

Die Auswirkung von Einzelbindungs- Konformationsänderungen auf die Polyprolin II Sekundärstruktur

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt

der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Stephan Wawra

geboren am 14.05.1977 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Fischer
Prof. Dr. Rudolph
Prof. Dr. Hofmann (Leipzig)

Verteidigungsdatum: 27.09.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000013999

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013999>]

Abkürzungsverzeichnis

ΔG^\ddagger	Änderung der freien Energie im Übergangszustand (kJ/mol)
ΔG^0	Grundzustandsenergie­differenz
ΔH^\ddagger	Änderung der Enthalpie im Übergangszustand (kJ/mol)
ΔH^0	Grundzustandsenthalpie­differenz
ΔS^\ddagger	Änderung der Entropie im Übergangszustand (J/mol·K)
ΔS^0	Grundzustandsentropie­differenz
-pNA	-4-Nitro-Anilid
Ac-	Acetyl-
ACN	Acetonitril
Boc	Benzoyl-
Btz	Benzotriazol-
C-N	Bindung zwischen dem Amidstickstoffatom und dem Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung
CD	cirkular dichroismus
CH ₂ Cl ₂	DCM
D ₂ O	Deuteriumoxid
DCM	Dichlormethan
DIEPA	<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EE	Essigester
GmdCl	Guanidiniumhydrochlorid
Isop. D8	8fach deuteriertes Isopropanol
IR	infrarot
KSIE	kinetischer-Lösungsmittel-Isotopie-Effekt
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NMM	<i>N</i> -Methyl-morpholin
NaSO ₄	Natriumsulfat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen­konzentration
pD	negativer dekadischer Logarithmus der Deutroniumionen­konzentration
PPlase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
Pro-	Prolyl-
R	allgemeine Gaskonstante
TDF	Tetrahydrofuran 8fach deuteriert
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	ultraviolett
Vis	engl. <i>Visible</i>
λ	Wellenlänge in nm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	4
1.1 Die cis/trans Isomerie (CTI) der Peptidbindung	4
1.1.1 Die Peptidbindung	4
1.1.2 Isomerverhältnisse und Rotationsbarrieren der Peptidbindung	5
1.1.3 Lösungsmittelleffekte und pH	7
1.1.4 Amidische Peptidbindungen	9
1.1.5 Peptidyl-Prolylbindungen	10
1.2 Die Thiopeptidbindung	12
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften	12
1.2.2 Spektroskopische Eigenschaften und Photoschaltung der Thiopeptidbindung	16
1.3. Polyprolin	21
1.3.1 Die Polyprolinhelix	21
1.3.2 Die PP II-Konformation ist Hauptstrukturelement in Kollagen und ungefalteten Polypeptiden	26
Ziele der Arbeit	29
2 Material/Methoden/Geräte/Synthesen	30
2.1 Geräte und Chemikalien	30
2.1.1 Chemikalien	30
2.1.2 Geräte	31
2.2 Synthesen	32
2.2.1 Synthese der Thioxobausteine Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-NBzt und Boc-Pro- ψ [CS-N]-NBzt	32
2.2.2 Festphasensynthese der Thioxopolyprolinpeptide	35
2.2.3 Synthese der Dipeptide H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂	35
2.3 Methoden	37
2.3.1 Spektren und Kinetische Messungen	37
2.3.2 CD- und UV-Vis Spektroskopie	37
2.3.3 NMR-Spektroskopie	37
2.3.4 IR-Spektroskopie	37
2.3.5 Isothermale Kalorimetrie	38
2.3.6 Photoinduzierte cis/trans-Isomerisierung der Thiopeptide	38
2.3.7 Bestimmung des KSIE	38
3 Ergebnisse und Diskussion	39
3.1 Charakterisierung der Dipeptide H-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ (Ergebnisse)	39
3.1.1 <i>Cis/trans</i> -Gleichgewichte von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂	39
3.1.2 Charakterisierung der Relaxationsreaktion von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ nach photoinduzierter Gleichgewichtsverschiebung	44

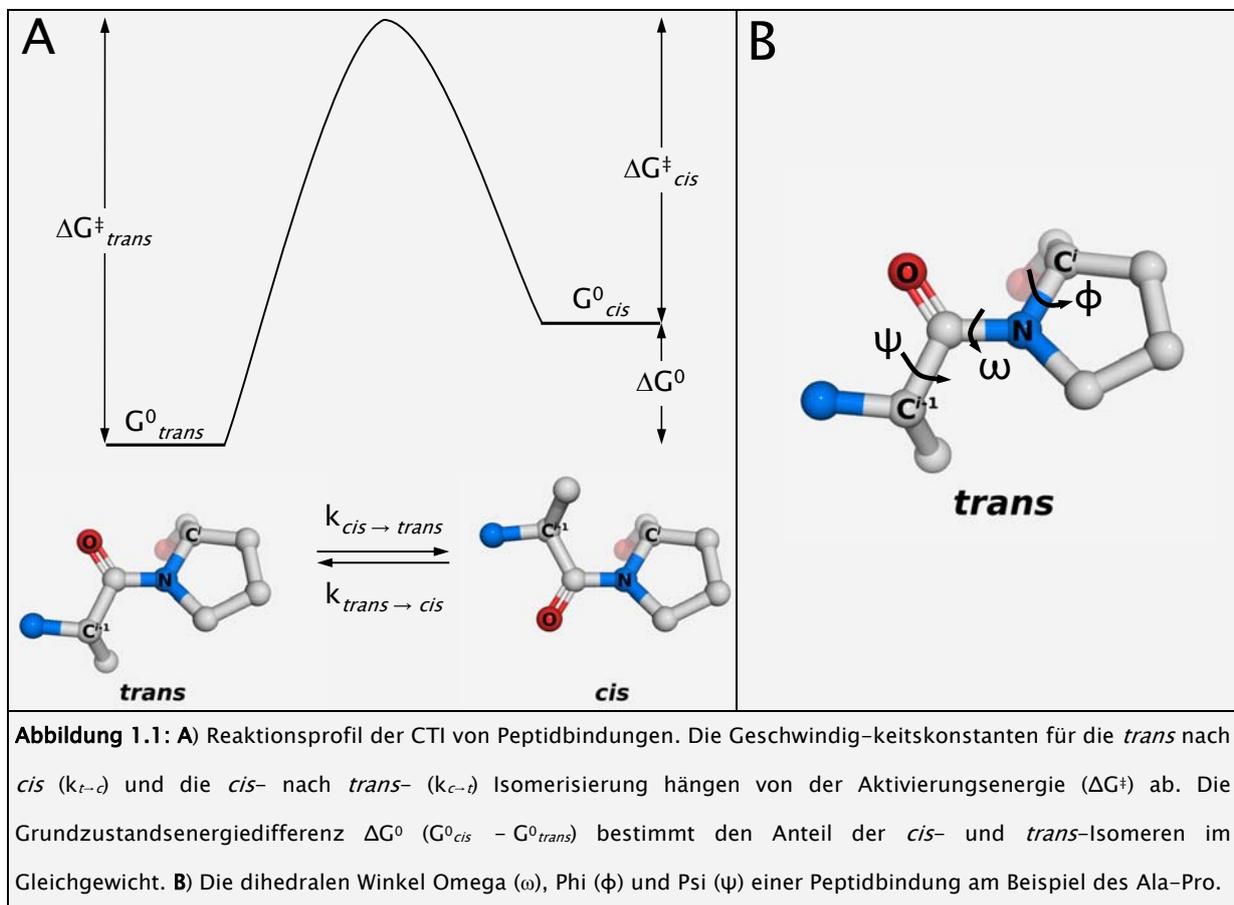
3.2	Die CTI der Thiopeptidbindung der Dipeptide (Diskussion)	50
3.3	Thioxopolyproline (Ergebnisse)	59
3.2.1	Grundzustände der Thioxopolyprolinpeptide	59
3.2.2	Charakterisierung der Thioxo- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung der Polyprolinpeptide	63
3.4	Diskussion der Ergebnisse der Thioxopolyprolinpeptide	72
3.4.1	Einzelbindungs-Konformationsänderung innerhalb der PP II-Struktur	72
3.4.2	Vergleich des PP I nach PP II Übergangs mit Einzelbindungs-CTI	79
3.5	IR-spektroskopische Untersuchung der Thioxo-CTI (Ergebnisse)	83
3.6	IR-spektroskopische Untersuchung der Thioxo-CTI (Diskussion)	87
4	Zusammenfassung	89
5	Referenzen	91
6	Anhang	102
	Danksagung	104
	Publikationsliste	106
	Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 Die *cis/trans* Isomerie (CTI) der Peptidbindung

1.1.1 Die Peptidbindung

Die Peptidbindung ($R-C(=O)-N-R'$), das repetitive Rückgratelement in Oligopeptiden und Proteinen, ist die am weitesten verbreitete funktionelle Gruppe in bioaktiven Molekülen. Sie entsteht durch Verknüpfung von Aminosäuren, wobei deren Aminogruppen mit den Carboxylgruppen einer zweiten Aminosäure unter Austritt eines Wassermoleküls reagieren. Die Propagationsrichtung der Polypeptidkette wird dabei durch die dihedralen Winkel ω , ψ , ϕ charakterisiert, die für die räumliche Ausrichtung des Polypeptidrückgrates verantwortlich sind. Aufgrund der Mesomerie der Peptidbindungselektronen, nimmt die Peptidbindung eine planare Struktur ein und begrenzt somit die Freiheitsgrade der dihedralen Winkel [1]. Diese Eigenschaften sind im klassischen Bild der Amid-Resonanzstrukturen zusammengefasst die der C-N-Bindung einen partiellen Doppelbindungscharakter zuschreibt.



Die räumliche Anordnung der Bindungselektronen zwischen Amidstickstoff- und Carbonylkohlenstoffatom kann kleinere Abweichungen von der planaren Struktur dieser C–N–Bindung zulassen [2–4]. Eine Konsequenz dieser Eigenschaften der Peptidbindung ist, dass beliebige Kombination von Aminosäuren in wässrigem Milieu nicht alle möglichen Kombinationen von ω , ψ , und ϕ einnehmen. Diese Kombinationen sind im Ramachandran Diagramm in bestimmte Bereiche eingeordnet [5, 6]. Grundsätzlich existieren für die Peptidbindung zwei geometrische Isomere mit den Winkeln $\omega \sim 0^\circ$ (*cis*) und $\omega \sim 180^\circ$ (*trans*), welche durch Rotation um die C–N–Bindung ineinander überführt werden können, wobei die Energiebarriere zwischen beiden Zuständen hoch ist. Das Gleichgewicht zwischen beiden Isomeren wird durch die Grundzustandsenergiedifferenz (ΔG^0) und die Halbwertszeit einer entsprechenden Isomeren-Form durch die Aktivierungsenergie (ΔG^\ddagger), bestimmt (**Abbildung 1.1**). Die *cis*-Form der Peptidbindung ist aufgrund von sterischen Spannungen, die durch van-der-Waals-Kontakte der benachbarten C_α -Atome hervorgerufen werden, energetisch instabiler. Dieser Stabilitätsunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Konformation ist bei den imidischen Peptidyl-Prolylbindungen, die auch tertiäre Peptidbindungen genannt werden, aufgrund des Pyrrolydinringes verringert, und führt in einigen Fällen sogar zu äquimolaren Isomerverhältnissen. Bis heute ist es schwierig verlässliche Vorhersagen zu Isomerverhältnissen und Rotationsbarrieren verschiedener chemischer Verbindungen bzw. Aminosäurekombinationen zu machen [7].

1.1.2 Isomerverhältnisse und Rotationsbarrieren der Peptidbindung

Für *N*-Methylacetamid, das einfachste Amidmodell, wurde eine Aktivierungsenergie von 79 kJ/mol für den *cis*- nach *trans*-Übergang, und 89 kJ/mol für die reverse Reaktion, bestimmt (30°C, D₂O). Die Grundzustandsenergiedifferenz von $\Delta G^0 = 10.7$ kJ/mol wurde mit Hilfe des *cis/trans*-Isomeren Gleichgewichts aus **Gleichung 1.1** berechnet [8]. Man nimmt an, dass im Übergangszustand der Rotation einer Peptidbindung verdrillte C–carbonyl und N–pyramidale Konfigurationen existieren, da nicht planare Grundzustände z.B. in zyklischen Peptiden, verringerte Rotationsbarrieren aufweisen [9].

$$\text{Gleichung 1.1: } \Delta G^0 = RT \ln K$$

R = ideale Gaskonstante = 8.31451 J/mol·K; **T** = Temperatur in Kelvin; **K** = Gleichgewichtskonstante (*cis/trans*)

In Abwesenheit von stabilisierenden Tertiärstrukturinteraktionen oder sterischen Einschränkungen zeigen sekundäre Amide eine starke Präferenz für das *trans*-Isomer. Ramachandran und Mitra berechneten 1976 für eine Ala-Ala Peptidbindung eine Wahrscheinlichkeit von 0.1 % für das Auftreten einer *cis* Konformation in der Mitte eines Tetrapeptides [10]. Experimentelle Untersuchungen ergaben 0.5 % *cis*-Gehalt in Di- und 0.15 % in Oligopeptiden [11, 12]. Generell liegt in linearen Molekülen der Wert für die Grundzustandsenergiedifferenz zwischen 2 und 16 kJ/mol sowohl für amidische als auch imidische Peptidbindungen. Oft ist es schwierig das genaue Isomerenverhältnis zu Bestimmen, aufgrund des geringen Prozentsatz an *cis*-Isomer im Gleichgewicht [13]. Um dennoch den prinzipiellen Einfluss von R und R' Substituenten (R-CO-NH-R') auf das *cis/trans* Verhältnis abzuschätzen, können die für die Ester Methylformiat (R=H) und Acetat (R=CH₃) beschriebenen Werte herangezogen werden (25°C, Acetonitril). Dabei konnten ΔG^0 -Werte für die *s-cis/s-trans*-Gleichgewichtslage von ~7 kJ/mol für R=H und 22 kJ/mol für R=CH₃ bestimmt werden. Demzufolge verschiebt ein voluminöser Substituent in R-Position das *s-cis/s-trans*-Isomergleichgewicht zugunsten der *trans*-Konformation [14]. Sterisch anspruchsvolle Substituenten in der R'-Position hingegen erhöhen die Präferenz für das *cis*-Isomer in Estern, Thioestern und Amiden. Legt man diesen Daten die *ab initio* Valenzbindungsberechnungen von Formamid zugrunde, kann die Resonanzstabilisierung des planaren Grundzustandes als determinierender Faktor für die Höhe der Rotationsbarriere angesehen werden [15]. Weiterhin beeinflusst die Orientierung des freien Elektronenpaares des Stickstoffatoms der Peptidbindung, welches senkrecht zur Ebene der Peptidbindung im Übergangszustand der Rotation angeordnet ist, den Energiebetrag der für eine *cis/trans*-Umwandlung aufgebracht werden muss. Unlängst wurde gezeigt, dass stereoelektronische Effekte genauso bedeutend sind wie sterische Effekte um die Präferenz des *trans* Konformeres zu erklären. Diese Untersuchung zeigte, dass die Hyperkonjugation eines freien Elektronenpaares des Carbonylsauerstoffatoms der Peptidbindung mit dem Carbonylkohlenstoffatom der nachfolgenden Peptidbindung einen zusätzlichen stabilisierenden Einfluss auf die *trans*-Konformation ausübt. Diese vorgeschlagene $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion des O_{i-1} mit dem C_i steuert einen Betrag von ca. 3 kJ/mol zur Stabilisierung der *trans*-Konformation in *N*-formyl-L-prolinmethylester bei [16]. Anhand ringsubstituierter Acetanilide konnte der Einfluss von polaren Gruppen auf die Rotationsbarriere und somit eine Resonanzinteraktion

zwischen der NH und der C=O Gruppe gezeigt werden. Die dabei ermittelte lineare Abhängigkeit zwischen Amidcarbonylstreckschwingung und Aktivierungsenergie unterstreicht die dominierende Rolle der Resonanzstabilisierung für die CTI [17]. Von den 2^n Konformeren eines Polypeptides (n = Anzahl der Peptidbindungen) wird somit im Gleichgewicht, durch die zuvor genannten Faktoren, meist eines der Konformern stark bevorzugt. In Proteinen kann die Tertiärstruktur in Extremfällen sekundäre und tertiäre Peptidbindungen, zu 100 % in eine *cis*-Konformation zwingen.

1.1.3 Lösungsmittelleffekte und pH

Peptidbindungen zeigen eine starke Wechselwirkung mit Wasser [18]. Demzufolge sollte die Solvatisierung einen entscheidenden Einfluss auf das Isomerengleichgewicht besitzen. NMR-Untersuchungen an O^{17} markierten amidischen und imidischen Peptidbindungen zeigten aber keine isomerspezifischen Unterschiede bezüglich der Hydratisierung [19, 20]. Im Gleichgewicht ist das *trans*-Konformer im Vergleich zum *cis*-Konformer enthalpisch bevorzugt ($\Delta H^0 = -5.14$ kJ/mol) aber entropisch ungünstig ($\Delta S^0 = -5.47$ J/mol·K). Diese Enthalpie-Entropie Kompensation wurde einer größeren Lösungsmittelimmobilisierung der *trans*-Konformation zugeschrieben [20]. Demzufolge ist bei Ausschluss geladener Gruppen in der Umgebung einer Peptidbindung, kein Lösungsmittelinfluss auf das *cis/trans*-Gleichgewicht von amidischen als auch von imidischen Peptidbindungen, in unstrukturierten Polypeptiden, zu beobachten [21–23]. Für alle in diesen Studien untersuchten Verbindungen konnte der höhere Anteil des *trans*-Isomeren im Gleichgewicht auf enthalpische Effekte zurückgeführt werden, die gleichermaßen in protischen und aprotischen Lösungen existieren müssen. Dagegen erhöht sich die Aktivierungsenergie für die CTI der Peptidyl-Prolylbindungen mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels [24]. Eine Erklärung dafür ist, das apolare Lösungsmittel den weniger polaren Carbonylamin ähnlichen Übergangszustand der Rotation, polare Lösungsmittel hingegen den Grundzustand durch Solvatisierung der Carbonylfunktion, stabilisieren [25]. Die Befähigung eines Lösungsmittels Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden hat zusätzlich einen starken Einfluss auf die Isomerisierungsgeschwindigkeiten. Infrarot spektroskopische Untersuchungen an *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützten Peptiden zeigten, dass intermolekulare Wasserstoffbrücken stärker mit dem *trans*-Konformer

ausgebildet werden. Diese erhöhen die Aktivierungsenergie die für die *trans*- nach *cis*-Isomerisierung benötigt wird [26]. In Gegenwart von Micellen, bestehend aus *N*-dodecyl-*N,N*-dimethyl-3-aminopropan-1-sulfonat (SB12), oder Phosphatidylcholinvesikeln, kann eine Stabilisierung der *trans*-Konformation in wässriger Umgebung beobachtet werden. Diese Stabilisierung des *trans*-Isomers geht einher mit einer Beschleunigung der CTI-Reaktion. Dabei ist die beschleunigte CTI nahezu vollständig enthalpisch kontrolliert was spezifische intramolekulare Effekte ausschließt [27]. Somit muss die Grundzustandsstabilisierung durch entropische Effekte erklärt werden was auf eine veränderte Solvatisierung schließen lässt. Die Tatsache, dass die CTI einfacher Amide und ungeladener prolinhaltiger Oligopeptide pH unabhängig im Bereich von 3 bis 10 ist, schließt generell eine Säure/Base-Katalyse der unkatalysierten *cis/trans*-Isomerisierung unter physiologischen Bedingungen aus. Eine säurekatalysierte CTI ist nur bei pH-Werten kleiner 0 möglich, da Amide eher am Carbonylsauerstoffatom als am Stickstoffatom der Peptidbindung protoniert werden [28, 29]. Ein kinetischer-Deuterium-Lösungsmittel-Isotopieeffekt (KSIE) von 1.0 gemessen für die spontane CTI schließt einen Protonenaustausch während der Isomerisierungsreaktion aus [30–32]. Eine Ausnahme bildet dabei das His-Pro Motiv. Kinetische Messungen ergaben, dass die protonierte Seitenkette des Histidylrestes, im Vergleich zur unprotonierten Spezies, die CTI-Geschwindigkeiten der His-Pro-Bindung um ca. Faktor 10 beschleunigt. Dagegen zeigten protonierte Arginyl und Lysyl Seitenketten an gleicher Position keinen Einfluss auf die Isomerisierungsgeschwindigkeit, verglichen mit den jeweiligen unprotonierten Formen. Für die His-Pro *cis/trans*-Isomerisierung in Angiotensin III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) konnte ein KSIE von 2.0 ± 0.1 bei pH Werten bestimmt werden die eine vollständige Protonierung der Histidyl-Seitenkette gewährleisten. Demzufolge handelt es sich hierbei um eine intramolekulare Katalyse, da für die unprotonierte Form des Angiotensin III kein KSIE gemessen werden kann. Diese Sequenzeigenheit wäre somit in der Lage geschwindigkeitsbestimmende Faltungsphasen in Proteinen, denen eine Prolylisomerisierung zugrunde liegt, in Abwesenheit von PPIasen zu beschleunigen [33].

1.1.4 Amidische Peptidbindungen

Sekundäre Amid-Peptidbindungen liegen in unstrukturierten Peptiden und Proteinen in der *trans*-Konformation vor. In der zwitterionischen Form des Gly-Gly Dipeptides beträgt ΔG^0 11.4 kJ/mol, d.h. ~ 0.1 % aller Moleküle nehmen die *cis*-Konformation ein (25°C, D₂O) [11, 12]. Trotz der hohen thermodynamischen Präferenz für das *trans*-Konformer liegt statistisch eine sekundäre Peptidbindung in *cis*-Konformation pro 1000 Aminosäuren als minimale Population in entfaltenen Proteinen vor. Diese *cis*-Bindung fluktuiert scheinbar durch die Polypeptidkette in Abhängigkeit der sequenzspezifischen ΔG^0 Werte [25]. Typische CTI-Halbwertszeiten für amidische Peptidbindungen in Dipeptiden liegen im Bereich von ~ 1 s. Diese Halbwertszeiten verringern sich in etwa um den Faktor vier, wenn diese Bindung innerhalb einer längeren Polypeptidkette lokalisiert ist. Die geringe *cis*-Population in amidischen Systemen im Vergleich zu Peptidyl-Prolylbindungen beruht dabei auf erhöhten *cis*- zu *trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeiten. Im Falle des Ala-Tyr Dipeptides beträgt dieser Unterscheid ca. Faktor 250 ($k_{c \rightarrow t} = 0.6 \text{ s}^{-1}$, $k_{t \rightarrow c} = 2.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 298 K) [12]. Generell kann man sagen, dass eine Kettenverlängerung die *cis*-Konformation in ungefalteten Polypeptiden destabilisiert und demzufolge zu verminderten *cis*-Population sowie verringerten ΔG^\ddagger -Werten, für die *cis*- nach *trans*-Rotation einer Peptidbindung, führt. Für die Ala-Tyr Peptidbindung z.B. beträgt die Aktivierungsenergie 76.7 kJ/mol (0.48 % *cis*) im Falle des Dipeptid, und 64.4 kJ/mol (0.11 % *cis*) im Falle des Pentapeptid Ala-Ala-Tyr-Ala-Ala [12]. Wenn amidische *cis*-Peptidbindungen in Proteinen auftreten sind sie meist in funktionell bedeutenden Bereichen lokalisiert, z.B. in der Nähe des aktiven Zentrums. Dabei nehmen diese Peptidbindungen meist ψ - und ϕ -Winkel ein die in der β -Region des Ramachandrandiagramms liegen [34]. Auffällig dabei ist die Tatsache, dass die Seitenketten-Seitenketteninteraktionen mehrheitlich aromatische Gruppierungen einbeziehen. In der unmittelbaren Umgebung von solchen amidischen *cis*-Peptidbindungen nähern sich die beiden benachbarten C $_{\alpha}$ -Atome (*i* und *i*-1) derart, dass die π -Elektronensysteme von aromatischen Seitenketten direkt mit dem entsprechenden C $_{i\beta}$ -Elektronen interagieren können. Dabei zeigt das Wasserstoffatom des C $_{i\beta}$ direkt auf das Zentrum des Aromaten und somit ermöglicht diese Anordnung attraktive C-H \cdots π Interaktionen [34]. Man nimmt an,

dass diese amidischen *cis*-Bindungen Energiespeicherstrukturen darstellen und direkt am Katalysemechanismus des jeweiligen Enzyms beteiligt sind [35].

1.1.5 Peptidyl-Prolylbindungen

Prolin als einzige Iminosäure unter den proteinogenen Aminosäuren nimmt bezüglich der konformationellen Dynamik, Reaktivität und Strukturdeterminante eine Sonderstellung in nativen als auch in ungefalteten Polypeptidketten ein [36, 37]. Die Grundzustandsenergie der *trans*-Konformation ist bei den imidischen Peptidyl-Prolylbindungen aufgrund des Pyrrolidinringes erhöht, und führt in einigen Fällen sogar zu äquimolaren Isomerenverhältnissen. In Abhängigkeit der Primärsequenz treten dabei *cis*-Populationen von 5 – 70 % auf. Typischerweise führt ein Prolylrest in ungefalteten Polypeptidketten zu einer konformationellen Heterogenität. Die Aktivierungsenergien für die CTI von Peptidyl-Prolylbindungen liegen im Bereich zwischen 60 und 100 kJ/mol in unstrukturierten Peptiden [38]. Die CTI zwischen den Isomeren kann demzufolge langsamer sein, als die biologischen Reaktion die an das zu isomerisierende Polypeptidsegment gekoppelt ist [39], denn es können Relaxationszeiten von bis zu einigen hundert Sekunden beobachtet werden [40–42]. Dies ist vor allem dann interessant, wenn während der Faltung von Proteinen eine solche Isomerisierungsreaktion entkoppelt von schnelleren Prozessen wie Kettenkollaps oder Sekundärstrukturbildung auftritt. Es ist oft möglich diese CTI als eine diskrete kinetische Phase im Anschluss an schnellere Vorgänge zu beobachten. Diese sind dann geschwindigkeitsbestimmend während der Faltung bzw. Rückfaltung und beeinflussen oft die biologische Aktivität dieser Proteine [43]. Die experimentell ermittelten ΔS^\ddagger -Werte ($\sim 0 \pm 5$ J/mol·K) für die CTI von Peptidyl-Prolylbindungen implizieren auch für die Rotation der Imidbindung einen enthalpisch kontrollierten Mechanismus [31]. Molekulardynamische Berechnungen lassen zusätzlich auf eine gerichtete Rotation um diese Bindung vermuten. Basierend auf dem Ser-Pro Motiv ergaben diese Berechnungen, dass die Rotation von $-180^\circ \leftrightarrow 0^\circ$ um ca. 12.5 kJ/mol begünstigt ist, im Vergleich zur Rotation von $180^\circ \leftrightarrow 0^\circ$. Die Energiebarrieren für die CTI sind dabei stark vom ψ -Winkel des Prolylrestes abhängig. Ein ψ -Winkel in der Größenordnung von -30° (α -helikale Region) ergab für die Rotation von $-180^\circ \leftrightarrow 0^\circ$ eine Aktivierungsenergie von 60 kJ/mol für die *trans*→*cis*- und 40 kJ/mol für die *cis*→*trans*-Isomerisierung. Die Rotation von $180^\circ \leftrightarrow 0^\circ$ bei gleichem ψ Winkel führte zu

einem ΔG^\ddagger von ~ 75 kJ/mol [44, 45]. Diese Arbeiten beschreiben zwar mechanistische Details korrekt, aber die berechneten Aktivierungsenergien stimmen nicht mit den experimentellen Befunden überein [8]. Im Vergleich zum ψ -Winkel ist der ϕ -Winkel von Prolylpeptidbindungen ($\sim 63^\circ$) durch den fünfgliedrigen Pyrrolidinring stark eingeschränkt, und verleiht prolinhaltigen Peptiden eine gewisse Biegesteifheit [46]. Generell verringert Prolin den konformationellen Raum besonders stark um das *cis*-Isomer. Dieser Effekt wird speziell während der „Loop“ Formierung deutlich. Die „Loop“ Bildung um ein *cis*-Prolyl ist bis zu fünfmal schneller verglichen mit einer *trans*-Prolylbindung an gleicher Position aufgrund verringerter End-zu-End Abstände [47]. Eine topologische Struktur bei der dieser Effekt von Bedeutung sein kann sind β -VI-Turns. Eine allgemeine Eigenschaft dieser β -VI-Turns ist eine *cis*-Prolylbindung welche eine Stabilisierung dieses Sekundärstrukturelementes durch Ringstapeleffekte erlaubt [48, 49]. Eine Stabilisierung des *cis*-Isomers über Ringstapeleffekte ist auch durch aromatische Aminosäuren möglich, wenn sich diese in direkter Sequenznachbarschaft zum Prolin befinden. Peptide der Form Yaa-Yaa-Xaa-Pro-Xaa-Yaa (Xaa und Yaa sind alle Aminosäuren außer Prolin) besitzen den höchsten *cis*-Isomeranteil wenn Xaa aromatisch ist [30, 48]. Im Gegensatz zu Lösungsmittel H/D-Austauschexperimenten zeigte der H/D-Austausch in C_α -Position des Prolin vorangestellten Aminosäurerestes im Tetrapeptid Suc-Ala-Ala-(C_α (H/D))-Pro-Phe-4-nitroanilid einen inversen Isotopieeffekt bezüglich des *cis/trans*-Gleichgewichtes ($K_H/K_D = 0.989 \pm 0.009$). Das bedeutet, dass diese Modifikation des Peptidrückgrates das *cis*-Isomer stabilisiert und lässt deshalb auf eine unterschiedliche Hyperkonjugation der Prolylisomere schließen [50]. Zusätzlich verlangsamt dieser H/D-Austausch die *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit ($k_H/k_D = 1.05 \pm 0.03$) und impliziert eine verstärkte Hyperkonjugation im Übergangszustand. Demzufolge muss die C-N-Rotation in diesem Stadium weit fortgeschritten sein und die Carbonylgruppe der Peptidbindung einen ketonähnlichen Übergangszustand einnehmen [50, 51]. Verändert man die Konfiguration des C_α -Atoms des Aminosäurerestes vor bzw. nach Prolin, d.h. ein Austausch durch die entsprechende D-Aminosäure, erhöht man den Anteil des *cis*-Isomers der Peptidyl-Prolylbindung. Zusätzlich verändert sich die *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit derart, dass von einem destabilisierten *trans*-Grundzustand im Vergleich zum Übergangszustand in folge der Konfigurationsumkehr ausgegangen werden kann [52].

1.2 Die Thioxozeptidbindung

1.2.1. Allgemeine Eigenschaften

Die Thioxozeptidbindung unterscheidet sich von Oxozeptidbindungen durch die Substitution des Carbonylsauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom. Quantenmechanischen Berechnungen zufolge sollte diese Bindung, analog zur Peptidbindung, in planarer Konformation vorliegen [53–56]. Röntgenkristallographische- [57–59] sowie IR-, CD- [60, 61] und NMR-Untersuchungen [60–63] an Substanzen, die Thioxozeptidbindungen enthalten, konnten dieses bestätigen, zeigten aber auch, dass die C=S-Bindung um ca. 0.4 Å im Vergleich zur C=O-Bindung gestreckt ist, d.h. eine Bindungslänge von ca. 1.65 Å aufweist (Tabelle 1).

Tabelle 1.1: Eigenschaften der Amid bzw. Thioxoamidbindung.

Amidbindung	Thioxoamidbindung
C=O Bindungslänge: 1.24 Å	C=S Bindungslänge: 1.65 Å
kovalenter Radius: Sauerstoff ~ 0.73 Å	kovalenter Radius: Schwefel ~ 1.02 Å
van-der-Waals-Radius: Sauerstoff ~ 1.4 Å	van-der-Waals-Radius: Schwefel ~ 1.85 Å
C=O Bindungsenergie: ~710 kJ/mol	C=S Bindungsenergie: ~ 543 kJ/mol
Elektronegativität: Sauerstoff ~3.5	Elektronegativität: Schwefel ~2.4
pK _a des NH: ~17	pK _a des NH: ~11–13

Die größere NH-Azidität der Thioxoamidbindung [64] im Vergleich zur Oxozeptidbindung ist vermutlich die Folge einer effektiveren Resonanzstabilisierung der nach Deprotonierung vorliegenden negativen Ladung [53]. Das führt dazu, dass Wasserstoffbrücken, in denen das N-H der Thioxozeptidbindung als Donor fungiert (NH-C=O...HN-C=S), in der Regel stärker sind als Wasserstoffbrücken vom NH-C=O...HN-C=O Typ. Wenn hingegen das Schwefelatom der Thioxozeptidbindung als Wasserstoffbrückenakzeptor dient, sind diese, aufgrund der geringeren Basizität des Schwefelatoms im Vergleich zum Carbonylsauerstoffatom, in der Regel schwächer [65]. Allerdings deuten theoretische Berechnungen für die Gasphase darauf hin, dass das Schwefelatom der Thioxozeptidbindung eine größere Protonenaffinität verglichen mit dem Sauerstoffatom der Peptidbindung besitzt [66]. Experimentell können Nah-IR-Spektren genutzt werden um die thermodynamische Stabilität von Wasserstoffbrückenbindungen zu analysieren. Für *N,N*-

Dimethylthioformamid (DMTF) als Wasserstoffbrückenakzeptor konnten ΔH^0 -Werte von 24.2 kJ/mol (Donor: Thioacetamid = TA) bzw. 20.9 kJ/mol (Donor: Thiopropionamid = TPA) für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in Tetrachlormethan ermittelt werden. Benutzt man hingegen *N,N*-Dimethylformamid (DMF) als Wasserstoffbrückenakzeptor erhält man ΔH^0 -Werte die ca. 40 % kleiner sind [67]. Das bedeutet, dass die Protonierung des Schwefelatoms einer Thioxozeptidbindung thermodynamisch günstiger ist als die Protonierung des Sauerstoffatoms einer Peptidbindung. Dieses wird auf die Größe und geringerer Elektronegativität des Schwefelatoms verglichen mit dem Sauerstoffatom zurückgeführt die vermutlich zu einer stärkeren Verschiebung der π -Elektronenladungsdichte in Richtung des Thiocarbonylatoms führt [68]. Die Gleichgewichtskonstante für die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung ist hingegen in DMTF ca. sechsmal niedriger als in DMF. Dieser Gegensatz beruht auf einer entropischen Kompensation und hängt mit der Polarität des Donors zusammen [67]. Für Thioxoformamid wurde gezeigt, dass dieses polarer als Formamid ist [68]. Demzufolge sind apolare Lösungsmittelmoleküle wie CCl_4 stärker um Amide strukturiert. Wenn eine Wasserstoffbrückenbindung in CCl_4 ausgebildet wird (TA als Donor), kommt es demzufolge zu einem größeren Entropiegewinn für DMF als für DMTF. Dieser entropische Unterschied führt letztendlich zu einer kleineren Gleichgewichtskonstante für die Wasserstoffbrückenbildung von Thioxoamiden im Vergleich zu Amidien [67]. Zusammenfassend kann man sagen, dass Wasserstoffbrückenbindungen der Thioxozeptidbindung, in denen der Schwefel als Akzeptor dient, stärker sind als die der korrespondierenden Oxo-Analoga. Die entropische Kompensation dieser thermodynamisch günstigen Konstellation hängt dabei von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Substanzmolekülen und Lösungsmittel ab. Das bedeutet, dass selbst in diesen einfachen Systemen die beobachtetenenthalpischen und entropischen Effekte eine Summe mehreren Einzelfaktoren darstellen.

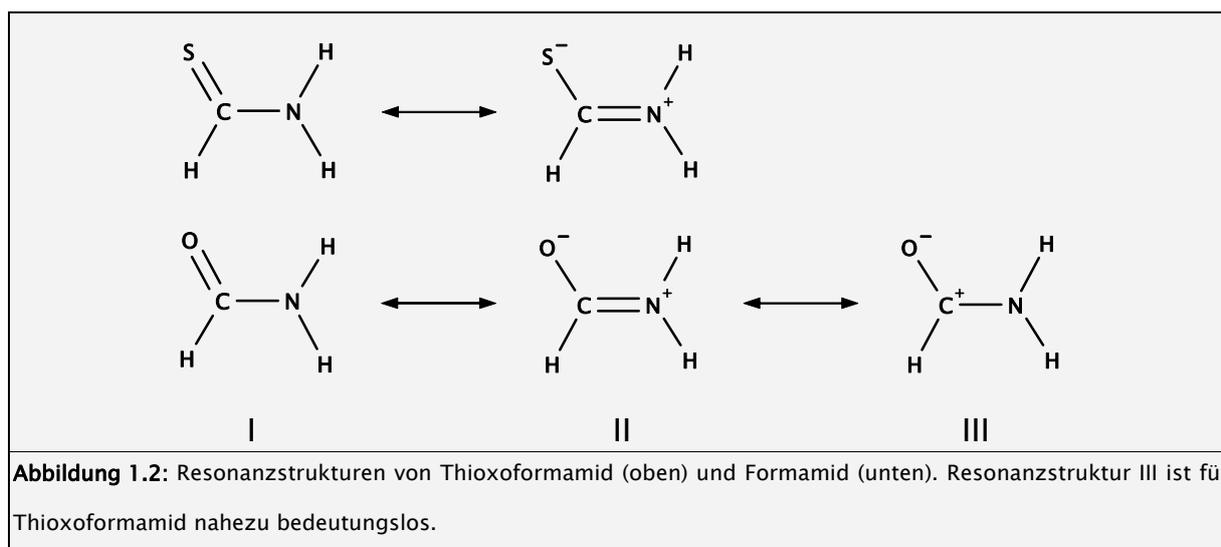
Die Energiebarriere der C–N-Bindungsrotation zeigt erhebliche Unterschiede, vergleicht man Thioxoamide und Oxo-Amiden [69, 70].

$$\text{Gleichung 1.2: } \Delta G_{\text{Thioxoamid}}^{\ddagger} = a + b\Delta G_{\text{Amid}}^{\ddagger}$$

ΔG^{\ddagger} in kcal/mol; **a** = 1.13; **b** = 1.11 Gleichung wurde der Referenz [71] entnommen.

Vergleicht man die Höhe der Rotationsbarriere um die C–N–Bindung von *N,N*-disubstituierten Amiden und Thioxoamiden in verschiedenen unpolaren Lösungsmitteln ergibt sich eine lineare Abhängigkeit (**Gleichung 1.2**) [71]. Obwohl die Aktivierungsenergie von der Polarität des Lösungsmittels [72] und von vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen [73] abhängig ist, kann diese Gleichung auch auf unstrukturierte Thioxozeptide der Form Xaa-Ψ[CS–N(H)]–Yaa (Xaa und Yaa sind beliebige Aminosäuren) in wässrigen Systemen übertragen werden [74–76]. Berücksichtigt man nur die Elektronegativitäten ($EN_{\text{Sauerstoff}}=3.5$; $EN_{\text{Schwefel}}=2.5$) würde man einen stärkeren Doppelbindungscharakter der C–N–Bindung in Amiden erwarten und somit höhere Rotationsbarrieren für die C(=O)–N Einheit. Theoretische Berechnungen ergaben dennoch einen höheren Doppelbindungscharakter für die Thioxoamidbindung [15, 56, 68, 77–79]. Die ähnlichen Elektronegativitäten von Schwefel (2.5) und Kohlenstoff (2.4) führen dazu, dass die Thioxocarbonylbindung nur wenig polarisiert ist und somit die Elektronendichte des Schwefelatoms relativ gering ist. Weiterhin ist Schwefel als gut polarisierbares Atom in der Lage einen verhältnismäßig hohen Anteil an π -Elektronenladungsdichte vom Stickstoff aufzunehmen und in der Thioxoamidbindung zu akkumulieren. Eine Korrelation zwischen Atomgröße und Rotationsbarriere konnte mit Hilfe von Formamidderivaten gefunden werden. In diesen Substanzen wurde das Sauerstoffatom selektiv gegen Schwefel, Selen oder Tellur ausgetauscht [56, 78]. Aus diesen Experimenten konnte geschlussfolgert werden, dass zusätzlich die Atomgröße den π -Elektronentransfer begünstigt, so dass sich die Ladungsdichte am Heteroatom nicht so stark erhöht, wie in Sauerstoff an gleicher Position. Theoretische Betrachtungen ergaben weiterhin, dass die C–O–Bindungslänge, während der Rotation um die Peptidbindung, kaum beeinflusst wird [80]. Das bedeutet, dass in diesem Prozess wenig Ladung vom Amidstickstoff- oder Carbonylkohlenstoffatom auf den Sauerstoff übertragen wird und der π -Elektronentransfer hauptsächlich zwischen Amidstickstoff und Carbonylkohlenstoff stattfinden muss. Aufgrund der verringerten Größe bzw. der bereits vorhandenen hohen Partialladungsdichte ist weiterer Ladungstransfer auf den Sauerstoff somit im Vergleich zum Schwefel energieaufwändiger. Demzufolge wird die Ladungsverteilung von Formamid am besten mit 3 Resonanzstrukturen beschrieben, im Gegensatz zu Thioxoformamid wo zwei Grenzstrukturen ausreichend sind (**Abbildung 1.2**). Ein großer Teil des Energiebetrages der für die CTI aufgebracht werden muss ist jedoch

unabhängig von der Konjugation der π -Elektronen und somit unabhängig von der Amidresonanz [81]. Dieser Energiebetrag ist notwendig um die Hyperkonjugation zwischen dem freiem Elektronenpaar des Amidstickstoffes und dem positivierten Carbonylkohlenstoff zu lösen. Aufgrund des stärker polarisierten Kohlenstoffatoms ist diese Hyperkonjugation bei Amiden intensiver, wird jedoch bei Thioxoamiden durch effektivere π -Konjugation überlagert.



