

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).

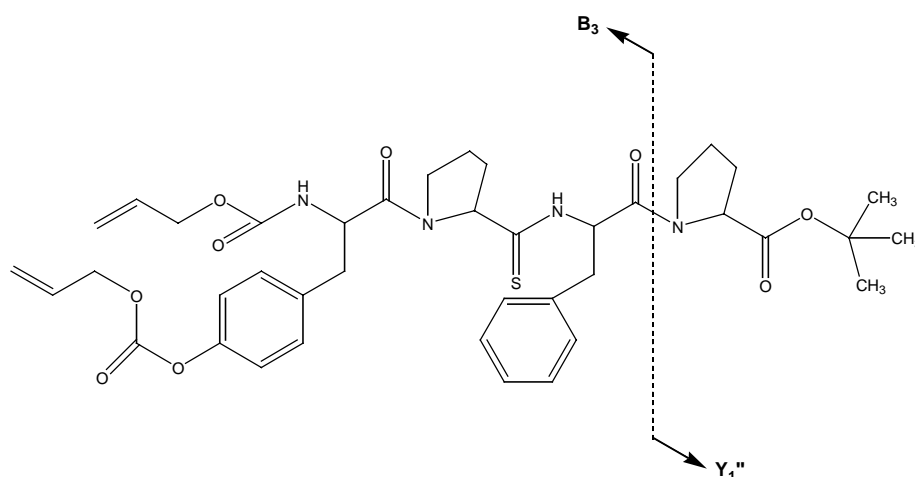


Abb. 21 Schema der Fragmentierung des Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-Pro-OtBu unter Generierung eines geladenen (B_3) und eines neutralen Fragmentes (Y_1'').

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).

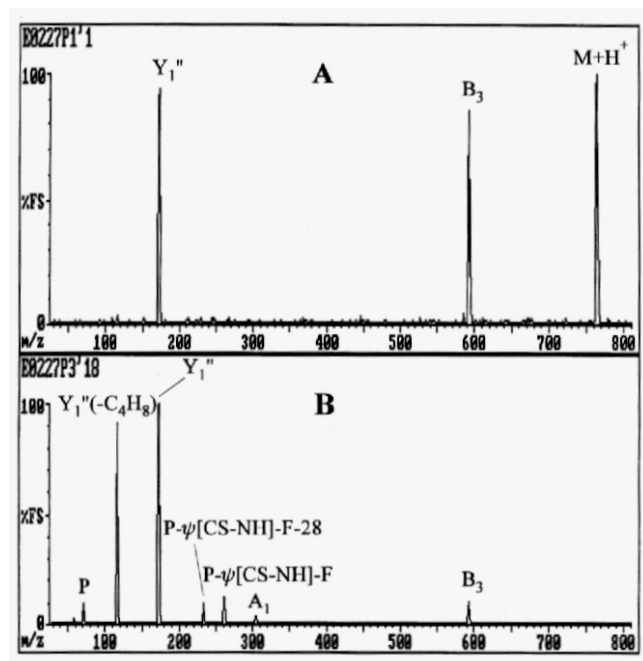


Abb. 22 CID-Massenspektrum des $[M+H]^+$ -Ions des Alloc-Tyr(Alloc)-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-Pro-OtBu: (A) CE = 0 eV; (B) CE = 40 eV ($p = 1.2$ mbar). Das Ionenspektrum bei 40 eV (B) zeigt die Generierung des internalen Ions Pro-ψ[CS-NH]-Phe und die Eliminierung des CO aus diesem.

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).

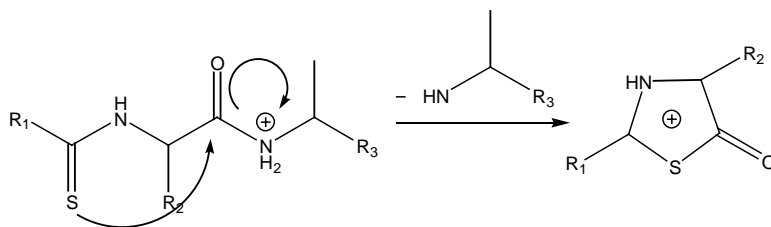


Abb. 23 Bildung eines protonierten Thiazolons während der massenspektrometrischen Analyse von Thioxopeptiden durch nucleophilen Angriff des Schwefels auf den Carbonylkohlenstoff der nachfolgenden Peptidbindung.

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.

