

Untersuchungen zur Synthese, den physikalisch-chemischen
Eigenschaften und der biologischen Aktivität von
Thioxopeptiden



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Robert Frank

geb. am 15. 01. 1968 in Schlema

Halle (Saale), November 1999

Gutachter

- Prof. Dr. Gunter Fischer
Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ Halle
- Prof. Dr. Claus Liebmann
Institut für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Prof. Dr. Renè Csuk
Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die vorliegende Arbeit wurde am 15/03/2000 am Fachbereich Biochemie verteidigt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	5
1.1. Die Thiopeptidbindung	5
1.2. Strategien zur Synthese von Thiopeptiden	7
1.2.1. Einführung eines Thioxocarbonyls in das Peptidrückgrat durch O/S-Austausch	7
1.2.2. Aufbau von Thiopeptiden durch thioxylierte Peptidbausteine	9
1.2.3. Einführung eines Thioxocarbonyls in das Peptidrückgrat durch Thioacylierung	11
1.3. Die physikalisch-chemische Charakterisierung von Thiopeptiden	13
1.4. Auswirkung der Thioxylierung auf Proteolyse und biologische Aktivität.....	15
1.5. Aufgabenstellung	18
II. Untersuchungen zur Darstellung thioxylierter Peptidderivate	19
2.1. Thioxylierung des Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np.....	19
2.1.1. Die Regioselektivität des O/S-Austausches	19
2.1.2. Die schrittweise Verlängerung des Thioxotripeptids	22
2.2. Darstellung thioxylierter β -Casomorphin-7-Derivate	28
2.2.1. Untersuchungen zur Thioxylierung des geschützten Oligopeptids	28
2.2.2. Aufbau monothioxylierter β -Casomorphin-7-Derivate über thioxylierte Peptidbausteine	33
2.3. Darstellung eines monothioxylierten Nonadecapeptids durch Thioacylierung	39
2.4. Darstellung thioxylierten Casomorphin-5- und Endomorphin-Derivate am Harz	41
III. Untersuchungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften von Thiopeptiden	43
3.1. Massenspektrometrische Lokalisierung der Thiopeptidbindung im Peptid	43
3.2. Einfluß einer thioxylierten Peptidbindung auf die Sekundärstruktur	47
3.2.1. Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen der Peptide I und II	47
3.2.1.1. Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Struktur der Peptide I und II	52
3.2.1.2. Abhängigkeit der Struktur der Peptide I und II vom pH-Wert	53
3.2.1.3. Abhängigkeit der Sekundärstruktur der Peptide I und II von der Salzkonzentration	54
3.2.1.4. Der Cotton-Effekt der Thiopeptidbindung als Sonde für Konformationsänderungen.....	55
3.2.1.5. Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen der Peptide I und II	57
3.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung der thioxylierten Endomorphine	59
IV. Die biologische Aktivität thioxylierter opioider Peptide	71
4.1. Proteolytische Stabilität.....	72

4.2. <i>Biologische Aktivität</i>	73
4.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen zu Rezeptor-Bindungsaffinität.....	74
4.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibierung der cAMP-Bildung.....	76
4.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen zur isomerspezifischen Inhibierung der cAMP-Bildung.....	79
V. Zusammenfassung	82
5.1. <i>Thiopeptidsynthesen</i>	82
5.2. <i>Physikalisch-chemische Charakterisierung der Thiopeptide</i>	83
5.3. <i>Proteolytische Stabilität und biologische Aktivität der Thioxoendomorphine</i>	84
VI. Material und Methoden	85
6.1. <i>Synthese</i>	85
6.1.1. Allgemeine Bemerkungen.....	85
6.1.2. Synthesen in Lösung.....	86
6.1.2.1. Peptidbindungsknüpfung unter Verwendung der Mischanhydrid-Methode mit CAIBE (A).....	86
6.1.2.2. Peptidbindungsknüpfung unter Verwendung von TBTU (B).....	86
6.1.2.3. Abspaltung von Boc- und tBU-Schutzgruppen (C).....	86
Abspaltung mit HCl/organischem Lösungsmittel (C1)	86
Abspaltung mit TFA (C2)	86
Abspaltung mit SnCl₄ (C3)	87
6.1.2.4. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (D).....	87
6.1.2.5. Doppeleinführung der Alloc-Schutzgruppe (E).....	87
6.1.2.6. Einführung der OAll-Schutzgruppe (F).....	87
6.1.2.7. Entfernung der Alloc/OAll-Schutzgruppe (G).....	87
6.1.2.8. Thioxylierung (H).....	87
6.1.2.9. Darstellung der Thioxoacyl-6-Nitrobenzotriazole(I).....	88
6.1.3. Synthesen an der Festphase.....	88
6.1.3.1. Beladung der Harze.....	88
6.1.3.2. Bestimmung der Beladung (J).....	88
6.1.3.3. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (K).....	89
6.1.3.4. Peptidbindungsknüpfung (L).....	89
6.1.3.5. Thioacylierung (M).....	89
6.1.3.6. Acetylierung (N).....	89
6.1.3.7. Abspaltung des Peptids vom Harz (O).....	89
6.1.4. Untersuchungen zur Einführung der Thiopeptidbindung.....	90
6.1.4.1. Regioselektivität der Thioxylierungsreaktion.....	90
6.1.4.2. Untersuchung der Abspaltungsbedingungen von Schutzgruppen.....	90
6.1.5. Synthesedaten und analytische Daten der einzelnen Verbindungen.....	91
6.1.5.1. 4-Nitroanilid-Derivate.....	91
6.1.5.2. Thioxylierungsreagenzien.....	92

<i>Brillon-Typ (T2)</i>	92
<i>Lawesson-Typ (T3)</i>	92
<i>Yokoyama-Typ (T7)</i>	92
6.1.5.3. β -Casomorphine	93
6.1.5.4. Thioacylierungsbausteine	95
6.1.5.5. Tri- und Nonadecapeptide	95
6.1.5.6. Endomorphine	96
6.2. <i>Analytik</i>	97
6.2.1. Methoden	97
6.2.1.1. Puffer und Peptidlösungen	97
6.2.1.2. Stabilitätsuntersuchungen	97
6.2.1.3. aHPLC	97
6.2.1.4. UV/Vis-Spektroskopie	97
6.2.1.5. MS-Spektrometrie	97
6.2.1.6. CD-Spektroskopie	98
6.2.1.7. NMR-Spektroskopie	98
6.2.1.8. Kapillarzonenoelektrophorese	98
6.2.1.9. Isomerisierungsanregung durch Bestrahlung mit Laserlicht	99
6.3. <i>Biologische Untersuchungen</i>	99
6.3.1. Proteolytischer Abbau mit DP IV	99
6.3.2. Inhibierung der cAMP-Produktion	99
6.3.3. Bindungsaffinität	100
6.4. <i>Material</i>	100
VII. Abkürzungen	101
VIII. Literaturverzeichnis	104

I. Einleitung

Ein zentrales Ziel der Peptid- und Proteinforschung besteht in der Entwicklung rationaler Herangehensweisen an das Design von Peptid- und Proteinliganden mit spezifischen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Im Falle von Peptidliganden, die im allgemeinen durch Wechselwirkungen mit Rezeptoren oder Akzeptormolekülen (Hormonen, Neurotransmittern, Wachstums promotoren und –inhibitoren, Immunomodulatoren etc.) agieren, treten hierbei verschiedene inherente Probleme auf: (1) Da die Peptide im allgemeinen relativ klein und konformell flexibel sind, ist die Bestimmung der biologisch relevanten Konformationen stark erschwert. (2) Die Hauptfrage der Beziehung(en) zwischen primärer Peptidstruktur und Konformation („*structure code*“) und der Topographie ist noch ungelöst. (3) Da viele biologisch aktive Peptide multiple *active sites* aufweisen, ist die Frage der Spezifität und ihr Verhältnis zu Struktur und Konformation von zentralem Interesse. (4) Da in die Wechselwirkungen der Peptide mit ihrem Rezeptor oder Akzeptor („*host-guest*“ Beziehungen) Veränderungen der Konformation des Liganden und/oder des Rezeptors eingebunden sind, wird die Untersuchung von peptiddynamischen Prozessen notwendig. (5) Die Primärstruktur und Konformation eines Großteils der membrangebundenen Rezeptoren ist nicht bekannt. (6) Antagonistische Effekte erfordern, daß strukturelle, konformative und dynamische Eigenschaften als Charakteristika der Bindung an den Rezeptor bzw. Akzeptor („*binding message*“), von der nachfolgenden Signaltransduktion („*transduction message*“) unterschieden werden müssen. (7) Die dreidimensionale Struktur der Peptidliganden, frei oder gebunden an den Rezeptor/Akzeptor, ist im allgemeinen nicht bekannt.

Trotz dieser Schwierigkeiten wurden bei der Entwicklung rationaler Methoden zum Design von hochaktiven peptidischen Liganden mit spezifischen biologischen und konformellen Eigenschaften große Fortschritte gemacht. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf einer Einschränkung der Flexibilität der Peptide durch gezielte Fixierung von Konformationen. Die konformative Fixierung kann global und/oder lokal erzielt werden. Globale Einschränkungen, d.h. die Änderung der dreidimensionalen Struktur erfolgt über einen weiten Bereich von Aminosäureresten (Konformationsänderung), werden z. B. durch kovalente Peptidcyclisierungen, Pseudocyclisierungen oder der Stabilisierung von Sekundärstrukturen (wie α -Helices und β -Turns) erreicht. Lokale Einschränkungen, d.h. die Änderung der Konformation von Aminosäureseitenketten (topographische Änderung) oder die Fixierung der Rückgratkonformation einer oder zweier Aminosäurereste, sind erreichbar durch Cyclisierung (intramolekular oder mit benachbartem Aminosäurerest), durch Ersatz der natürlichen L- durch D-Aminosäuren, durch Veränderungen der funktionellen Seitenketten mittels Methyl- oder isosterischen Gruppen oder durch eine Modifizierung der Peptidbindung.

1.1. Die Thioxopeptidbindung

Der Aufbau von Peptiden und Proteinen erfolgt durch die Verknüpfung der α -Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der α -Aminogruppe einer zweiten. Der entstehenden Peptidbindung kommt als

chemisches Bindeglied zwischen den einzelnen Aminosäureresten eine zentrale Rolle in Chemie, Biochemie und Biologie der Peptide bzw. Proteine zu. Die Peptidbindung ist durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften gekennzeichnet, wie z.B. der verkürzten C-N-Bindungslänge, der Coplanarität der am Stickstoffatom gebundenen Gruppen, der charakteristischen Rotationsbarriere um die C-N-Bindung und einer definierten Stabilität bezüglich nucleophilem Angriff und Hydrolyse. Diese Eigenschaften beruhen weitgehend auf der Resonanz der CO-NH-Bindung, die aus der Delokalisation des freien Elektronenpaares am Stickstoff über das gesamte OCN- π -Elektronensystem resultiert und durch eine Reihe von Resonanzstrukturen darstellbar ist.

Eine konformative Einschränkung eines Peptids durch Modifizierung seiner Peptidbindung kann unterschiedliche Auswirkungen haben: Erhöhung der Rotationsbarriere, Veränderung des *cis*-/*trans*-Verhältnisses dieser Bindung oder Induzierung von Sekundärstrukturen [1]. Andererseits können diese Modifizierungen auch Effekte ähnlich denen einer D-Aminosäure-Substitution zeigen: Stabilisierung von Sekundärstrukturen und Erhöhung oder Eliminierung proteolytischen Abbaus. Auch stellt die chemische Modifizierung der Peptidbindung neben der Derivatisierung des Peptidrückgrates eine im *drug design* verwendete Methode dar, die biologische Aktivität von Peptiden zu verändern. Besonderer Schwerpunkt liegt hierbei auf dem Erhalt aktiverer Analoga, einer Verbesserung oder Veränderung der Selektivität gegenüber Rezeptoren, einer Erhöhung der enzymatischen Stabilität oder auch der Änderung von Transporteigenschaften. Die Nomenklatur der Pseudopeptide basiert auf dem Suffix ψ , gefolgt von der Substitution in eckigen Klammern [1]. Neben Modifizierungen, wie Ketomethylen ($-\psi[\text{CO-CH}_2]$), Depsipeptid ($-\psi[\text{CO-O}]$), Methylen ($-\psi[\text{CH}_2\text{-CH}_2]$), Thiomethylen ($-\psi[\text{CH}_2\text{-S}]$), Olefin ($-\psi[\text{CH=CH}]$), Tetrazol ($-\psi[\text{CN}_4]$), ist die Substitution der Amidbindung durch ein „reduziertes Amid“ ($-\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$) aufgrund der synthetisch guten Zugänglichkeit die gebräuchlichste Modifikation der Peptidbindung (Abb. 1).

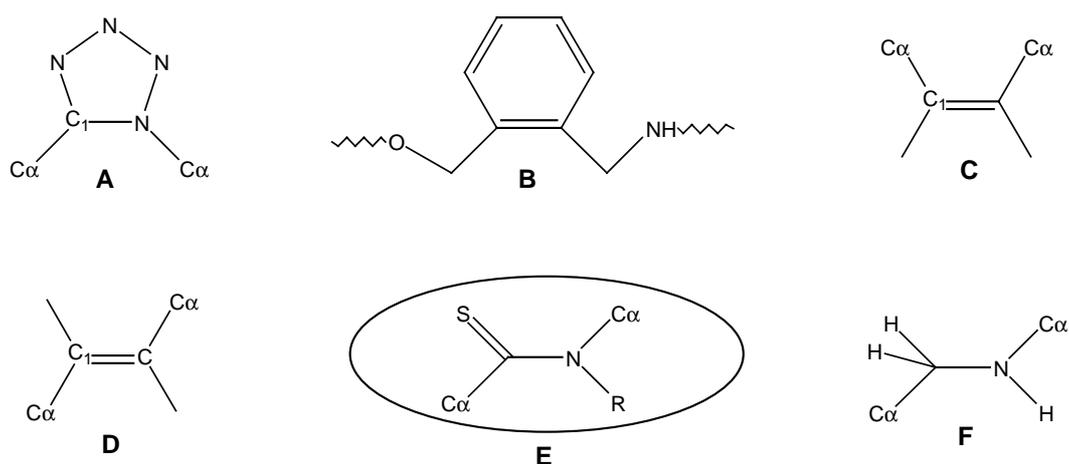


Abb. 1 Auswahl einiger Peptidbindungsmodifikationen. (A Tetrazol, B AMPA = o-[Aminomethyl-phenyllessigsäure], C Olefin-*cis*, D Olefin-*trans*, E Thiopeptid und F „reduziertes Amid“. R = H, Alkyl.

Wesentlich geringere Änderungen in der lokalen Geometrie und Flexibilität des Peptidrückgrates [2, 3] sind jedoch mit dem Austausch eines Carbonylsauerstoffs der Peptidbindung gegen ein Schwefelatom gegeben. Diese, als Thioxylierung bezeichnete isostere und isopolare Ein-Atom-

Substitution, führt zur Bildung eines Thiopeptids, dessen modifizierte Peptidbindung analog als Thiopeptidbindung ($-\psi[\text{CS-NH}]$) bezeichnet wird. Neben den geringen Änderungen der lokalen Geometrie erlauben die chemische Reaktivität und die physikalischen Eigenschaften des Schwefels eine gezielte chemische und physikalische Modifizierung bzw. Beeinflussung einer Amidbindung mit neuen Eigenschaften innerhalb des Peptid- bzw. Proteinrückgrats.

1.2. Strategien zur Synthese von Thiopeptiden

Die Einführung einer Thiopeptidbindung in das Peptidrückgrat kann durch einen direkten O/S-Austausch am geschützten Peptid mittels Thioxylierungsreagenzien, durch Kondensation thioxylierter Peptidbausteine oder durch Thioacylierung mit Thioacylierungsreagenzien erfolgen.

1.2.1. Einführung eines Thioxocarbonyls in das Peptidrückgrat durch O/S-Austausch

Erste Versuche des Austausches eines Carbonylsauerstoffs gegen Schwefel wurden 1926 durch Behandlung eines Diglycylethylesters mit P_4S_{10} beschrieben [4]. In Unkenntnis der Tatsache, daß P_4S_{10} und die von ihm abgeleiteten Derivate (Abb.2) durch Nucleophile in ihrer Fähigkeit zum O/S-Austausch gehemmt werden [5], blieb auch ein zweiter beschriebener Versuch der Thioxylierung eines ungeschützten Tetraglycins durch P_4S_{10} erfolglos [6]. Mit der Aufhebung der Nucleophilie der freien primären Aminogruppe durch Einführung einer Schutzgruppe gelang Jones *et al.* die P_4S_{10} -unterstützte Thioxylierung von Z-Gly-NH₂ zur Darstellung eines thioxylierten Oxytocinderivates [7]. Durch Lecher *et al.* [8] wurde im Jahre 1956 erstmals von einem Reagenz zur Einführung des Schwefels berichtet. Dieses 2,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiaphosphetan (Abb. 2, (3)) wurde 1967 nochmals bei Umsetzung von Benzophenon zu Thiobenzophenon erwähnt [9]. Aber erst 1978 wurde es durch Lawesson *et al.* systematisch untersucht und dessen Potential für den O/S-Austausch erkannt [10]. 1981 konnte erstmals die Thioxylierung eines geschützten Dipeptids mittels (3), mittlerweile als Lawesson Reagenz bekannt, gezeigt werden [11]. Mit der Darstellung des 4-Phenoxyphenylderivates dieses Dithiaphosphetans erhielt Lajoie *et al.* [12] ein Reagenz (Abb. 2, (4)) mit verbesserter Löslichkeit. Hierdurch konnten die bisher drastischen Reaktionsbedingungen gemildert werden [13]. Kurze Zeit später beschrieb Yokoyama *et al.* [14] den Erhalt eines Phenylthioanaloges (Abb. 2, (7)) mit vergleichbar guter Löslichkeit und Thioxylierungspotenz. P_4S_{10} wurde durch seine Derivate als Reagenz für den O/S-Austausch somit zwar weitgehend verdrängt, wird aber in kleinerem Umfang weiterhin zur Thioxylierung von Peptidderivaten eingesetzt. Während es in letzter Zeit zumeist in Fällen verwendet wurde, in denen seine Derivate wahrscheinlich ähnliche oder bessere Ergebnisse erbracht hätten [15-17], wird P_4S_{10} in manchen Fällen als obligatorisch zur erfolgreichen Thioxylierung beschrieben [18, 19]. Neben der Verwendung von P_4S_{10} mit tertiären Aminen [20, 21] führte auch die Kombination von P_4S_{10} mit anorganischen Salzen zur erfolgreichen Einführung des Schwefels.

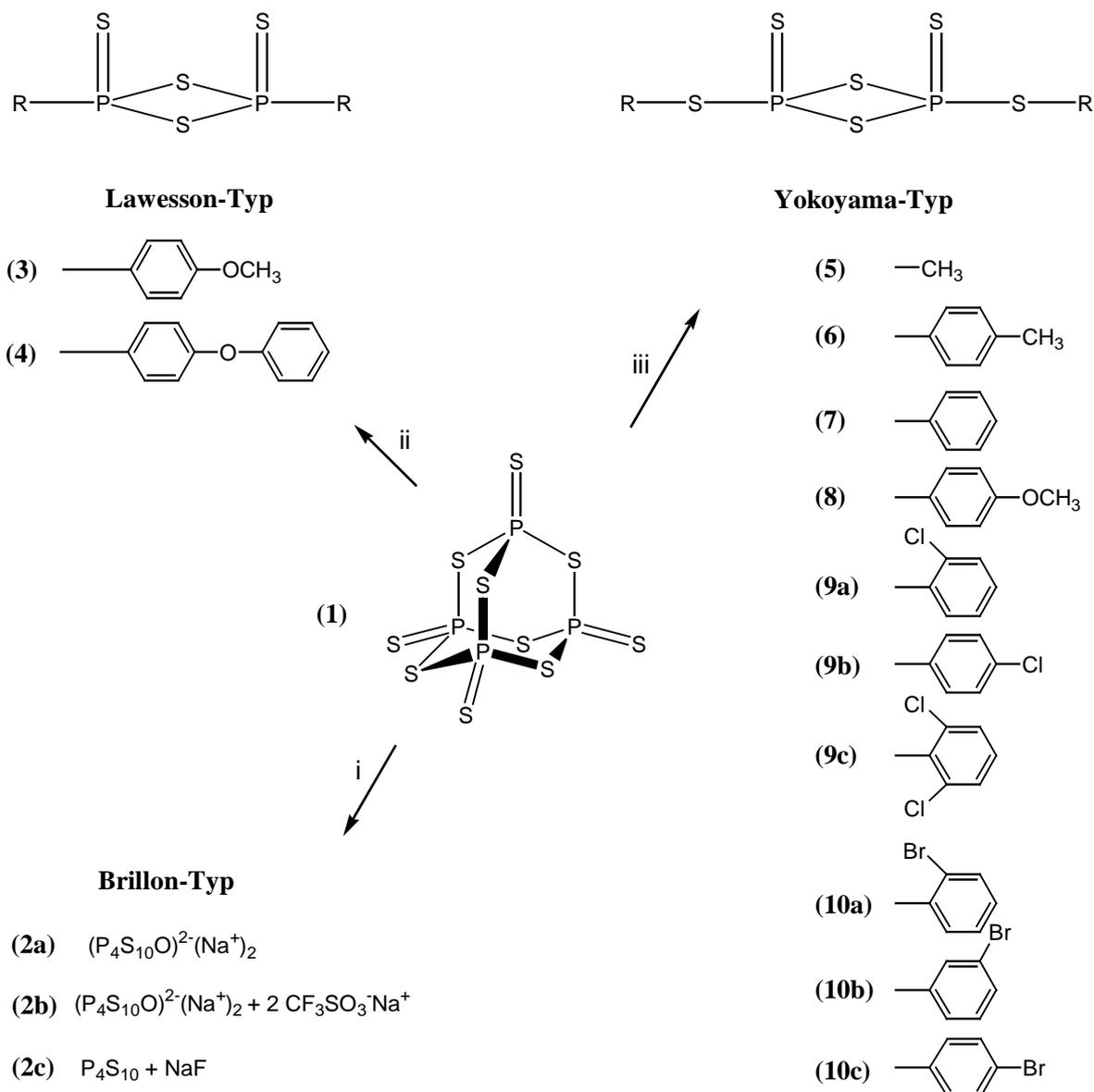


Abb. 2 Von P_4S_{10} ausgehend darstellbare Thioxylierungsreagenzien. Bedingungen: i) a: THF/ Na_2CO_3 ; b: THF/ $Na_2CO_3/2 CF_3SO_3CH_3$; c: DME/ NaF . ii) Phenolderivate. iii) substituierte Thiophenolderivate. Die gezeigten Reste stellen jeweils den Rest R im Phosphetan dar.

So sollen sich Brillon's Reagenzien (Abb. 2, (2a) und (2b)) [22], welche *in situ* in Tetrahydrofuran (THF) aus P_4S_{10} und Na_2CO_3 (und $CF_3SO_3CH_3$) dargestellt werden, durch einfache Präparation und Aufarbeitung [23], aber auch durch limitierte Reaktivität gegenüber sterisch anspruchsvolleren Peptiden [22] auszeichnen. Bessere Thioxylierungspotenz verspricht die Kombination P_4S_{10} und NaF in 1,2-Dimethoxyethan (DME) (Abb. 2, (2c)) [24]. Neben (1), (3), (4) und (7) wurden noch einige andere O/S-Austauschreagenzien beschrieben. Sie lassen sich alle dem Lawesson- oder Yokoyama-Typ zuordnen und nutzen Phosphor als oxygenophiles Element [25-28]. Andere, nicht auf Phosphor basierende Reagenzien, nutzen ähnliche Eigenschaften des Siliziums [29], Bors [30], Zinns [31, 32] oder Molybdäns [33, 34]. Eine Verwendung zur Modifizierung von Peptiden haben diese Reagenzien bisher jedoch nicht gefunden.

1.2.2. Aufbau von Thioxopeptiden durch thioxylierte Peptidbausteine

Die zweite Möglichkeit der Einführung einer Thioxopeptidbindung ist durch Kondensation thioxylierter Peptidfragmente gegeben. Der synthetisch vertretbare Aufwand zur Synthese der benötigten Fragmente beschränkt sich auf Thioxodi- und tripeptide. Bei Thioxylierung von Dipeptiden ist unter Blockierung des *N*-Terminus durch Urethanschutzgruppen und des *C*-Terminus durch Alkylester, sowie einer geeigneten Temperaturführung nur die Carbonylgruppe der Peptidbindung zwischen den beiden Aminosäuren als Thioxylierungsposition gegeben.

Eine grundlegende Bedingung zur Verlängerung von Thioxopeptiden stellt die Abspaltung der erforderlichen temporären Schutzgruppen dar. Während bei kürzeren Thioxopeptiden der Erhalt der Thioxopeptidbindung für die Acidolyse von *N*-terminalen Schutzgruppen, wie *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc) [35] und *N*-Benzyloxycarbonyl- (Z) [36] beschrieben ist [11, 37, 38], kommt es in anderen Fällen unter Bildung eines Thiazolons zum Bruch der Peptidkette [39, 40] (Abb. 3), ähnlich dem Edman-Abbau, welcher die Standardmethode zur Sequenzierung von Peptiden [41, 42] darstellt. Genaue Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit dieser Nebenreaktion liegen nicht vor, doch scheinen insbesondere Peptide mit sterisch ungehinderten Aminosäureresten, wie Leucin-Enkephalinderivate (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) [39, 40] und Alanin-haltige Peptide, dafür Anfälligkeit zu zeigen.

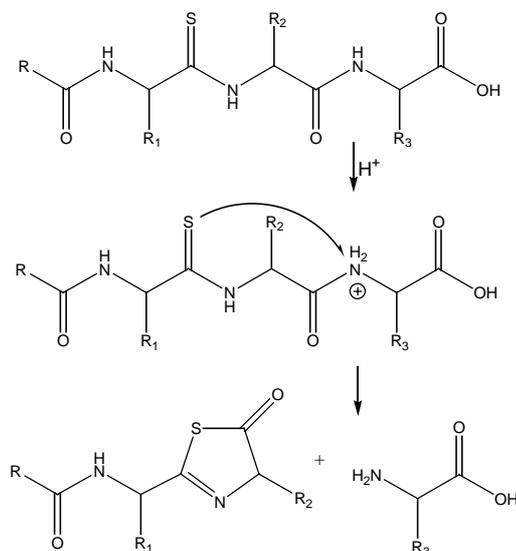


Abb. 3 Die acidolytischen Bedingungen bei der Abspaltung von Boc- und Z-Schutzgruppen können eine Spaltung des thioxylierten Peptidrückgrates katalysieren.

Aber nicht nur die Peptidsequenz, sondern auch das verwendete Abspaltungsreagenz haben einen Einfluß auf das Auftreten dieser Nebenreaktion. So war Clausen *et al.* nicht in der Lage, das Leucin-Enkephalinderivat H-Tyr-Gly-Gly-ψ[CS-NH]-Phe-Leu-OH zu erhalten [39]. Bei gemeinsamer Entfernung der Boc- und Bzl-Schutzgruppen mit HF wurde das Thioxopeptid gespalten. Durch eine veränderte Synthesestrategie und unter Verwendung von Ameisensäure zur Boc-Entfernung, gelang es Lajoie *et al.* [12] dieses Thioxopeptid darzustellen.

Die Empfindlichkeit des Thioxocarbonyls gegenüber nucleophilen Verbindungen erschwert die Verwendung der in der SPPS (*solid phase peptide synthesis*) zum temporären Schutz des *N*-Terminus gebräuchlichen *N*-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-(Fmoc)-Gruppe [43]. So sind bei der Synthese von Thiopeptiden unter Einsatz der Fmoc-Schutzgruppe nur unbefriedigende Gesamtausbeuten beschrieben [44]. Auch der Ersatz der nucleophilen Abspaltungsreagenzien durch nicht-nucleophile Reagenzien, wie DBU, brachte keine Fortschritte [45].

Eine gebräuchliche Methode zum Schutz von peptidischen Carboxylfunktion stellt die Veresterung zu Alkyl-, Aryl- und *tert.*-Butylestern dar [46]. In Verbindung mit einer *N*-terminalen Blockierung durch die Boc-Schutzgruppe werden üblicherweise primäre Alkylester verwendet. Für deren Entfernung durch basische Verseifung sind in einigen Fällen sehr starke Ausbeuteverluste beschrieben. Diese sind neben der Empfindlichkeit der Thiofunktion gegen die basischen Abspaltungsbedingungen auch auf eine bevorzugte Hydantoinbildung zurückzuführen [37, 47]. Während die Nutzung von *N*-Benzylschutzgruppen und deren hydrogenolytische Abspaltung aufgrund einer möglichen Vergiftung der Palladium- oder Platin-Katalysatoren durch den Schwefel problematisch ist, wurden lösliche Palladium-Katalysatoren in Verbindung mit Allyl-Schutzgruppen bereits eingesetzt [45, 48].

Während die *N*-terminale Verlängerung von Thiopeptiden keine spezifischen Probleme gegenüber der Standard-Peptidsynthese aufweist [2, 7, 12, 39, 40, 47, 49-62], ist die *C*-terminale Verlängerung von Thiodipeptiden bei chemischer Aktivierung gegenwärtig nur in Ausnahmefällen durchführbar. Ähnlich der Racemisierung von Standardpeptiden bei der Fragmentkondensation während der Aktivierung von nicht urethan-geschützten Fragmenten bildet sich durch eine Nachbargruppenreaktion bei Aktivierung des Peptids der schwefelhaltige Heterocyclus (Abb. 4), welcher den *C*-Terminus wieder inaktiviert [12, 37, 63]. Das entstehende Thiazol-5(4H)-on stellt ein noch schlechteres Acylierungsmittel als das korrespondierende Oxazolone dar und neigt ebenso an beiden chiralen Zentren stark zur Racemisierung [63]. Deshalb wurden die wenigen erfolgreichen *C*-terminalen Verlängerungen von Thiodipeptiden nur an achiralen *C*-Termini, wie Glycin und α -Aminobuttersäure [37, 40, 47, 52, 63, 64] sowie Prolin [52] durchgeführt.

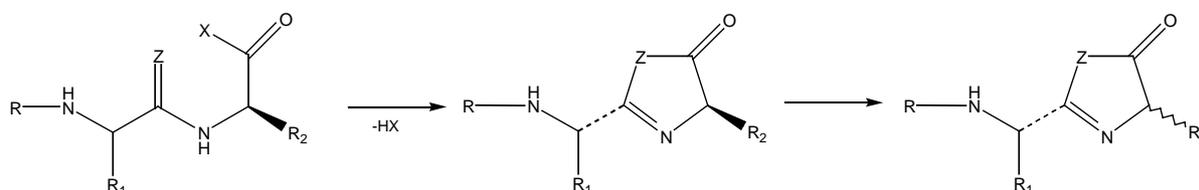


Abb. 4 Die Bildung eines Heterozyklus bei Aktivierung des *C*-Terminus eines Peptids führt zur Epimerisierung des C_α mit der Seitenkette R₂. Bei Z = O entsteht ein Oxazolone und bei Z = S ein Thiazol-5(4H)-on.

Beträgt die Entfernung der Thiopeptidbindung vom *C*-Terminus mehr als zwei Aminosäurereste, ist die Entstehung eines Thiazolons durch *C*-terminale Aktivierung nicht möglich. Unter Beachtung der

Racemisierungsgefahr durch Oxazolombildung sollten diese Thiopeptide C-terminal ohne o.g. Probleme aktivierbar sein.

Eine Möglichkeit, die Ausbildung von Thiazolonen bei C-terminaler Aktivierung zu verhindern, stellt die enzymatische Aktivierung dar. Erste Versuche zum Einsatz von Proteasen unternahm Mitin *et al.* bei der Verlängerung von α -Thioamino säuren durch Papain [65]. Durch Einsatz der Protease α -Chymotrypsin gelang Kessler *et al.* die Darstellung zweier thioxylierter Hexapeptide [48] und Yao *et al.* die Synthese von thioxylierten Inhibitoren der HIV-1-Protease [66]. In den genannten proteasekatalysierten Peptidsynthesen wurden Thiopeptidester verwendet, die thioxylierte Sekundärbindungsstellen enthielten. In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals eine direkte Knüpfung der Thiopeptidbindung gezeigt werden. Hierbei wurden Thioxyarylamide und Dithioester als Proteasesubstrate eingesetzt. Die sich intermediär bildenden Thioxyacylenzyme können in Gegenwart von Aminonucleophilen unter Bildung von Thiopeptidbindungen deacylieren.

1.2.3. Einführung eines Thioxocarbonyls in das Peptidrückgrat durch Thioacylierung

Eine dritte Möglichkeit zur Einführung einer Thiopeptidbindung in ein Peptid stellt die Thioacylierung dar. Erste Thioacylierungen gelangen Ried *et al.* durch Umsatz von N-terminal geschützten Aminosäurethioethylestern, dargestellt aus den korrespondierenden Imdidoestern und H_2S , mit freien Aminosäuren [38, 67, 68]. Diese Ester sind begrenzt reaktiv und nur bei Aminosäuren mit kurzen Seitenketten einsetzbar [69]. Als Thioacylierungsmittel höherer Reaktivität erwiesen sich Alkyldithioester [70, 71]. Doch diese in vielen Fällen erfolgreichen Thioacylierungsreagenzien [53, 54, 56, 72, 73], zeigten bei sterisch anspruchsvolleren Reaktionspartnern ebenfalls zu geringe Reaktivität [50, 53, 63].

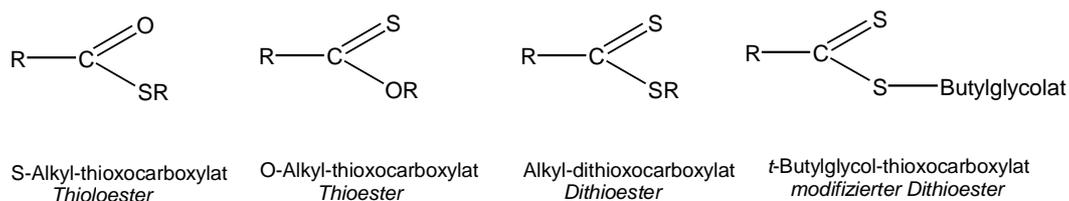


Abb. 5 Zur Thioacylierung von Peptiden verwendete Thioester. R = Alkyl.

Diese relativ geringe Acylierungskraft ist oftmals mit einem erhöhten Risiko gegenüber Racemisierung verbunden [74]. Die Gefahr des Verlustes der optischen Reinheit wurde lange Zeit übersehen [54], doch Jurayi *et al.* zeigte, daß die langsame Acylierung durch Alkyldithioester generell von Racemisierung begleitet ist. Über den Einsatz von *tert.*-butylglycolylierten Dithioestern versuchte er dieses Problem zu lösen. Hierbei konnte er zwar eine beschleunigte Acylierung feststellen, doch eine starke Racemisierung (>23%) wurde ebenfalls gefunden [50]. Erst Le *et al.* umging die mit den Estern verbundenen Probleme durch Verwendung katalysierender Zusätze (DMAP, Cäsiumsalze) bei Thioacylierung durch Methyldithioester [75]. Da die Darstellung von Dithioestern in der Regel unter

Verwendung von O/S-Austauschreagenzien erfolgen muß [53], erschwert dies den Einsatz von Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten (Gln, Asn, pGlu). Durch Einsatz von Silylketendithioacetal-Intermediaten [76] ist dies zwar vermeidbar, doch durch den inhärenten achiralen Charakter der Verbindungen nur begrenzt praxistauglich.

In der modernen Peptidsynthese stellen heute Aktivester die gebräuchlichsten Reagenzien zur enantiomerenfreien Acylierung dar. Auf der Suche nach thioxylierten Analoga für diese Acylierungsreagenzien wurde durch Hoeg-Jensen *et al.* [77] das in der Peptidchemie weit verbreitete PyBOP mit einer *N*-terminal geschützten Aminomonothiosäure und HOBt umgesetzt. Hierbei wird unter Nutzung der Oxygenophilie des Phosphors durch Aktivierung einer *N*-terminal geschützten Aminomonothiosäure mit Kupplungsreagenzien wie PyBOP *in situ* der Benzotriazolylthioester (Abb. 6 A) der entsprechenden Aminosäure generiert. Die entsprechenden Monothiosäuren werden durch Umsatz von Aktivestern, wie *N*-Hydroxysuccinimidestern, mit H₂S dargestellt [78, 79]. Da hierbei kein P₄S₁₀ involviert ist, können auch Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten umgesetzt werden [45]. Bei Aktivierung unter Verwendung von Kupplungsreagenzien mit verbesserter Abgangsgruppe, wie PyNOP [23], konnte die Aktivität der Thioester gesteigert werden. Durch Le *et al.* konnte gezeigt werden, daß PyBOP sehr effektiv zur Modifizierung primärer Aminogruppen und BOP-Cl für sterisch gehinderte bzw. sekundäre Aminogruppen geeignet ist [80]. Neben dem Erhalt der Stereochemie, der durch chromatographische Analysen bestätigt wurde [80, 81], konnte die Eignung dieser Methode auch für die SPPS [45] gezeigt werden. Ein großer Nachteil dieser Thioacylierungsrouten ist jedoch die Tatsache, daß die *in situ* generierten Benzotriazolylthioester nicht isoliert und gereinigt werden können. Es fallen bei Darstellung dieser Reagenzien immer die korrespondierenden Amide der Thiooxyloxyphosphonium-Intermediate [81] als Nebenprodukte an. Hierdurch sinken die Ausbeuten beträchtlich, eine chromatographische Reinigung ist unumgänglich [45] und die Darstellung größerer Thiopeptide unmöglich.

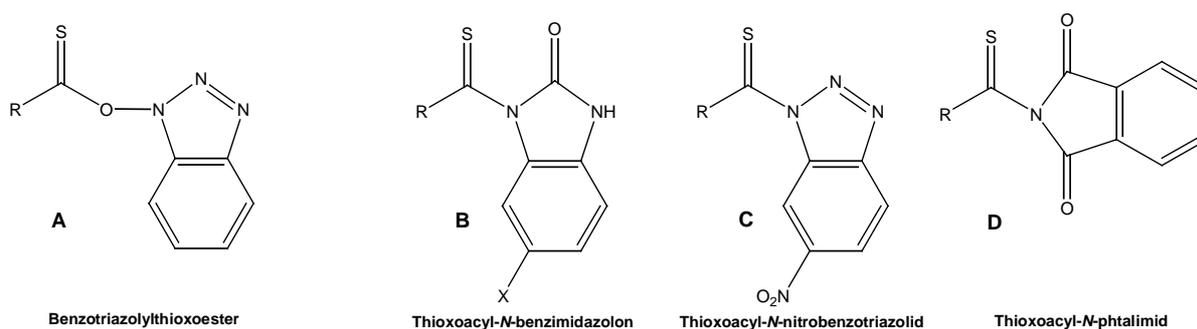


Abb. 6 Neben den Thioestern werden zur Einführung einer Thiopeptidbindung zunehmend Thioester (A) und aktivierte Amide (B, C, D) als Thioacylierungsreagenzien eingesetzt.

Neben Aktivestern finden in der Thiopeptidsynthese auch zunehmend aktivierte Amide Verwendung. So wurden von Zacharie *et al.* Thioacyl-benzimidazolinone (Abb. 6 B) von Aminosäurederivaten als Thioacylierungsreagenzien entwickelt [44, 82, 83]. Diese wurden

erfolgreich zur Derivatisierung des Thymopentins (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) [82], des Tuftsins (Thr-Lys-Pro-Arg) [44], aber auch zur Darstellung des Lissoclinamid 4, eines chiralen thiazolhaltigen makrocyclischen Peptids [84], eingesetzt. Zwar gilt diese Methode als nahezu racemisierungsfrei (max. 2%), doch die Bildung eines hohen Anteils an Oxoacyl-benzimidazol verringert die finale Ausbeute auf etwa 20%. Durch Einführung elektronenziehender Gruppen konnte unter Verminderung der Nucleophilie der Reagenzien die Entstehung des Nebenprodukts verringert werden [19].

Eine ähnlich der bei der Synthese von Benzimidazoliden verwendete, aber deutlich effizientere Strategie zeigt Shalaby *et al.* [85, 86]. Er verwendet α -Aminothiosäurederivate von Nitrobenzotriazoliden (Abb. 6 C) als Thioacylierungsreagenzien. Der Austausch der Abgangsgruppe Benzimidazol gegen Nitrobenzotriazol bringt wesentlich schnellere Reaktionszeiten, geringere Racemisierungstendenz, erhöhte Stabilität und Vermeidung des Benzimidazolid-Nebenprodukts mit sich. Die Thioxylierung des primären Aminosäureamides und dessen anschließende Umwandlung in die gute Abgangsgruppe Phthalimid wird von Brain *et al.* demonstriert. Unter milden Bedingungen führt die Verdrängung des Phthalimids durch einen entsprechenden Kupplungspartner zum gewünschten enantiomerenreinen thioacylierten Produkt (Abb. 6 D) in sehr guter Ausbeute [87, 88].

1.3. Die physikalisch-chemische Charakterisierung von Thioxopeptiden

Der Nachweis veränderter biologischer Aktivitäten durch Einführung von Thioxopeptidbindungen in Peptide und Proteine hat ein verstärktes Interesse an Thioxopeptiden hervorgerufen. Somit hat in den vergangenen Jahren die Charakterisierung thioxylierter Amide und Peptide anhand ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften bedeutende Fortschritte gemacht. Die Bestimmung von Struktur und Konformation erfolgte durch eine Vielzahl spektroskopischer Methoden, wie UV/VIS [11], MS [89, 90], Fluoreszenz, NMR [3, 11, 37, 52, 91-100], IR [99-101] und CD [100, 102-104]. Auch die Bestimmung von Röntgenkristallstrukturen [2, 3, 51, 58, 100, 105] und die Berechnungen molekularer Modelle [3, 52, 100, 105, 106] lieferten wertvolle Beiträge zur Charakterisierung der Thioxopeptidbindung.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, daß die Unterschiede in den elektronischen Eigenschaften zwischen dem Sauerstoff- und dem Schwefelatom mit strukturellen Konsequenzen für die Thioxopeptidbindung verbunden sind. Ähnlich den Amidbindungen (CO-NH) zeigen Thioxopeptidbindungen (CS-NH) eine Z-planare Anordnung der Substituenten [2, 99, 102], weisen aber eine deutlich erhöhte Rotationsbarriere der C-N-Bindung um 8 – 12 kJ/mol gegenüber der C=O-Bindung auf [107]. Die C=S-Bindung ist um ca. 0.4 Å gegenüber der Amidbindung auf 1.64 Å gestreckt [2]. Ein gegenüber dem Sauerstoffatom um ca. 0.3 Å größerer kovalenter [108] und um ca. 0.45 Å größerer van der Waals-Radius [109] des Schwefelatoms schränkt durch Interaktionen mit den Seitenketten die erlaubten Rotationen um die Winkel ϕ und ψ in der Nachbarschaft des

Thioxocarboxyls ein [106]. Deutlich wird dies insbesondere in einer Verlangsamung der *cis/trans*-Isomerisierung thioxylierter Aminoacyl-Prolyl-Peptidbindungen [61].

Zum Einfluß der Thioxozeptidbindung auf die Sekundärstruktur eines Peptids gibt es derzeit nur wenige Informationen. Die prinzipielle Akzeptanz einer Thioxozeptidbindung konnte jedoch für β -Turns [2, 51], ψ -Turns [52], α -Helices [105] und β -Faltblätter [58] nachgewiesen werden. Diese experimentellen Ergebnisse werden auch durch theoretische Untersuchungen ergänzt [106].

Bezüglich Wasserstoffbrückenbindungen (HBB), welche eine entscheidende Voraussetzung zur Bildung von peptidischen Sekundärstrukturen darstellen, wurde die Beteiligung der Thioxozeptidbindung an drei Mustern intramolekularer HBB gezeigt. So wurden NHC=O-HNCS (MIH = *mixed intramolecular hydrogen bonds*), NHC=S-HNCO (IMIH = *inverse mixed hydrogen bonds*) und NHC=S-HNCS (TTIH = *thioamide thioamide hydrogen bonds*) gefunden [99, 110]. Die im Vergleich zur Amidbindung verstärkte Acidität und Polarität der Thioxozeptidbindung [111] bedingen verbesserte Donoreigenschaften des benachbarten NH und bewirken, daß MIH stärker als gewöhnliche HBB sind. Hierdurch zeigen Thioxoamide um 1 bis 3 Einheiten kleinere pK_a -Werte [112]. Andererseits ist das Schwefelatom durch seine verminderte Basizität gegenüber dem Sauerstoffatom ein schwächerer Wasserstoffbrückenakzeptor [111]. Somit sollten IMIH schwächer als gewöhnliche HBB sein [2], was aber durch die erhöhte Polarisierbarkeit des Schwefelatoms nicht immer der Fall ist [110].

Beim Vergleich der elektronischen Eigenschaften der Thioxozeptidbindung mit denen einer Peptidbindung zeigt sich, daß innerhalb dieser Bindungen die Verteilung der Elektronen von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Diese in beiden Bindungen unterschiedlich stark ausgeprägten Faktoren beruhen zum einen auf unterschiedlichen Elektronegativitätswerten zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dessen Substituenten. Diese werden durch Ladungstransfer mehr oder weniger kompensiert und führen zu Unterschieden bezüglich der Basizität, Nucleophilie und der Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen. Zum zweiten sind Resonanzeffekte zwischen dem freien Elektronenpaar des Substituenten und den π -Elektronen des Carbonyls an der Stabilisierung der Peptidbindung beteiligt.

Da die Peptidbindung einen Chromophor darstellt, ermöglicht deren Absorption die UV/Vis- und CD-spektroskopische Untersuchung des entsprechenden Peptids. Die Resonanzstruktur der Peptidbindung führt zu einem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 190 nm, der im UV/Vis-Spektrum mit einem Absorptionskoeffizienten (ϵ) von ca. $7000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ detektiert werden kann. Der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei ca. 220 nm ist im UV/Vis-Spektrum des Peptids mit einem $\epsilon \sim 100\text{-}200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ sehr schwach; er ist außerdem von der Absorption der Seitenketten einiger Aminosäuren überlagert und kann nicht für die Analyse des Peptids herangezogen werden. Eine Substitution des Carbonylsauerstoffs der Peptidbindung durch Schwefel bewirkt im UV/Vis-Spektrum eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums [37] des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs ($\epsilon \sim 12000$) in den Bereich 250 bis 285 nm und des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs ($\epsilon \sim 100$) in den Bereich 300 bis 350 nm

[113, 114]. Chromophore bieten neben der Möglichkeit der spektroskopischen Charakterisierung auch eine Möglichkeit zur Anregung durch Licht. So konnte die Photoanregung des Thioxochromophors durch UV- und Laserlicht an einem einfachen *N*-Methylthioacetamid gezeigt werden [115-117].

1.4. Auswirkung der Thioxylierung auf Proteolyse und biologische Aktivität

Ähnlich den Amiden sind Thioxoamideinheiten durch Säuren und Basen hydrolysierbar [118-120]. So wird Thioxoacetamid, verglichen zu Acetamid, im Basischen 80-fach schneller [121], im Sauren vergleichbar schnell [122] hydrolysiert. Im Gegensatz hierzu verläuft die enzymatische Hydrolyse, abhängig vom Substrat, an Thioxozeptiden zumeist langsamer. Hierbei ist zu unterscheiden, ob es sich bei der zu hydrolysierenden Bindung um eine Thioxozeptid- oder um eine, ihr benachbarten Peptidbindung handelt. Die thioxylierte Peptidbindung ist außerordentlich beständig gegen proteolytische Enzyme. Bisher ist nur für die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) die Proteolyse einer nichtaktivierten Thioxozeptidbindung beschrieben [123]. Ist ein der zu hydrolysierenden Peptidbindung benachbarter Aminosäurerest thioxyliert, zeigen sich unterschiedliche Proteolysemuster. Der proteolytische Abbau durch die Metalloprotease Aminopeptidase P zeigt an Thioxozeptiden Proteolyseraten, die bis zu 1100-fach langsamer als die der korrespondierenden Oxosubstrate sind [61]. Hierbei wurden ähnliche K_m , aber deutlich geringere k_{kat} -Werte gefunden. Carboxypeptidase A hydrolysiert Thioxozeptidsubstrate mit Spezifitätskonstanten (k_{kat}/K_m), die 10- bis 10000-fach kleiner als bei nativen Substraten sind [15, 72, 73]. Hierbei entspricht der beobachtete Abbau der Thioxozeptide einer Proteolyse und resultiert in Bildung eines Amins und einer Monothioxosäure und nicht in der Bildung von Amid und H_2S [15]. Gegen DP IV zeigen solche Thioxozeptide eine bis zu 100-fach erhöhte Stabilität [61]. Für Prolyloligopeptidase ist eine vierfach verlangsamte Hydrolyse zweier Thioxozeptidsubstrate beschrieben. Für fünf Cysteinproteasen aus der Papainfamilie zeigten diese Derivate eine zwei bis dreifache Verlangsamung der Proteolyse [59].

Im Gegensatz zu den o.g. verlangsamten Reaktionen, erfolgte im Falle eines thioxylierten TSH- (Thyreoid-stimulierendes Hormon) Derivates ein dreifach schnellerer Abbau als im nativen Zustand [124]. Ein *angiotensin converting enzyme* (ACE) hydrolysierte ein thioxyliertes Substrat in nahezu unveränderter Geschwindigkeit. Das durch eine Alanin-Glycin-Substitution modifizierte Thioxosubstrat zeigte dagegen vollständige Proteolyseresistenz [97]. Durch Yao *et al.* konnte anhand eines thioxylierten Substrates der HIV-1-Protease erstmals eine Hydrolyseresistenz zeigen [66]. Weiterhin liegen Untersuchungen für die Leucin-Aminopeptidase [125, 126], für die Serinproteasen Chymotrypsin [48, 126, 127], Subtilisin [48, 127] und die Cysteinproteasen Papaya Peptidase A, Chymopapain [127, 128] und Papain [126, 127, 129] vor.

