

## 2. Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Thiopeptidderivaten

### 2.1. UV/VIS und CD-spektroskopische Untersuchungen an Thiopeptiden

Die Peptidbindung stellt in der UV/VIS Spektroskopie einen Chromophor dar, der hauptsächlich auf  $\pi$ - $\pi^*$  Übergänge zurückzuführen ist (Galla, 1988). Voraussetzung für den Erhalt eines CD-Signals von Aminosäurederivaten und Peptiden ist das Vorhandensein asymmetrischer  $C_\alpha$ -Substituenten auf beiden Seiten der an sich planaren und somit nicht CD-aktiven Peptidbindung (Übersicht: Johnson, 1995). Untersuchungen an N-Acetyl-alanin-N'-methylamid und Dipeptid-Diketopiperazinen zeigten, daß Banden im Bereich um 195 nm  $\pi$ - $\pi^*$  Übergängen zuzuordnen sind, während Banden zwischen 210 und 220 nm  $n$ - $\pi^*$  Übergänge repräsentieren. CD-Banden unterhalb von 190 nm werden auf  $\sigma$ - $\sigma^*$  bzw.  $n$ - $\sigma^*$  Übergänge zurückgeführt.

Die Substitution des Sauerstoffes der Carbonylgruppe durch Schwefel bewirkt eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima (Brown et al., 1982, Maciejewski & Steer, 1993). Thioxoamidbindungen besitzen ein Absorptionsmaximum im Bereich zwischen 250 und 280 nm, das auf  $\pi$ - $\pi^*$  Übergänge des Thioxoamidchromophors zurückzuführen ist (Sugawara et al., 1977; Milewska et al., 1997). N-Methyl-thioxoacetamid, ein einfaches Modell für eine Thioxoamid-Bindung, besitzt in wäßriger Lösung neben der Hauptbande bei 256 nm ( $\epsilon$ : 12 400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) noch eine Schulter bei 315 nm ( $\epsilon$ : 60 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), die, in Analogie zu Untersuchungen am Thioxoacetamid (Barrett & Dehaidy, 1975), auf einen  $n_s$ - $\pi^*$  Übergang zurückgeführt wird, wobei  $n_s$  die nichtbindenden Orbitale des Schwefelatoms bezeichnet (Ataka et al., 1984; Kato et al., 1984). Keine klare Zuordnung existiert für das Maximum bei 204 nm, ein möglicher  $n$ - $\sigma^*$  Übergang wird diskutiert (Kajtar et al., 1986).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde zunächst das Dipeptid Ala-Pro mit dem entsprechenden Thioxodipeptid Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro verglichen. Letzteres besitzt als potentiell chromogene Gruppe nur die thioxylierte Peptidbindung, so daß gemessene Effekte eindeutig zugeordnet werden können. Außerdem ist der Extinktionskoeffizient der Thioxoamidgruppe im Vergleich zu den Extinktionswerten im Bereich zwischen 200 und 220 nm bei dieser Verbindung sehr hoch (vgl. Abb. 2 und 3, Tab. 1), so daß sowohl bei UV/VIS- als auch CD-Messungen gute Meßsignale erhalten werden. Bei längeren Peptiden kommt hier die Absorption der nichtthioxylierten Peptidbindungen (und eventuell vorhandener aromatischer Seitenketten) noch hinzu, so daß sich das Absorptionsverhältnis zu Ungunsten der Thioxoamidbande verschiebt (vgl. Abb.5).

Xaa-Pro Dipeptide besitzen in wäßriger Lösung einen definierten Anteil des *cis*-Isomers, der in Abhängigkeit vom Protonierungszustand des Carboxylsäurerestes variiert. Der erhöhte *cis*-Gehalt des C-terminal deprotonierten Ala-Pro ist auf eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Carboxylatsauerstoff und dem Carbonylsauerstoff des Ala zurückzuführen (Grathwohl &

Wütrich, 1976a). Die Isomerisierung der Peptidbindung kann mittels NMR (Grathwohl & Wütrich, 1976a, b 1981) und über Isomerentrennung mittels Tieftemperatur-Kapillarelektrophorese (Thuncke et al., 1996) verfolgt werden.

In den hier durchgeführten Messungen wurden nicht nur differente Spektren für die *cis* und *trans* Formen gefunden, die einzelnen Isomere zeigten auch in Abhängigkeit vom Protonierungszustand ihrer Carboxylgruppe unterschiedliche Eigenschaften sowohl in UV/VIS als auch CD-spektroskopischen Messungen (vgl. Abb.2). Während die UV/VIS-Spektren beider Verbindungen und das CD-Spektrum von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro vor und nach einem definierten pH-Sprung wegen der niedrigen Isomerisierungsgeschwindigkeit bei 10°C direkt gemessen werden konnten, mußte für die CD-Messungen am Ala-Pro eine andere Methode gewählt werden, da der Zeitaufwand für die Datenaufnahme hier größer ist, und die beginnende Isomerisierung die Spektren verfälschen würde. Durch kinetische Messung der zeitabhängigen Isomerisierung bei einer definierten Wellenlänge und Beginn der Datenaufnahme zum Zeitpunkt  $t$  kann aus der I. Ordnungsregression der Meßdaten der Wert für  $t_0$  berechnet werden. Durch Auftragung mehrerer  $t_0$ -Werte gegen die entsprechenden Wellenlängen kann durch Interpolation das Spektrum von Ala-Pro, das dessen Eigenschaften nach dem pH-Sprung aber vor der Isomerisierung widerspiegelt, ermittelt werden. Aus den bei einem bestimmten pH-Wert gemessenen Mischspektren von Lösungen mit verschiedenem und genau bekanntem *cis/trans* Verhältnis können die Spektren der reinen Isomere über ein Gleichungssystem gemäß

$$0.9 \times trans + 0.1 \times cis = \text{Spektrum I}$$

$$0.55 \times trans + 0.45 \times cis = \text{Spektrum II}$$

berechnet werden (vgl. Abb.3). Aus den rechnerisch ermittelten Spektren wurden die Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten ermittelt (vgl. Tab.1).

Das UV/VIS Absorptionsspektrum des Ala-Pro zeigt die erwarteten  $\pi$ - $\pi^*$  Übergänge bei 201 nm (pH 2) bzw. 203 nm (pH 7.5). Neben der bathochromen Verschiebung der Spektren des Zwitterions um 2 nm findet man unabhängig vom pH-Wert um ca. 10% erhöhte Extinktionskoeffizienten der *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren. Die *cis*- und *trans*-UV/VIS-Spektren bei pH 7.5 weisen zusätzlich ein lokales Minimum bei 191 nm auf, das in den CD-Messungen am Ala-Pro als Maximum bei 194 (*trans*) bzw. 195 nm (*cis*) erscheint.

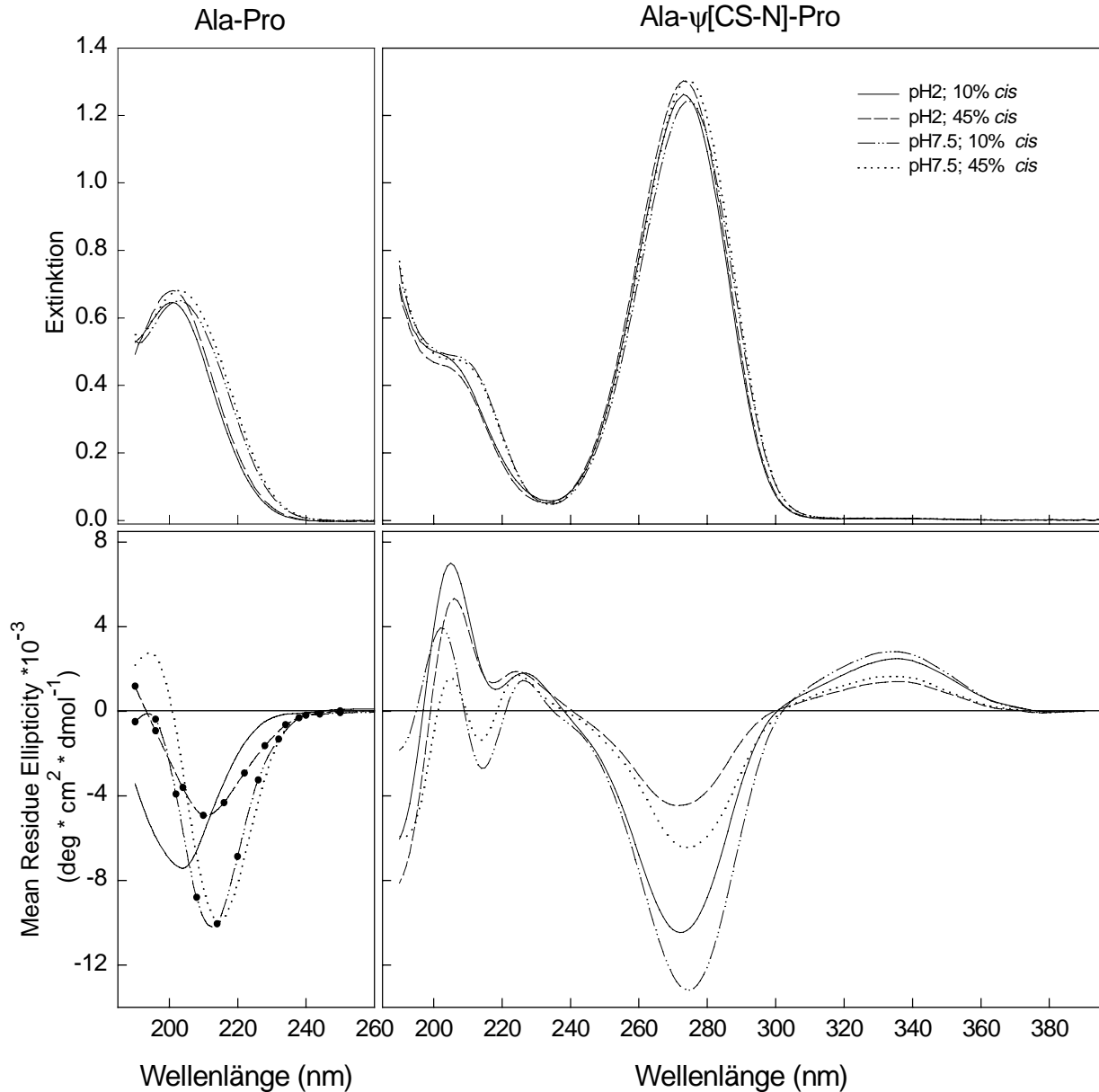


Abb.2: Gemessene UV/VIS- (oben) und CD-Spektren (unten) des Dipeptids Ala-Pro (links) und des Thioxodipeptids Ala-ψ[CS-N]-Pro (rechts). Die Messungen erfolgten in 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 2 bzw. pH 7.5. 20 mM Stammlösungen (im Isomerisierungsgleichgewicht) beider Verbindungen im jeweiligen Puffer (pH korrigiert) wurden 1:20 in den Meßansatz verdünnt. Bei Messung der Spektren im Isomerisierungsgleichgewicht wurde in den gleichen Puffer verdünnt, in dem sich die Stammlösung befand, bei den pH-Sprung Experimenten wurde in den jeweils anderen Puffer verdünnt. Die CD-Spektren für Ala-Pro im Isomerisierungsungleichgewicht wurden durch Interpolation einzelner Meßpunkte ermittelt, die aus kinetischen Daten der zeitabhängigen Isomerisierung abgeleitet wurden (Erläuterungen im Text). Folgende Meßbedingungen wurden gewählt: T: 10°C, d = 1 mm, c: 1 mM. CD: scan speed: 200 nm/min, response: 0.5 s, 12 Akkumulationen, Rauschunterdrückung durch Fourier-Transformation, zeitabhängige CD-Messungen: Datenintervall 5s, response: 1s.