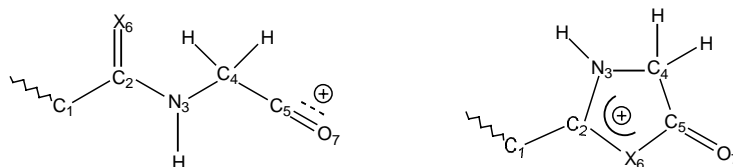


Abb. 24 Strukturen für das Modell eines acyclischen und eines cyclischen B-Ions. Oxazolone: X = O, Thiazolone: X = S.

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 Oxazolone [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 Oxazolone.

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 thioxoamidhaltige 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.

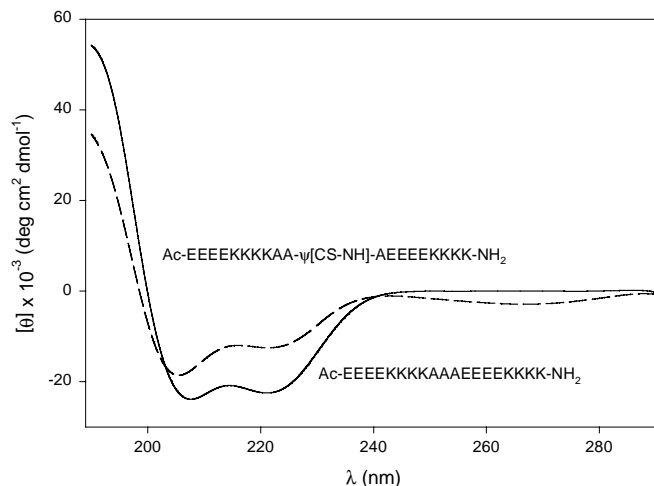


Abb. 25 CD-Spektren der Peptide I (—) und II (---). Die Peptide wurden in einer 50 μ M-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7 und 4°C aufgenommen.

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 bezugnehmend 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.

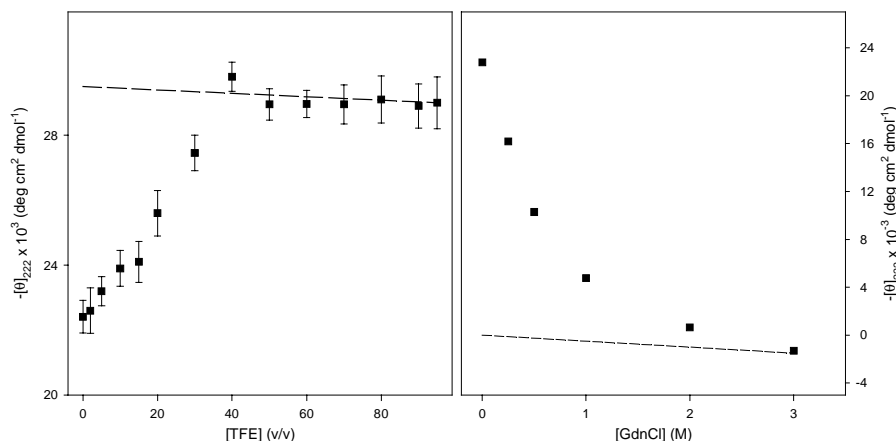


Abb. 26 (links) Erhöhung der MRE des Peptids **I** durch Zugabe von α -helixstabilisierendem TFE. Der Wert $[\theta]_{\infty, \text{TFE}}$ ist erhältlich aus der Extrapolation (---) zur Nullkonzentration von TFE und stellt die 100%ige α -Helix dar. **(rechts)** Erniedrigung der MRE des Peptids **I** 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 μM 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 $[\theta]_{\text{H, TFE}} = -29.800 \pm 700 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$ 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 $[\theta]_{C, \text{GdnCl}} = 0 \pm 500 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$, 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 Thiopeptidbindung 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 Oxopeptid **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).