Während sich der Einfluß einer Thioxozeptidbindung bezüglich der Hydrolyse zumeist in einer erhöhten proteolytischen Stabilität zeigt, ist der Effekt auf biologische Aktivitäten wesentlich weniger

vorhersehbar. Es zeigte sich, daß die minimale Modifizierung in Form eines O/S-Austausches starke Auswirkungen bezüglich der Konformation und damit auf die Bioaktivität des jeweiligen Peptids haben kann. So wurden Thioxo-peptide mit gegenüber dem nativen Peptid stark erhöhter, gleicher, geringerer und nicht vorhandener Aktivität gefunden. Erste Untersuchungen zur Bioaktivität von thioxylierten Peptiden wurden im Jahre 1973 durchgeführt. Jones *et al.* [7] modifizierte das C-terminale Glycinamid des Desamino-Oxytocin und erhielt im Vergleich zum Oxo-peptid eine stark reduzierte Oxytocinaktivität von 6% und Vasodepressinaktivität von nur noch 1.5%. An einem cyclischen Oxytocinderivat konnte Freidiger *et al.* eine 7-fach höhere Affinität an beiden Rezeptoren zeigen [130]. In den Jahren 1983 und 84 gelang zwei Arbeitsgruppen die Modifizierung des opioiden Rezeptorliganden Leucin-Enkephalin. Clausen *et al.* [39] stellte drei und Lajoie *et al.* [12, 54] vier monothioxylierte Derivate dar. Während in den Bioassays *guinea pig ileum* (GPI) und *mouse vas deferens* (MVD) [131] neben einem inaktiven Thioxoderivat zwei Derivate mit 2- bis-14-fach erhöhter Aktivität gegenüber dem nativen Peptid gefunden wurde, zeigten Lajoie *et al.* [12, 54] nur verminderte Aktivität des ersten Derivates und gleichstarke bis erhöhte Aktivitäten (3- bis 9-fach) bei den beiden anderen. Für das vierte Derivat wurde gleiche bis 6-fach schwächere Aktivität gezeigt [12]. Die Bindungsaffinitätsstudien beider Arbeitsgruppen stimmen mit den Untersuchungen zur Bioaktivität gut überein. So zeigen beide Autoren eine deutlich erhöhte Selektivität eines Thioxoderivates für den δ -Rezeptor gegenüber dem μ -Rezeptor (bis 5-fach). Die anderen Thioxoderivate zeigen übereinstimmend verminderte bzw. keine Bindungsaffinität. Für thioxylierte cyclische Pseudoenkephaline wurden ebenfalls abhängig von der Thioxylierungsposition erhöhte Rezeptorselektivitäten bei geringerer Affinität gezeigt [18]. Für drei thioxylierte Analoga des Dynorphin A, das zu einer Familie endogener Opioidpeptide mit hoher Affinität und Selektivität für den κ -Rezeptor gehört, wurde im GPI-Assay und in den opioiden Bindungsstudien eine verminderte Affinität, für die motorische Dysfunktionsaktivität eine verringerte Beeinträchtigung der motorischen Funktionen sowie die Zunahme der antinociceptiven Aktivität festgestellt. Eine deutliche Abnahme der κ -Rezeptorselektivität ist bei zwei Thioxoderivaten festzustellen [132]. Während Untersuchungen an drei monothioxylierten Hypothalamushormonen (TSH) [49, 55, 124, 133] dem nativen Tripeptidamid vergleichbare Aktivität zeigen, fällt die Aktivität des dithioxylierten TSH auf ca. 50% [134]. Neben einer deutlichen Unterscheidung zwischen pituitären und corticalen Rezeptoren für zwei Thioxoderivate, zeigen Bindungsstudien für ein Analogon trotz unverminderter Aktivität deutlich schlechtere Bindung (4-fach) als TSH [134]. Auch Schlafdauer und motorische Aktivitäten - untersucht an Ratten - werden durch TSH und seine Thioxoderivate ähnlich beeinflusst [133]. Die Wurzeln von *Rubia akane* und *Rubia cordifolia* sind als Quelle für eine Reihe von cyclischen Peptiden mit hoher Antitumoraktivität bekannt. Itokawa *et al.* gelang die Thioxylierung dieser cyclischen Hexapeptide. Alle dargestellten mono- und dithioxylierten Peptide zeigten in den durchgeführten *in vitro* Studien an Krebszellen gegenüber dem nativen Peptid gleiche oder bis zu 8-fach erhöhte

Antitumoraktivität [96, 135]. Untersuchungen an einem durch Thioxylierung modifizierten immunsuppressiv wirkendem cyclischen Decapeptid, dem Cyclosporin A, zeigen bei neun untersuchten Thioxoderivaten geringere Aktivität und bei zwei monothioxylierten Analoga keine Aktivitätsänderung bezogen auf das native Peptid. Es wurde festgestellt, daß mit Zunahme der Anzahl der eingeführten Thioxofunktionen die biologische Aktivität sank [3].

Das Auftreten der Thioxozeptidbindung in nativen Proteinen gibt Hinweise auf eine potentielle biologische Relevanz thioxylierter Peptidbindungen. So wurden aus *Streptomyces tateyamensis* mit den Thiopeptinen A und B eine Reihe von monothioxylierten cyclischen Depsipeptiden mit antibiotischer Aktivität isoliert [136-141]. Während auch in *Micromonospora arborensis* [142], in *Polycarpa clavata* [143] und in *Emericella striata* [144] natürlich vorkommende Thioxozeptidbindungen beschrieben sind, wurde von Ermler *et al.* [145] bei einem durch Röntgenkristallstrukturanalyse untersuchten Enzym eine Thioxylierung des Gly⁴⁴⁵ abgeleitet. Die Thioxosubstitution dieses Methyl-Coenzym M aus dem thermophilen Archebakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*) ist möglicherweise für den Katalysemechanismus des Enzyms bedeutsam.

1.5. Aufgabenstellung

Durch Modifizierung der Peptidbindung entstehende Pseudopeptide sind bezüglich der Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen sowohl in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten als auch in ihrer biologischen Aktivität von Interesse. Eine isostere Ein-Atom-Substitution des Carbonylsauerstoffs durch ein Schwefelatom stellt hierbei den kleinstmöglichen Eingriff in die lokale Geometrie der Peptidbindung dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen geeigneten Weg zur regioselektiven Einführung des Schwefelatoms in das Peptidrückgrat zu finden. Hierbei sollte sowohl der direkte O/S-Austausch am geschützten Modellpeptid als auch der systematische Aufbau thioxylierter β -Casomorphin- und Endomorphin-Derivate in Lösung und an der festen Phase Gegenstand der Untersuchungen sein. Die Ermittlung der Regioselektivität des O/S-Austausches sollte unter Variation der Reaktionsbedingungen (Thioxylierungsreagenz, Reaktionsdauer, Lösungsmittel, Temperatur, Zusätze) erfolgen. Für den systematischen Aufbau von Thioxozeptiden sind eine Reihe von Problemen gegenüber den Abspaltungsbedingungen unterschiedlicher Schutzgruppen bekannt. Unter Überwindung der bei acidolytischer Entschützung von Thioxozeptiden auftretenden Probleme sollte eine milde und zuverlässige Abspaltungsstrategie auf Basis der Boc-Chemie entwickelt werden und weiterhin die Eignung von Palladium-katalysiert abspaltbaren Allyl-Schutzgruppen für den Aufbau thioxylierter Peptide geprüft werden. Die dargestellten thioxylierten Oligo- und Polypeptide sollten identifiziert und bezüglich ihrer Sekundärstruktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Hierbei sollte neben der absorptionspektroskopischen Untersuchung eine Methode zur Bestimmung der Thioxylierungsposition mittels Massenspektrometrie entwickelt werden. Die Thioxylierung einer Peptidbindung führt zu einer Erhöhung der Rotationsbarriere der C-N-Bindung. Anhand thioxylierter Endomorphin-Derivate sollte die Möglichkeit einer präparativen Trennung und des quantitativen Erhalts der reinen *cis*- und *trans*-Isomere geprüft und die reinen *cis*- und *trans*-Isomere hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften verglichen werden. Ausgehend vom *cis*- und/oder *trans*-Isomer war die *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion mittels zeitabhängiger CZE-, NMR-, UV/Vis- und CD-Untersuchung zu charakterisieren. Unter Ausnutzung der Photoanregbarkeit des Thioxochromophors sollten Bedingungen für die Schaltbarkeit der *cis/trans*-Konformation mittels Laserlicht geschaffen werden. Monothioxylierte Endomorphin-Derivate sollten bezüglich ihrer Stabilität gegen proteolytischen Abbau, ihrer Bindungsaffinität an membrangebundene μ -Rezeptoren und ihres Einfluß auf die Signaltransduktion untersucht werden. Unter Verwendung von *cis/trans*-Isomeren der thioxylierten Endomorphine sollten Untersuchungen zur Signaltransduktion die Konformationsspezifität des opioiden μ -Rezeptors charakterisieren.

II. Untersuchungen zur Darstellung thioxylierter Peptidderivate

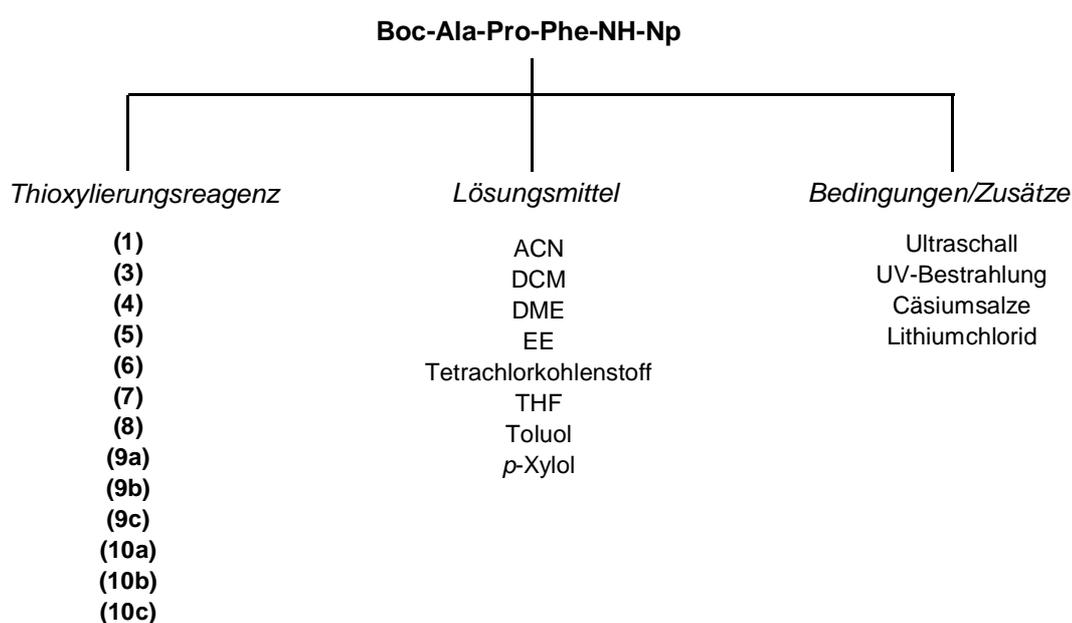
Um geeignete Bedingungen zur regioselektiven Einführung einer Thiopeptidbindung in das Peptidrückgrat zu finden, wurde die Thioxylierungsreaktion mit Hilfe des Modelltripeptids Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np und des geschützten β -Casomorphin-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) untersucht. Hierbei wurde die Regioselektivität der Thioxylierungsreagenzien, der Einfluß von Lösungsmitteln, Reaktionsbedingungen und die Verwendung von Zusätzen betrachtet. Während anhand des thioxylierten Modelltripeptids eine Strategie zur schrittweisen Verlängerung von thioxylierten Peptiden untersucht wurde, erfolgte die Darstellung monothioxylierter β -Casomorphin-7-Derivate durch Kondensation thioxylierter Fragmente. Unter Darstellung thioxylierter β -Casomorphin-5- und Endomorphin-Derivate sowie eines thioxylierten Nonadeca-peptids wurde die Einführung der Thiopeptidbindung mittels Thioacylierungsreagenzien in Lösung und an der festen Phase untersucht.

2.1. Thioxylierung des Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np

2.1.1. Die Regioselektivität des O/S-Austausches

Das Peptid Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np weist durch die enthaltenen Carbonylsauerstoffe vier mögliche Reaktionsorte für einen O/S-Austausch auf. Um den Umsatz des Eduktes und die Ausbeute an thioxylierten Produkten quantifizieren zu können, wurde das C-terminale Ende des Peptids durch einen *para*-Nitroanilidrest modifiziert, dessen Chromophor ein starkes UV/Vis-Signal bei 320 nm liefert.

Die untersuchten Reaktionsbedingungen umfaßten folgende Bereiche:



Regioselektivität der Thioxylierungsreagenzien

Zur Ermittlung der Regioselektivität von Thioxylierungsreagenzien wurden neben P_4S_{10} und Reagenzien vom Lawesson- und Yokoyama-Typ auch vom Autor entwickelte, an unterschiedlichen Positionen halogenierte Reagenzien vom Yokoyama-Typ (**9a**, **9c**, **10a**, **10b**) untersucht. Die Charakterisierung erfolgte durch Umsatz von Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np in THF bei 50°C mit 0.6 Äq. Reagenz nach 3 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels aHPLC und UV-Detektion des *para*-Nitroanilidrestes (Abb. 7).

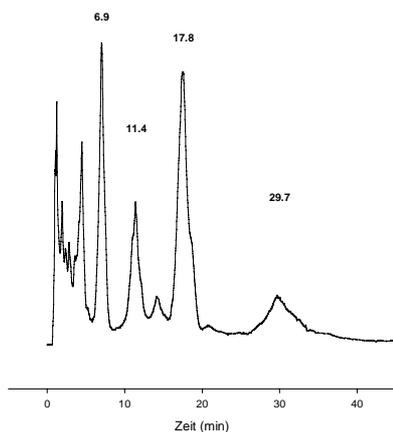


Abb. 7 HPLC-chromatographisches Elutionsprofil der Thioxylierung des Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np mit 0.6 Äq. (**3**) in THF bei 50°C nach 3 h. 6.9 min – Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np; 11.4 min – Boc-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np; ; 17.8 min – Boc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np; 29.7 min – Boc-Ala- ψ [CS-N]-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np. Bedingungen: RP18 (5 μ m); 125x4 mm; 0–45 min 57% ACN; 0.05% TFA; 1 ml/Min.; 320 nm.

In keinem der untersuchten Fälle konnte eine vollständige Umsetzung des Edukts beobachtet werden. Alle verwendeten Reagenzien thioxylieren mit einer durchschnittlichen Produktverteilung von 85 : 15, bevorzugt die Pro-Phe-Bindung (Xaa^2 -Position) gegenüber der Ala-Pro-Bindung (Xaa^1 -Position) (Abb. 8, Tabelle 1). Im untersuchten Modellpeptid Boc-Ala-Pro-Phe-NH-N wurde neben teilweiser Dithioxylierung (Xaa^1 - Xaa^2 -Position) keine Thioxylierung des Urethancarbonyls und des Phenylalanyl-(4)-nitroanilids gefunden.

Während in Übereinstimmung mit Clausen *et al.* [11] kein O/S-Austausch der Carbonylsauerstoffe der Schutzgruppen gefunden wurde, zeigten die einzelnen Aminosäurereste unterschiedliche Reaktivitäten gegenüber den Thioxylierungsreagenzien. Für (**3**), (**4**) und (**8**) ist die bevorzugte Thioxylierung von Gly und anderen sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäuren bekannt [12, 18, 47, 51, 89, 95]. Untersuchungen an offenkettigen Diamiden und cyclischen Undecapeptiden zeigten, daß (**3**) bevorzugt sekundäre gegenüber tertiären Amiden [3, 28, 146] und (**7**) bevorzugt tertiäre gegenüber sekundären Amidgruppen thioxyliert [28]. In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten unter Bevorzugung der sterisch weniger gehinderten Xaa^2 -Peptidbindung alle Thioxylierungsreagenzien eine sehr ähnliche Verteilung der monothioxylierten Produkte. Unterschiede sind nur hinsichtlich der Reaktivität und der Neigung zur Dithioxylierung zu finden. So bilden - im Gegensatz zu Hitotsuyanagi *et al.* [96, 135] - sowohl Reagenzien vom Lawesson- als auch vom

Yokoyama-Typ, das dithioxyliertes Produkt. In allen Fällen ging die Dithioxylierung auf Kosten des bevorzugten monothioxylierten Xaa²-Produktes.

Reagenz	Ala ¹ = S (%)	Pro ² = S (%)	Ala ¹ = Pro ² = S (%)	Totalausbeute (%)
(1)	15.4	84.6	0	50.7
(3)	19.1	66.7	14.2	70.0
(4)	18.8	81.2	0	35.6
(5)	15	75.7	9.3	57.4
(6)	15.6	84.4	0	47.6
(7)	15.7	84.3	0	40.0
(8)	16.6	83.4	0	37.2
(9a)	14.1	85.9	0	45.1
(9b)	14.1	74.9	11	44.2
(9c)	13.4	74	12.6	67.8
(10a)	15.2	84.8	0	41.4
(10b)	15.5	84.5	0	35.1
(10c)	15.2	84.8	0	47.4

Tabelle 1 Verteilung der mono- und dithioxylierten Produkte der dreistündigen Thioxylierung des Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np bei 50°C in THF durch unterschiedliche Thioxylierungsreagenzien.

I

Die Reaktivitäten der einzelnen Reagenzien weisen anhand der Totalausbeute an thioxylierten Produkten zwar Unterschiede auf, aber ähnlich einer Studie an thioxylierten Lactonen [26] sind hinsichtlich des Typs zwischen Lawesson- und des Yokoyama-Reagenzien keine eindeutigen Unterscheidungen zu treffen.

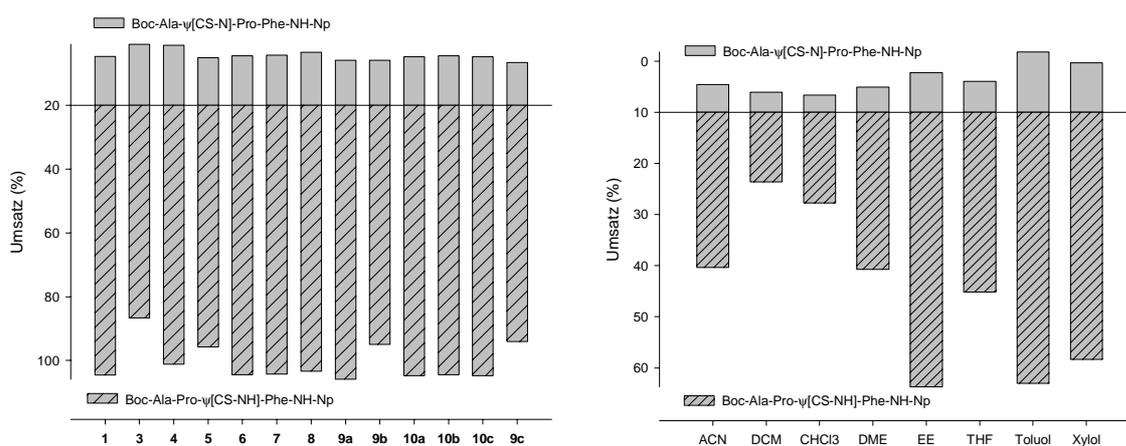


Abb. 8 Verteilung der monothioxylierten Produkte Boc-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np und Boc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np der Thioxylierung von Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np bei 50°C. (**links**) Thioxylierung in THF unter Variation von 0.6 Äq Thioxylierungsreagenz. (**rechts**) Thioxylierung mit 0.6 Äq (3) unter Variation des Lösungsmittels.

Solventsabhängige Regioselektivität der Thioxylierung mit Lawesson Reagenz

Zur Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittels auf die Regioselektivität der Thioxylierung wurde das Modelltripeptid in unterschiedlichen Lösungsmitteln mit (**3**) bei 50°C umgesetzt (Abb. 8). In polar protischen Lösungsmitteln, wie Isopropanol, *tert.*-Butanol oder Trifluorethanol (TFE), findet keine Thioxylierung des Peptids statt. Beste Ergebnisse werden in unpolar bis schwach polaren Lösungsmitteln erzielt. Neben deutlich unterschiedlichen Reaktivitäten des (**3**) in den einzelnen Lösungsmitteln sind auch Unterschiede in der Verteilung der thioxylierten Produkte ersichtlich. Während in Acetonitril (ACN), Dichlormethan (DCM) und THF die Dithioxylierung deutlich unterdrückt ist, tritt sie in Toluol, *p*-Xylol, Essigsäureethylester (EE) und besonders in Tetrachlorkohlenstoff merklich hervor.

Eine selektive Monothioxylierung war auch durch Variation des Lösungsmittels nicht zu erreichen. Die Inhibierung der Thioxylierungsreaktion in polar protischen Lösungsmittel ist auf eine Reaktion der Lösungsmittel mit dem Thioxylierungsreagenz zurückzuführen. Eine - bezogen auf das Thioxylierungsreagenz - weniger gute Löslichkeit des Peptids in unpolaren Lösungsmitteln führt zu einer verstärkten Dithioxylierung. Beste Ergebnisse hinsichtlich Reaktivität und Ausbeute an monothioxylierten Produkten sind in THF zu erzielen. Auch bei geringeren Temperaturen ist eine gute Löslichkeit aller Reagenzien und vieler Peptide gegeben.

Beeinflussung der Regioselektivität durch Zusätze im Reaktionsansatz

Auch unterschiedliche Zusätze des Reaktionsansatzes THF/(**3**)/25°C erreichten keine regioselektive Monothioxylierung im Modellpeptid. Typische Komplexbildner wie Lithiumchlorid und Cäsiumcarbonat bewirkten keinen Einfluß auf die Produktverteilung. Für die Behandlung des Reaktionsansatzes mit UV-Licht [147] bzw. Ultraschall [148, 149] ist eine starke Erhöhung der Reaktivität der Thioxylierung beschrieben. Während unter Bestrahlung des Reaktionsansatzes mit UV-Licht keine Veränderung des Verhältnisses an monothioxylierten Produkten (Xaa^1 zu Xaa^2 : 15 : 85) zu finden waren, konnten unter Bedingungen der Ultraschallbehandlung 3% des Phe^3 -thioxylierten Produkts (Xaa^3) gefunden werden.

2.1.2. Die schrittweise Verlängerung des Thioxotripeptids

Der Aufbau längerer Thioxo-peptide erfordert nach Einführung des Schwefels in das Peptidrückgrat eine Verlängerung des Peptids unter Erhalt der Thioxo-peptidbindung. Um dies zu ermöglichen, wurden in der Peptidchemie gebräuchliche Verfahren zur Verlängerung von Peptiden auf ihre Eignung für den Aufbau von Thioxo-peptiden untersucht.

Der *N*-terminale Schutz des Tripeptids erfolgte durch die acidolytisch entfernbare Boc-Gruppe. Im folgenden sollten geeignete, d. h. schonende, die Thioxofunktion im Peptidrückgrat erhaltende Abspaltungsbedingungen dieser Schutzgruppe gefunden werden. Hierzu wurden einige der konventionell zur Entfernung dieser Schutzgruppe in nichtmodifizierten Peptiden verwendeten Methoden untersucht. Das Thioxo-peptid wurde einer Abspaltungsreaktion mit

chlorwasserstoffgesättigten organischen Lösungsmitteln, wie EE, Dioxan und Eisessig (AcOH), sowie der Behandlung mit TFA bzw. TFA in DCM unterzogen. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben dieser Abspaltungsansätze mittels aHPLC und UV-Detektion des *para*-Nitroanilidchromophors bei 320 nm untersucht. Wie bei der Entschützung des Thioxotripeptids durch 4 M chlorwasserstoffhaltiges Dioxan zu erkennen ist, trat neben dem gewünschten Produkt H-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np ein zunehmender Anteil an Nebenprodukt auf (Abb. 9). Mit zunehmender Dauer der Entschützung erhöhte sich der Anteil an Nebenprodukt. Die Abspaltung der Boc-Gruppe mit chlorwasserstoffhaltigen Lösungen von EE (4 M) und von AcOH (1 M) sowie TFA, TFA/DCM (v,v 50/50) und TFA/H₂O (v,v 80/20) gelang ebenfalls quantitativ, doch trat auch hier in allen Fällen nach kurzer Zeit zu Lasten des thioxylierten Produktes ein steigender Anteil an Nebenprodukt auf.

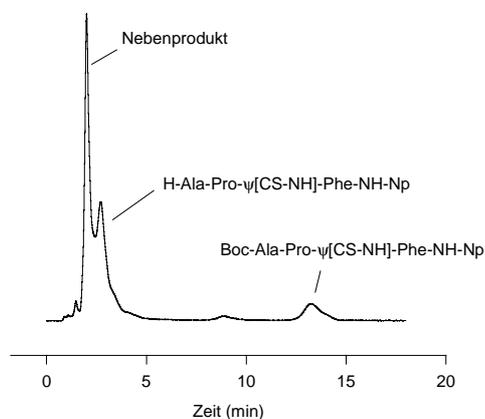


Abb. 9 Elutionsprofil einer aHPLC der Abspaltung des Boc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np mit 4 M HCl/Dioxan. Die Auftragung zeigt nach 20 min eine 91%ige Entschützung des Thioxopeptids, wobei neben 38% des gewünschten Produkts 61% Nebenprodukt auftreten. Bedingungen: RP18 (5 μm); 125x4 mm; 0–20 min 47%; 0.05% TFA; 1 ml/Min.; 320 nm.

Die UV-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchung dieses Nebenproduktes zeigte ein Absorptionsmaximum $\lambda_{\max} = 366$ nm mit einer Molmasse von $[M+H] = 331$. Detaillierte Untersuchungen dieses Nebenproduktes wurden nicht durchgeführt, doch läßt die massenspektrometrisch ermittelte Molmasse auf die Ausbildung eines schwefelhaltigen Heterozyklus vom Thiazol-5(4H)-on-Typ schließen (Abb. 10).

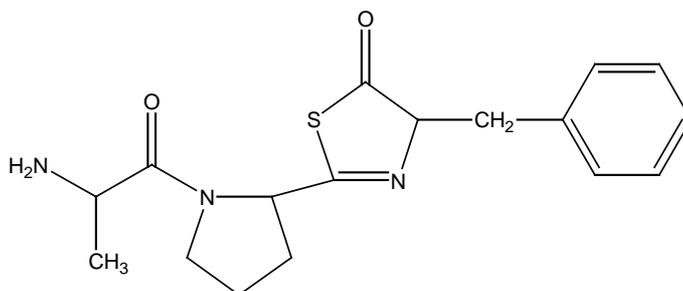


Abb. 10 Vermutete Struktur des bei der acidolytischen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von Boc-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np mit konventionellen Reagenzien auftretenden Nebenproduktes.

Um die auftretenden hohen Verluste während der Entschützung zu vermeiden, wurde gezielt nach alternativen Möglichkeiten einer milden Boc-Abspaltung gesucht. Schließlich erwiesen sich einige Lewis-Säuren (AlCl_3 , SnBr_4 und SnCl_4) als potente und gleichzeitig die sensitive Thiooxopeptidbindung schonende Reagenzien. Im direkten Vergleich der drei Lewis-Säuren zeigte SnCl_4 die höchste Effizienz der Abspaltungsreaktion. Da die Stärke einer Lewis-Säure abhängig vom entsprechenden Lösungsmittel ist, wurde das Abspaltungsvermögen des SnCl_4 in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln untersucht. Die effizienteste Entfernung der Boc-Gruppe konnte in ACN festgestellt werden (Abb. 11).

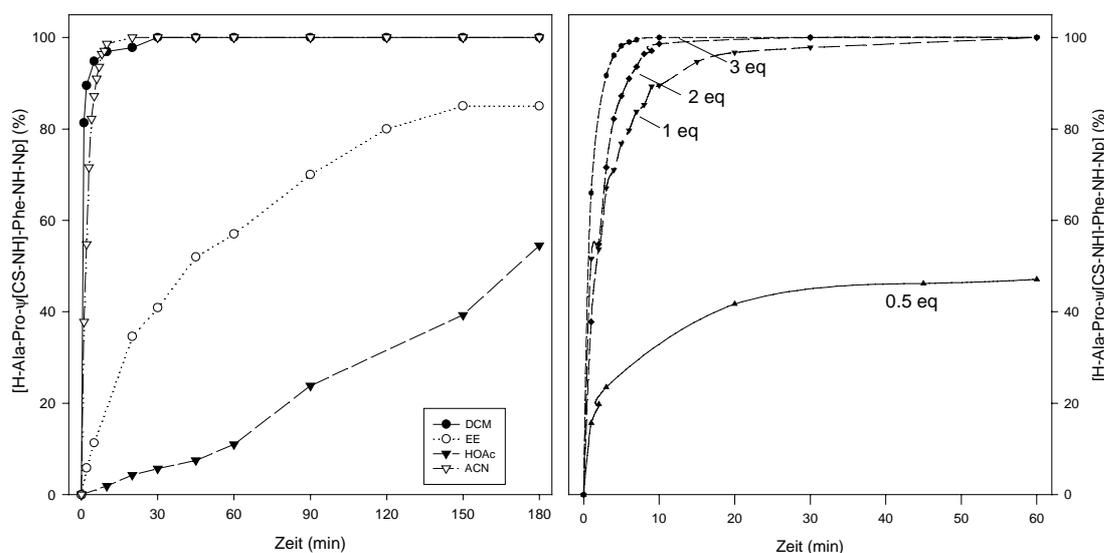


Abb. 11 (links) Zeitabhängige Bestimmung der Menge an Boc-entschütztem H-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np durch 2 Äq. SnCl_4 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel. **(rechts)** Zeitabhängige Bestimmung der Menge an Boc-entschütztem H-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np in Abhängigkeit von der SnCl_4 -Konzentration in ACN.

Die Effektivität des SnCl_4 in ACN wurde durch Behandlung von Boc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np mit unterschiedlicher Konzentration an Lewis-Säure in ACN bestimmt. Während 1 Äq. SnCl_4 die Boc-Gruppe nach 30 min vollständig vom Peptid abspaltet, vermögen dies geringere Konzentrationen an SnCl_4 nur partiell (0.25 Äq. nur 24% und 0.5 Äq. nur 47% nach 60 min deblockiert).

Im Vergleich der Abspaltungsreaktion des Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np mit der des thioxylierten Derivates Boc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np zeigte sich, daß die Schutzgruppe vom Thiooxopeptid schneller abgespalten wird als vom Oxopeptid. Während nach 3 min die Hälfte des geschützten Thiooxopeptids entschützt ist, benötigt das Oxopeptid ca. 5 min (Abb. 12).

Um die Verwendung von SnCl_4 in Gegenwart von Aminosäuren mit funktionellen Gruppen und die Orthogonalität zu anderen Schutzgruppen zu gewährleisten, wurden Trp- und Met-haltige Peptide sowie Peptide mit verschiedenen Schutzgruppen geprüft. Proben der Peptide Boc-Trp-Phe-NH-Np und Boc-Met-Pro-Phe-NH-Np wurden mit 2 und 10 Äq. SnCl_4 in ACN umgesetzt. Innerhalb von 10 min fand eine quantitative Deblockierung des Boc-Met-Pro-Phe-NH-Np statt. Im Untersuchungszeitraum

von 3 d konnten keine *tert.*-butylierten Nebenprodukte gefunden werden. Die Entschützung des Boc-Trp-Phe-NH-Np gelang nach 10 min quantitativ, jedoch wurde, wie massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, ein *tert.*-butyliertes Nebenprodukt gefunden. Sein Anteil betrug nach 10 min 8% und erhöhte sich nach 24 h auf 42%. In die Untersuchungen zur Orthogonalität wurden die säurelabilen Schutzgruppen (Z, Bpoc, Trt, *t*Bu und *O**t*Bu), die basenlabile Fmoc-Gruppe und die Pd(0)-katalyselablen Allyl-Gruppen (Alloc, OAll) einbezogen. Während die stark säurelabile Bpoc- und die Trt-Gruppe sehr rasch gespalten wurden, zeigten die *t*Bu- und *O**t*Bu-Gruppe ein gegenüber der Boc-Gruppierung deutlich verlangsamtes Abspaltungsverhalten. Die Z-, Fmoc- und Allyl-Gruppen erwiesen sich innerhalb der für die Boc-Spaltung nötigen Zeiträume (bis 30 min) als stabil.

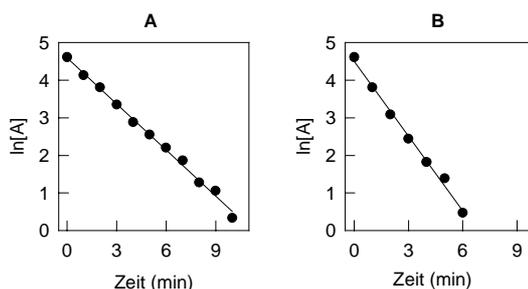


Abb. 12 Zeitabhängigkeit der Abspaltung der Boc-Gruppe des Peptids Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np (A) und seines Thioxoderivates Boc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (B) in Anwendung von 2 Äq. SnCl₄ in ACN bei 25°C.

Um mögliche Probleme mit SnCl₄ durch dessen Abbauprodukte bei nachfolgenden Verlängerungen der Thiopeptide auszuschließen, wurde die Abtrennbarkeit dieser Produkte untersucht. Das SnCl₄ und die entstehenden zinnhaltigen Verbindungen sind gut löslich in nichtpolaren Lösungsmitteln. Während die abgespaltenen *N*-terminal freien Thiopeptide in der Regel in wässrige Lösung extrahierbar sind, verbleiben die zinnhaltigen Verbindungen in der organischen Phase. Eine andere Möglichkeit besteht in der Aufnahme des eingeeengten Abspaltungsansatzes in Isopropanol und dem Ausfällen des *N*-terminal freien Thiopeptids durch Diethylether (Et₂O). Eine mittels ¹¹⁹Sn-NMR durchgeführte Untersuchung des SnCl₄-Gehaltes der Fällungen zeigte pro Fällung des Peptids eine Verminderung des Sn-Signals um ca. 50%. Nach vier Fällungen waren nur noch ca. 5% des ursprünglich, ohne Fällung des Peptids, detektierten Sn-Gehaltes feststellbar. Anhand der Untersuchung einer Reihe mit SnCl₄ entschützter Boc-Peptide konnte gezeigt werden, daß eine einmalige Fällung mit Et₂O ausreichend ist. Die Kettenverlängerung derart gewonnener Oxo- und Thiopeptide über ein gemischtes Anhydrid ergab in allen Fällen zinnfreie Produkte. Die Ausbeute der Kupplung von Boc-Ala-OH mit Ala-Pro-Phe-NH-Np (93%) war vergleichbar mit der für das konventionell mit 4 M HCl/AcOEt abgespaltene Tripeptid (90%). Bei der *N*-terminalen Verlängerung der Thiopeptide Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np, Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np und Ala-ψ[CS-N]-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np mit Boc-Ala-OH resultierten gute Ausbeuten (89%, 95% und 72%). Ebenso konnte gezeigt werden, daß eine Filtration über ein C₁₈-RP-Silicagel und anschließende Elution mit einer ACN-Wasser-Mischung bzw. eine Reinigung mittels pHPLC mit dem

Eluentensystem ACN-Wasser sehr effektive Methoden zur Entfernung der zinnhaltigen Verbindungen darstellen.

Eine große Bandbreite von Reagenzien ist zur Entfernung der Boc-Gruppe bekannt: Schwefelsäure in Dioxan [150]; trockener Fluorwasserstoff [151]; Bortrifluordiethyletherat in AcOH [152], Trimethylsilyltriflat [153], Trimethylsilylperchlorat [154]; Trimethylsilyliodid in Chloroform [155] oder ACN [156]; Cer-Ammoniumnitrat in ACN [157]. Gewöhnlich werden zur Abspaltung chlorwasserstoffgesättigte organische Lösungsmittel, wie EE [158], Dioxan und AcOH, sowie TFA [159] bzw. TFA in Dichlormethan [159] eingesetzt. Für „normale“ Peptide sind dies milde und zuverlässige Abspaltungsbedingungen. Während für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von Thiopeptiden bisher keine gravierenden Probleme beschrieben wurden, berichten verschiedene Autoren von drastischen Ausbeuteverlusten durch Thiazolonbildung bei der acidolytischen Entfernung der Z-Schutzgruppe von Thiopeptiden [39, 40] (Abb. 3). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte für prolinhaltige Thiopeptide unter den Bedingungen der konventionellen Boc-Abspaltung ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit gezeigt werden. Die Verwendung konventioneller Abspaltungsreagenzien führte an den untersuchten Thiopeptiden zu einem hohen Anteil an Nebenprodukt, welches als Thiazolon identifiziert wurde. Mit dem Ersatz der konventionellen Abspaltungsreagenzien durch die Lewis-Säure SnCl_4 konnte in allen untersuchten Fällen das Thiopeptid mit hoher Ausbeute entschützt werden. Es zeigte sich, daß stöchiometrische Mengen von SnCl_4 erforderlich sind und mit zunehmender Konzentration an SnCl_4 die Abspaltungsreaktion beschleunigt wird. Eine Menge von 2 Äq. SnCl_4 in ACN erwies sich als optimal zur Deblockierung von Boc-geschützten Thiopeptiden. Die Erfordernis stöchiometrischer Mengen an Lewis-Säure und die bei der Abspaltung zu beobachtende leichte Gasentwicklung legen die Vermutung nahe, daß ein zwischen der Lewis-Säure und dem *tert.*-butyl-*N*-Alkylcarbamat gebildeter Chelatkomplex (katalytischer Komplex, Abb. 13) unter solvolytischem Verlust von Isobuten und CO_2 schließlich zum freien Peptid führt.

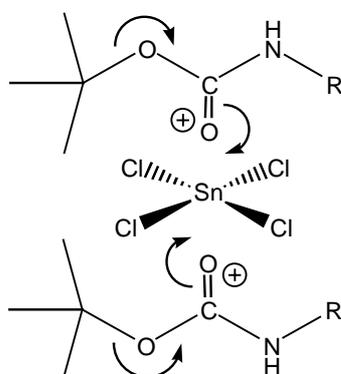


Abb. 13 Hypothetischer, zwischen SnCl_4 und dem Carbonylsauerstoff zweier Boc-Urethane gebildeter katalytischer Komplex, welcher zur Entfernung der Boc-Gruppe durch die Lewis-Säure führt.

Die Lewis-Säure SnCl_4 ist ein Elektronenpaarakzeptor und bildet mit Verbindungen, welche ein Elektronenpaar donieren (O-, N- oder S-haltige Verbindungen) 1:1 oder 1:2-Addukte [160, 161].

Durch spektroskopische Untersuchungen ist bekannt, daß in solchen sp^3d^2 -hybridisierten Komplexen das zentrale Zinnatom von zwei Peptidmolekülen umgeben ist (Abb. 13) [162]. Eine Isolierung und Charakterisierung dieses katalytischen Komplexes gelang nicht. Da bereits 1 Äq. $SnCl_4$ zur vollständigen Entschützung ausreicht, ist davon auszugehen, daß nur geringe Mengen an $SnCl_4$ zur Bildung des katalytischen Komplexes mit nachfolgender rascher Boc-Abspaltung verbraucht werden. Der verbleibende Anteil des $SnCl_4$ bindet unter Bildung eines zweiten Komplexes (stöchiometrischer Komplex) an die *N*-terminale Aminogruppe des Produkts. Eine mittels ^{119}Sn -NMR durchgeführte Untersuchung zum Zinn-Gehalt der ausgefällten, entschützten Peptide legt das Auftreten dieses zweiten Zinn-Peptid-Komplexes nahe. Dieser stöchiometrische Komplex zwischen $SnCl_4$ (oder dessen Abbauprodukten) und dem *N*-terminal freien Peptid würde auch die festzustellende, stark reduzierte Neigung zur Nebenproduktbildung und die hohe Stabilität der freien Thioxopeptide erklären. Ebenso könnte dieser stöchiometrische Komplex den Befund erklären, daß bei Abspaltung mit 0.5 Äq. $SnCl_4$ nur ca. 50% Umsatz detektierbar sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit reichen zur Abspaltung der Boc-Gruppe katalytische Mengen an $SnCl_4$, welches nach Boc-Entfernung mit dem freien *N*-Terminus des Peptids komplexiert. Da dieser stöchiometrische Komplex thermodynamisch stabiler ist als der katalytische Komplex, wird mit Fortschreiten der Abspaltung ein Teil des $SnCl_4$ deaktiviert und steht nicht mehr als Abspaltungsreagenz zur Verfügung.

2.2. Darstellung thioxylierter β -Casomorphin-7-Derivate

Basierend auf Untersuchungen an dem oben vorgestellten Modelltripeptid sollte die Einführung der Thiopeptidbindung in biologisch aktive Oligopeptide analysiert werden. Zur Darstellung von thioxylierten β -Casomorphin-7-Derivaten wurden Methoden zur selektiven Modifizierung von Oligopeptiden durch Thioxylierung und Baustein-Thioxylierung verglichen. Hierbei wurden eine Reihe von Reagenzien, Lösungsmitteln und Reaktionsbedingungen am β -Casomorphin-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) getestet. Unter Variation der Kupplungsmethoden und Schutzgruppen sollte weiterhin eine geeignete Synthesestrategie für die Baustein-Thioxylierung von Oligothiopeptiden gefunden werden. Hierzu eröffneten sich drei Möglichkeiten:

1. Nach Darstellung des geschützten Heptapeptids wird dieses den Bedingungen einer O/S-Austauschreaktion unterworfen. Nach Trennung des Produktgemisches muß die Position der Thiopeptidbindung auf analytischem Wege (NMR, MS) ermittelt werden.
2. Eine Darstellung der gewünschten thioxylierten Derivate mittels Baustein-Thioxylierung erlaubt die vorherige Festlegung der Thioxylierungsposition. Hierzu werden spezifisch thioxylierte Peptidbausteine synthetisiert und mittels Segmentkondensation in die Peptidkette eingefügt.
3. Eine dritte Möglichkeit der Einführung der Thiofunktion ist durch Thioacylierung mit geeigneten Aminosäurederivaten gegeben.

2.2.1. Untersuchungen zur Thioxylierung des geschützten Oligopeptids

Das als Ausgangsmaterial verwendete geschützte β -Casomorphin-7 - ausschließlich des Urethan- und Alkylestercarbonyls – enthält sechs mögliche Positionen für einen O/S-Austausch. Durch Variation der Thioxylierungsreagenzien, Lösungsmittel, der Temperatur und der Reaktionsdauer sollten Bedingungen gefunden werden, die die Monothioxylierung einer gewünschten Position im Peptid ermöglichen.

Hierzu wurde das geschützte Heptapeptid folgenden Reaktionsbedingungen unterworfen:

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll		
<i>Thioxylierungsreagenz</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Temperatur</i>
(1)	DME	-40 bis -20°C
(2a)	THF	0°C
(2b)	Toluol	25°C
(3)		50°C
(4)		65°C
(5)		100°C
(6)		120°C
(7)		
(8)		
(9b)		

Einfluß des Reagenzes, des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Regioselektivität

Zur Ermittlung der Reaktivität des geschützten Heptapeptids wurden 2.4 Äq. **(3)** in THF bei 50°C eingesetzt. Durch aHPLC und UV-Detektion bei 220 nm waren neben vier monothioxylierten β -Casomorphin-7-Derivaten auch di- und trithioxylierte Produkte feststellbar (Abb. 14).

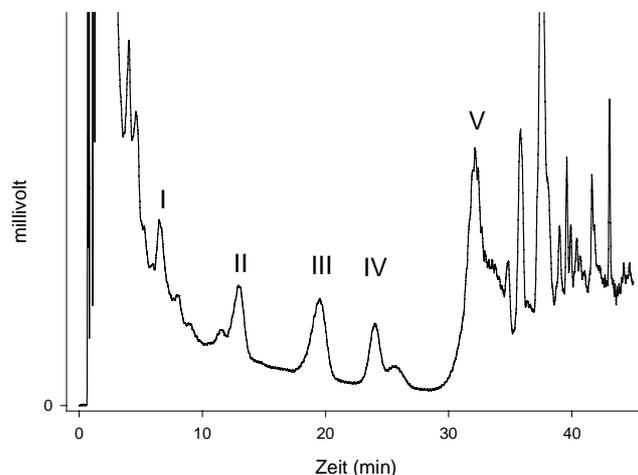


Abb. 14 HPLC-chromatographisches Elutionsprofil der Thioxylierung von Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll in THF, 2.4 Äq. **(3)**, 50°C, nach 2 h. Bei 220 nm sind neben dem Ausgangsstoff (I) vier monothioxylierte (II, III, IV, IVa) und ein Gemisch von mehrfach thioxylierten Derivaten und Nebenprodukten detektierbar (V) (siehe Tabelle 2). Bedingungen: RP18 (5 μ m); 125x4 mm; 0–30 min 47%, 30–45 min auf 100% ACN; 0.05% TFA; 1 ml/min; 220 nm.

Über eine massenspektrometrische Analyse (Kapitel 3.1.) der erhalten thioxylierten Heptapeptide konnten für folgende Retentionszeiten der Thioxoepptide die thioxylierten Carbonyle identifiziert werden:

	Retentionszeit in min	Thioxylierungsort
I	6,4	nicht umgesetztes Oxo peptid
II	12,8	-Gly- ψ [CS-N]-Pro- Gly ⁵
III	19,4	-Pro- ψ [CS-NH]-Gly- Pro ⁴
IV,IVa	23,9	-Pro- ψ [CS-NH]-Phe- und -Phe- ψ [CS-N]-Pro- Pro ² ; Phe ³
V	32-40	di- und trithioxylierte Peptide + Nebenprodukte

Tabelle 2 Retentionszeiten der thioxylierten β -Casomorphin-7-Derivate des in Abb.14 abgebildeten aHPLC-Profiles, deren Thioxylierungspositionen mittels massenspektrometrischer Fragmentierung ermittelt wurden.

Während die Zuordnung der monothioxylierten Peptide durch massenspektrometrische Fragmentierung möglich war, erschwerte die schlechte Trennbarkeit der mehrfach thioxylierten Verbindungen verbunden mit auftretenden Nebenprodukten die Zuordnung der thioxylierten Carbonyle.

Der Vergleich der untersuchten Lösungsmittel zeigte, daß die Löslichkeit aller Reagenzien in Toluol unterhalb 50°C stark eingeschränkt, in THF und DME unterhalb 50°C hingegen gut bis sehr gut ist.

Die Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die Regioselektivität der Thioxylierungsreaktion wurden bei -40 bis -20, 0, 25, 50 und 65°C in THF unter Verwendung der oben genannten Reagenzien durchgeführt. Während im Temperaturbereich von 65°C (Siedepunkt des THF) bis 120°C (in Toluol untersucht) neben mehrfach thioxylierten und Nebenprodukten nahezu keine monothioxylierten

Peptide erhältlich waren, zeigte die Thioxylierung bei 50°C einen Anteil von ca. 32-40% dithioxylierter und Nebenprodukte neben vier monothioxylierten Derivaten (Tabelle 2).

Bei Absenkung der Reaktionstemperatur auf 25°C ist unter Abnahme der Neigung zur Mehrfachthioxylierung und Nebenproduktbildung eine ähnliche Produktverteilung zu finden. Ein weiteres Absenken der Reaktionstemperatur auf 0°C bewirkt, unter weiterer Verringerung der Dithioxylierung, eine verstärkte Regioselektivität des O/S-Austausches (Tabelle 3). Während für die nichthalogenierten Reagenzien vom Yokoyama-Typ, (7) und (8), eine bevorzugte Monothioxylierung der Gly⁵-Position gezeigt werden konnte, thioxylieren P₄S₁₀ und (5) bevorzugt die Pro⁴-Position. (6) und (9b) neigen zur Dithioxylierung. Reagenzien vom Lawesson-Typ, (3) und (4), zeigen bei dieser Temperatur eine stark verminderte Reaktivität.

Thioxylierungsreagenz	Dauer (h)	Edukt (%)	-Gly ⁵ -ψ[CS-N]-Pro ⁶ - (%)	-Pro ⁴ -ψ[CS-NH]-Gly ⁵ - (%)	dithioxylierte Derivate (%)
(1)	3	96	0	4	0
	24	20	10	60	20
(2a),(2b)	3	100	0	0	0
	24	100	0	0	0
(3)	3	100	0	0	0
	24	70	15	12	3
(4)	3	90	6	4	0
	24	70	16	12	2
(5)	3	90	2	7	1
	24	34	22	39	5
(6)	3	96	0	0	4
	24	86	8	2	4
(7)	3	85	12	3	0
	24	26	67	7	0
(8)	3	52	32	10	6
	24	38	50	10	2
(9b)	3	62	2	4	31
	24	51	3	8	38

Tabelle 3 Produktverteilung der Thioxylierung von Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll in THF bei 0°C nach 3 und 24 h mit 2.4 Äq. des angegebenen Thioxylierungsreagenz. Die angegebenen Ausbeuten wurden mittels UV-Detektion in der aHPLC bei 220 nm bestimmt. Bedingungen: RP18 (5 µm); 125x4 mm; 0–30 min 47%, 30-45 min auf 100% ACN; 0.05% TFA; 1 ml/min

Zwei der regioselektiv wirksamsten Reagenzien wurden unter weiterer Verringerung der Reaktionstemperatur bei -40 bis -20°C untersucht. Bei Thioxylierung mit (8) konnte eine nahezu quantitative Monothioxylierung der Gly⁵-Position detektiert werden (95 % -Gly-ψ[CS-N]-Pro- neben 5 % -Pro-ψ[CS-NH]-Gly- bei 92 %igem Umsatz des Edukts). Bei Verwendung von P₄S₁₀ konnte die

Regioselektivität für die Pro⁴-Position auf 76 % erhöht werden. Daneben wurden 15 % -Gly-ψ[CS-N]-Pro- und 9 % dithioxyliertes Produkt gefunden. Das Edukt wurde aber nur zu 52 % umgesetzt.

