Frau Karin Walther für ihre Unterstützung bei der Synthese und Reinigung der Peptide.

Frau Dr. Birte Hernandez und Frau Martina Heidler danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die Durchführung der biologischen Experimente.

Bei Herrn Diplom-Biochemiker Jörg Fanghänel bedanke ich mich recht herzlich für sein Engagement bei der Durchführung der ITC-Messungen.

Des weiteren bedanke ich mich bei den Kollegen der Analytik, Frau Dr. Angelika Schierhorn, Herrn Dr. Marc Kipping und Frau Christina Gersching für die massenspektrometrischen Analysen, Herrn Dr. Peter Rücknagel für die Sequenzanalysen sowie Frau Dr. Mrestani-Klaus, Herrn Dr. Christian Lücke, Herrn Dr. Peter Bayer und Frau Monika Seidel für die NMR-Analysen.

Herrn Dr. Günter Jahreis danke ich für die konstruktiven Diskussionen bei synthetischen Problemen und die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihr Verständnis und die Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

## Angaben zur Person und zum Bildungsweg

Dirk Wildemann, geb. am 28.06.1973 in Wernigerode

September 1980      Besuch der Polytechnischen Oberschule in Halberstadt  
bis Juli 1990

September 1990      Abitur am Martineum in Halberstadt  
bis Juni 1992

Juli 1992              Militärdienst  
bis Juni 1993

Oktober 1993          Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
bis September 1998      Wittenberg  
Abschluss des Studiums mit der Diplomarbeit "Cyclische  $\beta$ -  
Casomorphin-5-Analoga mit antimitogenen und  $\mu$ -Opioidrezeptor-  
sensibilisierenden Eigenschaften

seit Oktober 1998      wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Max-Planck-Forschungsstelle  
für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle  
Anfertigung einer Dissertation zum Thema "Charakterisierung von  
Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Polypeptiden durch  
chemische Modifikation und Enzymkatalyse"

Halle (Saale), den 30.06.2004

---

Dirk Wildemann



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfsmittel angefertigt sowie andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Dissertation eingereicht.

Halle (Saale), den 30.06.2004

---

Dirk Wildemann