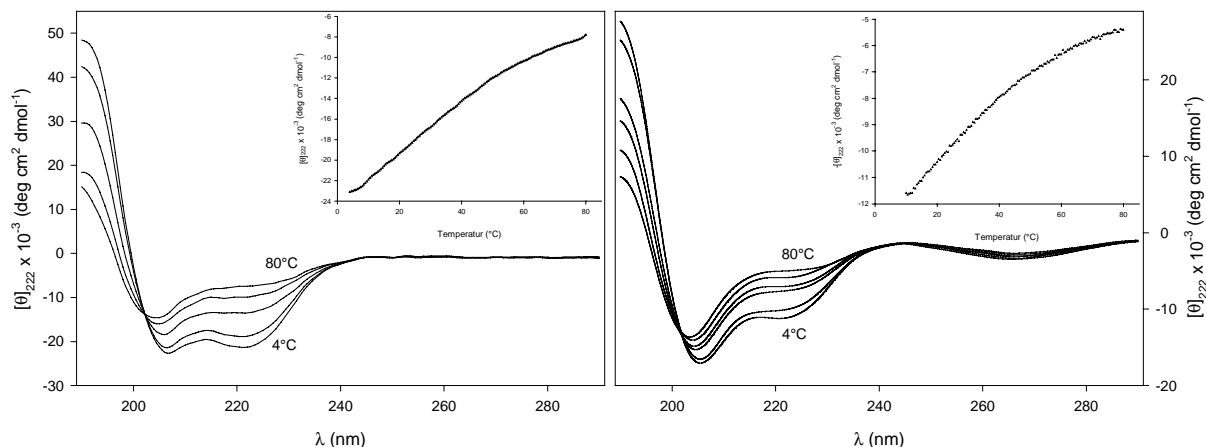


Abb. 27 CD-Spektren von I (links) und II (rechts) im Temperaturbereich von 4-95°C. Für die Temperaturen 10, 15, 30, 45, 60 und 80°C sind die Spektren abgebildet. Beide Messungen erfolgten mit 50 μ M Peptid in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7. Das Temperaturintervall betrug 1°C/min. Die eingefügten 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.

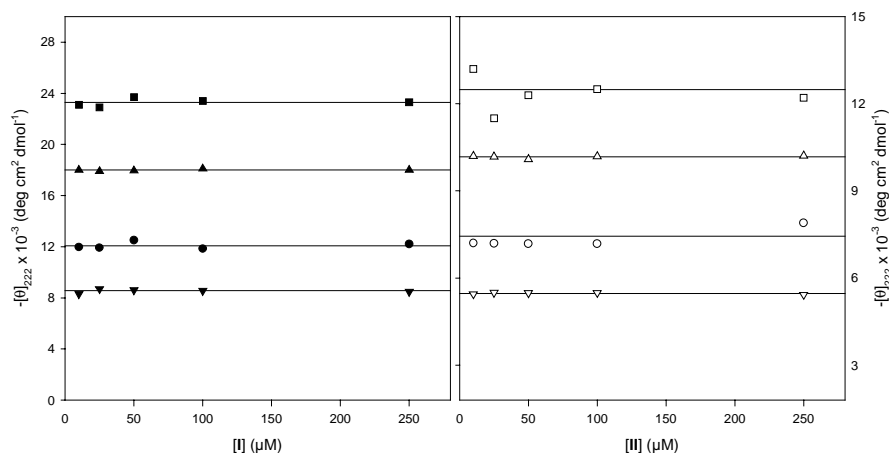


Abb. 28 Konzentrationsabhängigkeit der MRE bei 222 nm der Peptide I (links) und II (rechts) bei Erhöhung der Temperatur. Meßbedingungen: 10 nM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4, (■,□) 15 (▲,△), 50 (●,○) und 75°C (▼,▽).

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.

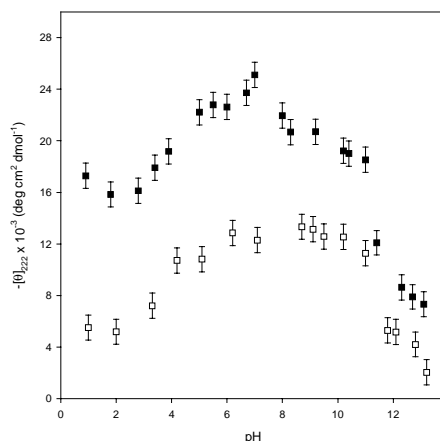


Abb. 29 Abhängigkeit der MRE bei 222 nm vom pH-Wert für **I** (■) und **II** (□). Meßbedingungen: 50 μM Peptid, 10 mM Natriumphosphatpuffer, 4°C.

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].