Anfängliche Untersuchungen zur Reaktivität des Heptapeptids unter Verwendung von **(3)**, in THF und Toluol bei 25 und 50°C zeigten, daß unter Verwendung der reaktionstheoretisch für den O/S-Austausch notwendigen Menge an Thioxylierungsreagenz ein Umsatz von weniger als 10% zu beobachten ist. Für den isosteren Austausch eines Carbonylsauerstoffs gegen Schwefel sind innerhalb der Peptidkette 0.5 Äq. Thioxylierungsreagenz nötig [11, 14, 25, 163]. (Gewöhnlich wird das Reagenz im leichten Überschuß von 0.6 Äq. eingesetzt.) So wird bei der Diskussion zum Mechanismus der Thioxylierungsreaktion mit **(3)** davon ausgegangen, daß in Gegenwart von Carbonylen das Thioxylierungsreagenz in zwei dipolare Aryl-Dithiophosphor-Monomere dissoziiert (Abb. 15). Die Elektrophilie des geladenen Phosphoratoms ermöglicht den Angriff eines Elektronendonators und damit die Ausbildung des Intermediates **A**, das über eine zyklische Thioketalstruktur **B** in eine Thioxocarbonylverbindung und das Thiometaphosphonat **C** zerfällt [22, 26, 163-166]. Erst bei Verwendung der vierfachen Menge (2.4 Äq.) an Thioxylierungsreagenz erfolgte eine annehmbarer Umsatz des geschützten Heptapeptids. Es ist davon auszugehen, daß für die Thioxylierung von Di- und Tripeptiden 0.6 Äq. Reagenz ausreichend sind, jedoch für längere Peptide bzw. für bestimmte Peptidsequenzen eine höhere Menge an Thioxylierungsreagenz eingesetzt werden muß. Entgegen Berichten von Yde *et al.* [25] erbrachten Reaktionen in DME im Vergleich zu Toluol oder THF wesentlich niedrigere Ausbeuten. Für Thioxylierung in einem Temperaturbereich von 0–60°C ist THF als gut geeignetes Lösungsmittel anzusehen. Muß bei höheren Temperaturen gearbeitet werden (Probleme bei der Löslichkeit bzw. Reaktionsfähigkeit der Edukte) eignet sich Toluol hervorragend.

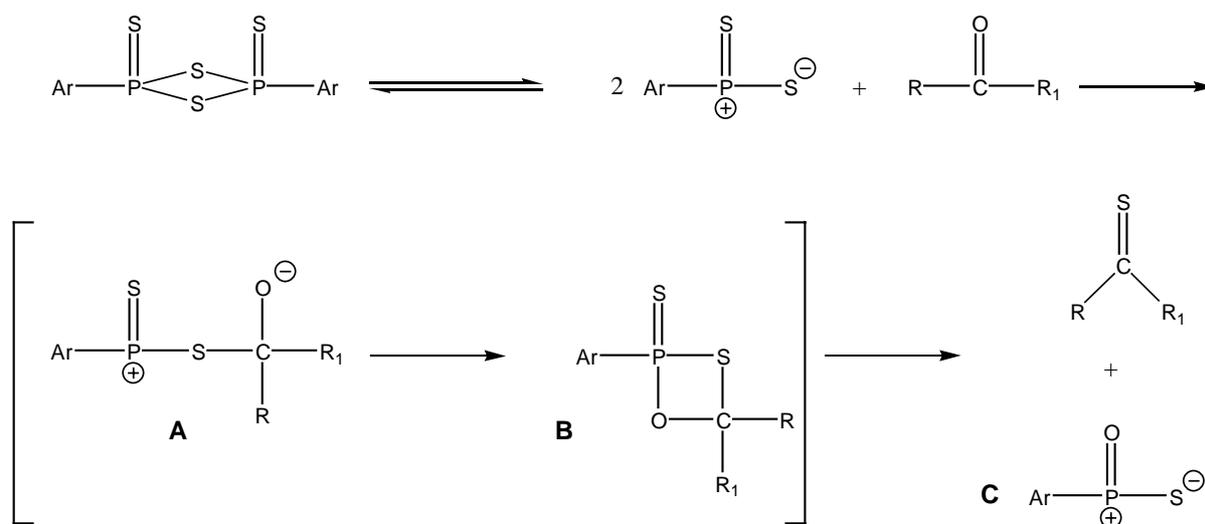


Abb. 15 Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus der Thioxylierung einer Carbonylkomponente durch **(3)** über Intermediate vom Wittig-Typ [164].

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß ein regioselektiver O/S-Austausch innerhalb eines Oligopeptids nur bedingt möglich ist. In den untersuchten Reaktionsansätzen des Heptapeptids

konnten lediglich vier monothioxylierte Produkte nachgewiesen werden. Das Tyr¹-, Pro⁶- und Ile⁷-Derivat wurde nicht gefunden. Somit beschränkt sich die Regioselektivität dieser Reaktion zunächst auf die vier verbleibenden thioxylierbaren Peptidbindungen. Eine Variation der Reagenzien und der Lösungsmittel zeigte bei Temperaturen oberhalb von 0°C keine bedeutende Auswirkung auf die Verteilung der Produkte. Durch Absenken der Reaktionstemperatur auf 0°C bzw. -20 - -40°C gelang jedoch die annähernd regioselektive Thioxylierung zweier Peptidbindungen. Da es sich hier mit der Pro⁴- und der Gly⁵-Bindung um die beiden auch bei höheren Temperaturen bevorzugt thioxylierbaren Carbonyle handelt, stellt die Thioxylierung bei niedriger Temperatur zwar eine Möglichkeit zum selektiven bzw. bevorzugten Erhalt eines monothioxylierten Produktes dar. Ein regioselektiver O/S-Austausch jedes beliebigen Carbonylsauerstoffs ist dadurch jedoch nicht gegeben.

Abschließend bleibt festzustellen, daß die Regioselektivität einer Thioxylierungsreaktion in hohem Maße vom umzusetzenden Peptid abhängig ist und durch Variation der Thioxylierungsreagenzien und/oder der Reaktionsbedingungen lediglich die vom O/S-Austausch bevorzugten Peptidbindungen selektiv thioxyliert werden können. Weiterhin wird deutlich, daß nicht jede Peptidbindung unter den untersuchten Bedingungen thioxylierbar ist und somit nicht von vornherein ein regioselektiver O/S-Austausch eines Carbonylsauerstoffs im Peptidrückgrat möglich ist. Eine regioselektive Einführung der Thioxopeptidbindung in eine beliebige Position des Peptids kann somit nur mittels Kondensation thioxylierter Peptidbausteine oder durch Thioacylierung erreicht werden.

Einfluß der Reaktionsdauer auf die Mehrfachthioxylierung und die Nebenproduktbildung

Bei Zunahme der Reaktionsdauer der Thioxylierungsreaktion erhöhte sich der Anteil an mehrfach thioxylierten Peptiden und Nebenprodukten. Besonders bei Reaktionstemperaturen oberhalb 50°C wurde dies noch beträchtlich verstärkt. Zur Untersuchung dieses Umstandes wurden diskontinuierlich Proben aus Thioxylierungsansätzen entnommen, mittels spHPLC aufgetrennt und durch massenspektrometrische Fragmentierungen analysiert. Hierbei zeigte sich, daß nach dem Auftreten von dithioxylierten Derivaten, neue Produkte auftraten. Diese wiesen gegenüber der monothioxylierten Verbindung eine Molmasse von [M-2] auf. Bei Zunahme der Reaktionszeit konnten unter Abnahme der mono- bzw. dithioxylierten Peptide ebenfalls dithioxylierte Produkte mit einer Massendifferenz [M-2] detektiert werden. Die massenspektrometrische Untersuchung durch Fragmentierung zeigte, daß es sich hierbei um Verbindungen mit Thiazolonstruktur handelt.

Wipf *et al.* berichtet bei der Thioxylierung von offenkettigen Diamiden ebenfalls von Thiazolonbildung, welche er auf Dithioxylierung mit anschließendem Ringschluß zum Heterozyklus zurückführt [28]. Aus Untersuchungen von Cava [164] und Cherkasov [166] ist bekannt, daß (3) unter bestimmten Bedingungen (hohe Temperatur, lange Reaktionszeit) zur Bildung von Trimeren neigt (Abb. 16). Die entstehenden Metathiophosphonate können bei geringen Mengen Feuchtigkeit die Acidität der Reaktionslösung erhöhen und damit die Thiazolonbildung aus dithioxylierten Verbindungen begünstigen [5, 26].

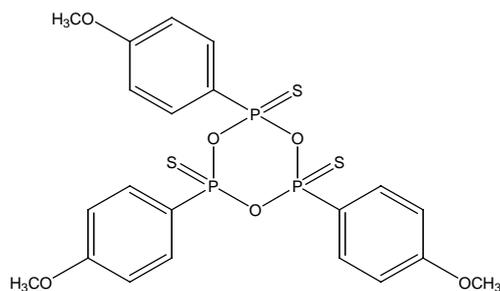


Abb. 16 Aus Thioxylierungen mit langer Reaktionsdauer und/oder hoher Reaktionstemperatur resultierendes Folgeprodukt des **(3)** [164].

Bei Einhaltung kurzer Reaktionszeiten, der Vermeidung von überschüssigem Thioxylierungsreagenz und der Verwendung trockener Lösungsmittel unter Schutzgasatmosphäre ist die Bildung dieser Trimere stark eindämmbar bzw. zu verhindern. Auch können Puffersubstanzen, wie 1,1,3,3-Tetramethylthioharnstoff, einer Acidifizierung des Reaktionsansatzes entgegenwirken.

2.2.2. Aufbau monothioxylierter β -Casomorphin-7-Derivate über thioxylierte Peptidbausteine

Wie gezeigt wurde, ist eine regioselektive Einführung des Schwefels in ein Oligopeptid nur in wenigen Fällen möglich und hierbei auf ganz bestimmte Peptidbindungen beschränkt. Die Probleme der Regioselektivität mit O/S-Austausch-Reagenzien umgehend, gestattet die Verknüpfung von thioxylierten Peptidsegmenten die selektive Einführung einer Thioxopeptidbindung. Der synthetisch vertretbare Aufwand zur Darstellung dieser Bausteine beschränkt sich auf Thioxodi- und -tripeptide. Bei Thioxylierung von Dipeptiden ist unter Blockierung des *N*-Terminus durch Schutzgruppen vom Urethantyp und des *C*-Terminus durch Alkylester nur das Carbonyl der Peptidbindung als Thioxylierungsposition gegeben.

Eine große Bedeutung für eine erfolgreiche Segmentverknüpfung kommt der richtigen Unterteilung des Zielpeptids zu. Die Festlegung der Verknüpfungsstellen sollte nach dem geringsten Racemisierungsrisiko erfolgen und eine komplikationsfreie Fragmentkondensation ermöglichen. Zur Ausschaltung der Racemisierung ist eine Unterteilung an achiralen Aminosäuren, wie Glycin und α -Aminobuttersäure, sowie der Iminosäure Prolin am günstigsten. Das zu derivatisierende β -Casomorphin-7 enthält in den Positionen (2), (4) und (6) die Iminosäure Prolin. Für die Synthese folgender β -Casomorphin-7-Derivate



wurden die Bausteine $\text{-Tyr}^1\text{-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro}^2\text{-}$, $\text{-Phe}^3\text{-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro}^4\text{-}$ und $\text{-Gly}^5\text{-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro}^6\text{-Ile}^7$ ausgewählt (Abb. 17).

Entsprechend den synthesesaktischen Erfordernissen mußten zum Schutz der Amino- und Carboxylgruppen der zu verknüpfenden Peptidsegmente temporäre und konstante Schutzgruppen eingesetzt werden. Die temporären Schutzgruppen dienen der vorübergehenden Blockierung der

Amino- bzw. Carboxylfunktionen, die am Peptidknüpfungsschritt unmittelbar beteiligt sind. Sie müssen daher selektiv und ohne Beeinträchtigung der Stabilität bereits vorhandener Peptid- und Thiopeptidbindungen sowie konstanter Schutzgruppen von Drittfunktionen abspaltbar sein. Die konstanten Schutzgruppen werden am Ende aller Segmentverknüpfungen mittels globaler Finalabspaltung entfernt.

Zur konstanten Blockierung der N^α -Aminofunktion des Tyr¹ wurde die Eignung folgender Aminoschutzgruppen auf der in der praktischen Peptidsynthese bewährten Carbamidsäureesterbasis untersucht: Fmoc-, Z-, Boc- und die Allyloxycarbonyl (Alloc) -Gruppe.

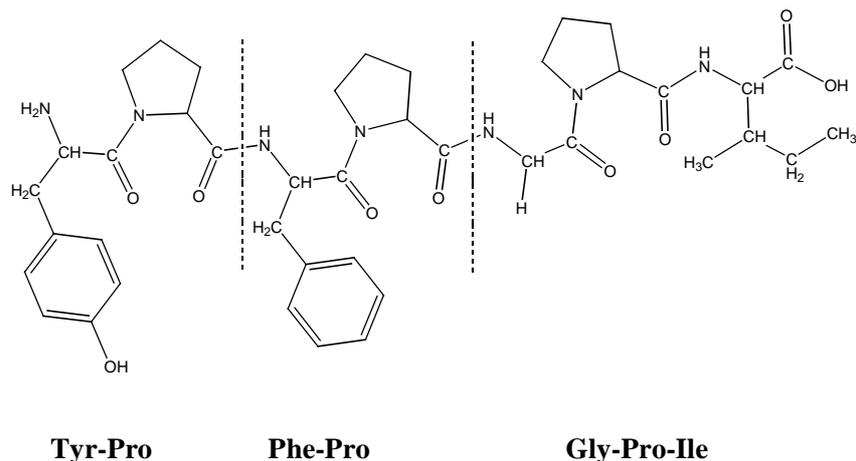


Abb. 17 Gewählte Peptidbausteine zur Darstellung der monothioxylierten β -Casomorphin-7-Derivate, welche eine Baustein-Thioxylierung über racemisierungsfreie Fragmentkondensation ermöglichen.

Während die Boc-Gruppe aufgrund mangelnder Orthogonalität zum *tert.*-Butylester (*OtBu*) keine Verwendung finden konnte, schieden auch die Fmoc- und Z-Gruppe infolge zu hoher Ausbeuteverluste bezüglich der Thioxyfunktion bei ihrer Abspaltung aus. Als Alternative wurde die säure- und basenstabile Alloc-Schutzgruppe eingesetzt. Diese wird über Chlorameisensäureallylester unter Schotten-Baumann-Bedingungen eingeführt und ist durch hydrostannolytische Abspaltung mittels Palladium(0)-katalysiert abspaltbar (Abb. 18) [167].

Im Sinne einer globalen Finalabspaltung aller konstanten Schutzgruppen wurde zur konstanten Blockierung des C-Terminus und der aromatischen Hydroxyfunktion im Tyr¹ ein ebenfalls Palladium(0)-katalysiert abspaltbare Allylrest (OAll) eingesetzt. Da die Synthese von Alloc-Tyr(OAll)-OH aber nur in sehr geringer Ausbeute (12%) gelang, wurde der durch Doppelallyloxycarbonylierung des Tyr¹ erhaltene Synthesebaustein Alloc-Tyr(Alloc)-OH eingesetzt. Neben den konstant blockierten Amino- und Carboxylfunktionen des Peptids waren folgende Peptidfragmente temporär zu blockieren (Tabelle 4).

Die temporäre Blockierung der N^α -Aminofunktion der Peptidsegmente erfolgte in allen Fällen durch die mittels SnCl₄ in ACN [168] sehr mild entfernbare Boc-Gruppe. Für die temporäre Blockierung der Carboxylfunktionen (OR) der Peptidsegmente wurde die Eignung alkalisch verseifbarer OMe bzw. acidolytisch abspaltbarer *OtBu*-Ester untersucht.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OR	Boc-Phe-Pro-OR	Boc-Gly-Pro-Ile-OAll
Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-OR	Boc-Phe-ψ[CS-N]-Pro-OR	Boc-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll
Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-OR		
Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-OR		
Alloc-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-OR		

Tabelle 4 Die Darstellung der drei monothioxylierten β-Casomorphin-7-Derivate erfolgte durch Verknüpfung dieser Peptidsegmente. Zur Blockierung der N^ε-Aminofunktionen wurde die Alloc-Gruppe als konstante und die Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe verwendet. Die Blockierung der Carboxylfunktionen erfolgte konstant mittels OAll-Gruppe und temporär (OR) mittels OMe oder OtBu-Schutzgruppe.

Anhand des Thioxodipeptidbausteins Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]Pro-OMe wurde die Stabilität von Thioxodipeptiden unter den Bedingungen einer alkalischen Verseifung untersucht. Die basischen Reaktionsbedingungen führten neben der Entfernung des C-terminalen Methylesters auch zu einer Entschützung der Tyr¹-Seitenkette. Die C-terminale Verlängerung der Thioxopeptidfragmente mit ungeschützter Hydroxylfunktion im Tyr¹ gelang jedoch in allen Fällen ohne nachweisbare Nebenreaktion. Die Verseifung des OMe gelang mittels äquimolaren Mengen Peptid-NaOH (1 Äq. für OMe + 1 Äq. für Alloc) innerhalb 1 h in allen drei untersuchten Alkoholen nicht vollständig. Bei Erhöhung der Basenkonzentration war in allen untersuchten Alkoholen die Verseifung innerhalb dieses Zeitraumes nahezu quantitativ. Nebenprodukte bzw. Dethioxylierung konnten nicht festgestellt werden (Tabelle 5).

Reagenzien	Alloc-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-OH	Alloc-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-OH
4 N NaOH/MeOH (2 Äq.)	30%	nicht untersucht
4 N NaOH/MeOH (10 Äq.)	89%	5%
4 N NaOH/EtOH (2 Äq.)	25%	nicht untersucht
4 N NaOH/EtOH (10 Äq.)	88%	33%
4 N NaOH/Isopropanol (2 Äq.)	26%	nicht untersucht
4 N NaOH/ Isopropanol (10 Äq.)	94%	35%

Tabelle 5. Vergleich der alkalischen Verseifung von Thioxodi- und -tetrapeptidmethylestern unter Variation des Alkohols und der Alkalikonzentration. Die Bestimmung der Ausbeute an C-terminal entschützten Di- und Tetrapeptiden erfolgte nach jeweils 1 h mittels UV-Detektion bei 267 nm in der aHPLC.

Anhand des Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-OMe sollte die Stabilität längerer, thioxylierter Peptidbausteine gegen die alkalischen Verseifungsbedingungen geprüft werden (Tabelle 5). Der Vergleich der Verseifungsausbeuten zwischen Thioxodi- und -tetrapeptid zeigt, daß längere Thioxopeptide bedeutend empfindlicher auf stark basische Abspaltungsbedingungen reagieren und hierbei die Ausbeute an C-terminal ungeschützten Thioxopeptiden stark verringert wird.

Unter Einsatz acider Reagenzien wurde die Entfernung der säurelabilen OtBu-Schutzgruppe von Thioxodi- und tetrapeptiden untersucht.

Die Abspaltung verlief in allen Fällen sehr schnell. Die für das Thioxodipeptid erhaltenen Ausbeuten deuten (bis auf eine Ausnahme) auf deren hohe Stabilität gegenüber acidolytischen Reaktionsbedingungen hin (Tabelle 6). Die Thioxotetrapeptide dagegen zeigten gegenüber den Abspaltungsbedingungen deutlich stärkere Empfindlichkeit. Lediglich bei Verwendung von SnCl₄ wurde eine gute Ausbeute gefunden.

Reagenz	Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-OH	Alloc-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-OH
TFA	86%	12%
TFA/DCM (1:1)	87%	13%
SnCl ₄ /ACN (5 Äq.)	95%	86%
HFIP/DCM (1:4, v/v)	75%	nicht untersucht
Iodotrichlorsilan	0%	nicht untersucht
TFA/DCM/Thioanisol (1:1:0.2)	90%	35%

Tabelle 6. Vergleich der sauren Hydrolyse der C-terminalen *OfBu*-Schutzgruppe von Thioxodi- und -tetrapeptidestern mit verschiedenen acidolytischen Deblockierungsmitteln. Die Bestimmung der angegebenen Ausbeuten erfolgte nach Entfernung der Abspaltungsreagenzien nach 20 min mittels UV-Detektion in der aHPLC bei 267 nm.

Der für die Darstellung des Gly⁵-thioxylierten β-Casomorphin-7 benötigte Thioxopeptid-Baustein wurde als Tripeptid eingeführt. Die Sequenz Gly-Pro-Ile-OAll gestattete eine selektive Thioxylierung der Gly-Pro-Bindung unter Verwendung von (8) in THF bei 20°C. Die Entschützung der Aminogruppe erfolgte in hoher Ausbeute (95%) mittels SnCl₄/ACN.

Während die temporäre Blockierung der Amino- und Carboxylfunktionen der Peptidsegmente durch base- und säurelabilen Schutzgruppen erfolgte, wurden zur konstanten Blockierung orthogonale Alloc- und OAll-Schutzgruppen verwendet. Die Einführung des Thioxocarboxyls in allyl-geschützte Peptide gelang ohne Nebenreaktion, die allyloxycarboxylierte Tyr¹-Seitenkette erwies sich unter den Thioxylierungsbedingungen (THF/40°C/(3)) stabil. Die hydrostannolytische Entfernung der Alloc/OAll-Schutzgruppen sollte unter Erhalt der Thioxofunktion in einem finalen Abspaltungsschritt erfolgen. Allylcarbamate und -ester werden in Gegenwart eines löslichen Palladiumkatalysators (üblicherweise Pd(PPh₃)₄) und eines Nucleophils, das als *scavenger* fungiert, gespalten (Abb. 18).

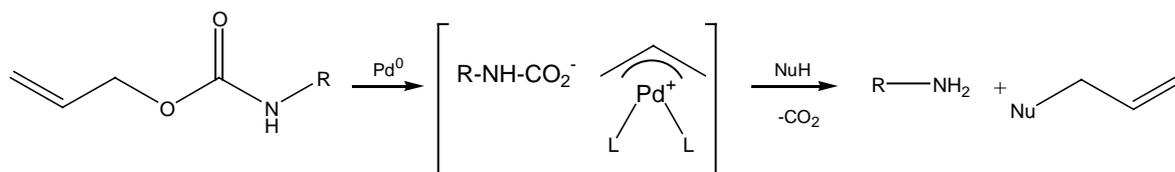


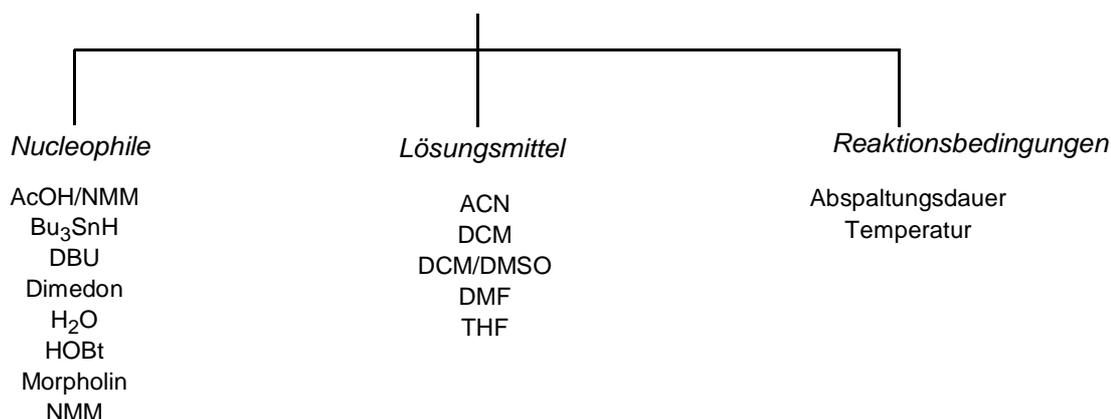
Abb. 18 Schema der Pd(0)-katalysierten Entfernung der N-terminalen Alloc-Schutzgruppe eines Peptids. L = Ligand, Nu = Nucleophil.

Um Bedingungen zur Abspaltung der allylierten Schutzgruppen unter Erhalt der Thiopeptidbindung zu finden, wurden folgende Reaktionsbedingungen untersucht:

Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll



Bezüglich der Stabilität der Thiofunktion im Peptid konnte für die Abspaltungsdauer ein großer Einfluß nachgewiesen werden. Je langsamer die Abspaltung vonstatten ging, desto mehr verringerte sich die Ausbeute an entschütztem Thiopeptid. Bei Verwendung der „Allylaketoren“ H₂O und Dimedon erfolgte nur geringe Deblockierung. Während NMM, NMM/AcOH und Bu₃SnH nur zu einer unvollständigen Entfernung der Allyl-Blockierung führten, dethioxylierten DBU und Piperidin die Thiopeptide. Erst der Einsatz von Morpholin oder HOBt führte zu den gewünschten deblockierten Thiopeptiden. Die Verwendung von Morpholin ist aber durch die Tendenz zur Dethioxylierung nur eingeschränkt zu empfehlen. Jedoch bei Abspaltung mittels Pd(0)/HOBt erwiesen sich die thioxylierten Heptapeptide bei einer Abspaltungsdauer bis zu 1 h stabil. Für die untersuchten Lösungsmittel konnten ebenfalls Abhängigkeiten bezüglich des Erhalts der Thiopeptidbindung gefunden werden. Während DMF und DMSO die Komplexbildungstendenz des Pd(0) verstärkten, war diese in THF oder DCM unterdrückt. Bei höheren Temperaturen wurde verstärkt Dethioxylierung und Komplexyierung beobachtet. Untersuchungen zur Komplexybildung wurden mit dem System Pd(0)/HOBt durchgeführt. Die Deblockierung der drei funktionellen Gruppen erfolgte innerhalb von 30–45 min. In allen Fällen wurde mittels aHPLC ein nichtidentifiziertes, hydrophobes Produkt gefunden. Da bei der Spaltung des Oxoderivates des β-Casomorphin-7 dieses Nebenprodukt nicht gefunden werden konnte, liegt die Vermutung einer Wechselwirkung zwischen Thiofunktion und Katalysator nahe.

Die Entschützung der drei monothioxylierten β-Casomorphin-7-Derivate gelang Pd(0)-katalysiert unter Verwendung von HOBt in THF oder DCM bei 20°C, Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluß.

Während die Kondensation der verwendeten thioxylierten Peptidfragmente in allen Fällen in guter Ausbeute gelang, wurde eine hohe Empfindlichkeit der Thioxozeptidbindung gegenüber den sauren, basischen und Pd(0)-katalysierten Abspaltungsbedingungen der temporären und konstanter Schutzgruppen deutlich. Unter Verwendung konventioneller Methoden zur Verseifung von Peptidestern sind hohe Ausbeuteverluste in Form nicht exakt zu definierender Peptidmischungen zu verzeichnen. Untersuchungen von Guziec *et al.* zur Verseifung von Thioxozeptidestern zeigen, daß die erhöhte Nucleophilie des Schwefels gegenüber dem Sauerstoff bei Thioxozeptiden zu einer verstärkten Thiohydantoin-Bildung führen kann [47]. Da eine Hydantoinbildung nur bei Z-Xaa-Gly-Peptiden Bedeutung besitzt und deren Auftreten für Boc-geschützte Peptide ausgeschlossen wird, sind andere Nebenreaktionen, wie die Dethioxylierung, für die starken Ausbeuteverluste bei der alkalischen Hydrolyse der Thiotetrapeptidester verantwortlich zu machen. Die bei der acidolytischen Entfernung der *Or*Bu-Schutzgruppe ebenfalls festzustellende höhere Empfindlichkeit der Thioxotetrapeptide ist auf die Bildung eines Thiazolons (Abb. 3) zurückzuführen [39, 40]. Die Abspaltung unter Verwendung von TFA resultiert in einer dramatischen Abnahme der Ausbeute. Auch der Zusatz des *scavengers* Thioanisol verbessert dies nur unbefriedigend. Lediglich die Verwendung des entwickelten Systems SnCl₄/ACN ermöglicht die milde Entschützung der Carboxylfunktionen thioxylierter Di- und Tetrapeptide in guter Ausbeute. Die Verwendung von Pd(0)-katalysiert entfernbaren Alloc- und OAll-Schutzgruppen wurde zum Aufbau von Thioxozeptiden bisher wenig untersucht [45, 48]. Für die Entschützung nichtmodifizierter Peptide sind eine Reihe von Allyl- und Allyloxycarbonylakzeptoren beschrieben: Kalium-2-ethylhexanoat [169, 170]; 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion [171]; Dimethylmalonat [172]; Ameisensäure [173, 174]; Morpholin [175-177]; *n*-Butylamine/Ameisensäure [178], Tributylzinnhydrid [179-181]; *N,N'*-Dimethylbarbitursäure [182, 183]; *N*-Methylanilin [184-186]; Dimedon [171]; und *N*-Methylmorpholin/AcOH [187]. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Entschützung Alloc/OAll-geschützter Thioxozeptide nur unter bestimmten Voraussetzungen erfolgreich ist. Durch die hohe Komplexbildungstendenz des Katalysators liegt bei Verwendung von Pd(0)-Verbindungen mit Thioxocarbonylen die Vermutung einer Komplexbildung nahe [188, 189]. So berichtet Kitas *et al.* [190] bei ähnlicher Chemie ebenfalls von starken Problemen mit Pd-Komplexen. Neben dieser - besonders in Lösungsmitteln wie DMF und DMSO - verstärkten Komplexbildung zeigte das Thioxocarbonyl eine hohe Empfindlichkeit gegen die Nucleophilie vieler gebräuchlichen „Allylakzeptoren“. Festzustellen bleibt, daß die Pd(0)-katalysierte Allylübertragung auf HOBt als akzeptierendes Nucleophil in THF oder DCM eine geeignete Methode zur Entschützung allylierter bzw. allyloxycarbonylierter Thioxozeptide darstellt. Hierbei sollte unter Lichtausschluß und in inerter Stickstoff- oder Argon-Atmosphäre gearbeitet werden.

2.3. Darstellung eines monothioylierten Nonadecapeptids durch Thioacylierung

Durch Thioxylierung des Nonadecapeptids Ac-EEEEKKKAAAEKKKK-NH₂ sollte der Einfluß einer Thiopeptidbindung auf die Sekundärstruktur eines Polypeptids untersucht werden (Kapitel 3.2.). Die gezielte Einführung der Thiopeptidbindung in den mittleren Bereich des Peptidrückgrates erforderte die Synthese dreier Peptidfragmente:



Ac-EEEEKKKKA-OH

H-EEEEKKKK-NH₂ bzw. H-AEEEEKKKK-NH₂

Der konstante Schutz der funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren Lys und Glu erfolgte durch Boc- und *Or*Bu-Gruppierungen. Während die Synthese des Fragmentes **F1** am 2-Chlorotriethylchlorid-Harz [191] erfolgte, wurden Fragment **F2a** und **F2b** an einem Sieber-Amid-Harz [192] dargestellt.

Zur Einführung des Thioxocarbonyls in das Peptidrückgrat wurden folgende Thioxo-Bausteine auf ihre Eignung hin überprüft:

- Boc-Alanyl-dithioester
- Boc/Fmoc-Thioxodialanin
- Boc-Thioxotrialanin.

Aufgrund von mangelnder Reaktivität, Dethioxylierung und der Bildung von Thiazolonen gelang in keinem Fall die Segmentkondensation des Thioxo-Bausteins bzw. Thioacylierung mit dem Fragment **F2a** oder **F2b**. Erst unter Verwendung der kürzlich von SHALABY *et al.* [85] vorgestellten Thioxoacyl-6-Nitrobenzotriazolide gelang eine racemisierungs- und epimerisierungsfreie Kondensation des Thioxobausteins mit dem Peptidfragment.

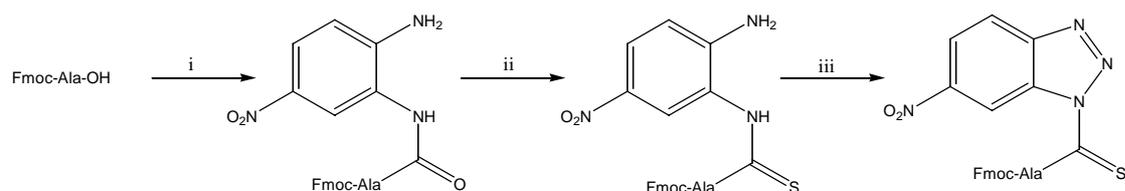


Abb. 19 Darstellung des zur Thioacylierung des Fragmentes **F2b** verwendeten Fmoc-Thioxoalanyl-6-nitrobenzotriazolids. i) 4-Nitro-1,2-Phenylendiamin; ii) **(3)**; iii) NaNO₂, AcOH, 4°C.

Nach Darstellung des Fmoc-Thioxoalanyl-6-nitrobenzotriazolids (Abb. 19) wurde dieses mit dem am Sieber-Amid-Harz befindlichen Fragment **F2b** verknüpft. Massenspektrometrische Untersuchungen am abgespaltenen Peptid zeigten, daß nur ca. 20% des gewünschten thioacylierten Produktes entstanden waren. Durch Untersuchung der Reaktivität von Thioxoacyl-6-nitrobenzotriazolid-Derivaten konnte gezeigt werden, daß diese in den verwendeten Lösungsmitteln DMF, DMSO oder NMP nur über einen kurzen Zeitraum stabil sind. Diese Zeit ist für eine effektive Thioacylierung sterisch ungehinderter und reaktiver Derivate ausreichend. Im Falle des sterisch gehinderten Fragmentes **F2b** kam es nur zu einem geringem Umsatz. Bei Durchführung der Thioacylierungen in

DCM bei verringerter Temperatur zeigt das Thioacylierungsagenz eine deutlich verbesserte Stabilität. Da durch die äußerst beschränkte Löslichkeit des geschützten, harzgebundenen Peptidfragmentes eine Reaktion in reinem DCM nicht möglich war, wurde die Kondensation in einer DMF/DCM-Mischung (v/v, 40:60) bei 4°C durchgeführt. Hierbei konnte der Umsatz an gewünschtem Produkt auf maximal 52% erhöht werden. Nach Entfernung der temporären Fmoc-Schutzgruppe und Abspaltung des thioxylierten Zwischenproduktes von der festen Phase unter Erhalt aller konstanten Schutzgruppen wurde es mit dem Fragment **F1** in Lösung verknüpft. Durch die äußerst geringe Löslichkeit beider Fragmente in polaren Lösungsmitteln war eine RP-chromatographische Reinigung nicht möglich. Lediglich eine Ausfällung aus wäßriger DMSO/DMF-Lösung gelang. Nach erfolgreicher Kondensation der beiden Segmente, Finalabspaltung aller konstanten säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen mit SnCl₄ in ACN und mehrfacher RP-chromatographischer Reinigung wurde das thioxylierte Nonadecapeptid in 12% Totalausbeute erhalten (Abb. 20).

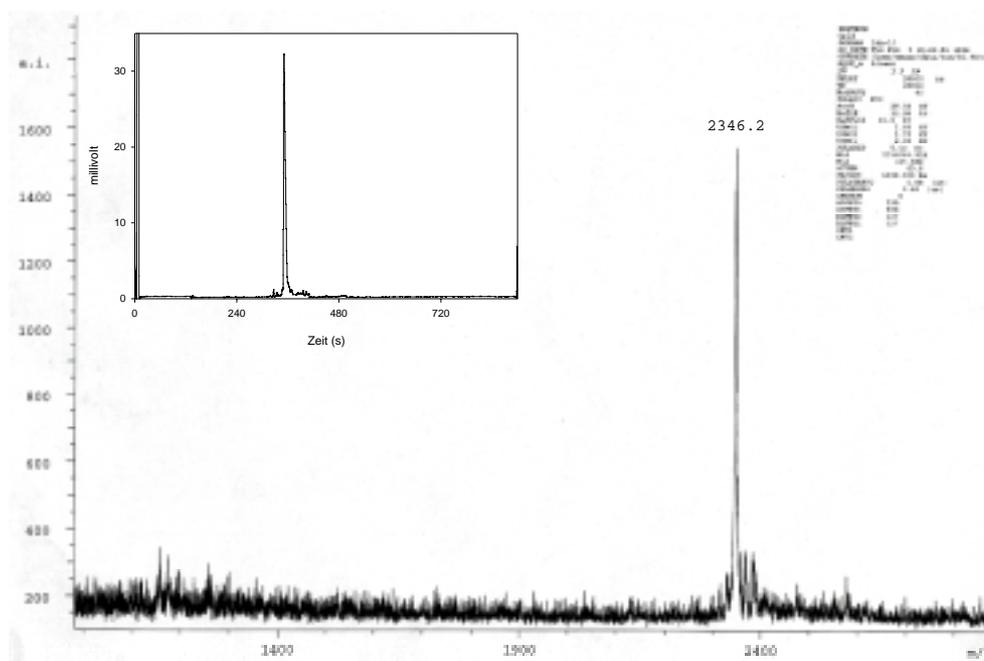
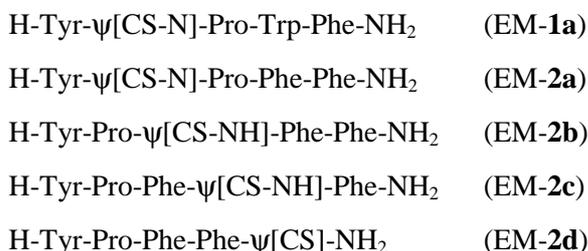


Abb. 20 MALDI-TOF-Spektrum des thioxylierten Nonadecapeptids. $M = 2346$. Das eingefügte Diagramm zeigt die Reinheitsprüfung mittels CZE bei 200 nm.

2.4. Darstellung thioxylierten Casomorphin-5- und Endomorphin-Derivate am Harz

Zur Untersuchung der Darstellbarkeit von thioxylierten Peptiden an der festen Phase wurden das 2-Chlorotriylchlorid- und das Sieber-Amid-Harz untersucht. Diese Harze werden zum schrittweisen Aufbau von Peptiden durch Fmoc-geschützte Aminosäuren verwendet. Ein schrittweiser Aufbau von Thioxozeptiden unter mehrfacher Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe gelang nicht. Die für eine Thioxozeptidbindung drastischen Abspaltungsbedingungen (20% Piperidin in DMF oder NMP) führten bei mehrfacher Anwendung zu einer quantitativen Dethioxylierung. Unter Verzicht der temporären Fmoc-Blockierung und der Verwendung des Fragmentes Alloc-Tyr(Alloc)- ψ [CS-N]-Pro-OH gelang - nach Kupplung auf die an 2-Chlorotriylchlorid-Harz gebundenen Peptidfragmente Phe-Pro-Gly und Phe-Val-Gly - der Erhalt der in Tyr¹-Position thioxylierten Casomorphin-5-Derivate. Die Entfernung der Alloc-Gruppen der harzgebundenen thioxylierten Pentapeptide erfolgte in DCM mittels Pd(0)-Katalysator und HOBt, die Abspaltung der thioxylierten Peptide vom Harz gelang mittels ACN/SnCl₄ in guter Ausbeute.

Auftretende Nebenreaktionen, wie Racemisierung, beschränken die Verwendung thioxylierter Peptidbausteine auf Aminosäuren wie Gly und Pro. Erst der Einsatz von Thioacylierungsreagenzien eröffnet neue Synthesemöglichkeiten. So wurden unter Verwendung der thioxylierten Acyl-6-nitrobenzotriazolid-Derivate des Tyr (Tyr-TNB), Pro (Pro-TNB) und Phe (Phe-TNB) die folgenden thioxylierten Derivate des Endomorphin-1 (EM-1) und des Endomorphin-2 (EM-2) dargestellt:



Die Darstellung der Tyr¹-thioxylierten Peptide erfolgte durch Kupplung des Tyr-TNB bei 4°C in DCM an das jeweilige am Sieber-Amid-Harz gebundene Tripeptid und unter Abspaltung des Thioxozeptids mittels ACN/SnCl₄. Die Einführung der Thioxozeptidbindung gelang für das Pro²- und das Phe³-Derivat in Lösung durch Pro-TNB und Phe-TNB. Ebenfalls in Lösung wurde das Phe⁴-thioxylierte Derivat durch schrittweisen Aufbau aus H-Pro- ψ [CS]-NH₂ und Boc-geschützten Aminosäuren synthetisiert.

Die Untersuchungen zeigten, daß die zur Abspaltung konstanter Alloc- und OAll-Schutzgruppen entwickelte Pd(0)/HOBt/DCM-Strategie auf die Synthese von Thioxozeptiden an der festen Phase angewendet werden kann. Ein Aufbau von Thioxozeptiden an der festen Phase unter Verwendung der temporären Fmoc-Schutzgruppe war aufgrund der gezeigten Empfindlichkeit der Thioxozeptidbindung gegen die Bedingungen der Fmoc-Entschützung nicht möglich. Untersuchungen zur Verwendung der Boc-Schutzgruppe und deren Abspaltung mit dem entwickelten SnCl₄/ACN-System erwiesen sich als bedingt möglich. Wird SnCl₄ zur Abspaltung temporärer Boc-Schutzgruppen

beim sukzessiven Aufbau eines Thiopeptids am Harz eingesetzt, müssen hohe Überschüsse der Lewis-Säure verwendet werden, da eine große Menge SnCl_4 offenbar vom Harz gebunden wird. Bedingt durch die entstehenden Folgeprodukte kommt es hierbei zu einer permanenten Verstopfung der Reaktionsgefäße. Wird SnCl_4 jedoch zur finalen Abspaltung von konstanten Boc- und/oder OtBu-Gruppen und/oder der Abspaltung der Thiopeptide vom Harz verwendet, ist eine milde und effiziente Methode des Erhalts von Thiopeptiden gegeben.

III. Untersuchungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften von Thiopeptiden

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Thiopeptide wurden mit Hilfe unterschiedlicher Methoden hinsichtlich der durch Einführung einer Thiopeptidbindung in das Peptidrückgrat bedingten Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften untersucht. Durch die Fragmentierung von thioxylierten β -Casomorphin-5- und β -Casomorphin-7-Derivaten wurde mit der Massenspektrometrie eine Methode zur Bestimmung des Thioxylierungsortes im Peptid entwickelt. Anhand des thioxylierten Derivates eines Nonadecapeptids mit α -helikaler Struktur sollte der Einfluß einer Thiofunktion auf das Sekundärstrukturelement α -Helix untersucht werden. An thioxylierten Derivaten der endogenen, μ -Rezeptor-spezifischen Endomorphin-1 und -2 wurde in Abhängigkeit vom Ort der Thioxylierung der Einfluß der Thiopeptidbindung auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung untersucht. Eine erstmalige Trennung von Aminoacyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeren der thioxylierten Endomorphine im präparativen Maßstab ermöglichte deren isomerspezifische Charakterisierung.

3.1. Massenspektrometrische Lokalisierung der Thiopeptidbindung im Peptid

Die NMR-Spektroskopie stellt in der Peptidchemie ein wichtiges Werkzeug zur Bestimmung der Konformation von Thiopeptiden dar. Die Bestimmung der Position einer thioxylierten Peptidbindung mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ erfolgt durch Detektion von Tieffeldverschiebungen der CS-NH-Protonen und CS-Kohlenstoffe gegenüber der Oxopeptidbindung. Diese NMR-Untersuchungen sind jedoch sehr zeitaufwendig und erfordern relativ große Mengen, hochreiner Produkte. Hinzu kommt, daß die spektrale Analyse von Polypeptiden schwierig und die Untersuchung einer Mischung mehrerer Oligo- oder Polypeptide nahezu unmöglich ist. Mittels massenspektrometrischer Fragmentierung der thioxylierten Produkte wurde die Bestimmbarkeit der Thioxylierungsposition des Peptids untersucht.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-Pro-OtBu repräsentiert ein Zwischenprodukt beim Aufbau von thioxylierten Casomorphin-7-Derivaten. Der *N*-Terminus und die Hydroxylgruppe des Tyr¹ sind durch die Alloc-Gruppe, das *C*-terminale Ende durch OtBu modifiziert. Abb. 22 zeigt das Tochterionenspektrum des $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions des Thiopeptids bei geringer Stoßenergie. Hierbei kommt es durch Spaltung der Phe³-Pro⁴-Bindung über einen schwefelkontrollierten Mechanismus zu einer Initialfragmentierung, die in der gleichberechtigten Bildung der Ionen B₃ und Y₁⁺ resultiert (Abb. 21).

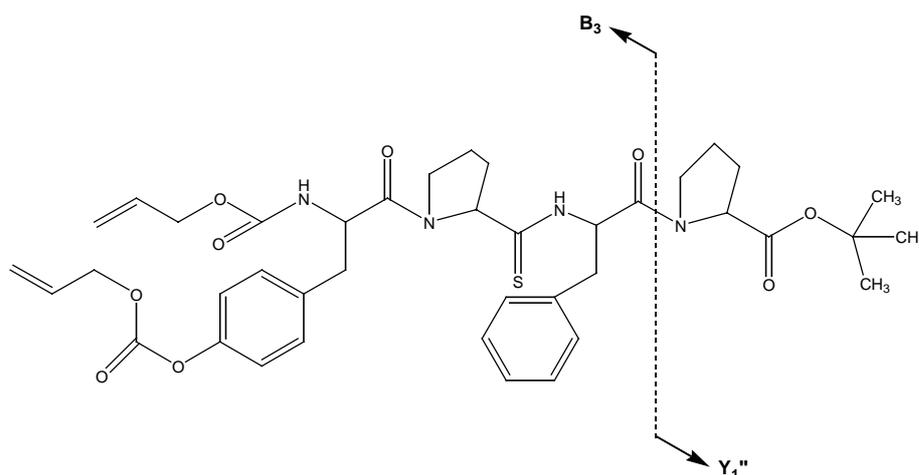


Abb. 21 Schema der Fragmentierung des Alloc-Tyr(Alloc)-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-Pro-OtBu unter Generierung eines geladenen (B_3) und eines neutralen Fragmentes (Y_1'').

Für die Bestimmung der Position des Schwefels in Oligopeptiden sind zwei experimentelle Schritte erforderlich. Im ersten Schritt findet durch niederenergetische Stöße die bevorzugte Spaltung des Peptids an der der Thiopeptidbindung nachfolgenden Bindung statt. Mit Erhöhung der Kollisionsenergie kann das vorher initiierte B-Ion im zweiten Schritt weiter fragmentiert werden. Hierbei bildet sich unter Austritt von CO ein internes Ion der Struktur P- ψ [CS-NH]-F, welches eine eindeutige Bestimmung der thioxylierten Aminosäure ermöglicht (Abb. 22).

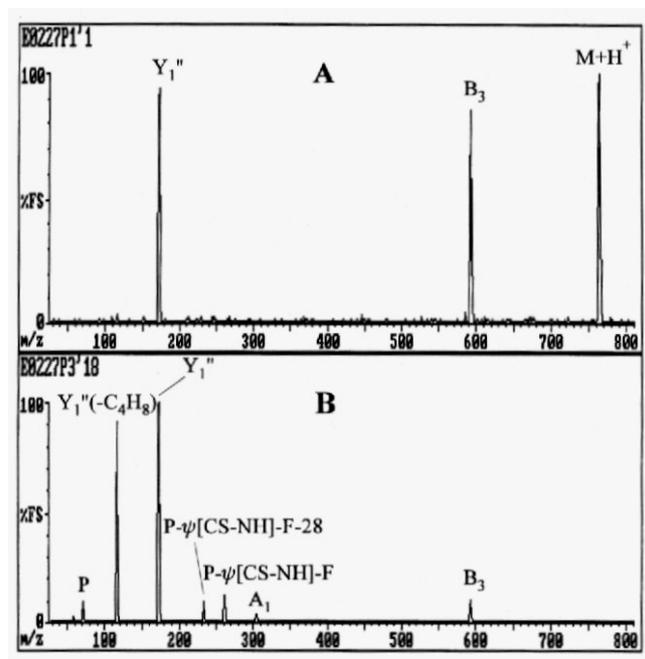


Abb. 22 CID-Massenspektrum des $[M+H]^+$ -Ions des Alloc-Tyr(Alloc)-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-Pro-OtBu: (A) CE = 0 eV; (B) CE = 40 eV ($p = 1.2$ mbar). Das Ionenspektrum bei 40 eV (B) zeigt die Generierung des internalen Ions Pro- ψ [CS-NH]-Phe und die Eliminierung des CO aus diesem.

Charakteristisch für den Prozeß der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI) ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen. Somit findet man für Peptide und Proteine entsprechend ihrer Masse eine Serie von Ionensignalen, die sich jeweils um eine Ladung (im positiven Modus durch Addition eines Protons und im negativen Modus durch Subtraktion eines Protons) unterscheiden. Diese Methodik erlaubt neben der Bestimmung des Molekulargewichts auch Strukturanalysen und die Sequenzierung von Peptiden. Da Peptidbindungen nach einer Kollisionsaktivierung bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidkette brechen, lassen sich mittels ESI Peptide sequenzieren. Unter Standard-Messbedingungen ist diese Fragmentierung von Peptiden nicht zu beobachten. Erhöht man jedoch die Spannung, nimmt auch die kinetische Energie der Ionen zu und es kommt es zu einer Fragmentierung. Diese Fragmentierung durch niederenergetische Stöße verursacht in Thioxopeptiden eine bevorzugte Spaltung der der Thioxopeptidbindung nachfolgenden Peptidbindung (Abb. 23).

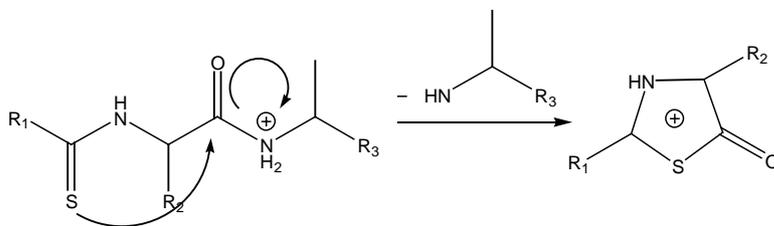


Abb. 23 Bildung eines protonierten Thiazolons während der massenspektrometrischen Analyse von Thioxopeptiden durch nucleophilen Angriff des Schwefels auf den Carbonylkohlenstoff der nachfolgenden Peptidbindung.

Diese Spaltung ist erklärbar mit einer Stabilisierung des B-Ions durch Cyclisierung zum protonierten Thiazolon. Für $[M+2H]^+$ -Ionen von *N*-terminalen Phenylthiocarbonyl-Derivaten von Peptiden ist ein ähnlicher Vorgang beschrieben worden [193]. Aber auch für Oxopeptide wurde eine analoge Stabilisierung von B-Ionen beschrieben [194]. Der erhöhte nucleophile Charakter des Schwefels gegenüber dem Sauerstoff und die damit verbundene höhere Stabilität des Thiazolons gegenüber dem Oxazolone sind die Hauptgründe für diese bevorzugte Fragmentierung.