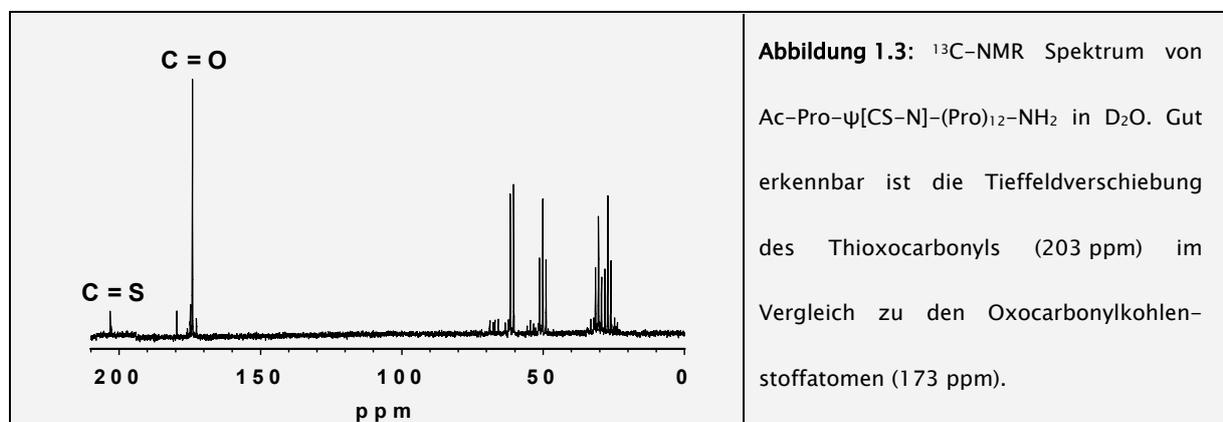
Verglichen mit den entsprechenden Oxo-Derivaten haben Thioxoamide ein deutlich größeres Dipolmoment. Dieses Dipolmoment ändert sich während der Bildung des Übergangszustandes der *cis/trans*-Isomerisierung, wodurch dipolare Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen die Rotationsbarriere nachhaltig beeinflussen [79]. Generell ist das Dipolmoment im Grundzustand stärker ausgebildet als im Übergangszustand (siehe Abschnitt 1.1.3). Deshalb erhöhen dipolare Wechselwirkungen der Peptidbindung mit den Lösungsmittelmolekülen die Aktivierungsenergie der CTI. Da die Dipolmomente des Grundzustandes in thioxylierten Peptidbindungen größer als in nichtthioxylierten sind, beeinflusst die Polarität des Lösungsmittels die Aktivierungsenergie in Thioxozeptiden stärker.

Die ψ - und ϕ -Winkel einer Thioxozeptidbindung sind, im Vergleich zu einer entsprechenden Oxozeptidbindung, stärker eingeschränkt. Ursache dafür ist der größere kovalente- und van-der-Waals-Radius des Schwefelatoms sowie eine verlängerte CS- im Vergleich zur CO-Doppelbindung. So erhöht eine Thioxylierung z.B. die Grundzustandsenergie, wenn die nachfolgende Aminosäurerestes ϕ -Winkel von $\sim 120^\circ$ bzw. $\sim -120^\circ$ einnimmt, da es bei

diesen Winkeln zu van-der-Waals Kontakten zwischen Schwefelatom und der Seitenkette des nachfolgenden Aminosäurerestes kommt [82]. Theoretischen Berechnungen zufolge sollte die Thioxozeptidbindung dennoch innerhalb von α -Helices, β -Faltblattstrukturen sowie Schleifenstrukturen toleriert werden [80–85]. Nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe (Wildemann *et al.*, Manuskript eingereicht) und Arbeiten von Miwa *et al.* [65] zeigen, dass das der Fall ist, solange ausreichend Raum für das voluminösere Schwefelatom vorhanden ist. In β -Schleifenstrukturen vom Typ II beispielsweise ist dieser Raum nicht vorhanden, sodass die Schleifenausbildung durch den größeren van-der-Waals-Radius des Schwefelatoms behindert ist wenn dieser in Position $i+1$ lokalisiert ist [86, 87].

1.2.2 Spektroskopische Eigenschaften und Photoschaltung der Thioxozeptidbindung

Im Allgemeinen zeigen die UV- und CD-spektroskopischen Absorptionsbanden der Thioxozeptidbindung eine Rotverschiebung im Vergleich zur amidischen Peptidbindung. Das Absorptionsmaxima des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ Übergangs von amidischen Peptidbindungen ~ 190 nm ($\epsilon \sim 7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ist in Thioxozeptidbindungen bathochrom auf ca. 250 bis 285 nm ($\epsilon \sim 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) verschoben. Dasselbe ist auch für den ${}^1n_s\text{-}{}^3\pi^*$ Übergang zu beobachten der bei thioxylierten Peptidbindungen in den Bereich von ca. 300 bis 350 nm fällt ($\epsilon \sim 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; n_s = nichtbindende Orbitale des Schwefels) [62, 88–92]. Für „normale“ Peptidbindungen liegt der ${}^1n\text{-}{}^3\pi^*$ Übergang bei ~ 220 nm ($\epsilon \sim 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [88]. ${}^{13}\text{C}$ NMR-spektroskopisch erscheint das Thiocarbonylkohlenstoffatom der Thioxozeptidbindung bei ca. 200–206 ppm d.h., ~ 30 ppm Tieffeld verschoben gegenüber dem Oxocarbonylkohlenstoffatom einer Peptidbindung (**Abbildung 1.3**).



Dieses Phänomen betrifft auch die Amidprotonen einer Thioxoamidgruppe. So sind die Amidprotonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu tieferem Feld um ca. 1.5–2 ppm verschoben, und somit auch aus einer größeren Masse von „normalen“ Amidprotonen separierbar [62]. Aufgrund der größeren Masse des Schwefelatoms im Vergleich zum Sauerstoff zeigen auch die IR-Spektren von Thioxozeptiden Differenzen wenn man diese mit Spektren der entsprechenden Oxo-Analoga vergleicht. So ist z.B. die Amid-A-Bande (N-H Streckschwingung) von Thioxozeptidbindungen ($\sim 3400\text{--}3420\text{ cm}^{-1}$), gemessen in unpolaren Lösungsmitteln, zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Zum Vergleich, die Amid-A-Bande eines entsprechenden Amides absorbiert bei ca. $3430\text{--}3460\text{ cm}^{-1}$ [61, 93]. Generell kann die Wellenzahlverschiebung mit Hilfe des Hookschen-Gesetzes (**Gleichung 1.3**) für kleinere Moleküle abgeschätzt werden.

<p>Gleichung 1.3: $\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{f \frac{(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$\tilde{\nu} = \text{Wellenzahl der Schwingung in cm}^{-1}; f = \text{Kraftkonstante die charakteristisch für die Stärke der Bindung ist; } m_1, m_2 = \text{Massen der Atome.}$</p>

Diese spektroskopischen Besonderheiten ermöglichen eine gezielte Beobachtung der Thioxozeptidbindung sofern diese selektiv in ein Polypeptid integriert werden kann. Weiterhin erlauben die unterschiedlichen Absorptionsmaxima und molaren Extinktionskoeffizienten der Thioxozeptid-*cis/trans*-Isomere eine photoinduzierbare Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes mittels UV-Licht. Für *N*-Methylthioxoacetamid konnte eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 5 nm sowie eine Abnahme der Extinktion um ca. 10 % durch Bestrahlung bei 253.7 nm beobachtet werden. Nach Abschluss der Photoanregung erfolgte eine Relaxation hin zum Ausgangsspektrum [92]. Diese Technik erlaubt es somit den meist geringen Anteil des *cis*-Konformeren deutlich zu erhöhen. Unter geeigneten Bedingungen kann man, bedingt durch die hohe Rotationsbarriere der Thioxozeptidbindung, die Isomere nach Bestrahlung trennen. Dieses wurde erstmals anhand der Endormorphinderivate H-Tyr- ψ [CS-N]-Pro-Trp-Phe-NH₂ und H-Tyr- ψ [CS-N]-Pro-Phe-Phe-NH₂ gezeigt. Interessanterweise wiesen nur die *cis*- Tyr- ψ [CS-N]-Pro Isomere eine biologische Aktivität auf, welches die Relevanz von Einzelkonformationen als determinierenden Faktor von biologischen Prozessen betont [94].

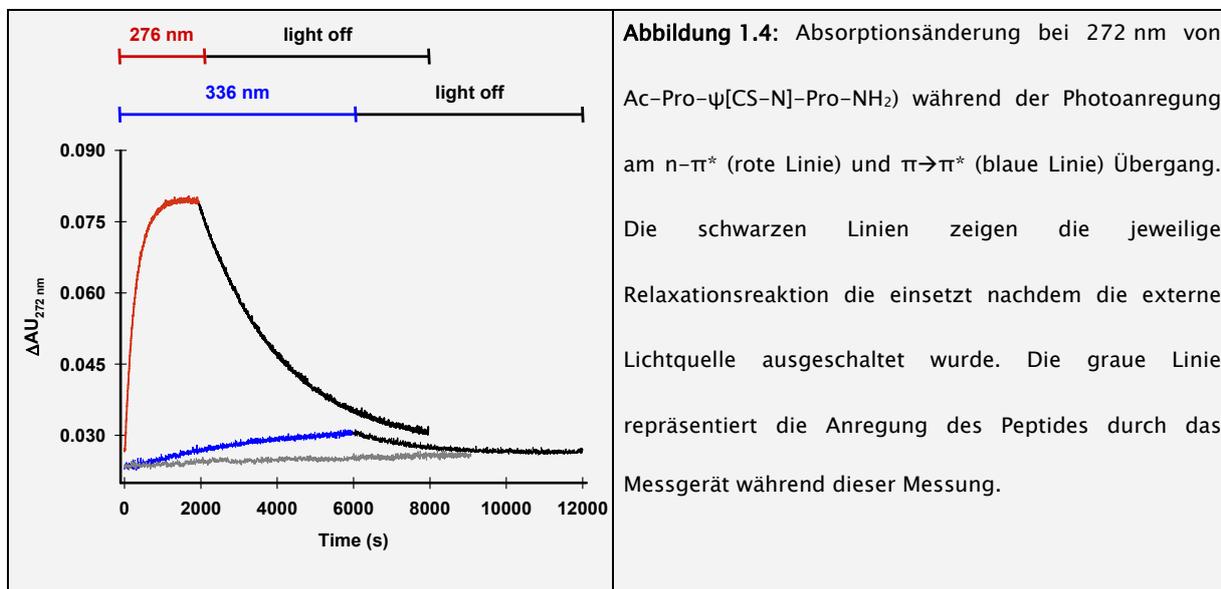
Die Anregung des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ Übergangs einer Thioxozeptidbindung führt zu elektronischen Triplet-Zuständen die im Picosekundenbereich zerfallen. Für die daran gekoppelte *trans*-nach *cis*-Isomerisierung wurde gezeigt, dass diese innerhalb einer Nanosekunde abgeschlossen ist [95]. Eine intensive Anregung des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ Übergangs geht jedoch auch mit chemischen Zersetzungsprozessen einher wie Untersuchungen an *N*-Methylthioxoacetamid zeigten [92, 96]. Aus Photolysestudien die an Isothiocyanatsäure (HNCS) durchgeführt wurden konnten drei initiale Mechanismen abgeleitet werden (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Initiale Zersetzungsreaktionen von Isothiocyanatsäure.

	Reaktion	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔH^\ddagger in J/Molekül	Referenz
(1)	$\text{HNCS} \rightarrow \text{NCS} + \text{H}$	472	$7.84 \cdot 10^{-19}$	[97]
(2)	$\text{HNCS} \rightarrow \text{HNC} + \text{S}$	288–472	$4.78 - 7.84 \cdot 10^{-19}$	[97]
	Gefolgt von $\text{S} + \text{HNCS} \rightarrow \text{S}_2 + \text{HNC}$			
(3)	$\text{HNCS} \rightarrow \text{NH} + \text{CS}$	497	$8.25 \cdot 10^{-19}$	[98]

Mechanismus (2) stellt den energetisch günstigsten Prozess dar. Die elektronischen Verhältnisse in Isothiocyanatsäure sind nicht vollständig vergleichbar mit denen einer Thioxozeptidbindung, dennoch sollten die energetischen Beträge für die Photolyse in etwa äquivalent sein. Die Energiebeträge für die Radikalbildung liegt demnach im Bereich der Lichtenergie die für die ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ ($\lambda_{276 \text{ nm}} = 7.2 \cdot 10^{-19} \text{ J/Photon}$) und $n\text{-}\pi^*$ ($\lambda_{336 \text{ nm}} = 5.9 \cdot 10^{-19} \text{ J/Photon}$) Anregung einer Thioxozeptidbindung benötigt wird. Dennoch ist es möglich unter geeigneten Bedingungen eine vollständig reversible Konformationsänderung durch Bestrahlung ohne begleitende Photozersetzung durchzuführen [99]. Um die Nebenreaktionen zu vermeiden scheint eine Photoanregung am $n\text{-}\pi^*$ Übergang am vorteilhaftesten. Jedoch verhindert die geringe Absorptionseffizienz ($\epsilon \sim 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) der Thioxozeptidbindung am $n\text{-}\pi^*$ Übergang eine messbare Auslenkung des Konformergleichgewichtes ohne geeignete Laserquelle (Abbildung 1.4). Die Photoanregung einer Thioxozeptidbindung kann zusätzlich zu einem verändertem Thioxo-amin/Thioxo-imino-Gleichgewicht führen. Die berechneten Energiedifferenzen für die Thioxo-amin- ($\text{C}(=\text{S})\text{-N}$)/Thioxo-imino- ($\text{C}(\text{-S-H})=\text{N}$) tautomerisierung am Beispiel von Thioacetamid (39.1 kJ/mol) und Thioformamid (41.4 kJ/mol) zeigen, dass diese Reaktion unter

Bestrahlungsbedingungen wahrscheinlich ist [100]. Aufgrund der hohen Grundzustandsenergie­differenz ist ohne Bestrahlung nur das Thioxo-amino-Tautomer zu beobachten [101–103].



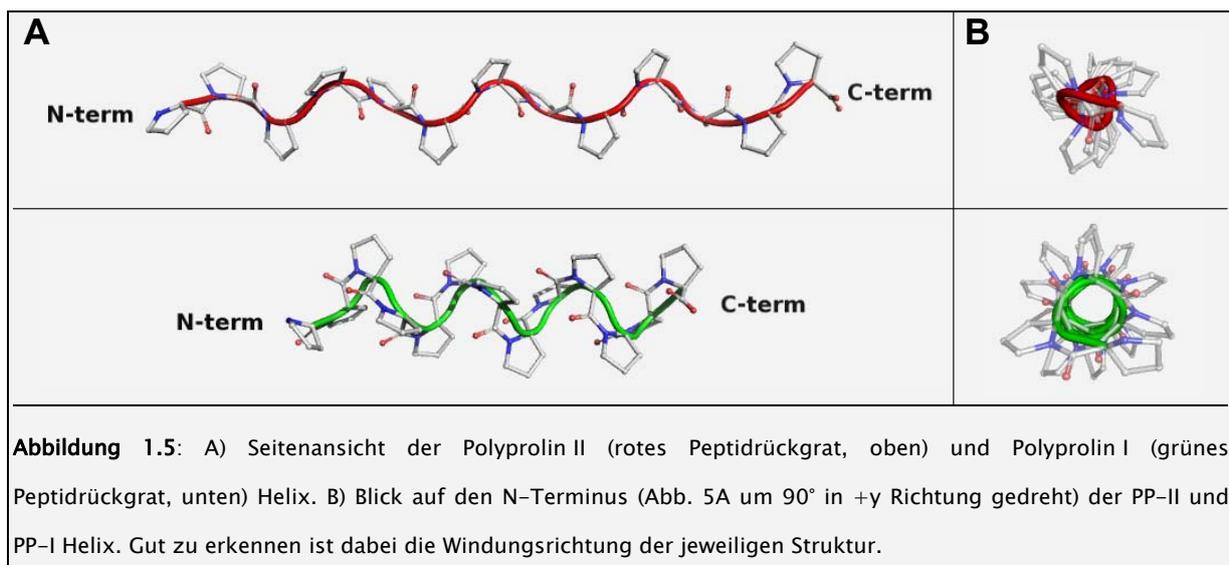
Eine Induktion der Thioxo-imino-tautomeren Form durch Bestrahlung wurde bisher schon für verschiedene schwefelhaltige Heterozyklen [104–106] als auch für Thioacetamid nachgewiesen [107]. In all diesen Fällen führte die UV-Anregung zu einem Protonentransfer von einem Stickstoffatom in räumlicher Nähe zum Schwefelatom der C=S-Gruppe. Dabei war die Voraussetzung für diesen Protonentransfer jeweils eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung im Substanzmolekül. Im Falle der Thioxo-peptidbindung kann dieses Proton entweder aus einer intramolekularen- oder aus einer Wasserstoffbrückenbindung die mit dem Lösungsmittel ausgebildet wird stammen. Berechnungen zufolge ist die Thioxo-imino-Form bei einem ω -Winkel von 0° am stabilsten und somit sollte das Thioxo-imino-Tautomer spontan eine *trans*- zu *cis*-Isomerisierung induzieren. Die Relaxation von der Thioxo-imino- zum Thioxo-amino-Tautomer ist dann wiederum an die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Peptidbindung gekoppelt [108]. Eine genaue Untersuchung der photoinduzierten Thioxo-imino-Form ($\lambda > 270 \text{ nm}$) von Thioacetamid ergab, dass vier unterschiedliche Konformeren gebildet werden. Diese unterschieden sich bezüglich der räumlichen Position des SH-Protons was anhand des Verlustes der symmetrischen und antisymmetrischen NH₂-Streckschwingungen im IR-Bereich beobachtbar ist [107].

Mittels Festphasenpeptidsynthese kann nun eine solche Thioxozeptidbindung, in den Grenzen dieser Methode, in ein Oligopeptid integriert werden [109]. Diese photoschaltbare Sonde erlaubt dann eine selektive Konformationsänderung innerhalb der Kette deren Relaxation mit einfachen spektroskopischen Methoden verfolgt werden kann. Interessant ist es nun diese Technik einzusetzen, um den Einfluss der Konformation einer einzelnen Peptidbindung auf die Sekundärstrukturausbildung und biologische Aktivität von Proteinen zu beobachten. Insbesondere erlaubt diese Methode die Bestimmung positionsabhängiger kinetischer und thermodynamischer Parameter von Sekundärstrukturausbildungen. Dieses wiederum kann Hinweise auf die Größe der Kräfte liefern die für Strukturbildung und Faltung verantwortlich sind.

1.3. Polyprolin

1.3.1 Die Polyprolinhelix

Der Polyprolin II Helix (PP II) wurde, im Gegensatz zu den klassischen Sekundärstrukturen wie α -Helix, β -Faltblatt oder Schleifenstrukturen, bisher wenig Beachtung geschenkt. So findet z.B. die Publikationssuchmaschine PUBMED (www.pubmed.org) 14100 Einträge nach Eingabe des Begriffes „*alpha helix*“, 8106 Einträge verweisen auf „*beta sheets*“ aber nur 655 Verknüpfungen werden für „*polyproline*“ gefunden (Stand 17.01.2007). Dieses Phänomen ist darauf zurückzuführen, dass dieses Sekundärstrukturelement oft als ungefalteter oder „*random coil*“ Zustand angesehen wurde [110, 111]. In der Zelle dagegen sind PP II-helikale Polypeptide von großer Bedeutung für die Übertragung zellulärer Signale. Sie sind involviert in Transkriptionsvorgänge, sind an Zellmigrationsvorgängen beteiligt und spielen eine Rolle bei der humanen Immunantwort [112, 113]. Weiterhin scheint diese Struktur an der Formierung von amyloiden Filamenten beteiligt zu sein [114]. Darüber hinaus sind PP II Helices in der Lage DNA zu binden [115] und stellen ein weit verbreitetes Protein-Protein Interaktionsmotiv dar [111, 116–120]. Die PP II-Helix ist eine linksgängige Rückgratstruktur die erstmals in Prolinhomopolymeren beobachtet wurde. Diese Poly-L-Prolinhomopolymere können lösungsmittelabhängig zwei helikale Strukturen einnehmen (**Abbildung 1.5**) [121].



In wässriger Lösung wird eine gestreckte, linksgängige „*all-trans*“ Helix, die PP II-Helix, ausgebildet. Diese hat eine Steighöhe von 9.3 Å/Windung (= 3 Aminosäurereste) und wird

deshalb auch als 3_1 Helix bezeichnet. Die dihedralen Winkel in dieser Konformation betragen $\omega \sim 180^\circ$, $\phi = -80 \pm 45^\circ$ und $\psi = 142.5 \pm 42.5^\circ$ [110, 122, 123]. Löst man Poly-L-Prolinpeptide in hydrophoben Lösungsmitteln wie Isopropanol oder n-Hexan bildet sich eine rechtsgängige „all-*cis*“ Helix, die Polyprolin I (PP I) Helix aus. Diese ist charakterisiert durch eine Steighöhe von 5.6 Å/Windung, wobei im Durchschnitt 3.3 *cis*-Prolinreste für eine komplette Windung benötigt werden. Die Peptidbindungswinkel betragen in diesem Fall $\omega \sim 0^\circ$, $\phi \sim -75^\circ$ und $\psi \sim +160^\circ$ [124]. Generell bilden Prolinhomopolymere in wässriger Umgebung eine PP II-Helix. Diese Struktur kann auch von Oligopeptiden die kein Prolin enthalten eingenommen werden wie z.B. Polyglycin, Polylysin [125–127], Polyglutamat, Polyaspartat [128], und Polyalanin [129]. Allerdings zeigen diese nicht Prolin Polypeptide zum Teil veränderte Helixtopologien. So bilden z.B. Poly-L-Lysine und Poly-L-Glutamate eine etwas kürzere 2.5₁-Helix aus, was aber auch auf schnellen Wechseln zwischen PP II- und einer gestreckten β -Faltblattstruktur beruhen kann [130]. Prolin innerhalb einer Aminosäuresequenz begünstigt die Ausbildung einer PP II-Helix wohingegen Glycin und aromatische Aminosäuren die Ausbildung dieser Struktur im Allgemeinen behindern. Betrachtet man nun die dihedralen Winkel des Aminosäurerestes Xaa in Tripeptiden der Form Ala-Xaa-Ala kann man feststellen, dass Prolyl- und Lysylreste Winkel einnehmen, die typisch für eine PP II-Struktur sind. Die Reste Val, Phe, Trp, His und Ser nehmen ω -, ϕ -, und ψ -Winkel ein, die charakteristisch für gestreckte β -Faltblätter sind, wohingegen Ala, Met, Gly und Leu beide Strukturen mit annähernd gleichen Konzentrationen populieren [131]. Die Tripeptide Glu-Glu-Glu, Asp-Asp-Asp und Lys-Lys-Lys nehmen ebenfalls eine PP II-Struktur ein [132]. Selbst das Ala-Ala Dipeptid nimmt zu einem gewissen Anteil Winkel ein, die denen der PP II-Konformation entsprechen [133]. Im Gegensatz dazu ist für Trivalin die gestreckte β -Faltblattstruktur die Hauptkonformation in wässriger Umgebung [134, 135]. Daraus ergibt sich folgende Tendenz eine PP II-Struktur auszubilden: Pro >> Ala > Gly ~ Leu ~ Met > Val [132]. Diese Hierarchie bleibt selbst dann erhalten, wenn sich diese Reste innerhalb einer längeren Polypeptidkette befinden wie am Beispiel einer „Host-Guest“ Studie an Ac-(Pro)₃-X-(Pro)₃-Gly-NH₂ erarbeitet wurde [116]. Dass diese *in vitro* Befunde den Verhältnissen in Proteinen entsprechen zeigten systematische Analysen der „coil library“ der PDB Datenbank. Demzufolge ist die *in vitro* ermittelte Tendenz für Aminosäuren eine PP II-Struktur einzunehmen auch in Proteinen zu finden [136]. Das bedeutet, dass individuelle

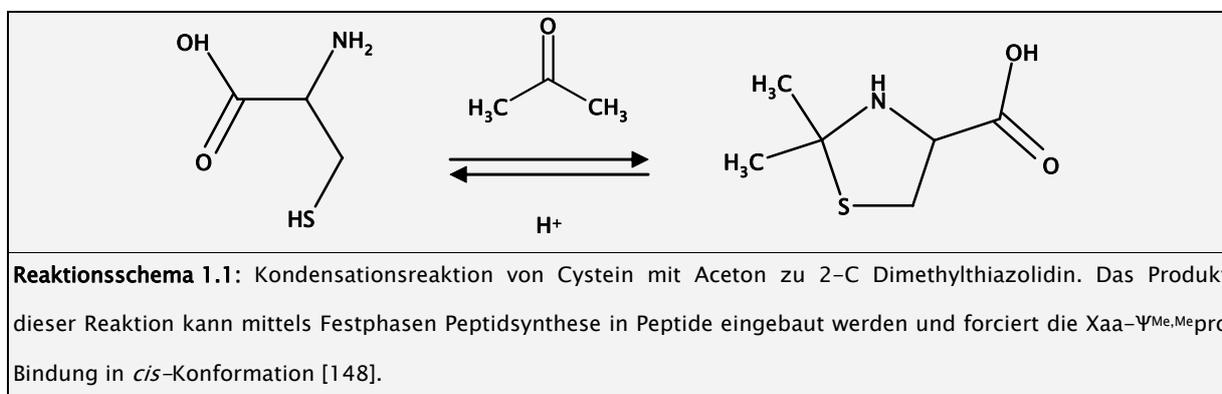
Aminosäuresequenzabschnitte eine spezifische strukturelle Präferenz im wässrigen Milieu aufweisen und somit nicht alle sterisch erlaubten Konformationen mit gleicher Wahrscheinlichkeit populiert werden. Weiterhin ist die Neigung von Aminosäuresequenzen eine PP II-Struktur einzunehmen unabhängig vom Prolingehalt, sondern stellt eine intrinsische Eigenschaft von Polypeptiden dar.

Theoretische und experimentelle Studien über die PP II-Struktur zeigen, dass in wässriger Umgebung Wasser die sequentiell benachbarten Carbonylsauerstoffatome über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren [137–139]. Diese Carbonylsauerstoff-Wasser-Carbonylsauerstoff-Brücken scheint eine der treibenden Kräfte zu sein weshalb in wässriger Lösung die *trans*-Konformation in der PP II-Struktur dominiert. Intermolekulare Wasserstoffbrücken können nicht in dieser Helixform ausgebildet werden, da die Carbonylgruppen in der PP II-Struktur dieses aus sterischen Gründen nicht zulassen [140]. Diese Wasser-Carbonyl-Cluster treten in der PP I-Konformation nicht auf, da in dieser Struktur die Carbonylsauerstoffatome von den Seitenketten der entsprechenden Aminosäuren überdeckt werden und somit nicht mehr lösungsmittlexponiert sind. Dieser Umstand erklärt unter anderem, warum Prolin homopolymere eine PP I-Helix in hydrophoben Lösungsmitteln bilden. Das Fehlen von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen und der entropische Stabilisierung durch die Abschirmung der hydrophilen Carbonylsauerstoffatome in der „all-*cis*“-Konformation, initiiert einen sequentiellen Isomerisierungsprozess der mit dem Erreichen der PP I-Helix endet [141]. Allerdings wurde die PP I-Helix bisher in keiner Proteinstruktur gefunden, sodass davon auszugehen ist, dass diese Helixform kaum eine biologische Relevanz besitzt. Eine Analyse der HOMSTRAD Datenbank ergab, dass die PP II-Konformation 3 % aller Peptidkonformationen in dieser Strukturdatenbank repräsentiert. Dieser Wert reduziert sich auf 1.3 % wenn man nur Helices mit mehr als drei Resten in dieser Konformation berücksichtigt [110].

Arbeiten von Slate *et al.* zeigten, dass Polyprolinpeptide sowohl in der PP II- als auch in der PP I-Konformation ein gewisses Helixdipolmoment besitzen [142]. Dafür wurden seitenkettenmodifizierte 4-Amino-L-Prolin im Abstand von drei Resten in ein Polyprolin eingebaut. Die Seitenketten der 4-Amino-L-Prolin waren dabei mit photoanregbaren Redoxpaaren modifiziert. Der lichtinduzierte Elektronentransfer war nahezu identisch in beiden Helixformen und erfolgte immer über das Polypeptidrückgrat und nicht über das

Lösungsmittel. Dabei war der Transfer unabhängig von der Anzahl der N- und C-terminalen Prolinerweiterungen [142].

Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung können genutzt werden um Aussagen über das dynamische Verhalten von Polypeptiden zu treffen. Mit Hilfe dieser Methode kann man den Gyrationradius eines Moleküls bestimmen. Zagrovic und Mitarbeiter nutzten das Ace-(diaminobutyrinsäure)₂-(Ala)₇-(ornithin)₂-NH₂ Peptid als Modell für ein PP II-strukturiertes Element und bestimmten dessen Gyrationradius [143]. In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass das (Ala)₇ Peptid bei 25°C hauptsächlich in der PP II-Konformation vorliegt [129]. Die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung an diesem Peptid zeigten, dass dieses Molekül in kurzer Zeit ein viele verschiedene Strukturen durchläuft und somit immer nur kleine Sequenzabschnitte eine ideale PP II-Geometrie in diesem Zeitraum einnehmen können [143]. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten die den hydrodynamischen Radius von Poly-L-Prolin beschreiben. Auch hier wurde ein Radius bestimmt, der deutlich kleiner war als der theoretische Radius für eine ideale PP II-Struktur [144, 145]. Eine Erklärung dafür lieferten NMR-spektroskopische Untersuchungen an Poly-L-Prolinen (M_w~60.000). In D₂O befanden sich, unter diesen Bedingungen, 2-3 % der Peptidbindungen in *cis*-Konformation. Diese *cis*-Bindungen sollten den Autoren zufolge zufällig über die Kette verteilt sein [146]. Allerdings ist diese *cis*-Fraktion zu klein um die experimentell ermittelten hydrodynamischen Radien zu erklären [144], weshalb eine zusätzliche PP II-Konformation vorgeschlagen wird, die ψ -Winkel in der Region von -50° besitzen soll [144, 145]. Mit Hilfe von Pseudoprolin (Ψ pro) Substitutionen wurde der Einfluss von *cis*-Prolylbindungen auf die Strukturierung der PP II Helix untersucht [147].



Pseudoprolin wie z.B. das 2-C dimethylierte Thiazolidin können durch die Kondensationsreaktion von Aminosäuren, in diesem Fall Cystein, mit Aldehyden oder Ketonen gewonnen werden (**Reaktionsschema 1.1**) [148]. Im Falle des Fmoc-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH zwingt das Pseudoprolin die Ala-Cys($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$) Peptidbindung zu $99 \pm 1\%$ in *cis*-Konformation [122] wobei das *cis*-Isomer ~ 4.18 kJ/mol gegenüber dem *trans*-Isomer begünstigt ist [148]. Baut man nun ein Tyrosin basiertes Pseudoprolin in eine Polyprolinhelix bestehend aus 11 Resten ein, verringert dieses den Anteil an PP II-Struktur im Vergleich mit dem entsprechenden unmodifizierten Peptid (Ac-(Pro)₁₁-OH). Kein Unterschied im PP II-Gehalt ist zu erkennen, wenn man die Peptide Ac-(Pro)₅-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-(Pro)₅-OH und Ac-Pro-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-(Pro)₉-OH miteinander vergleicht. Somit scheint der *cis* induzierende Effekt des Pseudoprolines auf die Gesamtstruktur unabhängig von seiner Position innerhalb des Polyprolines in wässriger Umgebung zu sein. Betrachtet man hingegen den PP I-Gehalt in *n*-Propanol für diese Peptide zeigen sich positionsabhängige Unterschiede. Generell verringert der Einbau eines einzelnen Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$) Pseudoprolins den Anteil an PP I-Helix verglichen mit dem Referenzpeptid Ac-(Pro)₁₁-OH [122]. Allerdings befinden sich nicht 100 % der Ac-(Pro)₁₁-OH Moleküle in PP I-Konformation, denn Peptide die ein alterierendes Pro- Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$) Motiv enthalten zeigen einen viel stärkeren PP I-spezifischen Cotton-Effekt [122, 149]. Vergleicht man den Anteil an PP I von Ac-(Pro)₅-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-(Pro)₅-OH und Ac-Pro-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-(Pro)₉-OH unter diesen Bedingungen, zeigt sich, dass Pseudoprolin in N-terminaler Position die Ausbildung der PP I-Helix stärker behindert, als in mittlerer Position [122]. Dieses kann einerseits durch sterische Behinderungen, aufgrund des Phenolrings in C5 Position dieser Pseudoprolinvariante, hervorgerufen werden, andererseits auch Folge der sequentiellen Isomerisierungsreaktion sein. Die CTI der PP II nach PP I Umwandlung wurde mit Hilfe der *trans* spezifische Prolin Endopeptidase, Aminopeptidase P, charakterisiert [150, 151]. Diese Studie zeigte, dass die PP II nach PP I Umwandlung sequentiell vonstatten geht. Demzufolge wandelt sich die PP II-Helix durch eine schrittweise *trans*- nach *cis*-Isomerisierung in die PP I-Helix um. Dieser Prozess beginnt am C-terminalen Ende der Polypeptidkette. Der PP I- nach PP II-Wechsel erfolgt ebenfalls sequentiell, die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion setzt in diesem Falle aber an der N-terminalen Seite der Polyprolinkette ein. Somit tritt in beiden Fällen, dem PP II→PP I und dem PP I→PP II Übergang, $\text{H}_2\text{N}-(\text{trans})_n-(\text{cis})_m\text{-OH}$ als Intermediat auf. Mit

dieser Methode konnten jedoch keine positionellen Unterschiede für die *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeiten sowie keine zufällige Verteilung der *cis*-Population festgestellt werden [151].

1.3.2 Die PP II-Konformation ist Hauptstrukturelement in Kollagen und ungefalteten Polypeptiden

Mittlerweile wird angenommen, dass die PP II Struktur das dominierende Sekundärstrukturelement in entfalteten bzw. "random coil" Strukturen von Proteinen ist. So kann z.B. eine α -helikale Polyalanin Kette (21 Reste) durch Erhitzen reversibel in eine PP II-Helix überführt werden [152]. Eine Erklärung ist, dass die PP II-Struktur die Organisation der Wassermoleküle weniger stört, als α -helikale und β -Faltblattstrukturen und demzufolge entropisch unter diesen Bedingungen bevorzugt wird [153, 154]. Sowohl kurze Peptide als auch Proteine zeigen einen erhöhten Anteil an PP II-Struktur wenn diese in hochmolaren Konzentrationen von chemischen Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid gelöst bzw. entfaltet sind [155]. Der Anteil an neu gebildeter PP II-Struktur ist dabei sequenzabhängig und nicht limitiert auf prolinhaltige Sequenzen [156]. Weiterhin ist der PP II-Anteil linear abhängig von der Denaturanzkonzentration, d.h. mit steigenden Konzentrationen an Denaturanz erhöht sich der PP II-Gehalt. Aufgrund der Ähnlichkeit der CD-Spektren chemisch denaturierter Proteine mit Pro-, Lys-, Glu- und Asp-Homopolymeren wird angenommen, dass chemisch denaturierte Proteine einen hohen Anteil an PP II-Struktur aufweisen [157-159]. Selbst für Polyprolinpeptide bewirkt die Zugabe von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid noch eine zusätzliche Erhöhung des PP II-Gehaltes was darauf hinweist, dass selbst in diesen stark PP II bildenden Peptiden nicht alle Moleküle in der PP II-Konformation vorliegen [159]. Aus diesem Grund kann man annehmen dass Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid die Beweglichkeit des Polypeptidrückgrates einschränkt [160].

Kollagen ist die am weitesten verbreitete Proteinklasse in denen die PP II-Struktur das dominierende Sekundärstrukturelement darstellt. Die Kollagen „Superhelix“ besteht aus drei umeinander gewundenen Polypeptidhelices die in PP II-Konformation vorliegen [161]. Dieser rechtsgängige „Supercoil“ hat eine $7/2$ Symmetrie und wird durch ein sich wiederholendes Muster an intermolekularen Wasserstoffbrücken stabilisiert die zwischen dem Glycyl- N-H

und dem Prolyl- C=O (in X Position) ausgebildet werden [162, 163]. Die drei Ketten die die Kollagen Superhelix bilden sind dabei um jeweils einen Rest versetzt. Dafür müssen die einzelnen Kollagenhelices dicht gepackt um die zentrale Achse der Superhelix sein, weswegen Glycin an jeder dritten Position innerhalb der Dreifachhelix benötigt wird. Wird dieses Glycin gegen Alanin substituiert, kommt es an den entsprechenden Positionen zu lokalen Entwindungen der Superhelix [164]. Weiterhin wird die Helix stabilisiert durch Wasserbrücken ähnlich derer beschrieben für die PP II-Konformation [12] sowie durch induktive Effekte der OH-Gruppen des Hydroxyprolins [165, 166]. Betrachtet man die Röntgenkristallstrukturen dieser Moleküle, so ist immer eine Vielzahl von Strukturwassermolekülen erkennbar die in einer festen Hydrathülle um die Superhelix angeordnet sind [12, 164, 167]. Die PP II bildenden Elemente des Kollagen bestehen aus Gly-X-Y Wiederholungen, wobei in X Position oft Prolin und in Y Stellung oft L-*trans*-4-Hydroxyprolin (Hyp) zu finden ist. Die Hydroxylsubstitution des Y Prolins in δ -Position ändert die Ringschwingung des Pyrrolidinrings und schränkt dadurch die Freiheitsgrade der Peptidbindungswinkel ein. Dieses erhöht die Präferenz der X-Y Peptidbindung die *trans*-Konformation einzunehmen und stabilisiert somit die Rückgratstruktur der PP II-Helix [168]. Dieser Effekt ist selbst in Dipeptiden zu beobachten. So hat z.B. das Dipeptid Ac-Phe-Hyp-NHMe einen deutlich höheren *trans*-Anteil (~83 %, D₂O, 298 K) als das entsprechende nicht-hydroxylierte Analoge Ac-Phe-Pro-NHMe [169]. Röntgenkristallstrukturen von *allo*-4-hydroxy-L-Prolin zeigen, dass in diesem Peptid der Pyrrolidinring hauptsächlich in *C β -exo* bzw. *C γ -exo* Konformation vorliegt [169, 170]. Dadurch scheinen sich die ψ - und ϕ -Winkel der Peptidbindung derart zu ändern, dass die Hyperkonjugation des Peptidrückgrates ($n \rightarrow \pi^*$ des O_{*i-1*} mit C_{*i*}) in der *trans*-Konformation verstärkt wird [171, 172]. Untersuchungen an Peptiden der Form (Gly-Pro-Xaa)₁₀ zeigten, dass elektronenziehende Substituenten in 4-Position des Xaa-Prolins auch die Stabilität der Superhelix erhöhen. Die dabei ermittelte Hierarchie für die Superhelixstabilisierung ergab: L-*trans*-4-Fluorprolin (Fpl) > L-*trans*-4-Hydroxyprolin > Prolin [165]. Um die *trans*-Konformation der vorangehenden Peptidbindung zu stabilisieren, müssen sich diese Substituenten in 4R-Konfiguration befinden, da eine 4S-Orientierung das Gleichgewicht in die entgegengesetzte Richtung verschiebt [172, 173]. Elektronenziehende Substituenten in 4R-Position verringern die Elektronendichte der Peptidbindung, erhöhen die Abweichung des Stickstoffatoms der Peptidbindung von einer

planaren Struktur und reduzieren den Doppelbindungscharakter der C–N Bindung. Dadurch wird die Rotationsbarriere der CTI verringert und das Isomer mit der geringeren Grundzustandsenergie G^0 begünstigt [174, 175]. Scheinbar ist die Hydroxylierung des Prolins in Kollagen notwendig um den PP II destabilisierenden Effekt des Glycins zu kompensieren um eine gute Stabilität der Kollagen Superhelix zu gewährleisten.

Ziele der Arbeit

Wie im einleitenden Abschnitt dargestellt wurde, existiert bisher kein Modell, welches die Auswirkungen von Einzelbindungs-*cis/trans*-Isomerisierungsereignissen auf die Polyprolin II Sekundärstruktur beschreibt. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, welches die Reaktion der PP II-Struktur auf diese Konformationsänderung widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurden Polyprolinpeptide synthetisiert, in denen ortsspezifisch das Carbonylsauerstoffatom einer Peptidbindung gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde. Zuerst musste die Thioxopropyl-Prolylbindung in Hinblick auf die photoinduzierte *cis/trans*-Gleichgewichtsverschiebung und deren Auswirkung auf unstrukturierte Dipeptide untersucht werden. Anschließend sollten anhand vergleichender Untersuchungen der Grund- und Übergangszustände der Thioxo-peptidbindungs-CTI, in Abhängigkeit von deren Lokalisation innerhalb einer PP II-Struktur, vorhandene positionsabhängige Unterschiede aufgezeigt und charakterisiert werden. Im Besonderen sollte der Einfluss des Lösungsmittels auf der Thioxo-CTI-Reaktion der PP II-Struktur näher beleuchtet werden. Der Vergleich der Grundzustandsenergie- und Aktivierungsenergieparameter sollte es ermöglichen, neue Informationen über die Art und Weise der Reaktion der PP II-Struktur auf konformationelle Änderungen zu liefern.