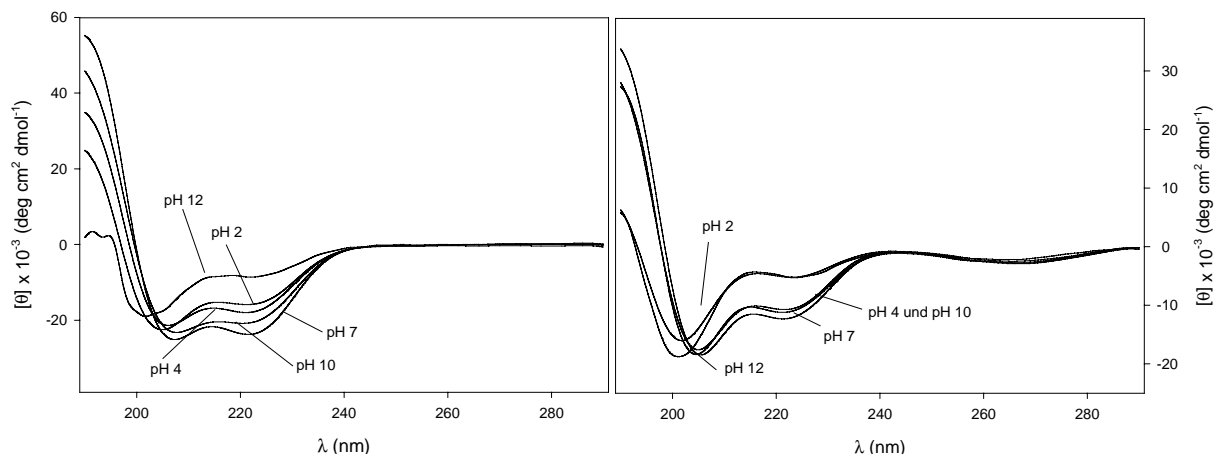


Abb. 30 Abhängigkeit der Cotton-Effekte der Peptide **I** (links) und **II** (rechts) vom pH-Wert im Bereich von pH 2-12. Für pH 2, 4, 7, 10 und 12 sind die Spektren abgebildet. Beide Messungen erfolgten in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 50 μM -Peptidkonzentrationen bei 4°C. Die Einstellung der pH-Werte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

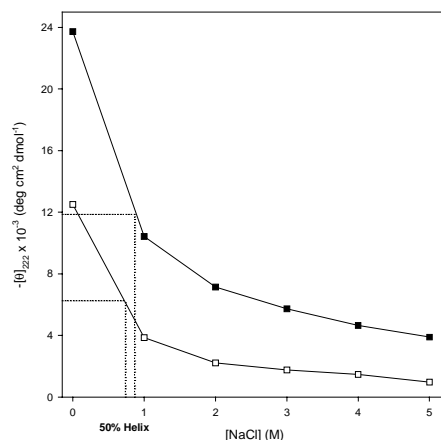


Abb. 31 Verminderung des α -Helixgehaltes von Peptid **I** (■) und **II** (□) bei Erhöhung der Konzentration an NaCl von 0 auf 5 M. Meßbedingungen: 50 μM Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C.

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.