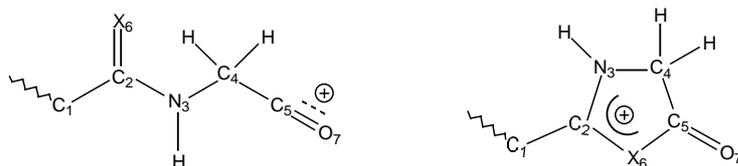


Abb. 24 Strukturen für das Modell eines acyclischen und eines cyclischen B-Ions. Oxazolone: X = O, Thiazolone: X = S.

Weiterhin haben *ab initio* Berechnungen der Energiegehalte cyclischer und acyclischer B-Ionen von Oxo- und Thioxopeptiden gezeigt, daß die von Thioxopeptiden gebildeten B-Ionen eine deutlich höhere Stabilität aufweisen (Abb. 24). Unter den verwendeten Fragmentierungsbedingungen beträgt

der berechnete Energiegewinn gegenüber der acyclischen Struktur für ein protoniertes Thiazolon 188 kJ mol^{-1} verglichen zu 170 kJ mol^{-1} für das protonierte Oxazolon [90]. Bedingt durch eine Ladungsverschiebung innerhalb des Heterocyclus vom C₅-Atom zum Schwefel (mit bevorzugter Lokalisierung der positiven Ladung am Schwefelatom) zeigt das protonierte Thiazolon erhöhte Stabilität gegenüber dem Oxazolon.

In Anwendung dieser Methode konnten die bei den Untersuchungen zur Regioselektivität der Thioxylierungsreaktion erhaltenen Gemische aus thioxylierten β -Casomorphin-7-Derivaten analysiert und die jeweiligen thioxylierten Peptide charakterisiert werden. Neben der Bestimmung der Position der thioxylierten Peptidbindung bei der Modifizierung von Oligopeptiden mit Thioxylierungsreagenzien eröffnet diese Methode die Möglichkeit einer positionalen Charakterisierung von thioxoamidhaltigen nativen Proteinen. Eine potentielle biologische Relevanz thioxylierter Peptidbindungen wird durch eine kürzlich beschriebene Thioxoamidfunktion in einem nativen Protein unterstrichen. So wurde von Ermler *et al.* [145] bei einem durch Röntgenkristallstrukturanalyse untersuchten Enzym (dem Methyl-Coenzym M aus dem thermophilen Archebakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*) eine Thioxylierung des Gly⁴⁴⁵ abgeleitet. Diese Thioxosubstitution ist möglicherweise für den Katalysemechanismus des Enzyms bedeutsam. Weiterhin konnten aus einer Reihe von Bakterien thioxopeptidhaltige Verbindungen, z. B. wie die Thiopeptide A und B, welche als monothioxylierter cyclische Depsipeptide antibiotische Aktivität aufweisen, isoliert werden [136-141].

3.2. Einfluß einer thioxylierten Peptidbindung auf die Sekundärstruktur

Die α -Helix [195] ist ein in globulären Proteinen abundant anzutreffendes Sekundärstrukturelement. Etwa 40% aller Aminosäurereste in bekannten Proteinstrukturen sind in α -helikale Konformationen eingebunden [196]. Polypeptide unterschiedlicher Zusammensetzung und Peptide verschiedener Sequenz zeigen variierende Gehalte helikaler Struktur, so daß jeder Seitenkette einer Aminosäure innerhalb der α -Helix ein Einfluß auf die helikale Struktur zugerechnet werden kann. Während durch Strukturuntersuchungen an synthetischen Polypeptiden [197] und statistischen Untersuchungen nativer, α -helikaler Proteine die Aminosäuren Ala und Leu als helixstabilisierende Aminosäurereste identifiziert wurden, bewirkt das Auftreten von Gly und Pro im Proteinrückgrat eine Destabilisierung α -helikaler Strukturen [197-199]. Um den möglichen Einfluß einer thioxylierten Aminosäure auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur eines Polypeptids zu untersuchen, wurde eine Thioxo-peptidbindung in ein charakteristisches α -helikales Peptid eingebracht. Für diese Untersuchungen wurde eine Peptidstruktur gewählt, die - ähnlich einer Gruppe von Lyu *et al.* [199] untersuchter Peptide - ein Muster alternierender saurer und basischer Seitenketten enthält. Die in Intervallen von $i, i \pm 4$ auftretenden Ladungen stabilisieren durch ihre Wechselwirkungen die α -Helix [200]. Um den Einfluß der Thioxo-peptidbindung auf die α -helikale Struktur zu untersuchen, wurden zwei, bis auf den isosteren O/S-Austausch identische Nonadecapeptide (Peptid I und II) synthetisiert (Kapitel 2.3.):

Peptid I	Ac-EEEEKKKKAAAEKKKK-NH ₂
Peptid II	Ac-EEEEKKKKAA- ψ [CS-NH]-AEEEEKKKK-NH ₂

3.2.1. Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen der Peptide I und II

Das Auftreten von helikalen Sekundärstrukturen ist durch spektroskopische Methoden detektierbar. Das Vorhandensein asymmetrischer C _{α} -Substituenten auf beiden Seiten der an sich planaren Peptidbindung macht eine α -Helix optisch aktiv [201]. Dadurch ergibt sich ein charakteristisches Spektrum, welches mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) untersucht werden kann. Die zumeist im Spektralbereich von 190 bis 250 nm durchgeführte Fern-UV-CD stellt eine gebräuchliche Methode zur Sekundärstrukturanalyse von Peptiden und Proteinen dar. In diesem Spektralbereich liegen die ${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$ und die ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergänge der Peptidbindungen, die im UV/Vis-Absorptionsspektrum überlappt liegen und somit kaum separat bewertet werden können. Aufgrund der Chiralität dieser Strukturen ist das CD-Spektrum eines Peptids äußerst empfindlich für seine Sekundärstruktur. So zeigen Peptide, welche ein α -helikales Sekundärstrukturelement enthalten, CD-Spektren mit einem negativen Cotton-Effekt bei $\lambda = 207$ nm und 222 nm, mit einem positiven Cotton-Effekt bei ca. 195 nm und einem isodichrotischen Punkt bei 204 nm. Während die beiden Cotton-Effekte bei 195 und 207 nm charakteristisch für den in zwei Signale aufgespaltenen Carbonyl-

$^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$ -Übergang sind, zeigt der Cotton-Effekt bei 222 nm einen $^1n \rightarrow ^3\pi^*$ -Übergang an [202-204]. Die Bestimmung des Gehaltes an Sekundärstruktur aus den aufgenommenen CD-Spektren ist durch unterschiedliche Methoden möglich. Zur Ermittlung der α -helikalen Anteile wird im allgemeinen ein Zwei-Zustands-Modell verwendet.

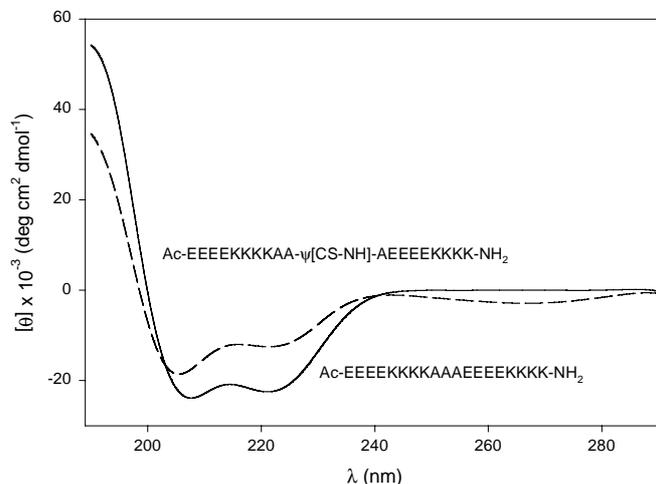


Abb. 25 CD-Spektren der Peptide I (—) und II (---). Die Peptide wurden in einer 50 μ M-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7 und 4°C aufgenommen.

Neben der bei 222 nm gemessenen Elliptizität eines Peptids sind zur Anwendung dieses Modells der Grenzwert der Elliptizität bei 222 nm im komplett α -helikalen Zustand $[\theta]_H$ und im vollständig ungeordneten (coiled) Zustand $[\theta]_C$ nötig. Diese beiden Grenzwerte erschließen sich entweder auf empirischen Gleichungen basierend rechnerisch (1) oder über Beeinflussung der peptidischen Sekundärstruktur experimentell (2).

(1) Es hat sich gezeigt, daß der Wert für den höchstmöglichen α -Helixgehaltes des zu untersuchenden Peptids ($[\theta]_H$) von der Länge dieses Peptids abhängig ist [205-207] und mit der empirischen Gleichung

$$[\theta]_H = [\theta]_H^\infty \left(1 - \frac{k_\lambda}{n} \right)$$

ermittelbar ist. Hierbei stellt k_λ den Faktor für die Kettenlängenabhängigkeit bei der Wellenlänge λ dar, n ist die Anzahl der Amide in der kompletten Helix und $[\theta]_H^\infty$ die Elliptizität für eine komplette α -Helix [205, 208]. In der Literatur sind eine Reihe von unterschiedlichen Werten für k_λ , $[\theta]_H^\infty$ und $[\theta]_C$ bei 222 nm zu finden [205, 208-213]. Alle am Nonadecapeptid und dem thioxylierten Derivat durchgeführten Berechnungen erfolgten beziehungsweise auf die Untersuchungen von Manning *et al.* [214] und Gans *et al.* [208] mit $k = 4.1$, $[\theta]_H^\infty = -40.000$ und $[\theta]_C = 0$.

(2) Die zweite Möglichkeit, die Grenzwerte der Helizität des Peptids zu erhalten, besteht in der Beeinflussung der α -Helixstabilität durch Lösungsmittel und Detergenzien. So besitzt TFE die Fähigkeit zur Förderung α -helikaler Strukturen, wobei es eher helixverstärkend als helixinduzierend

wirkt. Der exakte Mechanismus der Stabilisierung ist umstritten [215-222]. Unter Einsatz von TFE wird es möglich, den maximalen α -Helixgehalt des entsprechenden Peptids zu induzieren und zu messen [200, 223, 224].

Zum Erhalt des zweiten Grenzwertes, dem minimal möglichen α -Helixgehalt ($[\theta]_C$), muß das Peptid in einer möglichst ungeordneten Sekundärstruktur vorliegen. Hierzu wird mittels starker Denaturierungsmittel (GdnCl oder Harnstoff [199]) eine ausgebildete Sekundärstruktur sehr stark beeinträchtigt bzw. zerstört.

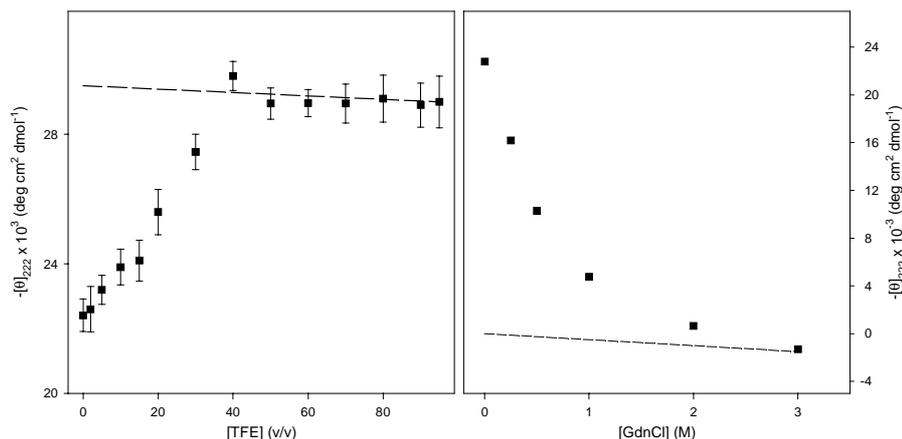


Abb. 26 (links) Erhöhung der MRE des Peptids **I** durch Zugabe von α -helixstabilisierendem TFE. Der Wert $[\theta]_{\infty, \text{TFE}}$ ist erhältlich aus der Extrapolation (---) zur Nullkonzentration von TFE und stellt die 100%ige α -Helix dar. **(rechts)** Erniedrigung der MRE des Peptids **I** bei Zugabe von α -helixdestabilisierendem GdnCl. Der durch Extrapolation (---) zur Nullkonzentration von GdnCl erhaltene Wert für $[\theta]_{C, \text{GdnCl}}$ korrespondiert mit einer ungeordneten Sekundärstruktur. Meßbedingungen: 50 μ M Peptid, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 4°C.

Um den maximalen α -Helixgehalt des Modellpeptids zu ermitteln, wurde dem Peptid **I** bei pH 7 und 4°C eine steigende Konzentrationen an TFE zugesetzt. Aus der Auftragung $[\theta]_{222}$ gegen die TFE-Konzentration ist der Wert $[\theta]_{\text{H, TFE}} = -29.800 \pm 700$ deg cm²/dmol für den maximal möglichen α -Helixgehalt des Peptids erhältlich (Abb. 26 links). Beide Peptide erreichen bei 40 Vol% TFE den Maximalgehalt an α -helikaler Struktur, wobei für **I** eine Erhöhung auf 80% und für **II** auf 58% detektiert wurde. Andere Autoren haben für Peptide ähnlicher Sequenz, aber unterschiedlicher Kettenlänge (-27000 ± 700 für ein 13-mer Peptid [225], -32000 für ein 16-mer Peptid [223], -33000 ± 1000 für ein 17-mer Peptid [224] und -32000 ± 700 für 21-mer Peptide [209]) vergleichbare Werte erhalten. Eine weitere Zugabe von TFE bewirkt keine Erhöhung des α -Helixgehaltes. Zum Erhalt des minimalen Gehaltes an α -helikaler Struktur wurde **I** unter neutralen Bedingungen bei 4°C mit 0 – 3 M GdnCl behandelt (Abb. 26 rechts). Nach Zugabe von 2 M GdnCl liegt das Peptid in denaturierter Form vor. Aus den gezeigten Untersuchungen erhält man den Wert von $[\theta]_{C, \text{GdnCl}} = 0 \pm 500$ deg cm²/dmol, der in dem für Peptide ähnlicher Sequenz gezeigten Bereich einer denaturierten α -Helix liegt.

Die Elliptizität eines Peptids wird üblicherweise als MRE (*mean residue ellipticity*) angegeben und über die Division der gemessenen Gesamte elliptizität bei 222 nm durch das Produkt aus Gesamtzahl der Aminosäuren der Peptidkette und der Peptidkonzentration bestimmt. Da die Peptidbindungen bzw. die Amidchromophore den Beitrag für den Cotton-Effekt bei 222 nm liefern und die beiden untersuchten Nonadecapeptide *N*-terminal geschützt sind, ist die Zahl der Peptidbindungen ungleich der Zahl der enthaltenen Aminosäuren. Bei Anwendung der Helix-coil-Theorie müssen die *mean residue*-Werte ($[\theta]_{\text{obs}}$) in *mean amide*-Werte ($[\theta]'_{\text{obs}}$) umgerechnet werden. Ein geschütztes Peptid mit x Aminosäuren hat demzufolge $x+1$ Amide und somit muß für die MRE der Korrekturfaktor von $x/(x+1)$ angewandt werden [226].

Das Zwei-Zustands-Modell ist eine vereinfachte thermodynamische Handhabung der Theorie vom Helix-coil-Übergang. Es geht davon aus, daß die thermische Abhängigkeit der Peptide durch einen Zwei-Zustands-Übergang - ungeordnete Struktur (coil) \Leftrightarrow Helix - beschrieben werden kann. Die Gleichgewichtskonstante K in Termen der Elliptizität ist ausdrückbar als:

$$K = \left[\frac{([\theta]'_{\text{obs}} - [\theta]_C)}{([\theta]_H - [\theta]'_{\text{obs}})} \right]$$

Die Berechnung des α -Helixgehaltes f_H erfolgt durch

$$f_{H,\text{obs}} = \left[\frac{([\theta]_{\text{obs}} - [\theta]_C)}{([\theta]_H - [\theta]_C)} \right]$$

Zur Ermittlung des α -Helixgehaltes der beiden Peptide wurden sowohl die aus den Berechnungen nach (1) erhaltenen als auch durch TFE/GdnCl-Untersuchungen (2) erhaltenen Grenzwerte verwendet (Tabelle 7).

Peptid	$[\theta]_{\text{obs}}$	$[\theta]'_{\text{obs}}$	$f_{H,\text{obs}}$ TFE/GdnCl	$f_{H,\text{obs}}$ Parameter
I	-23720	-22534	0.75	0.72
II	-12500	-11875	0.39	0.38

Tabelle 7 Aus den CD-Spektren bei pH 7 und 4°C erhaltene *mean residue*- ($[\theta]_{\text{obs}}$) und umgerechnete *mean amide*-Werte ($[\theta]'_{\text{obs}}$). Die Berechnung der α -Helixgehalte ($f_{H,\text{obs}}$) von I und II erfolgte unter Nutzung des Zwei-Zustands-Modells über empirische Parameter nach (1) und TFE bzw. GdnCl nach (2).

Wie Tabelle 7 zeigt, stimmen die berechneten Daten mit den experimentell ermittelten gut überein. Während Peptid I einen Gehalt von 75% an α -helikaler Sekundärstruktur aufweist, ist nach Einführung der Thioxofunktion eine Halbierung dieses Wertes auf 39% zu detektieren.

Über die Berechnung der Unterschiede in der Freien Energie der beiden Peptide ist der Effekt der Thioxylierung auf die α -helikale Struktur ermittelbar. Zu jeder beliebigen Temperatur ist die Änderung der Freien Energie durch $\Delta G = -RT \ln K$ berechenbar. Durch Erhalt des $\Delta \Delta G$ -Wertes über

$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{Thiopeptid}} - \Delta G_{\text{Oxopeptid}}$ ist Peptid **II** mit dem nichtmodifizierten Peptid **I** vergleichbar.

Bei Einführung einer Thioxozeptidbindung findet eine Abnahme des α -Helixgehaltes um 48% statt, die einer Destabilisierung von 3620 J/mol entspricht.

Peptid	K	ΔG (J/mol)	$\Delta\Delta G$ (J/mol)
I	3.101	2652	-
II	0.661	-970	3620

Tabelle 8 Berechnung der Änderung der Freien Energie der Peptide **I** und **II** über $\Delta G = -RT \ln \left[\frac{([\theta]_{obs} - [\theta]_H)}{([\theta]_C - [\theta]_{obs})} \right]$ zur Ermittlung der durch die Einführung des Schwefelatoms in **II** gegenüber **I** bedingten Differenz der Änderung der Freien Energie.

Die Ermittlung des Gehaltes am Sekundärstrukturelement α -Helix erfolgte zum einen über empirische Parameter und zum anderen über das TFE/GdnCl-System. Hierbei wurden gut miteinander übereinstimmende Werte für die α -Helixgehalte der Peptide **I** und **II** erhalten. Während im Peptid **II** der α -Helixgehalt auf 52% dessen im Oxozeptid **I** abfällt, wird bei Betrachtung des Cotton-Effektes des Peptids **II** (Abb. 25) deutlich, daß die Abnahme an α -helikaler Struktur nicht mit einer Zunahme an ungeordneter Struktureinheit korreliert. Anhand des Cotton-Effektes ist es möglich, durch Vergleich mit Standardsubstanzen Konformationen von Peptiden zu bestimmen. Der Cotton-Effekt von **II** zeigt gute Übereinstimmung mit einem für einige 3_{10} -Helices gefundenen Cotton-Effekt [227]. Ebenso wie die α -Helix weist die 3_{10} -Helix zwei negative Absorptionsmaxima auf, nur zeigt der charakteristische Cotton-Effekt einer 3_{10} -Helix eine gegenüber der CD-Bande bei 208 nm schwächere Bande bei 222 nm [201]. In detaillierten Untersuchungen zu theoretischen Aspekten der 3_{10} -Helix ermittelte Manning *et al.* [214] als Kriterium zur Unterscheidung von α - und 3_{10} -Helices die Bestimmung des Differenzwertes $R = [\theta]_{222} / [\theta]_{208}$. Während für längere α -helikale Polypeptide R-Werte von ~ 1 erhältlich sind, fallen diese für eine 3_{10} -Helix auf $R = 0.40$ [227]. So weist das Peptid **I** einen Differenzwert von $R = 0.95$ auf, welcher im Falle des Peptids **II** auf $R = 0.66$ abfällt. Für **II** ist ebenfalls der beschriebene, drastische Abfall der Elliptizität bei 195 nm zu verzeichnen. Unter Berücksichtigung der von Manning *et al.* [214] berechneten und durch Toniolo *et al.* [227] experimentell ermittelten Cotton-Effekte für 3_{10} -Helices, ist im Peptid **II** zusätzlich zu den α -helikalen mit 3_{10} -helikalen Sekundärstrukturanteilen zu rechnen. Somit führt die Thioxylierung einer Peptidbindung im untersuchten, stark α -helikal strukturierten Peptid zwar zu einer Verringerung des Anteils an rechtshändiger α -Helix, aber nicht zu einem Verlust an geordneter Sekundärstruktur. Vielmehr scheint das eingeführte Schwefelatom eine Ausbildung von rechtshändigen 3_{10} -helikalen Strukturbereichen zu induzieren.

3.2.1.1. Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Struktur der Peptide I und II

Mit einer Erhöhung der Temperatur von 4°C auf 95°C zeigt der graduelle Verlust der α -Helicität für I und II eine typische Abhängigkeit. Für I ist noch 14% und für II noch 6% α -helikale Sekundärstruktur ermittelbar (Abb. 26).

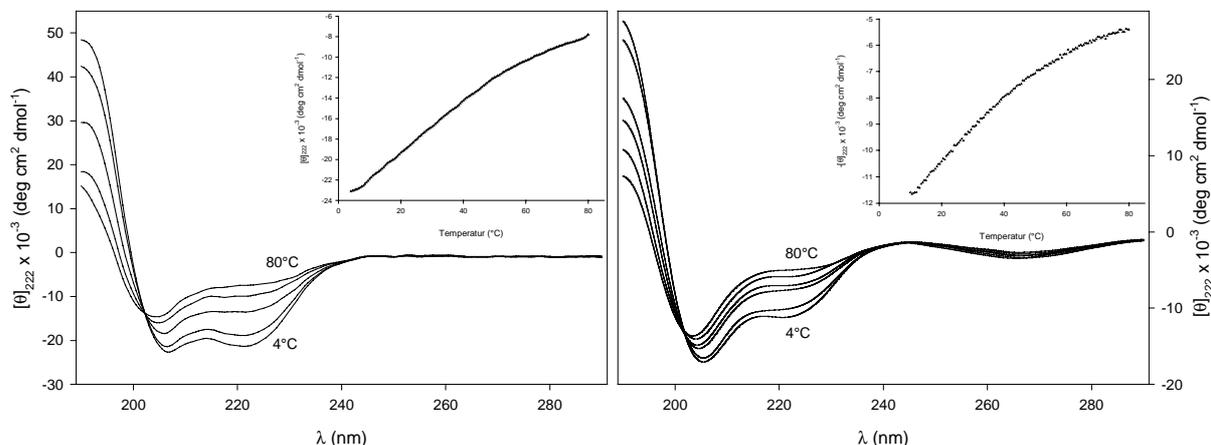


Abb. 27 CD-Spektren von I (links) und II (rechts) im Temperaturbereich von 4-95°C. Für die Temperaturen 10, 15, 30, 45, 60 und 80°C sind die Spektren abgebildet. Beide Messungen erfolgten mit 50 μ M Peptid in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7. Das Temperaturintervall betrug 1°C/min. Die eingefügten Diagramme zeigen die Abnahme der Elliptizität bei Erhöhung der Temperatur. Ein konkreter Schmelzpunkt sowie das komplette Umwandeln in eine ungeordnete Struktur ist für beide Peptide im untersuchten Temperaturbereich nicht feststellbar. Bei Abkühlung erfolgt in beiden Fällen die Wiederausbildung der helikalen Struktur ohne Verluste.

Die Ermittlung der Molekularität der α -Helix beider Peptide erfolgte über die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit ihrer Cotton-Effekte. Beide Peptide wiesen über einen Konzentrationsbereich von 10 – 300 μ M unveränderte CD-Spektren auf. Eine Verfolgung der thermisch verursachten Entfaltung der Peptidkette nach [228] bei 4, 15, 50 und 75°C zeigte ebenfalls keine Konzentrationsabhängigkeit der Elliptizitäten.

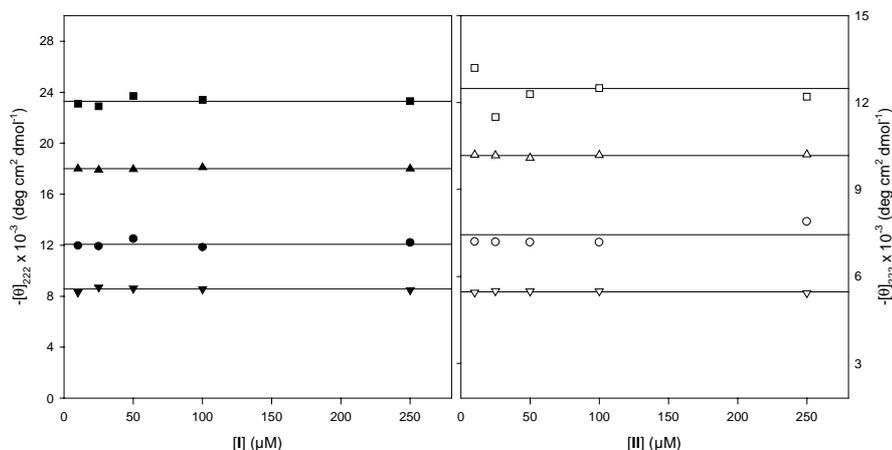


Abb. 28 Konzentrationsabhängigkeit der MRE bei 222 nm der Peptide I (links) und II (rechts) bei Erhöhung der Temperatur. Meßbedingungen: 10 nM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4, (■, □) 15 (▲, △), 50 (●, ○) und 75°C (▼, ▽).

Eine Charakterisierung der Molekularität der α -helikalen Sekundärstruktur eines Peptids erfolgte über die Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der CD-Spektren. Beide Peptide zeigen in einem weiten Konzentrationsbereich unveränderte Cotton-Effekte. Dieses Ergebnis schließt aber intermolekulare Wechselwirkungen nicht aus, wie sie in *coiled coils*-Strukturen auftreten [199]. Wesentlich stringenter Aussagen zur Molekularität der α -Helices erlaubt die in Abb. 28 gezeigte Untersuchung. Hier zeigt sich, daß es bei Erhöhung der Temperatur in allen Konzentrationsbereichen zu keiner Änderung der MRE kommt. Die gleichmäßige Entfaltung beider Peptide bei Erhöhung der Temperatur bestätigt einen intramolekularen Charakter der α -Helices. Beide Peptide folgen nicht der allgemein für α -Helices bekannten Tendenz zur intermolekularen Assoziation [199]. Durch $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen einer Verdünnungsreihe mit 10-, 100- und 1000-facher Verdünnung von 5 mM Proben der Peptide **I** und **II** war es ebenfalls möglich, die CD-spektroskopischen Daten zur Molekularität der Helixbildung zu bestätigen und eine Aggregation auszuschließen.

3.2.1.2. Abhängigkeit der Struktur der Peptide **I** und **II** vom pH-Wert

Der pH-Wert beeinflusst den Grad der Ionisierung der Seitenketten und somit deren Fähigkeit zur Ausbildung von Salzbrückenpaaren. Eine Änderung des pH-Wertes sollte damit auch Einfluß auf die Stabilität der α -Helix haben.

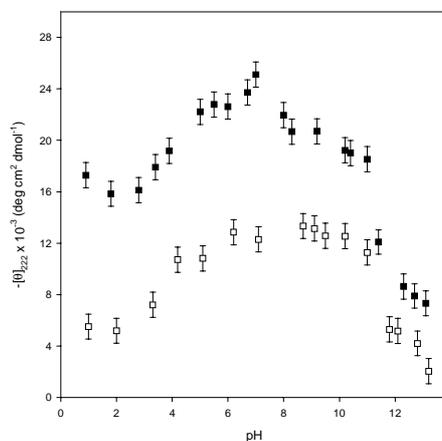


Abb. 29 Abhängigkeit der MRE bei 222 nm vom pH-Wert für **I** (■) und **II** (□). Meßbedingungen: 50 μM Peptid, 10 mM Natriumphosphatpuffer, 4°C.

Bei Titration in den sauren pH-Bereich zeigten beide Peptide einen weniger starken Abfall des Helixgehaltes im Vergleich zum basischen Bereich.

Da nichtionisierte Lysinseitenketten eine α -Helix stärker stabilisieren als ionisierte [229], ist bei Titration in den pH-Bereich oberhalb 11.5 in beiden Peptiden eine sprunghafte Abnahme der α -helikalen Struktur zu beobachten. In der Nähe des neutralen pH-Bereiches ist für beide Peptide die stärkste Stabilisierung der Helix zu verzeichnen. Dies deutet auf die Ausbildung von $\text{Glu}^- \text{Lys}^+$ -

Salzbrücken zwischen den Seitenketten im Abstand von $i, i \pm 4$ Aminosäuren hin [230] und zeigt, daß Salzbrücken starke Komponenten zur Stabilisierung einer α -Helix darstellen. Im stark sauren pH-Bereich findet durch HBB zwischen den protonierten Glutaminsäureseitenketten (Glu^0) und den Lysinresten (Lys^+) eine Stabilisierung der α -Helix statt [200].

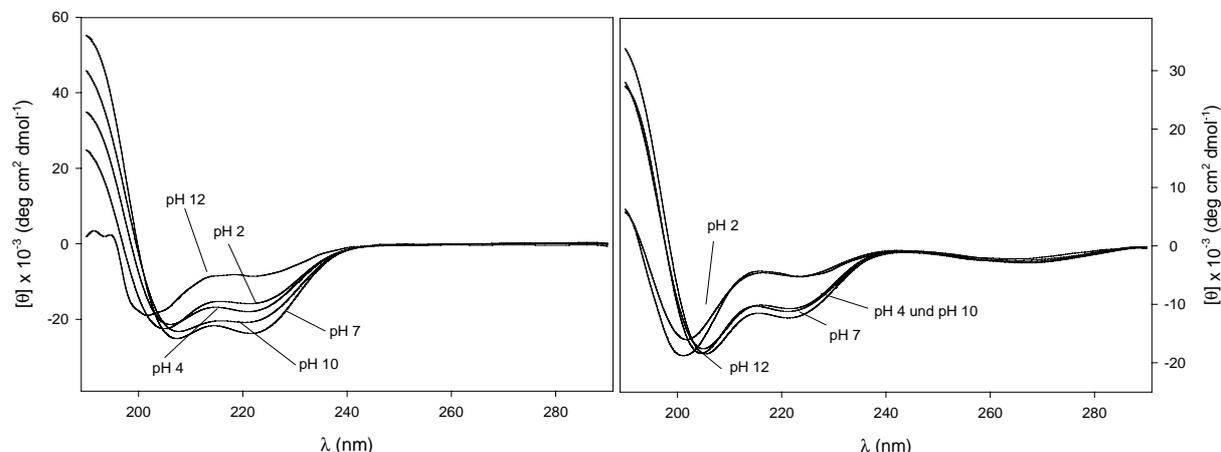


Abb. 30 Abhängigkeit der Cotton-Effekte der Peptide **I** (links) und **II** (rechts) vom pH-Wert im Bereich von pH 2-12. Für pH 2, 4, 7, 10 und 12 sind die Spektren abgebildet. Beide Messungen erfolgten in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 50 μM -Peptidkonzentrationen bei 4°C. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte mit H_3PO_4 und NaOH .

Während der Anteil α -helikaler Struktur im thioxylierten Peptid **II** drastisch abfällt, wird die α -Helix im Oxopeptid **I** noch deutlich stabilisiert. Die durch Einführung der Thioxozeptidbindung veränderten Eigenschaften bezüglich der Ausbildung von HBB könnten die Ursache dafür sein, daß die α -helikale Struktur im Peptid **II** unterhalb des pH-Bereiches 2 nicht stabilisiert wird.

3.2.1.3. Abhängigkeit der Sekundärstruktur der Peptide **I** und **II** von der Salzkonzentration

Durch Zugabe von NaCl zu Lösungen der Peptide **I** und **II** sollte geprüft werden, ob eine Erhöhung der Salzkonzentration zu Beeinträchtigungen bezüglich der Stabilisierung der α -Helix führt.

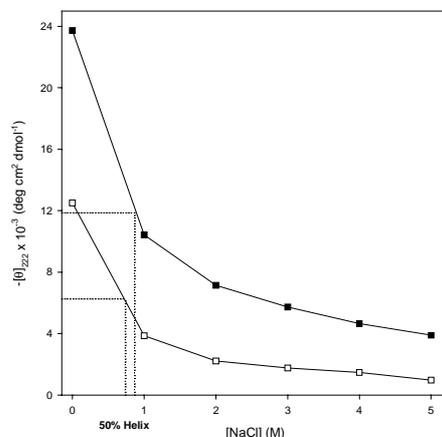


Abb. 31 Verminderung des α -Helixgehaltes von Peptid **I** (■) und **II** (□) bei Erhöhung der Konzentration an NaCl von 0 auf 5 M. Meßbedingungen: 50 μM Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C.

Beide Peptide weisen ein Potential zur Ausbildung von acht Glu⁻-Lys⁺-Salzbrücken auf. Den Salzbrücken zwischen Glu- und Lys-Resten wird ein maßgeblicher Anteil bei der Stabilisierung α -helikaler Strukturen zugeordnet [200, 230-232]. Die bei Zunahme der Salzkonzentration für beide Peptide zu verzeichnende Abnahme der MRE verläuft konsistent mit einer Kompetition um die Salzbrücken zwischen Glu und Lys.

3.2.1.4. Der Cotton-Effekt der Thioxozeptidbindung als Sonde für Konformationsänderungen

Der Austausch eines Carbonylsauerstoffs des Peptids **I** gegen ein Schwefelatom zeigt im resultierenden Thioxozeptid charakteristische Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften. So zeigen Thioxozeptide im UV/Vis-Absorptionsspektrum auf ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergänge der Thioxozeptidbindung zurückzuführende [113, 114], bathochrome Verschiebungen der Absorptionsmaxima [37, 63] auf 250-280 nm.

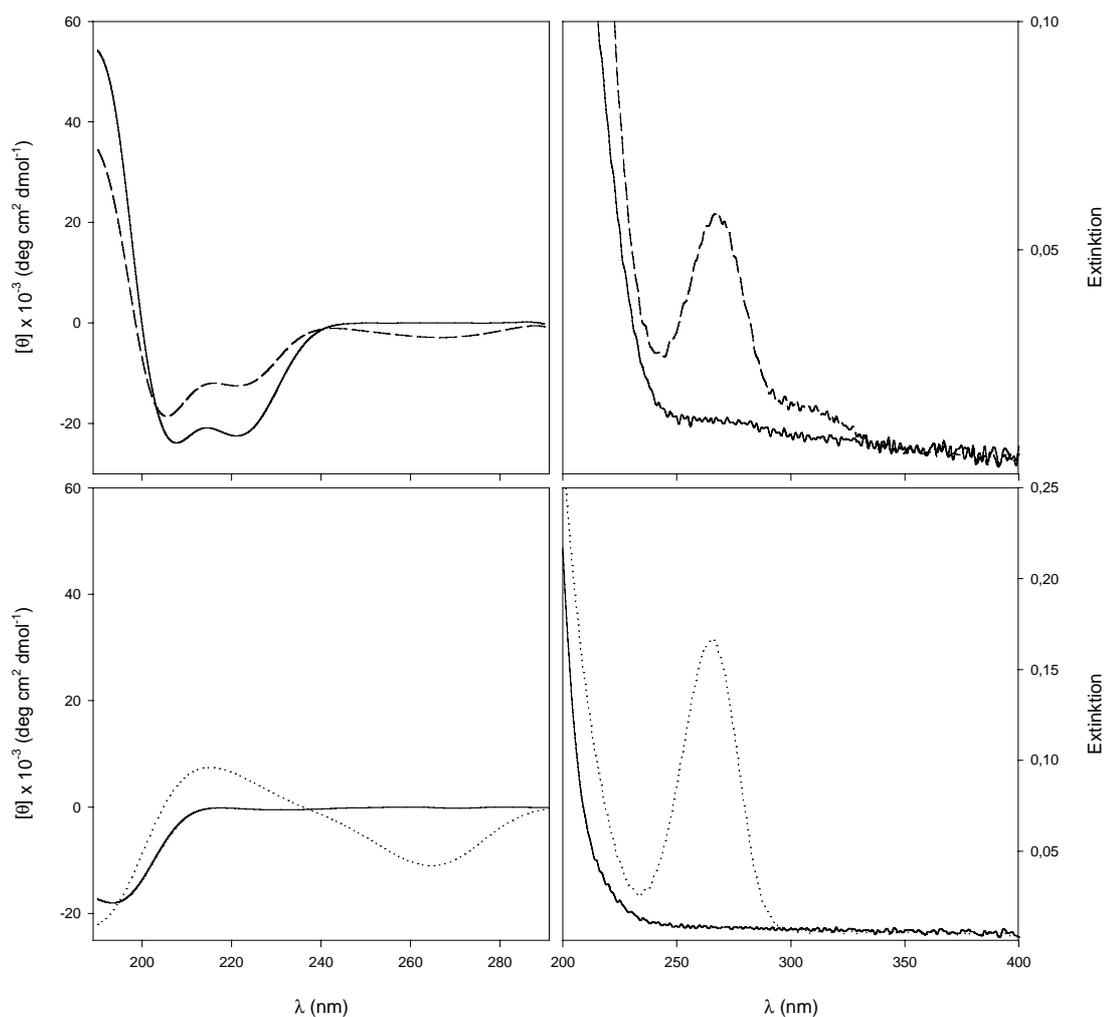


Abb. 32 Vergleich der CD- und UV/Vis-Absorptions-Spektren des Peptids **I** (—) und **II** (--) (**oben**) mit den Spektren des Trialanylesegment Ac-Ala-Ala-Ala-NH₂ (—) und dessen Ala²-thioxylierten Derivat (···) (**unten**). Meßbedingungen: 50 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C.

Dieser ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergang zeigt sich im CD-Spektrum als negativer Cotton-Effekt. Weiterhin wird für eine Thioxozeptidbindung für den ${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$ -Übergang ein positiver Cotton-Effekt gefunden, welcher für die Konfiguration des Asymmetriezentrums in Nachbarschaft der Thioxozeptidbindung charakteristisch ist [233, 234].

Um zu prüfen, welche der in **II** gefundenen Cotton-Effekte der Sekundärstruktur und welche der Thioxozeptidbindung zuzuordnen sind, wurde das thioxylierte Trialanyl Ac-Ala-Ala- ψ [CS-NH]-Ala-NH₂ dargestellt und spektroskopisch untersucht. Im Vergleich zum Oxotripeptid zeigt das thioxylierte Trialanylamid im UV/Vis-Spektrum den ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergang der thioxylierten Ala²-Ala³-Bindung als Absorptionsmaximum bei 265 nm an. Im CD-Spektrum wird neben einem negativen Cotton-Effekt bei 265 nm (${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergang) ein positiver Cotton-Effekt bei 335 nm (${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$ -Übergang) deutlich. Bei spektroskopischer Betrachtung von **II** ist ein gegenüber dem Thioxotripeptid um 3 nm bathochrom verschobener ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergang bei 268 nm festzustellen. Die im CD-Spektrum des Thioxotripeptids gefundenen Cotton-Effekte sind auch für **II** zu finden. So ist bei 267 nm ein negativer Cotton-Effekt (${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergang) und bei 331 nm ein positiver Cotton-Effekt (${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$ -Übergang) zu sehen. Der negative Cotton-Effekt des ${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergangs der Thioxozeptidbindung des Peptids **II** ($[\theta]_{267, \text{thioxo}}$) hat - gegenüber dem für die α -helikale Sekundärstruktur charakteristischen negativen Cotton-Effekt ($[\theta]_{222, \text{Helix}}$) - eine Signalstärke von 25%.

Peptid	UV/Vis	CD mit λ (nm),		
	λ (nm), ϵ (cm ² mmol ⁻¹)	θ (deg cm ² dmol ⁻¹)		
	${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$	Helixbande	${}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*$	${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$
Ac-AAA-NH ₂	-	-	-	-
Ac-AA- ψ [CS-NH]-A-NH ₂	265 ₈₃₃₅	-	265 ₋₁₁₀₀₉	335 ₁₄₁₁
Ac-E ₄ K ₄ A ₃ E ₄ K ₄ -NH ₂	-	222 ₋₂₃₇₄₉	-	-
Ac-E ₄ K ₄ AA- ψ [CS-NH]-E ₄ K ₄ -NH ₂	268 ₁₁₅₉₆	222 ₋₁₂₅₂₀	267 ₋₂₉₂₃	331 ₂₁₀

Tabelle 9. Aus den CD- und UV/Vis-Absorptions-Spektren ermittelte Extrema der Absorptionen mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten und MRE.

Die Charakterisierung dieser Bande während der Änderung von Temperatur (**A**), pH-Wert (**B**), TFE- (**C**) und GdnCl-Zugabe (**D**) sowie der Erhöhung der Salzkonzentration (nicht abgebildet) zeigt eine Korrelation mit der Änderung des α -helixinduzierten Cotton-Effektes bei 222 nm.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Thioxozeptidbindung eine wertvolle Sonde zur Verfolgung dynamischer Prozesse darstellt, die mit einer Änderung der spektroskopischen Eigenschaften verbunden sind. Der Absorptionsbereich des Thioxo chromophors im CD-Spektrum liegt mit 260-

285 nm außerhalb des Fern-UV-Absorptionsbereiches von Sekundärstrukturelementen. Dies ermöglicht eine Charakterisierung der Sekundärstruktur auch außerhalb der Bereiche für sekundärstrukturtypische Cotton-Effekte.

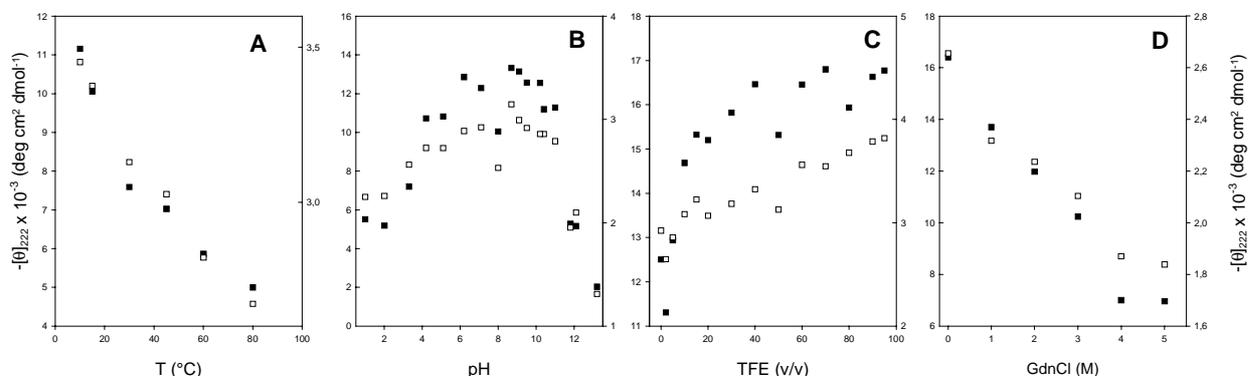


Abb. 33 Vergleich der MRE des Peptids I bei 222 nm (■) und 267 nm (□) durch (A): Temperaturerhöhung von 0 auf 80°C bei pH 7. (B):Veränderung des pH-Wertes von pH 1 bis 13 bei 4°C. (C):Erhöhung des α -Helixcharakters durch TFE-Zugabe bei pH 7, 4°C. (D):Erniedrigung des α -Helixcharakters durch GdnCl-Zugabe bei pH 7, 4°C.

3.2.1.5. Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen der Peptide I und II

Durch CD-spektroskopische Untersuchungen sind zwar die Art und die Stärke, nicht aber der Ort der Ausbildung einer Sekundärstruktur bestimmbar. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ist die Lokalisierung α -helikaler Strukturbereiche innerhalb der Peptidkette möglich. Da die α -Helix ein reguläres Sekundärstrukturelement mit Bereichen gleicher oder periodisch wiederkehrender Konformation des Peptidrückgrats darstellt, ist sie durch fest definierte Torsionswinkel und durch feste Abstände zwischen den Protonen des Rückgrats charakterisiert [235]. Wenn diese Abstände unterhalb 5Å liegen, sind im NOESY-Spektrum Kreuzsignale (*crosspeaks*) für die beteiligten Protonen zu erwarten. Für eine α -Helix sollten starke NOE-Signale zum ersten zwischen den Amidprotonen $\text{H}^{\text{N}}(i)\text{-H}^{\text{N}}(i+1)$ sowie $\text{H}^{\text{N}}(i)\text{-H}^{\text{N}}(i+2)$ und zum zweiten zwischen den $\text{H}^{\alpha}(i)\text{-H}^{\alpha}(i+3)$ -Protonen auftreten. Weiterhin sind die Werte der Kopplungskonstanten für den Winkel ϕ des Peptidrückgrats, $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha})$ für α -Helices typischerweise kleiner 5 Hz [236]. Anhand der chemischen Verschiebung der Signale einer Aminosäure ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein einer Sekundärstruktur erhältlich [237]. Befindet sich die betreffende Aminosäure in einem Sekundärstrukturelement, ändert sich die chemische Verschiebung der Signale der Aminosäureprotonen gegenüber dem unstrukturierten Zustand. Dieser Unterschied der chemischen Verschiebung (*chemical shift index*) spiegelt die Gleichförmigkeit der chemischen Umgebung in einem regulären Sekundärstrukturelement wieder. Sowohl für das Peptid I als auch Peptid II wurden für die Aminosäuren Ala, Glu und Lys die für α -Helices typische Verschiebung der H^{α} -Protonen nach hohem Feld festgestellt. Unstrukturierte Peptide weisen charakteristische Kopplungskonstanten $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha})$ von 6.5 – 8.5 auf [238, 239]. Die mit $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}) \sim 4 - 5$ Hz gefundenen Werte geben für beide Peptide ebenfalls Hinweise auf α -helikale

Strukturanteile. Während die beiden hier untersuchten Nonadecapeptide nur sehr schwache bzw. nicht detektierbare NOE-Signale aufweisen und somit keine Bestimmung der α -helikalen Bereiche erlaubten, konnte Lyu *et al.* [199] an Peptiden ähnlicher Sequenz (Suc-TyrSerGlu₄Lys₄Xaa₃Glu₄Lys₄-NH₂) die Ausbildung von NOEs beobachten. Hierbei wurde der dem *N*-Terminus benachbarte Glu-Lys-Block als der Bereich der höchsten α -Helicität ermittelt. Daß trotz ähnlicher Aminosäuresequenz für die Peptide **I** und **II** keine NOE-Signale erhalten werden konnten, ist möglicherweise auf die Ausbildung einer *capping box* [240] durch den Serinrest in Position 3 zurückzuführen. Durch eine HBB zwischen der Ser³-Seitenkette und dem NH der Hauptkette des Glu⁶-Restes bildet die Glu-Seitenkette eine reziproke HBB zum N ^{α} des Ser³, was in einer weiteren Stabilisierung der α -Helix resultiert [241]. Die Einführung einer negativen Ladung in den *N*-Terminus durch eine Succinyl-Blockierung trägt ebenfalls zur Stabilisierung einer α -Helix bei [242].

3.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung der thioxylierten Endomorphine

An den hochselektiv am μ -Opiatrezeptor agonistisch wirksamen, endogenen Tetrapeptiden Endomorphin-1 (EM-1 - H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) und Endomorphin-2 (EM-2 - H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) [243] wurden Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften bei Einführung einer Thioxozeptidbindung in unterschiedliche Positionen innerhalb des Peptidrückgrates untersucht. Durch Thioacylierung mittels Thioxoacyl-6-nitrobenzotriazolid-Derivaten bzw. O/S-Austausch mit Thioxylierungsreagenzien wurden das Tyr¹-thioxylierte EM-1-Derivat (EM-1a) sowie die Tyr¹- (EM-2a), Pro²- (EM-2b), Phe³- (EM-2c) und Phe⁴- thioxylierten (EM-2d) Derivate des EM-2 dargestellt (Kapitel 2.3.).

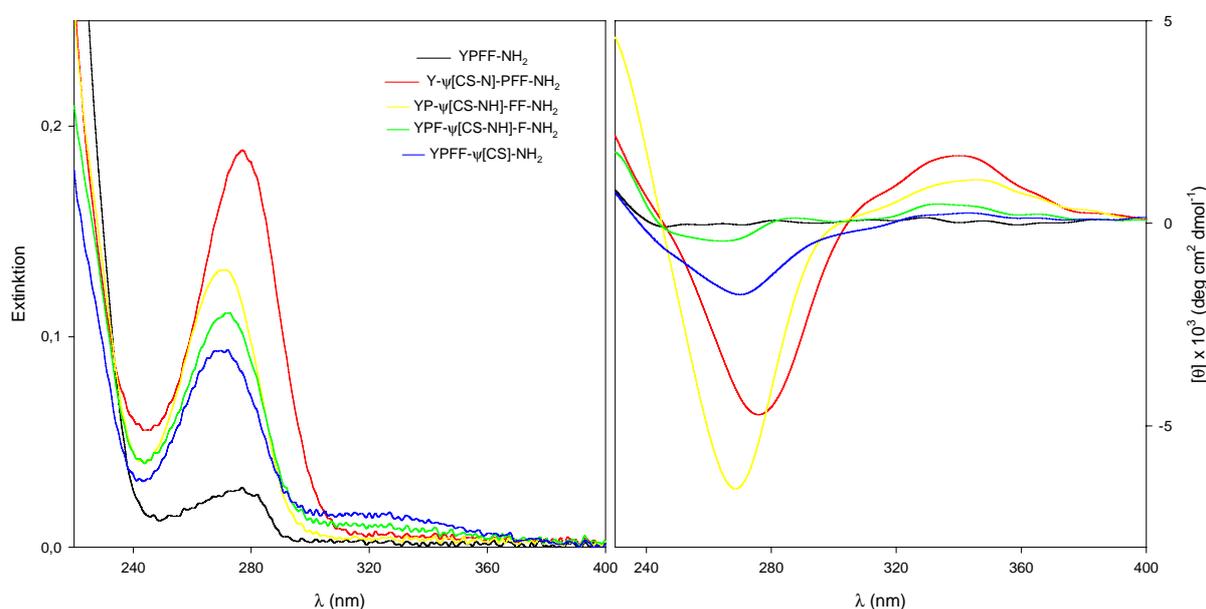


Abb. 34 Einfluß der Position der Thioxozeptidbindung im EM-2 auf die Cotton-Effekte anhand der UV-Absorptions- (**links**) und CD-Spektren (**rechts**) des EM-2 und der vier thioxylierten Derivate. Meßbedingungen: 50 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C; Schichtdicke $d = 1$ mm; CD-Scangeschwindigkeit 100 nm/min; Response 1 s; 8 Akkumulationen

Die unterschiedliche Position des Schwefels im Peptidrückgrat bedingt neben unterschiedlichen Elutionseigenschaften in der Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) auch Unterschiede in den spektroskopischen Eigenschaften der thioxylierten Derivate. Die spektroskopischen Eigenschaften der Thioxopeptide wurden mittels NMR-, UV/Vis-Absorptions- und CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei zeigten sich in Abhängigkeit von der Position der Thioxozeptidbindung differente spektroskopische Eigenschaften. Bei Betrachtung der UV-Absorptions- und CD-Spektren der Derivate wird deutlich, daß die Position des Schwefels im Peptid durch unterschiedliche Absorptionsmaxima und unterschiedliche Extinktionskoeffizienten charakterisiert werden kann (Tabelle 10). Eine Korrelation der Absorptionsmaxima und der Thioxylierungsposition ist anhand der Stellung des Schwefels zur Xaa-Pro-Bindung grob zu treffen: Die thioxylierten Tyr¹-Pro²-Peptidbindungen zeigten ein Absorptionsmaximum zwischen 276 und 279 nm. Bei Einführung der Thioxozeptidbindung in dem Prolin in der Peptidkette nachfolgende Positionen, erfolgt eine hypsochrome Verschiebung.

