

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 Thiopeptide 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 Polypeptiden oder gar Proteinen stellt die regioselektive Einführung der Thiopeptidbindung 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 Thiopeptide. Die Ergebnisse wurden mit denen der parallel untersuchten, nichtmodifizierten Oxoderivate verglichen. Somit konnte die Bedeutung der Thioxylation sowohl für physikalisch-chemische als auch biologische Fragestellungen bewertet werden.

5.1. Thiopeptidsynthesen

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 Thiopeptiden erarbeitet. Diese Methode reduziert die bei acidolytischer Schutzgruppenentfernung bei Thiopeptiden durch Thiazol-5(4H)-on-Bildung auftretenden hohen Ausbeuteverluste und gestattet den schrittweisen Aufbau längerer Thiopeptide.

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 aufwies. 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 Nonadeca-peptids, 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.