

1. Einleitung

Die Peptidbindung als chemisches Bindeglied zwischen den Aminosäureresten in Peptiden und Proteinen spielt eine zentrale Rolle in der Biochemie. Sie ist durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften gekennzeichnet, wie z.B. der Coplanarität der am Stickstoffatom gebundenen Gruppen, der charakteristischen Rotationsbarriere um die C-N Bindung, der verkürzten C-N Bindungslänge und einer definierten Stabilität bezüglich nucleophilem Angriff und Hydrolyse (Lauvergnat & Hiberty, 1997). Diese Eigenschaften beruhen weitgehend auf der Amidbindungsresonanz, die aus der Delokalisation des freien Elektronenpaares am Stickstoff über das gesamte CNO- π -Elektronensystem resultiert, und die durch eine Reihe von Resonanzstrukturen dargestellt werden kann (vgl. Abb.1). Neben den klassischen Formen 1 und 2 wurden, basierend auf Valenzbindungsberechnungen, weitere Resonanzstrukturen (vgl. 3 und 4 in Abb.1) beschrieben.

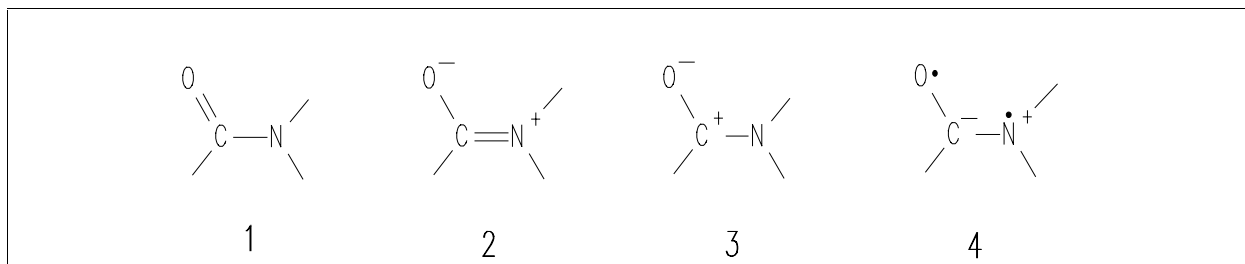


Abb.1: Resonanzformen der Peptidbindung nach (Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Neben der kovalenten Verknüpfung der Aminosäurereste einer Peptidkette durch die Peptidbindung fungiert diese auch als Donor bzw. Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen (im Folgenden: HB), und ist somit maßgeblich an der Ausbildung und Stabilisierung dreidimensionaler Peptidstrukturen beteiligt. Die Modifizierung der Peptidbindung, z.B. durch Austausch des Carbonylsauerstoffes durch ein Schwefelatom, verändert deren chemische Eigenschaften, und erlaubt somit Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Wechselwirkungen. Eine derartige Substitution, im Folgenden als Thioxylierung bezeichnet, führt zur Bildung von Thiopeptiden, die modifizierten Peptidbindungen werden analog als Thiopeptidbindungen bezeichnet. Der Vorteil der Thioxylierung besteht darin, daß es sich hier um eine weitgehend isostere Ein-Atom-Substitution direkt im Peptidrückgrad handelt, die Auswirkungen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der modifizierten Peptidbindung hat, und, in Fortsetzung dessen, auch ein verändertes Verhalten im biologischen System erwarten läßt.