Weiterhin sollte ein Vergleich der Relaxationsreaktion der Thioxo-peptidbindung nach photoinduzierter Gleichgewichtsverschiebung, d.h. Einzelbindungs-Konformationsänderung, mit einer klassischen lösungsmittelinduzierten *cis/trans*-Gleichgewichtsverschiebung erfolgen, um die vorhandenen Unterschiede beider experimenteller Ansätze besser zu verstehen.

2 Material/Methoden/Geräte/Synthesen

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Ac-Pro-OH	Bachem (Bubendorf)
Acetanhydrid	Fluka (Steinheim)
Acetonitril	Serva (Heidelberg)
D ₂ O	CamproScientific (Miamisburg)
DCM	Fluka (Steinheim)
Diisopropylether	Fluka (Steinheim)
DIPEA	Fluka (Steinheim)
EE	Fluka (Steinheim)
Glycerol	Merck Eurolab (Darmstadt)
GmdCl	AppliChem (Darmstadt)
H-Pro-OH	Bachem (Bubendorf)
H-Pro-NH ₂	Bachem (Bubendorf)
Isop. D8 (NMR-grade)	CIL (Andover/USA)
Isopropanol (p.a. 99.7 %)	ROTH (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	ROTH (Karlsruhe)
NMM	Fluka (Steinheim)
Rohrzucker	ROTH (Karlsruhe)
Sterilfilter	Schleicher & Schüll (Dassel)
TDF (NMR-grade)	CIL (Andover/USA)
TSP (NMR-grade)	Aldrich (SIGMA)
TFA	Fluka (Steinheim)

2.1.2 Geräte

CD-Spektrometer	Jasco-J710
UV/Vis-Spektrometer	PerkinElmer Lambda 900
HPLC-Systeme	von Synkam
Säulen analytisch	LiChrospher® 106 RP-8 (5 µm) (Merck)
preparativ	Hibar® Pre-Packed Column RT 250-25 LiChrosorb® RP-select B (7 µm) RP-8 (Merck)
preparativ	SP 250/21 NUCLEOSIL 300-7 C4 (Macherey Nagel)
FTIR-Spektrometer	Bruker Tensor 27 mit AuquaSpec® und Bio-ATR II® Zellen
Photoanregungssystem	
Lichtquelle	Quecksilber-Xenondampflampe 250 W von Hamamatsu
Monochromator	Monochromator 101 Photon Technology International
Lichtfokussierung	ORIEL 77800
Stopped Flow UV/Vis-Spektrometer	Applied Photophysics π*-180 und 05-109

2.2 Synthesen

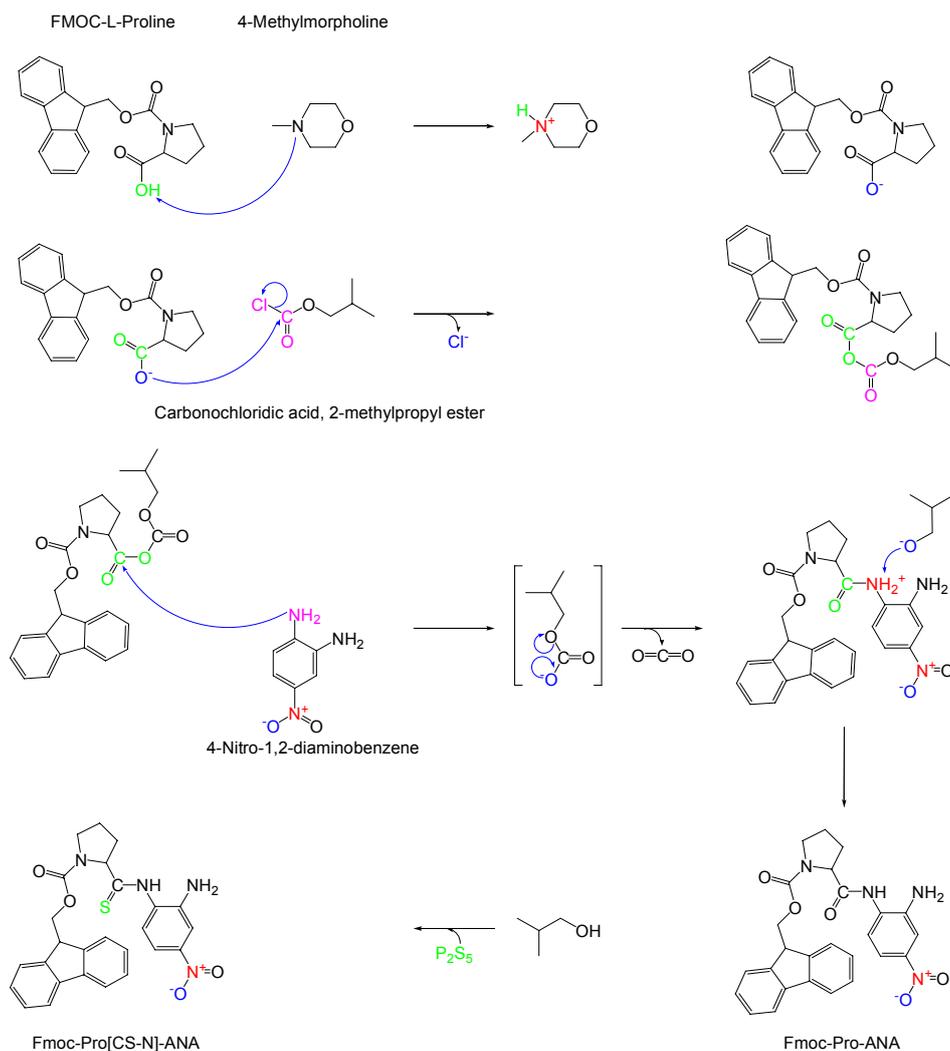
2.2.1 Synthese der Thioxobausteine Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-NBzt und Boc-Pro- ψ [CS-N]-NBzt

Chemikalien

- 15 g (42,2 mmol) Fmoc-Pro-OH · H₂O oder Boc-Pro-OH
- 4,63 ml (4,25 g = 42,2 mmol) *N*-Methyl-morpholin (NMM)
- 5,5 ml (5,74 g = 42,2 mmol) Chlorameisensäure-iso-butylester (CABE)
- 6,43 g (42,2 mmol) 4-Nitro-*o*-phenylendiamin (ANA)
- 14,0 g (63 mmol) Phosphorpentasulfid (P₂S₅)
- Lösungsmittel: Essigester, Tetrahydrofuran, Dichlormethan
- Gesättigte NaSO₄⁻, NaHCO₃ und NaCl-Lösung

Synthese von Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-ANA/Boc-Pro- ψ [CS-N]-ANA

15 g Fmoc-Pro-OH · H₂O/Boc-Pro-OH · H₂O in 200 ml Tetrahydrofuran lösen und auf -15°C temperieren. Anschließend erfolgt die Zugabe der entsprechenden Mengen von *N*-Methyl-morpholin und Chlorameisensäure-iso-butylester. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei -15°C die äquivalenten Menge an 4-Nitro-*o*-phenylendiamin der Lösung zuführen. Den Reaktionsansatz für weitere 60 min bei -15°C und anschließend über Nacht bei RT rühren (**Reaktionsschema 1**). Den Verlauf der Reaktion nach 24 h mittels HPLC überprüfen. Ist die Reaktion vollständig abgelaufen 1,5 Äquivalenten Phosphorpentasulfid dem Ansatz zugeben und nach 1 h bei RT den Reaktionsverlaufes mittels HPLC analysieren. Bei unvollständiger Umsetzung muss dem Reaktionsansatz weiteres Phosphorpentasulfid zugesetzt werden. Nach vollständig abgelaufener Reaktion wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer abdestillieren und das kristalline Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-ANA in 250 ml Essigester aufgenommen. Um hydrophile Verunreinigungen zu entfernen und die Lösung zu neutralisieren den Reaktionsansatz abwechselnd mit 100 ml gesättigter NaHCO₃-Lsg und NaCl-Lösung ausschütteln. Anschließend die organische Phase über Nacht auf ausreichend Natriumsulfat trocknen. Die getrocknete Lösung filtrieren und den Essigester im Vakuumrotationsverdampfer abdampfen.



Reaktionsschema 1: Reaktionsschema der Synthese von Fmoc-Pro-ψ[CS-N]-ANA

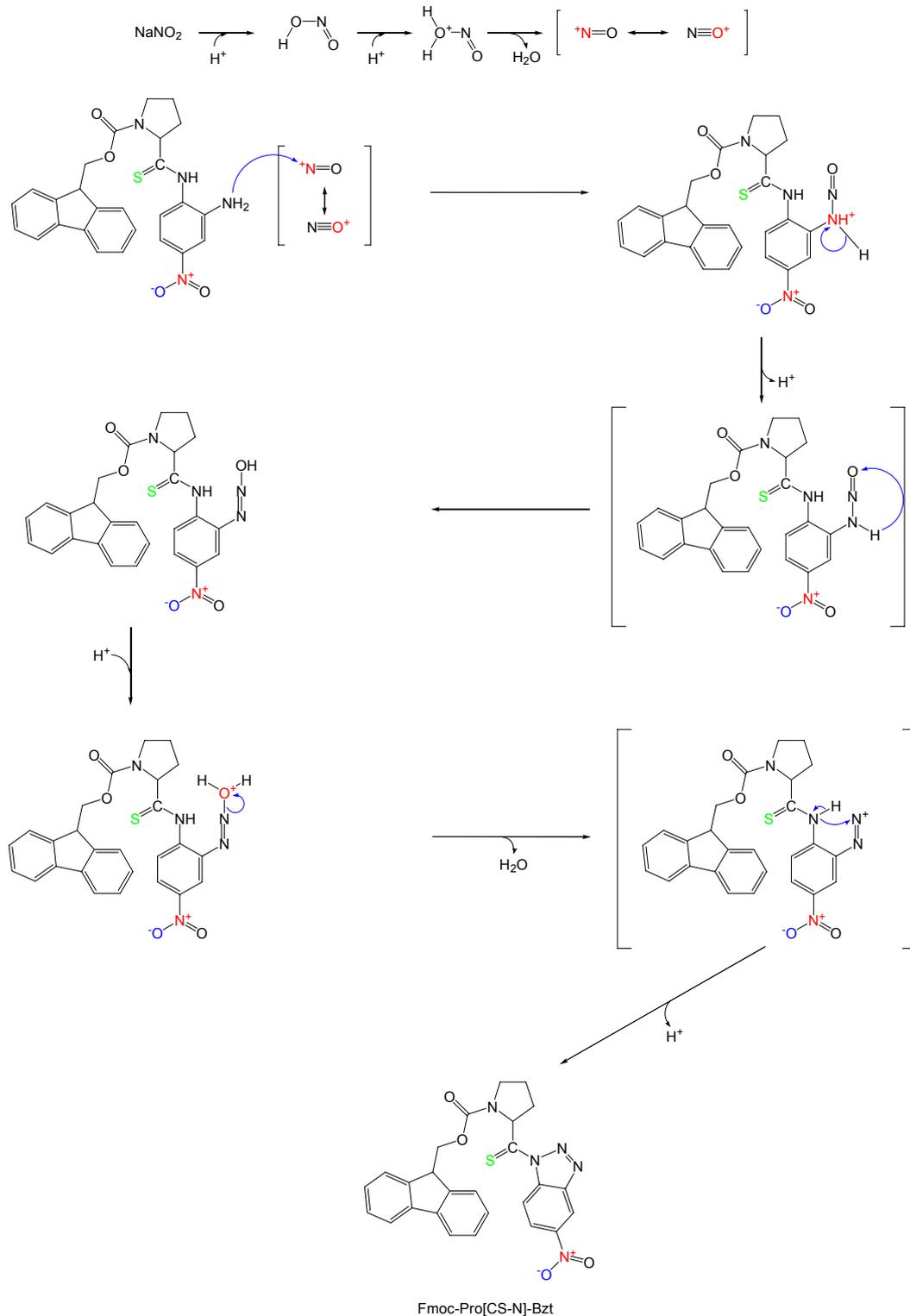
Reinigung von Fmoc-Pro-ψ[CS-N]-ANA

Zur weiteren Aufreinigung den kristallinen Rückstand in wenig DCM aufnehmen und über eine Kieselgelsäule (ca. 600 ml Kieselgel 60 (0,063–0,200 mm) von Merck) im Lösungsmittelgemisch EE/CH₂Cl₂ (1:9) trennen. Die erhaltenen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie und analytischer HPLC auf die Anwesenheit von Fmoc-Pro-ψ[CS-N]-ANA überprüft. Anschließend die entsprechenden Fraktionen einrotieren und über Nacht im Vakuum trocknen. Die Ausbeute beträgt ca. 61 %.

Cyclisierung (**Reaktionsschema 2**)

Fmoc-Pro-ψ[CS-N]-ANA in 125 äquivalenten Essigester und 22 äquivalenten Wasser lösen und auf 0°C temperieren. Anschließend über einen Zeitraum von ca. 10 min 1,5 äquivalent NaNO₂ dem Ansatz hinzufügen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Temperatur des

Ansatzes nicht über 0°C steigt, sowie entstehende Eiskristalle durch leichtes erwärmen entfernt werden.



Reaktionsschema 2 : Reaktionsschema der Synthese von von Fmoc-Pro-ψ[CS-N]-Bzt

20 min nach der erstmaliger Zugabe von NaNO₂ den Reaktionsansatz mittels HPLC überprüfen. Die Reaktionszeit sollte so kurz wie möglich gehalten werden, da das aktivierte

Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-Bzt bzw. Boc-Pro- ψ [CS-N]-Bzt unter diesen Reaktionsbedingungen nur begrenzt stabil ist. Nach vollständigem Umsatz von Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-ANA zu Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-Bzt den Ansatz über ca. 4 l zerkleinertes Eis geben. Es entsteht ein gelb-oranger Niederschlag der über eine Fritte abgesaugt und mit Wasser solange gewaschen wird bis die Waschlage einen neutralen pH aufweist. Das erhaltene Fmoc-Pro- ψ [CS-N]-Bzt anschließend für 48 h im Vakuum trocknen.

2.2.2 Festphasensynthese der Thioxopolyprolinpeptide

Die Festphasensynthese der Thioxopolyprolinpeptide wurde freundlicherweise von Dr. Dirk Wildemann durchgeführt. Die Synthese der thioxylierten Peptide erfolgte mit Hilfe des „Peptid Synthesizers Syro II“ (MultiSynTech, Germany) am Sieberamid®-Harz unter Verwendung der Fmoc-Strategie [176]. Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch zweiminütige Inkubation des Materials in 100 % TFA. Das in der TFA-Lösung enthaltene Peptid wurde anschließend durch absaugen in Diisopropylether ausgefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann solange in Diisopropylether aufgeschwemmt und gewaschen bis der pH der Lösung neutral war. Im Anschluss daran folgte ein präparativer-HPLC-Lauf unter Verwendung einer Hibar® Pre-Packed Column RT 250-25 LiChrosorb® RP-select B (7 μ m) RP-8 (Merck) Säule mit einem Gradienten von 10-40 % ACN in 90 Minuten (Fluss 10 ml/min). Die Fraktionen mit einer Retentionszeit von 50 bis 70 Minuten wurden gesammelt. Die Entscheidung darüber welche der Fraktionen für eine Aufreinigung weiter verwendet wurden, erfolgte aufgrund des analytischen HPLC-Laufprofils und massenspektrometrischer Daten der Fraktionen. Ein weiterer präparativer-HPLC-Lauf erfolgte unter Verwendung einer SP 250/21 NUCLEOSIL 300-7 C4 Säule von Macherey&Nagel. Diese Trennung erfolgte mit einem Gradienten von 20-60 % ACN in 90 Minuten bei einer Flussrate von 4 ml/min. Eine Elution des sauberen Peptides erfolgte bei einer Retentionszeit von 50-60 Minuten unter diesen Bedingungen. Die Reinigungsvorschrift ist für alle Thioxopolyprolinpeptide identisch.

2.2.3 Synthese der Dipeptide H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂

1 Äquivalen H-Pro-NH₂ in wenig DCM lösen und 1.5 Äquivalente Boc-Pro- ψ [CS-N]-Bzt über 1 h bei RT dazutropfen. Anschließend DCM abrotieren und den Ansatz in EE aufnehmen. Um

hydrophile Verunreinigungen zu entfernen und die Lösung zu neutralisieren den Reaktionsansatz abwechselnd mit 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lsg und NaCl -Lösung ausschütteln. Anschließend die organische Phase über Nacht auf ausreichend Natriumsulfat trocknen. Die getrocknete Lösung filtrieren und den EE im Vakuumrotationsverdampfer evaporieren. Zur weiteren Aufreinigung den kristallinen Rückstand in wenig DCM aufnehmen und über eine Kieselgelsäule (ca. 600 ml Kieselgel 60 (0,063–0,200 mm) von Merck) im Lösungsmittelgemisch $\text{EE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:9) trennen. Danach die Kieselgelsäule mit EE spülen. Die Elution von Boc-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ erfolgt mit Methanol. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt wasserfrei mit ZnCl_2 -Diethylether-Komplex-Lösung für 2 h. Anschließend den Diethylether evaporieren und den Rückstand in THF aufnehmen. Der nichtlösliche Rückstand wird Abzentrifugiert und in einem ACN/Wassergemisch (30/70) aufgenommen, filtriert und HPLC-chromatographisch mit einem Gradienten 0–60 % ACN in 105 Minuten gereinigt. Evaporiert man das Wasser/ACN-Gemisch der entsprechenden Fraktionen erhält man eine ölig-gelbliche Flüssigkeit wobei es sich dabei um H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ handelt. Dieses H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ kann maximal 24 h gelagert werden bei -20°C . Für eine Acetylierung wird das H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ in THF gelöst und langsam zu einer Mischung aus 1.5 Äquivalenten Essigsäureanhydrid und NMM über einen Zeitraum von 2 h zugegeben. Dabei sollte der pH über den gesamten Zeitraum möglichst neutral sein. Anschließend wurde das THF abgezogen und der Rückstand in einem ACN/Wassergemisch (30/70) aufgenommen, filtriert und HPLC-chromatographisch mit einem Gradienten 0–40 % ACN in 90 Minuten gereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden über analytische HPLC-Läufe und ESI-Massenspektrometrie auf Existenz und Reinheit des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ überprüft und Lyophilisiert. Man erhält mit dieser Methode Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ (weißes Pulver) mit Ausbeuten von $\sim 0.5\%$ im Vergleich zur eingesetzten molaren Menge von Boc-Pro- ψ [CS-N]-Btz.

2.3 Methoden

2.3.1 Spektren und Kinetische Messungen

Die Aufnahme der Relaxationskinetiken und der Peptidspektren erfolgte mittels der angegebenen Geräte. Die Messbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels der Programme OPUS 5.5 (Bruker), SigmaPlot 8.0 (Sysdat) und IgorPro 5.04B (WaveMetrix). Alle Peptidlösungen wurden vor gebrauch pH-überprüft, entgast und sterilfiltriert. Alle Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Natriumphosphatpuffer pH/pD 7.5 durchgeführt. Die Bestimmung der Peptidkonzentrationen in Lösung erfolgte UV/Vis-spektroskopisch mit Hilfe der in **Tabelle 3.9** aufgeführten Extinktionskoeffizienten. Die Peptidlösungen wurden im Anschluss an die Messungen HPLC-chromatographisch und massenspektrometrisch überprüft. Alle Messungen wurden bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt.

2.3.2 CD- und UV-Vis Spektroskopie

CD-Spektren und Kinetiken wurden am Jasco-J710 CD-Spektropolarimeter aufgenommen. Die Peptidkonzentration betrug für CD-spektroskopische Messungen 46 μM . Für Messungen im Wellenlängenbereich von 180–230 nm wurde ein Strahlengang von 0.1 cm, für Messungen im Bereich von 230–450 nm ein Strahlengang von 1 cm verwendet. Für UV/Vis-Messungen wurde Generell, wenn nicht anders angegeben, eine Peptidkonzentration von 46 μM bei einem Strahlengang von 1 cm verwendet.

2.3.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden freundlicherweise durch PD. Dr. Christian Lücke durchgeführt. Die Peptidkonzentrationen für diese Experimente sind den Bildbeschriftungen zu entnehmen. Als Puffer wurde 100 mM Natriumphosphat pH/pD 7.5 verwendet.

2.3.4 IR-Spektroskopie

Die IR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an einem Tensor 27 FTIR-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Einzelspektren in Lösung wurden mit einer BioATR II®-Zelle, Kinetiken mit einer Aquaspec®-Zelle aufgenommen. Die Peptidkonzentrationen für diese

Messungen betragen ~3–15 mM in 100 Natriumphosphatpuffer pH/pD 7.5. Die IR-Spektren wurden durch Summierung von 64 oder 128 Einzelspektren erhalten. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Spektrometersoftware OPUS 5.5.

2.3.5 Isothermale Kalorimetrie

Die Aufnahme der Relaxationskinetiken erfolgte mit Hilfe eines ITC-VP-Mikrokalorimeters von MicroCal. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Fanghänel durchgeführt. Die Methode ist im Detail in der Angegebenen Referenz geschildert [38].

2.3.6 Photoinduzierte cis/trans-Isomerisierung der Thiopeptide

UV-Licht der entsprechenden Wellenlänge wurde mit Hilfe einer Quecksilber-Xenondampflampe in Verbindung mit einem Monochromator erhalten. Je nach Peptidkonzentration wurde entweder 10 oder 100 mM Natriumphosphatpuffer verwendet. Es wurde immer das Gesamtvolumen der Peptidlösungen bestrahlt. Die UV/Vis-Spektren wurden mit Hilfe eines PerkinElmer Lambda900 Spektrometers und die CD-Spektren mit Hilfe eines Jasco-J710 Spectropolarimeters erhalten. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurde die Dunkelreaktion nach der Bestrahlung UV-, CD-, NMR-, und IR-spektroskopisch verfolgt. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte durch nichtlineare Regression der Messkurven.

3.2.7 Bestimmung des KSIE

Zur Bestimmung des KSIE wurde 10 mM Natriumphosphatpuffer in H₂O und D₂O hergestellt. Der pH/pH-Wert wurde mittels eines pH-Meters auf 7.5 eingestellt, wobei der pD-Wert nach der Formel $\text{pH} = \text{pD} + 0.4$ berechnet wurde. Die Messungen wurden wie unter 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Lösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von D₂O und H₂O wurden durch volumetrisches Mischen der beschriebenen Puffer erzeugt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Dipeptide H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ (Ergebnisse)

3.1.1 *Cis/trans*-Gleichgewichte von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen auf die Polyprolin II Sekundärstruktur zu charakterisieren. Anhand dieser Daten sollte, unter Berücksichtigung aller Literaturdaten, ein Modell entworfen werden, welches die Effekte von *cis/trans*-Isomerisierungsereignissen auf diese Sekundärstruktur beschreibt. Zu diesem Zweck wurden Polyprolinpeptide synthetisiert, in denen ortsspezifisch das Carbonylsauerstoffatom einer Peptidbindung gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde. Die daraus resultierenden Thioxpeptidbindungen wurden als photoschaltbare Sonde verwendet, um den *cis*-Konformeranteil dieser Bindung innerhalb der Polyprolinpeptide zu erhöhen. Anschließend wurden die Auswirkungen des veränderten *cis/trans*-Isomerenverhältnisses auf die PP II-Struktur, sowie die Wiedereinstellung des Gleichgewichtes mittels verschiedener spektroskopischer Methoden untersucht. Um die grundlegenden Aspekte der Thioxopeptidbindungs-CTI und deren durch PP II-Sekundärstrukturbildung veränderten physikochemischen Eigenschaften beurteilen zu können, wurde zunächst die Thioxopropyl-Prolylbindung der Dipeptide H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ charakterisiert. Während der Synthese tendierte das nicht acetylierte H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ stark zur Diketopiperazinbildung was auf eine hohe Reaktivität des Schwefelatoms der C(S)N-Bindung in diesem Peptid hinweist. Aufgrund der hohen Reaktivität konnte dieses Dipeptid nur bedingt charakterisiert werden, da viele experimentelle Bedingungen diese Nebenreaktion begünstigten. Ein grundsätzlicher Vergleich der Dipeptide H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ war jedoch notwendig, um den Effekt der N-terminalen Acetylgruppe auf die CTI-Eigenschaften der Thioxopropyl-Prolylbindung abzuschätzen, da diese auch in den Polyprolinpeptiden vorhanden war. Die N-terminale Acetylierung der Polyprolinpeptide war notwendig, um Ladungseffekte auf die PP II-Struktur von vornherein auszuschließen. NMR-spektroskopische Messungen zeigten, dass H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ bei 25°C einen *cis*-Isomergehalt von ~16 % aufweist. Die

konformerspezifischen chemischen Verschiebungen dieses Peptides in D₂O sind in **Tabelle 5.1** aufgeführt. Interessanterweise wird die *trans*-Konformation in diesem Peptid durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisiert, die zwischen einem Proton der sekundären Aminogruppe des N-Terminus und dem Schwefelatom der Thioxopeptidbindung gebildet wird. Befindet sich die Thioxopeptidbindung in *cis*-Konformation, kann diese Wasserstoffbrücke nicht beobachtet werden. Die theoretische Vorhersage der Struktur dieses Peptides mit dem Programm Hyperchem V7.5 ergab einen Winkel von 127.8° für diese Wasserstoffbrücke bei einem Abstand von ca. 2.26 Å. Somit handelt es sich hierbei um eine Wasserstoffbrücke mittlerer Stärke [177, 178]. Führt man die gleichen Messungen mit der N-terminal acetylierten Variante Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ durch, sind im Gegensatz zum H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂, vier verschiedene Konformationen, **tt**, **ct**, **tc** und **cc**, zu erkennen (**Abbildung 3.1/3.2/3.3**). Diese Heterogenität wird durch die Konformation der N-terminalen Acetyl-Prolylbindung verursacht. Die Populationen der Einzelisomere mit den dazugehörigen Grundzustandsenergieunterschieden (ΔG^0) sind in **Abbildung 3.3** aufgeführt und für Wasser und Deuteriumoxid äquivalent. Das Isomerengleichgewicht dieses Peptides ist dabei pH-unabhängig im Bereich zwischen pH 6 und 8. Für PP II bildende Polyprolinpeptide ist bekannt, dass das *cis/trans*-Gleichgewicht durch im Vergleich zu Wasser hydrophobere Lösungsmittel, wie z.B. Isopropanol, stark in Richtung *cis*-Konformer verschoben wird. Ähnliches ist auch für das Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid zu beobachten wie NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten (**Abbildung 3.2**, die dazugehörigen chemischen Verschiebungen sind in **Tabelle 5.2** aufgeführt).

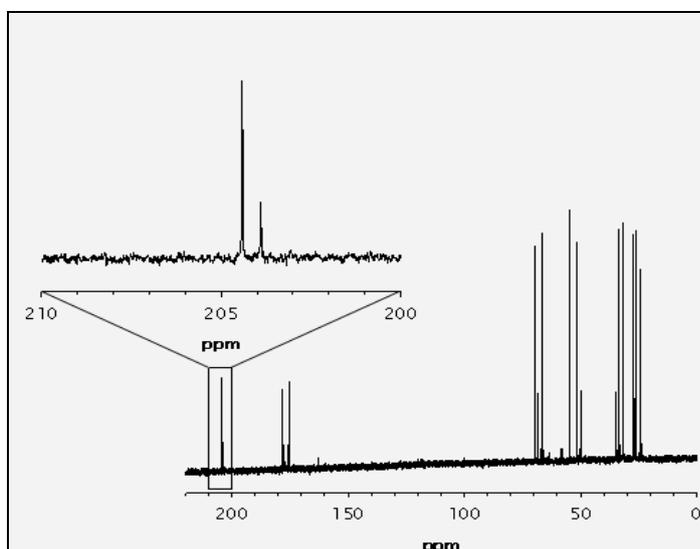


Abbildung 3.1: 1D ¹³C-NMR Spektrum von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ aufgenommen in D₂O durch Summierung von 72000 Scans. Das Inlett zeigt die chemischen Verschiebungen der Thioxocarbonylkohlenstoffatome. Zu erkennen sind in diesem Bereich die Signale der beiden Hauptkonformere **tt** und **ct**. Das Tieffeld verschobene Signal konnte dem **ct** Isomer zugeordnet werden. Die Integrale beider Signale zeigen ein Verhältnis von 75:25.

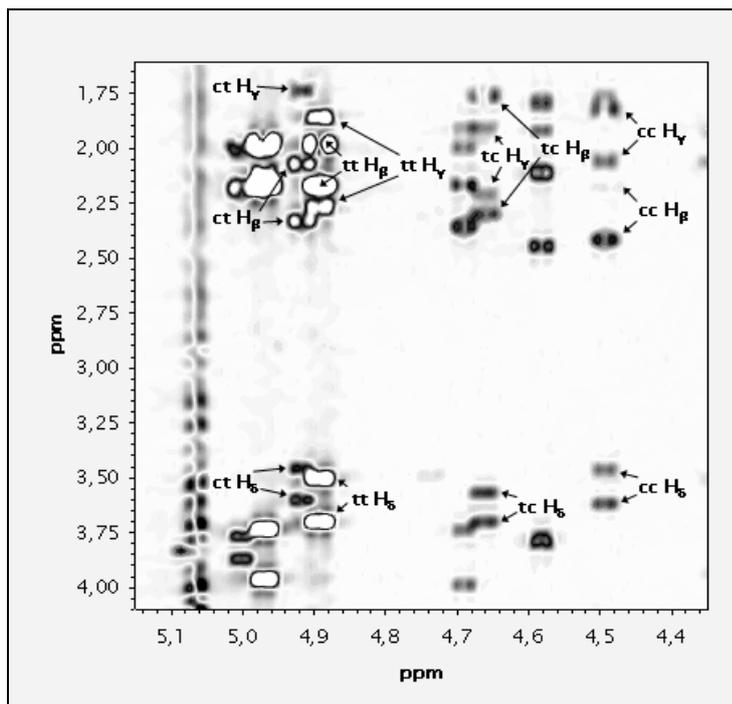


Abbildung 3.2: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ gelöst in deuteriertem Isopropanol. Das Spektrum wurde über 24 h mit einer Spinlogzeit von 80 ms in deuteriertem Isopropanol bei 25°C aufgenommen. Der Ausschnitt zeigt die Signale der C_α-Protonen Kopplungen zu den β, γ, und δ Protonen der Prolyl-Ringsysteme. Für eine bessere Übersicht wurden nur die Kopplungen des N-terminalen Prolinrestes in der Abbildung gekennzeichnet. Die chemischen Verschiebungen sind in **Tabelle 5.2** aufgeführt.

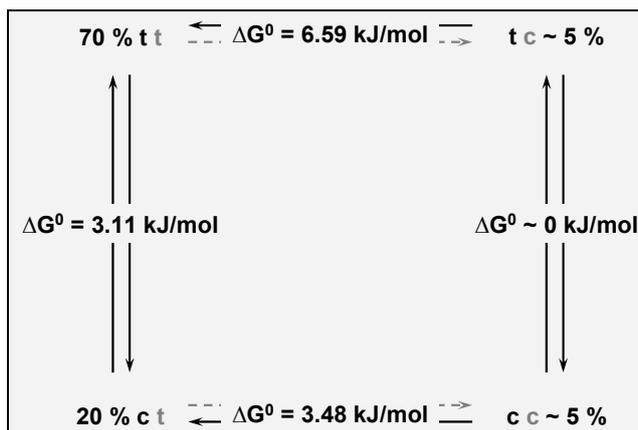


Abbildung 3.3: Isomerverhältnis von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ in Wasser und D₂O. Die *cis*- und *trans*-Konformation der Acetyl-Prolylbindung sind in schwarzen, die der Thioxozeptidbindung in grauen Buchstaben dargestellt. Die Grundzustandsenergie-differenzen wurden mit Hilfe von **Gleichung 1.1** (1.1.1) aus den 1D-¹H-NMR-Spektren berechnet. Alle Messungen wurden in 100 mM Natriumphosphatpuffer bei einem pH/pD von 7.5 bei RT durchgeführt.

Der Gesamt-*cis*-Gehalt der Thioxozeptidbindung erhöht sich durch Inkubation in Isopropanol auf 37.3 % wobei dieses hauptsächlich auf die Destabilisierung der Thioxo-*trans*-Konformation zurückzuführen ist (**Tabelle 3.1/3.2**). Ein völlig anderes Bild ergibt sich für die Isomergleichgewichte dieses Peptides in Tetrahydrofuran (**Tabelle 3.1/3.2**, die konformerspezifischen chemischen Verschiebungen dazu sind in **Tabelle 5.3** aufgeführt). In diesem Lösungsmittel ist das *trans-cis*-Konformer (43.8 %) die vorherrschende Spezies, was vor allem der Destabilisierung des *trans-trans*-Konformers zuzuschreiben ist. Demzufolge muss die Verschiebung des Isomergleichgewichtes in beiden Lösungsmitteln, Isopropanol und Tetrahydrofuran, auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden. Anhand der UV-Vis-Spektren von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂, die direkt nach einem Lösungsmittelsprung

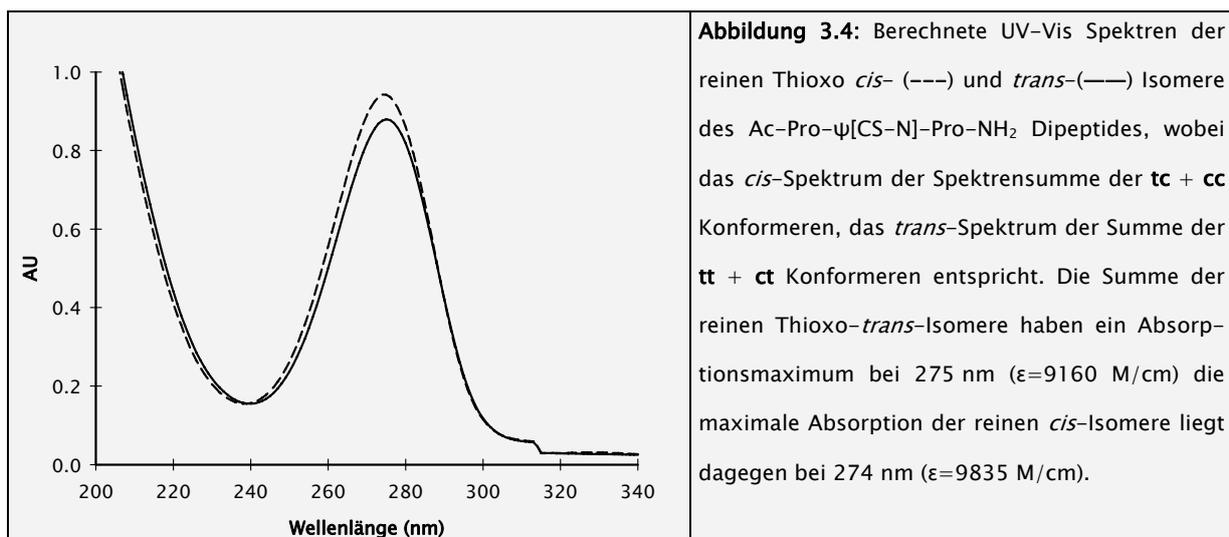
aus Isopropanol und TDF in Wasser aufgenommen wurden, ist es möglich die Spektrensumme der *cis*- und *trans*-Isomere der Thioxozeptidbindung zu extrapolieren (Abbildung 3.4).

Tabelle 3.1: Grundzustandsenergieunterschiede der Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Isomere in Wasser (D₂O), Isopropanol (8fach deuteriert = Isop.D8) und 8fach deuteriertem Tetrahydrofuran (TDF). Der erste Buchstabe in der Spalte „Konformer-gleichgewicht“ steht jeweils für die Ac-Pro-, der zweite für die Konformation der Thioxozeptidbindung.

Konformer-gleichgewicht	ΔG^0 in Wasser	ΔG^0 in Isop. D8	ΔG^0 in TDF	$\Delta\Delta G^0_{D_2O\text{-Isopropanol}}$	$\Delta\Delta G^0_{D_2O\text{-TDF}}$
tt \rightleftharpoons tc	6.59 kJ/mol	2.12 kJ/mol	-0.43 kJ/mol	4.47 kJ/mol	7.2 kJ/mol
ct \rightleftharpoons cc	3.84 kJ/mol	-0.5 kJ/mol	1.3 kJ/mol	4.34 kJ/mol	2.5 kJ/mol
tt \rightleftharpoons ct	3.11 kJ/mol	3.36 kJ/mol	2.7 kJ/mol	-0.25 kJ/mol	0.4 kJ/mol
tc \rightleftharpoons cc	~0 kJ/mol	0.6 kJ/mol	4.47 kJ/mol	-0.6 kJ/mol	-4.74 kJ/mol

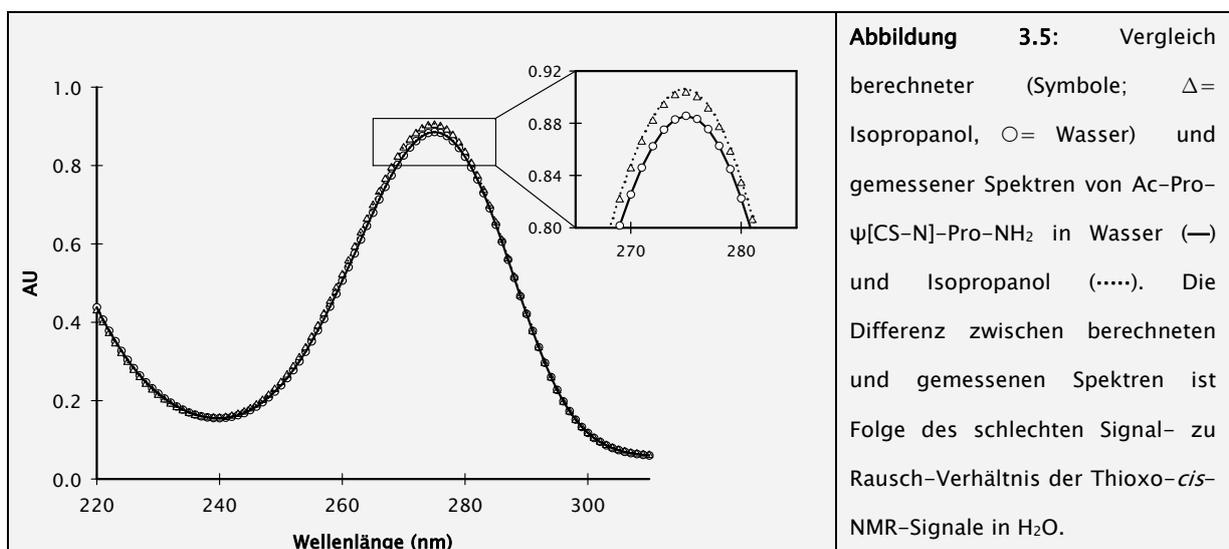
Tabelle 3.2: Anteile der Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Konformere in Wasser (D₂O), Isopropanol (8fach deuteriert) und 8fach deuteriertem Tetrahydrofuran (TDF). Der erste Buchstabe in der Spalte „Konformer“ steht jeweils für die Ac-Pro-, der zweite für die Konformation der Thioxozeptidbindung.

