

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. Kapillarzonelektrophorese	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