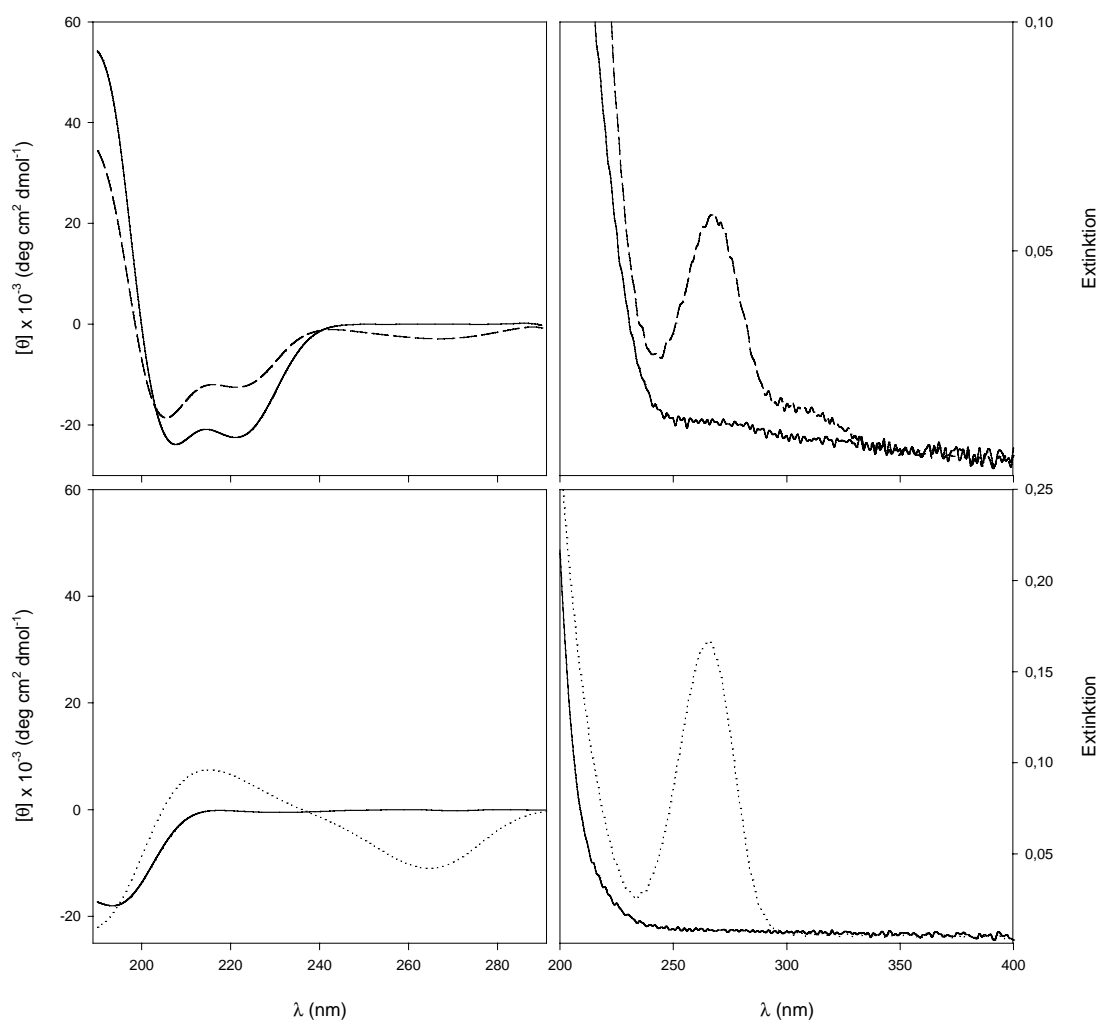


Abb. 32 Vergleich der CD- und UV/Vis-Absorptions-Spektren des Peptids **I** (—) und **II** (--) (**oben**) mit den Spektren des Trialanylsegment Ac-Ala-Ala-Ala-NH₂ (—) und dessen Ala²-thioxylierten Derivat (···) (**unten**). Meßbedingungen: 50 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C.

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.

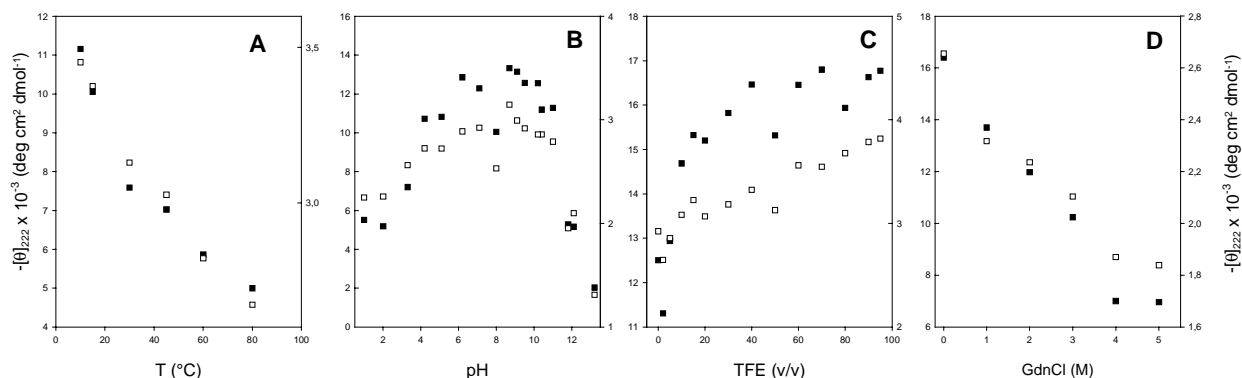


Abb. 33 Vergleich der MRE des Peptids I bei 222 nm (■) und 267 nm (□) durch (A): Temperaturerhöhung von 0 auf 80°C bei pH 7. (B):Veränderung des pH-Wertes von pH 1 bis 13 bei 4°C. (C):Erhöhung des α -Helixcharakters durch TFE-Zugabe bei pH 7, 4°C. (D):Erniedrigung des α -Helixcharakters durch GdnCl-Zugabe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