Konformer	Anteil im Gleichgewicht in D ₂ O	Anteil im Gleichgewicht in Isopropanol (D8)	Anteil im Gleichgewicht in TDF
tt	~70 %	~49.2 %	~36.8 %
ct	~20 %	~13.5 %	~12.2 %
tc	~5 %	~20.9 %	~43.8 %
cc	~5 %	~16.4 %	~7.2 %



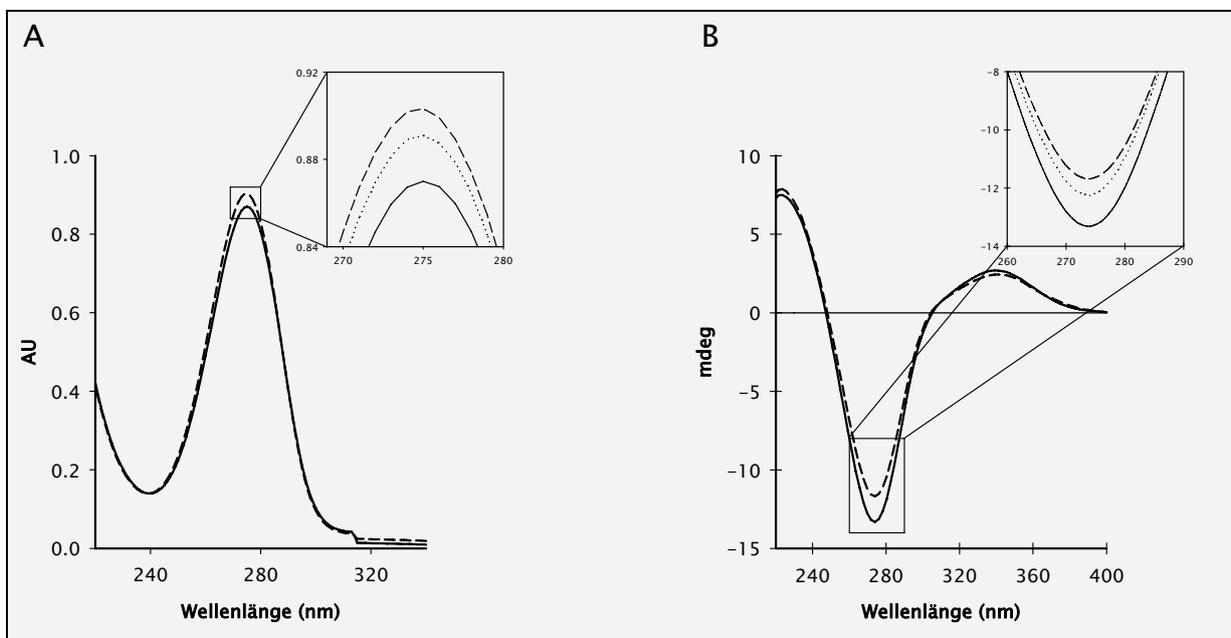
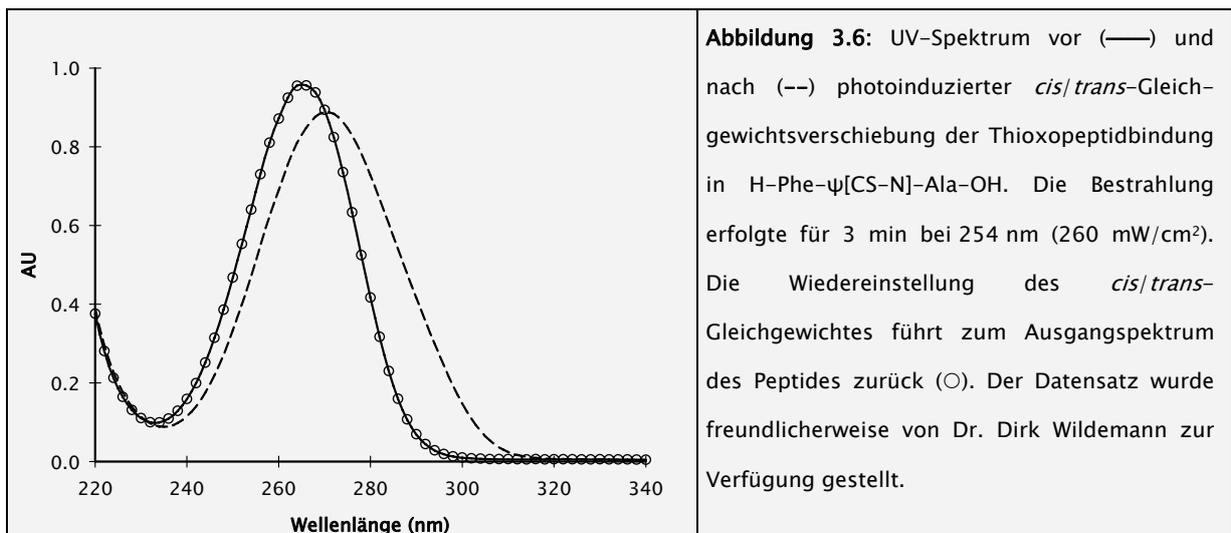
Dieses funktioniert nur dann genau, wenn ein Lösungsmittelsprung mit ca. 1:100 Verdünnung durchgeführt wird, da die verwendeten Lösungsmittel unterschiedliche bathochrome Effekte auf die Absorptionsbanden des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptides

ausüben. Da die Isomerisierungsgeschwindigkeiten des Peptides ausreichend langsam sind, sollten die NMR-spektroskopisch bestimmten Isomerenverhältnisse direkt nach dem Lösungsmittelsprung immer noch zutreffend sein. Die aus diesen Daten berechneten Absorptionsspektren der reinen Thioxo-peptidbindungsisomere zeigen, dass das Absorptionsmaximum des reinen Thioxo-*cis*-Konformers von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ im Vergleich zur *trans*-Konformation um ca. 2 nm hypsochrom nach 274 nm verschoben ist. Weiterhin besitzen die Thioxo-*cis*-Isomeren dieser Verbindung einen etwas größeren molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{274 \text{ nm}} = 9835 \text{ M/cm}$) im Vergleich zu den Thioxo-*trans*-Konformeren ($\epsilon_{275 \text{ nm}} = 9160 \text{ M/cm}$). Diese Unterschiede sind allerdings zu gering um die Einzelspektren aller vier Konformeren mit ausreichender Genauigkeit aus diesen Daten zu extrapolieren. Dennoch erlauben diese Daten die Konzentration der Thioxo-*cis*-Population, anhand des UV-Vis Spektrums, nach Verdünnung aus einem beliebigen Lösungsmittel, sowie nach photoinduzierter Auslenkung des *cis/trans*-Gleichgewichtes abzuschätzen wie in **Abbildung 3.5** exemplarisch gezeigt ist.



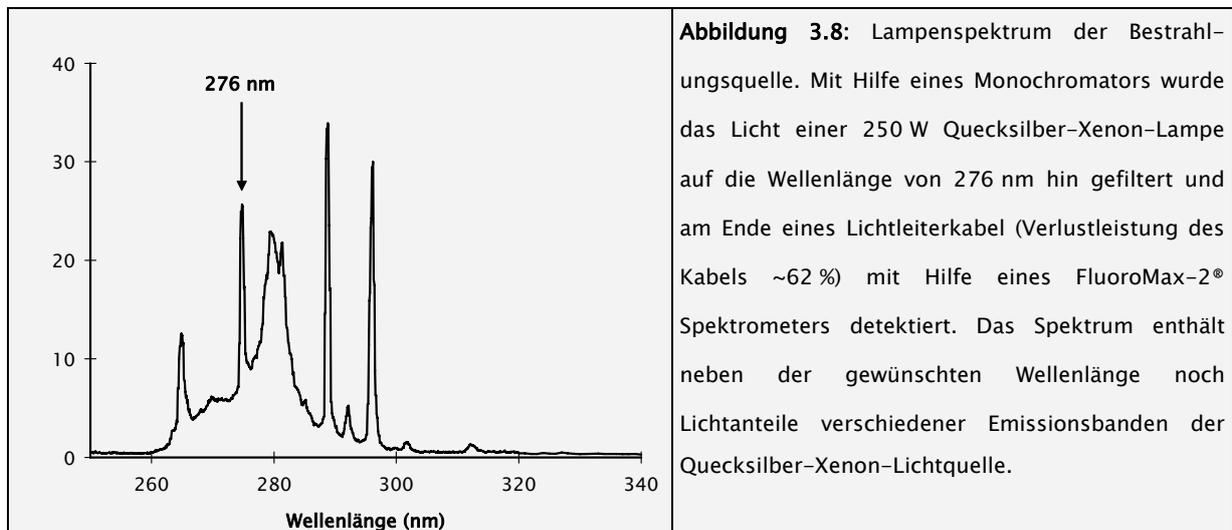
3.1.2 Charakterisierung der Relaxationsreaktion von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ und Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ nach photoinduzierter Gleichgewichtsverschiebung

Thiooxeptidbindungen weisen nach Anregung am ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ -Übergang ein in Richtung des *cis*-Konformers verschobenes *cis/trans*-Gleichgewicht auf [99]. Dieses führt bei sekundären Thiooxeptidbindungen zu einer bathochromen Verschiebung der UV-Vis-Spektren (Abbildung 3.6) [176, 179].



Thioxoaminoacyl-Prolyl-Peptidbindungen dagegen zeigen keine Bandenverschiebung nach Bestrahlung aber ein erhöhtes Absorptionsmaximum im UV-Vis-Spektrum, d.h. die Spektren der *cis*- und *trans*-Konformere unterscheiden sich nur aufgrund ihres unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten [94, 180]. Das UV-Spektrum der Thioxozeptidbindung von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ ist nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 276 nm leicht blau verschoben und zeigt eine erhöhte Absorption. Dieses ist exemplarisch in **Abbildung 3.7A** dargestellt. Allen Thioxozeptidbindungsformen ist gemeinsam, dass die Erhöhung des *cis*-Konformerengehaltes durch Bestrahlung zu einer Abnahme der Cotton-Effekte am ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ - und am ${}^1n_s\text{-}{}^3\pi^*$ -Übergang im CD-Spektrum führt (**Abbildung 3.7B**). Der *cis*-Anteil der Thioxozeptidbindung nach Bestrahlung für das in **Abbildung 3.7A** dargestellte Spektrum wurde mit Hilfe der *cis*- und *trans*-Einzelspektren auf ca. 52 % abgeschätzt. Die Einstellung des *cis/trans*-Konformergleichgewichtes in der Dunkelreaktion wurde mittels UV-, CD-, ${}^1\text{H}$ -NMR- und IR-Spektroskopie (Kapitel 3.3) kinetisch und thermodynamisch charakterisiert. Der Beweis, dass es sich bei den beobachteten Änderungen in den UV-Vis-Spektren um eine lichtinduzierte *trans*- nach *cis*-Gleichgewichtsverschiebung der Thioxozeptidbindung handelt, erfolgte mit Hilfe von 1D ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektren unter Verwendung der im TOCSY bestimmten chemischen Verschiebungen der Konformere. Allerdings, ließen sich, aufgrund der geringen chemischen Verschiebungen in den 1D Spektren, keine prozentualen Anteile der vier Einzelkonformeren bestimmen. Deswegen bleibt die Frage offen, welches der beiden Thioxozeptidbindungs-*cis*-Konformere durch Bestrahlung angereichert wird. Die Kinetiken für die Wiedereinstellung des Konformergleichgewichtes nach Bestrahlung zeigte, in Abhängigkeit der Bestrahlungsbedingungen, eine oder zwei kinetische Phasen. Das Emissionsspektrum der verwendeten Bestrahlungsquelle ist in **Abbildung 3.8** aufgeführt. Nach 5-minütiger Bestrahlung mit hoher Energiedichte ($I_{276\text{ nm}} = 0.27 \cdot 10^{-2} \text{ W/cm}^2$) konnte die Relaxationsreaktion durch eine monoexponentielle Funktion, mit einer Geschwindigkeitskonstante von $(3.34 \pm 0.13) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, beschrieben werden. Die für Ac-Pro- ψ [CS-N]-NH₂ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten waren dabei unabhängig von der Konzentration (20 μM bis $\sim 4 \text{ mM}$) des Peptides. Durch die Messung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten, unter diesen Bedingungen, konnten mit Hilfe der Eyring-Auftragung und **Gleichung 3.1** die Aktivierungsparameter der Thioxo-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion bestimmt werden. Für Ac-Pro- ψ [CS-N]-NH₂ ergab sich ein ΔH^\ddagger von

90.5 kJ/mol, ein ΔS^\ddagger von $-7.9 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ und ein ΔG^\ddagger bei 25°C von 92.8 kJ/mol in Wasser bei pH 7.5.



Gleichung 3.1:
$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$
 (Linearisierte Form der Eyring-Gleichung)

R = ideale Gaskonstante ($8.3145 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$; T = Temperatur in Kelvin; k = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion; k_B = Boltzmannkonstante ($1.380658 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$); h = Plancksches Wirkungsquantum ($6.6260755 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$); ΔH^\ddagger = Aktivierungsenthalpie; ΔS^\ddagger = Aktivierungsentropie

Sieht man die Daten in Kombination mit den bestimmten Grundzustandsenergiedifferenzen aus Abschnitt 3.1.1 kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um die **tc** nach **tt** Umwandlung handeln sollte. Eine Bestrahlung mit geringerer Lichtintensität über einen längeren Zeitraum ($\ll 0.27 \cdot 10^{-2} \text{ W/cm}^2$, Expositionszeiten von ca. 50 min) führt zu doppelt exponentiellen Relaxationskinetiken. Diese waren immer durch Kombination zweier erster Ordnungsreaktionen beschreibbar. Theoretische Betrachtungen mit Hilfe des Programms Hyperchem V7.5 zeigen, dass die CTI der Acetyl-Prolylbindung die Umgebung des Schwefelatoms der Thioxopeptidbindung verändert. Demzufolge könnte die Konformation der Acetyl-Prolylbindung die Absorption der Thioxopeptidbindung beeinflussen. Die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und der langsamen Reaktion unterschieden sich dabei ca. um Faktor 10 bei 25°C ($k_1 = (3.61 \pm 0.88) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $k_2 = (3.55 \pm 0.68) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Die Amplitude der schnellen Reaktion bei 272 nm ist ebenfalls um ca. Faktor 10 kleiner als die Amplitude der langsamen Reaktion. Die Temperaturabhängigkeit der

Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Reaktion sind in der Eyring-Auftragung in **Abbildung 3.9**, die daraus ermittelten Aktivierungsparameter in **Tabelle 3.3** aufgeführt.

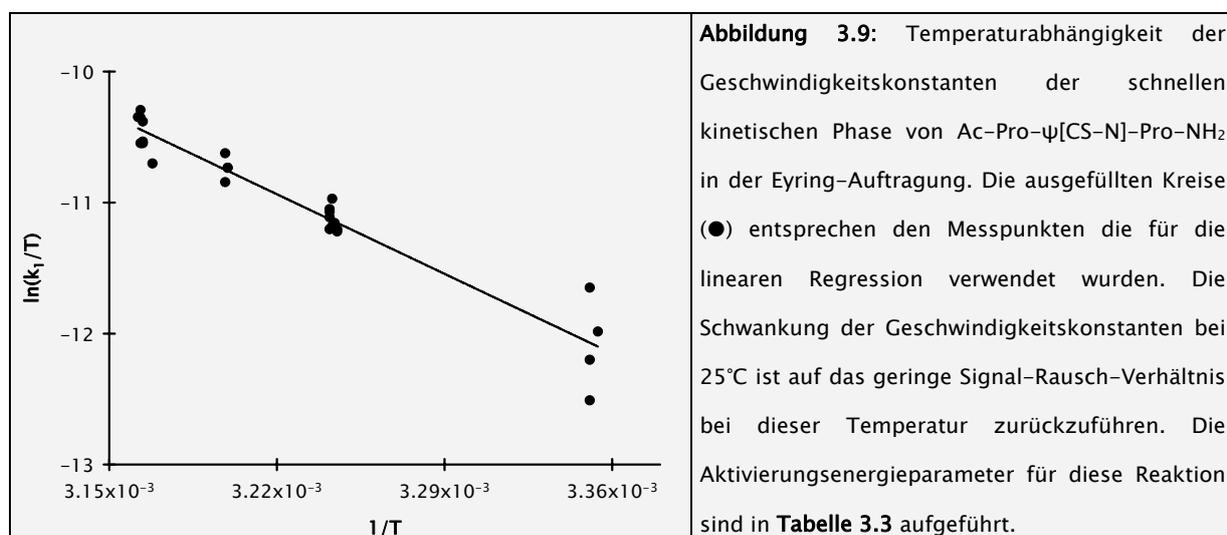
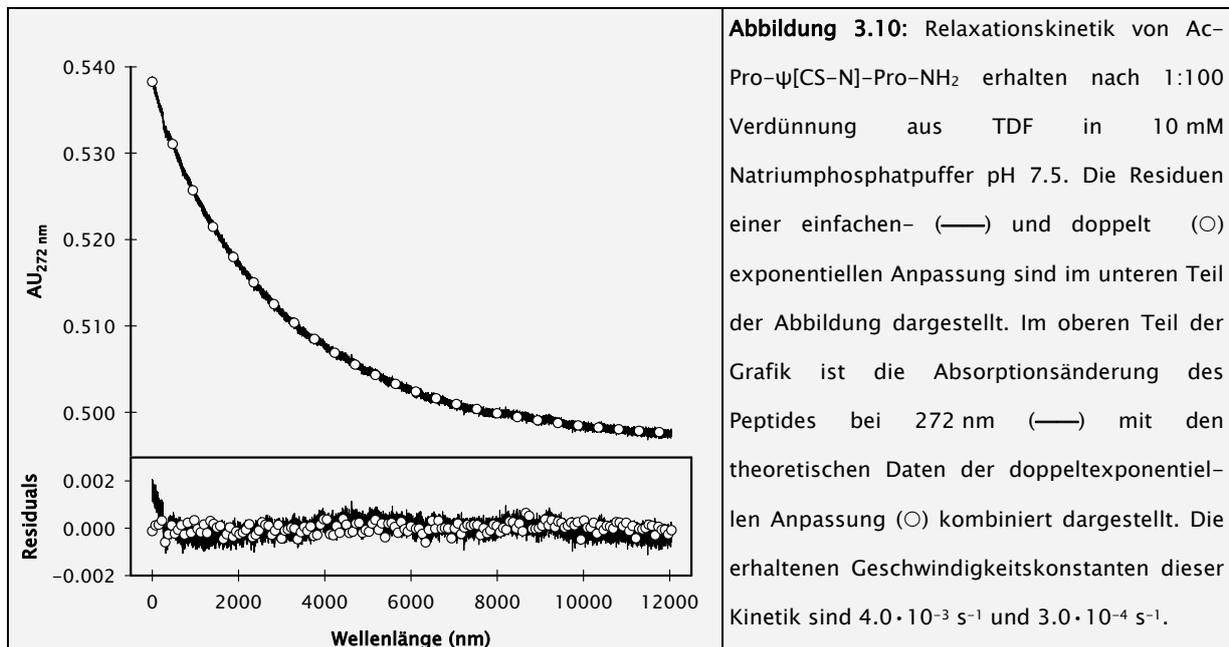


Tabelle 3.3: Aktivierungsenergieparameter der schnellen kinetischen Phase der Relaxationsreaktion von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ erhalten nach Bestrahlung mit geringer Lichtintensität über 50 Minuten. Die Datenpunkte, die die Grundlage für die Berechnung der Parameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger darstellen, sind in **Abbildung 3.9** aufgeführt. Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei einem pH von 7.5 durchgeführt. Die Konzentration des Peptides betrug 96 μ M.

ΔG^\ddagger in kJ/mol	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔS^\ddagger in J/(mol·K)
88.8 ± 0.6	72.1 ± 4.2	-56.1 ± 5.4

Die Relaxationskinetik von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ nach einem Lösungsmittelsprung aus TDF zeigt ebenfalls ein doppeltexponentielles Verhalten (**Abbildung 3.10**). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der nach Lösungsmittelsprung erhaltenen Relaxationsreaktion betragen $(3.67 \pm 1.0) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $(3.57 \pm 0.49) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Diese Werte stimmen gut mit den Relaxationsgeschwindigkeiten überein, die nach Photoanregung mit niedriger Lichtintensität ermittelt wurden. Auch entspricht das Amplitudenverhältnis schneller zu langsamer Phase $\sim 1:10$. Der Lösungsmittelsprung aus Isopropanol führte in vielen Fällen dazu, dass ein Großteil des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ durch eine Nebenreaktion modifiziert wurde, und kann demzufolge nur bedingt als Vergleich herangezogen werden. Das dabei entstehende Nebenprodukt besitzt ein rot verschobenes Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei

320 nm. Weiterhin deutet die erhöhte molekulare Masse von +17 auf die Addition einer OH-Gruppe hin.



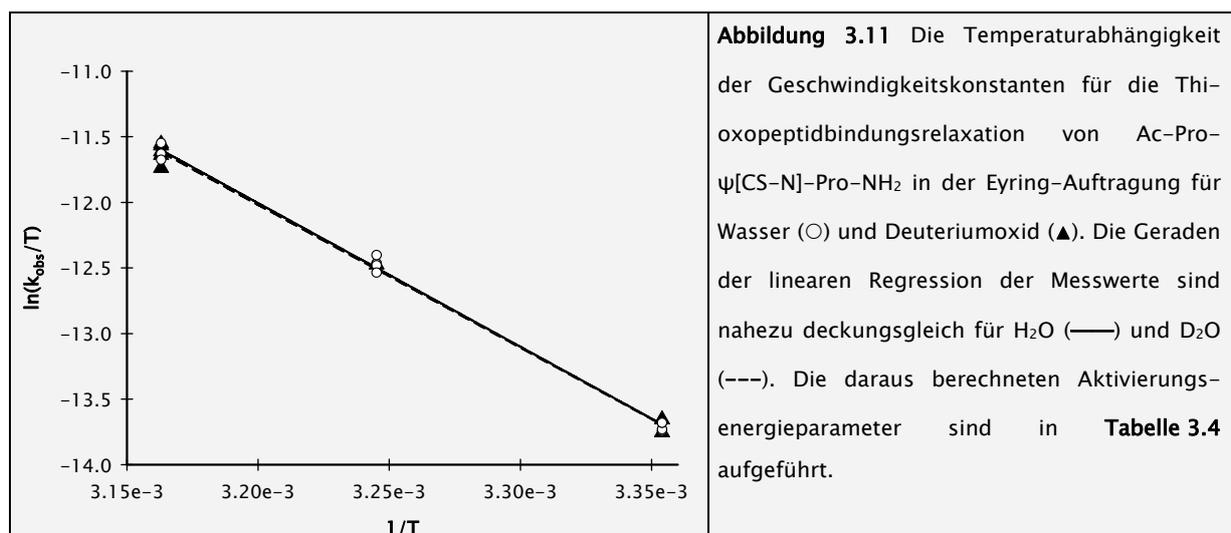
Die massenspektrometrische Fragmentierung dieses Produktes zeigte, dass das Peptid weiterhin in linearer Form vorlag. Somit handelt es sich bei dieser Nebenreaktion nicht um eine Diketopiperazinbildung. Die Fragmentanalysen zeigten zusätzlich, dass die 17 Masseinheiten direkt mit der C(S)N Gruppierung verknüpft sein müssen. Die Art dieser Verknüpfung konnte aber trotz weiterer massenspektrometrischer und NMR-spektroskopischer Untersuchungen nicht näher charakterisiert werden.

Die Aktivierungsenergieparameter der langsamen Relaxationsreaktion von Ac-Pro- ψ [CS-N]-NH₂ nach Photoanregung, sind in **Tabelle 3.4** aufgeführt. Diese beschreiben die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung, wie aus NMR-spektroskopischen Messungen geschlussfolgert werden konnte. Die CTI der Thioxopeptidbindung in Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ ist demnach hauptsächlich enthalpisch kontrolliert und zeigt keinen kinetischen Lösungsmittelisotopieeffekt (KSIE) (**Abbildung 3.11**, **Tabelle 3.4**). Die beobachteten Unterschiede in den ΔH^\ddagger - und ΔS^\ddagger -Werten für Wasser und Deuteriumoxid liegen im Fehlerbereich der Messungen. Im Gegensatz zu Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ zeigt die Relaxationsreaktion von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ einen KSIE nach photoinduzierter Gleichgewichtsverschiebung. Dieser konnte aufgrund der Instabilität der Substanz nur in einem 50/50 H₂O/D₂O (v/v) Gemisch bestimmt werden. Dazu wurde direkt im Anschluss an

eine analytische Feintrennung die Spitze des Hauptpeaks aufgefangen und sofort mit einem äquivalenten Volumen von 10 mM Natriumphosphatpuffer, mit einem pH oder pD von 7.5, versetzt. Unter diesen Voraussetzungen konnten keine Nebenprodukte, in der anschließend durchgeführten HPLC-chromatographischen Analyse der Peptidlösung, detektiert werden. Die Daten der Relaxationsreaktion nach Bestrahlung in reinem H₂O konnten durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Für 35°C ergab sich dafür eine Geschwindigkeitskonstante von $5.7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. In einem 50/50-H₂O/D₂O-Gemisch dagegen war eine doppeltextponentielle Relaxationskinetik beobachtbar, die durch Geschwindigkeitskonstanten von $5.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $5.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden konnte. Beide kinetische Phasen wiesen nahezu identischen Amplituden auf ($A_1 = 7.3 \cdot 10^{-4} \text{ AU}$ und $A_2 = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ AU}$). Dieser KSIE ist ein weiterer Hinweis auf die intramolekulare Wasserstoffbrücke die in diesem Peptid in wässriger Lösung vorliegt.

Tabelle 3.4: Aktivierungsenergieparameter der Thioxobindungsrelaxationsreaktion von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ in Wasser und Deuteriumoxid. Die Datenpunkte, die die Grundlage für die Berechnung der Parameter ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger darstellen, sind in **Abbildung 3.11** aufgeführt.

Lösungsmittel	ΔG^\ddagger in kJ/mol	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔS^\ddagger in J/(mol·K)
H ₂ O	92.8	90.5 ± 2.4	-7.9 ± 0.33
D ₂ O	92.8	91.0 ± 1.5	-5.9 ± 0.16



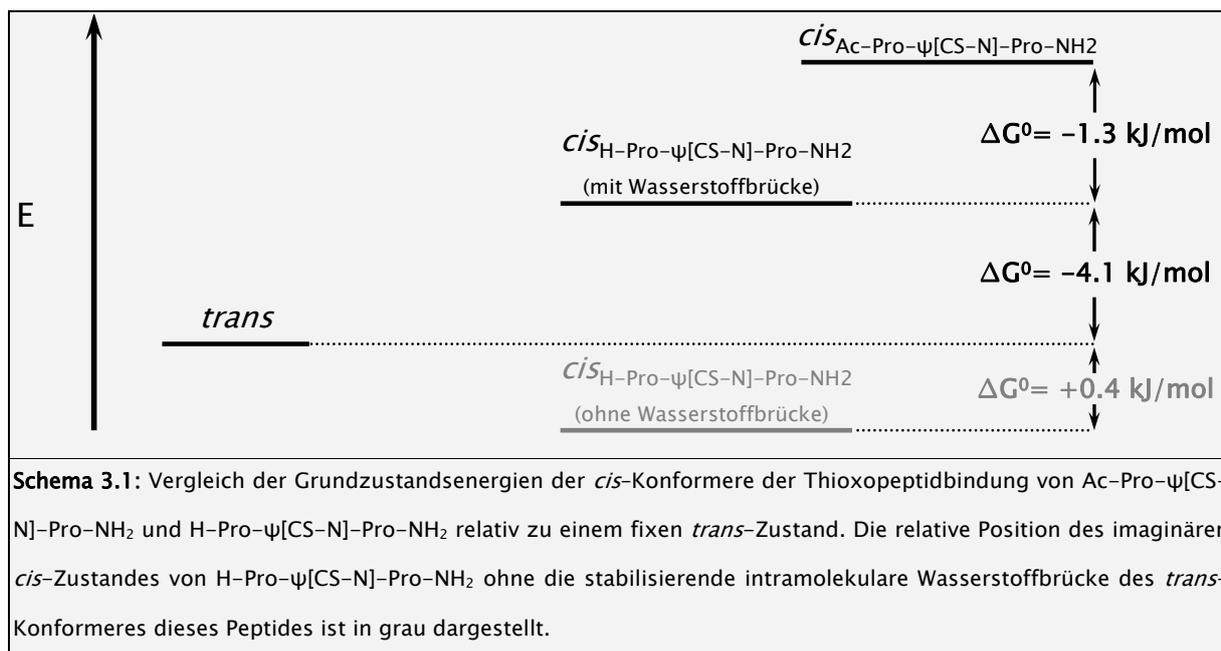
3.2 Die CTI der Thioxopeptidbindung der Dipeptide (Diskussion)

Wie Prolyl–Prolylbindungen liegen auch Thioxoprolyl–Prolylbindungen in unstrukturierten Peptiden hauptsächlich in der *trans*-Konformation vor. Vergleicht man die Gleichgewichtslage der *cis/trans*-Isomere der Thioxodipeptide H–Pro– ψ [CS–N]–Pro–NH₂ und Ac–Pro– ψ [CS–N]–Pro–NH₂ miteinander, kann man feststellen, dass die Einführung der sterisch anspruchsvolleren Acetylgruppe am N-Terminus der Sequenz zu einer Verringerung des *cis*-Konformeren Anteils im Gleichgewicht führt. Für Peptide ist es generell zu beobachten, dass die Verlängerung der Polypeptidkette zu verringerten *cis*-Konformeranteilen einer Bindung im Gleichgewicht führt [10–13]. Dieser Effekt betrifft neben amidische Peptidbindungen auch Ester, und wird auf größere van-der-Waals-Kontakte, sowie auf eine Erhöhung der Hyperkonjugation zwischen dem Carbonylsauerstoffatom O_i und dem Carbonylkohlenstoffatom in Position *i*–1 in der *trans*-Konformation zurückgeführt [14, 16, 172, 181]. Der Anteil dieser Effekte bezüglich der Thioxopeptidbindungs-*cis/trans*-Grundzustandsenergie­differenz muss dabei einen größeren Betrag einnehmen, als die intramolekulare Wasserstoffbrücke, die im Falle des H–Pro– ψ [CS–N]–Pro–NH₂ zwischen einem N–H Proton des freien N-Terminus und dem Schwefelatom der Thioxocarbonylgruppe in der *trans*-Konformation ausgebildet wird. Die Wasserstoffbrückenbildungsenthalpie von Amiden beträgt ca. 13 kJ/mol und weist zusätzlich einen ungünstigen Entropieterm auf (Tabelle 3.5). Die daraus resultierende Stärke einer Wasserstoffbrücke bei 25°C muss demnach einen Betrag von ca. 9 kJ/mol einnehmen. Die Wasserstoffbrückenbildungsenthalpie von Thioxoamiden ist im Vergleich zu Amiden ca. doppelt so groß, wird aber viel stärker entropisch kompensiert [67].

Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter der Wasserstoffbrückenbildung von Dimethylformamid (DMF) und Dimethylthioformamid. Tabelle modifiziert nach Min et al. 1998 [67].

	$\Delta G^{\circ}_{25^{\circ}\text{C}}$ (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol·K)
Dimethylformamid	~-8.0 bis -10.2	~-12.5 bis -13.4	~-10.5 bis -15.1
Dimethylthioformamid	~-3.9 bis -5.8	~-20.9 bis -22.2	~-56.9 bis -61.8

Der deutliche Unterschied in den Werten für ΔH^0 und ΔS^0 von Thioxoamidinen und Amidinen ist dabei auf das höhere Dipolmoment der Thioxozeptidbindung zurückzuführen [66, 68]. Die freie Bildungsenergie einer Wasserstoffbrücke mit der Thioxozeptidbindung als Akzeptor beträgt demnach nur ~ 4.5 kJ/mol bei 25°C. Die Distanz zwischen Donor und Akzeptor hat dabei einen größeren Einfluss auf die Stärke der Wasserstoffbrücke als deren Ausrichtung [178, 182–184]. Im Falle des in H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ berechneten Winkels von 127.8° bei einer Wasserstoffbrückendistanz von 2.26 Å sollte die Stärke der Wasserstoffbrücke nicht dramatisch von diesem Wert abweichen. Diese ~ 4.5 kJ/mol stellen dann die minimale Energie dar, die durch Einführung der N-terminalen Acetylgruppe in Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂, die *trans*-Konformation der Thioxozeptidbindung stabilisieren muss. Somit ist der Anteil der Grundzustandsenergie differenz der die *trans*- und *cis*-Isomere der Thioxozeptidbindung in Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂, aufgrund von Hyperkonjugation und sterischen Effekten durch die Acetylgruppe, separiert mit ca. 5.8 kJ/mol bei 25°C anzusetzen (Schema 3.1).



Die Acetyl-Prolylbindung in Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ stellt neben der Thioxozeptidbindung eine zweite Bindung dar, die ein *cis/trans*-Gleichgewicht aufweist. In diesem Dipeptid existieren vier Konformere deren Grundzustandsenergie differenzen in **Tabelle 3.1** aufgeführt sind. Für die Thioxozeptidbindung und die Acetyl-Prolylbindung, sind die *trans*-Konformationen dominierend in wässriger Lösung. Die UV-Vis-Spektren der Isomere zeigen, dass die Thioxoprolin-Prolin-Peptidbindung in der *cis*-Konformation ein stärker hypsochrom

verschobenes Spektrum im Vergleich zur *trans*-Konformation aufweist. Das bedeutet, dass die Energielücke zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO) in der *cis*-Konformation dieser Peptidbindung größer ist. Demzufolge muss die Konjugation der Peptidbindung in *cis*-Konformation geringer ausfallen als in der *trans*-Konformation [183]. Dieses wiederum verringert auch das Dipolmoment der Thioxopropyl-Prolylpeptidbindung in *cis*-Konformation. Dieses gilt scheinbar auch für Thioxopropylbindungen bei denen der N-terminale Rest von einer Aminosäure abstammt die keine Iminosäure ist [180]. Bei amidischen Thioxozeptidbindungen ist der gegenteilige Effekt zu beobachten, was auf die Besonderheit von Prolin als Aminosäure in biologischen Systemen hinweist. Vergleicht man die Konformerengleichgewichte von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ in Wasser (D₂O) mit denen in deuteriertem Isopropanol (D8) und 8fach deuteriertem Tetrahydrofuran (TDF), kann man feststellen, dass der *cis*-Konformeranteil der Thioxozeptidbindung im Gleichgewicht mit zunehmender Hydrophobizität des Lösungsmittels zunimmt. Dabei scheint die Hydrophobizität des Lösungsmittels dominierend, da sich die Dipolmomente von Isopropanol und TDF nur geringfügig unterscheiden (**Tabelle 3.9**). Der *cis*-Anteil der Acetyl-Prolylbindung hingegen korreliert nicht mit diesem Effekt, da dieser in TDF, dem Lösungsmittel mit der größten Hydrophobizität, den kleinsten Anteil im Gleichgewicht besitzt. Generell wird die *trans*-Konformation in Peptiden aufgrund der n-π* Interaktion zwischen dem O_{i-1} und dem C_i der Carbonylgruppe stabilisiert [14, 16, 172, 181]. Dieser stabilisierende Effekt kann im Falle der Acetyl-Prolylbindung nicht auftreten, da sich diese Bindung am N-Terminus des Peptides befindet. Da weder die Acetyl-Prolyl noch die Thioxoprolin-Prolylbindung als Wasserstoffbrückendonoren fungieren kann, aufgrund der Abwesenheit des N-H-Protons, kann auch die Donor/Akzeptor-Fähigkeit der Lösungsmittel nur bedingt als Erklärung herangezogen werden [25]. Demzufolge muss der beobachtete Unterschied durch Lösungsmittelimmobilisierung, die in der *trans*-Konformation größer ist [20], und die Fähigkeit der *trans*-Konformation stärkere intermolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden [26], erklärt werden. Aufgrund des geringeren Dipolmomentes von Isopropanol und Tetrahydrofuran im Vergleich zu Wasser, fällt die Stabilisierung der *trans*-Konformation durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung geringer aus. Da das Dipolmoment und die Polarität der Thioxozeptidbindung größer ist, als die der Acetyl-Prolylbindung [66, 68],

sollte diese Änderung der Lösungsmittleigenschaft die Thioxozeptidbindung stärker betreffen als die Acetyl-Prolylbindung.

Tabelle 3.6: Ausgewählte Eigenschaften der Lösungsmittel Wasser (H₂O), Isopropanol (deutert) und Tetrahydrofuran (8fach deutert) im Bezug zu den *cis*-Isomerenanteilen von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ im Gleichgewicht.

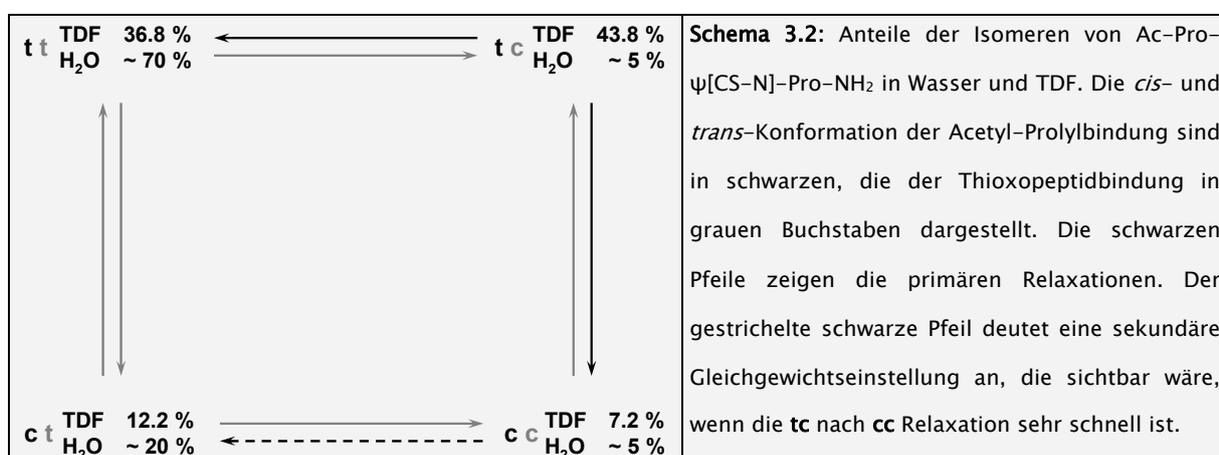
	H ₂ O	Isopropanol (D8)	TDF
Dipolmoment	1.84 Debye ^a	1.66 Debye ^b	1.63 Debye ^b
Dielektrizitätskonstante	80.1 (20°C) ^a	18.3 (20°C) ^b	7.5 (20°C) ^b
Wasserstoffbrücken Donor/Akzeptor	Donor/Akzeptor	Donor	Akzeptor
Dichte	1 g/cm ³	0.786 g/cm ³ (20°C)	0.888 g/cm ³ (20°C)
Hydrophobizität	klein $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ groß		
Anteil der Ac-Pro-<i>cis</i>-Konformation in Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂	~25 %	29.9 %	19.4 %
Anteil des Thioxo-<i>cis</i>-Isomeres in Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂	~10 %	37.3 %	51.0 %

a) [183]; b) <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/>

Diese Tatsache bietet eine Erklärung dafür, warum in Isopropanol nahezu ausschließlich das *cis/trans*-Gleichgewicht der Thioxozeptidbindung aber nicht das *cis/trans*-Gleichgewicht der Acetyl-Prolylbindung verschoben ist (**Tabelle 3.1/3.2**). Da TDF eine kleinere Dielektrizitätskonstante als Isopropanol besitzt, ist in diesem Lösungsmittel das Thioxozeptidbindungsgleichgewicht noch stärker zugunsten der *cis*-Konformation verschoben. Das *cis/trans*-Gleichgewicht der Acetyl-Prolylbindung dagegen korreliert nicht mit der Hydrophobizität der Lösungsmittel. Dieses Gleichgewicht, muss demzufolge stärker von der Lösungsmittelimmobilisierung abhängig sein. Die Lösungsmittelmoleküle von TDF sind im Vergleich zum Isopropanol (D8) voluminöser, besitzen aber ein fast identisches Dipolmoment (**Tabelle 3.6**). Demzufolge sollten in TDF weniger Lösungsmittelmoleküle um die Oberfläche des Peptides angeordnet sein. Dieses führt wahrscheinlich dazu, dass der Entropiebeitrag der Grundzustandsenergiedifferenz in TDF einen anderen Wert aufweist als in Isopropanol. Dieser Entropieunterschied bedingt, dass die gestreckte *trans-cis*-Konformation des Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptides in TDF stabiler als in Wasser ist.

Diese hier gemachten Aussagen gelten nur bedingt, da vorausgesetzt wurde, dass sich die Gleichgewichte beider Bindungen im Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid nicht beeinflussen. Da dieses jedoch der Fall ist [16], dienen diese Erklärungen nur dazu generell die Lösungsmittelleffekte darzustellen, die das Isomerengleichgewicht beider Bindungen beeinflussen.

Induziert man im Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid eine Gleichgewichtsverschiebung durch Anregung des ${}^1\pi$ - ${}^1\pi^*$ Übergangs mit hoher Lichtintensität über einen kurzen Zeitraum erhält man monoexponentielle Relaxationskinetiken für die Wiedereinstellung des Thioxo-*cis/trans*-Gleichgewichtes. Dagegen erhält man nach einem Lösungsmittelsprung dieses Dipeptides aus TDF in wässrige Umgebung eine zusätzliche kinetische Phase. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen unterscheiden sich dabei ca. um Faktor 10. Dieses wirft die Frage auf, welche Prozesse den beiden beobachteten kinetischen Phasen zugrunde liegen. Das Gleichgewicht der vier Einzelkonformere konnte in TDF mittels NMR-Spektroskopie eindeutig bestimmt werden (**Tabelle 3.1/3.2**). Ebenfalls konnte für die langsame Reaktion mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass es sich dabei um die CTI der Thioxozeptidbindung handelt. Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass die langsame Reaktion die tc- nach tt-Isomerisierung dieses Peptides beschreibt, da die Amplitude dieser Reaktion am größten ist. Das Verhältnis zwischen tt- und ct-Konformer in Wasser und TDF beträgt $\sim 75:25$, d.h. diese Konformere befindet sich nach einem Lösungsmittelsprung aus TDF in Wasser schon im Gleichgewicht zueinander. Demzufolge kann die Ursache der schnellen kinetischen Phase auf zwei Isomerisierungsprozesse eingeschränkt werden (**Schema 3.2**):



1) Nach einem Lösungsmittelsprung aus TDF streben die *tc*- und *cc*-Isomere einem äquimolaren Verhältnis entgegen. Da das *tc*-Isomer in TDF ca. 6-mal höher populierte ist im Vergleich zum *cc*-Konformer, muss es demzufolge nach dem Lösungsmittelsprung zu einem Ausgleich zwischen diesen beiden Spezies kommen. Die Acetyl-Prolyl-Isomerisierung besitzt Literaturangaben zufolge Aktivierungsenergien von 82 kJ/mol für die *cis*- nach *trans*- und 85.1 kJ/mol für die *trans*- nach *cis*-Umwandlung wenn der Prolinrest C-terminal als freie Säure in der anionischen Form vorliegt [23]. Demzufolge müsste diese Isomerisierungsreaktion unter den gewählten Versuchsbedingungen ca. Faktor 7 schnellere Geschwindigkeitskonstanten aufweisen. Für Acetyl-Prolyl-Methylester dagegen wurden ΔG^\ddagger -Werte von 86.4 kJ/mol für die *cis*- nach *trans*- und 88.1 kJ/mol für die *trans*- nach *cis*-Isomerisierung der Acetyl-Prolylbindung bestimmt [175]. In diesem Fall würde die Geschwindigkeitskonstante für die *trans*- nach *cis*-Umwandlung einen Wert einnehmen, der dem für die beobachtete schnelle kinetische Phase der Lösungsmittelsprungexperimente entspricht.