Hierbei wird deutlich, daß in prolinhaltigen Thioxozeptiden Thioxylierungspositionen vor dem Prolin ein längerwelliges Absorptionsmaximum (>275 nm) aufweisen. Erfolgt die Thioxylierung am Prolin oder nachfolgend der Xaa-Pro-Bindung, tritt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nach $\lambda < 275$ nm auf. Während im UV/Vis-Spektrum erkennbar wird, daß sich die Extinktionskoeffizienten von EM-2b, EM-2c und EM-2d zum C-terminalen Ende um 30, 40 und 50% (bezogen auf ϵ_{2a}) verringern, ist diese Abhängigkeit bei Betrachtung der negativen Cotton-Effekte in den CD-Spektren nicht zu verzeichnen. Hierbei zeigt EM-2b, gefolgt von EM-2a, EM-2d und EM-2c, den (für einen $^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$ -Übergang charakteristischen) negativsten Cotton-Effekt. Die einen $^1n \rightarrow ^3\pi^*$ -Übergang charakterisierenden Banden konnten für alle vier thioxylierten Derivate des EM-2 UV/Vis- (Bereich 300 – 370 nm) und CD-spektroskopisch (Bereich 334 – 345 nm) detektiert werden (Tabelle 10). Bei Verlagerung der Thioxozeptidbindung in Richtung des C-Terminus wird eine Zunahme des positiven Cotton-Effektes auffällig.

Peptid	UV/Vis	CD	
	λ (nm), ϵ (cm ² mmol ⁻¹)	λ (nm), θ (deg cm ² dmol ⁻¹)	
	$^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$	$^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$	$^1n \rightarrow ^3\pi^*$
EM-1	277 ₈₈₇₅	289 ₋₅₄₅	-
EM-1a	277 ₁₆₉₆₅	278 ₋₄₇₅₉	341 ₁₇₈₉
EM-2	277 ₄₄₂₀	-	-
EM-2a	277 ₁₅₄₃₂	276 ₋₄₇₂₆	340 ₁₆₆₇
EM-2b	271 ₁₂₅₈₅	268 ₋₆₅₅₈	345 ₁₀₇₂
EM-2c	272 ₁₁₀₅₈	265 ₋₄₃₉	336 ₄₇₃
EM-2d	268 ₉₆₅₉	270 ₋₁₇₆₁	343 ₂₅₀

Tabelle 10 Aus den UV-Absorptions- und CD-Spektren der Endomorphine und ihrer thioxylierten Derivate ermittelte Absorptionsmaxima mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten und MRE. Meßbedingungen: 50 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C; Schichtdicke $d = 1$ mm; CD-Scangeschwindigkeit 100 nm/min; Response 1 s; 8 Akkumulationen

Die Substitution eines Carbonylsauerstoffs durch ein Schwefelatom zeigt charakteristische kernresonanzspektroskopische Signale in den entsprechenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren. So wird dieser O/S-Austausch im ^{13}C -Spektrum als starke Verschiebung des Thiocarbonylsignales nach Tieffeld (ca. 30 ppm) deutlich und ermöglicht somit die eindeutige Identifizierung der Position der C=S-Gruppe [3]. In TOCSY-Experimenten gestattet die homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Korrelation die Identifikation beider an der Thioxozeptidbindung beteiligter Aminosäurereste und ermöglicht somit Aussagen über die Konstitution des Thioxozeptids. Heteronukleare *long range* Korrelationen (HMBC) erlauben die Charakterisierung der benachbarten Protonen NH und H-C $_{\alpha}$. Jensen *et al.* [51] beschrieb

eine allgemeine Regel für die Änderung der chemischen Verschiebung bei Thioxylierung einer Peptidbindung, wobei das eingeführte Schwefelatom die Signale der entsprechenden Aminosäure folgendermaßen nach Tieffeld verschiebt: nachfolgendes NH 1.6 bis 2.03 ppm, $H-C_\alpha$ 0.24 bis 0.62 ppm, CO 29.9 bis 32.3 ppm, C_α 7.7 bis 11.3 ppm. Im Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der thioxylierten Derivate mit dem nativen EM-2 wiesen alle modifizierten Aminosäurereste die charakteristische chemische Verschiebung der CS-NH-Protonen nach Tieffeld auf. Vorstellbar wird dies bei Betrachtung der durch den partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung verursachten Resonanzstrukturen. Im Falle einer Thiopeptidbindung liegt das Gleichgewicht bevorzugt auf der Seite der dipolaren Grenzstruktur A (Abb. 35). Die zunehmende positive Ladung am Stickstoffatom führt zu einer Entschirmung der Protonen am C_α -Atom ($H-C_\alpha$) und deren Verschiebung nach Tieffeld. Durch die Delokalisierung der d-Orbitale des Schwefelatoms und der dadurch erhöhten Polarisierbarkeit zeigt das Thioxocarbonyl eine stärkere Verschiebung nach Tieffeld [47].

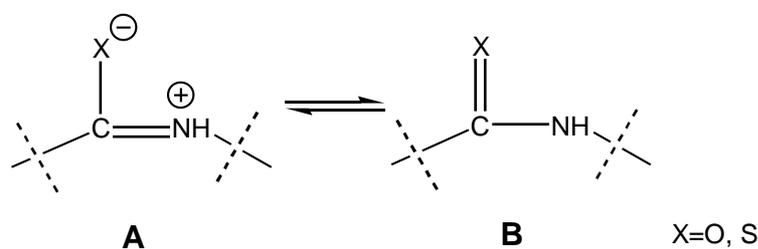


Abb. 35 Durch den partiellen Doppelbindungscharakter bedingte Ladungsverteilung einer Peptidbindung.

Der durch Resonanz der CX-NH-Bindung bedingte, partielle Doppelbindungscharakter der Peptidbindung zieht eine Einschränkung der freien Drehbarkeit um diese Bindung nach sich, die sich in einer Rotationsbarriere von ca. 60 – 100 kJ mol⁻¹ ausdrückt. Dies führt zum Auftreten von *cis*- und *trans*-Isomeren ($\omega = 0^\circ$ und $\omega = 180^\circ$). Während in Peptiden, welche nur sekundäre Amidpeptidbindungen ausbilden, weniger als 1% *cis*-Isomere gefunden wurden [244], ist deren Auftreten in prolinhaltigen Peptiden deutlich erhöht.

Die CZE erlaubt aufgrund von Mobilitätsunterschieden im elektrischen Feld die Trennung von in Größe und Ladung differenten Analyt-Ionen. Ähnlich den Untersuchungen von Meyer *et al.* [245] zeigen die *cis*-Isomere der thioxylierten Endomorphine (verglichen mit den *trans*-Isomeren) höhere absolute elektrophoretische Mobilitäten und damit kürzere Migrationszeiten. Aus den gegen die Migrationszeit korrigierten Signalflächen konnten die Verteilungen der *cis/trans*-Isomere der Peptide bestimmt werden. Eine Verifizierung der erhaltenen Daten erfolgte kernresonanzspektroskopisch (Tabelle 11). Die *cis/trans*-Isomerisierung der Amidbindung ist gewöhnlich so langsam, daß im NMR-Spektrum separate Signale für das jeweilige Isomer zu finden sind [246]. Die Signale der in Nähe der isomerisierenden Bindung befindlichen Kerne zeigen die deutlichsten Unterschiede zwischen den Isomeren. Zur Zuordnung der *cis/trans*-Konformationen der Peptidyl-Prolyl-(-Xaa-Pro-) - Peptidbindung werden verschiedene Ansätze genutzt. Im Folgenden die Gebräuchlichsten:

- (i) Unterschiedliche Kreuzsignale im NOESY-Spektrum: XaaH_α – ProH_α für das *cis*- und XaaH_α – ProH_β für das *trans*-Konformer [235].
- (ii) Charakteristische Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der ProC_β und ProC_γ im ¹³C-Spektrum [235, 247].
- (iii) Das Signal der chemischen Verschiebung der XaaH_α nach hohem Feld für das *cis*-Konformer [235, 248].

Im allgemeinen sind für Peptide gut getrennte Konformerensignale in der Region der α-Protonen im Bereich 4 ppm und Signale der NH-Protonen im Bereich 8 ppm zu erwarten. Für andere, die N-terminale Sequenz Tyr-Pro enthaltende opioide Peptide wie das Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂ [249], das Morphiceptin [250] oder auch das β-Casomorphin [251] und verschiedener Derivate desselben [252], lassen sich die Signale der aromatischen Protonen des Tyr¹ zur Charakterisierung der Konformation heranziehen. Hierbei weist das *cis*-Konformer eine chemische Verschiebung des Tyr_{ortho}-Signals nach hohem Feld auf. Diese Signale stammen von je zwei Protonen und treten als Multipllett auf, welches ein etwa vierfach verbessertes Signal-Grundrauschen-Verhältnis aufweist als ein α-Proton [252].

Peptid	CZE: <i>cis</i> -Isomer (%)	¹ H-NMR: <i>cis</i> -Isomer (%)
EM-2	31	25
EM-2a	21	21
EM-2b	51	50
EM-2c	37	38
EM-2d	33	35

Tabelle 11 Einfluß der Position der Thioxozeptidbindung auf die Population der *cis/trans*-Isomere. Die Bestimmung der Konformerenverhältnisse erfolgte über die Integration der Flächen der mittels CZE getrennten *cis/trans*-Konformere und durch kernresonanzspektroskopische Untersuchungen.

Das Verhältnis von *cis/trans*-Isomeren wird sowohl durch sterische als auch elektronische Faktoren bestimmt [253-255]. Während der erhöhte sterische Anspruch des Schwefelatoms bei Thioxylierung der Tyr¹-Pro²-Bindung eine leichte Verringerung des Anteils an *cis*-Konformer bewirkt, ist bei Verlagerung der Thioxozeptidbindung zum C-Terminus hin eine Erhöhung der *cis*-Population zu detektieren.

Die Isomerisierung ist als Reaktion erster Ordnung durch die Gleichung

$$t \leq \frac{1}{k_1 + k_2}$$

mit k_1 und k_2 als Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion beschreibbar. Eine Trennung beider Isomere ist somit nur möglich, wenn der zeitliche Abstand t zwischen den Isomeren kürzer als die Relaxationszeit der Isomerisierung ist. Bei 25°C korrespondieren die Isomerisierungsraten prolinhaltiger Oligopeptide (10^{-3} bis 10^{-2} s⁻¹ [256-258]) mit Relaxationszeiten von Sekunden bis wenigen Minuten, was in den meisten Fällen für eine Trennung deutlich zu kurz ist. So konnten unter

Verwendung von octadecyl-modifizierten Silika- und cyclodextringebundenen stationären Phasen [259-265] oder durch RP-HPLC bei erniedrigter Temperatur [252, 256, 261, 266, 267] lediglich die *cis/trans*-Isomere von Di- und Tripeptiden analytisch bzw. semipräparativ voneinander getrennt werden. Es wurde gezeigt, daß die Isomerisierung auf der Säule mit der chromatographischen Trennung interferiert, wenn die charakteristischen Zeiten der Isomerisierung und der Trennung sich überlappen [256, 261, 266]. Durch Schutkowski *et al.* [60, 62] ist bekannt, daß die Isomerisierung von Peptiden mit thioxylierter Xaa-Pro-Bindung in wäßriger Lösung bis zu 125-fach langsamer gegenüber dem nicht modifizierten Peptid abläuft. Die Orbitale des Schwefelatoms können, verglichen mit dem Sauerstoffatom, die Orbitale des Kohlenstoffatoms schlechter überlappen. Dies führt im Thioxocarbonyl zu einer erhöhten Polarität [255] und zu einer Erhöhung der Rotationsbarriere der C-N-Bindung [268, 269] um ca. 8 – 12 kJ/mol [61, 107, 270, 271]. Die dipolare Resonanzstruktur im Thioxoamid liefert dadurch in den Grundzuständen einen größeren Beitrag als im Amid [272], was zu einem stärkeren partiellen Doppelbindungscharakter der Thioxopeptidbindung führt. Während Walter *et al.* für Thioxoformamide eine Anreicherung der Isomere durch Kristallisation [273, 274] bzw. Schichtchromatographie [275] zeigen konnte, ist eine quantitative *cis/trans*-Isomerentrennung in präparativem Maßstab für Thioxopeptide bislang nicht beschrieben. Während in EM-2a eine bezogen auf EM-2 verlangsamte *cis/trans*-Isomerisierung gefunden wird (bei pH 7.4 und 15°C ca. 245-fach), weisen EM-2b, EM-2c und EM-2d in kapillarelektrophoretischen Untersuchungen mit dem Oxoderivat EM-2 vergleichbar hohe Isomerisierungsraten auf. Da es sich bei der *cis/trans*-Isomerisierung um eine reversible Reaktion erster Ordnung handelt, gilt während einer RPC-Trennung des Isomerengemischs auf der RP-Säule folgendes Schema:

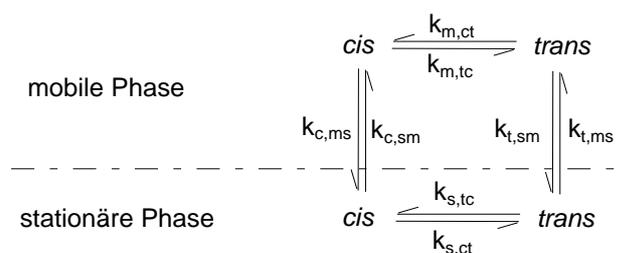


Abb. 36 Schema der Interkonversion der *cis/trans*-Isomere in der mobilen und stationären Phase einer RP-Säule.

Die Beeinflussung der chromatographischen Trennung durch die Isomerisierungsreaktion auf der Säule ist durch die Damköhler-Zahl (*Da*) [256] beschreibbar. Dieser dimensionslose Wert drückt das Verhältnis der charakteristischen Trennzeit und der charakteristischen Isomerisierungszeit aus. Er ist definiert als:

$$Da = \frac{L k_{ct} \left(\frac{1+1}{K_m} \right)}{u_o} = \frac{L (k_{ct} + k_{tc})}{u_o}$$

wobei L die Säulenlänge, K_m die Gleichgewichtskonstante für die Interkonversion in der mobilen Phase und u_0 Geschwindigkeit der mobilen Phase darstellt. Die Konstanten der *cis*→*trans* und *trans*→*cis*-Umwandlungen sind definiert als:

$$k_{ct} = k_{s,ct}k'_c + k_{m,ct}$$

$$k_{tc} = k_{s,tc}k'_t + k_{m,tc}$$

wobei k_s und k_m die Konstanten für die Reaktion an der stationären und mobilen Phase und k'_c und k'_t die Retentionsfaktoren des *cis*- und *trans*-Isomers sind.

Besitzt die Damköhler-Zahl einen Wert < 0.1 Da, so interferiert die *cis/trans*-Isomerisierung nicht mit dem chromatographischen Prozeß und die Konformere werden getrennt. Ist die Damköhler-Zahl größer 0.1 Da, ist die Isomerisierung so schnell, daß beide Konformere zusammen als Einzelpeak eluieren. Der Retentionsfaktor dieses Peaks liegt zwischen denen des *cis*- und *trans*-Isomers. Nach Definition der Da sollten kurze RP-Säulen, hohe Eluentenflußraten und niedrige Temperaturen den Wert für Da soweit senken, daß die Isomerisierungsreaktion die Trennung nicht beeinflußt. Jedoch ist mit Kombinationen aus kurzen Säulen, hohen Flußraten und geringen Temperaturen in der Regel keine hohe Trennungseffizienz gegeben. Weiterhin schränkt eine erhöhte Viskosität der mobilen Phase bei niedriger Temperatur die Verwendung hoher Flußraten ein. Es zeigte sich, daß eine Erniedrigung der RP-Säulentemperatur die effektivste Methode zur Erniedrigung der Da darstellt. Ursache hierfür ist, daß die Aktivierungsenergie der Isomerisierungsreaktion gewöhnlich höher ist, als die Temperaturabhängigkeit von Diffusion und Viskosität. Eine auf die Konformerenisolierung optimierte Trennung (erniedrigte Säulentemperaturen, kurze Trennzeiten, Schockfrostten der erhaltenen Fraktionen mit flüssigem Stickstoff, kontrollierte Gefriertrocknung) mittels HPLC ermöglichte den Erhalt der getrennten *cis*- und *trans*-Konformere. Auf diesem Wege konnten EM-1a und EM-2a mittels präparativer HPLC isomerspezifisch aufgetrennt werden.

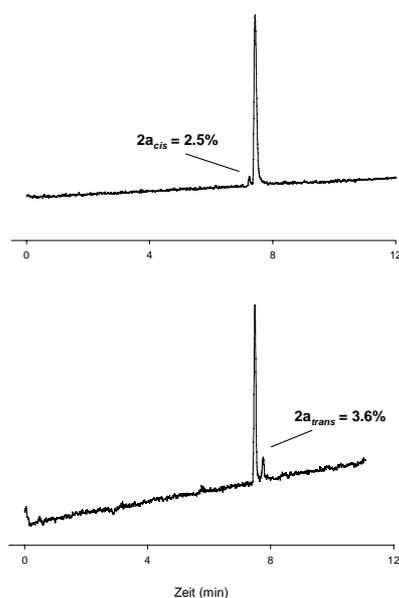


Abb. 37 CZE der mittels pHPLC getrennten und gefriergetrockneten *cis*- und *trans*-Isomere von EM-2a. Die Reinheit der Isomere betrug 95 – 98%.

Bei der chromatographischen Trennung zeigte das *cis*- gegenüber dem *trans*-Isomer eine stärkere Wechselwirkung und damit verstärkte Bindung an die stationäre Phase der zur Trennung verwendeten RP-Säulen. Dieses Elutionsverhalten entspricht dem von Melander *et al.* [266] benutzten Modell zur Bestimmung der hydrophoben Kontaktfläche in prolinhaltigen Dipeptiden. Es geht davon aus, daß ein *cis*-Konformer eine größere hydrophobe Kontaktfläche zur Bindung an die stationäre Phase hat und somit länger als das *trans*-Konformer retardiert wird. Die aus der pHPLC erhaltenen Fraktionen der Trennung wurden sofort nach Erhalt und nach dem Lyophilisieren der Proben mittels Zonenelektrophorese auf ihre Konformerenreinheit geprüft (Abb. 37). Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Isomere in einer bis zu 98%igen Reinheit erhältlich sind. Unter den verwendeten Bedingungen trat im Gegensatz zu Kalman *et al.* [252] beim Gefriertrocknen der Trennungsfractionen keine Interkonversion auf. Erstmals konnten somit die *cis/trans*-Isomere eines thioxylierten Peptids in fester Form und präparativem Maßstab erhalten werden, welche bei -20°C mindestens vier Wochen stabil sind.

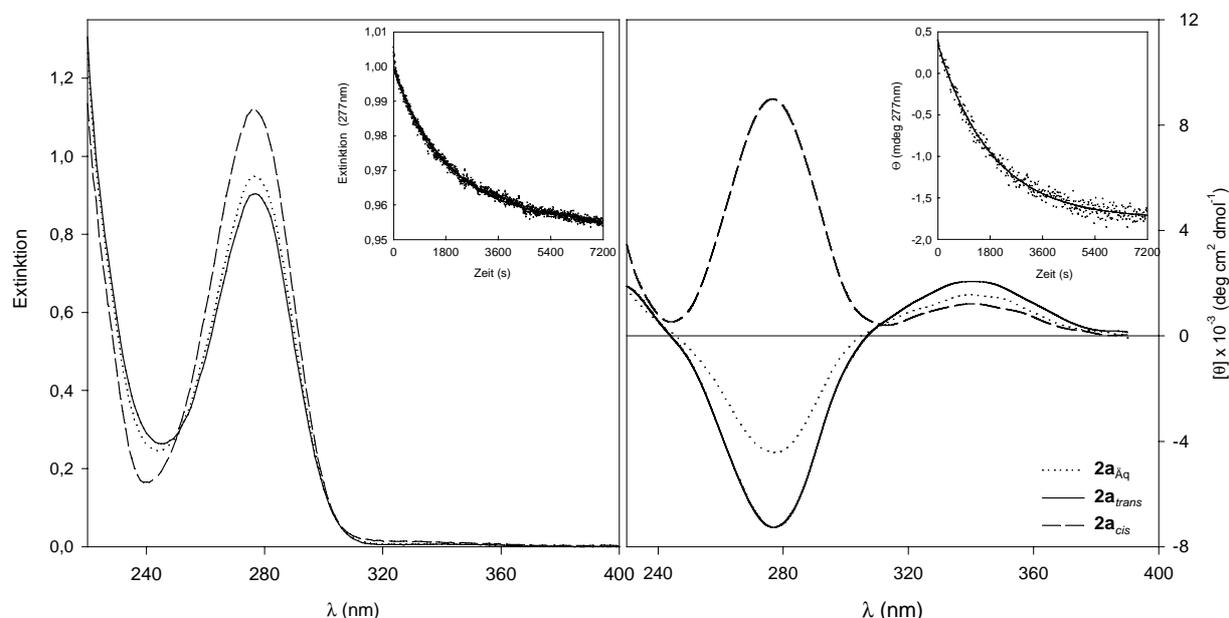


Abb. 38 Vergleich der isomerspezifischen Cotton-Effekte der reinen *cis*- und *trans*-Isomere des EM-2a und der äquilibrierten Lösung anhand der UV/Vis- (**links**) und CD-Spektren (**rechts**). Meßbedingungen: 10 mM Natriumphosphatpuffer, 200 μM Peptid, pH 7.4 und 4°C ; Äquilibrierte Probe (.....), EM-2a_{trans} (—) und EM-2a_{cis} (- - -). Eingefügte Diagramme: Charakterisierung der Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung des EM-2a über die Änderung der Extinktion im UV/Vis-Spektrum (**linker Inset**) und der MRE im CD-Spektrum (**rechter Inset**). Meßbedingungen: 10 mM Natriumphosphatpuffer, 200 μM Peptid, pH 7.4, 40°C . Die bei 277 nm gemessene Änderung des Extinktionskoeffizienten bzw. der Elliptizität folgt einer Reaktion Erster Ordnung mit einer beobachteten Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs,UV}} = (5.18 \pm 0.02) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{obs,CD}} = (5.38 \pm 0.02) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Der Erhalt der reinen *cis*- und *trans*-Konformere ermöglichte eine isomerspezifische spektroskopische Charakterisierung durch UV/Vis- und CD-Spektroskopie. In den Untersuchungen wurden differente Spektren für die *cis*- und die *trans*-Formen gefunden. Im UV/Vis-Absorptions-Spektrum zeigen beide Konformere bei 277 nm ein Maximum. Während der Extinktionskoeffizient des *cis*-Isomers eine Signalzunahme von 10% gegenüber dem Gleichgewichtszustand aufweist, fällt der des *trans*-Isomers um ca. 14% ab. In den CD-Spektren werden isomerspezifische Cotton-Effekte gefunden. Während das

cis-Isomer einen positiven Cotton-Effekt ($\lambda_{\max} = 277$ nm) aufweist, zeigt das zugehörige *trans*-Isomer einen negativen Cotton-Effekt ($\lambda_{\max} = 277$ nm). Unter Beachtung der Umkehrung des Vorzeichens von ϵ ergibt sich hieraus eine Signaländerung für die *cis*→*trans*-Isomerisierung von 190% und die *trans*→*cis*-Isomerisierung von 90%. Beide Konformere zeigen einen für den $n_s \rightarrow \pi^*$ -Übergang charakteristischen Cotton-Effekt bei $\lambda = 341$ nm. Hierbei zeigt das *cis*-Isomer eine um 60% hypochrom verstärkte Elliptizität.

Die Charakterisierung der Kinetik und Thermodynamik einer *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion erfolgt häufig durch isomerspezifische Proteolyse. Eine andere Möglichkeit besteht in der Veränderung des *cis/trans*-Gleichgewichts durch einen pH- und/oder Lösungsmittelsprung und der spektroskopischen Verfolgung der Relaxation. So kann in Xaa-Pro-haltigen Peptiden die Protonierung bzw. Deprotonierung von zum Prolin benachbarter ionisierbarer Gruppen die Kinetik der Isomerisierungsreaktion beeinflussen.

Peptid	UV/Vis		CD	
	λ (nm), ϵ (cm ² mmol ⁻¹)		λ (nm), θ (deg cm ² dmol ⁻¹)	
	$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang	$n_s \rightarrow \pi^*$ -Übergang	$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang	$n_s \rightarrow \pi^*$ -Übergang
EM-2a _{eq}	277 ₁₄₅₈₁	335 ₁₀₇	276 ₋₄₇₂₆	340 ₁₆₆₇
EM-2a _{trans}	277 ₁₃₇₈₀	335 ₁₀₄	277 ₋₇₃₆₆	341 ₁₉₆₂
EM-2a _{cis}	276 ₁₅₁₅₃	334 ₁₂₂	277 ₈₉₈₈	340 ₁₂₁₉

Tabelle 12 Aus den UV/Vis- und CD-Spektren der *cis* und *trans*-Isomere des EM-2a ermittelte Grenzwerte. Bedingungen: 200 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7.4; 4°C; Schichtdicke = 1 mm.

Während für prolinhaltige Dipeptide eine pH-abhängige Änderung der *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit [276] sowie eine pH-Abhängigkeit des *cis/trans*-Verhältnisses [277], [278] gefunden wurde, sind die Geschwindigkeitskonstanten der Xaa-Pro-Isomerisierung [279] und die *cis*-Gehalte prolinhaltiger Oligopeptide [257, 280] in den meisten Fällen im pH-Bereich 3-9 pH-unabhängig. Von Reimer *et al.* [281, 282] konnte bei Ionisierung von zum Prolin benachbarter Seitenkettengruppen gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der Xaa-Pro-*cis/trans*-Isomerisierung in His-Pro- und Tyr-Pro-haltigen Peptiden einer pH-Abhängigkeit unterliegt.

Im Falle der Tyr-Pro-Bindung verlangsamt sich die Isomerisierungsgeschwindigkeit gegenüber der protonierten, ungeladenen Form von $1.20 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ um zwei Drittel auf $0.40 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [282]. Die pH-Abhängigkeit einer thioxylierten Tyr-Pro-Bindung wurde mittels zeitabhängigen ¹H-NMR-Spektren des Peptids EM-2a nach einem pH-Sprung von pH 7.4 nach 11.1 und von pH 11.1 nach 7.4 bei 40°C untersucht (Abb. 39). Das Einbringen einer negativen Ladung durch Deprotonierung resultiert in einer Abnahme der Summe der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten von $k_{\text{obs}} = 5.31 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ auf $3.25 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

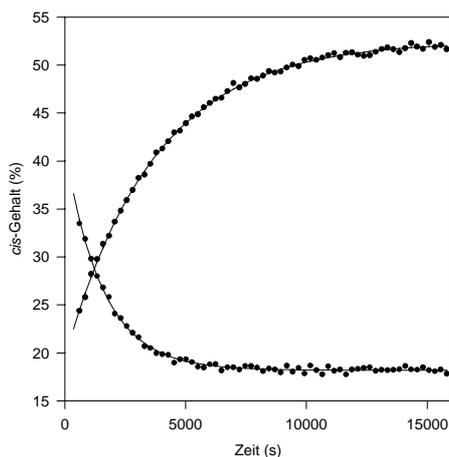
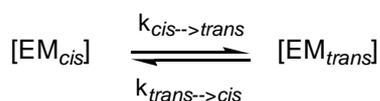


Abb. 39 pH-abhängige Änderung des *cis*-Gehaltes in EM-2a. Die Bestimmung der Änderung des *cis*-Gehaltes erfolgte nach einem pH-Sprung von pH 7.4 auf 11.1 und pH 11.1 auf 7.4 mittels $^1\text{H-NMR}$.

Die Ursachen hierfür sind entweder in einer direkten Wechselwirkung der negativen Ladung mit einem Übergangszustand der Rotation oder/und in den, durch die höhere Elektronendichte des Phenylrings bedingten, lokalen Wechselwirkungen des Tyrosinrestes [283, 284] zu sehen. Eine eindeutige Entscheidung kann derzeit nicht getroffen werden. Biologische Relevanz sollte diese Hemmung der Isomerisierung jedoch nicht besitzen, da unter physiologischen Bedingungen anionische Tyrosinyl-Hydroxidgruppen nicht begünstigt sind.

Da die reinen *cis*- und *trans*-Isomere von EM-2a durch verschiedene Extinktionskoeffizienten UV/Vis- und durch isomerspezifische Cotton-Effekte CD-spektroskopisch charakterisierbar sind, sollten Verschiebungen des *cis/trans*-Verhältnisses mit definierten Änderungen der Banden der $^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$ bzw. $^1n \rightarrow ^3\pi^*$ -Übergänge korrelieren. Ausgehend vom reinen *cis*- und *trans*-Isomer wurde in zeitabhängigen Messungen die Kinetik der *cis/trans*-Isomerisierung bei einer Wellenlänge von 277 nm UV- und CD-spektroskopisch untersucht (Abb.40). Die erhaltenen Summen der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten k_{obs} setzen sich additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten der Prozesse *cis*→*trans* (k_{ct}) und *trans*→*cis* (k_{tc}) zusammen. Für das Gleichgewicht der Isomerisierung gilt:



$$(k_{\text{ct}}) \times [\text{EM}_{\text{cis}}] = (k_{\text{tc}}) \times [\text{EM}_{\text{trans}}]$$

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{ct}} + k_{\text{tc}}$$

Unter Verwendung der mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmten Verteilung der Isomere lassen sich hieraus die beiden Einzelkonstanten errechnen. Aus der bei 40°C und pH 7.4 UV-spektroskopisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{obs,UV,40}^\circ\text{C}} = 5.18 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ konnten die Einzelkonstanten $k_{\text{ct}} = 4.09 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{tc}} = 1.09 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Diese stimmen mit denen unter identischen Bedingungen CD-

spektroskopisch aus $k_{\text{obs,CD},40^\circ\text{C}} = 5.38 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelten $k_{\text{ct}} = 4.25 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{tc}} = 1.13 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ gut überein.

Um die Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierung der nativen und der thioxylierten Tyr-Pro-Bindung unter identischen Bedingungen zu bestimmen, wurden $^1\text{H-NMR}$ -verfolgte pH-Sprung-Experimente an EM-2 und einer äquilibrierten Probe von EM-2a bei pH 7.4 und 15°C durchgeführt. Hierbei konnte eine 245-fache Verlangsamung der *cis/trans*-Isomerisierung der Tyr- ψ [CS-N]-Pro-Bindung gegenüber der Tyr-Pro-Bindung gefunden werden. Unter identischen Meßbedingungen wurde die Isomerisierungsgeschwindigkeit der reinen *cis*- und *trans*-Isomeren des EM-2a mittels CZE bestimmt (Abb. 40). Die ermittelte Summe der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten von $k_{\text{obs,CZE},15^\circ\text{C}} = 2.18 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ stimmt gut mit der in der $^1\text{H-NMR}$ gefundenen von $k_{\text{obs,NMR},15^\circ\text{C}} = 2.09 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ überein.

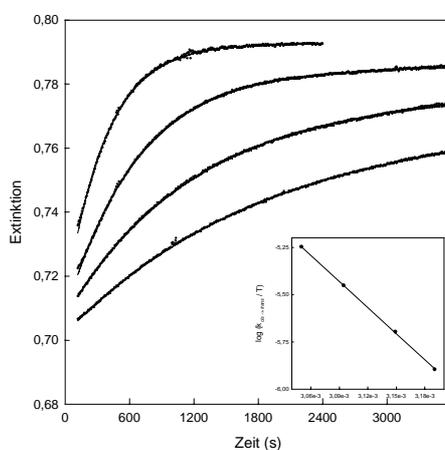


Abb. 40 Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung, ausgehend von EM-2a_{cis}. Die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes wurde an $70 \mu\text{M}$ Peptid, in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 bei $40, 45, 50$ und 55°C verfolgt. Dargestellt ist die UV-absorptionsspektroskopisch detektierte Änderung der Extinktion bei $\lambda = 277 \text{ nm}$. Das eingefügte Diagramm zeigt die Auftragung der aus den k_{obs} -Werten abgeleiteten 1. Ordnungskonstanten $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ im Eyring-Plot.

Um die Aktivierungsparameter der *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion des EM-2a zu erhalten, wurde die Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung ausgehend vom reinen Isomer bei unterschiedlichen Temperaturen UV/Vis-spektroskopisch charakterisiert (Abb. 40). Die Auftragung der erhaltenen Konstanten im Eyring-Diagramm ermöglicht nach linearer Regression die Ermittlung der Aktivierungsenthalpie und der Aktivierungsentropie für die *cis*→*trans*- bzw. *trans*→*cis*-Reaktion. Über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung gemäß $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ (Tabelle 13) ist die freie Aktivierungsenthalpie zugänglich.

Isomer	Isomerisierung	$k_{1.\text{Ordnung},40^\circ\text{C}} (\text{s}^{-1})$	$\Delta H^\ddagger (\text{kJ/mol})$	$\Delta S^\ddagger (\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	$\Delta G^\ddagger_{40^\circ\text{C}} (\text{kJ mol}^{-1})$
EM-2a _{Cis}	cis→trans	$3.98 \cdot 10^{-4}$	88.14 ± 0.92	-33.64 ± 2.89	98.68
	trans→cis	$1.06 \cdot 10^{-4}$	88.15 ± 0.92	-44.62 ± 2.89	102.13

Tabelle 13 Geschwindigkeitskonstanten und berechnete Aktivierungsparameter der Isomerisierungsreaktion des *cis*- und *trans*- Isomers des EM-2a. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden UV-spektroskopisch bei $\lambda = 277 \text{ nm}$ und Temperaturen von $40, 45, 50$ und 55°C bestimmt.

Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomere sind ineinander umwandelbare, chemisch gleiche Verbindungen mit unterschiedlichem Energiegehalt und verschiedener Konformation. Alle im UV/Vis-Absorptionsspektrum detektierbaren Gruppen stellen Chromophore dar, welche durch Lichtenergie (UV-Strahlung, Laserlicht) angeregt werden können.

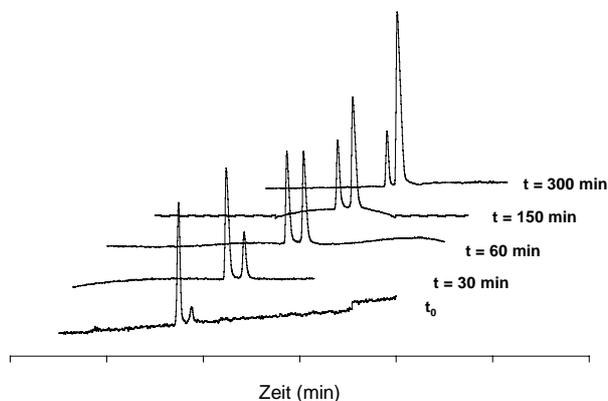


Abb. 41 Zeitabhängige CZE-Läufe während der Interkonversion des *cis*-Isomers EM-**2a**_{*cis*} bei 25°C bis zur Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes mit einer Halbwertszeit von 3h. Meßbedingungen: 50 µM Peptid, 50 mM Natriumphosphatpuffer, Detektion bei 200 nm.

Für EM-**2a** stellen die Peptidbindungen ($\lambda_{\max} \sim 200$ nm), die aromatischen Aminosäuren ($\lambda_{\text{Tyr}} = 275$ nm; $\lambda_{\text{Phe}} = 257$ nm) und die Thioxopeptidbindung ($\lambda_{\max, {}^1\pi \rightarrow {}^1\pi^*} = 277$ nm; $\lambda_{\max, {}^1n \rightarrow {}^3\pi^*} = 320$ -350 nm) photoanregbare Gruppen dar. Um eine spezifische Anregung der Thioxopeptidbindung zu erreichen und eine Anregung der Peptidbindungen und aromatischen Aminosäuren zu vermeiden, kann nur der Bereich des ${}^1n \rightarrow {}^3\pi^*$ -Übergangs der Thioxopeptidbindung bestrahlt werden. Die Anregung des ${}^1n \rightarrow {}^1\pi^*$ -Übergangs einer äquiliбриerten Probe von EM-**2a** erfolgte mit einem N₂-Laser bei 337 nm. Die hierdurch hervorgerufene *cis/trans*-Photoisomerisierung der Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Bindung zeigt im UV/Vis-Absorptionsspektrum für EM-**2a** einen isosbestischen Punkt bei 251 nm, der auf eine einheitliche Umwandlung hindeutet. Die Isomerisierung ist reversibel und verläuft ohne Photozersetzung. Selbst nach vier Bestrahlungs-/Äquilibrierungs-Zyklen wird das Ausgangsspektrum des Thioxopeptids erhalten. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Bestrahlung des sekundären Thioxoamids *N*-Methylthioacetamid mit UV- oder Laserlicht verschiedener Wellenlängen [115-117]. Mittels Raman- und UV-Spektroskopie wurde gezeigt, daß die Quantenausbeute für die *cis/trans*-Photoisomerisierung mit der für die Photozersetzung vergleichbar ist [116]. Damit scheint die Thioxfunktion nicht als Sonde für die *cis/trans*-Photoisomerisierung sekundärer, "normaler" Peptidbindungen geeignet zu sein. Doch wie hier anhand der Photoanregung der Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Bindung demonstriert werden konnte, ist die thioxylierte tertiäre Peptidbindung als photoschaltbares Element im Peptidrückgrat verwendbar. Die Wiedereinstellung des Gleichgewichtes nach der Bestrahlung des EM-**2a** folgt einer Reaktion erster Ordnung. Die durch temperatur- und zeitabhängige Analyse der *cis/trans*-Photoisomerisierung bei 40°C erhaltene Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 5.23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ war innerhalb der Fehlergrenze identisch mit den unter gleichen Meßbedingungen durch UV/Vis- und CD-spektroskopisch Untersuchungen ermittelten Konstanten.

Mit Hilfe der CZE wurde die Kinetik der Konformationsänderung bei Bestrahlung der reinen *cis*- und *trans*-Isomere von EM-2a durch einen N₂-Laser bei 337 nm untersucht. Die getrennten Isomere wurden, sobald sie den Laserstrahl passierten, einer *cis/trans*-Photoisomerisierung unterworfen. Die Datenaufnahme erfolgte am isosbestischen Punkt bei 251 nm. Die gegen die Migrationszeit korrigierten Signalflächen ermöglichten die Berechnung des Umsatzes der *cis/trans*-Photoisomerisierung. Nach 30 min ist die Zunahme des Gehaltes an *cis*- bzw. *trans*-Isomer auf 58 bzw. 59% gestiegen. Bei Verlängerung der Bestrahlungsdauer wird der Umsatz der Isomerisierung durch die höhere Relaxation wieder kompensiert.

Damit stellen Thiopeptidbindungen eine sehr empfindliche Sonde dar, die es erlaubt, durch *cis/trans*-Photoisomerisierung Konformationsänderungen im Peptidrückgrat zu induzieren. Aufgrund der besonderen spektroskopischen Eigenschaften der Thiopeptidbindung kann die Kinetik und Thermodynamik dieser Änderungen regiospezifisch analysiert werden. Es ist besonders hervorzuheben, daß im Gegensatz zur nativen Peptidbindung ($^1\pi \rightarrow ^1\pi^*$ -Übergang bei 190 - 200 nm) das Meßsignal für die Thiopeptidbindung in einem Bereich (260 - 285 nm) liegt, der selektive Messungen innerhalb von Oligopeptiden und Proteinen erlaubt.

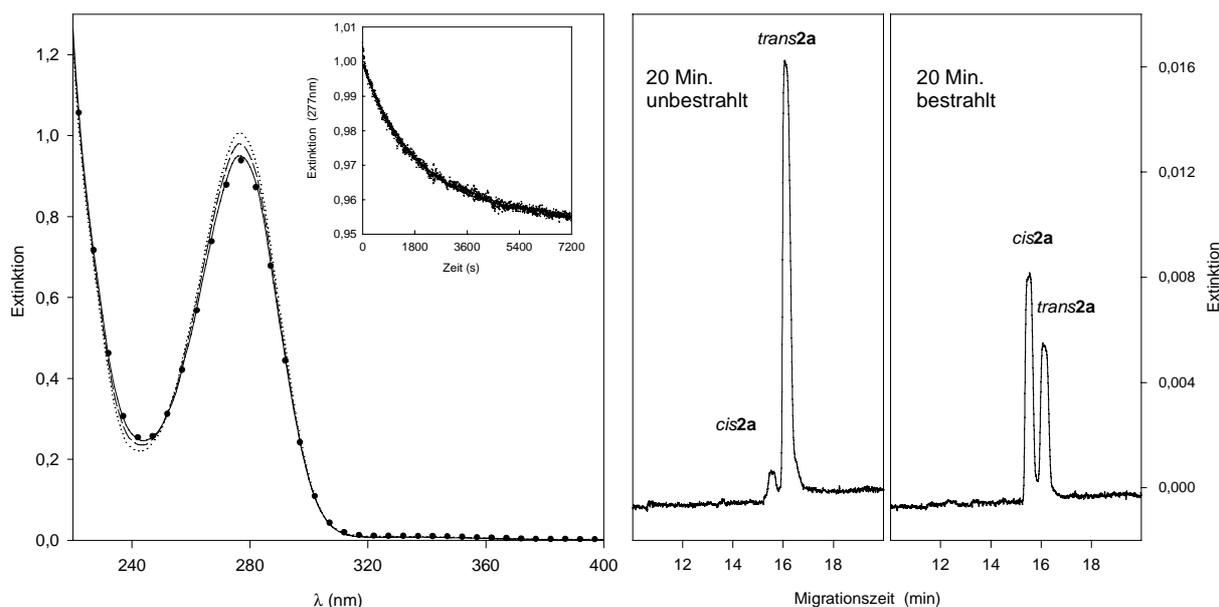


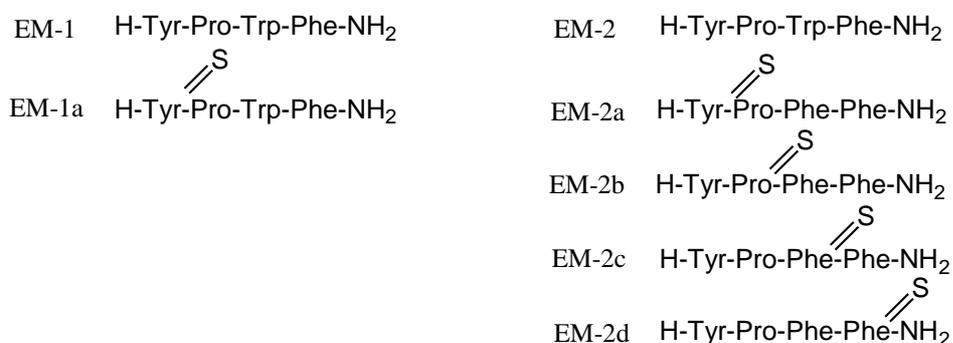
Abb. 42 (links) UV/Vis-Absorptionsspektren des N₂-Laser-bestrahlten Peptids EM-2a in 10 mM Natriumphosphatpuffer, 70 μM, pH 7.4 und 40°C. Äquiliibrierte Probe vor der Bestrahlung mit N₂-Laserlicht bei 337 nm (—), Probe direkt nach 30 min Bestrahlung (·····), Probe 40 min nach der Bestrahlung (-----), Probe nach 4 Bestrahlungs-/Äquilibrierungs-Zyklen (-·-·-·-). Die quantitative Auswertung der ¹H-NMR-Spektren unter gleichen Bedingungen ergab für den Grundzustand einen *cis*-Gehalt von 21% und für das Photoprodukt eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes auf 58%. (Mitte) CZE-Elektropherogramm von EM-2a_{trans} 20 min dem nach Auflösen des Peptids in 50 μM Natriumphosphatpuffer, pH 7.4, 15°C (rechts). Elektropherogramm des EM-2a_{trans} nach 20 min Bestrahlung mit einem N₂-Laser (Wellenlänge 337 nm, Pulsbreite 500 ps, Pulsfrequenz 30 Hz, 400 μJ/Puls, 298 K). CZE-Bedingungen: 50 μM Natriumphosphatpuffer, pH 2.5, 12°C, Quarz-Kapillare: 60 cm * 50 μm, 30 kV, UV-Detektion bei 200 nm.

Eine weitere Anwendung fand diese Methode bei der Konformerentrennung. So wurde im Vorfeld einer präparativen Konformerentrennung der Anteil an *cis*-Peptid durch Bestrahlung erhöht und die Ausbeute an reinem *cis*-Isomer gesteigert.

IV. Die biologische Aktivität thioxylierter opioider Peptide

Die Peptidbindung (-CONH-) stellt ein wichtiges Element in der Funktionsweise von biologisch aktiven Peptiden und Proteinen dar. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen primärer Struktur, Konformation und biologischer Funktion werden chemisch modifizierter Peptide benutzt. Hierbei ist von großer Bedeutung, daß keine zu drastische Veränderung der Konformation des nativen Peptids vorgenommen wird. Die Einführung einer Thioxo-peptidbindung in ein Peptidrückgrat stellt durch den isosteren Sauerstoff-Schwefel-Austausch eine vergleichsweise geringe Modifizierung der Peptidbindung dar. Diese Modifikation reicht aber oftmals aus, um eine veränderte proteolytische Stabilität und/oder veränderte Bindungsaffinitäten und -selektivitäten an Rezeptoren und damit Auswirkungen auf die Signaltransduktion, welche den biologischen Effekt verändert, zu bedingen.

Als Modellsystem zur Untersuchung der Auswirkungen einer thioxylierten Peptidbindung sowie des Einflusses der Position dieser auf die biologische Aktivität wurden das endogene, für den opioiden μ -Rezeptor selektive Endomorphin-1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) und Endomorphin-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) gewählt. Hierbei wurde die Stabilität der thioxylierten Derivate gegenüber der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV), die Affinität an den μ -Rezeptor sowie die Signaltransduktion über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als *second messenger* an folgenden Derivaten untersucht: Tyr¹-thioxyliertes EM-1-Derivat (EM-1a) sowie Tyr¹- (EM-2a), Pro²- (EM-2b), Phe³- (EM-2c) und Phe⁴- thioxylierte (EM-2d) Derivaten des EM-2.



thioxylierten Derivate (EM-**2c**, **2d**) bereits nach 20 bis 45 min durch DP IV abgebaut. Die nativen Substrate wurden innerhalb von ca. 90 min hydrolysiert.

Für die DP IV stellen *N*-terminal freie Tripeptide [287] bzw. chromophore Dipeptidamide die minimale Substratstruktur dar. Zwar muß sich in der P₁-Position ein Prolinrest befinden, doch werden mit verringerter Effizienz auch Alanin und Hydroxyprolin akzeptiert [288]. Während Substrate mit P₁ = Prolin bezüglich der P₂-Position absolut L-spezifisch sind, wird bei P₁ = Alanin und D-Aminosäuren oder achiralen Aminosäuren in P₂-Position eine langsame Hydrolyse beobachtet. Eine Hydrolyse erfolgt nur an Substraten, deren Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt [289]. Bezüglich der Hydrolyse von thioxylierten Substraten ist bekannt, daß in P₂-Position thioxylierte Substrate eine ca. 600-fache Reduktion der katalytischen Effizienz durch eine Verschlechterung von k_{cat} und K_m um den Faktor 20 bis 30 aufweisen [61]. Jakob konnte erstmals die Hydrolyse eines nichtaktivierten P₁- thioxylierten Substrates zeigen [123].

Während innerhalb von 90 min ein quantitativer Abbau der nativen Endomorphine erfolgte, erhöhte die Thioxylierung sowohl der P₂- als auch der P₁-Position die Abbaustabilität gegenüber der Protease drastisch. Befand sich die Thioxozeptidbindung allerdings C-terminal zu der zu hydrolysierenden Pro-Xaa-Bindung, zeigten diese in P₁'- und P₂'-Position thioxylierten Derivate eine gegenüber den Oxozeptiden deutlich verringerte Abbaustabilität.

4.2. Biologische Aktivität

Sowohl Neuropeptide - einschließlich der endogenen Peptide (Opioide) - als auch exogene Alkaloide (Opiate) üben ihre physiologischen Effekte ursächlich durch Bindung an spezifische membrangebundene Rezeptoren aus. Dadurch können verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden, die schließlich zu Effekten, wie der Veränderung des Schmerzempfindens, der Ausschüttung von Neurotransmittern, der Hormonsekretion, der gastrointestinalen Motilität und der respirativen Aktivität, führen [290]. Bekannt sind drei Haupttypen von opioiden Rezeptoren im Hirn und Rückenmark: namentlich μ , δ und κ , wobei der μ -Rezeptor eine bedeutende Rolle in der opioiden Analgesie und der Entwicklung der opioiden Abhängigkeit spielt. Es ist bekannt, daß Endomorphine eine sehr hohe Affinität und Selektivität für die an G-Proteine-gekoppelten- μ -Rezeptoren aufweisen [243, 291, 292].