Thiopeptidbindungen nehmen, wie gewöhnliche Peptidbindungen auch, eine Z-planare Konformation ein (Bardi et al., 1988; Kajtar et al., 1986; Hollosi et al., 1988), jedoch ist die C=S Bindung mit einer Bindungslänge von 1.64 Angström im Vergleich zur C=O Bindung

um 0.4 Angström gestreckt (Bardi et al., 1988). Wegen des größeren kovalenten (Walter & Voss, 1970) und van der Waals Radius (Biondi; 1964) des Schwefelatoms sind die erlaubten ϕ und ψ Winkel in der Nachbarschaft des Thioxocarbonyls stärker limitiert (La Cour; 1987). Thiopeptide zeigen veränderte Eigenschaften bei der Ausprägung von HB. Einerseits sind sie stärkere Säuren (Dudeck & Dudeck, 1967), und somit bessere Donoren für HB, andererseits ist die verminderte Basizität des Schwefels für schlechtere Akzeptoreigenschaften verantwortlich (Abboud et al., 1988, 1993; Laurence et al., 1995).

Die Beschreibung der elektronischen Eigenschaften der Peptidbindung und deren Vergleich mit den Charakteristika der Thiopeptidbindung ist schwierig, da die Elektronenverteilung innerhalb dieser Bindungen durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, die bei den Oxo- und Thioformen entsprechender Derivate unterschiedlich stark ausgeprägt sind und sich in ihrer Wirkung überlagern. Diese Faktoren beruhen einerseits auf den Unterschieden der Elektronegativitätswerte zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dessen Substituenten, die durch Ladungstransfer mehr oder minder kompensiert werden, und zu Differenzen hinsichtlich Basizität, Nucleophilie und Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen einzelner Komponenten führen. Andererseits sind Resonanzeffekte zwischen dem freien Elektronenpaar des Substituenten und den π -Elektronen der Carbonylfunktion an der Stabilisierung der Peptidbindung beteiligt.

Wenngleich das Resonanzmodell von der Mehrzahl der Autoren als das geeignetste betrachtet wird, gibt es auch alternative Modelle zur Erklärung der elektronischen Eigenschaften und des daraus resultierenden chemischen Verhaltens von Oxo- und Thiopeptiden. Konträr zum Resonanzmodell stehen Ergebnisse theoretischer Berechnungen (Wiberg & Breneman, 1992; Laidig & Cameron, 1996), die eine höhere Elektronendichte (geringere Delokalisation) am Stickstoff in der planaren als in der tetraedrischen Form zum Ergebnis haben, und die erhöhte Rotationsbarriere (von 66.1 kJ/mol im Formamid auf 85.9 kJ/mol im Thioformamid) über einen größeren ionischen Charakter der planaren C-N Bindung erklären. Deren Bindungslänge verringert sich in der planaren Konformation und die Bindungsstärke nimmt zu (Prasad et al., 1997). Diese Berechnungen beruhen auf einer Theorie, die eine Überlagerung von π -Effekten (Konjugation) und σ -Effekten (Polarisation) beschreibt, wobei deren Einflüsse in Abhängigkeit vom Substituenten und der untersuchten Konformation verschieden sind. So wird, diesem Modell folgend, im planaren Thioformamid mehr Ladung vom Stickstoff auf den Schwefel (und bei Rotation der C-N Bindung wieder zurück) transferiert als im Formamid vom Stickstoff auf den Sauerstoff, dessen Ladungsdichte sich bei Rotation der Amidgruppe kaum ändert (Wiberg & Rablen, 1995; Ou et al., 1994).

Nach (Abboud et al., 1993) sind Thioxocarbonyl-Derivate im Allgemeinen stärkere Basen als entsprechende Carbonyl-Derivate, wie an Hand von FTICR-spektroskopischen Messungen