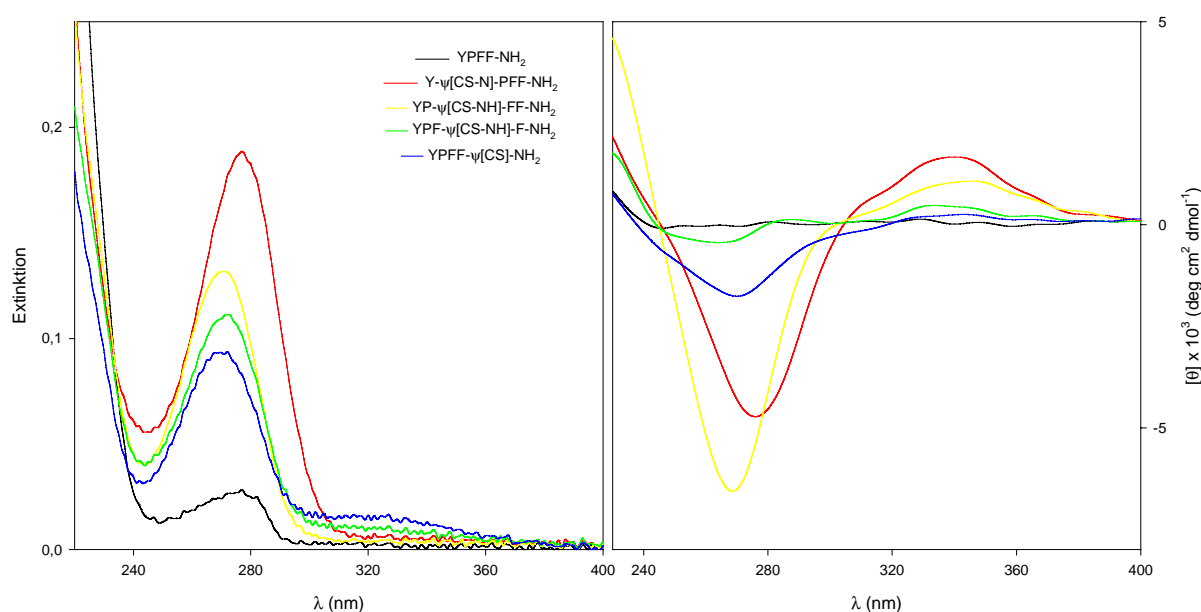


Abb. 34 Einfluß der Position der Thioxozeptidbindung im EM-2 auf die Cotton-Effekte anhand der UV-Absorptions- (**links**) und CD-Spektren (**rechts**) des EM-2 und der vier thioxylierten Derivate. Meßbedingungen: 50 μ M Peptid; 10 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7; 4°C; Schichtdicke $d = 1$ mm; CD-Scangeschwindigkeit 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 ${}^1\text{H}$ - und ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. So wird dieser O/S-Austausch im ${}^{13}\text{C}$ -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].

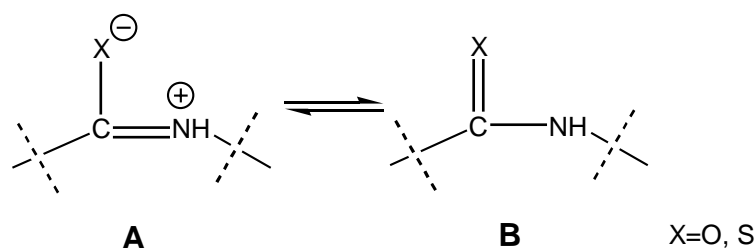


Abb. 35 Durch den partiellen Doppelbindungscharakter bedingte Ladungsverteilung einer Peptidbindung.

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 Thiopeptidbindung 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 Thiopeptidbindung 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:

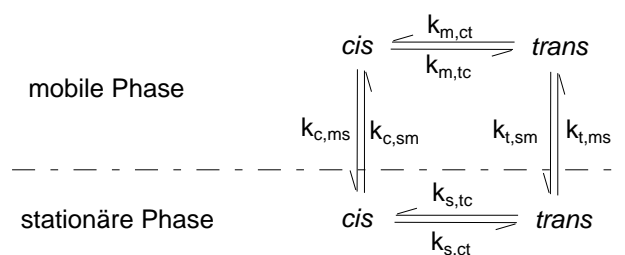


Abb. 36 Schema der Interkonversion der *cis/trans*-Isomere in der mobilen und stationären Phase einer RP-Säule.

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 Gefrierdrying) 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.

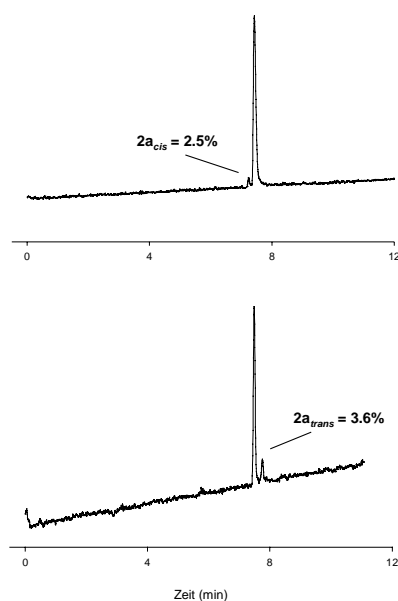


Abb. 37 CZE der mittels pHPLC getrennten und gefriergetrockneten *cis*- und *trans*-Isomere von EM-2a. Die Reinheit der Isomere betrug 95 – 98%.

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.