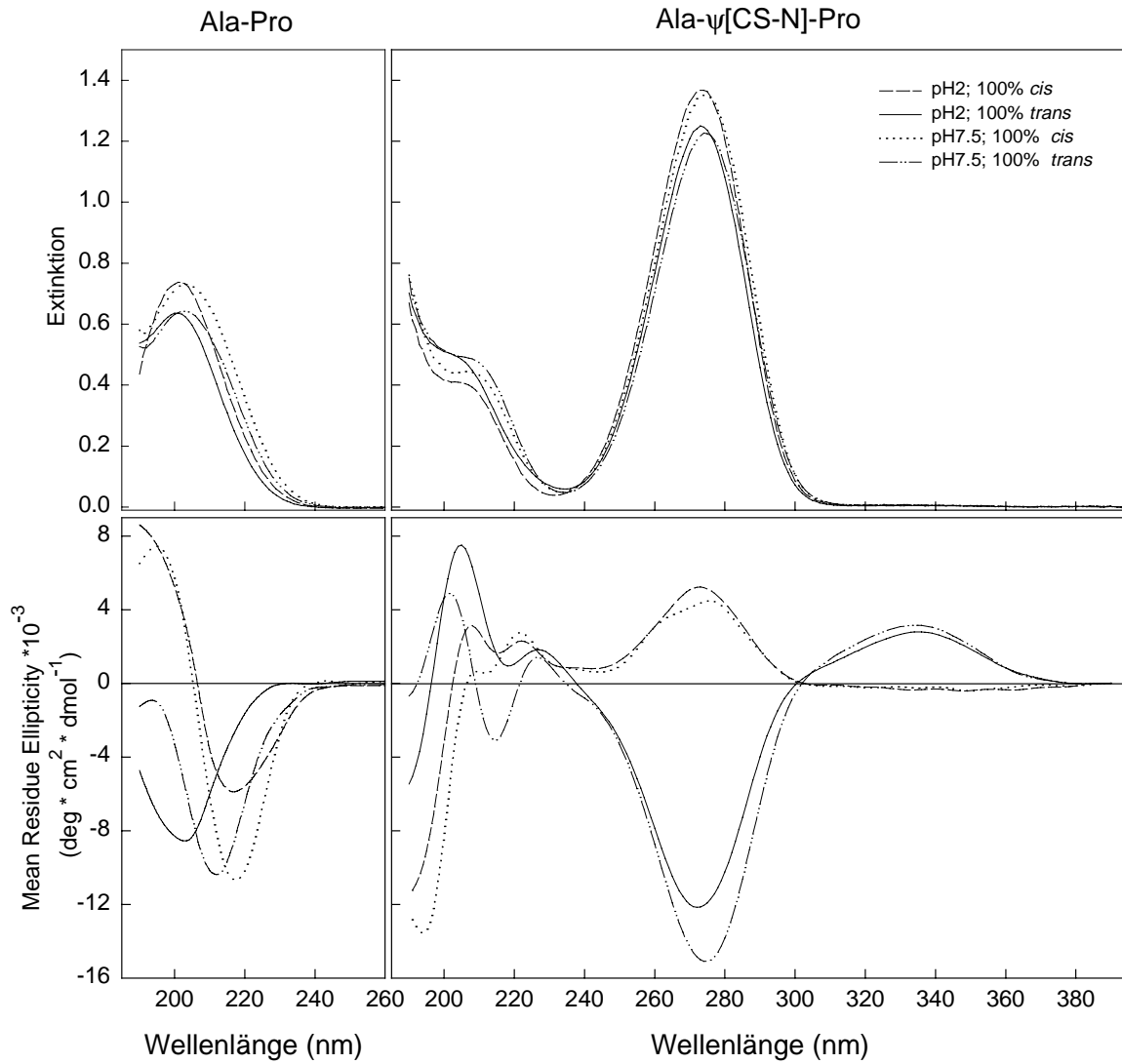


Abb.3: Berechnete UV/VIS- (oben) und CD-Spektren (unten) des Dipeptids Ala-Pro (links) und des Thioxodipeptids Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro (rechts). Erläuterungen im Text.

Isomer		UV/VIS $\lambda$ (nm), $\epsilon$ (cm <sup>2</sup> /mmol)		CD $\lambda$ (nm), $\epsilon$ (cm <sup>2</sup> /mmol)					
<i>trans</i> , pH 2	O	201 <sub>6361</sub>		203 <sub>-8510</sub>					
	T	<sup>a</sup> 208 <sub>4490</sub>	273 <sub>12505</sub>	208 <sub>6332</sub>	218 <sub>936</sub>	227 <sub>1817</sub>	272 <sub>-1271</sub>	335 <sub>2789</sub>	
<i>cis</i> , pH 2	O	201 <sub>7374</sub>		216 <sub>-5880</sub>					
	T	<sup>a</sup> 208 <sub>3928</sub>	273 <sub>13666</sub>	208 <sub>3127</sub>	215 <sub>1642</sub>	222 <sub>2290</sub>	273 <sub>5219</sub>	335 <sub>-368</sub>	
<i>trans</i> , pH 7.5	O	191 <sub>5209</sub>	203 <sub>6426</sub>	194 <sub>-960</sub>	212 <sub>-10380</sub>				
	T	<sup>a</sup> 213 <sub>4351</sub>	274 <sub>12264</sub>	202 <sub>4885</sub>	215 <sub>-309</sub>	227 <sub>1395</sub>	275 <sub>-15105</sub>	334 <sub>3147</sub>	
<i>cis</i> , pH 7.5	O	191 <sub>5641</sub>	203 <sub>7308</sub>	195 <sub>7440</sub>	217 <sub>-10680</sub>				
	T	<sup>a</sup> 213 <sub>3975</sub>	274 <sub>13509</sub>	194 <sub>-13588</sub>	209 <sub>639</sub>	212 <sub>560</sub>	222 <sub>2728</sub>	276 <sub>4461</sub>	334 <sub>-258</sub>

Tab.1: Berechnete Extrema der UV/VIS- und CD Spektren des Dipeptids Ala-Pro (O) und des Thioxodipeptids Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro (T). <sup>a</sup> kennzeichnet eine Schulter.

Die  $\pi$ - $\pi^*$  Übergänge hingegen erscheinen im CD-Spektrum als Minima, auch hier sind die *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren (bei gleichem pH-Wert) bathochrom verschoben.

Im UV/VIS-Spektrum von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro beobachtet man im Bereich zwischen 190 und 230 nm die Flanke einer Bande, die bei 208 nm (pH 2) bzw. 213 nm (pH 7.5) eine Schulter aufweist. Es handelt sich hier wahrscheinlich um bathochrom verschobene  $\sigma$ - $\sigma^*$  bzw.  $n$ - $\sigma^*$  Übergänge, deren Absorptionsmaxima beim unsubstituierten Dipeptid unterhalb von 180 nm liegen (Johnson, 1995). Der gleiche Wellenlängenbereich weist im CD-Spektrum drei, im Falle des zwitterionischen *cis*-Isomers von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro sogar 4 unterschiedlich stark ausgeprägte und sich überlagernde Extrema auf. Korrelationen zwischen Lage und Intensität der Banden, Protonierungszustand und Isomerenstatus können hier nicht getroffen werden.

Die Hauptabsorption des  $\pi$ - $\pi^*$  Überganges des Thioxodipeptids liegt im Bereich von 272 bis 276 nm, im CD-Spektrum bilden nur die beiden *trans*-Formen, analog zum Ala-Pro, Minima, die berechneten Spektren der *cis*-Isomere erscheinen als Maxima (vgl. Abb.3). Im UV/VIS Spektrum sind die zwitterionischen Isomere (pH 7.5) gegenüber der kationischen Form (pH 2) um 1 nm bathochrom verschoben. Bei gleichem pH-Wert zeigen die *cis*-Isomere um ca. 9 % höhere Extinktionskoeffizienten als die entsprechenden *trans*-Formen. Sehr viel größere Differenzen der Extinktionskoeffizienten findet man bei Vergleich der CD-Signale der Isomere von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro. Unter Beachtung der Umkehrung des Vorzeichens von  $\epsilon$  ergibt sich rechnerisch eine Signaländerung für die *cis*  $\rightarrow$  *trans* Isomerisierung von 330 % (pH 2) bzw. 440 % (pH 7.5) und von 140 % (pH 2) bzw. 130 % (pH 7.5) bei Isomerisierung in der entgegengesetzten Richtung. Die CD-Signale der Hauptbande des Thioxodipeptids sind bei der zwitterionischen Form gegenüber dem Signal bei pH 2 um 3 nm bathochrom verschoben, des weiteren wird eine zusätzliche bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren (bei gleichem pH-Wert) um 1 nm gefunden. Das dem  $n$ - $\pi^*$  Übergang zugeordnete Maximum des CD-Spektrums bei 335 nm (pH 2) bzw. 334 nm (pH 7.5) wird im UV/VIS-Spektrum nicht gefunden.

Für Thioxo-peptide ist bekannt, daß sie in wäßrigen Lösungen ca. 100-fach langsamer isomerisieren als die entsprechenden Oxo-Peptide (Schutkowski et al., 1995). Für das Thioxodipeptid Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro konnte eine sehr langsame Isomerisierung (vgl. Tab.2) nach einem pH-Sprung von pH 2 (10 % *cis*) auf pH 7.5 (45 % *cis*) mittels NMR und durch Isomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese gemessen werden. Die Halbwertszeit (HWZ) der Isomerisierung der Thioxoamid-Bindung von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro in wäßriger Lösung beträgt bei 20°C ca. 16 Stunden. Um diese in einem vernünftigen Zeitrahmen messen zu können, wurde die *cis/trans* Isomerisierung in wäßrigen Lösungen bei Temperaturen zwischen 40 und 60°C

verfolgt. An dieser Stelle sei angemerkt, daß das verwendete Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro bei Inkubationstemperaturen bis 60°C keine Zersetzungsreaktionen zeigte. Die in Analogie zu der bei Dipeptid-Derivaten häufig beobachteten Bildung von Diketopiperazin-Derivaten möglicherweise stattfindende Bildung von Thioxo-keto-piperazin-Derivaten wurde bei massespektrometrischer Analyse der zuvor bis auf 60°C erhitzten Proben nicht gefunden.