und *ab initio* Berechnungen der Gasphasen-Basizitäten für Thioformaldehyd und Formaldehyd gezeigt werden konnte. Als Ursache dafür wird die höhere Polarisierbarkeit des Schwefels angesehen, die dessen geringere Elektronegativität gegenüber dem Sauerstoff überkompensieren kann. Hingegen verläuft die Basizitätserhöhung durch Substituenteneinflüsse in Carbonylverbindungen effektiver als in Thioxocarbonylverbindungen, weshalb der Schwefel der Thiopeptidbindung letztlich weniger basisch ist als der Sauerstoff der gewöhnlichen Peptidbindung. Ursachen für diesen Effekt sind einerseits die größere Energiedifferenz zwischen dem Orbital des freien Elektronenpaares des Stickstoffes und dem C=S- π -Orbital, verglichen zur Energiedifferenz zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffes und dem C=O- π -Orbital, andererseits die, durch die Elektronegativität des Stickstoffes bedingte, erhöhte Polarität der C ^{$\delta+$} -O ^{$\delta-$} und C ^{$\delta+$} -S ^{$\delta-$} Bindungen, die bei Carbonylverbindungen bereits im unsubstituierten Zustand vorhanden und nach der Substitution stärker ausgeprägt ist als bei entsprechenden Thioxocarbonylverbindungen (Abboud et al., 1993). Nach anderen, auf dem Resonanzmodell aufbauenden Befunden ist das Dipolmoment der Thioxocarbonylgruppe jedoch höher als das der Carbonylgruppe (Lumbrosco et al., 1998; Glendening & Hrabal, 1997). Trotz der geringeren Elektronegativität des Schwefels akkumuliert dieser in stärkerem Maße negative Ladung als Sauerstoff, was auf die bessere Polarisierbarkeit des Schwefelatoms zurückgeführt wird.

Ab initio Valenzbindungsberechnungen sowohl für die planare als auch für die um 90° gedrehte Konformation des Formamids bzw. Thioformamids zeigen jedoch eindeutig, daß die Resonanz zwischen den π -Elektronen der Carbonylgruppe und dem einsamen Elektronenpaar des Amidstickstoffs ein charakteristisches Merkmal der elektronischen Struktur der Amide und Thioamide ist (Lauvergnat & Hiberty, 1997). Die für die Rotation um die C-N Bindung benötigte Energie resultiert neben der Konjugation auch aus anderen Wechselwirkungseffekten, die letztlich auf der bevorzugten Orientierung des freien Elektronenpaares am Stickstoffatom senkrecht zur Molekülebene beruhen. Während die Resonanzstabilisierung beim Formamid ca. 50% des Energiebetrages der Rotationsbarriere ausmacht, sind es beim Thioformamid ca. $\frac{2}{3}$. Die höhere Rotationsbarriere um die C-N Bindung im Thioformamid beruht somit auf dem größeren Einfluß von Konjugationseffekten (Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Unabhängig vom betrachteten Modell kann allgemein gesagt werden, daß die Ladungsverschiebung im Formamid vorwiegend zwischen dem Stickstoff und dem Carbonylkohlenstoff stattfindet, was durch die Resonanzstrukturen 1 bis 3 in Abb.1 dargestellt werden kann, hingegen wird der Ladungstransfer zwischen Stickstoff und Schwefel im Thioformamid allein durch die Resonanzstrukturen 1 und 2 (vgl. Abb.1) hinreichend beschrieben (Wiberg & Rablen, 1995; Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thiopeptidbindung, die aus deren spezifischen elektronischen Eigenschaften resultieren.

Ein Kapitel widmet sich Untersuchungen zu Konformationsänderungen an Thiopeptiden, und deren Verfolgung mittels spektroskopischer Methoden, basierend auf den spezifischen spektroskopischen Eigenschaften von Thiopeptidbindungen, die eine charakteristische Bande im Bereich von 260 - 280 nm im UV/VIS und CD-Spektrum liefern.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Thioxylierung von Peptiden gute Möglichkeiten zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Konformation und biologischer Aktivität eröffnet (Angyal et al., 1985; Michel et al., 1990; Seebach et al., 1991; Lankiewicz et al., 1992; Hitotsuyanagi et al., 1996; Morita et al., 1995a,b, 1997). Eine Substitution des Sauerstoffes einer Peptidbindung durch Schwefel kann auch dann die Konformation des betreffenden Peptids ändern, wenn der substituierte Sauerstoff in der nativen Konformation nicht an der Ausprägung von HB beteiligt war. (Kessler et al., 1992).