Um Aussagen über den Einfluß der thioxylierten Peptidbindung auf die opioide Affinität und Aktivität der Endomorphine zu erhalten, wurde die Bindung an den μ -Rezeptor und die Auswirkungen auf einen Teil der nachgeschalteten Signaltransduktion untersucht.

4.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen zu Rezeptor-Bindungsaffinität

Da Endomorphine mit hoher Selektivität gegenüber dem δ - und κ -Rezeptor an den μ -Rezeptor binden, konnten zur Untersuchung der Opiatrezeptoraffinität der thioxylierten Endomorphine Rattenhirnmembrane als μ -repräsentatives Testsystem genutzt werden.

Um Aussagen über die Affinität der thioxylierten Endomorphins zu erhalten, wurden unter Verwendung des μ -rezeptorselektiven peptidischen Agonisten (D-Ala², N-Me-Phe⁴, glycinol⁵)-Enkephalin ([³H]DAMGO) als Radioligand, Bindungsstudien an Rattenhirnmembranhomogenaten durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien für die Endomorphine und das Tyr¹-thioxylierte Peptid sind in Abb. 45 und Tabelle 14 ersichtlich.

Peptid	IC ₅₀ (nM)
EM-1	3
EM-1a	2
EM-2	5.8
EM-2a	3.9
EM-2b	8
EM-2c	80
EM-2d	24

Tabelle 14. IC₅₀-Werte für die Bindung von EM-1 und EM-2, sowie EM-1a und EM-2a, b, c und d an μ -Rezeptoren einer Membranpräparation aus Rattenhirn. Die Bestimmung erfolgte durch Konkurrenzexperimente unter Verwendung des μ -selektiven Agonisten [³H]DAMGO.

Mit Einführung der Thioxyfunktion in die Tyr¹-Position war für die beiden Endomorphine eine leichte Erhöhung der Affinität zum μ -Rezeptor festzustellen. Eine quantitative Verdrängung des Radioliganden [³H]DAMGO erreichten die Peptide bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M.

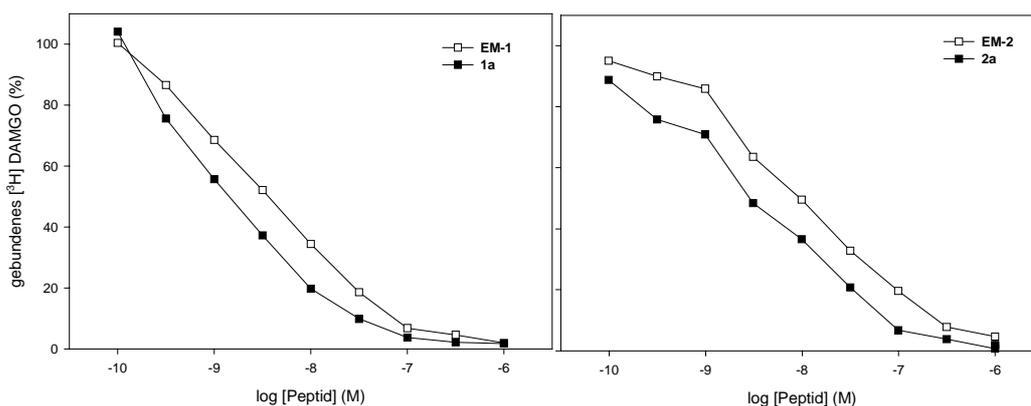


Abb. 45 Konzentrationsabhängige Verdrängung des [³H] DAMGO an Rattenhirnmembranen durch das EM-1 und EM-2 und deren Tyr¹-thioxylierten Derivate. Die abgebildeten Meßpunkte stellen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente dar.

Die Ermittlung des Einflusses der Thioxylierungsposition im Endomorphin erfolgte anhand des Vergleiches der Bindungsaffinitäten der Thioxyderivate EM-2a, b, c und d. Während bei Thioxylierung der Pro²-Bindung (EM-2b) nur eine geringe Abnahme der Bindungsaffinität feststellbar ist, nahm mit

Verlagerung der Thioxofunktion zum C-Terminus hin, die Bindungsaffinität merklich ab (**Abb. 46**) (Tabelle 14).

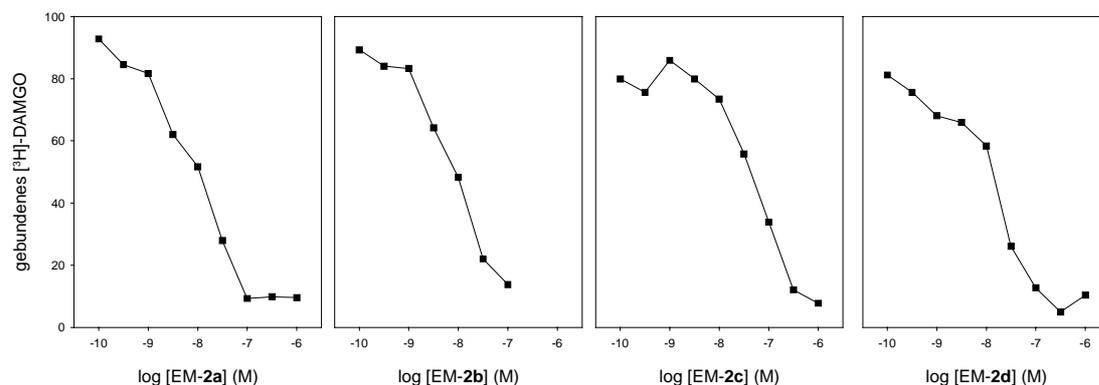


Abb. 46 Konzentrationsabhängige Verdrängung des [³H] DAMGO an Rattenhirnmembranen durch verschiedene thioxylierte EM-2-Derivate. Die abgebildeten Meßpunkte stellen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente dar.

Während pharmakologische Untersuchungen die opioiden Rezeptoren in drei Klassen (δ -, κ - und μ -Rezeptoren) einteilten, führten Studien an endogenen Opioiden im Säugerhirn zur Identifizierung dreier Hauptklassen opioider Liganden: β -Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (887). β -Endorphine und Enkephaline zeigen sowohl für μ - als auch δ -Rezeptoren Affinität, Dynorphine binden selektiv am κ -Rezeptor. Die 1997 in Rinderhirn entdeckten Endomorphine [243] sind keine Bruchstücke eines bekannten „Vorgänger-Moleküls“ und repräsentieren aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine neue Familie endogener Opiode. Sie zeigen höchste Affinität und Selektivität für den μ -Rezeptor. So sind für das EM-1 eine Affinität von 0.36 μ M bei einer 4000- bis 150000-fachen Selektivität für den μ - gegenüber dem δ -Rezeptor beschrieben [243]. Mit einer Affinität von 0.69 μ M und einer Selektivität von >13000 für den μ -Rezeptor erweist sich das EM-2 als ähnlich μ -affiner Ligand.

Erstmalige Rezeptor-Bindungsstudien mit thioxylierten opioiden Peptiden wurden an Leu-Enkephalinen (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) durchgeführt. Clausen *et al.* konnte eine drastische Verminderung der Bindungsaffinität bei den Tyr¹-thioxylierten Derivaten zeigen. Hierbei fiel die Bindungsaffinität des Tyr¹-Thioxoenkephalins auf 2% gegenüber dem nativen Leu-Enkephalin [131]. Von Lajoie *et al.* zur Verdrängung von μ - und δ -spezifischen Radioliganden durchgeführte Bindungsstudien bestätigten für das analoge Thiopeptid diesen drastischen Abfall der Bindungsaffinität. So verringerte sich die Affinität für den μ -spezifischen Ligand auf 45% und für den δ -spezifischen auf 31% der Affinität des nichtmodifizierten Leu-Enkephalins [54]. Durch Clausen [131] und Lajoie [54] wurden neben der Tyr¹-Position andere Peptidbindungen des Leu-Enkephalins durch einen O/S-Austausch modifiziert. Hierbei wurde festgestellt, daß bei Schwefeleinführung in Position 2 (Gly²) des Leu-Enkephalins eine Erhöhung der Bindungsaffinität auf das 5- bzw. 13-fache

erfolgt. Verschiebt sich die Position des Schwefel zum C-terminalen Ende, zeigen die Thioxoderivate verglichen zum nativen Enkephalin entweder geringere [54] oder leicht erhöhte Affinität [131].

Die Untersuchungen der thioxylierten Endomorphine zeigen ebenfalls einen deutlichen Einfluß der Position der Thioxozeptidbindung auf die Bindungsaffinität an den μ -Rezeptor. Für beide Tyr¹-thioxylierten Derivate (EM-1a, 2a) tritt, verglichen mit den nativen Endomorphinen, eine leicht verbesserte Affinität zum μ -Rezeptor auf. Die Thioxylierung der Pro²-Position (EM-2b) beeinträchtigt die Affinität ebenfalls nicht wesentlich. Sie fällt um das 1.5-fache gegenüber den Oxozeptiden. Die stärkste Beeinträchtigung der Bindungsaffinität ist bei Thioxylierung der Position 3 (Phe³) zu finden. Während das EM-2c eine Verminderung der Affinität um das 12-fache gegenüber dem EM-2 zeigt, sinkt die Bindungsaffinität des EM-2d um das 4-fache. Die Ergebnisse zeigen, daß die aus der Einführung eines Schwefelatoms in den C-terminalen Bereich der Endomorphine resultierenden Änderungen, die Affinität zum μ -Rezeptor deutlich stärker als eine Thioxylierung des N-terminalen Tyr-Pro-Motifs beeinträchtigen. Aus Untersuchungen zur Rezeptorerkennung konnte an β -Casomorphin, Dermorphin, Deltorphin I und Enkephalin gezeigt werden, daß die Reste Tyr¹ und Phe³ (bzw. im Enkephalin Phe⁴) pharmakophore Reste darstellen, wobei das N ^{α} - und die phenolische Gruppe des Tyr¹ sowie die aromatische Seitenkette des Phe für die opioide Aktivität dieser Peptide essentiell sind [293]. Im Falle der hier untersuchten Thioxoendomorphine wurden beide pharmakophore Reste modifiziert, wobei nur im Falle des Phe³ eine Affinitätsverminderung detektierbar war. Im Gegensatz hierzu wiesen die durch Clausen [131] und Lajoie [54] untersuchten thioxylierten Enkephaline bei Thioxylierung des Tyr¹ eine starke Verminderung bis zur Inaktivierung der Bindungsaffinität sowie bei Thioxylierung des Phe⁴ eine nur weniger drastische Änderungen der Affinität auf. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine allgemeingültige Vorhersage der durch Einführung einer Thioxozeptidbindung hervorgerufenen Änderungen der Bindungsaffinität nicht möglich ist.

4.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibierung der cAMP-Bildung

Sowohl agonistische als auch antagonistische opioide Liganden weisen eine Bindungsaffinität zum Rezeptor auf. Zur Charakterisierung eines Liganden hinsichtlich seiner agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung ist es erforderlich, entweder die von der Bindung an den Rezeptor initiierte Signaltransduktion oder die wiederum hieraus resultierende biologische Antwort zu analysieren. Hierbei sollten nur Agonisten eine Weiterleitung des Signals, d.h. Signaltransduktion und somit letztendlich auch biologische Effekte zeigen. Der opioide μ -Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren mit sieben transmembranen α -Helices und inhibiert bei Bindung eines agonistischen Liganden an den Rezeptor die Adenylyl-Cyclase (AC), wobei der Spiegel des intrazellulären *second messengers* cAMP gesenkt wird [294].

Im Verlauf der Untersuchungen wurde die Aktivität der thioxylierten Endomorphine anhand der Reduzierung des intrazellulären cAMP-Gehaltes untersucht. Als zelluläres Modellsystem wurde die

Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Für diese ist ein hoher Anteil an μ -Rezeptoren beschrieben. Chakrabarti *et al.* ermittelte ein Expressionsverhältnis der μ - zu δ -Rezeptoren von 5 zu 1, bei einem Rezeptorgehalt von 140 fmol/mg Protein [295].

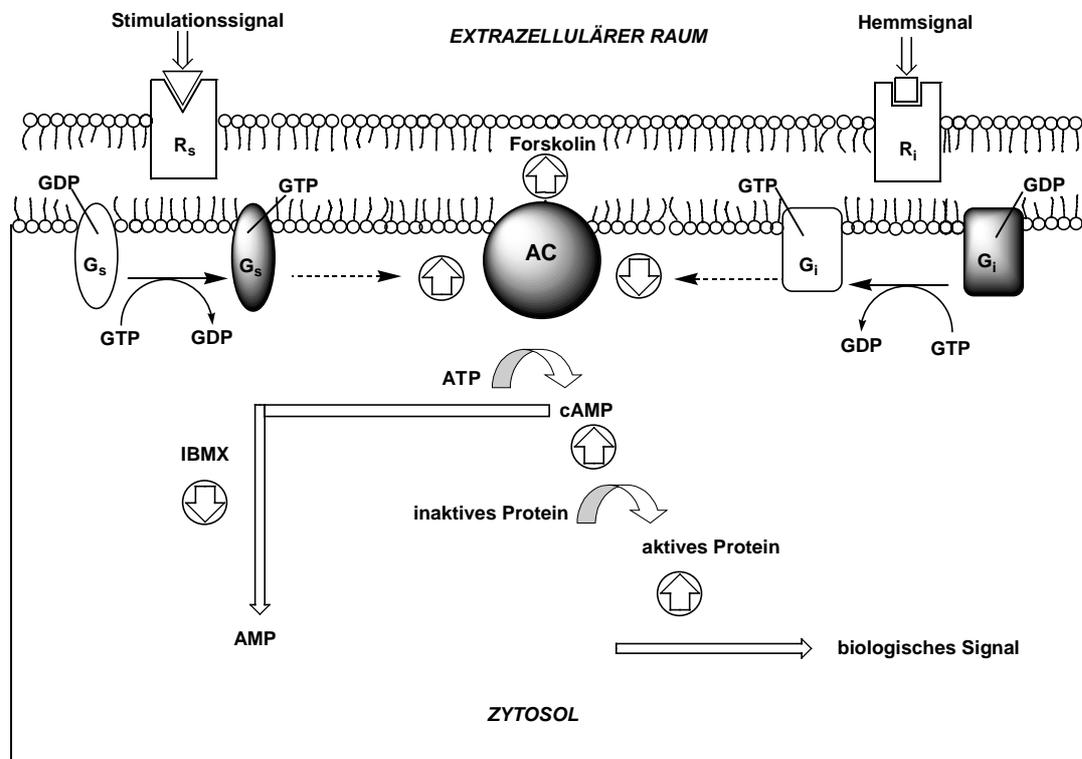


Abb. 47 Der Mechanismus der rezeptorvermittelten Aktivierung/Hemmung von Adenylylcyclase (AC). G-Proteine (Guaninnucleotid-bindenden Proteine) bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten (α , β und γ) und haben im Ruhezustand ein Molekül GDP gebunden. Die Bindung eines Liganden veranlaßt einen stimulatorischen Rezeptor R_s (links), das stimulierende G-Protein (G_s) zu binden. Die $G_{s\alpha}$ -Untereinheit des Trimers $G_{s\alpha}G_{\beta}G_{\gamma}$ tauscht gebundenes GDP gegen GTP aus. Der Komplex aus $G_{s\alpha}$ und GTP dissoziiert dann von $G_{\beta}G_{\gamma}$ und stimuliert die AC, ATP in cAMP umzuwandeln. Das gebildete cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche wiederum verschiedene Proteine phosphoryliert. Bindet der Ligand an einen inhibitorischen Rezeptor R_i (rechts), hemmt der Komplex aus $G_{i\alpha}$ und GTP die Bildung von cAMP durch AC.

Da es bei Bindung eines opioiden Liganden an den μ -Rezeptor zu einer Hemmung der AC durch das inhibitorische G-Protein G_i und somit zu einer Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt, war es meßtechnisch notwendig, den konstitutiven cAMP-Gehalt zu erhöhen. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen eines Derivates des Diterpenoids Forskolin und das Prostaglandin E_1 (PGE_1) auf ihre stimulierende Wirkung hin untersucht. Die maximale Erhöhung des cAMP-Spiegels der Zellen konnte bei Stimulierung mit 100 μ M Forskolin erzielt werden. Da jedoch trotz Stimulierung keine ausreichend hohe Differenz der Inhibierungsamplitude erzielt werden konnte, wurden die Zellen einer Behandlung mit all-*trans*-Retinoinsäure unterzogen. Hierbei ist, einhergehend mit einer morphologische Differenzierung, eine Erhöhung des Gehaltes an μ -Rezeptor bestimmbar [296],[297]. Mit einer Konzentration von 10^{-5} M all-*trans*-Retinoinsäure konnte eine optimale morphologische Differenzierung der Zellen erreicht werden (Abb. 48).

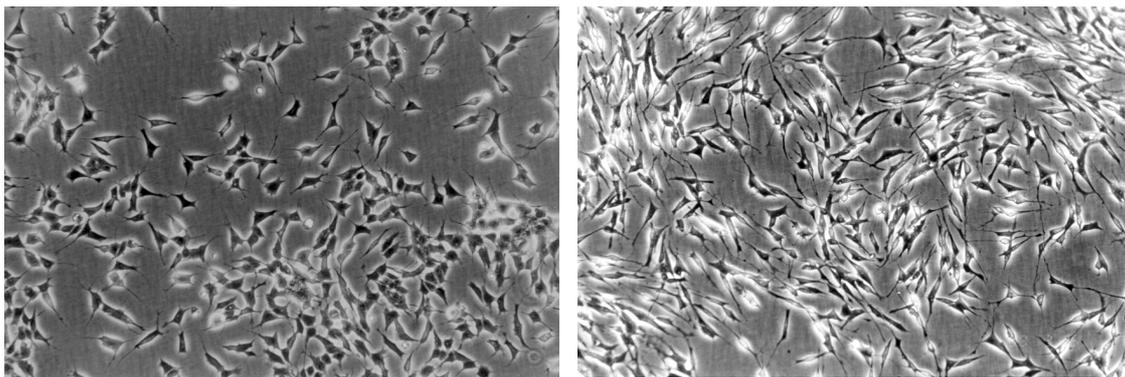


Abb. 48 Erhöhung der morphologischen Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen nach sechstägigem Wachstum ohne (**links**) und nach (**rechts**) Behandlung mit 10^{-5} M all-*trans*-Retinoinsäure.

Bei Vergleich der Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung der cAMP-Bildung durch natives und Tyr¹-thioxyliertes Peptid wurden für das EM-1 und 2 ähnliche Inhibierungspotenzen gefunden (Abb. 49).

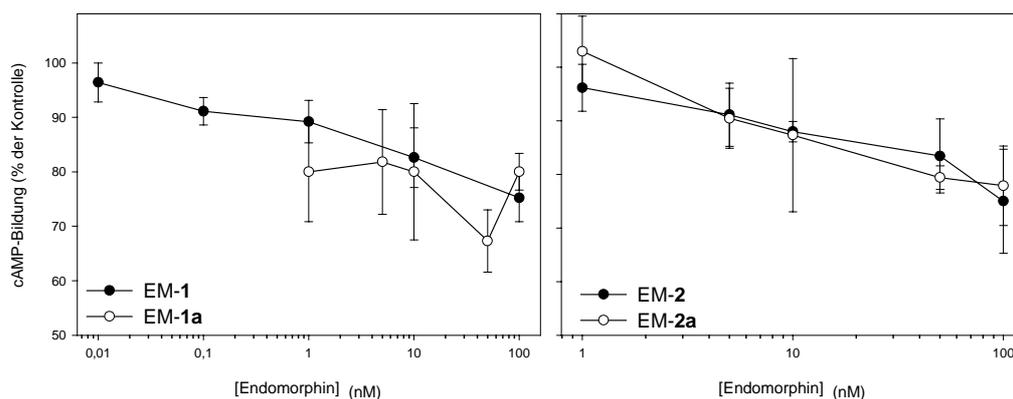


Abb. 49 Konzentrationsabhängige Inhibierung der cAMP-Bildung durch EM-1 und EM-2 und deren Tyr¹-thioxyliertes Derivate. Die Auftragungen stellen die gemittelten Werte aus fünf unabhängigen Experimenten dar.

Die Inhibierung der Bildung des intrazellulären cAMP betrug 10 bis ca. 30%. Maximale Inhibierung wurde für 100 nM Peptid mit 32% gefunden. Die Thioxo-peptide zeigten hierbei gleiche oder sogar gering verbesserte Inhibierungsfähigkeit verglichen mit den nativen Peptiden.

Für die drei weiteren thioxylierten EM-2-Derivate (EM-2b, c, und d) wurden Inhibierungsraten zwischen 8 und 22% gefunden (Abb. 50).

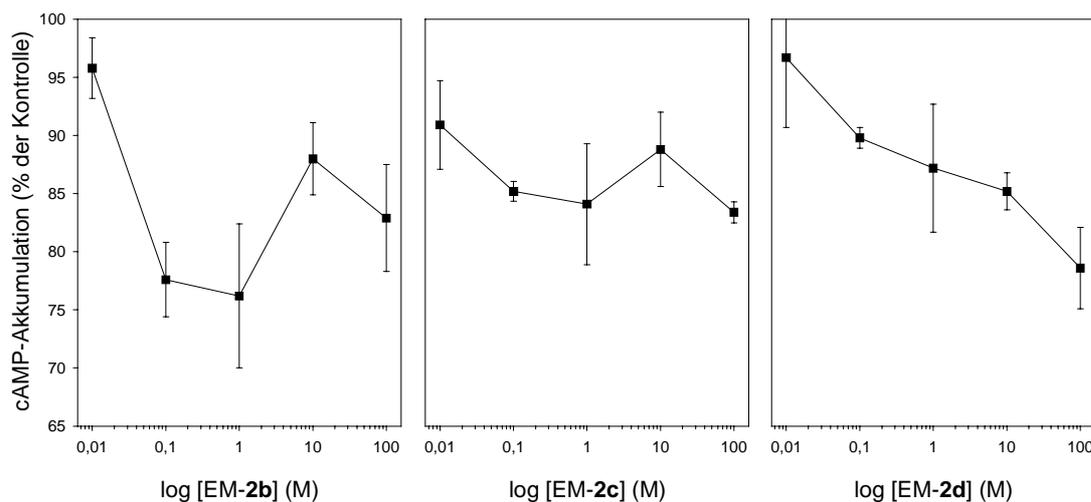


Abb. 50 Konzentrationsabhängige Inhibierung der cAMP-Produktion durch die thioxylierten EM-2-Derivate EM-2b, c und d. Die Auftragungen stellen die gemittelten Werte aus vier unabhängigen Experimenten dar.

Für alle thioxylierten Derivate der EM-1 und EM-2 konnte anhand der Inhibierung der Bildung des *second messengers* cAMP eine Signaltransduktion und somit biologische Aktivität nachgewiesen werden. Hierbei wurden Parallelen zu den an Rattenhirnhomogenaten durchgeführten Untersuchungen zur Bindungsaffinität deutlich. Während die Tyr¹-thioxylierten Peptide im Vergleich zum Oxozeptid sowohl eine geringfügige Erhöhung der Bindungsaffinität als auch eine verstärkte Inhibierung der cAMP-Bildung zeigten, nahm die Bindungsaffinität an den Rezeptor und die Inhibierungspotenz des cAMP mit Verschiebung der Thiozeptidbindung zum C-Terminus des Peptids hin ab. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die thioxylierten Derivate als agonistische Liganden wirken.

4.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen zur isomerspezifischen Inhibierung der cAMP-Bildung

Die thioxylierten Derivate beider nativen Endomorphine, EM-1a und 2a, erwiesen sich als hochaffine Liganden für den μ -Rezeptor, welche Signaltransduktion initiieren. Die durch die thioxylierte Tyr-Pro-Bindung verlangsamte Interkonversion beider Peptide ermöglichte eine präparative Trennung der *cis*- und *trans*-Isomere der Peptide. Zusammen mit der relativen, konformativen Stabilität der *cis*- und *trans*-Isomere waren somit Voraussetzungen geschaffen, die Isomerspezifität der Signaltransduktion des μ -Rezeptors zu charakterisieren.

Trotz der relativen Stabilität der Isomere mußten die Untersuchungen in einem bestimmten Zeit-Temperatur-Regime durchgeführt werden. In Anlehnung an die mittels ¹H-NMR bestimmte Summe der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten und der Extrapolation über den Zeitraum der Experimente, wurden die isomerspezifischen Untersuchungen mit einem durchschnittlichen Gehalt von 90-95% an jeweiligem *cis*- bzw. *trans*-Isomer durchgeführt. Mittels ¹H-NMR wurde für das äquilibrierten EM-1a ein *cis*-Gehalt von 31% und für das EM-2a von 25 % bestimmt.

Sowohl EM-1a als auch EM-2a zeigten im Konzentrationsbereich von 1 und 10 nM Peptid isomerspezifische Inhibierungen. Die geringste Inhibierung der cAMP-Produktion wurde bei beiden Peptiden durch das *trans*-Isomer erreicht. Während die *cis*-Isomere die stärkste Inhibierungspotenz aufwiesen, lagen die Werte der äquilibrierten Peptide zwischen den der beiden Isomere.

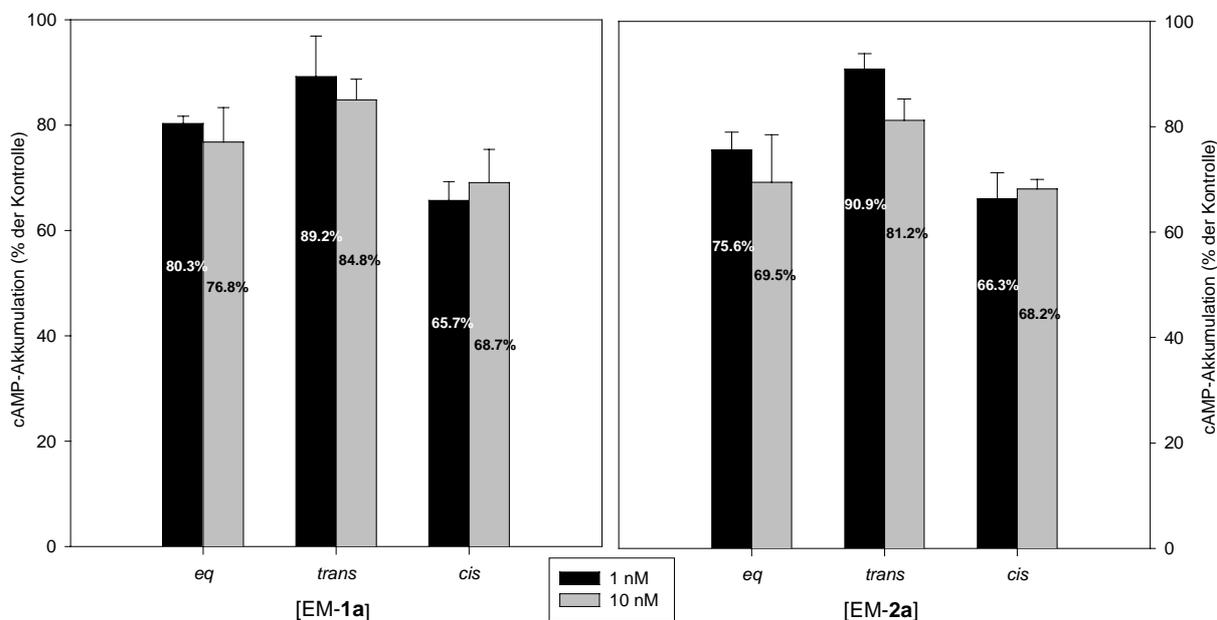


Abb. 51 Vergleich der isomerspezifischen Inhibierung des cAMP-Spiegels durch die *cis*- und *trans*-Isomere und die äquilibrierten Proben des EM-1a (links) und EM-2a (rechts) der Peptidkonzentrationen 1 (■) und 10 nM (□). Die Auftragung zeigt Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Parallelversuchen.

Die dreidimensionale Struktur eines Liganden stellt eine wichtige Voraussetzung zur Bindung an den μ -, δ - oder auch an den κ -Rezeptor dar. Diese sogenannte „bioaktive Konformation“ weist für viele opioide Liganden des μ -Rezeptors eine bestimmte Anordnung von pharmakophoren Gruppen innerhalb der *N*-terminalen Signalsequenz auf. Topochemische Untersuchungen an μ -selektiven Casomorphinderivaten, wie Morphiceptin (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂) und β -Casomorphin-5 (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH), identifizierten Tyr¹ und Phe³ als pharmakophore Reste [293, 298]. Da die Verknüpfung beider Aminosäuren über die Iminosäure Pro² erfolgt, muß die *cis/trans*-Isomerisierung der Tyr¹-Pro²-Bindung und hiermit die Konformation der *N*-terminalen Sequenz in der Rezeptorerkennung eine entscheidende Rolle spielen [293]. Bisher konnten Untersuchungen zur Isomerspezifität des μ -Rezeptors nur über eine chemische Modifizierung der *N*-terminalen Erkennungssequenz durch den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren bzw. Aminosäuremimetika erreicht werden. Die hierbei erfolgende Eliminierung der *cis/trans*-Isomerisierung resultierte in den Erhalt von Derivaten mit einer *cis*- bzw. *trans*-ähnlichen Anordnung der pharmakophoren Reste. Anhand von Rezeptor-Ligand-Untersuchungen mit derartig modifizierten Derivaten des β -Casomorphin-5 [299] und des Morphiceptins [293, 298, 300] wurde für die biologische Aktivität dieser μ -Rezeptor-Liganden die Erfordernis einer *cis*-Konformation der Tyr¹-Pro²-Bindung

vorhergesagt. Während für Endomorphine bislang keine Untersuchungen zu isomerspezifischen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen vorliegen, wurde anhand von NMR-Untersuchungen und Modellberechnungen von Podlogar *et al.* für das EM-1 die *trans*-Konformation als biologisch aktiv vorgeschlagen [301].

Der O/S-Austausch innerhalb der Tyr¹-Pro²-Bindung stellt - im Gegensatz zur Einführung von Aminosäuremimetika - unter Erhalt der nativen Peptidsequenz und Chiralität eine geringe Änderung der lokalen Geometrie dar, wobei die verlangsamte Isomerisierung der Thioxopeptidbindung den Erhalt der reinen *cis*- und *trans*-Konformere ermöglicht. Die zur Charakterisierung der Isomerspezifität der Signaltransduktion durchgeführten Untersuchungen zeigen deutliche Unterschiede in der Inhibierung der cAMP-Bildung durch die *cis*- und *trans*-Isomere. Während das *trans*-Isomer beider Endomorphinderivate nur eine geringe Hemmung der cAMP-Produktion bewirkt, zeigt das *cis*-Isomer die stärkste Inhibierung. Die äquilibrierten Proben beider Endomorphine liegen in ihrer Inhibierungsfähigkeit zwischen den beiden Konformeren. Die starke Inhibierung durch das *cis*-Isomer - verbunden mit der sehr geringen Inhibierung durch das *trans*-Isomer - zeigt, daß das *cis*-Isomer die Signaltransduktion initiiert und somit für die Endomorphine das bioaktive Konformer darstellt. Da bei höheren Peptidkonzentrationen (10 nM) durch die spontane *cis/trans*-Isomerisierung eine größere Menge *cis*-Isomer entsteht, ist gegenüber Peptidkonzentrationen von 1 nM eine verbesserte Hemmung der cAMP-Bildung durch das *trans*-Isomer festzustellen.

V. Zusammenfassung

Der Peptidbindung (CO-NH) kommt in der Funktionsweise biologisch aktiver Peptide eine entscheidende Bedeutung zu. Zur Untersuchung von Beziehungen zwischen Funktion und Struktur werden diese Peptidbindungen oftmals chemisch modifiziert. Hierbei gewinnt die Thioxylierung, d. h. der isostere und isopolare Austausch des Carbonylsauerstoffs gegen ein Schwefelatom als kleinstmögliche Modifikation einer Peptidbindung, zunehmend an Bedeutung. In verstärktem Maße werden Thioxo-peptide als pharmakophore Substanzen in biologischen Systemen und als Sonden zur Charakterisierung und/oder Änderung von Konformationen eingesetzt. Ein großes Problem bei der Darstellung von thioxylierten Oligo- und Polypeptide oder gar Proteinen stellt die regioselektive Einführung der Thioxo-peptidbindung dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur regioselektiven Thioxylierung von Oligo- und Polypeptiden durchgeführt. Neben der physikalisch-chemischen Charakterisierung erfolgte eine Untersuchung der proteolytischen Stabilität und der biologischen Aktivität der erhaltenen Thioxo-peptide. Die Ergebnisse wurden mit denen der parallel untersuchten, nichtmodifizierten Oxoderivate verglichen. Somit konnte die Bedeutung der Thioxosubstitution sowohl für physikalisch-chemische als auch biologische Fragestellungen bewertet werden.

5.1. Thioxo-peptidsynthesen

Die Untersuchungen zur Thioxylierungsreaktion am Modelltripeptid zeigten, daß regioselektive Thioxylierungen nur bedingt möglich sind. Unterschiedliche Reaktionsbedingungen erbrachten keine deutliche Bevorzugung einer Thioxylierungsposition. Mit der Verwendung einer Boc-Schutzgruppenstrategie bei Abspaltung mit SnCl_4 wurde eine sehr milde und effektive Methode der schrittweisen Verlängerung von Thioxo-peptiden erarbeitet. Diese Methode reduziert die bei acidolytischer Schutzgruppenentfernung bei Thioxo-peptiden durch Thiazol-5(4H)-on-Bildung auftretenden hohen Ausbeuteverluste und gestattet den schrittweisen Aufbau längerer Thioxo-peptide.

Die Untersuchungen zur Regioselektivität der Thioxylierungsreaktion am β -Casomorphin-7 zeigten, daß die Reaktivität der Reagenzien stark sequenzabhängig ist. So konnten vier monothioxylierte Casomorphine detektiert werden, wobei die Gly-Pro- und die Pro-Gly-Bindung eine deutlich höhere Reaktivität aufwiesen. Unter Nutzung der ermittelten Temperaturabhängigkeit des O/S-Austausches wurden zwei regioselektiv monothioxylierte β -Casomorphine-7 erhalten. Eine vorhersagbare regioselektive Einführung des Schwefels in ein Oligopeptid ist jedoch nicht oder nur stark eingeschränkt möglich. Durch Fragmentkondensation thioxylierter Peptidbausteine gelang es, drei monothioxylierte β -Casomorphin-7-Derivate zu erhalten. Hierbei zeigte sich die prinzipielle Eignung von Pd(0)-katalytisch abspaltbaren Schutzgruppen für den Aufbau von thioxylierten Oligopeptiden.

Die Darstellung eines thioxylierten Nonadecapeptids erforderte die Prüfung unterschiedlicher thioxylierter Peptidbausteine und Thioacylierungsreagenzien. Hierbei führte die Verwendung einer

kombinierten Synthese an der festen Phase und in Lösung, die Thioacylierung durch Thioxoaminosäure-6-Nitrobenzotriazole und eine acidolytisch, mild mit SnCl_4 abspaltbare Schutzgruppenstrategie zum gewünschten Erfolg.

5.2. Physikalisch-chemische Charakterisierung der Thioxo-peptide

Die Bestimmung der Position einer thioxylierten Peptidbindung erfolgt gewöhnlich an hochreinen Verbindungen über eine zeit- und materialintensive kernresonanzspektroskopische Charakterisierung. Durch massenspektrometrische Fragmentierung konnte eine Methode gefunden werden, die es ermöglicht, die Position des Schwefels im Peptidrückgrat zu lokalisieren. Hierbei führt die angeregte Fragmentierung zur Bildung einer Thiazol-5(4H)-on-Struktur, welche Aufschluß über die thioxylierte Aminosäure liefert. Neben der sehr schnellen Durchführbarkeit und des geringen Materialbedarfs ist diese Methode in der Lage, Thioxo-peptidbindungen aus Gemischen von thioxylierten Peptiden heraus zu charakterisieren.

Das Verständnis der Struktur und Konformation der Thioxo-peptidbindung hat in den letzten Jahren zwar zugenommen, doch der Einfluß von in Peptidstrukturen eingebundener Thioxofunktionen auf physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften derart modifizierter Derivate wurde weniger intensiv untersucht. Anhand eines thioxylierten Nonadecapeptids, dessen nicht modifiziertes Derivat einen hohen Anteil α -helikaler Bereiche aufweist, wurde durch CD-spektroskopische Untersuchungen der Einfluß der Schwefelsubstitution auf das Sekundärstrukturelement α -Helix untersucht. Während das thioxylierte Peptid eine Verminderung des Anteils an α -helikaler zugunsten einer 3_{10} -helikalen Struktur aufwies, zeigte es unter Bedingungen, die zur Verstärkung (TFE) bzw. Verringerung (GdnCl) des helikalen Charakters führen, dem Oxo-peptid identische Abhängigkeiten. Der Cotton-Effekt des Thioxo-chromophors erwies sich als sekundärstrukturabhängig. Damit ist es möglich, die Thioxofunktion als Sonde zu verwenden und Sekundärstrukturelemente thioxo-peptidhaltiger Peptide und Proteine außerhalb der für Sekundärstrukturuntersuchungen verwendeten Wellenlängen zu charakterisieren.

Modifizierungen des Peptidrückgrates biologisch aktiver Peptide erhalten zunehmend Bedeutung im Design von Peptidanaloga mit verstärkter biologischer Potenz und erhöhter proteolytischer Stabilität. Anhand der endogenen Opiatpeptide Endomorphin-1 und Endomorphin-2 wurden die durch die Einführung eines Schwefelatoms in unterschiedliche Positionen der Peptide hervorgerufenen veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften untersucht. Die Nutzung der verlangsamten Interkonversion der thioxylierten Tyr-Pro-Bindung erlaubte die Trennung und damit separate Charakterisierung der *cis*- und *trans*-Isomere der Tyr¹-thioxylierten Endomorphine. Während die Cotton-Effekte der UV/Vis-Spektren weniger sensitiv für die *cis/trans*-Isomerisierung sind, geben die CD-Spektren der reinen Isomere mit isomerspezifischen Cotton-Effekten die chirale Umgebung der Thioxo-peptide in der *cis*- und *trans*-Konformation sehr deutlich wieder. Über die spezifische Anregung des $^1n \rightarrow ^3\pi^*$ -Übergangs der Thioxo-peptidbindung durch einen N_2 -Laser gelang es, das

native Verhältnis der *cis/trans*-Isomere zu beeinflussen. Die Thioxosubstitution eröffnet hiermit die Möglichkeit, mittels Laserlicht die *cis/trans*-Gleichgewichte von Xaa-Pro-Bindungen gezielt zu verschieben und damit die Konformation definierter Peptidbindungen zu „schalten“.

5.3. Proteolytische Stabilität und biologische Aktivität der Thioxoendomorphine

Die veränderten chemischen Eigenschaften der Thioxozeptidbindung spiegeln sich auch in der Wechselwirkung mit proteolytischen Enzymen und der biologischen Aktivität der modifizierten Peptide wieder. Der proteolytische Abbau durch die Exopeptidase DP IV zeigt eine Abhängigkeit der Abbaustabilität von der Position der Thioxozeptidbindung auf. Während die in P₁- und P₂-Position thioxylierten Endomorphin-Derivate eine - verglichen mit den Oxoderivaten - drastische Erhöhung der Proteolysestabilität zeigen, verringert sich die Proteolysestabilität bei Thioxylierung der P₁'- und P₂'-Position.

Die Position der Thioxozeptidbindung hat ebenfalls einen Einfluß auf die Affinität der Peptide zum opioiden μ -Rezeptor und auf die Inhibierung des *second messengers* cAMP, die einen Teil der nachgeschalteten Signaltransduktion darstellt. Bindungsaffinitätsstudien an Rattenhirnmembranen und Untersuchungen der cAMP-Inhibierung in Neuroblastoma-Zellen der Linie SH-SY5Y zeigen – im Vergleich zu den nativen Endomorphine - für Tyr¹-thioxylierte Endomorphine eine leicht verstärkte Bindungsaffinität und ebenfalls verstärkte Inhibierung der cAMP-Bildung. Bei Verlagerung der Thioxozeptidbindung zum C-terminalen Ende der Peptidkette nimmt sowohl die Bindungsaffinität als auch die Fähigkeit zur Hemmung der cAMP-Produktion ab.

Unter Nutzung der getrennten *cis*- und *trans*-Isomere der beiden Tyr¹-thioxylierten Endomorphine konnte die isomerspezifische Inhibierung der cAMP-Bildung untersucht werden. Hierbei kann für das *cis*-Isomer beider Derivate die stärkste Inhibierung gezeigt werden. Während das *trans*-Isomer die geringste Inhibierung der cAMP-Produktion aufweist, liegt die Inhibierung der äquilibrierten Peptide zwischen beiden Isomeren. Diese Ergebnisse deuten auf eine bioaktive *cis*-Konformation der endogenen, μ -selektiven Endomorphine hin.

VI. Material und Methoden

6.1. Synthese

6.1.1. Allgemeine Bemerkungen

Lösungsmittel wurden grundsätzlich einfach getrocknet und destilliert. DCM wurde über P_4O_{10} refluxiert und anschließend destilliert. DMF und NMP wurden mit saurem Al_2O_3 gerührt und im Vakuum refraktioniert. EE und Diethylether wurden über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert. Piperidin und THF wurden unter N_2 über KOH destilliert. Die Aufbewahrung aller Lösungsmittel erfolgte über frisch aktiviertem Molekularsieb 3\AA oder 4\AA .

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde an Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck) mit Standard-Laufmittelgemischen durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch UV oder Besprühen mit 0.2%-iger Ninhydrin-Acetonlösung und Entwicklung bei $110^\circ C$.

Flash-Chromatographie (FC): Dafür wurden Säulen verschiedener Abmessung (Länge 30-80 cm, Durchmesser 20-50 mm) eingesetzt; stationäre Phase: Kieselgel Flash 60, Korngröße 0.035-0.07 mm (Fluka-Nr.:60738); manuelles Auffangen der 5-25 ml Fraktionen, Produktkontrolle mittels DC oder aHPLC.

pHPLC: Die RP-chromatographische Reinigung der Peptidderivate erfolgte an einem Gerät der Firma Sykam (Gilchingen, Deutschland) bei Temperaturen von 4 bis $40^\circ C$ mit unterschiedlichen ACN/Wasser-Gemischen, die jeweils 0.05% TFA enthielten. Zur Trennung wurden RP-8 und RP-18-Säulen (Lichrosorb RP-8, 250x25, 7 μm , Merck / Lichrosorb RP-18, 250x25, 7 μm , Merck / Nucleosil C 18, 100x7, 7 μm , Macherey&Nagel / Nucleosil C 8, 250x40, 7 μm , Macherey&Nagel) verwendet. Allen Säulen waren entsprechende Vorsäulen und Lösungsmittelfilter vorgeschaltet. Die UV-Detektion erfolgte mit variabler Wellenlänge mit einem Lambda 1000-Durchflußdetektor (Sykam). Für die isokratische Arbeitsweise wurde die entsprechende Flußrate bzw. die zu erwartende

Retentionszeit nach

$$\frac{t_{R1}}{t_{R2}} = \frac{d_1^2 l_1 v_2}{d_2^2 l_2 v_1}$$

(t_{Ri} =Retentionszeiten; d_i =Säulendurchmesser; l_i =Säulenlänge; v_i =Flußrate) aus den Daten für die analytischen Läufe berechnet. In der Regel wurde mit Flüssen von 15-20 ml/min gearbeitet. Die Probenaufgabe erfolgte direkt über das Rheodyne-Ventil ($V_{max} = 3$ ml). Konformerentrennungen wurden unter Kühlung des Gerätes bei $4^\circ C$ durchgeführt. Die erhaltenen getrennten Isomere wurden in flüssigem N_2 aufgefangen und anschließend bei $4^\circ C$ gefriergetrocknet.

Festphasensynthesen wurden an einem halbautomatischen Peptidsynthesizer ACT 90 (Advanced ChemTech) durchgeführt. Die Lösungen der entsprechenden Aminosäurederivate und die Kupplungsreagenzien mußten manuell zugegeben werden.

6.1.2. Synthesen in Lösung

6.1.2.1. Peptidbindungsknüpfung unter Verwendung der Mischanhydrid-Methode mit CAIBE (A)

Ein Äq. einer *N*-terminal geschützten Aminosäure bzw. eines *N*-terminal geschützten Peptids wurde in THF (1mmol/ml) gelöst und auf -15°C gekühlt. Nach Zugabe von je einem Äq. NEM und CAIBE wurde nach einer Aktivierungszeit von 10 min das Reaktionsgemisch mit einem Äq. des entsprechenden *N*-terminal freien Peptidderivates versetzt. Lag die Aminokomponente als Hydrochlorid bzw. Trifluoracetat vor, wurde ein weiteres Äq. NEM zugegeben werden. Der Ansatz wurde 1 h bei -15°C und 5 - 12 h bei 25°C gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit Wasser versetzt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in EE aufgenommen. Die EE-Phase wurde nacheinander mit gesättigter NaCl-Lösung, 5%iger KHSO_4 -Lösung, gesättigter NaCl-Lösung, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der EE-Phase wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zur Kristallisation gebracht bzw. chromatographisch gereinigt.

6.1.2.2. Peptidbindungsknüpfung unter Verwendung von TBTU (B)

Ein Äq. einer *N*-terminal geschützten Aminosäure sowie ein Äq. der Aminokomponente wurde in THF (2 mmol/ml) gelöst bzw. suspendiert. Es wurden ein Äq. TBTU, ein Äq. HOBT und zwei Äq. DIPEA zugegeben. Lag die Aminokomponente als Salz vor, mußte ein weiteres Äq. DIPEA zugegeben werden. Die Reaktionsmischung wurde 15 - 20 min bei 25°C gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog Methode A.

6.1.2.3. Abspaltung von Boc- und tBU-Schutzgruppen (C)

Abspaltung mit HCl/organischem Lösungsmittel (C1)

Das Boc-geschützte Peptidderivat wurde im organischen Lösungsmittel (3 ml/mmol) gelöst und mit 3 Äq. 1.1 N HCl/organisches Lösungsmittel versetzt. Nach 30 min bei 25°C wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in Isopropanol aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mehrfach mit Diethylether gewaschen.

Abspaltung mit TFA (C2)

Das Boc-geschützte Peptid wurde mit 95% TFA versetzt. Nach 30 min bei 25°C wurde die TFA im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Isopropanol aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mehrfach mit Diethylether gewaschen.

Abspaltung mit SnCl₄ (C3)

Das Boc-geschützte Peptidderivat wurde in ACN (3 ml/mmol) gelöst und mit 2 Äq. (bezogen auf das Peptid) SnCl₄ versetzt. Nach entsprechend angegebener Zeit wurde entsprechend C1 aufgearbeitet.

6.1.2.4. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (D)

Das Fmoc-geschützte Peptidderivat wurde in Morpholin/THF (v/v; 1:1) gelöst und 30 - 60 min bei 25°C gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in MeOH aufgenommen und das ausfallende *N*-(9-Fluorenyl)methylmorpholin abfiltriert. Das verbleibende Filtrat wurde eingengt und dessen Rückstand gegebenenfalls zur Kristallisation gebracht.

6.1.2.5. Doppeleinführung der Alloc-Schutzgruppe (E)

100 mmol Aminosäure wurden in 25 ml 4 N NaOH gelöst. Unter Rühren wurden abwechselnd in kleinen Portionen dem auf 0°C gekühlten Ansatz 21.2 ml Allylchlorformiat und 50 ml 4N NaOH zugefügt. Nach Erwärmung dieser Mischung auf 25°C wurde der Ansatz mit Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und mehrfach mit EE extrahiert. Die vereinigten EE-Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert.

6.1.2.6. Einführung der OAll-Schutzgruppe (F)

50 mmol Aminosäure wurden in 400 ml Toluol gelöst. Nach Zugabe von 500 mmol Allylalkohol und 60 mmol *p*-Toluolsulfonsäurehydrat wurde der Ansatz am Rückfluß bei 98°C gekocht. Nach 6 h war eine Abscheidung von 2 ml Wasser festzustellen und der Ansatz wurde über Nacht bei 25°C gerührt. Nach Entfernung des Toluol im Vakuum und Zugabe von Diethylether fiel das Produkt aus.

6.1.2.7. Entfernung der Alloc/OAll-Schutzgruppe (G)

Die hydrostannolytische Entfernung der Alloc- und OAll-Schutzgruppen erfolgte in THF oder DCM. unter Verwendung von 0.1 Äq. Pd⁰P(Ph₃)₄ und 2 Äq. HOBt. Der Ansatz wurde 15 min unter Lichtausschluß in N₂-Athmosphäre gerührt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und eine Reinigung mittels pHPLC durchgeführt.

6.1.2.8. Thioxylierung (H)

20 mmol geschütztes Peptid wurden im angegebenen Lösungsmittel gelöst. Hierzu wurden unter Rühren 11 mmol Thioxylierungsreagenz gegeben. Das erhaltene Gemisch wurde bei der angegebenen Temperatur über den angegebenen Zeitraum gerührt. Mittels DC erfolgte eine Kontrolle des Reaktionsverlaufes. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurde das erhaltene Öl durch FC am Kieselgel mit DCM zur Entfernung des anfallenden P,S-Nebenprodukts 2,4,6-Tris(4-methoxyphenyl)-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosporinan-2,4,6-trisulfid - gefolgt von einem vorher mittels DC optimierten EE/DCM-Gemisches - gereinigt.