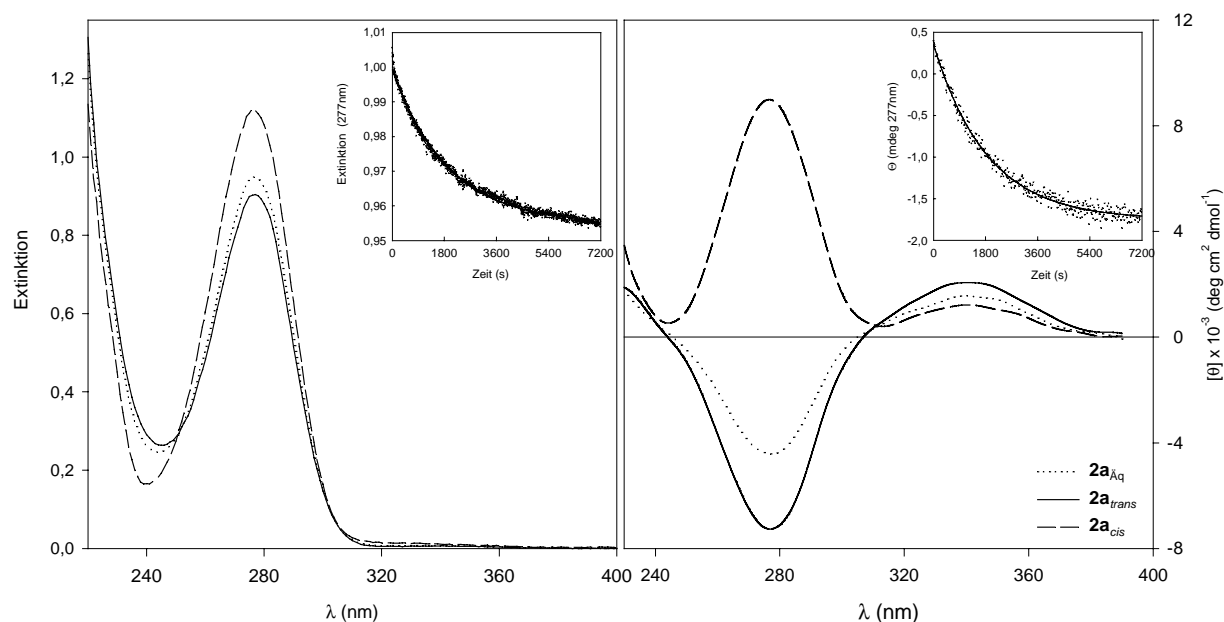


Abb. 38 Vergleich der isomerspezifischen Cotton-Effekte der reinen *cis*- und *trans*-Isomere des EM-2a und der äquilibrierten Lösung anhand der UV/Vis- (links) und CD-Spektren (rechts). Meßbedingungen: 10 mM Natriumphosphatpuffer, 200 μM Peptid, pH 7.4 und 4°C ; Äquilibrierte Probe (.....), EM-2a_{trans} (—) 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 $3.25 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

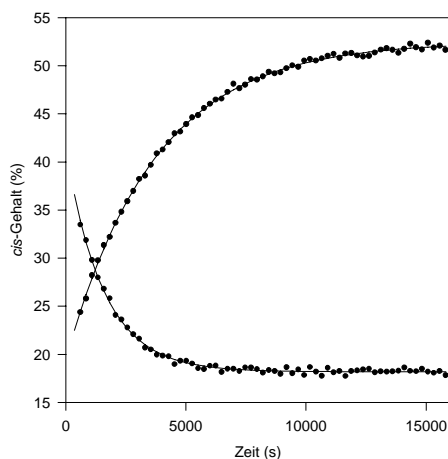
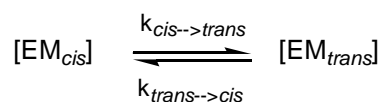


Abb. 39 pH-abhängige Änderung des *cis*-Gehaltes in EM-2a. Die Bestimmung der Änderung des *cis*-Gehaltes erfolgte nach einem pH-Sprung von pH 7.4 auf 11.1 und pH 11.1 auf 7.4 mittels $^1\text{H-NMR}$.

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.

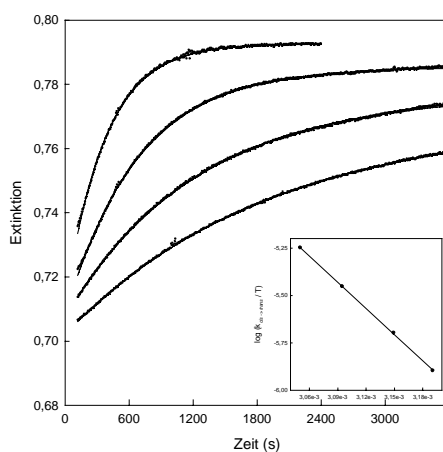


Abb. 40 Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung, ausgehend von EM-2a_{cis}. Die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes wurde an $70 \mu\text{M}$ Peptid, in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 bei $40, 45, 50$ und 55°C verfolgt. Dargestellt ist die UV-absorptionsspektroskopisch detektierte 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.