In den hier durchgeführten Messungen wurde untersucht, inwiefern UV/VIS- und CD-Messungen im Absorptionsbereich des Thioxoamid-Chromophors zur Verfolgung dynamischer Prozesse, wie z.B. der *cis/trans* Isomerisierung in Peptiden, verwendet werden können. In Erweiterung dessen wurden Experimente zur Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes in Peptiden nach Anregung des Thioxochromophors mit UV-Licht durchgeführt.

Der Schwerpunkt im zweiten Kapitel war darauf gerichtet, Erkenntnisse über die Stabilität und das chemische Verhalten von Thiopeptiden in wäßrigen Lösungen zu gewinnen. Es wird gezeigt, daß die Thioxosubstitution am ersten bzw. zweiten Aminosäurerest eines Peptids die Reaktivität der terminalen Aminogruppe beeinflusst. Die Thioxylierung der 4-Nitroanilidbindung in Thioxoarylamiden bzw. der dieser vorausgehenden Peptidbindung in Thiopeptid-4-Nitroaniliden beeinflusst deren Empfindlichkeit gegenüber einer basisch katalysierten Hydrolyse.

Einen zentralen Schwerpunkt der biochemischen Forschung stellt die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen dar, wie sie z.B. im Rahmen von Protease-Substrat und Protease-Inhibitor Wechselwirkungen gefunden werden. Proteasen sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen. Dies beruht hauptsächlich auf ihrer großen Bedeutung bei der Regulation biologischer Prozesse, und damit einhergehend, ihrer Einbindung in viele medizinisch relevante Problemstellungen. Neben den seit vielen Jahren bekannten Funktionen bei extrazellulären Prozessen wie der Verdauung, der Immunreaktion und der Blutgerinnung

(Übersichten: Neurath, 1984, 1989; Davie et al., 1991) sind zahlreiche weitere, vor allem membrangebundene und im intrazellulären Bereich ablaufende Prozesse entdeckt und beschrieben worden (Bond & Butler, 1987). Einige Proteasen sind in der Lage, durch definierte Hydrolyseschritte membranständige Rezeptoren der G-Protein Kaskade (proteinase activated receptors, PARs) zu aktivieren (Dery et al., 1998). Caspasen umfassen eine Gruppe von Cystein-Proteasen, welche die Apoptose von Zellen auslösen können (Cohen, 1997; Schulzeosthoff et al., 1998; Mignotte & Vayssiere, 1998; Kidd, 1998). Calpaine sind Calcium-abhängige Proteasen, die an vielfältigen intrazellulären Prozessen beteiligt sind (Suzuki et al., 1995; Sorimachi et al., 1997; Carafoli & Molinari, 1998). Multikatalytische Proteinkomplexe, Proteasomen genannt, sind hauptsächlich für den intrazellulären Proteinabbau verantwortlich (Coux et al., 1996; Goldberg et al., 1997; Tanaka, 1998). Das Processing von Prä-Pro-Proteinen, das mit Transport und Reifungsprozessen verbunden ist, wird von intrazellulären Proteasen wie z.B. dem Furin und den Proprotein Convertasen (PC) vorgenommen (Rouille et al., 1995; Nakayama, 1997; Steiner, 1998). Andere Proteasen sind an der Freisetzung und Modulation der Aktivität von Peptidhormonen beteiligt, wie z.B. die Prolyl oligopeptidase und das „Angiotensin converting enzyme“ (Yaron & Naider, 1993; Cunningham & Oconnor, 1997). Eine Beteiligung proteolytischer Enzyme bei der Ausprägung ventraler und lateraler Muster bei der Ontogenese von *Drosophila* wurde von (Chasan & Anderson, 1989) beschrieben. Mit der in Antikörpern gefundenen Esteraseaktivität, deren Funktion an eine, der katalytischen Triade der Serinproteasen ähnliche, Ser-His Diade gekoppelt ist, wurde das Spektrum *in vivo* bedeutsamer proteolytischer Prozesse nochmals erweitert (Benkovic, 1992, 1996; Zhou et al., 1994; Schultz & Lerner, 1995).