2) Besitzt die Acetyl-Prolylbindung in Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ eine Aktivierungsenergie die annähernd der von Ac-Pro-OH entspricht, ist die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen dem *tc*- und *cc*-Konformer nicht für die beobachtete schnelle kinetische Phase nach Lösungsmittelsprung aus TDF verantwortlich. Nach einem schnellen Konzentrationsausgleich zwischen *tc* und *cc* kann dann nur die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung für den Konformerübergang von *cc* nach *tc* herangezogen werden, um das Auftreten der zweiten kinetischen Phase zu erklären.

Um die schnelle kinetische Phase einem der beiden möglichen Gleichgewichtseinstellungen zuordnen zu können, müssen die Ergebnisse der Relaxationsreaktionen nach photoinduzierter Gleichgewichtsverschiebung herangezogen werden. Bestrahlt man das Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid 5 Minuten mit hoher Lichtintensität, wird vorwiegend das im Gleichgewicht am höchsten populierte Thixo-*trans*-Isomer, die *tt* Form, in die *tc*-Konformation überführt. Unter diesen Bestrahlungsbedingungen wird kein photostationäres Gleichgewicht erreicht (**Abbildung 1.4**). Dieses führt dazu, dass die Konzentrationsdifferenz zwischen dem *tc*- und dem *cc*-Isomer zu gering ist, sodass die Amplituden für die Umwandlung der *cc*-Konformation nach *tc* oder der *tc*-Konformation nach *cc* nicht mehr detektierbar sind. Bestrahlt man über einen Zeitraum von 50 Minuten mit geringer

Lichtintensität erhält man Relaxationskinetiken, die nur durch Kombination zweier erster Ordnungsreaktionen angepasst werden können. Da die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und langsamen Relaxationsreaktion unter diesen Voraussetzungen denen nach Lösungsmittelsprung aus TDF entsprechen, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um identische Prozesse handelt. Diese experimentellen Bedingungen gewährleisten, dass sich die Peptidlösung lange genug im photostationären Zustand befindet, sodass annähernd äquimolare Konzentrationen an *tc*- und *cc*-Konformer vorliegen. Dafür müssen zwei Voraussetzungen gelten, a) die Extinktionskoeffizienten und -maxima der *tc*- und *cc*-Konformation sind nahezu identisch und b) die Grundzustandsenergiedifferenzen der Acetyl-Prolylbindung sind unter diesen Versuchsbedingungen unverändert. Da unter diesen Bestrahlungsbedingungen die Konzentrationen der *tc*- und *cc*-Isomeren gleich sind, kann die schnelle Relaxationsreaktion nur durch die Isomerisierungsreaktion, die das *cc*- in das *ct*-Konformer überführt, erklärt werden (Schema 3.3).

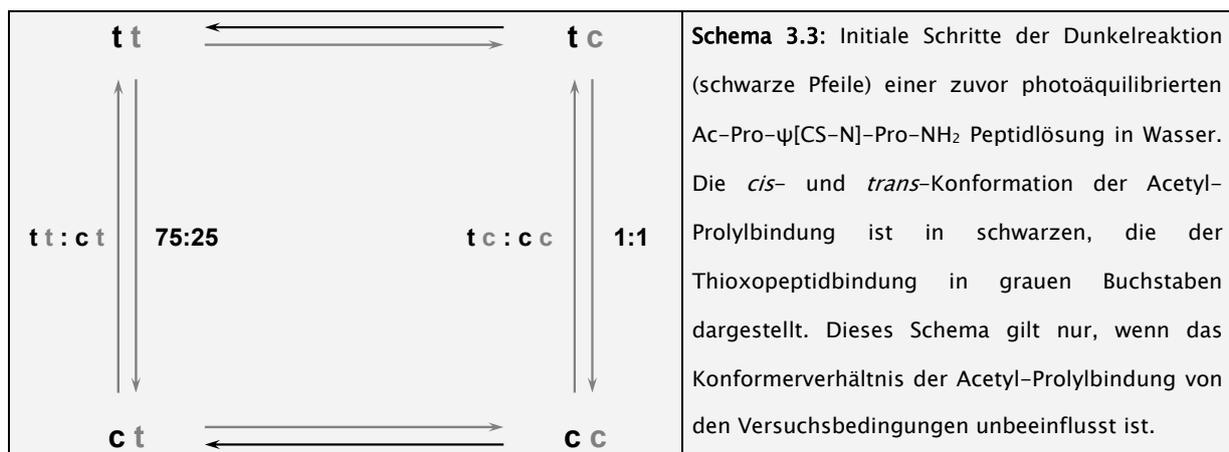


Tabelle 3.7: CTI-Aktivierungsenergieparameter der Thioxozeptidbindung in Wasser. Alle dafür notwendigen Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 aufgenommen. Die Peptidkonzentration für die Messung der *cc/ct*-Aktivierungsparameter betrug 96 μM, die für die Messung der *tc/tt*-Aktivierungsparameter betrug 40 μM.

<i>cis/trans</i> -Gleichgewicht von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH ₂	ΔG^\ddagger in kJ/mol	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔS^\ddagger in J/(mol·K)
<i>cc/ct</i>	88.8 ± 0.6 ^a	72.1 ± 4.2 ^a	-56.1 ± 5.4 ^a
<i>tc/tt</i>	92.8 ^b	90.5 ± 2.4 ^b	-7.9 ± 0.33 ^b

a) Daten aus **Tabelle 3.3**; b) Daten aus **Tabelle 3.4**

Vergleicht man die Aktivierungsenergieparameter der *cc*- nach *ct*-Isomerisierungsreaktion mit denen der *tc*- nach *tt*-Isomerisierung kann man erhebliche Unterschiede feststellen (**Tabelle 3.7**). In beiden Fällen handelt es sich um die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Thioxozeptidbindung ein und derselben Verbindung. Die Aktivierungsenergie der Thioxozeptidbindungsisomerisierung ist für die CTI von *cc* zu *ct* um ca. 4 kJ/mol niedriger verglichen mit der Thioxozeptidbindungsisomerisierung bei der sich die Acetyl-Prolylbindung in *trans*-Konformation befindet. Aufgrund der Grundzustandsenergieunterschiede der Konformer in wässriger Lösung würde man eine erniedrigte Aktivierungsenergiebarriere von 3.11 kJ/mol erwarten (**Abbildung 3.3**). Diese Diskrepanz von 0.9 kJ/mol könnte möglicherweise auf Messungenauigkeiten beruhen. Betrachtet man aber die enthalpischen und entropischen Anteile der Aktivierungsbarriere ist eindeutig erkennbar, dass es sich hierbei um zwei völlig verschiedene Vorgänge handeln muss. Die Rotationsbarriere der Thioxozeptidbindung weist im Falle der *cc*- zu *ct*-Isomerisierungsreaktion einen deutlich geringeren enthalpischen Anteil auf, verglichen mit der *tc*- nach *tt*-Umwandlung. Gleichzeitig ist dieser Übergang aber auch deutlich entropisch ungünstiger. Der kleinere ΔH^\ddagger -Wert für den *cc*- nach *ct*-Übergang kann das Resultat der geringeren Konjugation der Thioxozeptidbindung als auch Folge einer verringerten Hyperkonjugation in der *cc*-Konformation sein. Dies würde bedeuten, dass das Stickstoffatom im Grundzustand weniger planar und somit dem Übergangszustand ähnlicher als in der *tc*-Konformation ist, was zu einer verringerten Rotationsbarriere führen würde [9]. Der ungünstige entropische Anteil der Aktivierungsenergie kann Folge einer größeren Umordnung von Lösungsmittelmolekülen für diesen Konformerübergang sein.

Sind diese Annahmen korrekt, bedeutet das, dass die Übergangszustände der Thioxozeptidbindungsisomerisierung der *tc*- nach *tt*- und *cc*- nach *ct*-Reaktion energetisch nicht äquivalent sind, d.h. der Übergangszustand der Isomerisierung ist abhängig von der Gesamtstruktur des Peptides. Dieses ist verständlich, da die für die Thioxopropyl-Prolylbindung beobachtete geringere Konjugation in der *cis*-Konformation auch für Oxoprolylbindungen beobachtbar ist [185, 186]. Daher kann man annehmen, dass die Hyperkonjugation der Thioxozeptidbindung in der *cc*-Konformation geringer ausfällt verglichen zur *tc*-Konformation. Das bedeutet, dass die Energiebarriere, die für eine

Überführung der Thioxozeptidbindung in den Übergangszustand benötigt wird, kleiner in der cc- als in der tc-Konformation ist.

3.3 Thioxopolyproline (Ergebnisse)

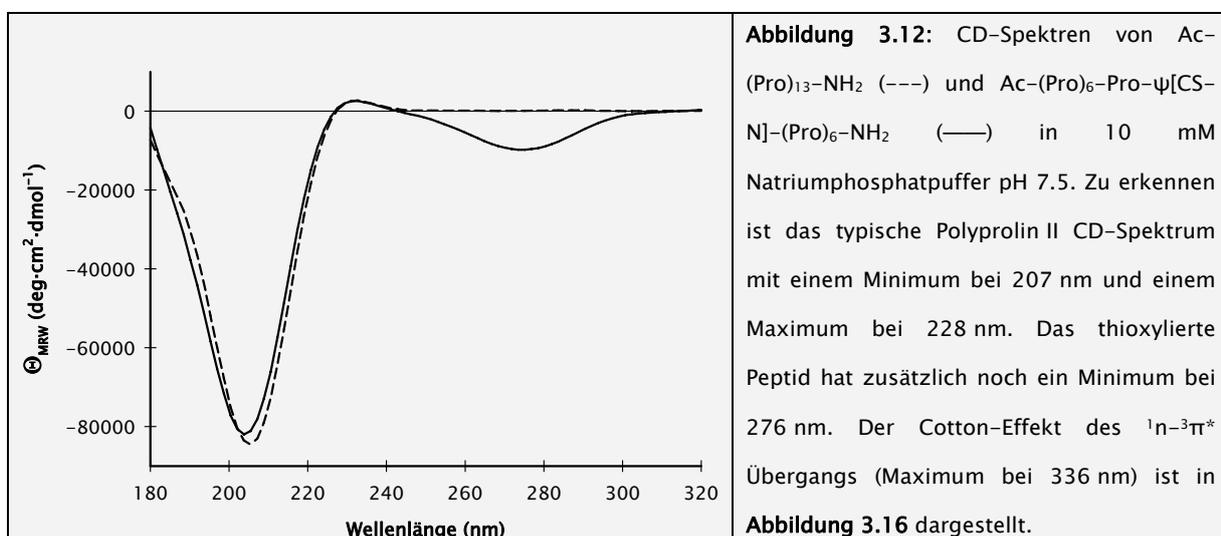
3.2.1 Grundzustände der Thioxopolyprolinpeptide

Um den ortsspezifischen Einfluss von *cis/trans* Isomerisierungsereignissen auf die Polyprolin II Struktur zu untersuchen, wurden die in **Tabelle 3.8** aufgeführten Peptide, bestehend aus 13 Prolinresten, charakterisiert. Für jede ungerade Peptidbindungsposition wurde ein monothioxyliertes Peptid synthetisiert, so dass für jede zweite Peptidbindung ein Thioxomodellpeptid vorlag.

Tabelle 3.8: Sequenzen der in dieser Arbeit charakterisierten Polyprolinpeptide.

Peptid	Position der Thioxopeptidbindung
Ac-Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	1
Ac-(Pro) ₂ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₁₀ -NH ₂	3
Ac-(Pro) ₄ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₈ -NH ₂	5
Ac-(Pro) ₆ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₆ -NH ₂	7
Ac-(Pro) ₈ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₄ -NH ₂	9
Ac-(Pro) ₁₀ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₂ -NH ₂	11
Ac-(Pro) ₁₃ -ψ[CS-NH]-H	—
Ac-(Pro) ₁₃ -NH ₂	—

Die CD-Spektren aller Peptide zeigen die Merkmale von PP II-strukturierten Peptiden [149]. Die Thioxopolyprolinpeptide enthielten zusätzlich die für Thioxopeptidbindungen typischen Banden des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ (bei 276 nm) und ${}^1n\text{-}{}^3\pi^*$ (bei 336 nm) Übergangs, wie exemplarisch in **Abbildung 3.12/3.16** zu sehen ist. Das nicht thioxylierte Referenzpeptid wies in diesem Bereich keine Banden im CD-Spektrum auf.



Das Polyprolinpeptid Ac-(Pro)₁₃-ψ[CS-NH]-H, das keine Thioxopeptidbindung, sondern nur eine Thioxoamidgruppe am C-terminalen Ende aufweist, zeigt einen verschobenen ¹π-¹π* Übergang bei 267 nm. Sowohl UV-Vis- als auch CD-spektroskopisch konnte für dieses Peptid kein Signal am ¹n-³π* Übergang beobachtet werden. Der *cis*-Gehalt der Thioxopeptidbindung wurde mittels NMR-Spektroskopie, in Analogie zum Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid, bestimmt. Die untersuchten Peptide Ac-Pro-ψ[CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂, Ac-(Pro)₄-Pro-ψ[CS-N]-(Pro)₈-NH₂ und Ac-(Pro)₈-Pro-ψ[CS-N]-(Pro)₄-NH₂ zeigten, innerhalb des Messfehlers (± 1 %), jeweils ein *cis*-Gehalt der Thioxopeptidbindung von ~3 %. Somit ist der *cis*-Gehalt einer Thioxopeptidbindung innerhalb eines Polyprolinpeptides unabhängig von deren Position. Für Ac-Pro-ψ[CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂ konnte im Rahmen dieser Untersuchungen eine zweite *trans*-Konformation, die durch das Isomerengleichgewicht der Acetyl-Prolylbindung hervorgerufen wird, analog zum Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid, nachgewiesen werden. Beide Konformere lagen in einem Konzentrationsverhältnis von 74.3 zu 25.7 % bei 5°C vor, wobei in der energetisch ungünstigeren Form die Acetyl-Prolylbindung eine *cis*-Konformation einnimmt. Das *cis/trans*-Verhältnis dieser Bindung ändert sich nur geringfügig mit steigender Temperatur. **Gleichung 3.2** wurde benutzt, um die Grundzustandsenthalpie- und Grundzustandsentropiedifferenz dieser Bindung zu bestimmen. Das dabei erhaltene ΔH⁰ von -1.5 kJ/mol entspricht den in der Literatur beschriebenen Grundzustandsenthalpiedifferenzen für die Ala-Pro Peptidbindung [38]. Die Grundzustandsentropiedifferenz TΔS⁰ dieses Gleichgewichtes beträgt -3.55 kJ/mol.

$$\text{Gleichung 3.2: } \ln K_{c/t} = \left(-\frac{\Delta H_{c/t}^0}{R}\right) \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{c/t}^0}{R}$$

R = ideale Gaskonstante = 8.31451 J/mol·K; T = Temperatur in Kelvin; K = Gleichgewichtskonstante (*cis/trans*);
 ΔH⁰_{c/t} = Grundzustandsenthalpiedifferenz; ΔS⁰_{c/t} = Grundzustandsentropiedifferenz;

Obwohl alle in **Tabelle 3.8** aufgeführten Polyprolinpeptide die eine Thioxopeptidbindung enthalten einen nahezu identischen *cis*-Konformerengehalt bezüglich dieser Bindung aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrem PP II-Strukturgehalt (**Abbildung 3.13B**). Die molaren Extinktionskoeffizienten die zur Eichung der CD-Spektren genutzt wurden sind in **Tabelle 3.9** aufgeführt. Um den PP II-Anteil der Peptide untereinander vergleichen zu

können, wurde die Konzentration der in **Tabelle 3.9** aufgeführten Peptide mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Dafür wurden die Integrale der Methylprotonensignale der Acetylgruppe mit dem von Trimethylsilylpropionsäure, welche in bekannter Konzentration (3 mM) der Lösung zugegeben war, verglichen. Diese geeichten Lösungen wurden dann benutzt, um die UV-Vis-Spektren des jeweiligen Peptides zu normieren. Aus diesen Spektren wurden dann mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes die entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten berechnet. Trimethylsilylpropionsäure hat dabei den Vorteil, dass es weder NMR-spektroskopisch mit den Peptidsignalen interferiert, noch Absorptionbanden bzw. Cotton-Effekte im UV-Vis- und CD-spektroskopisch relevanten Bereich aufweist.

Tabelle 3.9: Molare Extinktionskoeffizienten ausgewählter Polyprolinpeptide.

Peptid	Molarer Extinktionskoeffizient bei angegebener Wellenlänge
Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	$\epsilon_{276\text{ nm}} = 16348\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Ac-(Pro) ₈ -Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₄ -NH ₂	$\epsilon_{276\text{ nm}} = 14967\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Ac-(Pro) ₁₃ - ψ [CS-NH]-H	$\epsilon_{267\text{ nm}} = 16145\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Mit Hilfe dieser Daten war es nun möglich den PP II-Strukturgehalt der Polyprolinpeptide untereinander durch Normierung der CD-Spektren mittels **Gleichung 3.3** zu vergleichen.

Gleichung 3.3:
$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\text{deg} \cdot M_{\text{w}}}{c \cdot d \cdot N_{\text{Pept}} \cdot 10}$$

deg = gemessenes CD-Signal in Grad; **M_w** = Molekulare Masse in g/mol; **c** = Konzentration der Verbindung in mg/ml; **d** = Schichtdicke der Lösung, **N_{Pept}** = Anzahl der Peptidbindungen (Anzahl der Reste -1), **[Θ]_{MRW}** = mean residue weight ellipticity (in deg · cm² · dmol⁻¹)

Wie aus **Abbildung 3.13** zu erkennen ist, nimmt der Anteil an PP II-Struktur zu, je näher sich die Thioxopeptidbindung am C-Terminus der 13-gliedrigen Polyprolinkette befindet. Der geringere PP II-Strukturanteil der nahe dem N-Terminus thioxylierten Polyproline ist dabei verstärkt auf eine Destabilisierung der PP II- und nicht auf einen erhöhten Anteil an PP I-Struktur zurückzuführen. Ein erhöhter Anteil an PP I-Konformation würde zu einer viel stärkeren Bandenverschiebung im Bereich von 220 nm führen (**Abbildung 3.13A**). Das Ac-(Pro)₁₃-NH₂ ein stärkeres PP II-Signal bei 207 nm aufweist als Ac-(Pro)₁₃- ψ [CS-NH]-H ist wahrscheinlich auf den positiven Cotton-Effekt der Thioxylierung zurückzuführen, wie er im Falle des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ zu beobachten ist (**Abbildung 3.7**). Das der *cis*-Gehalt

der gesamten Helix gleich bleibend, und somit unabhängig von der Position der Thioxozeptidbindung ist, zeigte ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]-(\text{Pro})_{12}\text{-NH}_2$ und $\text{Ac}-(\text{Pro})_8\text{-Pro-}\psi[\text{CS-N}]-(\text{Pro})_4\text{-NH}_2$. Wie in **Abbildung 3.14** am Beispiel der β -Kohlenstoffatome des Prolinrings gezeigt ist, konnten alle ^{13}C -NMR-Signale die typische chemische Verschiebungen von *cis*-Prolylpeptidbindungen aufweisen [187, 188], in beiden Peptiden *trans*-Konformationen zugeordnet werden. Somit liegt der Gesamt-*cis*-Gehalt beider Peptide unterhalb der Detektionsgrenze dieser Methode ($\sim 5\%$). Dieses Ergebnis entspricht den bisher publizierten Daten von Oxopolyprolinpeptiden, für die ebenfalls ein $\sim 3\%$ iger Anteil von *cis*-Peptidbindungen nachgewiesen werden konnte [146].

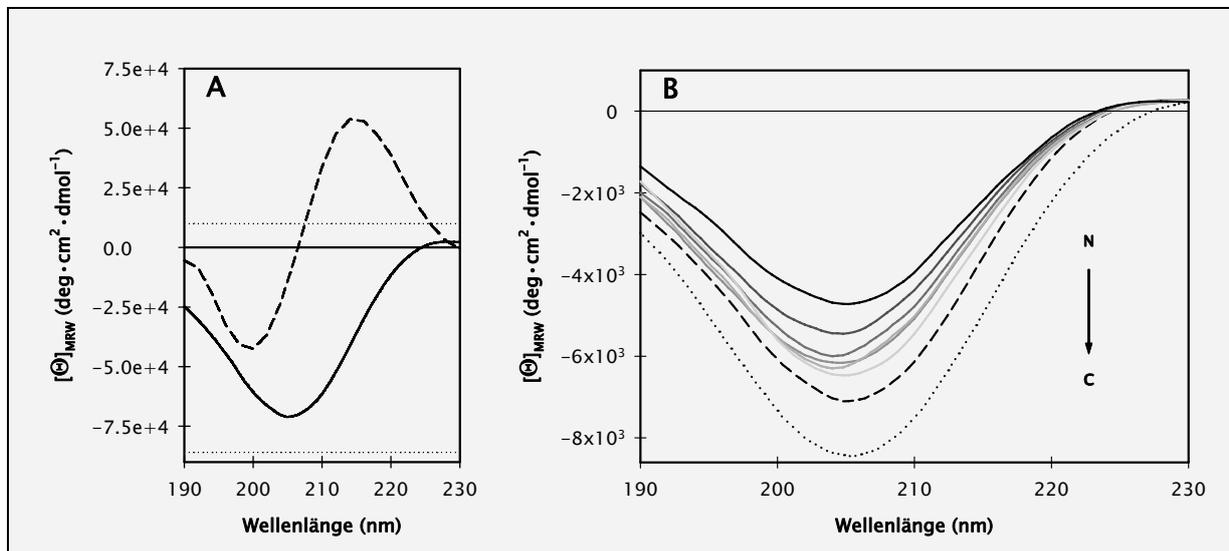


Abbildung 3.13: A) Normierte CD-Spektren von $\text{Ac}-(\text{Pro})_{13}\text{-}\psi[\text{CS-NH}]\text{-H}$ in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 (—) und unmittelbar nach einem Lösungsmittelsprung aus Isopropanol (---). Die Inkubationszeit betrug in beiden Fällen 24 Stunden. Im Gleichgewicht in wässriger Lösung zeigt das Spektrum einen hohen PP II-Sekundärstrukturgehalt mit der typischen negativen Bande bei 207 nm. Nach Inkubation in Isopropanol zeigt das Spektrum dagegen einen hohen Anteil an PP I-Struktur. Die gepunkteten Linien zeigen zum besseren Vergleich die Skalierung des Y-Achsenabschnittes der Abbildung B.

B) Normierte CD-Spektren der thioxylierten Polyprolinpeptide und von $\text{Ac}-(\text{Pro})_{13}\text{-NH}_2$ im Bereich der typischen Bande für die PP II-Struktur bei 207 nm im Gleichgewicht in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5. Ausgehend von $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]-(\text{Pro})_{12}\text{-NH}_2$ (schwarze durchgezogene Linie; —) führt die Positionierung der Thioxozeptidbindung in Richtung des C-Terminus der 13-gliedrigen Polyprolinhelix zu einem stärkeren PP II-Helix Signal. Dieses ist durch Graustufungen der Thioxozeptidspektren in der Abbildung dargestellt, wobei ein hellerer Grauton eine Verschiebung der Thioxozeptidbindung um zwei Bindungen in Richtung des C-Terminus wiedergibt. Die gestrichelte schwarze Linie (---) zeigt das CD-Spektrum von $\text{Ac}-(\text{Pro})_{13}\text{-}\psi[\text{CS-NH}]\text{-H}$, das keine Thioxozeptidbindung enthält, im Gleichgewicht in wässriger Pufferlösung. Zum Vergleich ist das normierte Spektrum von $\text{Ac}-(\text{Pro})_{13}\text{-NH}_2$, aufgenommen unter identischen Bedingungen, als gepunktete Linie (....) eingefügt.

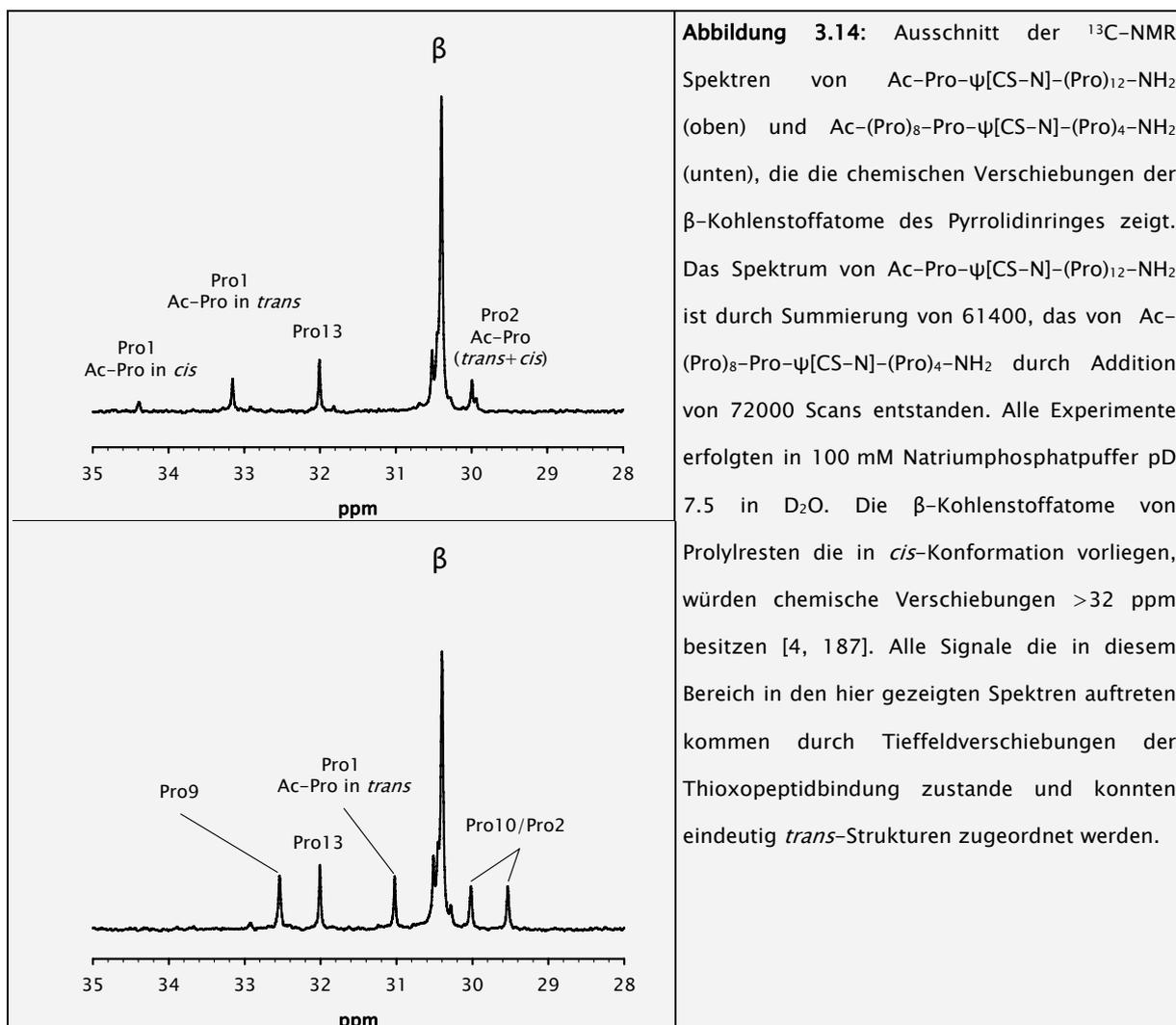
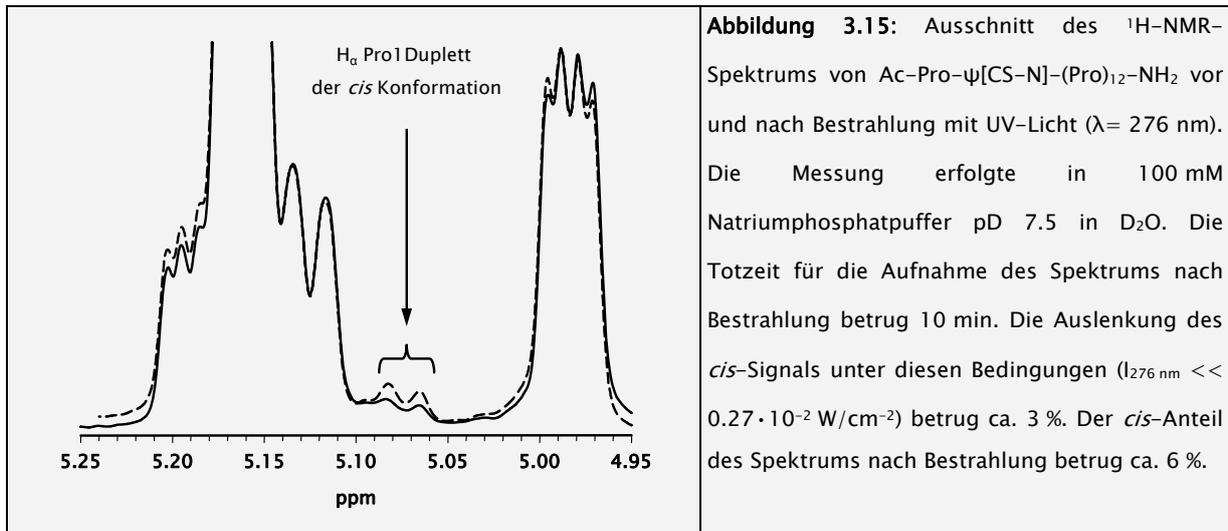


Abbildung 3.14: Ausschnitt der ^{13}C -NMR Spektren von $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-(Pro)}_{12}\text{-NH}_2$ (oben) und $\text{Ac-(Pro)}_8\text{-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-(Pro)}_4\text{-NH}_2$ (unten), die die chemischen Verschiebungen der β -Kohlenstoffatome des Pyrrolidinringes zeigt. Das Spektrum von $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-(Pro)}_{12}\text{-NH}_2$ ist durch Summierung von 61400, das von $\text{Ac-(Pro)}_8\text{-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-(Pro)}_4\text{-NH}_2$ durch Addition von 72000 Scans entstanden. Alle Experimente erfolgten in 100 mM Natriumphosphatpuffer pD 7.5 in D_2O . Die β -Kohlenstoffatome von Prolylresten die in *cis*-Konformation vorliegen, würden chemische Verschiebungen >32 ppm besitzen [4, 187]. Alle Signale die in diesem Bereich in den hier gezeigten Spektren auftreten kommen durch Tieffeldverschiebungen der Thioxopeptidbindung zustande und konnten eindeutig *trans*-Strukturen zugeordnet werden.

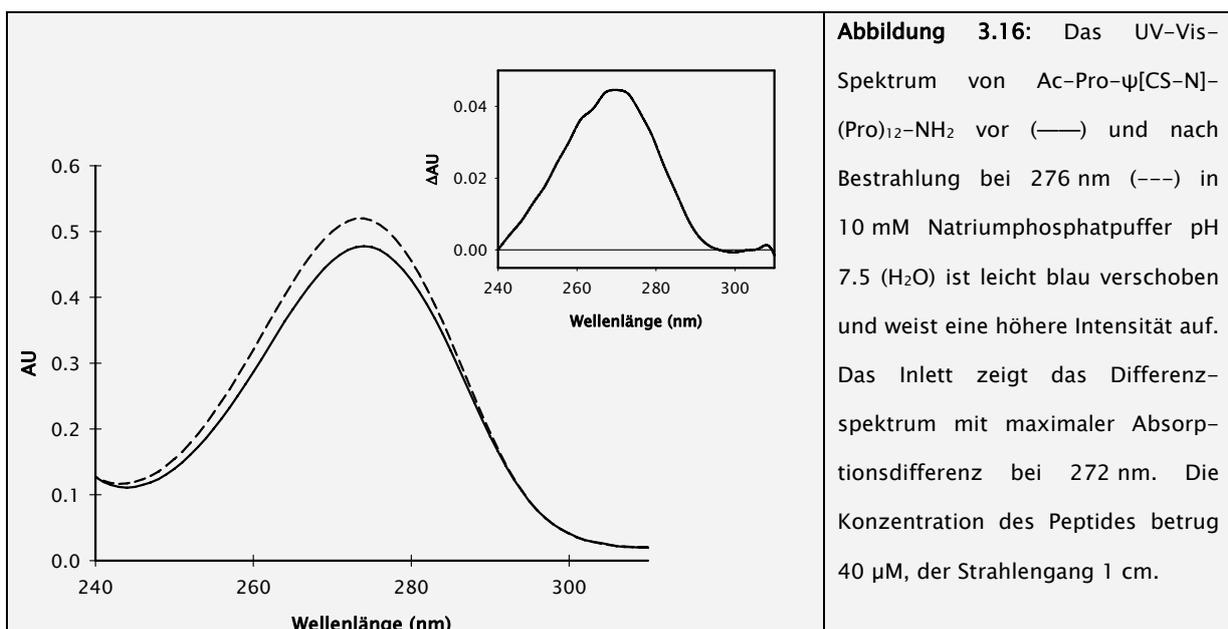
3.2.2 Charakterisierung der Thioxo-*cis/trans*-Isomerisierung der Polyprolinpeptide

Davon ausgehend, dass es sich bei der PP II-Struktur um ein sehr rigides Sekundärstrukturelement handelt, sollten *cis/trans*-Peptidbindungsrotationen zu massiven strukturellen Änderungen führen. Die in den Modellpeptiden integrierte Thioxopeptidbindung ermöglicht es einerseits das Konformerengleichgewicht dieser spezifischen Peptidbindung zu verändern, andererseits bietet es eine Sonde mit deren Hilfe man die Gleichgewichtswiedereinstellung dieser Bindung mit einfachen spektroskopischen Methoden verfolgen kann. Um zu zeigen, dass die Photoanregung des $^1\pi\text{-}^1\pi^*$ tatsächlich zu einem verschobenem Konformerengleichgewicht führte, wurde die Peptidrelaxation anhand von ^1H -NMR-Spektren verfolgt (Abbildung 3.15). Die chemischen Verschiebungen der α -

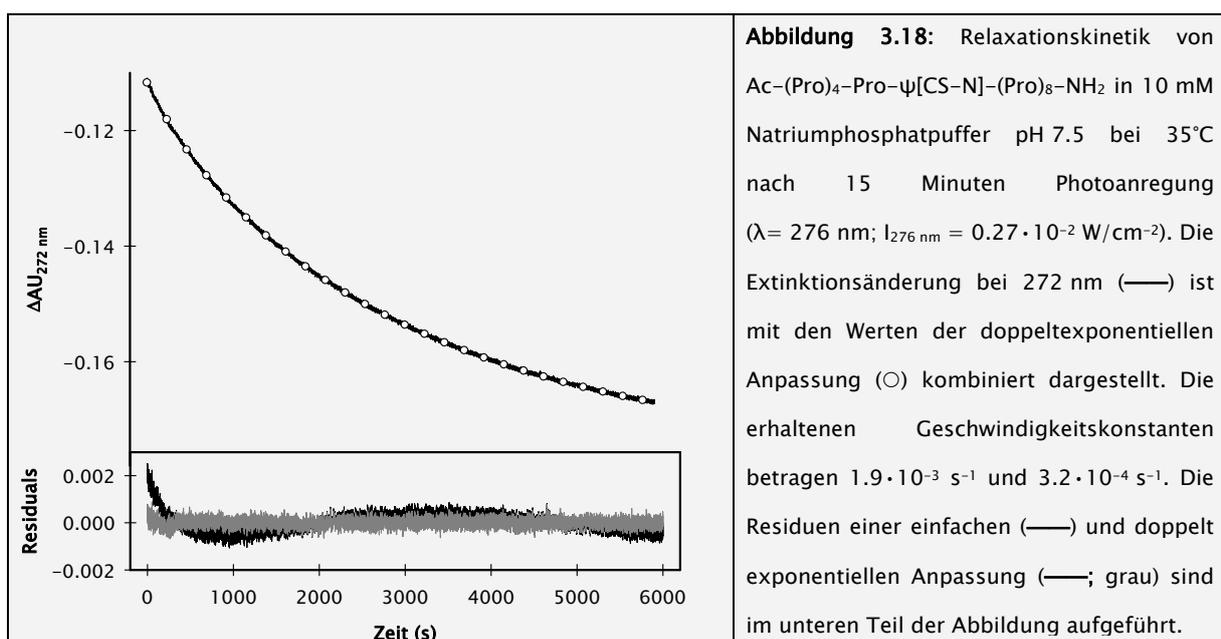
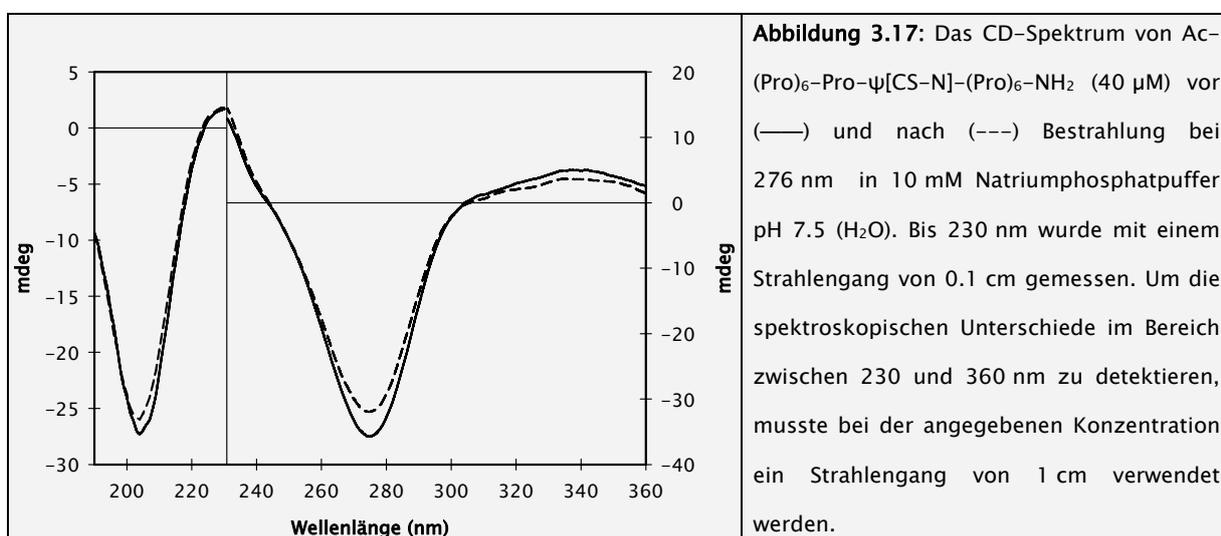
Protonen der Thixo-*cis*- als auch der Thixo-*trans*-Konformation wurden durch die Aufnahme der TOCSY und ROSY 2D- ^1H NMR-Spektren erhalten.



Anhand dieser Spektren konnte geschlussfolgert werden, dass die Photoanregung $\text{am } ^1\pi\text{-}^1\pi^*$ Übergang zu einer Erhöhung des *cis*-Konformerengehaltes führt. Die Relaxationskinetik der in **Abbildung 3.15** gezeigten Signale konnte mittels einer monoexponentiellen Funktion der Form $y = y_0 + a e^{-kt}$ angepasst werden und ergab eine Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion von $4.05 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bei 23°C. Vergleicht man die UV-Vis-Spektren vor und nach Bestrahlung zeigen sich für alle Polyprolinpeptide, die eine Thioxopeptidbindung enthalten dieselben Charakteristika. Vor Bestrahlung ist ein typisches Thioxospektrum mit maximaler Absorption bei 276 nm zu beobachten.



Nach Bestrahlung sind diese Spektren leicht hypsochrom verschoben und besitzen ein Absorptionsmaximum bei 274 nm. Gleichzeitig erhöht sich die Absorption, was einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten der Thixo-*cis*-Isomeren, analog zu Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂, impliziert. Ein Beispiel ist in **Abbildung 3.16** dargestellt. Nach Photoanregung zeigen die CD-Spektren aller Polyprolinpeptide, die eine Thioxozeptidbindung besitzen, ebenfalls ein identisches Verhalten, wobei immer verringerte Cotton-Effekten für das ${}^1\pi-{}^1\pi^*$ und ${}^1n-{}^3\pi^*$ Signal sowie der PP II-Bande bei 207 nm zu beobachten sind (**Abbildung 3.17**). Das Peptid Ac-(Pro)₁₃- ψ [CS-NH]-H, welches nur eine Thioxoamidbindung besitzt, zeigt keine Veränderung des Spektrums nach Bestrahlung.



Anhand der **Abbildung 3.13** kann geschlossen werden, dass mindestens zwei Reaktionen in den Relaxationskinetiken der nach Einzelbindungs-Konformationsänderung auftreten (siehe Abschnitt 3.4). Konsequenterweise, müssen die Relaxationskinetiken aller Thioxopolyprolinpeptide nach beendeter Bestrahlung mit Hilfe einer doppelt exponentiellen Funktion, der Form $y = y_0 + ae^{-k_1t} + be^{-k_2t}$, angepasst werden (**Bsp. in Abbildung 3.18**). Das Auftreten der schnellen kinetischen Phase aufgrund von Temperaturschwankungen kann ausgeschlossen werden, da die Probenlösungen über die gesamte Bestrahlungsdauer im Messgerät unter Rühren temperiert wurden.