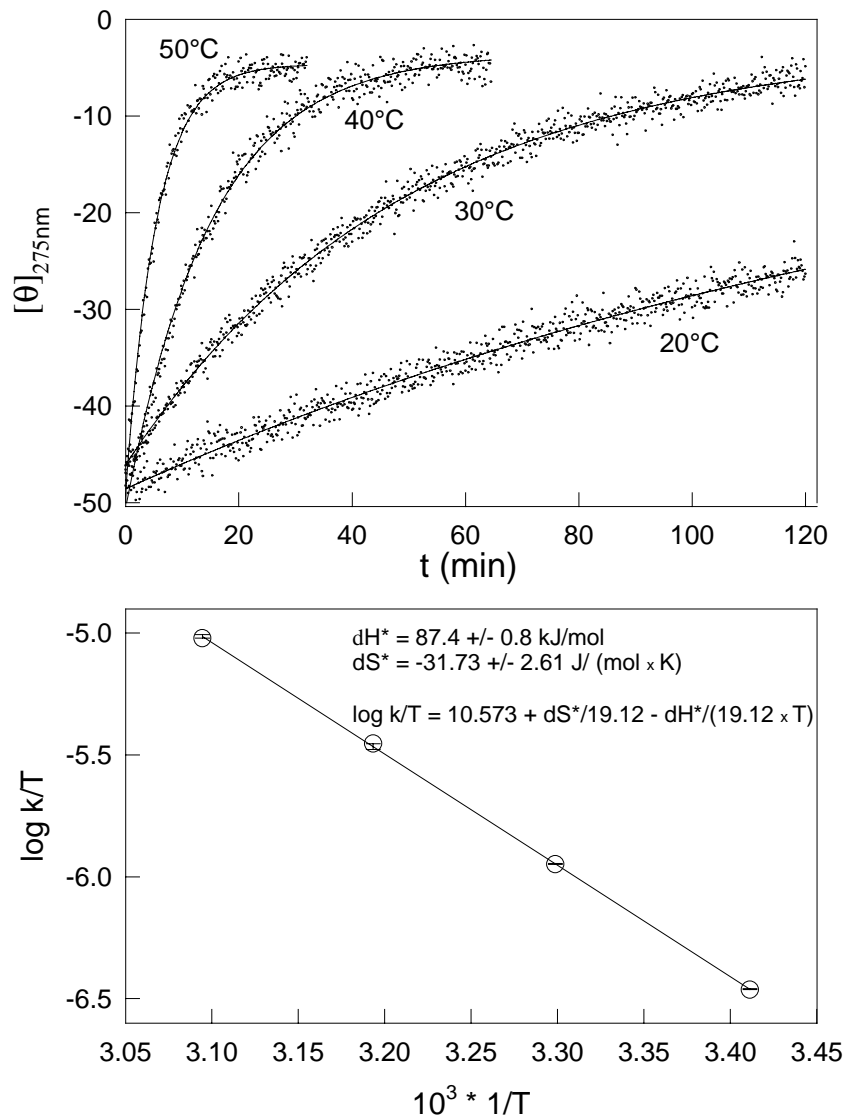


Abb.4: oben: Zeitabhängigkeit der Isomerisierung von Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro nach einem kombinierten pH- und Lösungsmittelsprung. Dazu wurde 1 Volumen Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro (20 mM in Natriumphosphatpuffer, pH 2) mit 1 Volumen 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 und 8 Volumen Trifluorethanol (TFE) verdünnt. Die Endkonzentration Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro betrug 2 mM. Die Daten wurden bei 275 nm und Temperaturen von 20, 30, 40 und 50°C aufgenommen. unten: Eyring-Diagramm der I.Ordnungskonstanten  $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$ , die aus  $k_{\text{obs}}$  abgeleitet wurden (s.Text).

Wie hier erstmals gezeigt, kann der durch einen pH-Sprung bzw. kombinierten pH- und Lösungsmittelsprung ausgelöste *cis/trans* Isomerisierungsprozeß des Thioxodipeptids Ala-ψ[CS-N]-Pro durch CD-spektroskopische Messungen direkt verfolgt werden, die Verschiebung des *cis*-Gehaltes korreliert mit definierten Änderungen der CD-Signale der  $\pi$ - $\pi^*$  bzw.  $n_s$ - $\pi^*$  Übergänge (vgl. Abb.4). Letztere reflektieren bei kinetischen Messungen in gleichem Maße die *cis/trans* Isomerisierung wie das Hauptsignal der Thiopeptidbindung. Die im Zuge des Isomerisierungsprozesses meßbaren Änderungen der CD-Signale sind reversibel, bei Rückstellen des pH-Wertes wird der Anfangswert wiedererreicht. Durch parallele NMR-Analyse und kapillarelektrophoretische Messungen entsprechender Proben wurde sichergestellt, daß die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen tatsächlich den jeweiligen Isomerisierungsprozeß widerspiegeln (G.Scherer, nichtpublizierte Daten). Die Isomerisierung kann in einer zeitabhängigen Messung bei einer Wellenlänge von 272 nm (pH 2) bzw. 275 nm (pH 7.5) verfolgt werden, man erhält einen Kurvenverlauf, der dem einer I.Ordnungsreaktion folgt. Die daraus berechnete Geschwindigkeitskonstante, im Folgenden als  $k_{\text{obs}}$  bezeichnet, setzt sich additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$  und  $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$  zusammen. Im Gleichgewicht der Isomerisierung gilt weiterhin:

$$k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} \times [\text{cis}] = k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} \times [\text{trans}]. \quad (\text{I})$$

Da die Konzentrationen der [*cis*] und [*trans*]-Konformere von Ala-ψ[CS-N]-Pro mittels Kapillarelektrophorese oder NMR-Messungen getrennt ermittelt werden können, kann Gleichung (I) umgestellt und in Gleichung (II)

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} + k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} \quad (\text{II})$$

eingesetzt werden, wodurch eine der zwei Teilkonstanten substituiert, und die jeweils andere über  $k_{\text{obs}}$  berechnet werden kann. Die Durchführung der Messungen bei verschiedenen Temperaturen lieferte verschiedene Geschwindigkeitskonstanten der I.Ordnungsreaktion (vgl. Abb.4). Um die Relevanz der so ermittelten Daten zu prüfen, wurden die CD-spektroskopisch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten mit den aus NMR-Messungen und der zeitabhängigen kapillarelektrophoretischen Isomerentrennung abgeleiteten  $k_{\text{obs}}$ -Werten verglichen. Die Meßwerte waren innerhalb der Fehlergrenze identisch.

Die Auftragung dieser Konstanten im Eyring-Diagramm ermöglicht eine lineare Regression der Meßdaten, und somit die Ermittlung der Aktivierungsenthalpie und der Aktivierungsentropie der Isomerisierungsreaktion. Die freie Aktivierungsenthalpie ist über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung gemäß  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$  zugänglich.

Isomerisierung (Medium)	<i>cis</i> (%) (final)	$k_{I,Ordnung}$ (40°C) (s <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta S^\ddagger$ [J/(mol*K)]	$\Delta G^\ddagger$ (40°C) [kJ/mol]
<i>cis</i> → <i>trans</i> 10 mM P <sub>i</sub> ; pH2 <sup>a</sup>	9.8	$2.70 \cdot 10^{-4}$	$89.56 \pm 1.53$	$-32.2 \pm 2.75$	99.64
<i>trans</i> → <i>cis</i> 10 mM P <sub>i</sub> ; pH7.5 <sup>b</sup>	44.3	$0.67 \cdot 10^{-4}$	$91.05 \pm 0.84$	$-38.88 \pm 2.60$	103.23
<i>trans</i> → <i>cis</i> P <sub>i</sub> +TFE; pH7.5 <sup>c</sup>	60.6	$6.67 \cdot 10^{-4}$	$87.40 \pm 0.80$	$-31.73 \pm 2.61$	97.34

Tab.2: *cis*-Gehalte, Geschwindigkeitskonstanten und berechnete Aktivierungsparameter der Isomerisierungsreaktionen von Ala-ψ[CS-N]-Pro nach einem pH-Sprung bzw. kombiniertem pH- und Lösungsmittelsprung. <sup>a</sup>pH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer (P<sub>i</sub>), pH 7.5 auf pH 2 durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure. <sup>b</sup>pH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2 auf pH 7.5 durch Zugabe von 1 M NaOH. <sup>c</sup>1 Volumen Ala-ψ[CS-N]-Pro (20 mM in H<sub>2</sub>O/Trifluoressigsäure, pH 2) wurde mit 1 Volumen 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 und 8 Volumen Trifluoethanol (TFE) verdünnt. Die Endkonzentration Ala-ψ[CS-N]-Pro betrug in allen Meßansätzen 2 mM. Die *cis*-Gehalte wurden durch kapillarelektrophoretische Isomerentrennung und Integration der Peakflächen bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  wurden durch CD-Messungen bei  $\lambda$ :275 nm und Temperaturen von 40, 50 und 60°C (<sup>a,b</sup>) bzw. 20, 30, 40 und 50°C (<sup>c</sup>) ermittelt, und in die jeweiligen Einzelkonstanten  $k_{cis \rightarrow trans}$  bzw.  $k_{trans \rightarrow cis}$  umgerechnet (s.Text).

	Isomerisierung (Medium)	$\Delta H^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta S^\ddagger$ [J/(mol*K)]	$\Delta G^\ddagger$ (40°C) [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (40°C) [kJ/mol]
Ala-Pro*	<i>cis</i> → <i>trans</i>	$83.00 \pm 1.17$	$-2.00 \pm 0.01$	83.63	
Ala-ψ[CS-N]-Pro	10 mM P <sub>i</sub> ; pH2 <sup>a</sup>	$89.56 \pm 1.53$	$-32.20 \pm 2.75$	99.64	16.01
Ala-Pro*	<i>trans</i> → <i>cis</i>	$90.90 \pm 1.40$	$16.00 \pm 0.40$	85.89	
Ala-ψ[CS-N]-Pro	10 mM P <sub>i</sub> ; pH7.5 <sup>b</sup>	$91.05 \pm 0.84$	$-38.88 \pm 2.60$	103.23	17.34

Tab.3: Aktivierungsparameter der Isomerisierungsreaktionen von Ala-Pro und Ala-ψ[CS-N]-Pro nach einem pH-Sprung. <sup>a</sup>pH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer (P<sub>i</sub>), pH 7.5 auf pH 2 durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure. <sup>b</sup>pH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2 auf pH 7.5 durch Zugabe von 1 M NaOH. Die Berechnung der Daten erfolgte wie im Text beschrieben. \*Meßdaten übernommen von S. Füssel (nichtpublizierte Daten).