6.1.2.9. Darstellung der Thioxoacyl-6-Nitrobenzotriazole(l)

10 mmol der *N*-terminal geschützten Aminosäure wurden über Methode A mit 4-Nitro-*o*-phenylendiamin gekuppelt und aufgearbeitet. Das erhaltene Aminoacylphenylendiamin wurde mit 0.6 Äq. *p*-Yokoyama-OMe in THF thioxyliert. Nach 45-minütigem Rühren bei 25°C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das resultierende Öl flashchromatographisch mit DCM/EE-Mischungen gereinigt. Das gereinigte Thioxoaminoacylphenylendiam (5 mmol) wurde bei 25°C in AcOH gelöst und auf 5°C abgekühlt. Innerhalb von 5 min wurde in zwei Portionen Natriumnitrit (7.5 mmol) zugegeben und der Ansatz 30 min bei 5°C gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Eiswasser fiel das Produkt flockenartig aus und wurde unter Eiskühlung abgesaugt, 5-fach mit Eiswasser gewaschen und bei 50°C im Vakuum getrocknet.

6.1.3. Synthesen an der Festphase

6.1.3.1. Beladung der Harze

Rink-Amid-MBHA-Harz

Das verwendete Harz wies eine Belegung mit 0.55 mmol/g Aminogruppen auf. Nach 2-stündigem Quellen des Harzes in NMP und Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 6 min) erfolgte die Beladung mit 3 Äq. Fmoc-Aminosäure, 3 Äq. TBTU, 3 Äq. HOBt, sowie 6 Äq. DIPEA in 6 ml NMP bei 25°C.

2-Chlorotrylchlorid-Harz

Das verwendete Harz enthielt 1.3 mmol/g aktives Chlorid. 0.6 Äq. der Fmoc-Aminosäure wurden in trockenem DCM unter Zugabe von wenig DMF unter Argon-Athmosphäre gelöst. Nach Zusatz von 1.3 Äq. DIPEA wurde das Harz hinzugefügt und der Ansatz 1 h bei 25°C geschüttelt. Durch Zugabe von 0.8 ml/mg MeOH wurden die verbliebenen Tritylchloridreste am Harz *gecappt*.

Sieber-Amid-Harz

Die Belegung des eingesetzten Harzes mit Aminogruppen betrug 0.6 mmol/g. Nach 2-stündigem Quellen des Harzes in NMP und Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 6 min) erfolgte die Beladung mit 3 Äq. Fmoc-Aminosäure, 3 Äq. TBTU, 3 Äq. HOBt, sowie 6 Äq. DIPEA in 6 ml NMP bei 25°C.

Nach der Beladung der Harze wurden diese folgendermaßen gewaschen: 3x20 ml DCM, 3x20 ml NMP, 2x20 ml Isopropanol, 2x20 ml MeOH, 2x20 ml Diethylether. Anschließend wurden sie im Vakuum über P₂O₅ getrocknet.

6.1.3.2. Bestimmung der Beladung (J)

3-5 mg des getrockneten Harzes werden mit 500 µl einer frisch hergestellten Lösung von 20% Piperidin in DMF versetzt und 10 min geschüttelt. Entnommene Aliquots von 20 µl werden mit 780 µl

DMF verdünnt und gegen DMF UV/Vis-Spektren aufgenommen. Aus der Extinktionsänderung bei 301 nm kann unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten des *N*-(9-Fluorenyl)methylpiperidins ($\epsilon = 7200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dessen Konzentration in der Abspalllösung und somit die ursprüngliche Beladung des Harzes mit Fmoc-geschütztem Aminosäurederivat bestimmt werden. Als Berechnungsgrundlage diente jeweils der Mittelwert aus drei Bestimmungen.

6.1.3.3. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (K)

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte 2 x 6 min mit 20% Piperidin in DMF. Zwischen beiden Abspaltungsschritten sowie nach der zweiten Abspaltung wurde das Harz mehrfach mit NMP gewaschen.

6.1.3.4. Peptidbindungsknüpfung (L)

Für jeden Kupplungsschritt wurden 3 Äq. Fmoc-geschütztes Aminosäurederivat, 3 Äq. TBTU, 3 Äq. HOBt und 6 Äq. DIPEA eingesetzt. Alle Kupplungen wurden in einer durchschnittlichen Kupplungsdauer von 2 h bei 25°C in 6 ml NMP durchgeführt. In einigen Fällen wurden Doppelkupplungen durchgeführt.

6.1.3.5. Thioacylierung (M)

Das mit dem zu thioacylierenden Peptid belegte Harz wurde in DCM oder DCM/DMF (60/40, v/v) gequollen und im Eisbad auf 4°C gekühlt. 3 Äq. geschütztes Thioxoacyl-Nitrobenzotriazolid und 6 Äq. DIPEA werden eingesetzt und 6 h bei 4°C, sowie 2-3 h bei 25°C geschüttelt. In einigen Fällen wurden Doppelkupplungen durchgeführt.

6.1.3.6. Acetylierung (N)

Die Acetylierung des *N*-Terminus wurde bei 25°C in NMP durchgeführt. Es wurden 5 Äq. Acetanhydrid und 10 Äq. DIPEA eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 30 min.

6.1.3.7. Abspaltung des Peptids vom Harz (O)

Das Harz wurde nacheinander mit je 3x mit NMP, Isopropanol, MeOH und Diethylether gewaschen und im N_2 -Strom getrocknet. Anschließend wurde mit der angegebenen Abspaltungslösung versetzt. Nach angegebener Zeit wurde vom Harz abfiltriert und das Harz mit DCM 2 x gewaschen.

Rink-Amid-MBHA-Harz (O1)

Das Harz wurde mit 10 ml 95% TFA versetzt und 30 min bei 25°C stengelassen.

2-Chlorotriylchlorid-Harz (O2)

Das Harz wurde mit 10 ml 1% TFA versetzt und 5 min bei 25°C stengelassen.

Sieber-Amid-Harz (O3)

Das Harz wurde mit 10 ml einer SnCl_4/ACN -Lösung versetzt und 10-15 min bei 25°C stengelassen.

Die Abspaltungslösung wurde nach der angegebenen Zeit vom Harz abfiltriert und das Harz mit 2 x 10 ml DCM gewaschen. Nach Einengung der Abspaltungslösung im Vakuum wurde das Rohpeptid mit Diethylether ausgefällt.

6.1.4. Untersuchungen zur Einführung der Thioxozeptidbindung

6.1.4.1. Regioselektivität der Thioxylierungsreaktion

Thioxylierungsreagenz

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl THF gelöst und unter der angegebenen Temperatur mit dem entsprechenden Thioxylierungsreagenz umgesetzt. Probenentnahme erfolgte nach 3 und 24 h.

Lösungsmittel

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl des entsprechenden Lösungsmittels gelöst und unter der angegebenen Temperatur mit der angegebenen Menge (**3**) umgesetzt. Probenentnahme erfolgte nach 3 und 24 h.

Zusätze

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl THF gelöst und bei 50°C mit 0.6 Äq. (**3**) unter Zugabe des angegebenen Zusatzes umgesetzt. Probenentnahme erfolgte nach 3 und 24 h.

(Quantitative Auswertung wie 6.1.4.2.)

6.1.4.2. Untersuchung der Abspaltungsbedingungen von Schutzgruppen

Alkalische Verseifung der OMe-Gruppen

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl des entsprechenden Alkohols gelöst und bei 25°C mit der angegebenen Menge 4 N NaOH/ROH versetzt und 1 h gerührt.

Saure Abspaltung von Boc- und OtBu-Gruppen

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl THF gelöst und bei 25°C mit dem angegebenen Abspaltungsreagenz versetzt. Die Probenabnahme erfolgte nach 20 min.

Hydrostannolytische Entfernung von Alloc/OAll-Gruppen

20 mg des Peptids wurden in 1000 µl des angegebenen Lösungsmittels gelöst. Nach Zugabe von 0.1 Äq. $\text{Pd}^0\text{P}(\text{Ph}_3)_4$ und 2 Äq. des angegebenen Nucleophils wurde der Ansatz bei 25°C bis zu einer Stunde gerührt.

Nach Ablauf der angegebenen Zeiträume wurden 10 µl dem Ansatz entnommen und in 500 µl ACN/Wasser-Gemisch gelöst. Mittels aHPLC und UV-Detektion bei 320 nm (Tripeptid-*p*-Nitroanilid) bzw. 220 nm (β -Casomorphin-Derivate) erfolgte die Analyse des Reaktionsgemisches. Eine quantitative Auswertung anhand der Peakflächen wurde mit dem Pyramid Chromatography Manager durchgeführt.

6.1.5. Synthesedaten und analytische Daten der einzelnen Verbindungen

6.1.5.1. 4-Nitroanilid-Derivate

Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np

Die Darstellung erfolgte nach [60], errechnete molare Masse $C_{28}H_{35}N_5O_7$ 553.6, Ausbeute 82 %, gefunden $(M+H)^+$ 554.3.

Boc-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np

Methode H aus Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np und 0.6 Äq. **(3)** in THF bei 50°C; Ausbeute 19 %, errechnete molare Masse $C_{28}H_{35}N_5O_6S$ 569.7, gefunden $(M+H)^+$ 570.8, $\lambda_{max} = 270$ nm.

Boc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode H aus Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np und 0.6 Äq. **(3)** in THF bei 50°C; Ausbeute 66 %, errechnete molare Masse $C_{28}H_{35}N_5O_6S$ 569.7, gefunden $(M+H)^+$ 570.6, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Boc-Ala- ψ [CS-N]-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode H aus Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np und 1.2 Äq. **(3)** in THF bei 50°C; Ausbeute 14 %, errechnete molare Masse $C_{28}H_{35}N_5O_5S_2$ 585.8, gefunden $(M+H)^+$ 586.7, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Boc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np

Methode A aus Boc-Ala und Ala-Pro-Phe-NH-Np; Ausbeute 93 %, errechnete molare Masse $C_{31}H_{40}N_6O_8$ 624.7, gefunden $(M+H)^+$ 625.9.

Boc-Ala-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np

Methode A aus Boc-Ala und Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np; Ausbeute 89 %, errechnete molare Masse $C_{31}H_{40}N_6O_7S$ 640.8, gefunden $(M+H)^+$ 641.7, $\lambda_{max} = 280$ nm.

Boc-Ala-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode A aus Boc-Ala und Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np; Ausbeute 95 %, errechnete molare Masse $C_{31}H_{40}N_6O_7S$ 640.8, gefunden $(M+H)^+$ 641.9, $\lambda_{max} = 271$ nm.

Boc-Ala-Ala- ψ [CS-N]-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode A aus Boc-Ala und Ala- ψ [CS-N]-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np; Ausbeute 72 %, errechnete molare Masse $C_{31}H_{40}N_6O_6S_2$ 656.8, gefunden $(M+H)^+$ 657.8, $\lambda_{max} = 274$ nm.

H-Ala-Pro-Phe-NH-Np

Methode C3 aus Boc-Ala-Pro-Phe-NH-Np; Ausbeute 98 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{27}N_5O_5$ 453.5, gefunden $(M+H)^+$ 454.3.

H-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np

Methode C3 aus Boc-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np; Ausbeute 94 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{27}N_5O_4S$ 469.6, gefunden $(M+H)^+$ 470.5, $\lambda_{max} = 278$ nm.

H-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode C3 aus Boc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np; Ausbeute 95 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{27}N_5O_4S$ 469.6, gefunden $(M+H)^+$ 470.9, $\lambda_{max} = 271$ nm.

H-Ala-ψ[CS-N]-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np

Methode C3 aus Boc-Ala-ψ[CS-N]-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np; Ausbeute 88 %, errechnete molare Masse $C_{28}H_{35}N_5O_3S_2$ 485.4, gefunden $(M+H)^+$ 486.6, $\lambda_{max} = 274$ nm.

6.1.5.2. Thioxylierungsreagenzien

Brillon-Typ (T2)

4.5 mmol P_4S_{10} und 4.5 mmol Na_2CO_3 wurden in 30 ml THF gelöst. Nach 10 – 20-minütigem Rühren wurde das Peptid zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte durch Zugabe einer 10%-igen Lösung von Na_3PO_4 (20 ml) sowie EE (15 ml) und Hexan (15 ml). Nach einmaliger Extraktion mit EE wurde die organische Phase getrocknet.

Lawesson-Typ (T3)

10 mmol Anisol bzw. *p*-substituierte Derivate und 1 mmol P_4S_{10} wurden am Rückfluß bei 155 C für 6 h erhitzt. Innerhalb dieser Zeit löste sich der gesamte feste Ausgangsstoff, verbunden mit dem Entweichen von H_2S . Beim Abkühlen kristallisierte das Produkt aus. Dieses wurde abgesaugt und mit 50:50 DCM/DE gewaschen.

Yokoyama-Typ (T7)

Eine Suspension von P_4S_{10} (6.3 mmol), 4-substituiertem Thiophenol (30 mmol) in 1,2,4-Trichlorbenzen (7 ml) wurde 30 min unter Rückfluß erhitzt. Aus der resultierenden klaren Lösung fielen nach Abkühlung auf 25°C gelbe Kristalle aus, die abgesaugt, mit Chloroform und Diethylether gewaschen und aus 1,2,4-Trichlorbenzen umkristallisiert wurden.

Reagenz	P_4S_{10} umgesetzt mit:	nach	Ausb. (%)		M (g mol ⁻¹)	mp (°C)
2a	Na_2CO_3	T2		-	-	-
2b	$Na_2CO_3 + CF_3SO_3CH_3$	T2				
2c	NaF	T2				
<i>in situ</i> dargestellt						
3	Anisol	T3	80	$C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$	404.4	228-229
4	Dibenzofuran	T3	77	$C_{24}H_{18}O_2P_2S_4$	528.6	187-190
5	O,O-Dimethyldithio-phosphorsäure	T3	78	$C_{24}H_{18}O_2P_2S_4$	284.4	188-189
6	Thio-4-cresol	T7	80	$C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$	436.6	175-176
7	Thiophenol	T7	58	$C_{24}H_{18}O_2P_2S_4$	408.6	167-168
8	4-Methoxythiophenol	T7	62	$C_{24}H_{18}O_2P_2S_4$	470.6	177-178
9a	2-Chlorthiophenol	T7	61	$C_{12}H_8O_2P_2S_4Cl_2$	317.1	154-157
9b	4-Chlorthiophenol	T7	75	$C_{12}H_8O_2P_2S_4Cl_2$	317.1	150-152
9c	2,4-di-Chlorthiophenol	T7	54	$C_{12}H_6O_2P_2S_4Cl_4$	317.1	149-150
10a	2-Bromthiophenol	T7	63	$C_{12}H_8O_2P_2S_4Br_2$	406.1	161-163
10b	3-Bromthiophenol	T7	68	$C_{12}H_8O_2P_2S_4Br_2$	406.1	160-161
10c	4-Bromthiophenol	T7	71	$C_{12}H_8O_2P_2S_4Br_2$	406.1	172-174

6.1.5.3. β -Casomorphine

Bausteine für die Synthese der thioxylierten Peptide

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OtBu

Methode E aus Tyr-OH, Kupplung nach Methode A mit Pro-OtBu, Ausbeute 82 %, errechnete molare Masse $C_{26}H_{34}N_2O_8$ 502.6, gefunden $(M+H)^+$ 503.4

Alloc-Tyr(Alloc)- ψ [CS-N]-Pro-OtBu

Methode H aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OtBu, Ausbeute 68 %, errechnete molare Masse $C_{26}H_{34}N_2O_7S$ 518.6, gefunden $(M+H)^+$ 519.7, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OMe

Methode E aus Tyr-OH, Kupplung nach Methode A mit Pro-OMe, Ausbeute 87 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{28}N_2O_8$ 460.5, gefunden, $(M+H)^+$ 461.7

Alloc-Tyr(Alloc)- ψ [CS-N]-Pro-OMe

Methode H aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OMe, Ausbeute 65 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{28}N_2O_7S$ 476.6 gefunden, $(M+H)^+$ 477.9, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-OMe

Methode B Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OH, Phe-Pro-OMe, Ausbeute 81 %, errechnete molare Masse $C_{37}H_{44}N_4O_{10}$ 704.8, gefunden $(M+H)^+$ 705.9

Alloc-Tyr(Alloc)- ψ [CS-N]-Pro-Phe-Pro-OMe

Methode B aus Alloc-Tyr(Alloc)- ψ [CS-N]-Pro-OH und Phe-Pro-OMe, Ausbeute 62 %, errechnete molare Masse $C_{37}H_{44}N_4O_9S$ 720.6 gefunden, $(M+H)^+$ 721.8, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-OtBu

Methode B Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-OH, Phe-Pro-OtBu, Ausbeute 88 %, errechnete molare Masse $C_{40}H_{50}N_4O_{10}$ 746.9, gefunden $(M+H)^+$ 748.2

Boc-Phe-Pro-OtBu

Methode A aus Boc-Phe und Pro-OtBu, Ausbeute 91 %, errechnete molare Masse $C_{23}H_{34}N_2O_5$ 418.5, gefunden $(M+H)^+$ 419.7

Boc-Phe-Pro-OMe

Methode A aus Boc-Phe und Pro-OMe, Ausbeute 89 %, errechnete molare Masse $C_{20}H_{28}N_2O_5$ 376.5, gefunden $(M+H)^+$ 377.5

Boc-Phe- ψ [CS-N]-Pro-OMe

Methode H aus Boc-Phe-Pro-OMe, Ausbeute 92 %, errechnete molare Masse $C_{20}H_{28}N_2O_4S$ 392.5 gefunden, $(M+H)^+$ 393.7, $\lambda_{max} = 278$ nm.

Boc-Gly-Pro-Ile-OAll

Methode B mit Boc-Gly-Pro und Ile-OAll (nach Methode F), Ausbeute 65 %, errechnete molare Masse $C_{21}H_{35}N_3O_6$ 425.5 gefunden, $(M+H)^+$ 426.6

Boc-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll

Methode H aus Boc-Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 61 %, errechnete molare Masse $C_{21}H_{35}N_3O_5S$ 441.6 gefunden, $(M+H)^+$ 442.8

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll

Methode B aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro und Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 43 %, errechnete molare Masse $C_{52}H_{67}N_7O_{13}$ 998.1, gefunden $(M+H)^+$ 999.4

Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll

Methode B aus Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro und Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 45 %, errechnete molare Masse $C_{52}H_{67}N_7O_{12}S$ 1014.2 gefunden, $(M+H)^+$ 1015.7, $\lambda_{max} = 279$ nm.

Alloc-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll

Methode B aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro und Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 61 %, errechnete molare Masse $C_{48}H_{63}N_7O_{10}S$ 930.1 gefunden, $(M+H)^+$ 931.4, $\lambda_{max} = 276$ nm.

Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll

Methode B aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro und Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 54 %, errechnete molare Masse $C_{52}H_{67}N_7O_{12}S$ 1014.2 gefunden, $(M+H)^+$ 1015.4, $\lambda_{max} = 271$ nm.

*Zielverbindungen***H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OH**

Methode G aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 68 %, errechnete molare Masse $C_{41}H_{55}N_7O_9$ 789.9, gefunden $(M+H)^+$ 791.2.

H-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OH

Methode G aus Alloc-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 14 %, errechnete molare Masse $C_{41}H_{55}N_7O_8S$ 806.0, gefunden $(M+H)^+$ 807.2, $\lambda_{max} = 279$ nm.

H-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-Gly-Pro-Ile-OH

Methode G aus Alloc-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-N]-Pro-Gly-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 11 %, errechnete molare Masse $C_{41}H_{55}N_7O_8S$ 806.0, gefunden $(M+H)^+$ 807.2, $\lambda_{max} = 276$ nm.

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OH

Methode G aus Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-Phe-Pro-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Ile-OAll, Ausbeute 19 %, errechnete molare Masse $C_{41}H_{55}N_7O_8S$ 806.0, gefunden $(M+H)^+$ 807.4, $\lambda_{max} = 271$ nm.

H-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Pro-Gly-OH

300 mg 2-Chlorotriylchlorid-Harz, die Beladung mit Phe-Pro-Gly betrug 1.0 mmol/g, Kupplung mit Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro, Abspaltung des Peptides vom Harz nach Methode O3, Ausbeute 108 mg (62 %), errechnete molare Masse $C_{30}H_{37}N_5O_6S$ 595.7, gefunden $(M+H)^+$ 596.6, $\lambda_{max} = 280$ nm.

H-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Val-Gly-OH

300 mg 2-Chlorotriylchlorid-Harz, die Beladung mit Phe-Val-Gly betrug 0.9 mmol/g, Kupplung mit Alloc-Tyr(Alloc)-ψ[CS-N]-Pro, Abspaltung des Peptides vom Harz nach Methode O3, Ausbeute 87 mg (54 %), errechnete molare Masse $C_{30}H_{39}N_5O_6S$ 597.7, gefunden $(M+H)^+$ 598.9, $\lambda_{max} = 280$ nm.

6.1.5.4. Thioacylierungsbausteine

Fmoc-Ala-TNB

Methode I aus Fmoc-Ala; errechnete molare Masse, Ausbeute 73 %, $C_{24}H_{19}N_5O_4S$ 473.5, gefunden $(M+H)^+$ 474.7

Boc-Tyr(OtBu)-TNB

Methode I aus Boc-Tyr(OtBu); Ausbeute 76 %, errechnete molare Masse $C_{25}H_{30}N_5O_5S$ 512.6, gefunden $(M+H)^+$ 513.5

Boc-Pro-TNB

Methode I aus Boc-Pro; Ausbeute 64 %, errechnete molare Masse $C_{16}H_{19}N_5O_4S$ 353.4, gefunden $(M+H)^+$ 354.6

Boc-Phe-TNB

Methode I aus Boc-Phe; Ausbeute 76 %, errechnete molare Masse $C_{20}H_{21}N_5O_4S$ 424.5, gefunden $(M+H)^+$ 425.8

6.1.5.5. Tri- und Nonadecapeptide

Ac-[Glu]₄-[Lys]₄-Ala-Ala-Ala-[Glu]₄-[Lys]₄-NH₂

300 mg Rink-Amid-MBHA-Harz, die Beladung mit Fmoc-Lys(Boc) betrug 0.51 mmol/g, Ausbeute 310 mg (87 %), errechnete molare Masse $C_{99}H_{172}N_{28}O_{36}$ 2330.6, gefunden $(M)^+$ 2331.2

Ac-[Glu]₄-[Lys]₄-Ala-Ala-ψ[CS-NH]-Ala-[Glu]₄-[Lys]₄-NH₂

Fragment F1: 300 mg 2-Chlorotriylchlorid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Ala betrug 0.6 mmol/g, Abspaltung des Peptids vom Harz nach Methode O2; *Fragment F2b*: 300 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Ala betrug 0.55 mmol/g; *Thioacylierung*: Kondensation des Fragmentes F2b mit Fmoc-Ala-TNB nach Methode M, Abspaltung vom Harz nach O2; *Fragmentkondensation*: Verknüpfung der Fragmente nach Methode B in DMSO; Finalabspaltung der konstanten Schutzgruppen mit 20 Äq. $SnCl_4/ACN/30$ min; Ausbeute 42 mg (12 %), errechnete molare Masse $C_{99}H_{172}N_{28}O_{35}S$ 2346.7, gefunden $(M)^+$ 2347.5, $\lambda_{max} = 268$ nm.

Ac-Ala-Ala-Ala-NH₂

500 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Ala betrug 0.52 mmol/g, Ausbeute 65 mg (92 %), errechnete molare Masse $C_{11}H_{20}N_4O_4$ 272.3, gefunden $(M+H)^+$ 273.5

Ac-Ala-Ala-ψ[CS-NH]-Ala-NH₂

500 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Ala betrug 0.52 mmol/g, Thioacylierung mit Fmoc-Ala-TNB nach Methode M, Abspaltung vom Harz nach O3, Ausbeute 56 mg (75 %), errechnete molare Masse $C_{11}H_{20}N_4O_3S$ 288.4, gefunden $(M+H)^+$ 289.6, $\lambda_{max} = 265$ nm.

6.1.5.6. Endomorphine

H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂

500 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Phe betrug 0.51 mmol/g., Ausbeute 141 mg (91 %), berechnete molare Masse C₃₄H₃₈N₆O₅ 610.7, gefunden (M+H)⁺ 611.8.

H-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Trp-Phe-NH₂

1000 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Phe betrug 0.51 mmol/g., Abspaltung vom Harz nach O3, Ausbeute 281 mg (88 %), berechnete molare Masse C₃₄H₃₈N₆O₄S 626.8, gefunden (M+H)⁺ 627.1, λ_{max} = 277 nm.

H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂

500 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Phe betrug 0.51 mmol/g., Ausbeute 135 mg (93 %), berechnete molare Masse C₃₂H₃₇N₅O₅ 571.7, gefunden (M+H)⁺ 572.3.

H-Tyr-ψ[CS-N]-Pro-Phe-Phe-NH₂

1000 mg Sieber-Amid-Harz, die Beladung mit Fmoc-Phe betrug 0.51 mmol/g., Abspaltung vom Harz nach O3, Ausbeute 334 mg (90 %), berechnete molare Masse C₃₂H₃₇N₅O₄S 587.8, gefunden (M+H)⁺ 589.9, λ_{max} = 277 nm.

H-Tyr-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-Phe-NH₂

Aufbau des Phe-Phe-NH₂ nach Methode B, Thioacylierung des Phe-Phe-NH₂ nach Methode M mit Boc-Pro-TNB, Kondensation mit Boc-Tyr(OtBu), Finalabspaltung der konstanten Schutzgruppen nach C3, Totalausbeute 92 mg (48 %) berechnete molare Masse C₃₂H₃₇N₅O₅ 571.7, gefunden (M+H)⁺ 572.5, λ_{max} = 271 nm.

H-Tyr-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Phe-NH₂

Thioacylierung des Phe-NH₂ nach Methode M mit Boc-Phe-TNB, anschließende Kupplung mit Boc-Phe und Boc-Tyr(OtBu), Abspaltung der temporären und konstanten Schutzgruppen nach C3, Totalausbeute 84 mg (44 %) berechnete molare Masse C₃₂H₃₇N₅O₅ 571.7, gefunden (M+H)⁺ 572.5, λ_{max} = 272 nm.

H-Tyr-Pro-Phe-Phe-ψ[CS]-NH₂

Thioxylierung des Phe-NH₂ nach Methode H mit (3)/25°C/60 min, anschließende Kupplung mit Boc-Phe und Boc-Tyr(OtBu), Abspaltung der temporären und konstanten Schutzgruppen nach C3, Ausbeute 68 mg (36 %) berechnete molare Masse C₃₂H₃₇N₅O₅ 571.7, gefunden (M+H)⁺ 572.5, λ_{max} = 268 nm.

6.2. Analytik

6.2.1. Methoden

6.2.1.1. Puffer und Peptidlösungen

Alle Puffer wurden vor Einstellung des pH-Wertes entgast und steril filtriert. Die fertigen Pufferlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Stammlösungen der Peptidderivate wurden nach dem Lösen zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 14000 rpm, 10 min) und anschließend durch einen 0.45 µM Filteraufsatz filtriert (Alltech, Unterhaching, Deutschland). Es wurden die anhand der Einwaage berechneten Konzentrationen verwendet. Alle peptidischen Stammlösungen wurden bei –20°C eingefroren und während der Messungen auf Eis aufbewahrt.

6.2.1.2. Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität aller Peptidderivate wurde durch 24-stündige Inkubation bei 25°C im entsprechenden Puffer geprüft und durch aHPLC und CZE an Hand der Retentionsprofile und Peakspektren untersucht.

6.2.1.3. aHPLC

RP-HPLC-Analysen wurden an einer mit einem schnellscannenden UV-Detektor ausgerüsteten aHPLC (Sykam, Gilchingen, Deutschland) in Kombination mit RP-8 und RP-18-Säulen (Lichrospher 100, RP 8, 125 x 4 mm, 5µm, Machery&Nagel / Lichrospher 100, RP 18, 125 x 4 mm, 5µm, Machery&Nagel) bei 25°C und einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Als Eluent wurden ACN/Wasser-Mischungen, die jeweils 0.05% TFA enthielten, verwendet. Die Peakspektren wurden im Wellenlängenbereich von 220 bis 365 nm aufgenommen. Die Datenauswertung erfolgte mittels Sykam-Software und dem Pyramid Chromatography Manager.

6.2.1.4. UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-spektroskopische Messung der kinetischen Konstanten

Die *cis/trans*-Isomerisierung der thioxylierten EM-Derivate wurde spektrophotometrisch bei 277 nm mit einem M500 Spektrophotometer (Zeiss, Jena, Deutschland) verfolgt. Die Temperierung der Meßzelle erfolgte kryostatisch mit einem WK 14-1 DS (Colora, Lorach, Deutschland). Die Messungen wurden in 100 µl Probenvolumen erfordernden Quarzküvetten (Schichtdicke 1 mm) durchgeführt.

6.2.1.5. MS-Spektrometrie

Die ESI-Massenspektren wurden an einem VG BIO-Q-Spektrometer (Fisons Instruments) aufgenommen. Die massenspektrometrischen Fragmentierungen der thioxylierten β-Casomorphin-Derivate wurden von Dipl.-Chem. Thomas Pfeiffer durchgeführt.

6.2.1.6. CD-Spektroskopie

Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurde das CD-Spektropolarimeter J-710 (Jasco, Groß Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei den jeweils angegebenen Temperaturen und pH-Werten vermessen. Die Spektren wurden mit 1 mm-CD-Quarzküvetten im Wellenlängenbereich von 190 bis 390 nm aufgenommen. Die Meßkammer wurde 5 min vor und während den Messungen mit 4 l/min N₂ (5.0) gespült. Es wurden jeweils 4-16 Akkumulationen mit einer Geschwindigkeit von 100-200 nm/min bei einer *response*-Zeit von 0.5 s durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden nach Subtraktion der Pufferspektren mittels Fourier-Transformation geglättet.

CD-spektroskopische Messung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen CD-Messungen wurden bei konstanter Wellenlänge mit variablen Meßzeiten durchgeführt. Die *response*-Zeit betrug zwischen 1 und 4 s bei einem Datenintervall von 2-10 s. Die k_{obs} -Werte der Prolylisomerisierung wurden durch eine 1. Ordnungsregression gemäß

$$A = A_0 \times e^{-k \times t} + C \quad (\text{Abnahme des Meßsignals})$$

$$A = A_0 \times (1 - e^{-k \times t}) + C \quad (\text{Zunahme des Meßsignals})$$

ermittelt, wobei A der Meßwert für die Elliptizität $[\theta]$ zum Zeitpunkt t, A_0 die Gesamtamplitude der Isomerisierung und C die Verschiebung der 1. Ordnungsfunktion auf der $[\theta]$ -Achse darstellt.

6.2.1.7. NMR-Spektroskopie

Die ¹H- und ¹³C-Spektren wurden an einem ARX 500-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) bei 500.13 MHz (¹H-NMR) bzw. 125.27 MHz (¹³C-NMR) in DMSO-d₆ oder D₂O aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen in ppm beziehen sich auf das Hauptisomer und sind bezogen auf TMS als Standard angegeben.

Kinetische Messungen mit Sprung-Experimenten

Von den Proben, in denen die Prolylisomerisierung durch Veränderung des pH-Wertes initiiert wurde, wurden nach einer Totzeit von 1.5 bis 2.5 min Serien von 64 oder 128 1D-Spektren aufgenommen, die zur einfacheren Verarbeitung in einem zweidimensionalen seriellen Datensatz gespeichert wurden. Alle aufgelösten Signale, die entweder dem *trans*- oder *cis*-Isomer zugeordnet werden konnten, wurden zur kinetischen Auswertung genutzt. Die NMR-Untersuchungen wurden von Dr. Ulf Reimer und Dr. Peter Bayer durchgeführt.

6.2.1.8. Kapillarzonenelektrophorese

Die CZE-Messungen erfolgten an einem High Throughput Capillary Electrophoresis System, Modell 270A-HT (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) in Verbindung mit unbeschichteten Silica-Kapillaren (720 mm x 50 µm). Als Laufpuffer dienten die jeweils angegebenen Natriumcitrat- oder Natriumphosphatpuffer.

Die Untersuchungen zur *cis/trans*-Isomerisierung der Endomorphine wurden freundlicherweise von Dr. Frank Thunecke durchgeführt.

6.2.1.9. Isomerisierungsanregung durch Bestrahlung mit Laserlicht

Zur Bestrahlung wurden unterschiedliche Konzentrationen konformererene und äquibrierte EM-Derivaten verwendet. Die Anregung erfolgte mit einem N₂-Laser (Wellenlänge 337 nm, Pulsbreite 500 ps, Pulsfrequenz 30 Hz, 400 µJ/Puls) bei der angegebenen Temperatur über den angegebenen Zeitraum. Die Charakterisierung der Photoprodukte erfolgte mittels CZE.

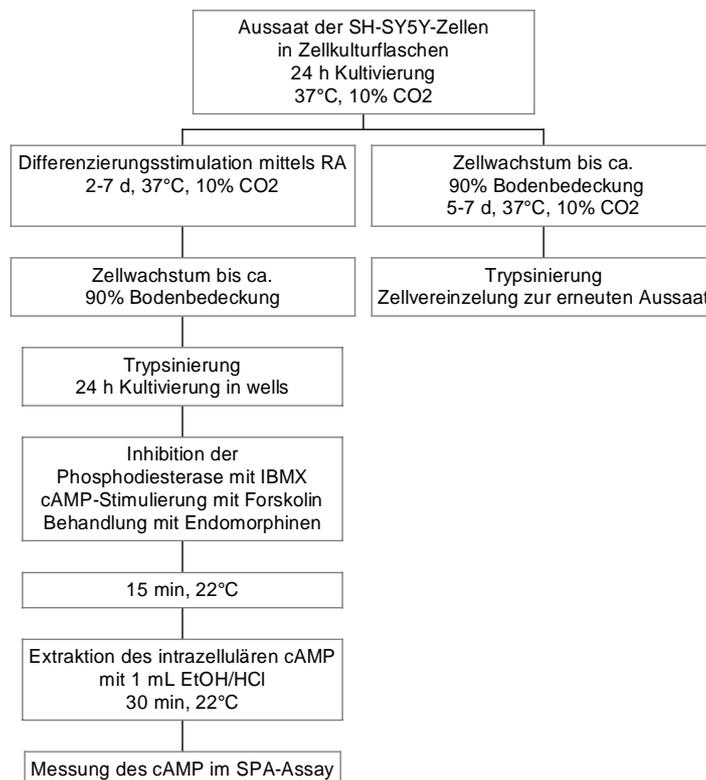
6.3. Biologische Untersuchungen

6.3.1. Proteolytischer Abbau mit DP IV

Die DP IV wurde aus Schweineiere isoliert und von Dr. Jens Rahfeld freundlicherweise für die hier durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt. Das Enzym ist bei 4°C über mehrere Monate stabil. Der proteolytische Abbau der Endomorphin-Derivate wurde bei einer Peptidkonzentration von 200 µM in 35 mM Hepes-Puffer, pH 7.8, bei 25°C mit 0.1 mg/ml DP IV untersucht. In definierten zeitlichen Abständen wurden Proben aus dem Hydrolyse-Ansatz entnommen und die Restmenge ungespaltenen Peptids bei 200 und 270 nm mittels CZE bestimmt.

6.3.2. Inhibierung der cAMP-Produktion

Allgemeines Schema der Zellkultur und Protokoll des Assays zur Bestimmung der Inhibierung des intrazellulären cAMPs.



Die Neuroblastoma Zellen der Linie SH-SY5Y wurden in 90% Dulbecco's MEM + 15% FBS bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Inhibierung der cAMP-Bildung wurde durch einen SPA-Assay bestimmt.

6.3.3. Bindungsaffinität

Die Bindungsaffinitätsstudien an Rattenhirnhomogenaten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Liebmann, Universität Jena, durchgeführt.

6.4. Material

Alle Lösungsmittel und Amine stammen aus kommerziellen Quellen und wurden nach den üblichen Verfahren gereinigt bzw. getrocknet. Weiterhin kamen folgende Materialien zum Einsatz.

Aminosäurederivate und Peptide:

Alexis (Grünberg, Deutschland): Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH,

Bachem (Bubendorf, Schweiz): Phe-NH₂, Fmoc-Ala-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Pro-OH,

Fluka (Buchs, Schweiz): Anisol, Dibenzofuran, *O,O*-Dimethyldithio-phosphorsäure, Thio-4-cresol, Thiophenol, 4-Methoxythiophenol, 2-Chlorthiophenol, 4-Chlorthiophenol, 2,4-di-Chlorthiophenol, 2-Bromthiophenol, 3-Bromthiophenol, 4-Bromthiophenol,

Kupplungsreagenzien:

Alexis (Grünberg, Deutschland): TBTU, HOBt

Merck (Darmstadt, Deutschland): CAIBE, DIPEA,

Harze:

Novabiochem (Läuffelingen, Schweiz): Rink-Amid-MBHA-Harz, 2-Chlorotriethylchloridharz, Sieber-Amid-Harz

biologisches Material:

Dt. Sammlung v. Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland): SH-SY5Y

Sonstiges:

Aldrich (St. Louis, USA): Pd⁰P(Ph₃)₄

Fluka (Buchs, Schweiz): Tributylzinnhydrid, Chlorameisensäureallylester

Calbiochem (Bad Soden, Deutschland): *trans*-Retioninsäure; Forskolin, (7-Deacetyl-7-[*O*-(*N*-methylpiperazino)- γ -butyryl)]-, Dihydrochlorid; Prostaglandin E₁; IBMX

NEN: SPA-Assay

VII. Abkürzungen

Die verwendeten Abkürzungen für die Aminosäuren und Peptidderivate stimmen mit den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für die biochemische Nomenklatur überein.

Ac-	Acetyl-
AC	Adenylylcyase
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure, wasserfrei
aHPLC	analytische HPLC
Alloc	Allyloxycarbonyl-
Äq.	Äquivalente
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-
Bpoc	Biphenyloxycarbonyl-
c	Konzentration
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
CZE	Kapillar-Zonen-Elektrophorese
d	Tag
DAMGO	[D-Ala ² -N-Me-Phe ⁴ , glycinol ⁵] Enkephalin
deg	degree
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EM	Endomorphin
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
FMOC	Fluoren-9-methoxycarbonyl-
g	Gramm
G	freie Enthalpie

GdnCl	Guanidinium-Hydrochlorid
h	Stunde
H	Enthalpie
HBB	Wasserstoffbrückenbindung
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigchromatografie
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Inhibitor-Konzentration, die eine 50%-ige Hemmung des Enzyms bewirkt
J	Joule
k	Geschwindigkeitskonstante
k _{cat}	Katalysekonstante
K _i	Inhibitor-Konstante der enzymkatalysierten Reaktion
kJ	Kilojoule, 10 ³ Joule
K _m	Michaelis-Konstante der enzymkatalysierten Reaktion
M	Molar, Mol pro Liter
mdeg	Millidegree
Me	Methyl
ml	Milliliter, 10 ⁻³ Liter
μl	Mikroliter; 10 ⁻⁶ Liter
mM	Millimolar, 10 ⁻³ Mol pro Liter
μM	Mikromolar, 10 ⁻⁶ Mol pro Liter
MeOH	Methanol
min	Minute
mol	Mol
M _R	relatives Molekulargewicht
MRE	<i>mean residue ellipticity</i>
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
nm	Nanometer, 10 ⁻⁹ Meter
nM	Nanomolar, 10 ⁻⁹ Mol pro Liter
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
-Np	4-Nitrophenyl-Rest
OAl	Allylester
OMe	Methylester
<i>Ot</i> Bu	<i>tert.</i> -Butylester
OR	C-terminaler Ester
O/S-	Sauerstoff/Schwefel-

P (P ₁ , P ₂ ...)	„peptide“; beschreibt des Aminosäurereste des Peptidsubstrates bzw. -inhibitors, die mit den Bindungsstellen der Protease wechselwirken
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pHPLC	präparative HPLC
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
θ	Elliptizität
R	Rest
RP	„reversed phase“, Umkehrphase
s	Sekunde
S	Entropie
spHPLC	semipräparative HPLC
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> Synthese an der festen Phase
t	Zeit
T	Temperatur
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TNB	-6-Nitrobenzotriazolid
Trt	Trityl-
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
Vis	„visible“, sichtbar
Vol.	Volumen
Xaa	symbolisiert einen variablen Aminosäurerest
ψ	kennzeichnet eine Substitution innerhalb einer Peptidsequenz
Yaa	symbolisiert einen variablen Aminosäurerest
Z-	Benzyloxycarbonyl-

VIII. Literaturverzeichnis

1. Spatola, A. F. (1983) *Peptide backbone modifications: a structure-activity analysis of peptides containing amide activity analysis of peptides containing amide bond surrogates and conformational constraints.*, B. Weinstein, New York.
2. Bardi, R., Piazzesi, A. M., Toniolo, C., Jensen, O. E., Andersen, T. P. & Senning, A. (1988) Molecular and crystal structures of two β -bend forming monothiated analogues of melanostatin, *Tetrahedron*. **44**, 761-769.
3. Seebach, D., Ko, S. Y., Kessler, H., Köck, M., Reggelin, M., Schmieder, P., Walkinshaw, M. D., Bölsterli, J. J. & Bevec, D. (1991) Thiocyclosporins: preparation, solution and crystal structure and immunosuppressive activity, *Helv. Chim. Acta*. **74**, 1953-1990.
4. Gatewood, E. S. & Johnson, T. B. (1926) Thio-amides. VI. A preliminary study of some amino acid derivatives containing sulfur in thio-amide combination, *J. Am. Chem. Soc.* **48**, 2900-2905.
5. Scheibye, S., Pedersen, B. S. & Lawesson, S. O. (1978) 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.
6. Backes, M. (1947) *C. R. Acad. Sci., Paris*. **225**, 533.
7. Jones, W. C., Nestor, J. J. & du Vigneaud, V. (1973) Synthesis and some pharmacological properties of [1-Deamino,9-thioglycine]oxytocin, *J. Am. Chem. Soc.*, 5677-5679.
8. Lecher, H. Z., Greenwood, R. A., Whitehouse, K. C. & Chao, T. H. (1956) The Phosphonation of Aromatic Compounds with Phosphorus Pentasulfide, . **78**, 5018-5022.
9. Hoffman, H. & Schuhmacher, S. (1967) *Tetrahedron Letters*. **31**, 2963.
10. Pedersen, B. S., Scheibye, S., Nilsson, N. H. & Lawesson, S. O. (1978) Studies on organophosphorus compounds XX. Synthesis of thioketones., *Bull. Soc. Chim. Belg.* **87**, 223-228.
11. Clausen, K., Thorsen, M. & Lawesson, S.-O. (1981) Studies on amino acids and peptides-I Synthesis of N-benzoyloxycarbonylendothiodipeptide esters, *Tetrahedron*. **37**, 3635-3639.
12. Lajoie, G., Lepine, F., Maziak, L. & Belleau, B. (1983) Facile regioselektive formation of thiopeptide linkages from oligopeptides with new thiation reagents, *Tetrahedron Letters*. **24**, 3815-3818.
13. Campbell, M. M., Ross, B. C. & Semple, G. (1989) Retroinverso Endothiono-peptides, *Tetrahedron Letters*. **30**, 1997-2000.
14. Yokoyama, M., Hasegawa, Y., Hatanaka, H., Kawazoe, Y. & Imamoto, T. (1984) Improved O/S Exchange Reagents, *Synthesis*. **10**, 827-829.
15. Bartlett, P. A., Spear, K. L. & Jacobsen, N. E. (1982) A thioamide substrate of carboxypeptidase A, *Biochemistry*. **21**, 1608-1611.
16. Bond, M. D., Holmquist, B. & Vallee, B. L. (1986) Thioamide substrate probes of metal-substrate interactions in carboxypeptidase A catalysis, *Journal of Inorganic Biochemistry*. **28**, 97-105.
17. Haugen, S. E., Douglas, A. J., Roenning, B., Walker, B., Sandvik, A. K., Murphy, R. F., Waldum, D. T. & Waldum, H. L. (1989) *Scand. J. Gastroenterol.* **24**, 577.

18. Sherman, D. B., Spatola, A. F., Wire, W. S., Burks, T. F., Nguyen, T. M. & Schiller, P. W. (1989) Biological activities of cyclic enkephalin pseudopeptides containing thioamides as amide bond replacements, *Biochem Biophys Res Commun.* *162*, 1126-1132.
19. Zacharie, B., Lagraoui, M., Dimarco, M., Penney, C. L. & Gagnon, L. (1999) Thioamides: synthesis, stability, and immunological activities of thioanalogues of Imreg. Preparation of new thioacylating agents using fluorobenzimidazolone derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry.* *42*, 2046-52.
20. Dash, B., Dora, E. K. & Panda, C. S. (1982) *Heterocycles.* *19*, 2093.
21. Machiguchi, T., Hasegawa, T. & Kano, Y. (1993) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* *66*, 3639.
22. Brillon, D. (1990) Reagent For Thionation Of Amides, Peptides And Lactams, *Synthetic Communications.* *20*, 3085-3095.
23. Hoeg-Jensen, T., Olsen, C. E. & Holm, A. (1994) Thioacylation Achieved by Activation of a Monothiocarboxylic Acid with Phosphorus Reagents, *Journal of Organic Chemistry.* *59*, 1257-1263.
24. Hartke, K. & Gerber, H. D. (1996) Tetrphosphorus Decasulfide, Revival Of an Old Thionating Agent, *Journal fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung.* *338*, 763-765.
25. Yde, B., Yousif, N. M. i., Pedersen, U., Thomsen, I. & Lawesson, S. O. (1984) Studies on organophosphorus compounds XLVII, *Tetrahedron.* *40*, 2047-2052.
26. Nicolaou, K. C., McGarry, D. G., Somers, O. K., Kim, B. H., Ogilvie, W. W., Yiannikouros, G., Prasad, C. V. C., Veale, C. A. & Hark, R. R. (1990) Synthesis of medium-sized ring ethers from thionolactones. Applications to polyether synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* *112*, 6263-6276.
27. Davy, H. (1982) A direct Conversion of Carboxylic Acids into Dithioesters, *J.Chem.Soc.Chem Comm.*, 457-458.
28. Wipf, P., Jenny, C. & Heimgartner, H. (1987) Ein neues Reagens zur Schweflung von N,N-disubstituierten Amiden, *Helvetica Chimica Acta.* *70*, 101-111.
29. Smith, D. C., Lee, S. W. & Fuchs, P. L. (1994) Conversion of Amides and Lactams to Thioamides and Thiolactams Using Hexamethyldisilathiane, *Journal of Organic Chemistry.* *59*, 348-354.
30. Köster, R. & Kuczniarz, R. (1992) Sulfidierung ausgewählter Carbonsäure- und Kohlensäureamide mit dem (9-BBN)₂ S-Reagenz, *Liebigs Ann. Chem.*, 1081-1086.
31. Steliou, K. & Mrani, M. (1982) Tin-Assisted Sulfuration: A Highly Potent New Method for the Conversion of Carbonyl Units into Their Corresponding Thiocarbonyl Analogues, *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 3104-3106.
32. Lim, M. I., Ren, W. Y. & Klein, R. S. (1982) Facile Conversion of Primary Thioamides into Nitriles with Butyltin Oxides, *J. Org. Chem.* *47*, 4594-4595.
33. Ramesha, A. R. & Chandrasekaran, S. (1994) A Facile Entry to Macrocyclic disulfides: An Efficient Synthesis of Redox-Switched Crown Ethers, *J. Org. Chem.* *59*, 1354-1357.
34. Ilankumaran, P., Ramesha, A. R. & Chandrasekaran, S. (1995) A Facile Conversion Of Amides and Lactams to Thioamides and Thiolactams Using Tetrathiomolybdate, *Tetrahedron Letters.* *36*, 8311-8314.
35. Carpino, L. A. (1957) Oxidative reactions of hydrazines. II. Isophthalimides. New protective groups on nitrogen, . *79*, 98-101.
36. Bergmann, M. & Zervas, L. (1932) *Ber. dtsh. Chem. Ges.* *65*, 1192.

37. Brown, D. W., Campbell, M. M. & Walker, C. V. (1983) Endothiopeptides, *Tetrahedron*. 39, 1075-1083.
38. Ried, W. & Emden, W. v. d. (1961) Aminosäure-Thionester und Endothiopeptide, II, *Liebigs Annalen*. 642, 128-133.
39. Clausen, K., Thorsen, M., Lawesson, S. O. & Spatola, A. F. (1984) Studies on amino acids and peptides Part 6. Methods for introducing thioamide bond into the peptide backbone: synthesis of the four monothio analogues of leucine enkephalin, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans. I*, 785-797.
40. Brown, D. W., Campbell, M. M., Chambers, M. S. & Walker, C. V. (1987) Mono- and dithiono peptide synthesis, *Tetrahedron Letters*. 28, 2171-2174.
41. Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scan.* 4, 283.
42. Edman, P. & Begg, G. (1968) *Eur. J. Biochem.* 1, 80.
43. Carpino, L. A. & Han, G. Y. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5748.
44. Zacharie, B., Sauve, G. & Penney, C. (1993) Thioacylating Agents - Use of Thiobenzimidazolone Derivatives for the Preparation of Thiotuftsins Analogs, *Tetrahedron*. 49, 10489-10500.
45. Hoeg-Jensen, T., Spatola, A. F. & Holm, A. (1996) Amino monothio acids in solid-phase synthesis of peptide thioamides, *Int. J. Peptide Prot. Res.* 47, 190-200.
46. Gross, E. & Meienhofer, J. (1975-1987) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York.
47. Guziec, F. S. & Wasmund, L. M. (1989) Synthesis and Reactions of Endothiopeptides, *J. Chem. Research (S)*, 1301-1353.
48. Unverzagt, C., Geyer, A. & Kessler, H. (1992) Racemisierungsfreie Kettenverlängerung von Thiodipeptiden mit Proteasen, *Angew. Chem.* 104, 1231-1233.
49. Majer, Z., Zewdu, M., Hollosi, M., Seprodi, J., Vadasz, Z. & Teplan, I. (1988) Solid phase synthesis of a GHRP analog containing C-terminal thioamide group, *Biochem Biophys Res Commun.* 150, 1017-1020.
50. Jurayi, J. & Cushman, M. (1992) Approaches to the synthesis of endothiopeptides: Synthesis of a thioamide-containing C-terminal bombesin nonapeptide, *Tetrahedron*. 48, 8601-8614.
51. Jensen, O. E., Lawesson, S. O., Bardi, R., Piazzesi, A. M. & Toniolo, C. (1985) 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.
52. Sherman, D., B. & Spatola, A. F. (1990) Compatibility of thioamides with reverse turn features: Synthesis and conformational analysis of two model cyclic pseudopeptides containing thioamides as backbone modification, *J.Am.Chem.Soc.* 112, 433-441.
53. Thorsen, M., Yde, B., Pedersen, U., Clausen, K. & Lawesson, S. O. (1983) Studies on Amino Acids and Peptides-V, *Tetrahedron*. 39, 3429-3435.
54. Lajoie, G., Lepine, F., Lemaire, S., Jolicouer, F., Aube, C., Turcotte, A. & Belleau, B. (1984) Synthesis and biological activity of monothionated analogs of leucine-enkephalin, *Int.J.Peptide Protein Res.* 24, 316-327.
55. Kruszynski, M., Kupryszewski, G., Ragnarsson, U., Alexandrova, M., Strbak, V., Tonon, M. C. & Vaudry, H. (1985) TRH analogue with C-terminal thioamide group. Synthesis, receptor binding, TSH-releasing activity and alpha-MSH-releasing activity, *Experientia*. 41, 1576-1577.