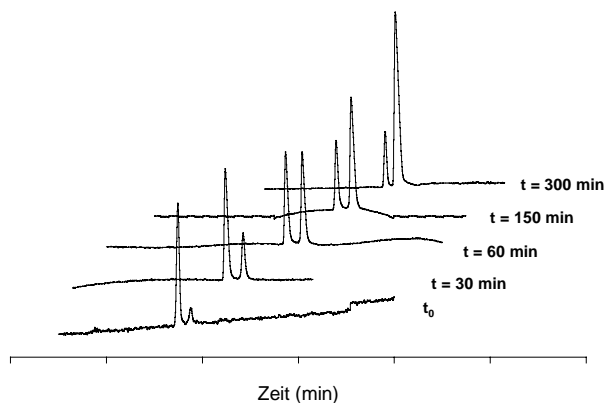


Abb. 41 Zeitabhängige CZE-Läufe während der Interkonversion des *cis*-Isomers EM-**2a**_{*cis*} bei 25°C bis zur Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes mit einer Halbwertszeit von 3h. Meßbedingungen: 50 µM Peptid, 50 mM Natriumphosphatpuffer, Detektion bei 200 nm.

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.

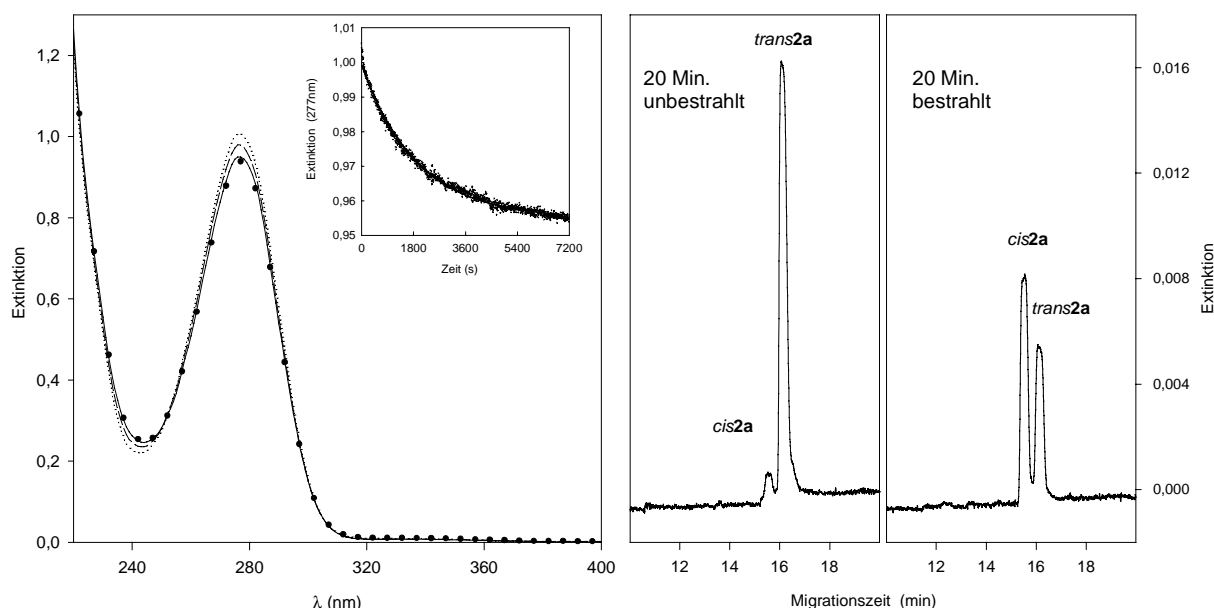


Abb. 42 (links) UV/Vis-Absorptionsspektren des N₂-Laser-bestrahlten Peptids EM-2a in 10 mM Natriumphosphatpuffer, 70 μ M, pH 7.4 und 40°C. Äquilibrierte Probe vor der Bestrahlung mit N₂-Laserlicht bei 337 nm (—), Probe direkt nach 30 min Bestrahlung (·····), Probe 40 min nach der Bestrahlung (-----), 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 μ M 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 μ J/Puls, 298 K). CZE-Bedingungen: 50 μ M Natriumphosphatpuffer, pH 2.5, 12°C, Quarz-Kapillare: 60 cm * 50 μ m, 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.