Weiterhin wurden die für die *trans*→*cis* Isomerisierung von Ala-ψ[CS-N]-Pro erhaltenen Werte für  $\Delta G^\ddagger$  mit denen, die mittels NMR (G.Scherer, nichtpublizierte Daten) für das Dipeptid Ala-Pro ermittelt wurden, verglichen (vgl.Tab.3). Es zeigt sich, daß die Erhöhung der Rotationsbarriere um die Thioxoamidbindung weitgehend auf die negativen Werte für die



Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  zurückzuführen ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen, die bei der Untersuchung anderer Thioxo-peptid-Derivate erzielt wurden (Schutkowski et al., 1994, 1995). Die Differenzen der freien Aktivierungsenthalpien zwischen Thioxo- und Oxo-Dipeptid sind mit  $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werten von 16-17 kJ/mol um ca. 4 kJ/mol höher als die aus den Aktivierungsparametern für die Paare Ala-Pro-NH-Np / Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro-NH-Np ( $\Delta\Delta G^\ddagger_{40^\circ\text{C}} = 12.9$  kJ/mol) und Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np / Ala-Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np ( $\Delta\Delta G^\ddagger_{40^\circ\text{C}} = 12.2$  kJ/mol) abgeleiteten Werte (Schutkowski et al., 1994, 1995). Die zum Vergleich herangezogenen Derivate besitzen, im Gegensatz zu den hier untersuchten Dipeptiden, keine freie Carboxylgruppe, deren Protonierung und Deprotonierung die pH-abhängige Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes bedingt, und die wahrscheinlich auch die Höhe der Rotationsbarriere um die Thioxoamidbindung beeinflusst.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tetrapeptid-4-nitroanilid Derivate besitzen charakteristische UV/VIS Absorptionsspektren (vgl. Abb.5). Einerseits liefert die gebundene 4-Nitroanilidgruppe einen charakteristischen Chromophor im Bereich um 315 nm (Abb.5a), im Falle thioxylierter Derivate kommt die Absorption der Thioxoamidbindung noch hinzu.

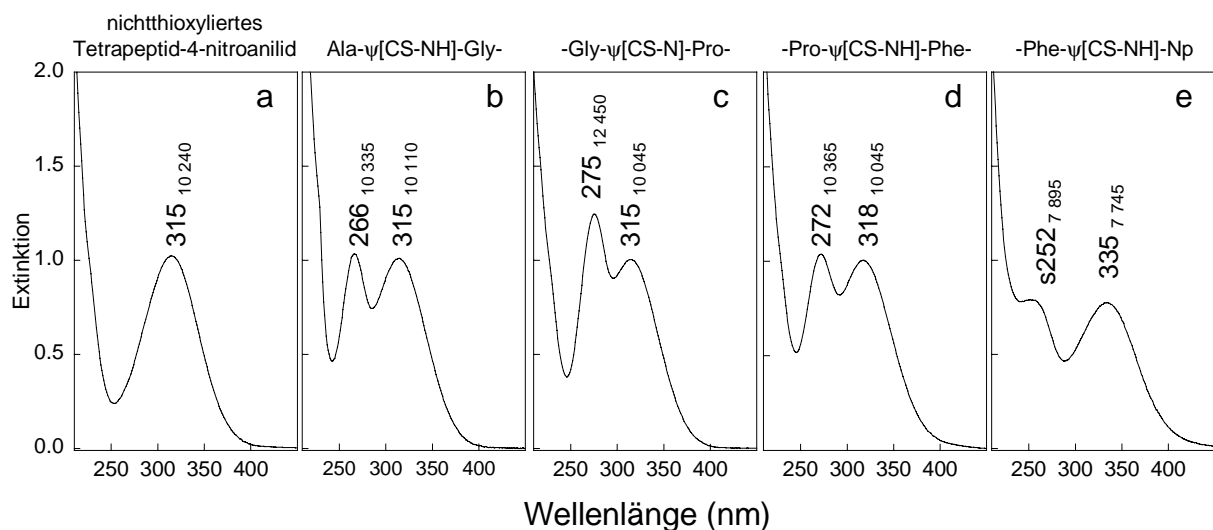


Abb.5: UV/VIS-Spektren von Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np (a) und dessen vier monothioxylierten Derivaten (b-e). Die Zahlenwerte geben das Absorptionsmaximum der jeweiligen Bande an, die tiefgestellten Zahlen den Extinktionskoeffizienten. s kennzeichnet eine Schulter im Spektrum des Thioxoarylamides Ala-Gly-Pro-Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np (e). Die Meßdaten wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 bei 10°C (c: 0.1 mM, d = 1 cm) im Wellenlängenbereich von 210 bis 450 nm aufgenommen.

Sind die beiden Chromophore durch mindestens eine Peptidbindung getrennt, überlagern sich die einzelnen spektralen Komponenten weitgehend unabhängig voneinander im Gesamtspektrum

(Abb. 5b –5d). Die Einbindung einer tertiären Aminogruppe im Derivat Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np, bewirkt eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten der Thiooxopeptidbindung um ca. 20 %. Die direkte Verknüpfung der Thiooxopeptidbindung mit dem 4-Nitroanilidrest im Thioxoarylamid Ala-Gly-Pro-Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np führt zu einer bathochromen Verschiebung des 4-Nitroanid-Chromophors, während das Signal der Thiooxopeptidbindung nur noch als Schulter bei 252 nm erscheint (Abb.5e).

Im nächsten Schritt wurden die Untersuchungen zur CD-spektroskopischen Meßbarkeit der *cis/trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung auf die Verbindung Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np ausgedehnt. Diese besitzt in Abhängigkeit vom Lösungsmittel unterschiedliche *cis*-Gehalte (33% in DMSO, 14% in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5), die *cis/trans* Isomerisierung der Thiooxopeptidbindung verläuft ca. 100-fach langsamer als beim nichtthioxylierten Derivat ( $k_{10^\circ\text{C}}$ :  $7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; HWZ: 2.75 h) (Schutkowski et al., 1995), und kann mit einem proteasegekoppelten Test (Fischer et al., 1984) direkt verfolgt werden.

Das CD-Spektrum von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np (vgl. Abb.6) ist dem des zuvor untersuchten Thioxodipeptids Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro vergleichbar, der im UV/VIS-Spektrum eine charakteristische Absorptionsbande liefernde 4-Nitroanilidrest zeigt kein CD-Signal. Die in Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 gemessene Probe (14 % *cis*) liefert wiederum intensivere Banden im Bereich der  $\pi$ - $\pi^*$  (274 nm) und  $n_s$ - $\pi^*$  (346 nm) Übergänge als die Probe, die unmittelbar nach 1:100 Verdünnung aus DMSO in Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 gemessen wurde und noch das *cis/trans* Verhältnis der DMSO-Lösung aufweist (33 % *cis*). Aus den gemessenen Mischspektren können die Spektren der reinen Isomere berechnet werden. Auch hier besitzt das Absorptionsspektrum des *cis*-Isomers umgekehrte Vorzeichen im Bereich der  $\pi$ - $\pi^*$  (277 nm) und  $n_s$ - $\pi^*$  Übergänge, verglichen zum Spektrum des *trans*-Isomers. Das berechnete Signal bei 334 nm ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Die *cis/trans* Isomerisierung kann bei 1:100 Verdünnung von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np aus einer DMSO-Stammlösung in Natriumphosphatpuffer in einer zeitabhängigen Messung bei 274 nm verfolgt werden (vgl. Abb.6). Der aus  $k_{\text{obs}}$  abgeleitete Wert für  $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$  war innerhalb der Fehlergrenze identisch dem unter gleichen Meßbedingungen im proteasegekoppelten Test parallel bestimmten Wert für  $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ .

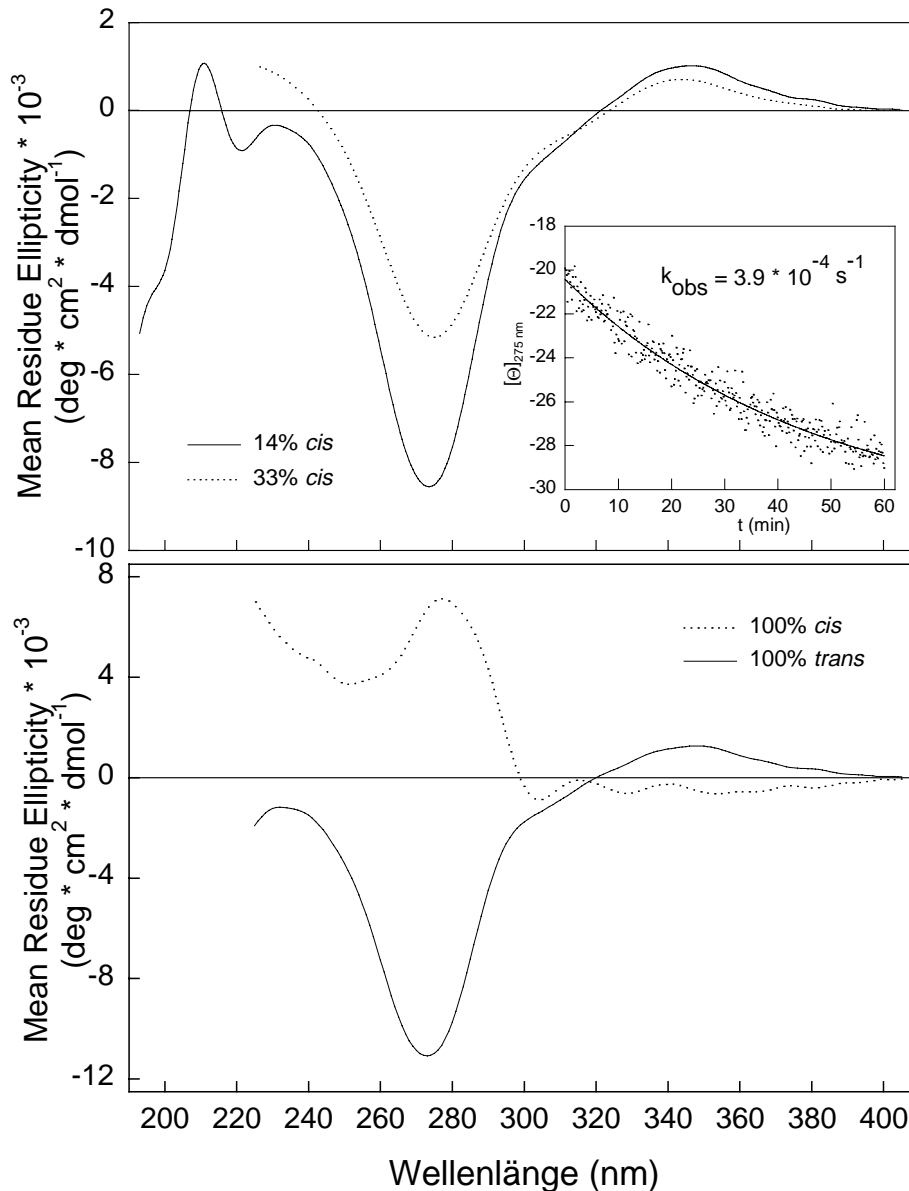


Abb.6: oben: CD-Spektren von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (—) im Gleichgewicht der Isomerisierung (14 % *cis*; 3 Maxima:  $\lambda_{\epsilon}$ : 211<sub>1070</sub>, 230<sub>340</sub> und 346<sub>1015</sub> nm; 2 Minima:  $\lambda$ : 221<sub>-910</sub>, 274<sub>-850</sub> nm) und unmittelbar nach 1:100 Verdünnung einer DMSO-Stammlösung in Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (•••••), diese Probe besitzt noch den *cis*-Gehalt der DMSO-Stammlösung (33 % *cis*; Maximum:  $\lambda_{\epsilon}$ : 344<sub>760</sub>, Minimum: 275<sub>-5160</sub> nm). Meßbedingungen: 20°C, c: 0.5 mM, d: 1 mm. Meßbedingungen: Datenintervall: 190-390 nm, DMSO-haltige Lösungen: 220-390 nm, CD: scan speed: 100 nm/min, response: 0.5 s, 16 Akkumulationen, Rauschunterdrückung durch Fourier-Transformation. eingefügte Abb.: Zeitabhängigkeit der Isomerisierung von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np unmittelbar nach 1:100 Verdünnung einer DMSO-Stammlösung (33 % *cis*) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (14 % *cis*), aufgenommen bei  $\lambda$ :274 nm (Datenintervall 5s, response: 1s) und 20°C. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Meßwerte, die Linie stellt deren Anpassung an eine Reaktion 1.Ordnung dar, welche  $k_{\text{obs}}$  der Isomerisierung liefert. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$  kann aus  $k_{\text{obs}}$  berechnet werden (s.Text).

unten: Berechnete Spektren für das *trans*- (—) Isomer (Maximum:  $\lambda_{\epsilon}$ : 348<sub>1260</sub>, Minimum: 273<sub>-11080</sub> nm) bzw. *cis*- (•••••) Isomer (Maximum:  $\lambda_{\epsilon}$ : 277<sub>7130</sub>, Minimum: nicht eindeutig zuweisbar) von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np.

In den UV/VIS-Spektren wässriger Lösungen von N-Methyl-thioacetamid wurde nach Bestrahlung mit UV-Licht einer Hg-Lampe ( $\lambda$ :253.7 nm) eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima um 5 nm, verbunden mit einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten um ca. 10 % beobachtet (Kato et al., 1984). Nach Ausschalten des UV-Lichtes wurde eine Relaxation hin zum Ausgangsspektrum gefunden, die durch die Bestrahlung ausgelösten spektralen Änderungen konnten auf eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes zurückgeführt werden.

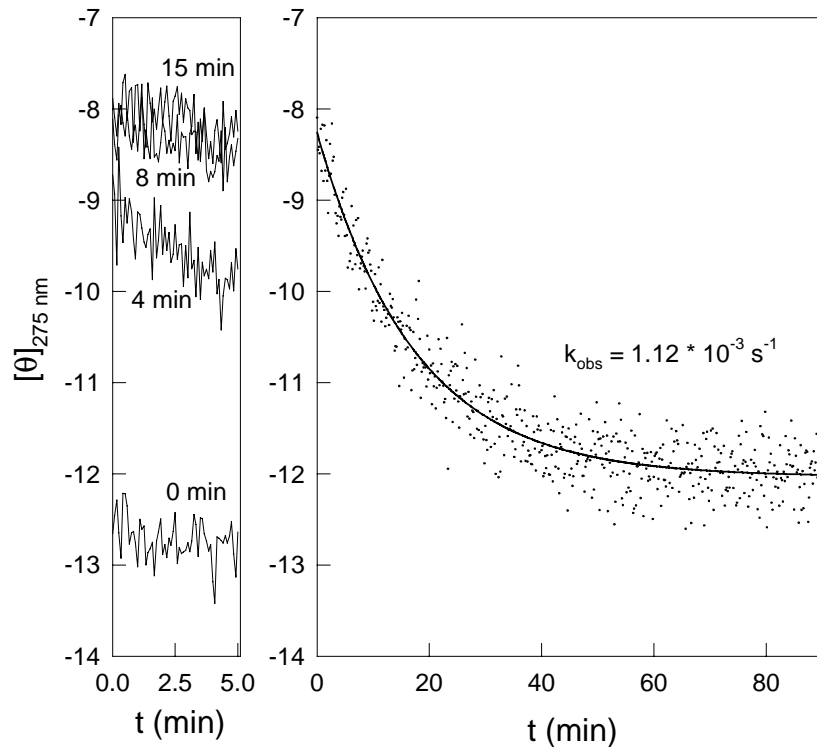


Abb.7: links: Zeitabhängige Messung der CD-Signale von Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 bei 274 nm (Datenintervall 5s, response: 1s) und 30°C. Der Wert bei 0 min wurde im Zustand des Gleichgewichtes der Isomerisierung (14 % *cis*) gemessen. Danach wurde die Probe für 4 min mit UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 nm bestrahlt und anschließend wiederum das CD-Signal bei 274 nm gemessen. Eine Vergrößerung des Meßsignals (von -12.7 auf -9 mdeg) wird beobachtet, gleichzeitig wird eine beginnende Relaxation in Richtung des Ausgangswertes sichtbar. Die Unterbrechung des Relaxationsprozesses nach 5 min, Fortsetzung der Bestrahlung mit UV-Licht für weitere 4 min ( $\Sigma$  8 min) und erneute CD-Messung führte zu einer weiteren Vergrößerung des Signals (-8 mdeg). Eine nochmalige Exposition im UV-Licht für 7 min ( $\Sigma$  15 min) bewirkte keine weitere Vergrößerung des CD-Signals, verglichen zu dem nach 8 min Bestrahlung erhaltenen Wert.

rechts: Zeitabhängige Messung einer nahezu vollständigen Relaxation der 15 min mit UV-Licht bestrahlten Probe, bei 274 nm und 30°C. Die Anregung mit UV-Licht bewirkt eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes von 14 auf 24 %, was die Vergrößerung des Meßsignals erklärt. Die Relaxation stellt eine *cis/trans* Isomerisierung dar, die Anpassung der Meßwerte an eine I.Ordnungsreaktion liefert  $k_{\text{obs}}$ , aus dem  $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$  berechnet werden kann (s.Text).

Gleiches wurde für das Derivat Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np gefunden. Nach Anregung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 nm konnte in einer zeitabhängigen Messung eine Vergrößerung der CD-Meßwerte bei 274 nm (von -12.5 auf -8 mdeg) gefunden

werden (vgl. Abb. 7). Verglichen mit den Literaturdaten und den zuvor am Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro erhaltenen Ergebnissen, deutete dies auf eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes infolge der Bestrahlung hin. Unter den gewählten Bedingungen erreichte die Verschiebung des Meßsignals nach 8 min einen Endwert (vgl. Abb. 7). Die anschließende zeitabhängige CD-Messung zeigte eine Relaxation hin zum Ausgangswert. Durch zweifach wiederholte Exposition der relaxierten Probe im UV-Licht konnte der Vorgang wiederholt werden, was zeigt, daß der beobachtete Prozeß einen reversiblen Gleichgewichtsvorgang beschreibt. Durch parallele Bestimmung des *cis*-Gehaltes eines Aliquots der UV-bestrahlten Probe in einem proteasegekoppelten Test (Fischer et al., 1984) wurde nachgewiesen, daß dieser von 14 auf 24 % erhöht war. Es muß angemerkt werden, daß die hier praktizierte unspezifische Anregung auch einen gewissen Grad an Photozersetzung bewirkte, so daß die Relaxation nach jedem Anregungszyklus nur 85 bis 90% des Ausgangswertes erreichte. Durch eine spezifischere Anregung des Thioxocarbonyls mit Laserlicht entsprechender Wellenlänge und Intensität sollte die Photozersetzung reduziert werden können.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Thioxosubstitution im Peptid eine wertvolle Sonde zur Verfolgung dynamischer Prozesse, die mit der Änderung spektroskopischer Eigenschaften einhergehen, darstellt. Die besondere Bedeutung dieser Ein-Atom-Substitution besteht darin, daß sie eine weitgehend isostere Substitution im Peptidrückgrat ermöglicht, gekoppelt mit der Möglichkeit der spezifischen Anregung nur einer, nämlich der thioxylierten Peptidbindung mit UV-Licht definierter Wellenlänge. Wie hier erstmals gezeigt wurde, eröffnet dies eine neue Möglichkeit der direkten Messung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung. Der Vorteil besteht darin, daß mittels dieser Methode auch in Gegenwart anderer Effektoren, z.B. Proteinen, gemessen werden kann, weil (i) in CD-Messungen der Absorptionsbereich des Thioxochromophors außerhalb des Fern-UV-Absorptionsbereiches von Sekundärstrukturelementen liegt, und (ii), keine Hilfsprotease benötigt wird, welche Proteine und Peptide hydrolysieren könnte. In Erweiterung dessen wurde nachgewiesen, daß durch spezifische Anregung der thioxylierten Peptidyl-Prolyl-Bindung deren *cis*-Gehalt innerhalb einer relativ kurzen Anregungsphase (< 10 min) erhöht, und die anschließende Relaxation CD-spektroskopisch gemessen werden kann. Somit wird eine prinzipielle Möglichkeit geschaffen, eine „Schalter“-Funktion direkt in ein Polypeptidrückgrat einzubauen, ohne die Struktur des modifizierten Peptides zu beeinflussen.

Die potentielle biologische Relevanz thioxylierter Peptidbindungen wird durch eine kürzlich erstmals beschriebene Thioxosubstitution in einem nativen Protein unterstrichen (Ermler et al., 1997). Für das mittels Röntgenkristallstrukturanalyse untersuchte Enzym Methyl-Coenzym M aus dem thermophilen Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde eine Thioxylierung des Gly445, die möglicherweise für den Katalysemechanismus des Enzyms bedeutsam ist, aus den berechneten Daten abgeleitet.