Neben der Identifikation der zahlreichen *in vivo* ablaufenden Proteolyseprozesse, besteht ein weiterer Schwerpunkt der Proteasenforschung in der Aufklärung der Substratspezifität der Proteasen (Perona & Craik, 1995; Turk et al., 1998) und der dem Katalyseprozeß zugrunde liegenden Katalysemechanismen (Bender & Kezdy, 1967; Kraut, 1977; Fischer & Barth, 1981; Warshel et al., 1989; Menard & Storer, 1992; Storer & Menard, 1994; Whiting & Peticolas, 1994; Cleland & Kreevoy, 1994; Frey et al., 1994; Pinitglang et al., 1997; Paetzel & Dalbey, 1997). Zum einen sollten die aus kinetischen Daten und Kristallstrukturanalysen nativer und gentechnologisch veränderter Proteasen (Craik et al., 1987; Carter & Wells, 1988) erhaltenen Ergebnisse ein Verständnis der prinzipiellen Prozesse der enzymkatalysierten Peptidbindungshydrolyse ermöglichen, andererseits sind diese Kenntnisse Grundlage für die Erzeugung künstlicher Modulatoren spezifischer Enzymaktivitäten, die wiederum für medizinische Belange von großem Interesse sind (Laskowski & Kato, 1980; Travis & Salvesen, 1983; Shaw, 1994; Storer & Menard, 1996; Rasnick, 1996; Turk et al., 1997;

Dahlen et al., 1997; Katz et al., 1998; Whisstock et al., 1998; Lenarcic & Bevec, 1998; Estrada et al., 1998).

Ein dritter Schwerpunkt der Proteaseforschung besteht in deren Anwendung für industriell-technische Zwecke. Vor allem die enzymkatalysierte Peptidsynthese mit z.T. chemisch oder gentechnologisch modifizierten Proteasen, durchgeführt in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Kuhl et al., 1981,1982; Kise et al., 1990; Sears et al., 1994; Cerovsky & Jakubke, 1994a-c, 1996) oder unter Kryobedingungen (Jakubke, 1987; Gerisch et al., 1994; Hänsler et al., 1995; Hänsler & Jakubke, 1996a, b), eröffnet ein weites Feld für die Herstellung biologisch aktiver Peptide durch selektive, racemisierungsfreie Peptidbindungsknüpfung (Übersichten: Jakubke, 1987; Kuhl & Jakubke, 1990; Heiduschka et al., 1990; Schellenberger & Jakubke, 1991; Bongers & Heimer, 1994; Hänsler & Jakubke, 1996a, b; Jakubke et al., 1996).

Da Protein-Ligand-Interaktionen sehr komplex sind, müssen Möglichkeiten gefunden werden, die funktionellen und energetischen Beiträge einzelner Teilkomponenten getrennt zu bewerten. Zu diesem Zweck wurde ein breites Arsenal an Methoden entwickelt, wobei zwischen Verfahren zur Modifikation des Peptidrückgrates bzw. der Seitenketten unterschieden werden kann. Letzteres kann durch definierte Aminosäureaustausche innerhalb einer Polypeptidsequenz mittels ortsspezifischer Mutation (Fersht et al., 1985; Alber et al., 1987) erreicht werden. Durch Substitution mit Cys an definierten Stellen und dessen chemischer Modifikation, z.B. mit Thiolverbindungen, können unter Bildung von Disulfiden Seitenketten verändert werden (Berglund et al., 1998). Die Untersuchung des Einflusses solcher Substitutionen auf die enzymatischen Eigenschaften derart erzeugter Mutantenzyme ermöglichte es, die funktionellen Aminosäurereste von Proteasen, unabhängig von Röntgenkristallstrukturdaten, eindeutig zu bestimmen (Craik et al., 1987; Carter & Wells, 1988; Vernet et al., 1995; Brömme et al., 1996; Liang et al., 1998). Auch die Seitenketten-Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand können durch ortsspezifische Mutation einzelner Aminosäurereste moduliert werden, wobei, je nach Art der Substitution, zwischen sterischen, hydrophoben, ionischen und auf HB-Wechselwirkungen basierenden Interaktionen unterschieden werden kann (Heinz et al., 1992; Menard & Storer, 1992; Kurth et al., 1997; Qasim et al., 1997; Shinde & Inouye, 1997; Estrada et al., 1998).