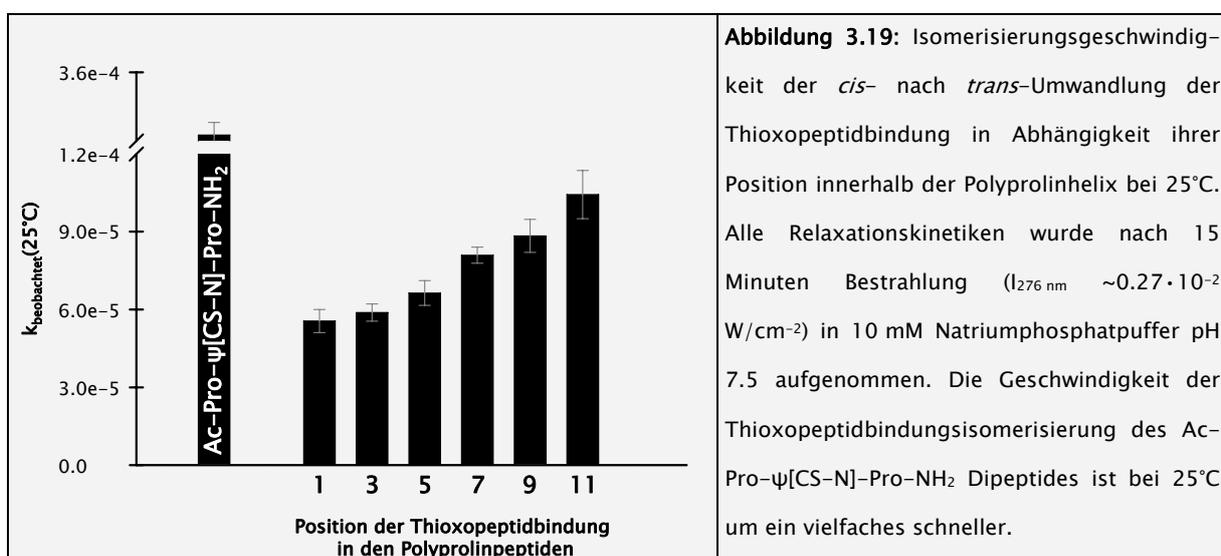
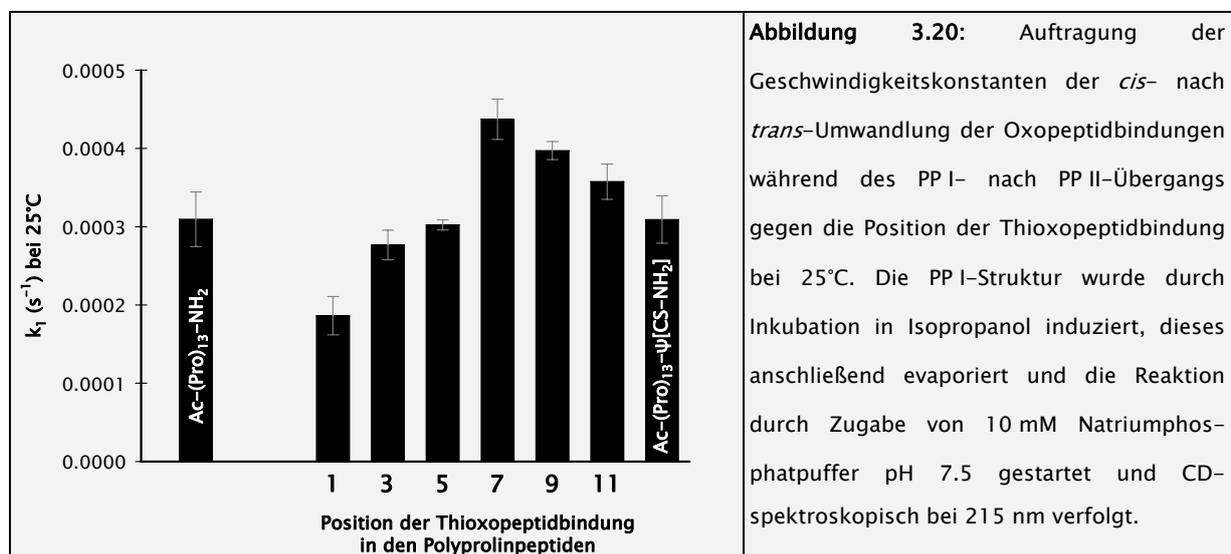


Tabelle 3.10: Aktivierungsenergieparameter der Thiopeptidbindungs-CTI berechnet mittels **Gleichung 3.1** aus den Temperaturabhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten der Thioxo-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion nach Photoanregung bei 276 nm (15 Minuten; $I_{276\text{ nm}} \sim 0.27 \cdot 10^{-2} \text{ W/cm}^2$) in Wasser ($C_{\text{Peptid}} = 40 \mu\text{M}$; Puffer = 10 mM Natriumphosphat pH 7.5).

Peptid	ΔG^\ddagger in kJ/mol (25°C)	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔS^\ddagger in J/(mol · K)
Ac-Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	97.2	83.2	-46.9
Ac-(Pro) ₂ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₁₀ -NH ₂	97.0	87.8	-30.8
Ac-(Pro) ₄ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₈ -NH ₂	96.7	83.0	-45.9
Ac-(Pro) ₆ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₆ -NH ₂	96.3	75.8	-69.0
Ac-(Pro) ₈ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₄ -NH ₂	96.1	74.7	-71.9
Ac-(Pro) ₁₀ -Pro-ψ[CS-N]-(Pro) ₂ -NH ₂	95.8	70.8	-83.9
Ac-(Pro) ₁₃ -ψ[CS-NH]-H	—	—	—
Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH ₂	92.8	90.5	-7.9

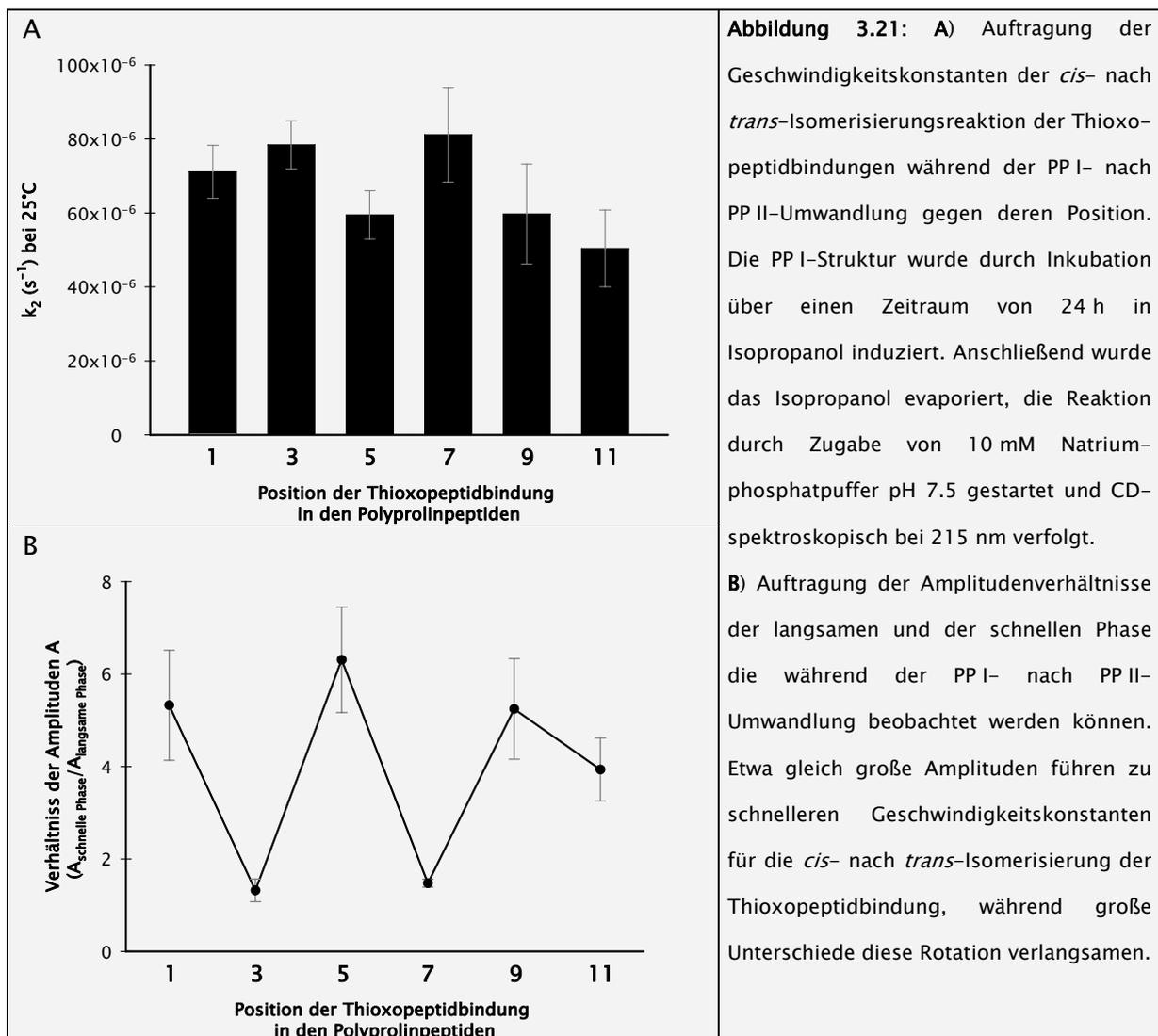
Trägt man die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Relaxationsreaktion, welche die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung wiedergibt, bei 25°C gegen die Position in den Polyprolinpeptiden auf, zeigen sich positionsabhängige Unterschiede (**Abbildung 3.19**). Mit zunehmender Distanz zum N-Terminus der Polyprolinkette nimmt die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit der Thioxopeptidbindung zu, aber erreicht in keinem Falle die Geschwindigkeit der CTI-Reaktion der Thioxopeptidbindung die für den *tc*- nach *tt*-Übergang des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptides unter identischen Bedingungen erhalten wurde. Vergleicht man die thermodynamischen Charakteristika der Thioxopeptidbindungs-isomerisierung innerhalb des Dipeptides mit denen innerhalb der Polyprolinpeptide, so ist zu erkennen, dass die deutlich langsameren Geschwindigkeitskonstanten der CTI in der PP II-Struktur auf entropische Effekte zurückzuführen sind (**Tabelle 3.10**). Generell wird die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Thioxopeptidbindung innerhalb der Polyprolinkette, mit steigender Entfernung zum N-Terminus, schneller. Der enthalpische Anteil der Rotationsbarriere nimmt dabei deutlich ab, wenn sich die Thioxopeptidbindung näher am C-Terminus der 13-gliedrigen Prolinkette befindet, wird aber teilweise kompensiert durch einen erhöhten entropischen Betrag. Um Aussagen darüber treffen zu können, ob die *cis/trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung an andere *cis/trans*-Isomerisierungen in der Polyprolinkette gekoppelt ist, wurde die PP I- nach PP II-Umwandlung der Polyprolinpeptide bei 25°C analysiert. Die Polyprolin I-Struktur wurde durch Inkubation in Isopropanol induziert, dieses anschließend im Vakuum evaporiert und die Reaktion durch Zugabe von Puffer gestartet. Die Relaxationsreaktion wurde CD-spektroskopisch bei 215 nm verfolgt, und spiegelt somit statistisch das Verhalten der gesamten Polyprolinkette wieder. Die Polyprolinpeptide, die keine Thioxopeptidbindung enthalten, zeigen erster Ordnungs-Relaxationskinetiken mit den identischen Geschwindigkeitskonstanten, $(3.09 \pm 0.30) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Ac-(Pro)₁₃- ψ [CS-NH]-H) und $(3.09 \pm 0.35) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Ac-(Pro)₁₃-NH₂). Diese Geschwindigkeitskonstante beschreibt demnach die Summe aller *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsereignisse der Oxozeptidbindungen in diesen Peptiden. Die temperaturabhängige Messung des PP I- nach PP II-Übergangs von Ac-(Pro)₁₃-NH₂ wurde benutzt, um die Aktivierungsparameter dieser Reaktion für die Summe aller Oxozeptidbindungen zu bestimmen. Diese ergeben ein ΔG^\ddagger von $92.9 \pm 0.1 \text{ kJ/mol}$, mit einem enthalpischen Anteil

ΔH^\ddagger von 85.6 ± 0.25 kJ/mol und einem entropischen Anteil ΔS^\ddagger von -23.6 ± 1.2 J \cdot mol $^{-1}\cdot$ K $^{-1}$. Diese Daten zeigen, dass die Geschwindigkeit der PP I- nach PP II-Umwandlung hauptsächlich enthalpisch kontrolliert ist. Eine Thioxopeptidbindung innerhalb eines 13-gliedrigen Polyprolinpeptides führt zu doppeltexponentiellen Relaxationskinetiken. Dabei beeinflusst die Position der Thioxopeptidbindung innerhalb des Peptides die Relaxationsgeschwindigkeiten nachhaltig (**Abbildung 3.20**). Die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Oxopeptidbindungen ist dann am schnellsten, wenn die Thioxopeptidbindung mittig in der 13-gliedrigen Polyprolinkette lokalisiert ist. Die dabei beobachtete Geschwindigkeitskonstante ist sogar größer, als die der Referenzpeptide Ac-(Pro) $_{13}$ - ψ [CS-NH]-H und Ac-(Pro) $_{13}$ -NH $_2$.



Wird die Thioxopeptidbindung in Richtung der Termini verschoben, verringern sich hingegen die Isomerisierungsgeschwindigkeiten für diese Reaktion, wobei eine Verschiebung in Richtung des N-Terminus den größeren Effekt besitzt. Die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase die bei der PP I- nach PP II-Umwandlung der Thioxopeptide auftritt, liegen in der Größenordnung der *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeiten der Thioxopeptidbindungen. Diese Geschwindigkeitskonstanten scheinen keinem Muster zu folgen und stimmen nicht mit den Geschwindigkeitskonstanten der Thixo-*cis*- nach *trans*-Isomerisierung überein, die in den Photoanregungsexperimenten bestimmt wurden (**Abbildung 3.21A**). Dieses kann auf Messungenauigkeiten beruhen, aufgrund des verhältnismäßig hohen Signal-Rauschverhältnis der CD-spektroskopischen Messungen. Vergleicht man die Amplituden der schnellen und der langsamen Reaktion zeigen diese ein

alternierendes Verhalten (**Abbildung 3.21B**). Demzufolge scheinen weder die Oxo- noch die Thiopeptidbindungen beim Übergang von PP I nach PP II unabhängig voneinander zu isomerisieren. Des Weiteren ist die Aktivierungsenergiebarriere der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung in diesem Prozess nicht mit jener der Bestrahlungsexperimente zu vergleichen, wie ein Vergleich der CTI-Geschwindigkeitskonstanten der Thiopeptidbindung(en) in beiden experimentellen Ansätzen zeigt (**Abbildungen 3.19/3.21**). Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die *cis/trans*-Isomerisierung der Thiopeptidbindung abschätzen zu können, wurde die Relaxation nach lichtinduzierter Verschiebung des Konformerengleichgewichtes in Deuteriumoxid gemessen. Bei 25°C konnte eine sekundärer-kinetischer-Lösungsmittel-Isotopieeffekt (KSIE) beobachtet werden. Dieser KSIE ist am stärksten wenn sich die Thiopeptidbindung nahe am N-Terminus der Kette befindet, und verringert sich mit zunehmender Distanz (**Tabelle 3.11**).



In D_2O ist die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxozeptidbindung in den Polyprolinpeptiden langsamer als in Wasser. Die Ursache dieses Effekts beruht auf höheren ΔH^\ddagger Werten in D_2O , die den Einfluss des günstigeren entropischen Betrages in D_2O , im Vergleich zu Wasser, für diese Rotation überkompensiert. Das Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid zeigt keinen KSIE. Die Abweichungen der Aktivierungsenergieparameter für dieses Dipeptid liegen im Fehlerbereich der Messungen. Schaut man sich die Eyring-Auftragungen der Thioxozeptidbindungsisomerisierung an, ist zu erkennen, dass der KSIE mit steigenden Temperaturen abnimmt (**Abbildung 3.22**).

Tabelle 3.11: Aktivierungsenergieparameter der Thioxozeptidbindungs-CTI berechnet mittels **Gleichung 3.1** aus den Temperaturabhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten der Thioxo-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion nach Photoanregung bei 276 nm (15 Minuten; $I_{276\text{ nm}} = 0.27 \cdot 10^{-2} \text{ W/cm}^{-2}$) in Deuteriumoxid und Wasser ($C_{\text{Peptid}} = 40 \mu\text{M}$; Puffer = 10 mM Natriumphosphat pH 7.5).

Peptid	KSIE (25°C)	ΔG^\ddagger in kJ/mol (25°C)	ΔH^\ddagger in kJ/mol	ΔS^\ddagger in J/(mol·K)
Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	1.41	H ₂ O 97.2	93.2 ± 2.5	-46.9 ± 3.8
		D₂O 97.9	94.1 ± 2.3	-12.7 ± 0.8
Ac-(Pro) ₆ -Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₆ -NH ₂	1.19	H ₂ O 96.3	75.8 ± 1.7	-69.0 ± 3.0
		D₂O 96.7	79.8 ± 2.0	-56.5 ± 2.6
Ac-(Pro) ₁₀ -Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₂ -NH ₂	1.08	H ₂ O 95.8	70.8 ± 2.5	-83.9 ± 4.0
		D₂O 96.1	75.6 ± 1.3	-70.8 ± 2.3
Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂	1.001	H ₂ O 92.8	90.5 ± 2.5	-7.9 ± 0.3
		D₂O 92.8	91.1 ± 1.5	-5.9 ± 0.2

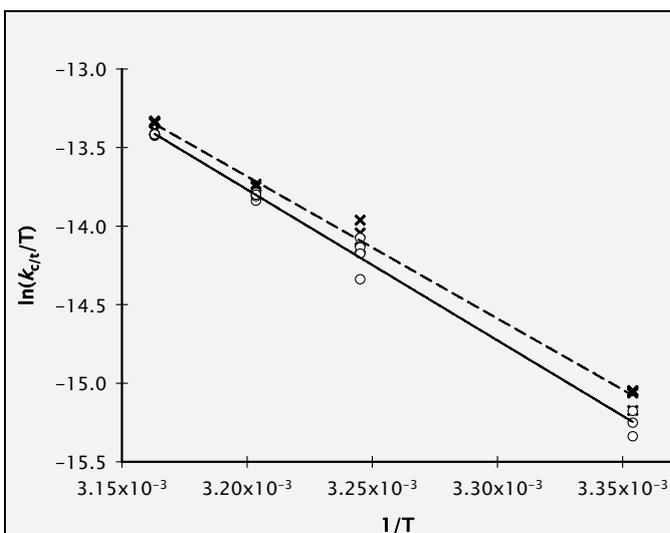
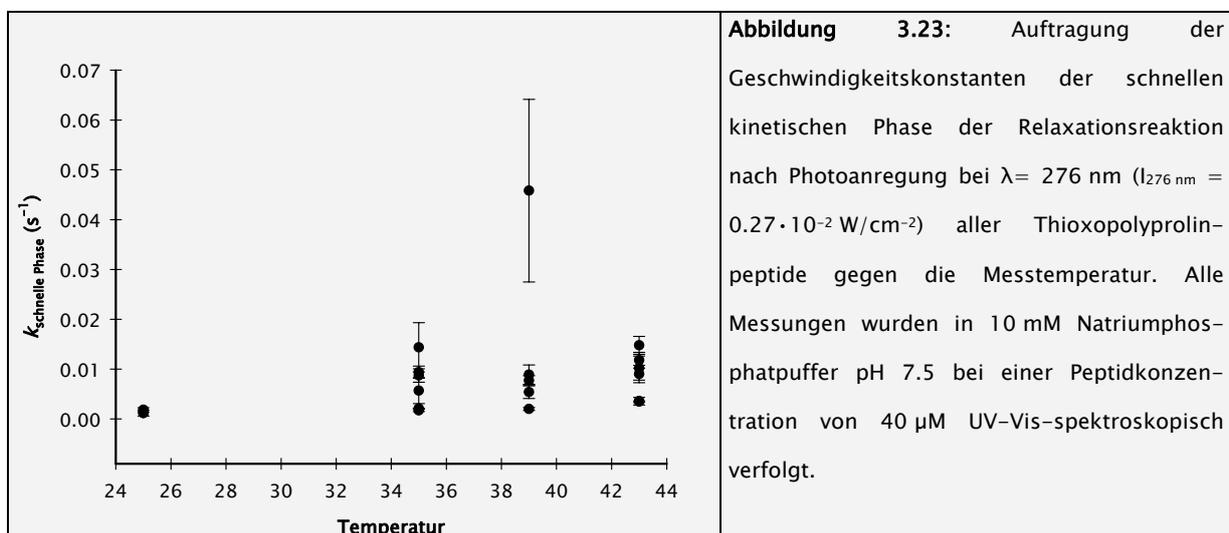


Abbildung 3.22: Eyring-Auftragung der Relaxationsraten von Ac-(Pro)₆-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₆-NH₂ in Wasser (○) und Deuteriumoxid (×) nach Photoanregung bei $\lambda = 276 \text{ nm}$ ($I_{276\text{ nm}} = 0.27 \cdot 10^{-2} \text{ W/cm}^{-2}$). Die Geraden zeigen die lineare Regression der Messwerte für H₂O (—) und D₂O (---). Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH/pD 7.5 bei einer Peptidkonzentration von 40 μM durchgeführt.

Zusammengenommen bedeuten diese Daten, dass verschiedene Wasserstoffbrückenbindungsgeometrien zwischen Peptid- und Lösungsmittelmolekülen in der *cis*- und *trans*-Konformation vorliegen. Um auszuschließen, dass der gemessene KSIE Folge der erhöhten Viskosität des Deuteriumoxids war, wurden Vergleichsmessungen in 30 % Glycerin- bzw. 40 % Saccharoselösungen durchgeführt. Die dabei ermittelten Geschwindigkeitskonstanten bei 25°C entsprachen genau denen in reinem Wasser.

Genauere Aussagen über die Natur der schnellen kinetischen Phase der Relaxationsreaktion nach Bestrahlung können anhand der gemessenen Daten nicht gewonnen werden. Dieses liegt unter anderem darin begründet, dass die Amplitude dieser Reaktion sehr klein war. Trägt man die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase der Relaxationsreaktion nach Bestrahlung aller Thioxopolyproline gegen die Messtemperatur auf, zeigt sich, dass die Geschwindigkeitskonstante dieses Prozesses nahezu temperaturunabhängig ist (**Abbildung 3.23**). Demzufolge kann man annehmen, dass die Aktivierungsbarriere dieser Reaktion sehr stark entropisch kontrolliert ist. Weiterhin ist davon auszugehen, dass ein ähnlicher Mechanismus in allen thioxylierten Polyprolinen für die beobachtete schnelle kinetische Phase der Relaxationsreaktion nach Photoanregung zugrunde liegt.



3.4 Diskussion der Ergebnisse der Thioxopolyprolinpeptide

3.4.1 Einzelbindungs–Konformationsänderung innerhalb der PP II–Struktur

Die Röntgenkristallstruktur der PP II–Helix ist nunmehr schon seit über 50 Jahren bekannt [189], dennoch existieren bisher nur wenige Informationen über das Verhalten dieser Sekundärstruktur in wässriger Umgebung. Anhand der bisher veröffentlichten Daten konnte bis jetzt noch kein einheitliches Modell erarbeitet werden, das die Auswirkungen von CTI–Ereignissen auf diese Struktur beschreibt, da die Interpretationen verschiedener Autoren scheinbar im Widerspruch zueinander stehen. Wu und Mitarbeiter konnten mit Hilfe NMR–spektroskopischer Untersuchungen im Jahre 1975 zeigen, dass 2–3 % aller Peptidbindungen in Poly–L–Prolinpeptiden in *cis*–Konformation vorliegen [146]. Dennoch ist bisher nicht bekannt, in welchem Maße diese *cis*–Konformationen die Struktur der betreffenden Moleküle verändern, da dieser *cis*–Anteil zu gering ist, um die gemessenen gyrations– und hydrodynamischen Radien von PP II–Strukturen zu erklären [143, 144]. Bestimmt man den *cis*–Konformeranteil der Thioxopeptidbindung in den in dieser Arbeit untersuchten thioxylierten Polyprolinpeptiden zeigt sich, dass für alle Thioxopeptidbindungspositionen ~3 % *cis* im Gleichgewicht beobachtet werden können. Das bedeutet, dass in diesen Peptiden 36 % aller Moleküle statistisch gesehen eine *cis*–Prolyl–Prolylbindung enthalten. Betrachtet man aber das PP II–spezifische CD–Signal dieser Peptide ist zu erkennen, dass der PP II–Strukturanteil zunimmt, je näher die Thioxopeptidbindung am C–terminalen Ende der Polypeptidkette lokalisiert ist (**Abbildung 3.13**). Der einzige Unterschied zwischen diesen Peptiden ist dabei nur bezüglich der Position der Thioxopeptidbindung zu finden. Sieht man die CD–Spektren dieser Peptide in Kombination mit den ¹³C–NMR–Daten (**Abbildung 3.14**) muss man schlussfolgern, dass die beobachteten Unterschiede im PP II–Strukturgehalt nicht auf einen veränderten Anteil an *cis*–Peptidbindungen zurückzuführen ist. Sterische Effekte, verursacht durch die Größe des Schwefelatoms, können aufgrund der Geometrie der PP II–Helix ausgeschlossen werden [65, 80–87], zumal die O nach S Substitution in Mittelposition besser akzeptiert wird, als an der weniger sterisch eingeschränkten N–terminalen Seite. Eine positionsabhängige Änderung des Helixdipolmomentes, verursacht durch die Thioxopeptidbindung, ist ebenfalls nicht verantwortlich, da die dann beobachtbaren Effekte sich

bezüglich der Helix-Mittelposition symmetrisch in Richtung N- und C-Terminus auswirken müsste [142]. Dadurch stellt sich die Frage nach der Ursache dieses Phänomens. Einen ersten Hinweis darauf zeigte der Vergleich der IR-Spektren von Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂ und Ac-(Pro)₈-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₄-NH₂. Diese Spektren zeigen, dass die Amid I-Bande von Ac-(Pro)₈-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₄-NH₂ eine Verschiebung von $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ zu kleineren Wellenzahlen in D₂O aufweist. Da diese Peptide ansonsten identisch sind, kann anhand der **Gleichung 1.3** geschlossen werden, dass die Kraftkonstante der Summe aller C=O-Bindungen von Ac-(Pro)₈-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₄-NH₂ nicht identisch mit denen von Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂ ist [190]. Somit müssen, statistisch gesehen, die Carbonyl-Wasser-Carbonyl-Cluster der beiden Thioxopolyprolinpeptide eine unterschiedliche Geometrie aufweisen [190, 191]. Eine veränderte PP II-Geometrie, die nicht auf einen veränderten *cis*-Anteil der Peptidbindungen in diesen Peptiden zurückzuführen ist, kann nur durch Änderungen des dihedralen Winkels ψ hervorgerufen werden, da der ϕ -Winkel von Peptidyl-Prolylbindungen nahezu fixiert ist [46]. Im Falle von Thioxopeptidbindungen ist diese Einschränkung sogar noch größer [82]. Eine zweite stabile ψ -Winkel-Einstellung der PP II-Helix wurde schon in den 1970er Jahren vorgeschlagen [144, 145], konnte aber bis jetzt noch nicht experimentell in PP II-bildenden Polypeptiden nachgewiesen werden. Dieses führt zu der Frage, warum dieser Effekt in den in dieser Arbeit untersuchten thioxylierten Polyprolinpeptiden sichtbar wird. Ein Unterschied zwischen einer Oxo- und einer Thioxopeptidbindungen besteht darin, dass die Halbwertszeit für die Umwandlung der Thioxopeptidbindungskonformere ineinander größer ist. Dieses wird durch die größere Aktivierungsbarriere dieser Bindung bezüglich der Peptidbindungsrotation verursacht [15, 56, 68–70, 77–79]. Betrachtet man die Relaxationskinetiken aller Thioxopeptide, zeigen diese nach kurzer intensiver Anregung des $^1\pi-^1\pi^*$ Übergangs ein doppeltexponentielles Verhalten, wobei die schnelle kinetische Phase eine Geschwindigkeitskonstante aufweist, die im Bereich von 10^{-3} s^{-1} bei 35°C anzusiedeln ist. Die Aktivierungsenergie des PP I- nach PP II-Übergangs von Ac-(Pro)₁₃-NH₂ ist im hohen Maße enthalpisch kontrolliert und zeigt eine Geschwindigkeitskonstante die deutlich langsamer ist, als die beobachtete schnelle kinetische Phase der Relaxationsreaktion der Thioxo-polyprolinpeptide nach kurzer intensiver Bestrahlung. Da generell die Aktivierungsbarrieren der CTI-Reaktionen von Xaa-Pro-Bindungen einen hohen enthalpischen Anteil aufweisen [8, 27, 30, 31], und die hier beobachtete schnelle Phase

nahezu entropisch kontrolliert ist (**Abbildung 3.23**), kann diese nicht auf eine CTI-Reaktion, wie im Falle des Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptides gezeigt wurde, zurückgeführt werden. Diese schnelle Reaktion ist schon nach sehr kurzer intensiver Bestrahlung in den Relaxationskinetiken erkennbar. Wenn diese beobachtete Phase aufgrund von ψ -Winkeländerungen in der Helix zustande kommt, bedeutet das, dass eine *cis*-Peptidbindung im C-terminal zu dieser Peptidbindung gelegenen Teil der PP II-Helix eine ψ -Winkeländerungen induziert. Weiterhin, stellt diese ψ -Winkel-Rotation, auf biologische Vorgänge bezogen, eine langsame Reaktion dar. Aufgrund der höheren Aktivierungsenergiebarrieren der *cis* und *trans*-Zustände von Thiopeptidbindungen, wirkt sich dieser Effekt länger in dem C-terminal zu dieser *cis*-Thiopeptidbindung gelegenen Teil der Helix aus, im Vergleich zu einer Oxopeptidbindung an dieser Position. Der N-terminal von dieser *cis*-Peptidbindung gelegene Teil scheint dabei unbeeinflusst zu bleiben. Dieses Modell ist in der Lage die CD-spektroskopisch detektierten Strukturunterschiede der thioxylierten Polyprolinpeptide zu erklären, da dann die Positionierung der Thiopeptidbindung näher am C-Terminus statistisch gesehen einen geringeren Effekt auf die Gesamtstruktur und somit auf das beobachtete PP II Signal besitzt. Über die Größe der ψ -Winkeländerungen kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Dieses hier aufgestellte Modell, welches die Auswirkungen von *cis*-Peptidbindungen auf die PP II-Struktur beschreibt, wird unter anderem dadurch gestützt, dass eine Erhöhung des *cis*-Anteils der Thiopeptidbindung durch Bestrahlung fast ausschließlich die Intensität des PP II-CD-Signales verringert (207 nm), aber nicht zu einem stärkeren PP I-typischen Signal (228 nm) führt (**Abbildung 3.17**). Der beobachtete differente PP II-Anteil der Thioxopolyprolinpeptide tritt aufgrund der Position der Thiopeptidbindung auf, und zeigt, die Auswirkungen von *cis*-Peptidbindungen auf diese Struktur. Dieses hier beschriebene Modell ist in der Lage einige der scheinbar widersprüchlichen Schlussfolgerungen anderer Arbeitsgruppen zu erklären. Die Aussagen, dass die Fraktion an *cis*-Peptidbindungen zufällig über die PP II-Helix verteilt ist [146], dieser Anteil aber dann zu klein ist, um die für Polyprolinpeptide gemessenen hydrodynamischen Radien zu erklären [144], stehen in dem hier dargestellten Modell nicht im Widerspruch zueinander, da einzelne *cis*-Peptidbindungen weitreichende strukturelle Auswirkungen auf die PP II-Helix zeigen. Des Weiteren kann damit die Beobachtung erklärt werden, dass im Durchschnitt nur eine begrenzte Fraktion an PP II-

bildenden Molekülen eine ideale PP II–Geometrie aufweisen [143]. Die minimale Anzahl an Strukturen wird dabei durch die Anzahl der Peptidbindungen festgelegt, da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer *cis*–Peptidbindung an allen Positionen nahezu gleich groß ist. Aufgrund der Literaturdaten, die mit Hilfe von konformationell fixierten Prolin–Derivaten über die PP–Strukturen erhalten wurden [122, 148], kann ein ähnliches Verhalten auch für die PP I–Struktur angenommen werden. Demnach scheinen *trans*–Peptidbindungen innerhalb dieser Struktur ebenfalls zu Neuorientierungen des dihedralen Winkel ψ zu führen. Dennoch kann dieses hier aufgestellte Modell nicht in Gänze die Beobachtung erklären, dass bei einem endoproteolytischer Verdau von Polyprolinpeptiden mittels Aminopeptidase P keine *cis*–Fraktion nachweisen konnte [141, 151]. Möglicherweise liegt dieses daran, dass in den Studien von Lin et al. N– und C–terminal ungeschützte Peptide verwendet wurden, d.h. die Termini der Peptide waren, unter den experimentellen Bedingungen dieser Untersuchungen, geladen. Da anhand kurzer Peptide gezeigt wurde, dass eine solche Ladung das Konformerengleichgewicht der benachbarten Bindung sowie deren Isomerisierungsgeschwindigkeit ändert [25], könnte dieses als mögliche Ursache für die differente Beobachtung in Frage kommen. Betrachtet man die Relaxationsreaktion der Thioxopolyprolinpeptide nach lichtinduzierter Verschiebung des *cis/trans*–Gleichgewichtes der Thioxopeptidbindung zeigt sich, dass ein hoher PP II–Strukturanteil statistisch gesehen die Aktivierungsbarriere der Thioxopeptidbindungsrotation verringert (**Abbildungen 3.13B/3.19 und Tabelle 3.10**). Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten der Thioxopeptidbindungsrotation in Abhängigkeit ihrer Position in der Polyprolinkette, wird diese mit zunehmender Distanz vom N–Terminus größer. Das bedeutet, dass in den Peptiden in denen sich mehr Prolylreste C–terminal der Thioxopeptidbindung befinden die Aktivierungsenergie der Thioxopeptidbindungsrotation im Durchschnitt größer ist. Eine Ursache dafür kann die größere Anzahl von ψ –Winkelneuorientierungen von den Peptidbindungen liefern, die auf die konformationelle Änderung reagieren müssen.

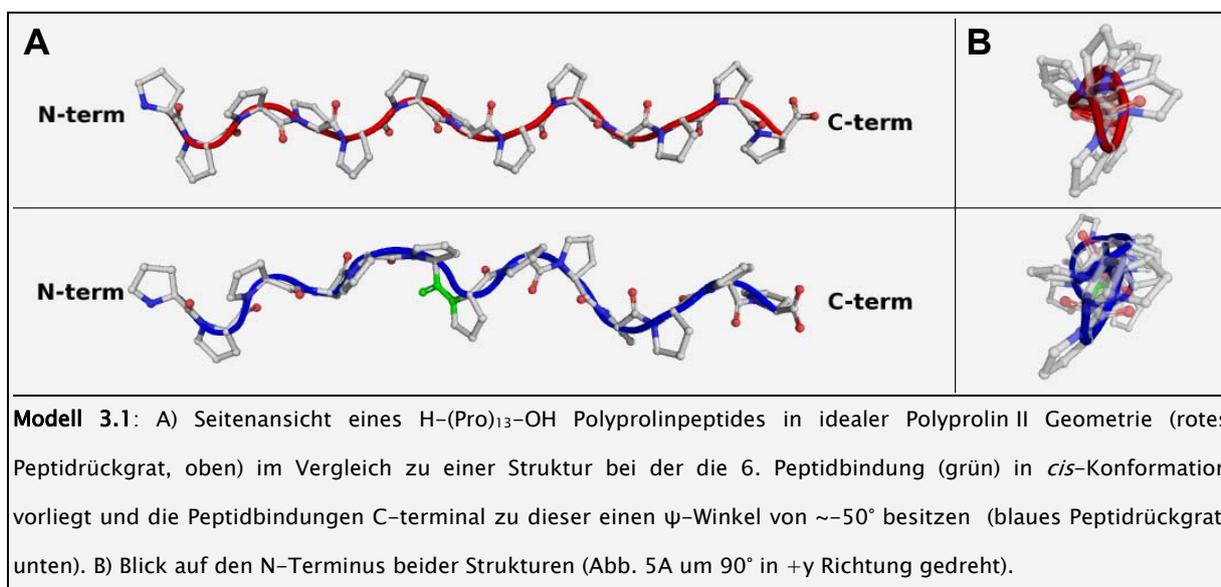
Daraus kann man schlussfolgern, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer weiteren *cis*–Peptidbindung in dieser alternativen PP II–Konformation geringer ist, da die Polypeptidkette dann nicht mehr in dem Maße auf erhöhte sterische Effekte reagieren kann. Demzufolge sollte im Kettenabschnitt C–terminal zu einer *cis*–Peptidbindung die Aktivierungsenergie für weitere CTI–Ereignisse und/oder die Grundzustandsenergiedifferenz

der Konformeren vergrößert sein, d.h. CTI-Ereignisse in Polyprolinpeptiden sind sehr stark von den ψ -Winkeln der Peptidbindungen abhängig.

Betrachtet man die Aktivierungsenergieparameter der CTI-Relaxationsreaktion der Thioxopeptidbindung nach kurzer intensiver Anregung des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ -Übergangs zeigt sich, dass der enthalpische Anteil kleiner ist, als im Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ Dipeptid. Dieser Enthalpieterm wird aber durch einen größeren entropischen Beitrag überkompensiert. Die ΔH^\ddagger - und ΔS^\ddagger -Werte der CTI der Thioxopeptidbindung in den Polyprolinpeptiden scheinen dabei direkt mit der Länge der C-terminal dieser Bindung vorhandenen Aminosäurereste zu korrelieren, wobei der enthalpische Anteil sequentiell kleiner, der entropische Anteil hingegen größer wird. Da die Grundzustandsenergiedifferenzen der Thioxopeptidbindungen an jeder Position innerhalb der 13-gliedrigen Helix gleich groß ist, bedeutet das, dass die Energie die für eine Überführung der Thioxopeptidbindung in den Übergangszustand für alle Positionen einen unterschiedlichen Betrag besitzen muss. Die Grundzustandsenergiedifferenz der Thioxopeptidbindung der hier verwendeten Thioxopolyprolinpeptide ist mit 8.6 kJ/mol bei 25°C groß, deshalb spiegeln die Aktivierungsenergieparameter die in **Tabelle 3.10** aufgeführt sind hauptsächlich die *cis*-nach *trans*-Umwandlung der Thioxopeptidbindung wieder. Ein höherer enthalpischer Anteil der Aktivierungsbarriere von Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂ im Vergleich zu Ac-(Pro)₁₀-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₂-NH₂ könnte aufgrund von z.B. stärkeren Wasserstoffbrückenbindungen herrühren [93, 192-194]. Ein Indiz dafür liefern die in D₂O bestimmten Aktivierungsenergieparameter (**Tabelle 3.10**). In D₂O zeigen alle vermessenen Peptide einen höheren ΔH^\ddagger -Wert. Da Deuteriumoxid im Vergleich zu Wasser stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden kann [183, 190], bietet diese Tatsache eine mögliche Erklärung für die ermittelten Aktivierungsenergiedifferenzen der Thioxopeptidbindungsisomerisierung der untersuchten Thioxopolyprolinpeptide. Betrachtet man die ΔH^\ddagger -Werte in Kombination mit den KSIE-Effekten, kann man schlussfolgern, dass die alternative PP II-Konformation des C-terminal zur *cis*-Thioxopeptidbindung gelegenen Kettenabschnittes stärkere Wasser-Carbonyl-Wasser-Cluster ausbildet im Vergleich zur idealen PP II-Geometrie. Dieses würde erklären, warum hochmolare GmdCl-Konzentrationen den PP II-Strukturanteil von Polyprolinpeptiden in wässriger Umgebung erhöhen, da GmdCl unter anderem die Interaktion der

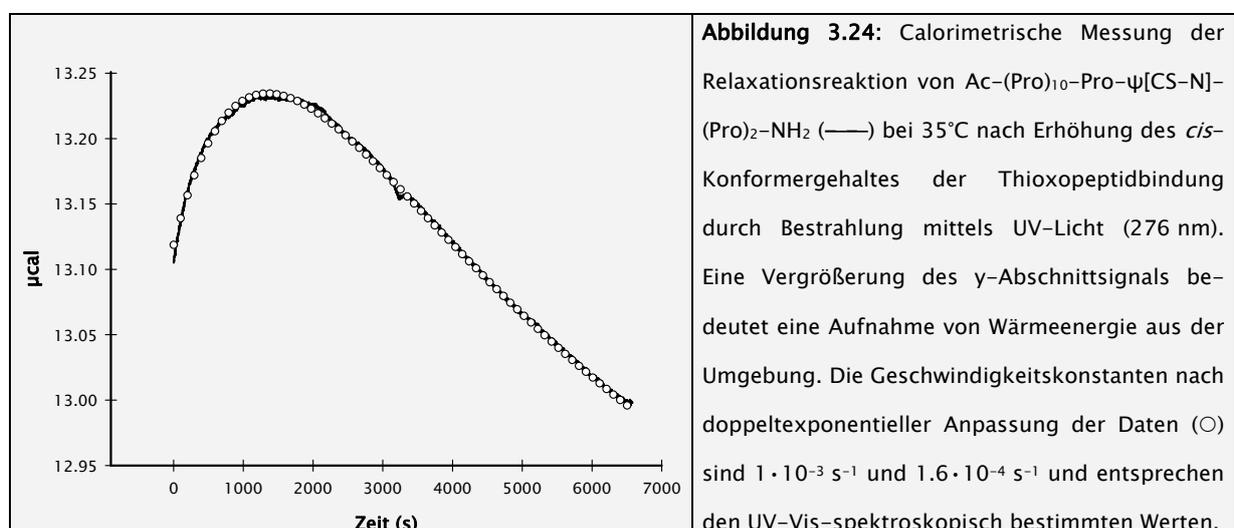
Peptidmoleküle mit den Lösungsmittelmolekülen verringert und somit die ideale PP II-Geometrie begünstigen sollte [159, 195].