## 2.2. Nichtenzymatische Reaktionen von Thioxozeptid-Derivaten

### 2.2.1. Reaktion der N-terminalen Aminogruppe mit Formaldehyd

Es wurde beobachtet, daß bei thioxylierten Tetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-ψ[CS-NH]-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) in 100 mM TRIS / 1 mM DTT eine Umwandlung zu noch thioxylierten, in der HPLC hydrophoberen Produkten stattfindet, die ein um 12 g/mol höheres Molekulargewicht besitzen. Die massespektrometrische und NMR-Analyse des mittels präparativer HPLC isolierten Umwandlungsproduktes aus Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np zeigte, daß es sich hierbei um die entsprechende, durch Umsatz mit stöchiometrischen Mengen Formaldehyd entsprechend Gleichung



gebildete, Schiff'sche Base handelt. Die in den Positionen 2 bis 4 thioxylierten Tetrapeptid-4-nitroanilide bzw. die entsprechenden Oxo-Verbindungen Ala-Xaa-Pro-Phe-NH-Np zeigten unter vergleichbaren Bedingungen diese Reaktion nicht. Bei letzteren beobachtet man erst in Anwesenheit einer 1000-fachen Formaldehydkonzentration (10 Vol.% im Ansatz) im schwach alkalischen Milieu (35 mM Hepes, pH 7.8 oder 10 mM KOH, pH 12) eine vergleichbare Umwandlung, die jedoch mit der Bildung von mehreren Nebenprodukten einhergeht.

Das Absorptionsmaximum der Thioxozeptidbande des Azomethins ist um 5 nm bathochrom verschoben, der Extinktionskoeffizient im Maximum ist ca. 10% höher im Vergleich zur Ausgangsverbindung (vgl. Abb.8). Trotz der geringen Molekulargewichtsdifferenz von 12 g/mol sind beide Verbindungen in der HPCE voneinander trennbar.

Die Umwandlungsgeschwindigkeit ist temperaturabhängig. Bei in destilliertem Wasser gelöstem Ala-ψ[CS-NH]-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala; pH 4-5, wegen des Trifluoracetats) tritt diese Umwandlung nicht auf, läßt sich aber durch Zusatz von Methanol (40 Vol.% im Ansatz) bzw. durch Formaldehyd (0.01 Vol.% im Ansatz) erreichen. Sowohl die Synthese von TRIS-Puffer als auch die von Methanol verlaufen über Vorstufen, an denen Formaldehyd beteiligt ist. Verbleibende Spuren desselben könnten die beschriebenen Effekte bedingen. Bei Verwendung anderer Puffer (Hepes, Morpholinethansulfonsäure, Piperazin, Natriumcarbonat, Natriumphosphat; alle pH 7.5) bzw. Zusatz anderer Alkohole (Ethanol, Propanol) traten diese Umwandlungen nicht auf. Sättigt man TRIS-Puffer vor dem Lösen des Thioxozeptids mit dem Formaldehyd bindenden Dimedon ab (Löslichkeit in Wasser bei 25°C: 4,16 g/l; = 29,67 mM), wird die Umwandlung zur Schiff'schen Base fast vollständig unterdrückt. Andererseits reichen wiederum Spuren von Formaldehyd in Wasser (0.01 Vol.%)

aus, um das Thioxoarylamid Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np in das Azomethin N-Methyliden-Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np zu überführen.

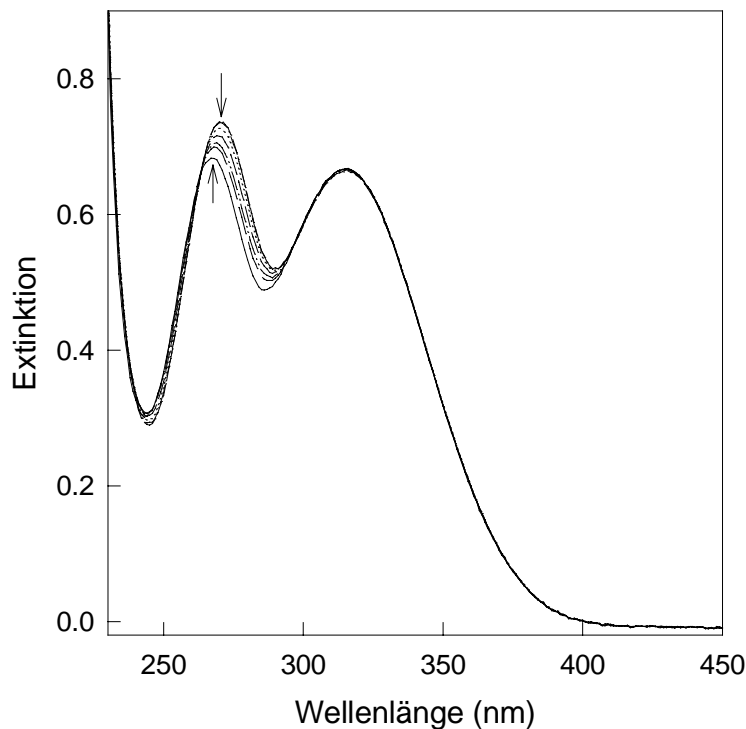
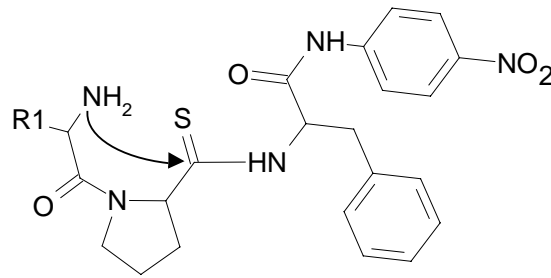


Abb.8: Veränderung des UV/VIS-Spektrums von Ala- $\psi$ [CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np (in H<sub>2</sub>O, pH 4.5, c: 70  $\mu$ M, d: 1 cm) nach Reaktion mit 3  $\mu$ l (35%; 0.1% im Ansatz) Formaldehyd unter Bildung der Schiff'schen Base N-Methyliden-Ala- $\psi$ [CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np. Es wurden 7 Spektren im Abstand von 3 Minuten aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20°C. Die Thioxocarbonyl-Bande wird bathochrom vom 267 nm ( $\uparrow$ ) zu 270 nm ( $\downarrow$ ) verschoben, der Extinktionskoeffizient erhöht sich von  $\epsilon_{264}=10\ 375$  auf  $\epsilon_{269}=11\ 410$ . Die Bande des 4-Nitroanilid-Restes bei 318 nm bleibt unverändert.

### 2.2.2. Intramolekular nucleophile Reaktion der N-terminalen Aminogruppe

Ausgangspunkt dieser Beobachtungen waren Untersuchungen von Zellhomogenaten aus *E.coli*, *S.cerevisiae* und Schweineniere auf Thioxopeptidbindungen hydrolysierende enzymatische Aktivitäten. Eine Hydrolyse der Thioxopeptidbindung bei Inkubation mit Homogenat sollte spektrophotometrisch durch die damit einhergehende Verringerung der Absorption bei 270 nm detektierbar sein. Im Fall von Thioxotetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val) wurde eine Absorptionsabnahme der -C=S Bande gefunden. Nachfolgende Analysen ergaben jedoch, daß dies auf eine nichtenzymatische Umwandlung zurückzuführen war. Diese fand nach der enzymatischen, wahrscheinlich durch eine Aminopeptidase des Zellhomogenates katalysierten, Abspaltung des N-terminalen Alanins an den verbleibenden Thioxotripeptid-4-

nitroaniliden Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np statt. Dabei erfolgt ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe auf den Carbonylkohlenstoff der zweiten (thioxylierten) Aminosäure (s. Abb.9).



R <sub>1</sub>	Xaa <sub>1</sub>	HWZ (min)
-H	Gly	5
-CH <sub>3</sub>	Ala	71
-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Val	180

Abb.9: Nucleophiler Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf den Thioxocarbonyl-Kohlenstoff der zweiten Aminosäure unter Abspaltung von H<sub>2</sub>S und Bildung eines 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Die Reaktionen fanden in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C statt. Die Tabelle gibt die Halbwertszeiten der Zyklisierung in Abhängigkeit von der Seitenkette der vor Pro stehenden Aminosäure an.

Unter Abspaltung von H<sub>2</sub>S bildet sich ein zyklisches, durch Tautomerie stabilisiertes 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat (s.Abb.10).

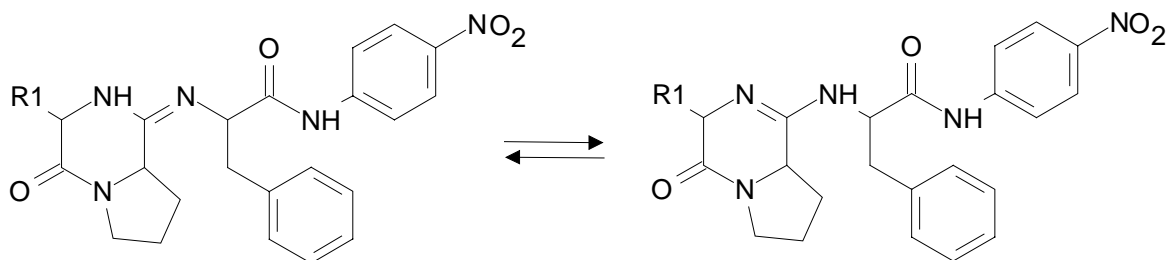


Abb.10: Tautomerie-Stabilisierung der zyklischen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Umwandlungsprodukte von Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val).

Der nucleophile Angriff muß über das *cis*-Konformere verlaufen, damit die Ringbildung sterisch möglich wird. Der *cis*-Anteil in Xaa-Pro Bindungen ist wahrscheinlich der Grund, weshalb diese Reaktion vorwiegend bei Thioxopeptid-Derivaten mit einem thioxylierten Pro in Position 2 der Aminosäuresequenz (Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-R) beobachtet wird. Derivate mit Xaa = Gly zyklisieren mit einer HWZ von 5 min sehr viel schneller als solche mit Ala oder Val in dieser Position (vgl.Abb.9). Dies kann sowohl auf den vergleichsweise höheren *cis*-



Gehalt der Gly-Pro Bindung als auch auf deren größere Flexibilität zurückgeführt werden. Der Verlust des Thioxochromophors im Zuge der Zyklisierungsreaktion kann spektrophotometrisch verfolgt und die Geschwindigkeitskonstante der Umwandlung bestimmt werden (s. Abb. 11). Die zeitabhängige Abnahme des Meßsignals im Maximum der Thioxocarbonyl-Bande folgt einer Reaktion I. Ordnung, was den postulierten intramolekularen Reaktionsmechanismus stützt.