Große Bedeutung im Bereich der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den Amid- und Carbonylgruppen verschiedener Aminosäurereste des gebundenen Peptids einerseits und dem Proteinrückgrat andererseits kommen den HB zu. Zur Bewertung der energetischen Einzelbeiträge definierter HB ist es notwendig, diese selektiv auszuschalten oder abzuschwächen. Auch hierzu wurden einige Verfahren entwickelt. Mittels chemischer Peptid- bzw. Proteinsynthese (Schneider & Kent, 1988; Liu et al., 1996) können einzelne

Peptidbindungen selektiv durch Ester- (Lu et al., 1997) bzw. Thiolesterbindungen (Schnolzer & Kent, 1992; Baca & Kent, 1993; Miller et al., 1998) ersetzt werden. Mit neueren Techniken wie z.B. der *in vitro* Translation (Mendel et al., 1995) können ausgewählte Aminosäurereste durch Prolin oder nichtnative N-Alkyl-Aminosäurereste (Rajarathnam et al., 1994; Cornish et al., 1995) ausgetauscht werden.

Eine weitere Möglichkeit HB-Wechselwirkungen zu modulieren besteht darin, den Sauerstoff der Peptidbindung durch ein Schwefelatom zu ersetzen. Die damit verbundenen Änderungen der chemischen Eigenschaften der Peptidbindung machen Thioxylierungen für die Untersuchung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen bei der Katalyse der Peptidbindungshydrolyse durch Proteasen interessant. Bislang liegen Untersuchungen für die Metalloproteasen Aminopeptidase P (Schutkowski et al., 1994), Angiotensin Converting Enzyme (Maziak et al., 1986), Carboxypeptidase A (Mock et al., 1981; Bartlett et al., 1982; Campbell & Nashed, 1982), Leucin-Aminopeptidase (Beattie et al., 1987; Thompson et al., 1986), für die Serinproteasen Chymotrypsin (Thompson et al., 1986; Asboth & Polgar, 1983; Unverzagt et al., 1992), Subtilisin (Asboth & Polgar, 1983, Unverzagt et al., 1992), Dipeptidylpeptidase IV (Schutkowski et al., 1994), Prolyl oligopeptidase (Polgar et al., 1993; Schutkowski et al., 1997) und die Cysteinproteasen Papaya Peptidase A, Chymopapain (beide Asboth et al., 1988) und Papain (Asboth & Polgar, 1983; Thompson et al., 1986; Asboth et al., 1988; Foje & Hanzlick, 1994) vor. Kürzlich wurden die Ergebnisse von Monothioxoamid-Substitutionen in einem Peptid, welches ein Substrat der HIV-1 Protease darstellt, publiziert (Yao et al., 1998).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die proteolytische Stabilität von Thiopeptiden bezüglich der Hydrolyse durch Serin- und Cysteinproteasen untersucht. Dabei wurden die Serinproteasen α -Chymotrypsin als Vertreter der Pankreasproteasen, Subtilisin Carlsberg als Vertreter der bakteriellen Subtilisine und die zwei, einer neuen Klasse von Serinproteasen (Rawlings et al., 1991) zugerechneten, Prolyl-spezifischen Proteasen Dipeptidylpeptidase IV (im Folgenden: DP IV) und Prolyl oligopeptidase (im Folgenden: POP) verwendet. Die zwei erstgenannten sekretorischen Proteasen, die sowohl Endo- als auch Carboxypeptidase-Aktivität aufweisen, wurden als Vertreter der Serinprotease-Klassen I (α -Chymotrypsin) und II (Subtilisin Carlsberg) (Neurath, 1984) gewählt, sie stellen vielfach verwendete Modelle der Proteaseforschung dar. Um zu prüfen, ob die dort erhaltenen Ergebnisse auch für komplexer strukturierte Proteasen gelten, wurden die unmittelbar zellgebundenen Proteaseaktivitäten der Exoprotease DP IV und der Endopeptidase POP untersucht. Die Suche nach spezifischen Aktivitätsmodulatoren ist auch wegen der großen medizinischen Bedeutung der zwei letztgenannten Proteasen von großem Interesse. Die für