Betrachtet man den entropischen Anteil der Aktivierungsbarriere der Thioxopeptidbindungsrotation ist dieser umso günstiger, je näher die Thioxopeptidbindung am N-terminalen Ende der Helix lokalisiert ist. Dieser Trend kann anhand der Anzahl der ψ -Winkelrelaxationen der C-terminal der *cis*-Thioxopeptidbindung gelegenen Reste erklärt werden. Das bedeutet, dass die Geometrie des Helixabschnittes C-terminal zu einer *cis*-Thioxopeptidbindung nicht die entropisch günstigste Struktur darstellt. Legt man einen ψ -Winkel von $\sim -50^\circ$ wie er in der Literatur für eine Alternative *trans*-Konformation vorgeschlagen wird zugrunde [144, 146], so liegen die Pyrrolidinringe benachbarter Prolinreste näher beieinander, was zu einem größeren Gauche-Effekt in dieser Struktur führen würde (**Modell 3.1**).



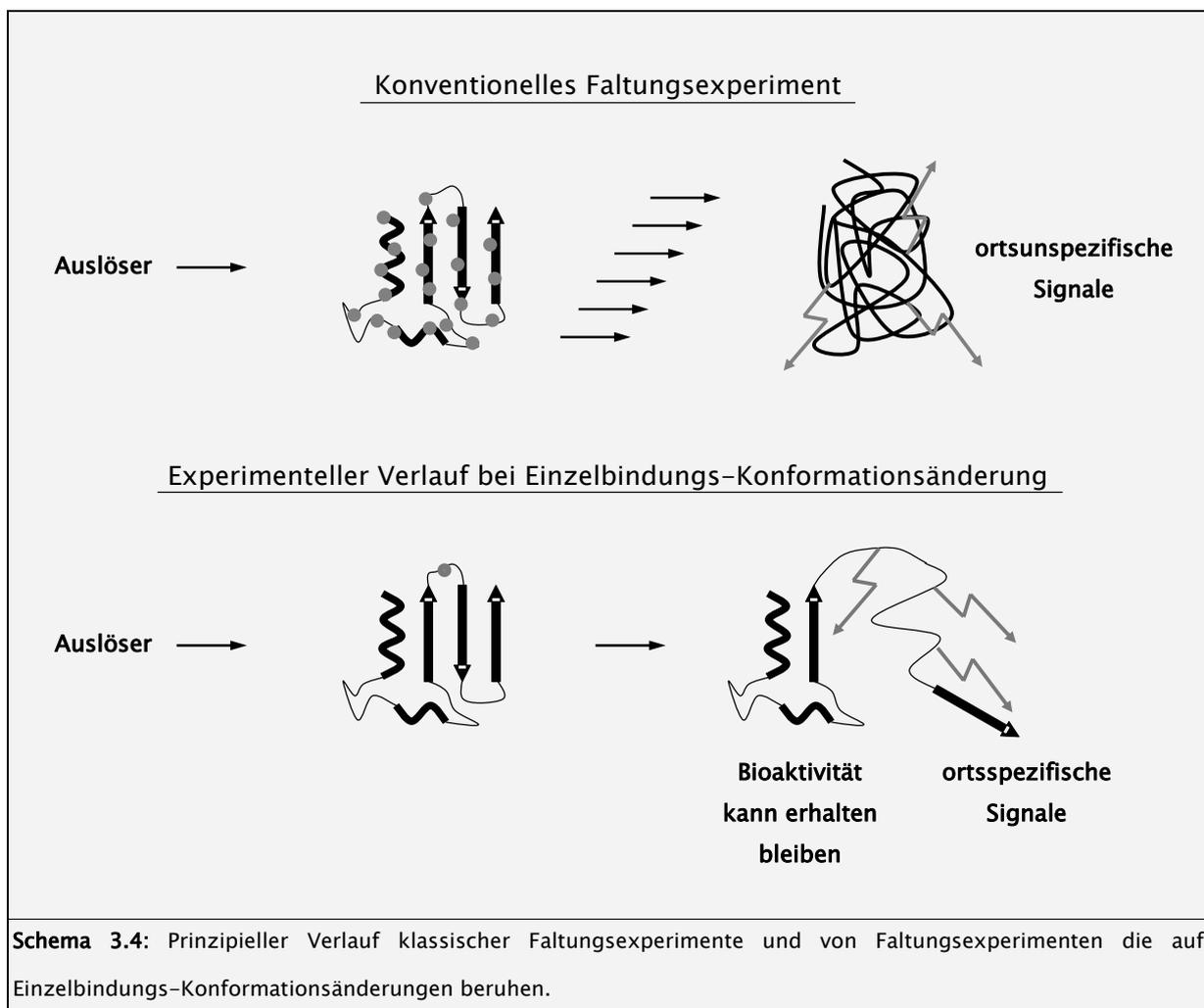
Demzufolge sollte die Verringerung dieser Gauche-Abstoßungen durch *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung mit einem positiven entropischen Effekt einhergehen, da sich die Unordnung der Gesamtstruktur vergrößert. Dieser Effekt muss demzufolge größer sein, wenn sich die Thioxopeptidbindung näher am N-Terminus der Helix befindet, da mehr Prolinreste von einer ψ -Winkel Neuorientierung betroffen sind. Dieser positive entropische Effekt tritt in Deuteriumoxid stärker hervor, da in diesem Lösungsmittel aufgrund der stärkeren Carbonyl-Wasser-Carbonyl-Cluster die Lösungsmittelmoleküle fester um das Peptid angeordnet sind, d.h., beim Übergang in die ideale PP II-Geometrie ist der Entropiegewinn in D₂O größer als in Wasser. Die schnelle

kinetische Phase der Relaxationsreaktion der thioxylierten Polyprolinpeptide die nach kurzer intensiver Anregung des ${}^1\pi\text{-}{}^1\pi^*$ -Übergangs beobachtet werden kann, liefert weitere Informationen über die ψ -Winkelrelaxationsreaktion. Da diese kinetische Phase separat zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, dass die ψ -Winkel Reorientierung der eigentlichen Isomerisierungsreaktion vorangestellt sein muss, oder diese initiiert. Diese ψ -Winkel Neuorientierung ist dabei nahezu temperaturunabhängig (**Abbildung 3.23**), d.h. der entropische Anteil an der Aktivierungsbarriere dieser Reaktion dominiert deren Geschwindigkeit. Misst man die freiwerdende Wärme der Relaxationsreaktion eines Thioxopolyprolins nach Bestrahlung mit Hilfe eines Calorimeters, erkennt man, dass die ψ -Winkelrelaxation die an die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxopeptidbindung gekoppelt ist einen endotherme Reaktion darstellt (**Abbildung 3.24**). Die Energie die dabei von der Umgebung aufgenommen wird, dient wahrscheinlich dazu, die Wasserstoffbrücken, die zwischen Peptidrückgrat und den Lösungsmittelmolekülen bestehen, aufzubrechen. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine *cis*-Peptidbindung innerhalb eines Polyprolinpeptides eine ψ -Winkeländerung in dem C-terminal zu dieser Bindung gelegenen Prolyl-Prolylbindungen induziert. Die dabei entstehende Struktur besitzt wahrscheinlich erhöhte Gauche-Abstoßungs-Effekte im Vergleich zu idealen PP II-Geometrie, bildet aber stärkere Carbonyl-Wasser-Carbonyl-Cluster und sollte die Aktivierungsenergie für weitere CTI-Ereignisse in diesem Abschnitt erhöhen. Weiterhin scheint der *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der *cis*-Thioxopeptidbindung eine ψ -Winkelreorientierung des C-terminalen Kettenabschnittes voranzugehen.



3.4.2 Vergleich des PP I nach PP II Übergangs mit Einzelbindungs-CTI

Der „klassische“ Weg um Konformationsänderungen von Peptiden und Proteinen zu charakterisieren beinhaltet einen Sprung aus einem denaturierenden Lösungsmittel in ein Lösungsmittel in dem das Untersuchungsobjekt die unter physiologischen Bedingungen vorliegende Struktur einnimmt. Der Unterschied dieser Methodik im Vergleich zu Konformationsänderungen die auf Schaltung von Einzelbindungen beruhen liegt darin, dass dabei die gesamte Struktur des Untersuchungsobjektes beeinflusst wird (**Schema 3.4**). Demzufolge ist es oft schwierig mit diesem Ansatz die beobachteten Messsignale spezifischen Konformationsänderungen des untersuchten Moleküls zuzuordnen. Um die Auswirkungen beider Herangehensweisen zu vergleichen, wurden Lösungsmittelsprungexperimente mit den in dieser Arbeit untersuchten Polyprolinpeptiden durchgeführt. Für Polyprolinpeptide ist beschrieben, dass diese durch Lösen in Isopropanol in die all-*cis*-Konformation die PP I-Struktur überführt werden können [121, 124, 189].



Wird die erhaltene PP I-Struktur in wässriger Umgebung überführt, relaxiert diese in eine PP II-Konformation wobei alle im Peptid betroffenen Prolyl-Prolylbindungen eine *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion durchlaufen müssen. Die Polyprolinpeptide die keine Thioxozeptidbindung enthalten, Ac-(Pro)₁₃-NH₂ und Ac-(Pro)₁₂-Pro-ψ[CS-NH]-H, zeigen eine monoexponentielle Relaxationskinetik für diesen Übergang von PP I nach PP II. Befindet sich eine Thioxozeptidbindung innerhalb dieser 13-gliedrigen Polyprolinkette, zeigen diese Peptide unter identischen Bedingungen zweiphasige Umwandlungskinetiken, die eine schnelle und eine langsame Reaktion beinhalten. Die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Reaktion gibt Auskunft über die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Oxozeptidbindungen, die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Reaktion über die der Thioxozeptidbindung. Dabei beeinflusst die Position der Thioxozeptidbindung innerhalb dieser Kette beide Geschwindigkeitskonstanten nachhaltig. Die Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung der Thioxozeptidbindung stimmen nicht mit denen überein, die nach Einzelbindungsschaltung dieser Thioxopolyprolinpeptide bestimmt werden konnten. Demzufolge zeigen beide experimentelle Ansätze unterschiedliche Vorgänge, d.h. die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung unter beiden Versuchsbedingungen laufen nach einem unterschiedlichen Mechanismus ab. Befindet sich die Thioxozeptidbindung an Position 7 innerhalb der 13-gliedrigen Polyprolinkette, d.h. in der Mitte der Helix, ist die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Oxozeptidbindungen am schnellsten. Diese Reaktion ist dann sogar schneller als die der Polyprolinpeptide die keine Thioxozeptidbindung enthalten (**Abbildung 3.20**). Die Polyprolinpeptide bei denen die Thioxozeptidbindung von der Mittelposition aus betrachtet näher in Richtung N- oder C-Terminus positioniert ist, zeigen langsamere *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeiten für die Summe aller Oxozeptidbindungsrotationen. Ist die Thioxozeptidbindung in Richtung des N-Terminus verschoben ist die Geschwindigkeitskonstante langsamer, als die der Polyprolinpeptide ohne Thioxozeptidbindung. Befindet sich die Thioxozeptidbindung dagegen C-terminal der Mittelposition, ist die *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Oxozeptidbindungen schneller im Vergleich zu den Referenzpeptiden die keine Thioxozeptidbindung enthalten. Die Geschwindigkeitskonstanten der Thioxozeptidisomerisierung die für den PP I nach PP II-Übergang ermittelt wurde, zeigen ein ähnliches Verhalten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Reaktion der

Thioxopolyprolinpeptide eine große Standardabweichung aufweisen. Eine Erklärung dieser Effekte, verursacht durch die Position der Thioxozeptidbindung, könnte das Helixdipolmoment dieser Struktur liefern. Dieses setzt voraus, dass das Helixdipolmoment die Übergangszustände der PP I- nach PP II-Umwandlung beeinflusst. Literaturdaten zufolge ist das Helixdipolmoment in beiden Konformationen, PP I und PP II, gleich groß. Ebenfalls scheint es nahezu keine Unterschiede im Bezug auf einen Ladungstransfer in Richtung des N- oder C-Terminus zu geben [142]. Da Thioxozeptidbindungen stärker polarisiert als Oxozeptidbindungen sind [66, 68], könnte diese zu einem Partialladungsgradienten in den Polyprolinhelices führen. Da der Übergangszustand von Peptidbindungsrotation unpolar im Vergleich zu den Grundzuständen ist, muss für die Überführung der Thioxozeptidbindung in den Übergangszustand mehr Energie aufgebracht werden als für Oxozeptidbindungen. Dieses würde die zweiphasigen Kinetiken des PP I- nach PP II-Übergangs der Thioxopolyprolinpeptide erklären. Aufgrund der vorliegenden Daten kann man schlussfolgern, dass die Geschwindigkeit der PP I- nach PP II-Umwandlung der Oxozeptidbindungen abhängig von deren Kettenlänge ist. Allerdings, würde man dann für die PP I- nach PP II-Reaktion der Peptide bei denen die Thioxozeptidbindung nicht symmetrisch in der Kette positioniert ist eine weitere kinetische Phase erwarten. Dieses ist aber nicht der Fall. Demzufolge muss die PP I- nach PP II-Umwandlung durch eine weitere Größe beeinflusst werden, die bisher noch nicht genau identifiziert werden konnte. Ein weiteres Indiz dafür, dass ein zweiter determinierender Faktor existieren muss, der die PP I- nach PP II-Umwandlung beeinflusst, belegen die Geschwindigkeitskonstanten der Oxo- und Thioxoisomerisierung. Diese zeigen, wenn die Thioxozeptidbindung N-terminal von der Mittelposition lokalisiert ist, andere Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu den Peptiden bei denen die Thioxozeptidbindung in Richtung des C-Terminus positioniert ist.

Betrachtet man die CD-spektroskopisch erhaltenen Amplitudenverhältnisse der Oxo- und Thioxoerelaxation für den PP I nach PP II-Übergang, ist ein alternierendes Muster zu erkennen (**Abbildung 3.21B**). Da die Gesamtamplitude dieser Reaktion für alle thioxylierten Polyprolinpeptide nahezu gleich groß ausfiel, scheint die Thioxozeptidbindung an einigen Positionen weniger gut in einer PP I-Helix akzeptiert zu werden. Das bedeutet, dass einzelne Segmente in solchen 13-gliedrigen Polyprolinpeptiden individuell die PP I-Konformation einnehmen und aus dieser wieder rückisomerisieren können. Diese Beobachtung steht im

Widerspruch zu den Untersuchungen von Lin et al. [151] und sind möglicherweise artifizierter Natur. Dennoch zeigt dieses Verhalten, dass die Geometrie der PP I-Struktur nicht an allen Positionen die gleichen Freiheitsgrade besitzt, bzw. dass die PP I-Helix wie die PP II-Helix nur einen Idealfall darstellt und verschiedene semistabile Intermediatstrukturen existieren. Was bedeutet dieses für biologische PP II-bildende Strukturen wie sie z.B. in Kollagen zu finden sind? Da *cis*-Peptidbindungen die statistisch auftreten zu ψ -Winkeländerungen führen werden die sterischen Spannungen der *cis*-Konformation reduziert. Theoretisch ermöglicht dieser Mechanismus die Akzeptanz dieses Ereignisses ohne große Längenänderungen in der Struktur hervorzurufen was die Akzeptanz in z.B. Kollagendreifachhelices ermöglichen könnte.

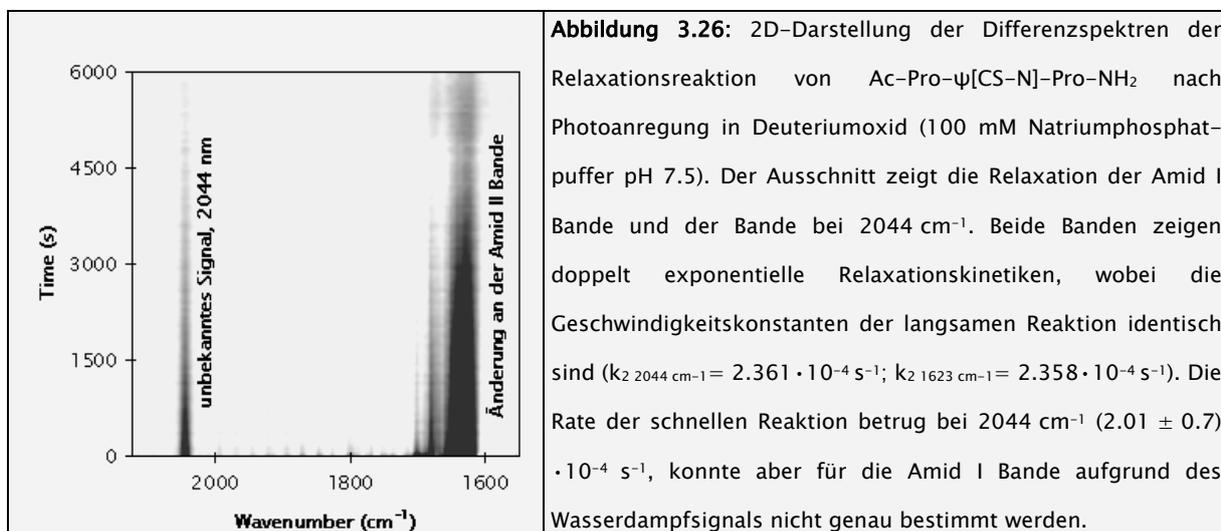
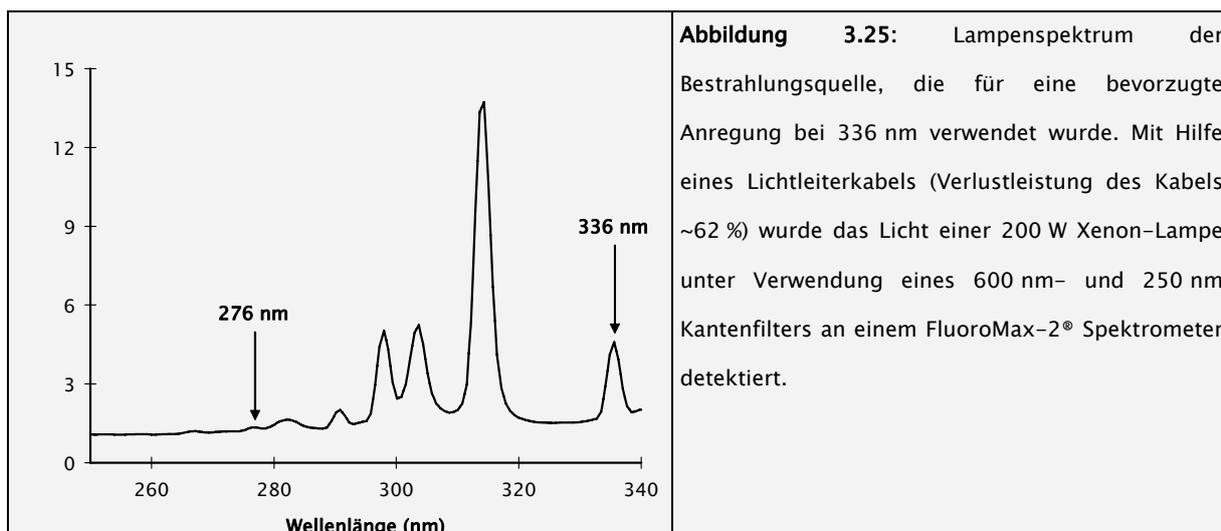
3.5 IR-spektroskopische Untersuchung der Thioxo-CTI (Ergebnisse)

Aufgrund der Tatsache, dass eine UV-Vis-spektroskopische Verfolgung der Isomerisierungsreaktion der Thioxo-peptidbindung immer mit einer Anregung derselben einhergeht, wurde mit Hilfe der IR-Spektroskopie die Thioxo-CTI-Reaktion analysiert, um diesen Einfluss auf die Thioxorelaxationsreaktion abschätzen zu können. Darüber hinaus, bietet die Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie), im Gegensatz zu UV-Vis und CD-spektroskopischen Messungen, den Vorteil, dass diese Methode gleichzeitig Informationen über verschiedene funktionelle Gruppen des gesamten Moleküls, als auch deren Umgebung in ein und derselben Messung liefert. Wie der **Tabelle 3.13** zu entnehmen ist, sind die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Thioxorelaxationsreaktion beider Messmethoden nahezu identisch. Die spektralen Banden des Fingerprintbereiches ausgewählter Thioxopolyprolinpeptide in Deuteriumoxid sind in **Tabelle 3.12** zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Zuordnung der Schwingungsbanden des IR-Fingerprintbereiches ($1700\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂, Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₁₂-NH₂, Ac-(Pro)₈-Pro- ψ [CS-N]-(Pro)₄-NH₂ und Ac-(Pro)₁₃-NH₂ in Deuteriumoxid. Die Zuordnung erfolgte anhand der angegebenen Literatur [191, 196, 197].

Peptid	IR-Banden in D ₂ O ($1700 - 1400\text{ cm}^{-1}$)	Zuordnung
Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂	1672 cm ⁻¹ 1656 cm ⁻¹ 1604 cm ⁻¹ 1472 cm ⁻¹ 1455 cm ⁻¹	Amid I der -C(=O)-NH ₂ Gruppe Amid I der Acetamidbindung Amid II Bande von -C(=O)-NH ₂ Prolin δ (CH ₂) Prolin ν (CN)
Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	1673 cm ⁻¹ 1623 cm ⁻¹ 1458 cm ⁻¹	Amid I der -C(=O)-NH ₂ Gruppe Amid I PP II spezifisch Prolin ν (CN) + δ (CH ₂)
Ac-(Pro) ₈ -Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₄ -NH ₂	1673 cm ⁻¹ 1623 cm ⁻¹ 1458 cm ⁻¹	Amid I der -C(=O)-NH ₂ Gruppe Amid I PP II spezifisch Prolin ν (CN) + δ (CH ₂)
Ac-(Pro) ₁₃ -NH ₂	1671 cm ⁻¹ 1621 cm ⁻¹ 1456 cm ⁻¹	Amid I der -C(=O)-NH ₂ Gruppe Amid I PP II spezifisch Prolin ν (CN) + δ (CH ₂)

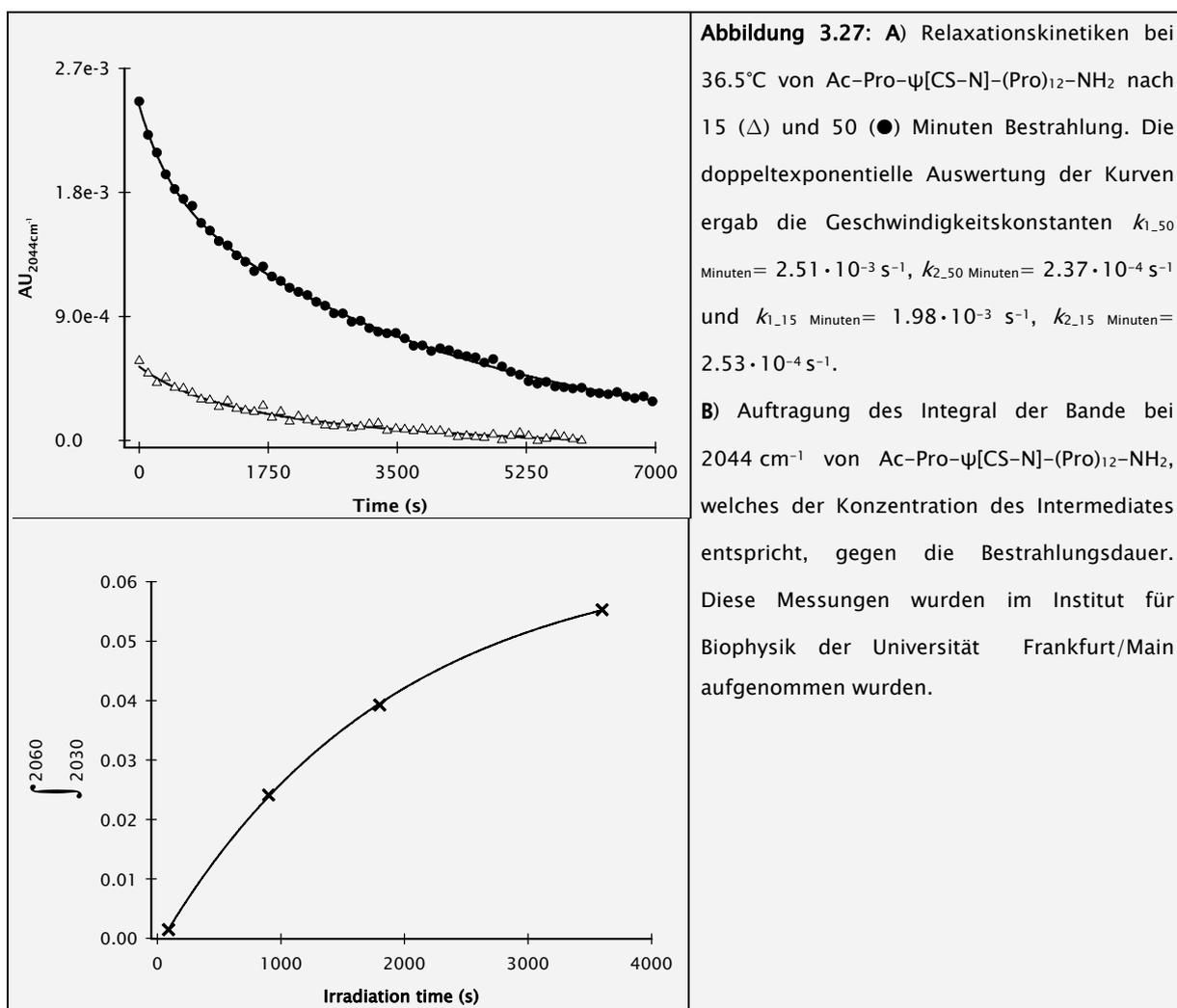
Das Spektrum von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂ zeigt noch ausreichend Feinstruktur und erlaubte nach Dekonvolution eine Zuordnung der Schwingungsmodi. Aufgrund der größeren Anzahl von Systemschwingungen ist in den Polyprolinpeptiden die Bandenüberlappung dafür zu groß und erlaubt nur eine globale Zuordnung. Betrachtet man die IR-Differenzspektren nach Bestrahlung der Thioxopeptide mittels Licht der Wellenlänge 276 nm (das Lampenspektrum dafür ist in **Abbildung 3.8** dargestellt), erkennt man reversible Änderungen in verschiedenen Bereichen des Spektrums. Differenzen sind für die Prolin- δ (CH₂)/ ν (CN)-Schwingungen (1458 cm⁻¹), die Amid I Bande (1623 cm⁻¹) aber nicht im Amid I-Bereich der Termini zu beobachten. Nach Photoanregung der Thioxopeptidbindung mit einem hohen Anteil an Licht der Wellenlänge 336 nm (Lampenspektrum in **Abbildung 3.25**) taucht zusätzlich eine neue Schwingungsbande bei einer Wellenzahl von 2044 cm⁻¹ auf (**Abbildung 3.26**).



Diese Schwingungsbande ist nach Bestrahlung sowohl in Wasser als auch in Deuteriumoxid beobachtbar und relaxiert vollständig mit fortschreitender Zeit (**Abbildung 3.26/3.27**).

Tabelle 3.13: Vergleich der langsamen Relaxationsgeschwindigkeiten der IR-Bande bei 2044 cm^{-1} mit den UV-Vis-spektroskopisch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Thioxopeptidbindung gemessen in D_2O .

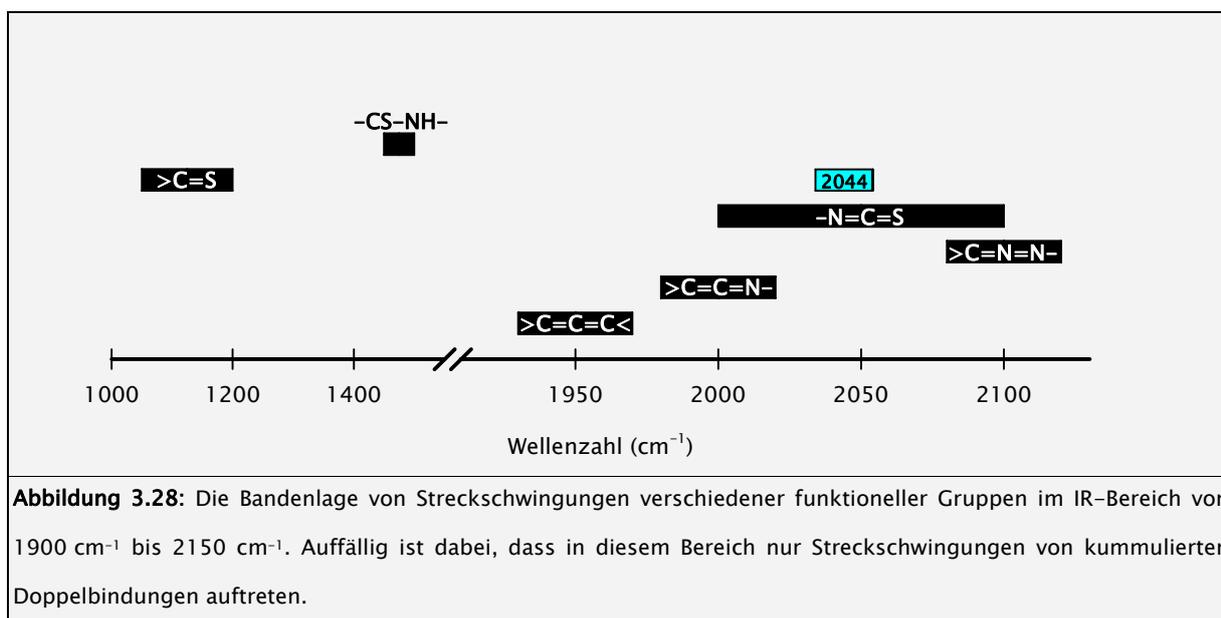
Peptid	k_2 IR-spektroskopisch (2044 cm^{-1})	k_2 UV-Vis-spektroskopisch (272 nm)
Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂	$1.34 \cdot 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ (36.5°C)	$1.21 \cdot 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ (35°C)
Ac-Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₁₂ -NH ₂	$2.36 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ (36.5°C)	$2.15 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ (35°C)
Ac-(Pro) ₈ -Pro- ψ [CS-N]-(Pro) ₄ -NH ₂	$2.81 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ (36.5°C)	$2.42 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ (35°C)



Die Struktur, die die Schwingung bei 2044 cm^{-1} hervorruft ist ungeklärt. Ein typisches Photolyseprodukt der Thioxo-peptide, das nach intensiver Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 276 nm zu beobachten ist, ist Isothiocyanat (HSCN; $\nu(\text{NC}) \sim 2181\text{ cm}^{-1}$ + $\nu(\text{SH}) \sim 2551\text{ cm}^{-1}$). Dieses ist gut IR-spektroskopisch detektierbar aufgrund des großen Extinktionskoeffizienten dieser Schwingung, konnte aber nach Bestrahlung mit einem hohen Anteil an Licht der Wellenlänge von 336 nm nicht beobachtet werden.

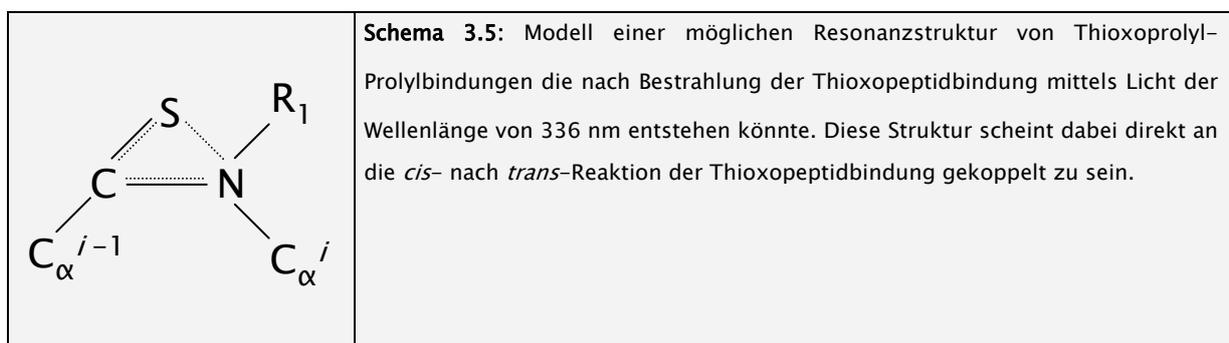
3.6 IR-spektroskopische Untersuchung der Thioxo-CTI (Diskussion)

Die Frage, die sich aufgrund des Schwingungssignales bei 2044 cm^{-1} stellt, ist, ob diese Bande durch eine Intermediatstruktur der Thioxo-peptidbindung hervorgerufen wird, da deren Auftreten und Relaxation direkt an die photoinduzierte Gleichgewichtsverschiebung der $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R},\text{R}')$ Gruppe gekoppelt ist (Tabelle 3.13). Diese Bande bei 2044 cm^{-1} fällt dabei in einen Bereich des Infrarotspektrums ($2000\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$) in dem nur sehr wenige Schwingungsmodi beobachtet werden können (Abbildung 3.28).



Weiterhin kann diese Bande nicht als Oberschwingung einer anderen Gruppierung zugeordnet werden. Ein möglicher struktureller Verwandter wäre die Thiocyanssäure (HSNC , $\nu(\text{NC}) \sim 2064\text{ cm}^{-1}$). Da aber die Bildung einer solchen Struktur eine Kettenspaltung, sowie den Bruch des Prolinrings der den Stickstoff enthält zur Folge hat, müssten diese Bruchstücke massenspektrometrisch detektierbar sein. Eine HPLC- und massenspektrometrische Analyse der bestrahlten Proben zeigte aber keine solchen Fragmente. Ein weiterer Hinweis auf eine Intermediatstruktur, die durch Bestrahlung der Thioxo-peptidbindung mit Licht der Wellenlänge von 336 nm hervorgerufen wird, zeigt sich anhand der Korrelation des Integrals der Bande bei 2044 cm^{-1} mit der Bestrahlungsdauer. Dieses Integral ist nicht proportional zur Bestrahlungsdauer, sondern spiegelt eine Sättigungsfunktion erster Ordnung wieder (Abbildung 3.27). Des Weiteren erscheint keine Bande bei $\sim 2551\text{ cm}^{-1}$ (SH-Streckschwingung) die typischerweise bei Photozersetzung der

Thioxo-peptide auftritt. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass eine Bestrahlung der Thioxopropyl-Prolylbindung am ${}^3n-1\pi^*$ Übergang spezifisch ein Intermediat induziert. Obwohl nicht mit 100 %iger Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei dieser Schwingungsbande nicht um ein Signal eines Photolyseproduktes der Thioxo-peptidbindung handelt, weist dieses Verhalten dennoch auf einen bisher unbekanntem Aspekt der Thioxo-peptidbindungsresonanz hin. Da diese Schwingung bei 2044 cm^{-1} auf Bindungsverhältnisse ähnlich derer von Thiocyan Säure (HSNC) hinweist, kann man schlussfolgern, dass eine einzelne *cis*-Konformation der Thioxo-peptidbindung in der PP II-Helix eine elektronische Interaktion zwischen dem Schwefelatom und dem Stickstoffatom dieser Bindung ermöglicht. Das Stickstoffatom der Thioxo-peptidbindung ist, im Gegensatz zu Oxo-peptidbindungen, das Atom mit der größten Elektronegativität in dieser funktionellen Gruppe. Möglicherweise erlaubt eine ψ -Winkel Neuorientierung nach Einzelbindungs-Konformationsänderung von Thioxopropyl-Prolylbindungen eine elektronische Interaktion und/oder Hyperkonjugation zwischen diesen beiden Atomen (**Schema 3.5**).



Um diese Theorie zu bestätigen müsste diese Interaktion anhand von Ab-initio-Valenzbindungsrechnungen nachvollzogen werden. Weiterhin sollte die Schwingungsbande bei 2044 cm^{-1} durch eine Substitution des Schwefelatoms gegen ein Selenatom an gleicher Position im Peptid ebenfalls nach Bestrahlung beobachtbar sein, und eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen aufweisen.

4 Zusammenfassung

Die CTI der Thioxozeptidbindung der Dipeptide

- Ein Vergleich der Grundzustände der Thioxodipeptide $\text{H-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro-NH}_2$ und $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro-NH}_2$ erlaubte es, den Einfluss einer N-terminalen Acetylierung auf die Grundzustandsenergie­differenz der nachfolgenden Thioxozeptidbindung abzuschätzen. Demnach stabilisiert die Einführung einer Acetylgruppe die *trans*-Konformation mit ca. 5.8 kJ/mol.
- Die Acetyl-Prolylbindung in $\text{Ac-Pro-}\psi[\text{CS-N}]\text{-Pro-NH}_2$ stellt neben der Thioxozeptidbindung eine zweite Bindung dar, die ein *cis/trans*-Gleichgewicht aufweist. Dadurch existieren 4 Konformere dieses Peptides. Die Untersuchung der CTI-Reaktionen der Thioxozeptidbindung dieses Peptides zeigte, dass verschiedene, thermodynamisch nicht äquivalente, Übergangszustände der Thioxozeptidbindung existieren müssen. Die Art und Weise des Übergangszustandes ist dabei abhängig von der Geometrie des gesamten Peptides.

Einzelbindungs-Konformationsänderung innerhalb der PP II-Struktur

- Anhand NMR-spektroskopischer Untersuchungen der Thioxopolyprolinpeptide, konnte geschlussfolgert werden, dass einzelne *cis*-Peptidbindungen an jeder Position mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten können. Dieses erlaubt anhand der Gleichung $y = N \cdot 3\%$ eine Berechnung des prozentualen Anteiles von Molekülen die in Polyprolinpeptiden eine *cis*-Bindung enthalten, wobei y der Gesamtfraction an Molekülen mit einer *cis*-Peptidbindung entspricht und N für die Anzahl der Peptidbindungen in der Polyprolinkette steht.
 - Aufgrund der kinetischen und thermodynamischen Parameter der CTI-Reaktion der Thioxoprolyl-Prolylbindung kann man schlussfolgern, dass eine *cis*-Peptidbindung innerhalb eines Polyprolinpeptides eine ψ -Winkeländerung in dem C-terminal zu dieser Bindung gelegenen Prolyl-Prolylbindungen induziert. Die dabei entstehende Struktur besitzt wahrscheinlich erhöhte Gauche-Abstoßungs-Effekte im Vergleich zur idealen PP II-Geometrie, bildet aber stärkere Carbonyl-Wasser-Carbonyl-Cluster und
-

sollte die Aktivierungsenergie für weitere CTI-Ereignisse in diesem Abschnitt erhöhen. Weiterhin scheint eine ψ -Winkelreorientierung des C-terminalen Kettenabschnittes der *cis*- nach *trans*-Isomerisierungsreaktion der Thioxozeptidbindung vorauszugehen.

Vergleich des PP I nach PP II Übergangs mit Einzelbindungs-CTI

- Befindet sich eine Thioxozeptidbindung innerhalb einer 13-gliedrigen Polyprolinkette, zeigt der PP I nach PP II Übergang eine zweiphasige Umwandlungskinetik, die eine schnelle und eine langsame Reaktion beinhaltet. Dabei scheinen die Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Reaktion der Oxo- und Thioxozeptidbindungen in den Polyprolinpeptiden direkt durch das Dipolmoment der Peptidkette beeinflusst zu werden.
- Aufgrund der kinetischen Separation zweier Reaktionen durch die ortsspezifische Thioxylierung konnte geschlussfolgert werden, dass die *cis*-Konformation der Thioxozeptidbindung an einigen Positionen weniger gut in einer PP I-Helix akzeptiert zu werden. Das bedeutet, dass einzelne Segmente in Polyprolinpeptiden individuell die PP I-Konformation einnehmen und aus dieser wieder rückisomerisieren können. Demzufolge besitzt die PP I-Struktur nicht an allen Positionen die gleichen Freiheitsgrade bzw. zeigt dieses, dass die PP I-Helix wie die PP II-Helix nur einen Idealfall darstellt und verschiedene semistabile Intermediatstrukturen existieren.