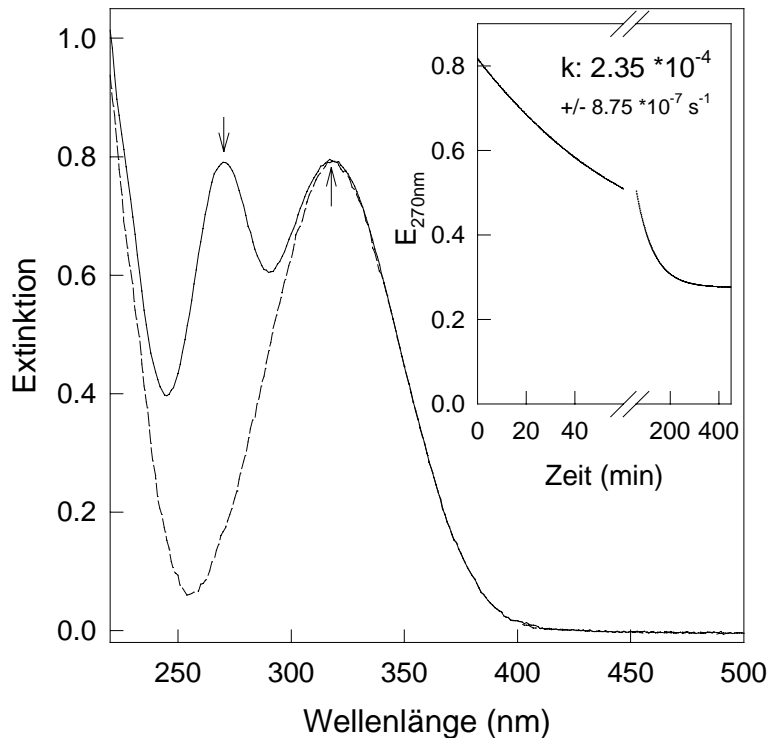


Abb. 11: Spektren von Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np (—) und dessen zyklischen Umwandlungsproduktes (---) in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C. Der Thioxochromophor bei 270 nm ( $\downarrow$ ) verschwindet mit der Bildung der 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate, die Bande des 4-Nitroanilid-Restes bei 318 nm ( $\uparrow$ ) bleibt unverändert. Die eingefügte Abbildung zeigt, daß die Messung der Extinktionsabnahme des Thioxochromophors über die Zeit eine direkte Verfolgung der Reaktion ermöglicht, der Kurvenverlauf folgt einer I. Ordnung-Reaktion und ermöglicht so die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante.

Bei Thioxotetrapeptid-Derivaten, die in Position 2 eine andere thioxylierte Aminosäure als Pro enthalten, z.B. Ala-Gly- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np und Ala-Ala- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np, wurde bei Langzeitinkubation in Puffer (100 mM TRIS, 1 mM DTT; pH 7.5) die Ringbildung ebenfalls beobachtet. Sie verläuft jedoch mit einer um mindestens 2 Größenordnungen langsameren Geschwindigkeitskonstante als bei den Xaa-Pro- $\psi$ [CS-NH]-R-Derivaten ab, am thioxylierten Glycin jedoch fünffach schneller als am thioxylierten Ala. Die entstehende C=N Bindung ist wegen des folgenden Prolins nicht durch Tautomerie stabilisierbar (vgl. Abb. 12).

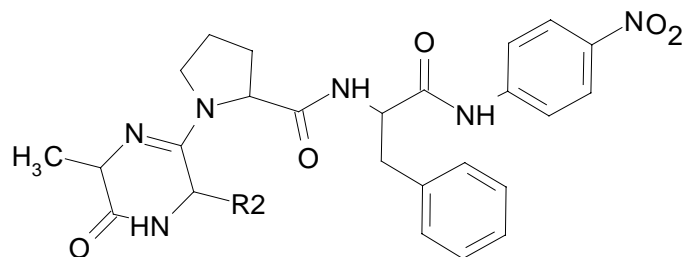


Abb.12: Die Zyklisierungsreaktion der zwei N-terminalen Aminosäurereste, unter  $\text{H}_2\text{S}$ -Abspaltung und Bildung eines zyklischen Derivates, wird auch bei Thioxotetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa- $\psi$ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) beobachtet, jedoch verläuft die Reaktion hier mit HWZ von 30 Stunden (Xaa = Gly) bzw. ca. 6 Tagen (Xaa = Ala) hundertfach langsamer als bei den voranstehend beschriebenen Verbindungen. Die Reaktionen fanden in 100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7.5 bei  $25^\circ\text{C}$  statt.

Eine hohe Tendenz zur Zyklisierung zeigte das Dipeptid-Thioxyarylamid Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np (vgl. Abb.13). Während das Thioxotripeptid-Derivat Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np als 0.5 mM wässrige Lösung (pH 3.5, wegen des Trifluoracetats) und in 100 mM Natriumcitrat; pH 5.5 stabil war, und die Umwandlung erst im schwach alkalischen Puffer (35 mM Hepes, pH 7.8) beobachtet wurde, findet diese beim Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np schon unter leicht sauren Bedingungen (100 mM Natriumcitrat; pH 4.5) zu einem 34 g/mol leichteren Produkt statt (vgl. Abb.13). Die HWZ unter diesen Bedingungen beträgt 21 min. Stabil ist das Thioxyarylamid nur in einer Acetonitril/Wasser/Trifluoracetat-Mischung, pH 3. Die Ursachen für diesen Effekt liegen in der Elektronen ziehenden Wirkung des 4-Nitroanilidrestes auf den Carbonylkohlenstoff des Prolins und im Einfluß des Thioxy-Substituenten begründet, die den nucleophilen Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf den Carbonylkohlenstoff erleichtern.

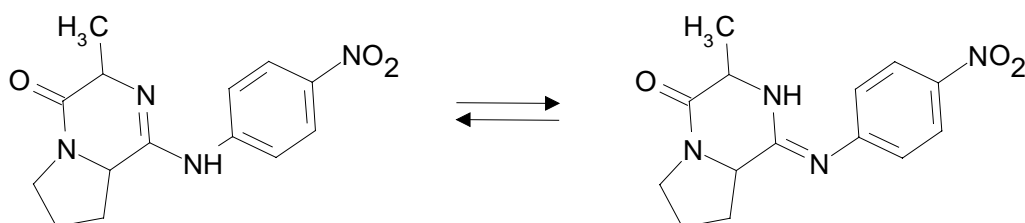


Abb.13: Zyklisches Umwandlungsprodukt des Thioxyarylamids Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{S}$  und Bildung eines 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Die Reaktionen fanden in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei  $25^\circ\text{C}$  statt. Die Abbildung zeigt die bei pH 3 zu findende protonierte Form der Verbindung, bei  $\text{pH} > 7$  ist die Amidinofunktion deprotoniert.

Das Umwandlungsprodukt wurde isoliert und durch NMR-Untersuchung als das entsprechende 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat (Abb.13) identifiziert. Es zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert sich unterscheidende UV/VIS Spektren. Während im leicht

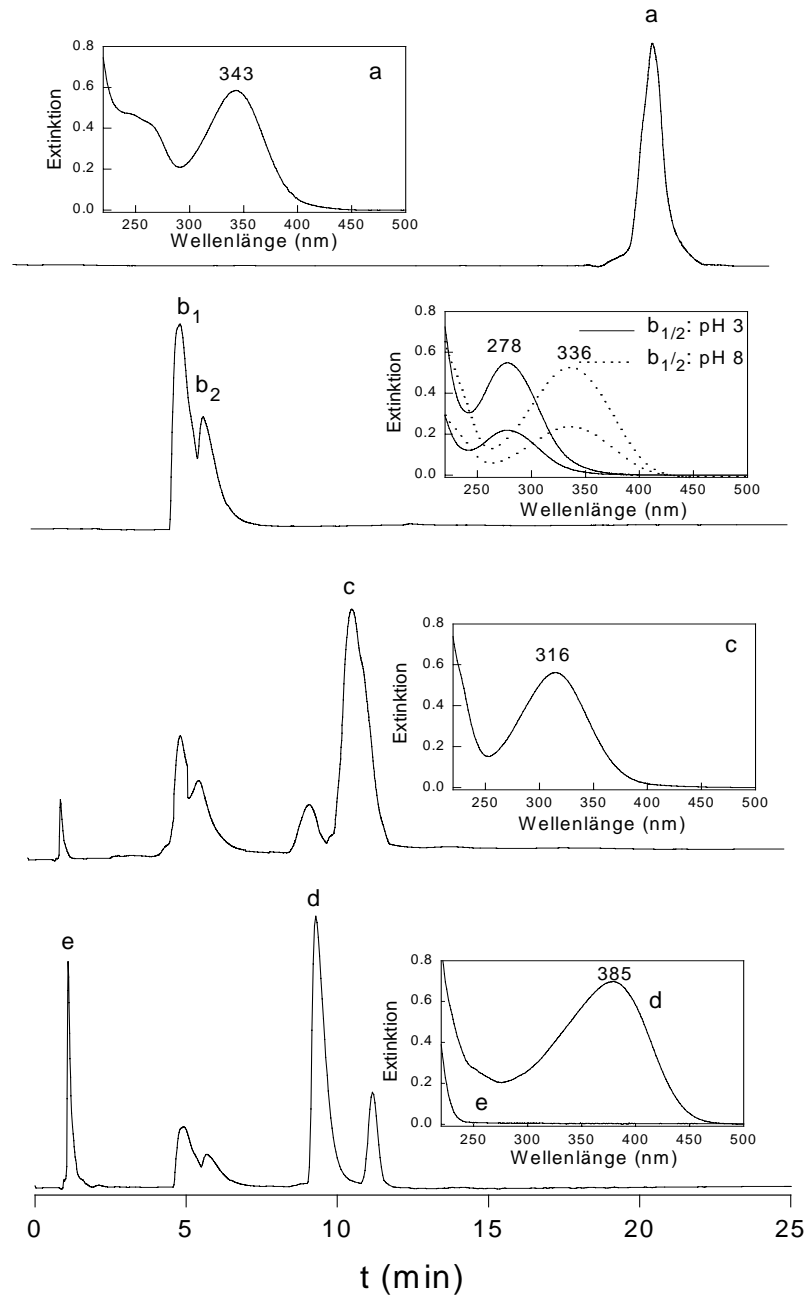


Abb.14: HPLC-Chromatogramme und UV/VIS Spektren von Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np (**a**) und dessen Umwandlungsprodukten (**b-e**): (**a**) 50  $\mu$ M (d: 1cm) des Thiooxoarylamides in Acetonitril-Wasser-TFA, pH 3; (**b**) intermediäres 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat in 35 mM Hepes, pH 7.8 (----) bzw. H<sub>2</sub>O-HCl, pH 2 (—), Spektrenform und Molekulargewicht von  $b_1$  und  $b_2$  sind identisch, sie repräsentieren wahrscheinlich D- und L-Konformere; (**c**) Hydrolyse des Intermediates zu D,L-Ala-Pro-NH-Np (in H<sub>2</sub>O, pH 5); (**d**) DP IV katalysierte Proteolyse von L-Ala-Pro-NH-Np zu Ala-Pro (**e**) und 4-Nitroanilin (in 35 mM Hepes, pH 7.8), der hypothetische Anteil D-Ala-Pro-NH-Np wird nicht hydrolysiert. HPLC-Bedingungen: Gradient aus ACN-Wasser-TFA, pH 3; 10-35 % ACN, 1%/min; Fluß: 1ml/min;  $\lambda$ :220 nm; Säule: Merck-LiChrospher RP 8, 125\*4 mm, 5 $\mu$ m.