56. Douglas, A. J., Walker, B., Elmore, D. T. & Murphy, R. F. (1987) The synthesis of endothionated analogues of the C-terminal region of gastrin, *Biochem. Soc. Trans.*, 927-928.
57. Kruszynski, M., Kupryszewski, G., J., K. S., Tasler, J. & Jaworek, J. (1990) Pentagastrin analogue with C-terminale thioamide group. Synthesis and biological activity, *Bulletin of the Polish Academy of sciences chemistry*. 38, 1-12.
58. Doi, M., Takehara, S., Ishida, T. & Inoue, M. (1989) Effects of thioamide substitution for the enkephalin conformation. Crystal structure of Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe psi [CSNH]Leu-OBzl, *Int J Pept Protein Res*. 34, 369-373.
59. Polgar, L., Kollat, E. & Hollosi, M. (1993) Prolyl oligopeptidase catalysis. Reactions with thiono substrates reveal substrate-induced conformational change to be the rate-limiting step, *FEBS Letters*. 322, 227-230.
60. Schutkowski, M., Jakob, M., Landgraf, G., Born, I., Neubert, K. & Fischer, G. (1997) Probing Substrate Backbone Function In Prolyl Oligopeptidase Catalysis - Large Positional Effects Of Peptide Bond Monothioxylation, *European Journal of Biochemistry*. 245, 381-385.
61. Schutkowski, M., Neubert, K. & Fischer, G. (1994) Influence on Proline-Specific Enzymes of a Substrate Containing the Thioxoaminoacyl-Prolyl Peptide Bond, *European Journal of Biochemistry*. 221, 455-461.
62. Schutkowski, M., Wöllner, S. & Fischer, G. (1995) Inhibition of Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Activity by Substrate Analog Structures: Thioxo Tetrapeptide-4-nitroanilides, *European Journal of Biochemistry*. 34, 13016-13026.
63. Jensen, O. E. & Senning, A. (1986) Studies on Amino Acids and Peptides XII, *Tetrahedron*. 42, 6555-6564.
64. Lehmann, J., Linden, A. & Heimgartner, H. (1998) Synthesis Of the Endothiopeptide Boc-Trp-Ile-Ala-Aib-Ile-Val-Psi[Csnh]Aib-Leu-Aib-Pro-Ome By a Variation Of the Azirine/Oxazolone Method, *Tetrahedron*. 54, 8721-8736.
65. Mitin, Y. V. & Zapevalova, N. P. (1990) Thio-alpha-amino acids (S-acids) as a carboxyl component in peptide synthesis catalysed by papain, *International Journal of Peptide & Protein Research*. 35, 352-356.
66. Yao, S., Zutshi, R. & Chmielewski, J. (1998) Endothiopeptide Inhibitors Of Hiv-1 Protease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 8, 699-704.
67. Ried, W. (1960) Aminosäure-thionester und Endothiopeptide, *Angew. Chem*. 72, 269.
68. Ried, W. & Schmidt, E. (1966) N-acylierte alpha-Aminoimidsäureester, Iminodipeptide und Endothiodipeptide, *Liebigs Annalen*. 695, 217-225.
69. Elmore, D. T., Guthrie, D. J. S., Kay, G. & Williams, C. H. (1988) Thioesters of amino acid derivatives as thioacylating agents in thiopeptide synthesis, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans. I*, 1051-1055.
70. Castro, E. A., Ibáñez, F., Santos, J. G. & Ureta, C. (1992) Kinetics and Mechanism of the Aminolysis of 4-Nitrophenyl Dithioacetate, *Journal of Organic Chemistry*. 57, 7024-7028.
71. Castro, E. A., Ibanez, F., Santos, J. G. & Ureta, C. (1993) Kinetics and Mechanism of the Aminolysis of Phenyl Thionoacetate in Aqueous Solution, *Journal of Organic Chemistry*. 58, 4908-4912.

72. Mock, W. L., Chen, J. T. & Tsang, J. W. (1981) Hydrolysis of a thiopeptide by cadmium carboxypeptidase A, *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 102, 389-96.
73. Campbell, P. & Nashed, N. T. (1982) Carboxypeptidase A catalyzed hydrolysis of thiopeptide and thioester analogues of specific substrates. An effect on kcat for peptide, but not ester, substrates, *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5221-5226.
74. Hartke, K. (1991) New Aspects of Dithio and Thiono Esters, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*. 58, 223-253.
75. Le, H. T., Mayer, M., Thoret, S. & Michelot, R. (1995) Incorporation Of Thioamide Linkages Into a Growing Peptide Under Spps Conditions Improved By Salt Effects, *International Journal of Peptide & Protein Research*. 45, 138-144.
76. Beslin, P. & Marion, M. (1992) Mono S-trimethylsilyl ketene dithioacetals as versatile tools for the synthesis of α -hydrazinodithioesters. A novel access to endothiopeptides., *Tetrahedron Letters*. 33, 935-938.
77. Hoeg-Jensen, T., Jacobsen, M. H., Olsen, C. E. & Holm, A. (1991) Formation of Peptide Thioamides by Use of Fmoc Amino Monothioacids and PyBOP, *Tetrahedron Letters*. 32, 7617-7620.
78. Yamashiro, D. & Li, C. H. (1988) New segment synthesis of α -inhibin-92 by the acyl disulfide method, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31, 322-334.
79. Blake, J. (1981) *Int. J. Peptide Protein Res.* 17, 273.
80. Le, H. T., Gallard, J. F., Mayer, M., Guittet, E. & Michelot, R. (1996) Use of BOP-Cl in the presence of Boc-amino monothioacids for the thioacylation of imino acid residues., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 4, 2201-2209.
81. Hoeg-Jensen, T., Holm, A. & Sorensen, H. (1996) Peptide Thioacylation With High Stereochemical Preservation, *Synthesis*, 383-386.
82. Zacharie, B., Martel, R., Sauve, G. & Belleau, B. (1993) Chemoselective Thioacylation of Amino Acids - Preparation of the 4 Monothiothymopentin Analogs and Their Biological Activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 3, 619-624.
83. Belleau, B., Brillon, D., Sauve, G. & Zacharie, B. (1992) U.S. Patent No. 5,138,061, . Aug. 11.
84. Boden, C. D. J. & Pattenden, G. (1995) Cyclopeptides from Ascidians. Total Synthesis of Lissoclinamide 4, and a General Strategy for the Synthesis of Chiral Thiazoline-containing Macrocyclic Peptides., *Tetrahedron Letters*. 36, 6153-6156.
85. Shalaby, M. A., Grote, C. W. & Rapoport, H. (1996) Thiopeptide Synthesis - Alpha-Amino Thionoacid Derivatives of Nitrobenzotriazole As Thioacylating Agents, *Journal of Organic Chemistry*. 61, 9045-9048.
86. Shalaby, M. A. & Rapoport, H. (1999) A general and efficient route to thionoesters via thionoacyl nitrobenzotriazoles, *Journal of Organic Chemistry*. 64, 1065-1070.
87. Brain, C. T., Hallett, A. & Ko, S. Y. (1997) Thioamide Synthesis - Thioacyl-N-Phthalimides As Thioacylating Agents, *Journal of Organic Chemistry*. 62, 3808-3809.
88. Brain, C. T., Hallett, A. & Ko, S. Y. (1998) N-Thioacylation of Beta-Amino Alcohols By N-(Thioacyl)Phthalimides - a Facile Synthesis of Alpha-Amino Acid Thiazolines, *Tetrahedron Letters*. 39, 127-130.

89. Ripperger, H. (1987) Zur Darstellung und selektiven Reduktion von geschützten Endothiopeptiden, *J. Prakt. Chemie.* 329, 1039-1044.
90. Pfeifer, T., Schierhorn, A., Friedemann, R., Jakob, M., Frank, R., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997) Specific Fragmentation Of Thioxo Peptides Facilitates the Assignment Of the Thioxylated Amino Acid, *Journal of Mass Spectrometry.* 32, 1064-1071.
91. Cox, B. G. & deMaria, P. (1977) Rates of hydrogen exchange in thioamides, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans. II*, 1385-1387.
92. Katritzky, A. R., S., S. & Marson, C. M. (1988) Comparative study of the ¹³C NMR shifts of carbonyl and thiocarbonyl compounds, *Magnetic Resonance in Chem.* 26, 665-670.
93. Avalos, M., Babiano, R., Duran, C. J., Jimenez, J. L. & Palacios, J. C. (1992) NMR studies of sugar amides and thioamides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 2205-2215.
94. Sosnicki, J. G., Jagodzinski, T. S., Nowakwydra, B. & Hansen, P. E. (1996) Complete Assignment Of H-1 and C-13 Nmr Spectra and Conformational Analysis Of Thioamide Cannabinoids, *Magnetic Resonance in Chemistry.* 34, 667-674.
95. Sauve, G., Le Berre, N. & Zacharie, B. (1988) Carboxyl-modified amino acids and peptides: II) A convenient route for the synthesis of difunctionalized enamines from thioamides via thioiminium salts, *Tetrahedron Letters.* 29, 2299-2302.
96. Hitotsuyanagi, Y., Suzuki, J., Matsumoto, Y., Takeya, K. & Itokawa, H. (1994) Studies on Rubia akane (RA) derivatives. Part 7. Thioamide analogues of RAs: Antitumor cyclic hexapeptides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1887-1889.
97. Maziak, L., Lajoie, G. & Belleau, B. (1986) Productive conformations in the bound state and hydrolytic behavior of thiopeptide analogues of angiotensin-converting enzyme substrates, *J. Am. Chem. Soc.* 108, 182-183.
98. Martin, G. J., Gouesnard, J. P., Dorie, J., Rabiller, C. & Martin, M. L. (1977) Advantages of ¹⁵N NMR in studying delocalization and evaluating the energy barriers of C-N rotation process in amides, thioamides, and related compounds, *Magnetic Resonance In Chemistry.* 99, 1381-1384.
99. Hollosi, M., Majer, Z., Zewdu, M., Ruff, E., Kajtar, M. & Köver, K. E. (1988) Mixed intramolecular H-Bonds of secondary thioamides, *Tetrahedron.* 44, 195-202.
100. Czugler, M., Kalman, A., Kajtarperedy, M., Kollat, E., Kajtar, J., Majer, Z., Farkas, O. & Hollosi, M. (1993) Reverse Turn Conformation of N-Thioacetyl Thiopropyl Glycine N'-Methylamide in the Crystal and in Solution, *Tetrahedron.* 49, 6661-6668.
101. Shaw, R. A., Kollat, E., Hollosi, M. & Mantsch, H. H. (1995) Hydrogen bonding and isomerization in thioamide peptide derivatives, *Spectrochimica Acta A.* 51, 1399-1412.
102. Kajtar, M., Hollosi, M., Kajtar, J., Majer, Z. & Koever, K. E. (1986) Chiroptical properties and solution conformations of protected endothiopeptide esters, *Tetrahedron.* 42, 3931-3942.
103. Khan, A. Z. Q., Ivanova, G. I., Spassov, S. L. & Sandstrom, J. (1996) Stereochemical Studies Of 1,2-Di(Thio)Acetamidocyclohexanes and Their N,N-Dimethyl Derivatives By Nmr and Cd Spectroscopy and By Molecular Mechanics Calculations, *Acta Chemica Scandinavica.* 50, 938-951.
104. Szokan, G., Majer, Z., Kollat, E., Kajtar, M., Hollosi, M. & Peredykajtar, M. (1995) Chromatographic Studies On the Racemization Of Thiopeptides, *Journal of Liquid Chromatography.* 18, 941-964.

105. Balaji, V. N., Profeta, S. J. r. & Dietrich, S. W. (1987) Mean geometry of the thiopeptide unit and conformational features of dithiopeptides and polythiopeptides [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1987 Aug 14;146(3):1531], *Biochem Biophys Res Commun.* 145, 834-841.
106. LaCour, T. F. M. (1987) Stereochemistry of peptides containing a thioacyl group, *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 564-571.
107. Stewart, W. F. & Siddal, T. H. (1970) Nuclear magnetic resonance studies of amides, *Chemical Reviews.* 70, 517-551.
108. Walter, W. & Voss, J. (1970) *Chemistry of the Amides*, , Interscience, New York.
109. Bondi, A. (1964) van der Waals volumes and radii, *J. Phys. Chem.* 68, 441-451.
110. Hollosi, M., Zewdu, M., Kollat, E., Majer, Z., Kajtar, M., Batta, G., Kover, K. & Sandor, P. (1990) Intramolecular H-bonds and thioamide rotational isomerism in thiopeptides, *International Journal of Peptide & Protein Research.* 36, 173-181.
111. Walter, W. & Becker, R. F. (1969) *Liebigs Ann. Chem.* 727, 71-75.
112. Jensen, K. A. (1981) *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.* 9, 93-97.
113. Sugawara, Y., Hamaguchi, H., Harada, I. & Shimanouchi, T. (1977) Resonance raman spectra of N-Methylthioacetamide, *Chem. Phys. Lett.* 52, 323-326.
114. Milewska, M. J., Gdaniec, M. & Polonski, T. (1997) Chiroptical Spectra of 1,2-Cyclopropanedicarboxylic Monothioimides, *Journal of Organic Chemistry.* 62, 1860-1862.
115. Ataka, S., Takeuchi, H., Harada, I. & Tasumi, M. (1984) Infrared studies of the cis-form of N-methylthioacetamide in low-temperature matrices, *J. Phys. Chem.* 88, 449-451.
116. Kato, C., Hamaguchi, H. O. & Tasumi, M. (1984) Transient resonance Raman study on the trans-cis photoisomerization of N-methylthioacetamide, *J. Phys. Chem.*, 89.
117. Harada, I. & Tasumi, M. (1980) Formation of transient cis N-methylthioacetamide under ultraviolet laser irradiation, *Chem. Phys.Lett.* 70, 279-282.
118. Hall, A. J. & Satchell, D. P. N. (1974) Acylation Part XXXVII. Kinetics and Mechanism of Hydrogen Ion Catalysed Hydrolysis of Thiobenzamide, *J. C. S. Perkin. II*, 1077-1080.
119. Butler, E. A., Peters, D. G. & Swift, E. H. (1958) Hydrolysis Reactions of Thioacetamide in Aqueous Solutions, *Analytical Chemistry.* 30, 1379-1383.
120. Mollin, J. & Bouchalova, P. (1978) Substituent and solvent effects in the alkaline hydrolysis of thioamides, *Coll.Czechoslov.Chem.Comm.* 43, 2283-2288.
121. Peeters, O. M. & De Ranter, C. J. (1976) Kinetics of hydrolysis of thioacetamide in alkaline solution, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans. II*, 1062-1065.
122. Peeters, O. M. & Ranter, C. J. d. (1974) Pathways in Thioacetamide Hydrolysis in Aqueous Acid: Detection by Kinetic Analysis, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1832-1835.
123. Jakob, M. (1998) Untersuchungen zur Konformation und proteolytischen Stabilität von thioxylierten Oligopeptiden, *Dissertation*.
124. Angyal, R., Strbak, V., Alexandrova, M. & Kruszynski, M. (1985) TRH analogue with C-terminal thioamide group: rapid degradation by plasma and its biological effects, *Endocrinologia Experimentalis.* 19, 213-219.
125. Beattie, R. E., Elmore, D. T., Williams, C. H. & Guthrie, D. J. (1987) The behaviour of leucine aminopeptidase towards thiono-peptides, *Biochemical Journal.* 245, 285-288.

126. Thompson, S. A., Andrews, P. R. & Hanzlik, R. P. (1986) Carboxyl-modified amino acids and peptides as protease inhibitors, *J. Med. Chem.* 29, 104-111.
127. Asboth, B. & Polgar, L. (1983) Transition-state stabilization at the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: hydrolyses of thiono and oxygen esters, *Biochemistry.* 22, 117-122.
128. Asboth, B., Majer, Z. & Polgar, L. (1988) Cysteine proteases: the S2P2 hydrogen bond is more important for catalysis than is the analogous S1P1 bond, *FEBS Letters.* 233, 339-341.
129. Foje, K. L. & Hanzlik, R. P. (1994) Peptidyl thioamides as substrates and inhibitors of papain, and as probes of the kinetic significance of the oxyanion hole, *Biochimica et Biophysica Acta.* 1201, 447-453.
130. Bock, M. G., DiPardo, R. M., Williams, P. D., Pettibone, D. J., Clineschmidt, B. V., Ball, R. G., Veber, D. F. & Freidinger, R. M. (1990) Receptor ligands which bind the oxytocin receptor with selectivity and high affinity. Chemical modification of a *Streptomyces silvensis* derived cyclic hexapeptide, *Journal of Medicinal Chemistry.* 33, 2321-2323.
131. Clausen, K., Spatola, A. F., Lemieux, C., Schiller, P. W. & Lawesson, S. O. (1984) Evidence of a peptide backbone contribution toward selective receptor recognition for leucine enkephalin thioamide analogs, *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 120, 305-310.
132. Le, H. T., Michelot, R., Dumont, M., Shukla, V. K., Mayer, M., Nguyen, K. P. P., Ruan, H. & Lemaire, S. (1997) Design Of Potent Dynorphin a-(1-9) Analogues Devoid Of Supraspinal Motor Effects In Mice, *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology.* 75, 9-14.
133. Alexandrova, M., Strbak, V., Herman, Z. S., Stachura, Z. & Kruszynski, M. (1987) Biological activity of TRH thionologue and its diastereoisomers, *Endocrinologia Experimentalis.* 21, 43-49.
134. Lankiewicz, L., Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Labroo, V., Cohen, L. A., Vonhof, S., Siren, A. L. & Spatola, A. F. (1992) Biological activities of thionated thyrotropin-releasing hormone analogs, *Biochem Biophys Res Commun.* 184, 359-366.
135. Hitotsuyanagi, Y., Matsumoto, Y., Sasaki, S., Suzuki, J., Takeya, K., Yamaguchi, K. & Itokawa, H. (1996) Studies on Rubia akane (RA) derivatives. Part 10. Backbone transformation of RA-VII, an antitumour cyclic hexapeptide, through thionation. X-Ray crystal structure of [Tyr-3-y(CH₂NH)-Ala-4]RA-VII, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1, 1749-1755.
136. Hensens, O. D. & Albers-Schonberg, G. (1983) Total structure of the highly modified peptide antibiotic components of thiopeptin, *Journal of Antibiotics.* 36, 814-31.
137. Hensens, O. D. & Albers-Schonberg, G. (1983) ¹³C NMR study of thiostrepton and thiopeptin components, *Journal of Antibiotics.* 36, 832-45.
138. Miyairi, N., Miyoshi, T., Aoki, H., Kosaka, M. & Ikushima, H. (1970) Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B, *Journal of Antibiotics.* 23, 113-119.
139. Miyairi, N., Miyoshi, T., Aoki, H., Kosaka, M. & Ikushima, H. (1972) Thiopeptin, a new feed additive antibiotic: microbiological and chemical studies, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 1, 192-196.
140. Muramatsu, I., Hikawa, E., Hagitani, A. & Miyairi, N. (1972) Quinoline derivatives as degradation products from antibiotic thiopeptin B, *Journal of Antibiotics.* 25, 537-538.
141. Mine, K., Miyairi, N., Takano, N., Mori, S. & Watanabe, N. (1972) Thiopeptin, a new feed-additive antibiotic: biological studies and field trials, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 1, 496-503.

142. Puar, M. S. (1981) *J. Am. Chem. Society.* 103, 5231.
143. Abas, S. A., Hossain, M. B., Vanderhelm, D. & Schmitz, F. J. (1996) Alkaloids From the Tunicate *Polycarpa Aurata* From Chuuk Atoll, *Journal of Organic Chemistry.* 61, 2709-2712.
144. Ooike, M., Nozawa, K. & Kawai, K. I. (1997) An Epitetrahydrodioxopiperazine Related to Emestrin From *Emericella Foveolata*, *Phytochemistry.* 46, 123-126.
145. Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M. & Thauer, R. K. (1997) Crystal Structure of Methyl Coenzyme M Reductase - the Key Enzyme of Biological Methane Formation, *Science.* 278, 1457-1462.
146. Eberle, M. K. & Nuninger, F. (1993) Preparation of [D-Cysteine]⁸-cyclosporin via Intramolecular Sulfur Transfer Reaction, *Journal of Organic Chemistry.* 58, 673-677.
147. Nizamov, I. S., Batyeva, E. S., Al'fonsov, V. A., Musin, R. Z. & Pudovik, A. N. (1993) *Phosphorus, Sulfur and Silicon.* 83, 191.
148. Nizamov, I. S., Garifzyanova, G. G. & Batyeva, E. S. (1994) Influence of Ultrasonic Irradiation On the Reactivity of Tetraphosphorus Decasulfide and 2,4-Dithioxo-1,3,2-Lambda(5),4-Lambda(5)-Dithiadiphosphetanes, *Phosphorus Sulfur & Silicon & the Related Elements.* 88, 39-44.
149. Raucher, S. & Klein, P. (1981) Ultrasound in heterogeneous organic reactions. An improved procedure for the synthesis of thioamides, *Journal of Organic Chemistry.* 46, 3558-3559.
150. Houghten, R. A., Beckman, A. & Ostresh, J. M. (1986) Use of 10% sulfuric acid/dioxane for removal of N-alpha-tertiary-butyloxycarbonyl group during solid phase peptide synthesis, *Int. J. peptide protein Res.* 27, 653-658.
151. Yamashiro, D., Blake, J. & Li, C. H. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* 94, 2855-2859.
152. Schnabel, E., Klostermeyer, H. & Berndt, H. (1971) Zur selektiven acidolytischen Abspaltbarkeit der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe, *Liebigs Ann. Chem.* 749, 90-108.
153. Schmidt, U., Utz, R., Lieberknecht, A., Griesser, H., Potzolli, B., Bahr, J., Wagner, K. & Fischer, P. (1987) *Synthesis*, 236-241.
154. Vorbrüggen, H. & Krolkiewicz, K. (1975) Selektive acidolytische Abspaltung der tert-Butoxycarbonyl-Gruppe, *Angew. Chem.* 87, 877.
155. Lott, R. S., Chauhan, V. S. & Stammer, C. H. (1979) Trimethylsilyl iodide as a Peptide Deblocking Agent, *J. C. S. Chem. Comm.*, 495-496.
156. Olah, G. A. & Narang, S. C. (1982) *Tetrahedron.* 38, 2225.
157. Hwu, J. R., Jain, M. L., Tsay, S. C. & Hakimelahi, G. H. (1996) Ceric Ammonium Nitrate in the Deprotection of Tert-Butoxycarbonyl Group, *Tetrahedron Letters.* 37, 2035-2038.
158. Stahl, G. L., Walter, R. & Smith, C. W. (1978) *Journal of Organic Chemistry.* 43, 2285.
159. Kocienski, P. J. (1994) *Protecting groups*, , Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
160. Pfeiffer, P. (1911) Beitrag zur Theorie der Halochromieerscheinungen II, *Liebigs Ann. Chem.*, 92-129.
161. Pfeiffer, P. (1910) Additionsprodukte von Zinnhalogeniden an Carbonylverbindungen I. Beitrag zur Theorie der Halochromieerscheinungen, *Liebigs Ann. Chem.*, 285-310.
162. Kovala-Demertzi, D., Tauridou, P., Russo, U. & Gielen, M. (1995) Adducts of organotin (I), tin (IV) and tin (II) halides with 1-methylimidazoline-2(3H)-thione (Hmimt) and imidazoline-2(1,3H)-thione

- (Himt). Synthesis, spectroscopic (IR, Mössbauer and ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn NMR) studies and in vitro antitumour activity, *Inorganica Chimica Acta*. 239, 177-183.
163. Rauchfuß, T. B. & Zank, G. A. (1986) Mechanistic studies on the thiation of carbonyls by Lawesson's reagent., *Tetrahedron Letters*. 27, 3445-3448.
164. Cava, M. P. & Levinson, M. I. (1985) Thionation reactions of lawesson reagents, *Tetrahedron*. 41, 5061-5087.
165. Yoshifuji, M., An, D. L., Toyota, K. & Yasunami, M. (1994) 2,4-Di-*t*-butyl-6-methoxyphenyldithioxophosphorane as a Probe for the Mechanistic Studies of Lawesson's Reagent, *Tetrahedron Letters*. 35, 4379-4382.
166. Cherkasov, R. A., Kutyrev, G. A. & Pudovik, A. N. (1985) Organothiophosphorus Reagents In Organic Synthesis, *Tetrahedron*. 41, 2567-2624.
167. Stevens, C. M. & Watanabe, R. (1950) Amino Acid Derivatives. I. Carboallyloxy Derivatives of α -Amino Acids, , 725-727.
168. Frank, R. & Schutkowski, M. (1996) Extremely Mild Reagent For Boc Deprotection Applicable to the Synthesis Of Peptides With Thioamide Linkages, *Chemical Communications*, 2509-2510.
169. Jeffrey, S. W. & McCombie, P. D. (1982) Homogeneous, Palladium(0)-Catalyzed Exchange Deprotection of Allylic Esters, Carbonates and Carbamates, *J. Org. Chem. Journal of Organic Chemistry*. 47, 587-590.
170. Jungheim, L. N. (1989) Bicyclic pyrazolidinone antibacterial agents. synthesis of side chain analogues of carbapenems PS-5 and thienamycin, *Tetrahedron Letters*. 30, 1889-1892.
171. Kunz, H. & Unverzagt, C. (1984) Der Allyloxycarbonyl(Aloc)-Rest-die Verwandlung einer untauglichen in eine wertvolle Aminoschutzgruppe für die Peptidsynthese, *Angew. Chem*. 96, 426-427.
172. Boullanger, P. & Descotes, G. (1986) *Tetrahedron Letters*. 27, 2599.
173. Hey, H. & Arpe, H. J. (1973) Triphenylphosphanpalladium-katalysierte Abspaltung von Allylgruppen mit Ameisensäure, *Angew. Chem*. 22, 986-987.
174. Minami, I., Ohashi, Y., Shimizu, I. & Tsuji, J. (1985) *Tetrahedron Letters*. 26, 2449.
175. Kunz, H. & Waldmann, H. (1984) Die Allylgruppe als mild und selektiv abspaltbare Carboxy-Schutzgruppe zur Synthesis empfindlicher O-Glycopeptide, *Angew. Chem*. 96, 49-50.
176. Kunz, H. & Waldmann, H. (1985) Aufbau disaccharidischer N-Glycopeptide-Synthese der Verknüpfungsregion der Transmembran-Neuraminidase eines Influenza-Virus, *Angew. Chem*. 97, 885-887.
177. Friedrich-Bochnitschek, S., Waldmann, H. & Kunz, H. (1989) Allyl esters as carboxy protecting groups in the synthesis of o-glycopeptides, *Journal of Organic Chemistry*. 54, 751-756.
178. Hayakawa, Y., Wakabayashi, S., Kato, H. & Noyori, R. (1990) The Allylic Protection Method in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis. An Efficient Preparation of Solid-Anchored DNA Oligomers, *J. Am. Chem. Soc*. 112, 1691-1696.
179. Dangles, O., Guibè, F. & Balavoine, G. (1987) Selective Cleavage of the Allyl and Allyloxycarbonyl Groups through Palladium-Catalyzed Hydrostannolysis with Tributyltin Hydride . Application to the Selective Protection-Deprotection of Amino Acid Derivatives and in Peptide Synthesis, *Journal of Organic Chemistry*. 52, 4984-4993.

180. Guibe, F. & Saint M'Leux, Y. (1981) The Allyloxycarbonyl Group For Alcohol Protection: Quantitative Removal Or Transformation Into Allyl Protecting Group Via Allyl Complexes Of Palladium, *Tetrahedron Letters*. 22, 3591-3594.
181. Loffet, A. & Zhang, H. X. (1993) Allyl-based groups for side-chain protection of amino-acids, *Int. J. Peptide Protein Res.* 42, 346-351.
182. Garro-Helion, F., Merzouk, A. & Guibe, F. (1993) Mild and selective palladium(0)-catalyzed deallylation of allylic amines. Allylamine and Diallylamine as very convenient ammonia equivalents for the synthesis of primary amines, *Journal of Organic Chemistry*. 58, 6109-6113.
183. Kimbonguila, A. M., Boucida, S., Guibe, F. & Loffet, A. (1997) On the allyl protection of the imidazole ring of histidine, *Tetrahedron*. 53, 12525-12538.
184. Ciommer, M. & Kunz, H. (1991) Synthesis of glycopeptides with partial structure of human glycoporphin using the Fluorenylmethoxycarbonyl/Allyl ester protecting group combination, *Synlett*, 593-595.
185. Seitz, H. & Kunz, O. (1995) Ein neuer allylischer Anker für die Festphasensynthese-Synthese von geschützten und ungeschützten O-Glycopeptiden des Mucintyps, *Angew. Chem.* 107, 901-904.
186. Vorherr, T., Trzeciak, A. & Bannwarth, W. (1996) Application of the allyloxycarbonyl protecting group for the indole og Trp in solid-phase peptide synthesis, *Int. J. Peptide Protein Res.* 48, 553-558.
187. Kates, S. A., Daniels, S. B. & Albericio, F. (1993) Automated allyl cleavage for continuous-flow synthesis of cyclic and branched peptides, *Analytical Biochemistry*. 212, 303-310.
188. Saheb, R., Dikshit, S. K. & Agarwala, U. C. (1984) *Ind. J. Chem.* 23A, 204-208.
189. Velkov, Z., Pelova, R., Stoev, S. & Golovinsky, E. (1992) *J. Coord. Chem.* 26, 75-78.
190. Kitas, E., Küng, E. & Bannwarth, W. (1994) Chemical synthesis of O-thiophosphotyrosyl peptides, *Int. J. Peptide Protein res.* 43, 146-153.
191. Athanassopoulos, P., Barlos, K., Gatos, D., Hatzi, O. & Tzavara, C. (1995) Application of 2-Chlorotriyl Chloride in Convergent Peptide Synthesis, *Tetrahedron Letters*. 36, 5645-5648.
192. Sieber, P. (1987) A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method, *Tetrahedron Letters*. 28, 2107-2110.
193. Summerfield, S. G., Bolgar, M. S. & Gaskell, S. J. (1997) Promotion and Stabilization of B(1) Ions in Peptide Phenylthiocarbamoyl Derivatives - Analogies With Condensed-Phase Chemistry, *Journal of Mass Spectrometry*. 32, 225-231.
194. Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R. & Harrison, A. G. (1995) Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 6, 1165-1174.
195. Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. (1951) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 205.
196. Creighton, T. E. (1984) *Proteins*, W. H. Freeman and Company, New York.
197. Lyu, P., Marky, L. A. & Kallenbach, N. R. (1989) The role of ion pairs in alpha-helix stability: Two new designed helical peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2733-2734.
198. O'Neil, K. T. & DeGrado, W. F. (1990) A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids [published erratum appears in Science 1991 Aug 30;253(5023):952], *Science*. 250, 646-651.

199. Lyu, P. C., Liff, M. I., Marky, L. A. & Kallenbach, N. R. (1990) Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides, *Science*. 250, 669-673.
200. Marqusee, S. & Baldwin, R. L. (1987) Helix stabilization by Glu...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84, 8898-8902.
201. Woody, R. W. (1988) *The Peptides*, Academic Press, New York.
202. Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*. 8, 4108-4116.
203. Johnson, W. C., Jr. (1988) *Annu. rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 145.
204. Woody, R. W. (1977) *J. Polym. Sci., Macromol. Revs.* 12, 181.
205. Chen, Y. H., Yang, J. T. & Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry*. 13, 3350-9.
206. Woody, R. W. & Tinoco, I., Jr. (1967) *J. Chem. Phys.* 46, 4927-4945.
207. Madison, V. & Schellman, J. (1972) *Biopolymers*. 11, 1041-1076.
208. Gans, P. J., Lyu, P. C., Manning, M. C., Woody, R. W. & Kallenbach, N. R. (1991) The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data, *Biopolymers*. 31, 1605-1614.
209. Lyu, P. C., Wang, P., Liff, M. I. & Kallenbach, N. R. (1991) Local effect of glycine substitution in a model helical peptide, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 3568-3572.
210. Lyu, P. C., Sherman, J. C., Chen, A. & Kallenbach, N. R. (1991) Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88, 5317-5320.
211. Scholtz, J. M., Qian, H., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1991) Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water, *Biopolymers*. 31, 1463-1470.
212. Shalongo, W. & Stellwagen, E. (1997) Dichroic statistical model for prediction and analysis of peptide helicity, *Proteins*. 28, 467-80.
213. Jackson, D. Y., King, D. S., Chmielewski, J., Singh, S. & Schultz, P. G. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9391-9392.
214. Manning, M. C. & Woody, R. W. (1991) Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors, *Biopolymers*. 31, 569-586.
215. Nelson, J. W. & Kallenbach, N. R. (1986) Stabilization of the ribonuclease S-peptide alpha-helix by trifluoroethanol, *Proteins*. 1, 211-217.
216. Sonnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. (1992) Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, *Biochemistry*. 31, 8790-8.
217. Cammersgoodwin, A., Allen, T. J., Oslick, S. L., McClure, K. F., Lee, J. H. & Kemp, D. S. (1996) Mechanism Of Stabilization Of Helical Conformations Of Polypeptides By Water Containing Trifluoroethanol, *Journal of the American Chemical Society*. 118, 3082-3090.
218. Jasanoff, A. & Fersht, A. R. (1994) Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves, *Biochemistry*. 33, 2129-2135.

219. Thomas, P. D. & Dill, K. A. (1993) Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation, *Protein Science*. 2, 2050-65.
220. Schonbrunner, N., Wey, J., Engels, J., Georg, H. & Kiefhaber, T. (1996) Native-like beta-structure in a trifluoroethanol-induced partially folded state of the all-beta-sheet protein tendamistat, *Journal of Molecular Biology*. 260, 432-45.
221. Bodkin, M. J. & Goodfellow, J. M. (1996) Hydrophobic solvation in aqueous trifluoroethanol solution, *Biopolymers*. 39, 43-50.
222. Blanco, F. J., Jimenez, M. A., Pineda, A., Rico, M., Santoro, J. & Nieto, J. L. (1994) NMR solution structure of the isolated N-terminal fragment of protein-G B1 domain. Evidence of trifluoroethanol induced native-like beta-hairpin formation, *Biochemistry*. 33, 6004-6014.
223. Marqusee, S., Robbins, V. H. & Baldwin, R. L. (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 5286-5290.
224. Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T. M. & Baldwin, R. L. (1990) Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids, *Nature*. 344, 268-270.
225. Shoemaker, K. R., Fairman, R., Schultz, D. A., Robertson, A. D., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1990) Side-chain interactions in the C-peptide helix: Phe 8 ... His 12+, *Biopolymers*. 29, 1-11.
226. Chang, C. F. & Zehfus, M. H. (1998) Effects Of Backbone Modification On Helical Peptides - the Reduced Carbonyl Modification, *Biopolymers*. 46, 181-193.
227. Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M. & Kamphuis, J. (1996) Circular Dichroism Spectrum Of a Peptide 3(10)-Helix, *Journal of the American Chemical Society*. 118, 2744-2745.
228. Ho, S. P. & DeGrado, W. F. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 6751.
229. Barskaya, T. V. & Ptitsyn, O. B. (1971) Thermodynamic parameters of helix-coil transition in polypeptide chains. II. Poly-L-lysine, *Biopolymers*. 10, 2181-2197.
230. Lyu, P. C., Gans, P. J. & Kallenbach, N. R. (1992) Energetic contribution of solvent-exposed ion pairs to alpha-helix structure, *J. Mol. Biol.* 223, 343-350.
231. Merutka, G. & Stellwagen, E. (1991) Effect of amino acid ion pairs on peptide helicity, *Biochemistry*. 30, 1591-1594.
232. Huyghues-Despointes, B. M., Scholtz, J. M. & Baldwin, R. L. (1993) Helical peptides with three pairs of Asp-Arg and Glu-Arg residues in different orientations and spacings, *Protein Science*. 2, 80-85.
233. Djerassi, C., Undheim, K. & Weidler, A.-M. (1962) *Acta Chem. Scand.* 16, 1147.
234. Burakevich, J. V. & Djerassi, C. (1965) Optical rotatory dispersion studies. XCVII. Anomalous rotatory dispersion and circular dichroism curves associated with thioamides. Application to stereochemical studies of carboxylic acids., *J. Am. Chem. Soc.* 87, 51-60.
235. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, , Wiley, New York.
236. Szilagy, L. & Jardetzky, O. (1989) *J. Magn. Res.* 83, 441.
237. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. (1995) ¹H, ¹³C und ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids.
- I. Investigations of nearest-neighbor effects, *J. of Biomolecular NMR*. 5, 67-81.

238. Pardi, A., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants, $3J_{HN\alpha}$, in a globular protein. Use of $3J_{HN\alpha}$ for identification of helical secondary structure, *Journal of Molecular Biology*. 180, 741-751.
239. Wuthrich, K., Billeter, M. & Braun, W. (1984) Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances, *Journal of Molecular Biology*. 180, 715-40.
240. Harper, E. T. & Rose, G. D. (1993) Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box, *Biochemistry*. 32, 7605-7609.
241. Lyu, P. C., Wemmer, D. E., Zhou, H. X., Pinker, R. J. & Kallenbach, N. R. (1993) Capping interactions in isolated alpha helices: position-dependent substitution effects and structure of a serine-capped peptide helix, *Biochemistry*. 32, 421-5.
242. Shoemaker, K. R., Kim, P. S., Brems, D. N., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1987) Test of the helix dipole model for stabilization of alpha-helices., *Nature*. 326, 563-567.
243. Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J. & Kastin, A. J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor [see comments], *Nature*. 386, 499-502.
244. Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., Reimer, U. & Fischer, G. (1998) Barriers to Rotation Of Secondary Amide Peptide Bonds, *Journal of the American Chemical Society*. 120, 5568-5574.
245. Meyer, S., Jabs, A., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1994) Separation of cis/trans isomers of a prolyl peptide bond by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. 15, 1151-1157.
246. Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1991) Defining solution conformations of small linear peptides, *Annual Review of Biophysics & Biophysical Chemistry*. 20, 519-538.
247. Jardetzky, O. & Roberts, G. C. K. (1981) *NMR in Molecular Biology*, Academic Press, New York.
248. Yao, J., Feher, V. A., Espejo, B. F., Reymond, M. T., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1994) Stabilization of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution, *Journal of Molecular Biology*. 243, 736-753.
249. Petersheim, M., Moldow, R. L., Halladay, H. N., Kastin, A. J. & Fischman, A. J. (1992) Conformational studies of N-Tyr-MIF-1 in aqueous solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *International Journal of Peptide & Protein Research*. 40, 41-48.
250. Goodman, M. & Mierke, D. F. (1989) Configurations of morphiceptins by 1H and ^{13}C NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3489-3495.
251. Delaet, N. G., Verheyden, P. M., Tourwe, D. & Van Binst, G. (1991) Assignment of the 1H -NMR resonances of the four rotamers of beta-casomorphin-5 in DMSO, *Biopolymers*. 31, 1409-1416.
252. Kalman, A., Thuncke, F., Schmidt, R., Schiller, P. W. & Horvath, C. (1996) Isolation and Identification Of Peptide Conformers By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Nmr At Low Temperature, *Journal of Chromatography*. 729, 155-171.
253. LaPlanche, L. A. & Rogers, M. T. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3728.
254. Walter, W., Schaumann, E. & Reubke, K.-J. (1968) *Angew. Chem.* 80, 448.
255. Walter, W. & Hühnerfuss, H. (1969) *J. Mol. Struct.* 4, 435.
256. Jacobson, J., Melander, W., Vaisnys, G. & Horvath, C. (1984) *J. Phys. Chem.* 88, 4536.

257. Grathwohl, C. & Wüthrich, K. (1981) Nmr studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides, *Biopolymers*. 20, 2623-2633.
258. Larive, C. K. & Rabenstein, D. L. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2833-2836.
259. Schmidt, R., Kalman, A., Chung, N. N., Lemieux, C., Horvath, C. & Schiller, P. W. (1995) Structure-activity relationships of dermorphin analogues containing N-substituted amino acids in the 2-position of the peptide sequence, *International Journal of Peptide & Protein Research*. 46, 47-55.
260. Friebe, S., Hartrodt, B., Neubert, K. & Krauss, G. J. (1994) High-performance liquid chromatographic separation of cis-trans isomers of proline-containing peptides. II. Fractionation in different cyclodextrin systems, *Journal of Chromatography A*. 661, 7-12.
261. Henderson, D. E. & Mello, J. A. (1990) *J. Chromatogr.* 199, 79.
262. Rusconi, L., Perseo, G., Franzoi, L. & Montecucchi, P. C. (1985) *J. Chromatogr.* 349, 117.
263. Friebe, S., Krauss, G.-J. & Nitsche, H. (1992) *J. Chromatogr.* 598, 139.
264. Gesquiere, J. C. & Diesis, E. (1989) *J. Chromatogr.* 478, 121.
265. Watson, E. & Kenney, W. C. (1992) *J. Chromatogr.* 606, 165.
266. Melander, W. R., Jacobson, J. & Horvath, C. (1982) *J. Chromatogr.* 234, 269.
267. Nishikawa, T., Hayashi, Y., Suzuki, S., Kubo, H. & Ohtani, H. (1996) Cis-Trans Isomerization of Proline Dipeptides During Liquid Chromatography - Kinetic Analysis of the Elution Profile, *Analytical Sciences*. 12, 561-564.
268. Loewenstein, A., Melera, A., Rigny, P. & Walter, W. (1964) *J. Phys. Chem.* 68, 1597.
269. Schwenker, G. & Rosswag, H. (1967) *Tetrahedron Letters*. 43, 4237.
270. Schaumann, E. (1974) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 13, 350.
271. Doepke, W., Bartholme, B. & Gross, T. (1976) *Z. Chem.* 16, 327-328.
272. Neuman, R. C., Jr. & Young, L. B. (1965) *J. Phys. Chem.* 69, 1777.
273. Walter, W. & Maerten, G. (1963) Thioformylierung von Aminen und Untersuchungen über die cis-trans-Isomerie an der Thioamidgruppe, *Liebigs A. Chem.* 669, 66-75.
274. Walter, W., Maerten, G. & Rose, H. (1966) NMR-spektroskopische Untersuchungen an cis- und trans-N-Methyl-N-benzyl-thioformamid. Zuordnung der Konfigurationen und Kinetik der Umwandlung, *Liebigs A. Chem.* 691, 25-32.
275. Walter, W. & Maerten, G. (1968) Untersuchungen an N-[β -Hydroxy-äthyl]-N-alkyl-thioformamiden, *Liebigs A. Chem.* 715, 35-46.
276. Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975) 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.
277. Grathwohl, C. & Wüthrich, K. (1976) The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides, *Biopolymers*. 15, 2025-2041.
278. Evans, C. A. & Rabenstein, D. L. (1974) Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. II. Dependence of the acidity of the c-terminal carboxyl group on the conformation of the c-terminal peptide bond, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 7312-7317.
279. Harrison, R. K. & Stein, R. L. (1990) Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion, *Biochemistry*. 29, 1684-1689.

280. Keim, P., Vigna, R. A., Nigen, A. M., Morrow, J. S. & Gurd, F. R. (1974) Carbon 13 nuclear magnetic resonance of pentapeptides of glycine containing central residues of methionine, proline, arginine, and lysine, *Journal of Biological Chemistry*. **249**, 4149-4156.
281. Reimer, U., el Mokdad, N., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997) Intramolecular assistance of cis/trans isomerization of the histidine-proline moiety, *Biochemistry*. **36**, 13802-13808.
282. Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998) Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation, *Journal of Molecular Biology*. **279**, 449-460.
283. Kemmink, J. & Creighton, T. E. (1995) The physical properties of local interactions of tyrosine residues in peptides and unfolded proteins, *Journal of Molecular Biology*. **245**, 251-260.
284. Nardi, F., Worth, G. A. & Wade, R. C. (1997) Local interactions of aromatic residues in short peptides in aqueous solution: a combined database and energetic analysis, *Folding & Design*. **2**, 62-68.
285. Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **27**, 157-162.
286. Kenny, A. J., Booth, A. G., George, S. G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, E. J. & Young, A. R. (1976) Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase, *Biochemical Journal*. **157**, 169-182.
287. Barth, A., Heins, J., Fischer, G., Neubert, K. & Schneeweiss, B. (1984) *Wiss. Beitr. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Mol. Cell. Regul. Enzyme Act., Pt1)*. **46**, 297-339.
288. Heins, J., Welker, P., Schoenlein, C., Born, I., Hartrodt, B., Neubert, K., Tsuru, D. & Barth, A. (1988) Mechanism of proline-specific proteinases. I. Substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney and proline-specific endopeptidase from flavobacterium-meningosepticum., *Biochimica et Biophysica Acta*. **954**, 161-169.
289. Fischer, G., Heins, J. & Barth, A. (1983) The conformation around the peptide bond between the P1- und p2-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases., *Biochimica et Biophysica Acta*. **742**, 452-462.
290. Pasternak, G. W. (1993) Pharmacological mechanisms of opioid analgesics, *Clinical Neuropharmacology*. **16**, 1-18.
291. Pasternak, G. W., Childers, S. R. & Snyder, S. H. (1980) Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors, *Science*. **208**, 514-516.
292. Chaillet, P., Coulaud, A., Zajac, J. M., Fournie-Zaluski, M. C., Costentin, J. & Roques, B. P. (1984) The mu rather than the delta subtype of opioid receptors appears to be involved in enkephalin-induced analgesia, *European Journal of Pharmacology*. **101**, 83-90.
293. Yamazaki, T., Ro, S., Goodman, M., Chung, N. N. & Schiller, P. W. (1993) A Topochemical Approach to Explain Morphiceptin Bioactivity, *J. Medicinal Chemistry*. **36**, 708-719.
294. Childers, S. R. (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems, *Life Sciences*. **48**, 1991-2003.
295. Chakrabarti, S., Law, P. Y. & Loh, H. H. (1995) Neuroblastoma Neuro2A cells stably expressing a cloned mu-opioid receptor: a specific cellular model to study acute and chronic effects of morphine, *Brain Research. Molecular Brain Research*. **30**, 269-278.

296. Pahlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E. & Esscher, T. (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation, *Cell Differentiation*. 14, 135-144.
297. Yu, V. C., Hochhaus, G., Chang, F. H., Richards, M. L., Bourne, H. R. & Sadee, W. (1988) Differentiation of human neuroblastoma cells: marked potentiation of prostaglandin E-stimulated accumulation of cyclic AMP by retinoic acid, *Journal of Neurochemistry*. 51, 1892-1899.
298. Yamazaki, T., Ro, S. & Goodman, M. (1991) Topochemical analysis of morphiceptin and dermorphin bioactivities, *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 181, 664-670.
299. Betsbrugge, J., Verheyden, P. & Tourwe, D. Increasing the cis peptide bond conformation between Tyr(1) and Pro(2) in β -casomorphin-5: implications on the receptor affinity, *Tagungsbericht*.
300. Yamazaki, T., Pröbstl, A., Schiller, P. W. & Goodman, M. (1991) Biological and conformational studies of [Val4]morphiceptin and [D-Val4]morphiceptin analogs incorporating cis-2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline, *Int J Pept Protein Res*. 37, 364-381.
301. Podlogar, B. L., Paterlini, M. G., Ferguson, D. M., Leo, G. C., Demeter, D. A., Brown, F. K. & Reitz, A. B. (1998) Conformational Analysis Of the Endogenous Mu-Opioid Agonist Endomorphin-1 Using Nmr Spectroscopy and Molecular Modeling, *FEBS Letters*. 439, 13-20.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gunter Fischer für die Vergabe des interessanten Themas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Mike Schutkowski möchte ich für die Einführung in die Welt der Peptide, für die produktive Zusammenarbeit und die kontroverse, konstruktive Diskussion herzlichen Dank sagen.

Danken möchte ich weiterhin allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, allen voran der peptidchemischen Arbeitsgruppe Dr. Schutkowski, für die gute Zusammenarbeit und das produktive Arbeitsklima.

Ria Baumgraß und Frank Thunecke gebührt mein Dank für fruchtbringende Kooperation und viele konstruktive Diskussionen.

Ulf Reimer, Gerd Scherer und Peter Bayer danke ich für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und die gute Zusammenarbeit.

Mario Jakob, Steffen Kiessig, Peter Rücknagel, Thomas Pfeifer, Susanne Füssel und den anderen danke ich dafür, daß sie mich an ihrem Wissen und ihren Erfahrungen teilhaben ließen und dadurch manche Idee ermöglichten..

Prof. Dr. Liebmann danke ich für die durchgeführten Bindungsstudien.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.

Lebenslauf

Name Robert Frank
Geburtsdatum 15.01.1968
Geburtsort Schlema
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbesuch
1974 – 1984 Polytechnische Oberschule Aue
1984 – 1986 Abitur an der Erweiterten Oberschule Aue

Wehrdienst
1986 – 1989 Militärdienst

Studium
1989 – 1994 Martin – Luther – Universität Halle - Wittenberg, Fachrichtung
Chemie, Abschluß als Diplom – Chemiker
Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Fischer
Thema: „Untersuchungen zur Synthese von thioxylierten
Tetrapeptiden“

1994 – 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Max-Planck-Arbeitsgruppe
„Enzymologie der Peptidbindung“ (ab 01.01.1997 Forschungsstelle
„Enzymologie der Proteinfaltung“) in Halle
Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. G. Fischer
Thema: „Untersuchungen zur Synthese, den physikalisch-chemischen
Eigenschaften und der biologischen Aktivität von Thioxopeptiden“

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Promotion eingereicht.

Halle/Saale, den 14. 11. 1999