die Serinproteasen erzielten Ergebnisse wurden mit denen, die für Papain als Vertreter der Cysteinproteasen erhalten wurden, verglichen.

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen beschränken sich weitgehend auf Derivate, deren zu hydrolysierende Bindung thioxyliert ist. Als Abgangsgruppe diente in der Regel ein Ester oder chromogenes Amid (4-Nitroanilid, Naphtylamid). Derartige Abgangsgruppen sind wegen der elektronenziehenden Wirkung des Sauerstoffes der Ester bzw. wegen der konjugierten π -Elektronensysteme der chromogenen Amide aktiviert (Foje & Hanzlick, 1994), und widerspiegeln nicht die Situation einer „echten“, d.h. zwei native Aminosäurereste verbindenden, thioxylierten Peptidbindung.

In den hier durchgeführten kinetischen Untersuchungen wurde der Einfluß der Thioxylierung sowohl für Verbindungen, deren zu hydrolysierende Bindung modifiziert war, als auch für solche mit thioxylierten Sekundärbindungsstellen unter Verwendung von Standardsubstraten und deren monothioxylierten Derivaten untersucht.

Die untersuchten Sekundärbindungsstellen reichten, je nach Protease und Substrat, von den Positionen P_2 bis P_4 , im Falle der Prolyloligopeptidase wurde auch P_1' untersucht. Bei der Bewertung des Einflusses der Thioxylierung der P_1 -Position wurde zwischen Verbindungen mit einer aktivierten Abgangsgruppe und nichtaktivierten Derivaten unterschieden. Für Erstere wurden Thioxoarylamide mit dem 4-Nitroanilidrest in P_1' -Position gewählt, letztere trugen dort einen proteinogenen Aminosäurerest.

Die Verwendbarkeit der dabei erhaltenen Ergebnisse für eine kinetisch kontrollierte enzymatische Thioxo-peptidsynthese wurde in einem weiteren Kapitel untersucht.

Neben den Wechselwirkungen von Thioxo-peptiden mit Proteasen wurde auch deren Verhalten gegenüber der (rekombinat gewonnenen) cytosolischen Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18 (im Folgenden: rhCyp18) untersucht. Die Rotationsbarriere um die C-N Bindung ist, im Vergleich zur Oxo-Peptidbindung, in der Thioxo-Peptidbindung um ca. 12 kJ/mol erhöht (Piccini-Leopardi et al., 1977; Schutkowski et al., 1994; 1995). Die Isomerisierung der -Xaa- ψ [CS-N]-Pro- Bindung kann durch rhCyp18 nicht beschleunigt werden, obwohl dieses Thioxo-peptide mit den entsprechender Oxo-Peptide vergleichbaren Affinitäten bindet (Schutkowski et al., 1995). Die in Folge der Thioxylierung veränderten chemischen Eigenschaften von Peptidyl-Prolyl-Peptidbindungen waren Anlaß für Untersuchungen zum Katalysemechanismus des rhCyp18.