basischen Milieu (35 mM Hepes; pH 7.8) und auch bei pH 12 (10 mM KOH) das Absorptionsmaximum bei 336 nm liegt, verschiebt es sich bei einem Sprung auf pH 2 (HCl) zu 278 nm (vgl. Abb. 14). Die bathochrome Spektrenverschiebung im basischen Milieu beruht wahrscheinlich auf der Deprotonierung der Amidino-Gruppe, das freie Elektronenpaar kann über die benachbarten konjugierten  $\pi$ -Elektronen delokalisiert werden. Durch wiederholte pH-Sprünge sind diese beiden Formen reversibel ineinander überführbar. Die Form des Intermediat-Spektrums im basischen ähnelt sehr dem der Ausgangsverbindung ( $\lambda_{\text{max.}}$ : 244 und 343 nm), die Schulter der Thioxo-Bande ist jedoch nicht mehr zu sehen.

In einer HPLC-Analyse des Umwandlungsproduktes eluierten unmittelbar aufeinanderfolgend zwei Fraktionen (vgl. Abb. 14), die Analyse der Peaks zeigte identische Spektren, und auch das Molekulargewicht beider Fraktionen war identisch, es entsprach dem des 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Das Konzentrationsverhältnis dieser zwei Fraktionen war im Verhältnis von ca. 70 : 30 zu der HPLC-hydrophileren Form hin verschoben.

Der gebildete Zyklus ist in DMSO stabil, im wäßrigen Puffer hydrolysiert er sehr langsam, mit einer HWZ von ca. 3 Tagen bei 25°C in 35 mM Hepes, pH 7.8. Dabei wird der Ring wieder geöffnet, die Bindung zum 4-Nitroanilid bleibt bestehen. Aus der Ringöffnung resultiert letztlich das nicht mehr thioxylierte Analoge Ala-Pro-NH-Np (vgl. Abb. 14). Letzteres zeigt im schwach alkalisch wäßrigen Puffer ebenfalls Hydrolyse und Diketopiperazin-Bildung, im Vergleich zum Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np jedoch mit mehr als 4 Größenordnungen reduzierten Geschwindigkeitskonstanten.

Ala-Pro-NH-Np ist ein Substrat für die Exoprotease DP IV, eine Analyse des Ala-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Np hinsichtlich Substrateigenschaften war wegen der beschriebenen Instabilität in neutral-wäßrigen Puffern nicht möglich, auch das zyklische Intermediat wird nicht als Substrat erkannt. Das nach Ringöffnung resultierende Ala-Pro-NH-Np ist ein Substrat der DP IV, jedoch erfolgte die enzymatische Hydrolyse nicht vollständig (vgl. Abb. 14). Bei einer Langzeitinkubation wurde gefunden, daß beide HPLC-Fraktionen des 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates zu Ala-Pro-NH-Np hydrolysieren, dieses eluiert in der HPLC-Analyse jedoch in Form nur einer Fraktion. Diese wurde auf Substrateigenschaften für die DP IV untersucht. Es zeigte sich, daß nur ca. 70% des so gebildeten Ala-Pro-NH-Np hydrolysiert wurden, während der verbleibende Rest auch bei Langzeitinkubation hydrolyseresistent war.

Aus diesen Ergebnissen wurde die Hypothese abgeleitet, daß eine Racemisierung im Zuge der zwei Umwandlungsreaktionen erfolgt sein muß. Es ist anzunehmen, daß die Amidino-Funktion des zyklischen Intermediates (vgl. Abb. 13) eine elektronenziehende Wirkung auf die  $C_{\alpha}$ -H Gruppe des benachbarten Prolins ausübt, was zu einer Erhöhung von deren C-H Acidität, und in Folge dessen, zu einer Racemisierung führt. Somit würde ein Teil des gebildeten Ala-Pro-NH-Np ein D-Pro in P<sub>1</sub>-Position enthalten. Derivate mit P<sub>1</sub>-D-Pro sind

keine Substrate der DP IV, deshalb wird nur eine teilweise DP IV katalysierte Hydrolyse beobachtet.

### 2.2.3. Hohe Basenstabilität von Peptidderivaten der Struktur R- $\psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np und R-Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np

Die Thioxoarylamidbindungen in Derivaten wie z.B. Ala-Xaa-Pro-Phe- $\psi$ [CS-NH]-Np (Xaa: Gly, Ala) und Ala-Phe-Gly- $\psi$ [CS-NH]-Np, sind einer basischen Hydrolyse kaum oder gar nicht zugänglich, während nichtthioxylierte Arylamidbindungen leicht hydrolysierbar sind (vgl.Tab. zu Abb.16). Die elektronenziehende Wirkung der 4-Nitroanilid-Gruppe und die Fähigkeit des Schwefels der Thioxocarbonyl-Gruppe, Ladungen zu delokalisieren, bewirken eine erleichterte Deprotonierung des Stickstoffs der Thioxoamidbindung unter basischen Bedingungen, indem sie die anionische Struktur stabilisieren (vgl.Abb.15). Die negative Ladung des Anions unterbindet den nucleophilen Angriff eines Hydroxid-Ions auf den Thioxocarbonyl-Kohlenstoff, und verhindert somit die Hydrolyse der Thioxoarylamid-Bindung.

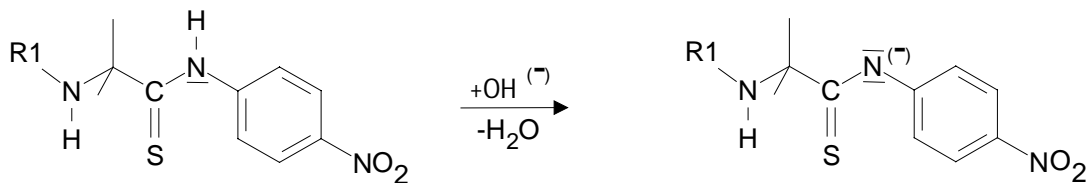
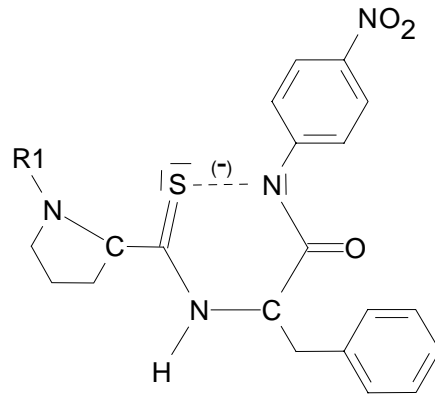


Abb.15: Die hohe Basenstabilität der Thioxoarylamid-Bindung ist auf die Deprotonierung des Amidstickstoffs zurückzuführen. Der Carbonylkohlenstoff der anionischen Thioxoarylamid-Bindung kann nicht mehr nucleophil durch ein Hydroxid-Ion angegriffen werden.

Überraschend war hingegen die ebenfalls deutlich erhöhte Basenstabilität von Thioxoamid-Derivaten der Struktur Ala-Xaa-Pro- $\psi$ [CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val). In 100 mM KOH zeigten sie keine Hydrolyse des 4-Nitroanilid-Restes, in Gegenwart von 2M KOH im Reaktionsansatz verlief diese nur sehr langsam (vgl.Abb.16) mit HWZ zwischen 27 und 95 Minuten. Nach der schnellen Deprotonierung des Arylamid-Stickstoffes, die sich in einem bathochrom verschobenen UV/VIS-Spektrum des Anions widerspiegelt, und die bei der zeitabhängigen Messung im Maximum des freien 4-Nitroanilins bei 385 nm einen Absorptionssprung bewirkt, geht die eigentliche Hydrolyse nur sehr langsam weiter, die beiden Phasen sind deutlich voneinander unterscheidbar. Die langsame Phase kann an eine Reaktion I. Ordnung angepaßt, und die Geschwindigkeitskonstante berechnet werden. Dies weist darauf hin, daß die langsame Phase tatsächlich die Hydrolyse der Arylamidbindung, die einer pseudo-I.-Ordnungsreaktion folgt, darstellt.



Peptid-Derivat	Hydrolyse der Arylamidbindung Halbwertszeiten (min)	
	100 mM KOH	2 M KOH
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np	48	<< 1
Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np	63	<< 1
Ala-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	39	<< 1
Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	95
Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	27
Ala-Val-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	86
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	n.m.	> 180

Abb.16: Postulierte Stabilisierung der anionischen Form von Thiopeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val), die eine erhöhte Resistenz der Arylamidbindung gegenüber basischer Hydrolyse bewirkt. Die Tabelle gibt die Halbwertszeiten für die basische Hydrolyse des 4-Nitroanilid-Restes an verschiedenen Positionen thioxylierter Tetrapeptid-4-nitroaniliden an. Die spektroskopischen Messungen erfolgten über 30 min bei 25°C und λ: 385 nm. n.m.: Hydrolyse war nicht meßbar, s. Text.

Die erhöhte Basenstabilität ist eindeutig an die Thioxylierung der Peptidbindung, die der Arylamidbindung unmittelbar vorausgeht, gebunden (vgl.Tab. zu Abb.15). Die entsprechenden in den Positionen 1 und 2 der Aminosäuresequenz thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroanilide bzw. das Oxo-Derivat Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np zeigen diese Eigenschaft nicht, bei einer Konzentrationen von 2M KOH erfolgt eine sehr schnelle (HWZ < 1s) vollständige Abspaltung des 4-Nitroanilides. Eine erleichterte Deprotonierung der Arylamidbindung, möglicherweise begünstigt durch eine transannuläre, über eine zyklische Struktur führende, Delokalisation der negativen Ladung des Stickstoffes auf freie d-Orbitale des Schwefels, und somit eine Stabilisierung des Anions der Derivate Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np wäre zu diskutieren (vgl.Abb.16). Alternativ käme eine, durch die Basizität der Thioxocarbonylgruppe ausgelöste, Fortpflanzung induktiver Effekte, die allerdings über drei kovalente Bindungen hinweg verlaufen müßte, in Frage.