IR-spektroskopische Untersuchung der Thioxo-CTI

- Eine Bestrahlung von Thioxopropyl-Prolylbindung am ${}^3n-1\pi^*$ Übergang scheint spezifisch ein langlebiges *cis*-ähnliches Thioxointermediat zu induzieren, welches nicht durch lösungsmittelbedingte *cis*-Konformerenerhöhung hervorgerufen werden kann. Dieses weist auf einen bisher unbekanntem Aspekt der Thioxozeptidbindungsresonanz hin, bei dem in Abhängigkeit von der *cis*-Konformation der Thioxozeptidbindung eine elektronische Interaktion und/oder Hyperkonjugation zwischen dem Schwefelatom und dem Stickstoffatom dieser Bindung ermöglicht wird.
-

5 Referenzen

1. Pauling, L., *The Nature of the Chemical Bond*. Cornell University Press, 1939 (first edition).
 2. Ramek, M., et al., *Ab Initio Study of the Conformational Dependence of the Nonplanarity of the Peptide Group*. J. Phys. Chem. A., 2000. **104**(42): p. 9636–9645.
 3. Dasgupta, A.K., R. Majumdar, and D. Bhattacharyya, *Characterization of non-planar peptide groups in protein crystal structures*. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2004. **41**: p. 233–240.
 4. Nardi, F., et al., *The cisproline(*i* - 1)-aromatic(*i*) interaction: folding of the Ala-cisPro-Tyr peptide characterized by NMR and theoretical approaches*. J Biomol NMR, 2000. **17**(1): p. 63–77.
 5. Ramachandran, G.N. and V. Sasisekharan, *Conformation of polypeptides and proteins*. Adv. Protein. Chem., 1968. **23**: p. 283–438.
 6. Esposito, L., et al., *Correlation between omega and psi dihedral angles in protein structures*. J. Mol. Biol., 2005. **347**(3): p. 483–7.
 7. Fischer, G. and S. Wawra, *Polypeptide binding proteins: what remains to be discovered?* Mol Microbiol, 2006. **61**(6): p. 1388–96.
 8. Drakenberg, T., K.I. Dahlqvist, and S. Forsen, *Barrier to internal rotation in amides. IV. N,N-Dimethylamides. Substituent and solvent effects*. J. Phys. Chem., 1972. **76**(15): p. 2178–2183.
 9. Avenoza, A., et al., *Incorporation of Ahc into model dipeptides as an inducer of a beta-turn with a distorted amide bond. Conformational analysis*. J. Org. Chem., 2002. **67**(12): p. 4241–9.
 10. Ramachandran, G.N. and A.K. Mitra, *An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides*. J. Mol. Biol., 1976. **107**(1): p. 85–92.
 11. Li, P., et al., *UV Resonance Raman Ground and Excited State Studies of Amide and Peptide Isomerization Dynamics*. J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**(5): p. 1116–1120.
 12. Scherer, G., et al., *Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(22): p. 5568–5574.
 13. Fischer, G. and T. Aumuller, *Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 2003. **148**: p. 105–50.
 14. Wiberg, K.B. and M.W. Wong, *Solvent effects. 4. Effect of solvent on the E/Z energy difference for methyl formate and methyl acetate*. J. Am. Chem. Soc., 1993. **115**(3): p. 1078–1084.
 15. Lauvergnat, D. and P.C. Hiberty, *Role of Conjugation in the Stabilities and Rotational Barriers of Formamide and Thioformamide. An ab Initio Valence-Bond Study*. J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**(40): p. 9478–9482.
 16. Hinderaker, M.P. and R.T. Raines, *An electronic effect on protein structure*. Protein Sci., 2003. **12**(6): p. 1188–1194.
 17. Ilieva, S., B. Hadjieva, and B. Galabov, *Theory supplemented by experiment. Electronic effects on the rotational stability of the amide group in p-substituted acetanilides*. J. Org. Chem., 2002. **67**(17): p. 6210–5.
 18. Voet, J. and D. Voet, *Biochemistry*. 1994, Weinheim: Wiley-VCH.
-

19. Gerothanassis, I.P., C. Vakka, and A. Troganis, *17O NMR Studies of the Solvation State of cisolidustrans Isomers of Amides and Model Protected Peptides*. J. Magn. Reson. B, 1996. **111**(3): p. 220–229.
 20. Troganis, A., et al., *Thermodynamic origin of cis/trans isomers of a proline-containing beta-turn model dipeptide in aqueous solution: a combined variable temperature 1H-NMR, two-dimensional 1H,1H gradient enhanced nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY), one-dimensional steady-state intermolecular 13C,1H NOE, and molecular dynamics study*. Biopolymers, 2000. **53**(1): p. 72–83.
 21. Radzicka, A., L. Pedersen, and R. Wolfenden, *Influences of solvent water on protein folding: free energies of solvation of cis and trans peptides are nearly identical*. Biochemistry, 1988. **27**(12): p. 4538–41.
 22. Eberhardt, E.S., S.N. Loh, and R.T. Raines, *Thermodynamic origin of prolyl peptide bond isomers*. Tetrahedron Lett., 1993. **34**(19): p. 3055–3056.
 23. Cheng, H.N. and F.A. Bovey, *Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline*. Biopolymers, 1977. **16**(7): p. 1465–1472.
 24. Eberhardt, E.S., et al., *Solvent effects on the energetics of prolyl peptide bond isomerization*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**(13): p. 5437–5439.
 25. Fischer, G., *Chemical aspects of peptide bond isomerisation*. Chem. Soc. Rev., 2000. **29**(2): p. 119–127.
 26. Ishimoto, B., K. Tonan, and S. Ikawa, *Coupling of intramolecular hydrogen bonding to the cis-to-trans isomerization of a proline imide bond of small model peptides*. Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc., 2000. **56A**(1): p. 201–209.
 27. Kramer, M.L. and G. Fischer, *FKBP-like catalysis of peptidyl-prolyl bond isomerization by micelles and membranes*. Biopolymers, 1997. **42**(1): p. 49–60.
 28. Martin, R.B. and W.C. Hutton, *Predominant nitrogen-bound hydrogen exchange via Oxygen-protonated amide*. J. Am. Chem. Soc., 1973. **95**(14): p. 4752–4754.
 29. Schmid, F.X. and R.L. Baldwin, *Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1978. **75**(10): p. 4764–4768.
 30. Reimer, U., et al., *Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation*. J. Mol. Biol., 1998. **279**(2): p. 449–460.
 31. Stein, R.L., *Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization*. Adv. Protein Chem., 1993. **44**: p. 1–24.
 32. Scholz, C., et al., *Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds*. Biol. Chem., 1998. **379**(3): p. 361–365.
 33. Reimer, U., et al., *Intramolecular assistance of cis/trans isomerization of the histidine-proline moiety*. Biochemistry, 1997. **36**(45): p. 13802–8.
 34. Jabs, A., M.S. Weiss, and R. Hilgenfeld, *Non-proline Cis peptide bonds in proteins*. J. Mol. Biol., 1999. **286**(1): p. 291–304.
 35. Stoddard, B.L. and S. Pietrokovski, *Breaking up is hard to do*. Nat. Struct. Biol., 1998. **5**(1): p. 3–5.
 36. Brandts, J.F., H.R. Halvorson, and M. Brennan, *Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues*. Biochemistry, 1975. **14**(22): p. 4953–63.
-

37. Fischer, G., et al., *Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1984. **791**(1): p. 87–97.
 38. Fanghanel, J., et al., *Isothermal calorimetry as a tool to investigate slow conformational changes in proteins and peptides*. *Anal Chem*, 2006. **78**(13): p. 4517–23.
 39. Dugave C. , I.K., M. Zimmer, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, U. Röhrig, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, C. Dugave, S. Wawra, G. Fischer, G. Fischer, M. Mutter, L. Moroder, C. Dugave, M. Gondry, C. Dugave, A. A. Batista, *cis–trans Isomerization in Biochemistry*, ed. C. edited by Dugave. 2006, Weinheim: WILEY–VCH.
 40. Schmid, F.X., et al., *Prolyl isomerases: role in protein folding*. *Adv Protein Chem*, 1993. **44**: p. 25–66.
 41. Grathwohl, C. and K. Wüthrich, *The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides*. *Biopolymers*, 1976. **15**(10): p. 2025–2041.
 42. Christoph Grathwohl, K.W., *Nmr studies of the rates of proline $\langle I \rangle$-$\langle I \rangle$ isomerization in oligopeptides*. *Biopolymers*, 1981. **20**(12): p. 2623–2633.
 43. Schmid, F.X., J. Buchner, and T. Kiefhaber, *Protein Folding Handbook*. 1 ed. 2005: Wiley–VCH, Weinheim. 916–945.
 44. Hamelberg, D., T. Shen, and J.A. McCammon, *Phosphorylation effects on cis/trans isomerization and the backbone conformation of serine–proline motifs: accelerated molecular dynamics analysis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005. **127**(6): p. 1969–1974.
 45. Fischer, S., R.L. Dunbrack, and J.M. Karplus, *Cis–Trans Imide Isomerization of the Proline Dipeptide*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994. **116**(26): p. 11931–11937.
 46. McDonald, D.Q. and W.C. Still*, *Molecular Mechanics Parameters and Conformational Free Energies of Proline–Containing Peptides*. *J. Org. Chem.*, 1996. **61**(4).
 47. Krieger, F., A. Moglich, and T. Kiefhaber, *Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005. **127**(10): p. 3346–3352.
 48. Yao, J., et al., *Stabilization of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution**. *J. Mol. Biol.*, 1994. **243**(4): p. 736–753.
 49. Zimmerman, S.S. and H.A. Scheraga, *Stability of cis, trans, and nonplanar peptide groups*. *Macromolecules*, 1976. **9**(3): p. 408–16.
 50. Fischer, G., E. Berger, and H. Bang, *Kinetic beta–deuterium isotope effects suggest a covalent mechanism for the protein folding enzyme peptidylprolyl cis/trans–isomerase*. *FEBS Lett.*, 1989. **250**(2): p. 267–270.
 51. Harrison, R.K. and R.L. Stein, *Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl cis–trans isomerization*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992. **114**(9): p. 3464–3471.
 52. Schiene, C., et al., *Mapping the stereospecificity of peptidyl prolyl cis/trans isomerases*. *FEBS Lett.*, 1998. **432**(3): p. 202–206.
 53. Aleman, C., *On the Ability of Modified Peptide Links to Form Hydrogen Bonds*. *J. Phys. Chem. A*, 2001. **105**(27): p. 6717–6723.
 54. Ming–Chiu Ou, S.–Y.C., *Protonation Sites and Rotational Barriers Calculation for Formamide and Thioformamide*. *J Phys Chem*, 1995. **99**(2): p. 556–62.
-

55. Lauvergnat, D.H., P. C., *Role of Conjugation in the Stabilities and Rotational Barriers of Formamide and Thioformamide. An ab Initio Valence-Bond Study* J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**(40): p. 9478–82.
 56. Prasad, B.V., P. Uppal, and P.S. Bassi, *Barrier to C---N rotation in selenoformamide: an ab initio study*. Chemical Physics Letters, 1997. **276**(1–2): p. 31–38.
 57. La Cour, T.F., et al., *The geometry of the thiopeptide unit*. Int J Pept Protein Res, 1983. **22**(4): p. 509–12.
 58. Jensen, O.E., et al., *Studies on amino acids and peptides VIII : Synthesis and crystal structure of two monothiated analogues of Boc-Gly-S-Ala-Aib-OMe*. Tetrahedron, 1985. **41**(23): p. 5595–5606.
 59. Bardi, R., et al., *Molecular and crystal structures of two [beta]-bend forming monothiated analogues of melanostatin*. Tetrahedron, 1988. **44**(3): p. 761–769.
 60. Kajtar, M., et al., *Chiroptical properties and solution conformations of protected endothiodipeptide esters*. Tetrahedron, 1986. **42**(14): p. 3931–3942.
 61. Hollosi, M., et al., *Mixed intramolecular h-bonds of secondary thioamides*. Tetrahedron, 1988. **44**(1): p. 195–202.
 62. Brown, D.W., M.M. Campbell, and C.V. Walker, *Endothiopeptides*. Tetrahedron, 1983. **39**(7): p. 1075–1083.
 63. Louise Maziak, G.L., Bernard Belleau, *Productive conformation in the bound state and hydrolytic behavior of thiopeptide analogs of angiotensin-converting enzyme substrates* J. Am. Chem. Soc., 1986. **108**(1): p. 182–3.
 64. Dudek, E.P. and G.O. Dudek, *Proton magnetic resonance spectra of thiocarboxamides* J. Org. Chem., 1967. **32**(3): p. 823–4.
 65. Miwa, J.H., et al., *Conformational stability of helical peptides containing a thioamide linkage*. Org Lett, 2002. **4**(26): p. 4655–7.
 66. Ming-Chiu, O. and S.-Y. Chu, *Protonation Sites and Rotational Barriers Calculation for Formamide and Thioformamide*. J Phys Chem, 1995. **99**(2): p. 556–62.
 67. Min, B.K., et al., *A comparative study on the hydrogen bonding ability of amide and thioamide using near IR spectroscopy*. Journal of Molecular Structure, 1998. **471**(1–3): p. 283–288.
 68. Wiberg, K.B. and P.R. Rablen, *Why Does Thioformamide Have a Larger Rotational Barrier Than Formamide?* J. Am. Chem. Soc., 1995. **117**(8): p. 2201–9.
 69. Stewart, W.E. and T.H. Siddall, *Nuclear magnetic resonance studies of amides* Chem. Rev., 1970. **70**(5): p. 517–51.
 70. Schaumann, *2nd German-Danish Symposium on Organic Chemistry* Angewandte Chemie International Edition in English, 1974. **13**(5): p. 350.
 71. Piccinni-Leopardi, C., et al., *¹H and ¹³C dynamic nuclear magnetic resonance study of hindered rotation in thiobenzoylpiperidines and thiobenzoylmorpholines. Correlation between barrier heights of amides and thioamides*. Can. J. Chem, 1977. **55**(14): p. 2649–2655.
 72. Jackman, L.M., T.E. Kavanagh, and R.C. Haddon, *Studies in nuclear magnetic resonance - IX. Rotational barriers in substituted N,N-dimethylbenzamides*. Organic Magnetic Resonance, 1969. **1**(2): p. 109–123.
 73. Berg, U., Acta. Chem. Scand. Ser. B, 1978. **B30**: p. 695–704.
-

74. Schutkowski, M., K. Neubert, and G. Fischer, *Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thioxoaminoacyl-prolyl peptide bond*. Eur J Biochem, 1994. **221**(1): p. 455-61.
 75. Schutkowski, M., et al., *Probing substrate backbone function in prolyl oligopeptidase catalysis--large positional effects of peptide bond monothioxylation*. Eur J Biochem, 1997. **245**(2): p. 381-5.
 76. Schutkowski, M., S. Wollner, and G. Fischer, *Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by substrate analog structures: thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides*. Biochemistry, 1995. **34**(40): p. 13016-13026.
 77. Lumbroso, H., et al., *Mesomeric and [pi]-moments in some hetero-conjugated compounds*. Journal of Molecular Structure, 1998. **442**(1-3): p. 183-194.
 78. Glendening, E.D. and J.A. Hrabal, *Resonance in Formamide and Its Chalcogen Replacement Analogues: A Natural Population Analysis/Natural Resonance Theory Viewpoint*. J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**(52): p. 12940-6.
 79. Wiberg, K.B. and D.J. Rush, *Solvent Effects on the Thioamide Rotational Barrier: An Experimental and Theoretical Study*. J. Am. Chem. Soc., 2001. **123**(9): p. 2038-46.
 80. Balaji, V.N., S. Profeta, Jr., and S.W. Dietrich, *Mean geometry of the thiopeptide unit and conformational features of dithiopeptides and polythiopeptides*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **145**(2): p. 834-41.
 81. Artis, D.R.L., M. A., *Conformations of Thioamide-Containing Dipeptides: A Computational Study*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(47): p. 12200-6.
 82. Tran, T.T., H. Treutlein, and A.W. Burgess, *Conformational analysis of thiopeptides: (ψ , ϕ) maps of thio-substituted dipeptides*. Journal of Computational Chemistry, 2001. **22**(10): p. 1026-1037.
 83. Bondi, A., *van der Waals Volumes and Radii*. J. Phys. Chem., 1964. **68**(3): p. 441-51.
 84. Tran, T.T., H. Treutlein, and A.W. Burgess, *Conformational analysis of thiopeptides: derivation of sp^2 sulfur parameters for the CFF91 force field*. Journal of Computational Chemistry, 2001. **22**(10): p. 1010-1025.
 85. Tran, T.T., et al., *Synthesis, X-ray crystallographic structures of thio substituted N-acetyl N'-methylamide alanine and evaluation of sp^2 sulfur parameters of the CFF91 force field*. J Pept Res, 2001. **58**(1): p. 67-78.
 86. Kessler, H., et al., *Unusual thionation of a cyclic hexapeptide. Conformational changes and dynamics*. Int J Pept Protein Res, 1992. **40**(1): p. 25-40.
 87. Czugler, M.K., A.; Kajtarperedy, M.; Kollat, E.; Kajtar, J.; Majer, Z.; Farkas, Ö.; Hollosi, M., *Reverse Turn Conformation of N-Thioacetyl Thioprolyl Glycine N'-Methylamide in the Crystal and in Solution*. Tetrahedron, 1993. **49**: p. 6661-8.
 88. Galla, H.J., *Spektroskopische Methoden für Biochemiker*. 1988, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
 89. Maciejewski, A. and R.P. Steer, *The photophysics, physical photochemistry, and related spectroscopy of thiocarbonyls*. Chem. Rev., 1993. **93**(1): p. 67-98.
 90. Sugawara, Y., et al., *Resonance Raman spectra of n-methylthioacetamide*. Chemical Physics Letters, 1977. **52**(2): p. 323-326.
 91. Winther, F., A. Guarnieri, and O.F. Nielsen, *The vibrational spectrum of methanesulfonyl chloride*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1975. **31**(5-6): p. 689-696.
-

92. Kato, C., H. Hamaguchi, and M. Tasumi, *Transient resonance Raman study on the trans-cis photoisomerization of N-methylthioacetamide* J. Phys. Chem., 1985. **89**(3): p. 407–10.
 93. Shaw, R.A., et al., *Hydrogen bonding and isomerization in thioamide peptide derivatives*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(8): p. 1399–1412.
 94. Frank, R., et al., *Thioxylation as One-Atom-Substitution Generates a Photoswitchable Element within the Peptide Backbone*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2000. **39**(6): p. 1120–1122.
 95. Satzger, H., et al., *Photoswitchable elements within a peptide backbone-ultrafast spectroscopy of thioxylated amides*. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys, 2005. **109**(10): p. 4770–5.
 96. Harada, I. and M. Tasumi, *Formation of transient cis n-methylthioacetamide under ultraviolet laser irradiation*. Chemical Physics Letters, 1980. **70**(2): p. 279–282.
 97. Boxall, C.R. and J.P. Simons, *The photodissociation of HNCS in the near ultra-violet*. Journal of Photochemistry, 1972. **1**(5): p. 363–369.
 98. Wierzejewska, M. and Z. Mielke, *Photolysis of isothiocyanic acid HNCS in low-temperature matrices. Infrared detection of HSCN and HSNC isomers*. Chemical Physics Letters, 2001. **349**(3–4): p. 227–234.
 99. Zhao, J., et al., *Direct photomodulation of peptide backbone conformations*. Chem. Commun. (Camb), 2003(22): p. 2810–1.
 100. Dapprich, S. and G. Frenking, *The keto/enol tautomerism of selenoformamide and telluroformamide*. Chemical Physics Letters, 1993. **205**(2–3): p. 337–342.
 101. Knudsen, R., O. Sala, and Y. Hase, *A low temperature matrix isolation infrared study of acetamides. II. Thioacetamide and some deuterated derivatives*. Journal of Molecular Structure, 1994. **321**(3): p. 197–203.
 102. Hargittai, M., S. Samdal, and R. Seip, *The molecular structure and conformation of acetamides in the vapour phase : Part III. Thioacetamide (ethanethioamide)*. Journal of Molecular Structure, 1981. **71**: p. 147–159.
 103. Hansen, E.L., N.W. Larsen, and F.M. Nicolaisen, *An infrared investigation of formamide, acetamide, and thiocetamide in the vapour phase : Inversion of the amino group*. Chemical Physics Letters, 1980. **69**(2): p. 327–331.
 104. Nowak, M.J., et al., *Theoretical and matrix-isolation experimental study on 2(1H)-pyridinethione/2-pyridinethiol* J. Phys. Chem., 1990. **94**(19): p. 7406–14.
 105. Nowak, M.J., et al., *Theoretical and infrared matrix isolation study of 4(3H)-pyrimidinethione and 3(2H)-pyridazinethione: tautomerism and phototautomerism* J. Phys. Chem., 1991. **95**(6): p. 2404–11.
 106. Prusinowska, D., et al., *Tautomerism, phototautomerism and infrared spectra of matrix-isolated 2-quinolinethione*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(11): p. 1809–1826.
 107. Lapinski, L., et al., *UV induced proton transfer in thioacetamide: first observation of thiol form of simple thioamide*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2003. **5**: p. 1524–9.
 108. Kamiya, K., et al., *Enol-to-keto tautomerism of peptide groups*. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys, 2006. **110**(9): p. 4443–50.
-

109. Wildemann, D., et al., *Extremely selective Mg(ClO₄)₂ mediated removal of Bpoc/Ddz moieties suitable for the solid phase peptide synthesis of thioxo peptides*. Chem. Commun., 1999: p. 1809–10.
 110. Cubellis, M.V., et al., *Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein–protein interactions*. Proteins, 2005. **58**(4): p. 880–892.
 111. Siligardi, G. and A.F. Drake, *The importance of extended conformations and, in particular, the PII conformation for the molecular recognition of peptides*. Biopolymers, 1995. **37**(4): p. 281–292.
 112. Kelly, M.A., et al., *Host–guest study of left–handed polyproline II helix formation*. Biochemistry, 2001. **40**(48): p. 14376–83.
 113. Rath, A., A.R. Davidson, and C.M. Deber, *The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition*. Biopolymers, 2005. **80**(2–3): p. 179–85.
 114. Blanch, E.W., et al., *Is polyproline II helix the killer conformation? A Raman optical activity study of the amyloidogenic prefibrillar intermediate of human lysozyme*. J. Mol. Biol., 2000. **301**(2): p. 553–563.
 115. Hicks, J.M. and V.L. Hsu, *The extended left–handed helix: a simple nucleic acid–binding motif*. Proteins, 2004. **55**(2): p. 316–329.
 116. Kelly, M.A., et al., *Host–guest study of left–handed polyproline II helix formation*. Biochemistry, 2001. **40**(48): p. 14376–14383.
 117. Nguyen, J.T., et al., *Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N–substituted inhibitors*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2088–2092.
 118. Pawson, T., *Protein modules and signalling networks*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 573–80.
 119. Cohen, G.B., R. Ren, and D. Baltimore, *Modular binding domains in signal transduction proteins*. Cell, 1995. **80**(2): p. 237–48.
 120. Ren, R., et al., *Identification of a ten–amino acid proline–rich SH3 binding site*. Science, 1993. **259**(5098): p. 1157–61.
 121. Knof, S.a.E., J., *Conformational stability, partial specific volumes and spectroscopic properties of poly–L–proline, poly–L–hydroxyproline and some of its O–acyl derivatives in various solvent systems*. Isr. J. Chem., 1974. **12**(165–77).
 122. Mutter, M., et al., *Pseudo–prolines: induction of cis/trans–conformational interconversion by decreased transition state barriers*. Biopolymers, 1999. **51**(2): p. 121–8.
 123. Kakinoki, S., Y. Hirano, and M. Oka, *On the Stability of Polyproline–I and II Structures of Proline Oligopeptides*. Polymer Bulletin, 2005. **V53**(2): p. 109–115.
 124. Shmueli, U. and W. Traub, *An X–Ray Diffraction Study of Poly–L–Lysine Hydrochloride*. J. Mol. Biol., 1965. **12**: p. 205–214.
 125. Drake, A.F., G. Siligardi, and W.A. Gibbons, *Reassessment of the electronic circular dichroism criteria for random coil conformations of poly(L–lysine) and the implications for protein folding and denaturation studies*. Biophys. Chem., 1988. **31**(1–2): p. 143–146.
 126. Yasui, S.C. and T.A. Keiderling, *Vibrational circular dichroism of polypeptides. 8. Poly(lysine) conformations as a function of pH in aqueous solution*. J. Am. Chem. Soc., 1986. **108**(18): p. 5576–5581.
-

127. Paterlini, M.G., T.B. Freedman, and L.A. Nafie, *Vibrational circular dichroism spectra of three conformationally distinct states and an unordered state of poly(L-lysine) in deuterated aqueous solution*. Biopolymers, 1986. **25**(9): p. 1751–1765.
 128. Osumi-Davis, P.A., et al., *Asp537, Asp812 are essential and Lys631, His811 are catalytically significant in bacteriophage T7 RNA polymerase activity*. J. Mol. Biol., 1992. **226**(1): p. 37–45.
 129. Shi, Z., et al., *Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2002. **99**(14): p. 9190–9195.
 130. Mikhonin, A.V., et al., *UV resonance Raman determination of polyproline II, extended 2.5(1)-helix, and beta-sheet Psi angle energy landscape in poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(21): p. 7712–20.
 131. Eker, F., et al., *Preferred peptide backbone conformations in the unfolded state revealed by the structure analysis of alanine-based (AXA) tripeptides in aqueous solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10054–9.
 132. Eker, F., et al., *Tripeptides with ionizable side chains adopt a perturbed polyproline II structure in water*. Biochemistry, 2004. **43**(3): p. 613–21.
 133. Weise, C.F.W., J. C.; , *Conformational Analysis of Alanine Dipeptide from Dipolar Couplings in a Water-Based Liquid Crystal*. J. Phys. Chem. B., 2003. **107**(14): p. 3265–77.
 134. Eker, F., et al., *Tripeptides adopt stable structures in water. A combined polarized visible Raman, FTIR, and VCD spectroscopy study*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(48): p. 14330–41.
 135. Eker, F., K. Griebenow, and R. Schweitzer-Stenner, *Stable conformations of tripeptides in aqueous solution studied by UV circular dichroism spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(27): p. 8178–85.
 136. Avbelj, F. and R.L. Baldwin, *Role of backbone solvation and electrostatics in generating preferred peptide backbone conformations: distributions of phi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5742–7.
 137. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Molecular dynamics simulations of polypeptide conformations in water: A comparison of alpha, beta, and poly(pro)II conformations*. Proteins, 1999. **36**(4): p. 400–406.
 138. Stapley, B.J. and T.P. Creamer, *A survey of left-handed polyproline II helices*. Protein Sci., 1999. **8**(3): p. 587–595.
 139. Makarov, A.A., et al., *Natural polypeptides in left-handed helical conformation. A circular dichroism study of the linker histones' C-terminal fragments and beta-endorphin*. FEBS Lett., 1992. **306**(1): p. 63–65.
 140. Gough, C.A., R.W. Anderson, and R.S. Bhatnagar, *The role of bound water in the stability of the triple-helical conformation of (Pro-Pro-Gly)₁₀*. J. Biomol. Struct. Dyn., 1998. **15**(6): p. 1029–1037.
 141. Brandts, J.F. and L.N. Lin, *Proline isomerization studied with proteolytic enzymes*. Methods. Enzymol., 1986. **131**: p. 107–126.
 142. Slate, C.A.S., D. R.; Moss, J. A.; Chen, P.; Erickson, B. W.; Meyer, T. J., *Photochemical Energy Transduction in Helical Proline Arrays* J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(19): p. 4885–6.
 143. Zagrovic, B., et al., *Unusual compactness of a polyproline type II structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(33): p. 11698–703.
-

144. Clark, D.S., J.J. Dechter, and L. Mandelkern, *Conformational Properties of Poly(L-proline) and Poly(-hydroxy-L-proline). 1. Cis Imide Bonds and Evidence for Two Trans Conformers*. *Macromolecules*, 1979. **12**(4): p. 626–33.
 145. Mandelkern, L. and W.L. Mattice, *Conformational properties of poly-L-proline from II in dilute solution*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971. **93**(7): p. 1769–77.
 146. Wu, C.C., R.A. Komoroski, and L. Mandelkern, *The Observation of Cis Residues in Poly(L-proline) in Aqueous Solution*. *Macromolecules*, 1975. **8**(5): p. 635–7.
 147. Dumy, P., et al., *Pseudo-Prolines as a Molecular Hinge: Reversible Induction of cis Amide Bonds into Peptide Backbones*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997. **119**(5): p. 918–25.
 148. Keller, M., et al., *Enhancing the Proline Effect: Pseudo-Prolines for Tailoring Cis/Trans Isomerization*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. **120**(12): p. 2714–2720.
 149. Bochicchio, B. and A.M. Tamburro, *Polyproline II structure in proteins: identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions*. *Chirality*, 2002. **14**(10): p. 782–792.
 150. Lin, L.N. and J.F. Brandts, *Role of cis-trans isomerism of the peptide bond in protease specificity. Kinetic studies on small proline-containing peptides and on polyproline*. *Biochemistry*, 1979. **18**(23): p. 5037–42.
 151. Lin, L.N. and J.F. Brandts, *Kinetic mechanism for conformational transitions between poly-L-prolines I and II: a study utilizing the cis-trans specificity of a proline-specific protease*. *Biochemistry*, 1980. **19**(13): p. 3055–9.
 152. Asher, S.A., A.V. Mikhonin, and S. Bykov, *UV Raman demonstrates that alpha-helical polyalanine peptides melt to polyproline II conformations*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. **126**(27): p. 8433–8440.
 153. Kentsis, A., et al., *Unfolded state of polyalanine is a segmented polyproline II helix*. *Proteins*, 2004. **55**(3): p. 493–501.
 154. Mezei, M., et al., *Polyproline II helix is the preferred conformation for unfolded polyalanine in water*. *Proteins*, 2004. **55**(3): p. 502–507.
 155. Whittington, S.J., et al., *Urea promotes polyproline II helix formation: implications for protein denatured states*. *Biochemistry*, 2005. **44**(16): p. 6269–75.
 156. Liu, Z., et al., *Solvent dependence of PII conformation in model alanine peptides*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(46): p. 15141–50.
 157. Tiffany, M.L. and S. Krimm, *New chain conformations of poly(glutamic acid) and polylysine*. *Biopolymers*, 1968. **6**(9): p. 1379–82.
 158. Tiffany, M.L., *A circular dichroism study of charged polypeptides interaction with salts*. *Physiol Chem Phys*, 1975. **7**(3): p. 191–207.
 159. M. Lois Tiffany, S.K., *Extended conformations of polypeptides and proteins in urea and guanidine hydrochloride*. *Biopolymers*, 1973. **12**(3): p. 575–587.
 160. Creamer, T.P., *Left-handed polyproline II helix formation is (very) locally driven*. *Proteins*, 1998. **33**(2): p. 218–26.
 161. Traub, W. and K.A. Piez, *The chemistry and structure of collagen*. *Adv Protein Chem*, 1971. **25**: p. 243–352.
 162. Crick, F.H. and A. Rich, *Structure of polyglycine II*. *Nature*, 1955. **176**(4486): p. 780–1.
 163. Ramachandran, G.N. and G. Kartha, *Structure of collagen*. *Nature*, 1955. **176**(4482): p. 593–5.
-

164. Bella, J., et al., *Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution*. Science, 1994. **266**(5182): p. 75–81.
 165. Holmgren, S.K., et al., *Code for collagen's stability deciphered*. Nature, 1998. **392**(6677): p. 666–667.
 166. Jenkins, C.L. and R.T. Raines, *Insights on the conformational stability of collagen*. Nat Prod Rep, 2002. **19**(1): p. 49–59.
 167. Bella, J., B. Brodsky, and H.M. Berman, *Hydration structure of a collagen peptide*. Structure, 1995. **3**(9): p. 893–906.
 168. Chakrabarti, P. and D. Pal, *The interrelationships of side-chain and main-chain conformations in proteins*. Prog. Biophys. Mol. Biol., 2001. **76**(1–2): p. 1–102.
 169. Taylor, C.M., R. Hardre, and P.J. Edwards, *The impact of pyrrolidine hydroxylation on the conformation of proline-containing peptides*. J. Org. Chem., 2005. **70**(4): p. 1306–1315.
 170. Shamala, N., R. Nagaraj, and P. Balaram, *The crystal and molecular structure of the amino terminal tetrapeptide of alamethicin. A novel 310 helical conformation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977. **79**(1): p. 292–298.
 171. Weinhold, F., *Chemistry. A new twist on molecular shape*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 539–541.
 172. Bretscher, L.E., et al., *Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect*. J. Am. Chem. Soc., 2001. **123**(4): p. 777–778.
 173. Renner, C., et al., *Fluoroprolines as Tools for Protein Design and Engineering*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2001. **40**(5): p. 923–925.
 174. Panasik, N., Jr., et al., *Inductive effects on the structure of proline residues*. Int. J. Pept. Protein Res., 1994. **44**(3): p. 262–9.
 175. Eberhardt, E.S., N.J. Panasik, and R.T. Raines, *Inductive Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization: Implications for Collagen Folding and Stability*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**(49): p. 12261–12266.
 176. Wildemann, D., *Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Polypeptiden durch chemische Modifikationen und Enzymkatalyse*, in *Dissertation*. 2004, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
 177. Creighton, T.E., *Proteins. Structures and Molecular Properties* 2ed. 1993, New York: W.H. Freeman and Company.
 178. Taylor, R. and O. Kennard, *Hydrogen-bond geometry in organic crystals*. Acc. Chem. Res., 1984. **17**(9): p. 320–6.
 179. Ataka, S., et al., *Infrared studies of the cis form of N-methylthioacetamide in low-temperature matrixes*. J. Phys. Chem., 1984. **88**(3): p. 449–51.
 180. Frank, R., *Untersuchungen zur Synthese, den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der biologischen Aktivität von Thioxozeptiden*, in *Dissertation*. 1999, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
 181. DeRider, M.L., et al., *Collagen stability: insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations*. J. Am. Chem. Soc., 2002. **124**(11): p. 2497–505.
-

182. Walter, W. and W. Francke, *Bayer-Walter Lehrbuch der Organischen Chemie*. Vol. 23. 1998, Stuttgart: Hirzel Verlag.
 183. Vollhardt, C. and K. Peter, *Organische Chemie*. 1990, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
 184. Fuller, W., *Hydrogen Bond Lengths and Angles Observed in Crystals*. J. Phys. Chem., 1959. **63**(10): p. 1705–1717.
 185. Janowski, B., *Charakterisierung der Wechselwirkung von Cyclophilin 18 mit niedermolekularen Liganden*. Dissertationsschrift, 1997.
 186. Janowski, B., et al., *A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates*. Anal Biochem, 1997. **252**(2): p. 299–307.
 187. Schubert, M., et al., *A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ¹³C chemical shift statistics*. J Biomol NMR, 2002. **24**(2): p. 149–54.
 188. Sarkar, S.K., et al., *Detection of cis and trans X-Pro peptide bonds in proteins by ¹³C NMR: application to collagen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(15): p. 4800–3.
 189. McGAVIN, P.M.C.S., *Structure of Poly-L-Proline*. Nature, 1955. **176**: p. 501–3.
 190. Smith, A.L., *Applied Infrared Spectroscopy*. Chemical Analysis, ed. P.J. Elving, J.D. Winefordner, and I.M. Kolthoff. Vol. 54. 1979, New York / Chichester / Brisbane / Toronto: John Wiley & Sons.
 191. Barth, A. and C. Zscherp, *What vibrations tell us about proteins*. Q Rev Biophys, 2002. **35**(4): p. 369–430.
 192. Scheiner, S., *Calculation of isotope effects from first principles*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1458**(1): p. 28–42.
 193. Wade, D., *Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules*. Chem Biol Interact, 1999. **117**(3): p. 191–217.
 194. Krantz, B.A., et al., *D/H amide kinetic isotope effects reveal when hydrogen bonds form during protein folding*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(1): p. 62–71.
 195. Makhatadze, G.I. and P.L. Privalov, *Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study*. J Mol Biol, 1992. **226**(2): p. 491–505.
 196. Sul, S., et al., *Conformations of N-acetyl-L-prolinamide by two-dimensional infrared spectroscopy*. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys, 2006. **110**(40): p. 19891–905.
 197. Mastle, W., et al., *Conformational study of linear alternating and mixed D- and L-proline oligomers using electronic and vibrational CD and Fourier transform IR*. Biopolymers, 1995. **36**(5): p. 623–31.
-

6 Anhang

Tabelle 5.1: Chemische Verschiebungen der C_{α} -Protonen Kopplungen von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂. Das TOCSY-Spektrum wurde mit einer Spinlogzeit von 80 ms in D₂O bei 25°C über 24 h aufgenommen. Das Peptid lag dabei in einer Konzentration von ca. 4 mM in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 vor.

TOCSY Kopplungen der C_{α} -Protonen von H-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ in D ₂ O (Angaben in ppm)				
konformerspezifische Kopplungen Prolin 1		konformerspezifische Kopplungen Prolin 2		Protonen
<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	
4.81	4.32	4.93	4.87	α
2.16/2.12	2.18/2.12	2.16	2.11/1.98	β
2.69/1.91	2.63/1.95	2.46/2.12	2.56/2.36	γ
3.58/3.45	3.62/3.42	4.01/3.82	4.06/3.84	δ
chemische Verschiebung der N-terminalen- und der Amidprotonen in D ₂ O (Angaben in ppm)				
N-Terminus			Amidgruppe	
9.35	8.52 (Proton in Wasserstoffbrücke zum Schwefel der Thioxopeptidbindung)		7.69/7.38	

Tabelle 5.2: Chemische Verschiebungen der C_{α} -Protonen Kopplungen von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH₂. Das TOCSY-Spektrum wurde mit einer Spinlogzeit von 80 ms in deuteriertem Isopropanol (D8) bei 25°C über 24 h aufgenommen. Das Peptid lag dabei in einer Konzentration von ca. 4 mM in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 vor.

TOCSY Kopplungen der C_{α} -Protonen von Ac-Pro- ψ [CS-N]-Pro-NH ₂ in Isopropanol (D8) (Angaben in ppm)								
konformerspezifische Kopplungen Prolin 1				konformerspezifische Kopplungen Prolin 2				Protonen
tt	ct	cc	tc	tt	ct	cc	tc	
4.89	4.91	4.50	4.66	4.96	5.0	4.69	4.58	α
2.16/1.98	2.33/2.07	2.41/1.82	2.30/1.76	2.16	2.00	2.16/1.99	2.44/2.10	β
2.26/1.86	1.73	2.06/1.79	2.21/1.90	1.98	2.19	2.36	1.92/1.79	γ
3.69/3.49	3.59/3.45	3.61/3.45	3.69/3.56	3.35/3.73	3.87/3.70	3.98/3.73	3.79/3.76	δ
Konformerspezifische chemische Verschiebung der Acetylprotonen und der Amidgruppe in Isopropanol (D8)								
Acetylrest				Amidgruppe				
tt/tc		ct	cc	<i>trans</i>		<i>cis</i>		
1.95		1.81	1.70	7.61/6.56		7.64/6.62		

Tabelle 5.3: Chemische Verschiebungen der C_α-Protonen Kopplungen von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH₂ in deuteriertem Tetrahydrofuran. Das TOCSY-Spektrum wurde mit einer Spinlogzeit von 80 ms bei 25°C über 24 h aufgenommen. Das Peptid lag dabei in einer Konzentration von ca. 5.5 mM in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 vor.

TOCSY Kopplungen der C _α -Protonen von Ac-Pro-ψ[CS-N]-Pro-NH ₂ in deuteriertem Tetrahydrofuran (in ppm)									
konformerspezifische Kopplungen Prolin 1				konformerspezifische Kopplungen Prolin 2					
tt	ct	cc	tc	tt	ct	cc	tc	Protonen	
4.98	4.82	4.91	4.63	5.00	4.64	5.08	4.59	α	
2.15/1.99	2.29/1.82	2.33	2.35	2.14/2.05	2.63/2.01	2.13/2.09	2.35/2.10	β	
2.35/1.88	1.93	2.09/1.74	2.24	2.19/2.04	1.91/1.81	2.25	1.88/1.76	γ	
3.74/3.54	3.75/3.61	3.59/3.49	4.04	4.03/3.78	3.83/3.78	3.85	3.64/3.48	δ	
Konformerspezifische chemische Verschiebung der Acetylprotonen in deuteriertem Tetrahydrofuran (in ppm)									
Acetylrest									
tt		ct		cc		tc			
1.93		1.96		1.78		1.86			

Danksagung

Prof. Dr. G. Fischer möchte ich für die Möglichkeit danken, in der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung diese Arbeit anfertigen zu können. Im Besonderen möchte ich mich für die große Freiheit, mit der ich dieses Thema bearbeiten durfte, und das entgegengebrachte Interesse am Fortschritt der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Dirk Wildemann danke ich für die Festphasenpeptidsynthese, die vielen Ratschläge, Hilfen und Anregungen im Bezug auf die durchgeführten chemischen Arbeiten sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Christian Lücke danke ich für die sorgfältige Durchführung und bedachte Interpretation der NMR-spektroskopischen Messungen sowie der stetigen Bereitschaft meinen Fragen ausführlich und gewissenhaft zu beantworten.

Frau Dr. Schierhorn und Frau Gersching danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiver Zusammenarbeit. Dabei danke ich besonders Alexandra Thiele, Sebastian Daum, Jörg Fanghänel, Thilo Kamphausen und Thobias Aumüller für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und allgegenwärtige Unterstützung im Laboralltag.

Frau Hella Kleemens, Frau Birgit Hökelmann, Frau Karin Jentzsch, Frau Ilona Kunze und Frau Suzanne Ross danke ich für ihre Bemühungen meine Arbeiten zu unterstützen, meinen Ordnungssinn zu verbessern, für ihre Geduld und für den humorvollen Umgang mit meiner Person.

Herrn Prof. Mäntele danke ich für die Erlaubnis im Institut für Biophysik in Frankfurt Main IR-spektroskopische Messungen durchzuführen. Dabei danke allen Institutsmitarbeitern für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich Dr. Georg Wille und Dr. Karin Hauser für ihre Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten sowie ihrer Hilfe bei der Interpretation der Messdaten danken. Georg danke ich weiterhin für die Unterbringung in seinem Gästezimmer!

Besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Familie dafür danken, dass sie mich immer unterstützt und ermutigt haben meine Ziele zu verwirklichen.

Weiterhin bedanke ich mich bei all meinen Freunden für die schöne Zeit hier in Halle.

Publikationsliste

1. Dugave C. , I.K., M. Zimmer, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, U. Röhrig, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, C. Dugave, S. Wawra, G. Fischer, G. Fischer, M. Mutter, L. Moroder, C. Dugave, M. Gondry, C. Dugave, A. A. Batista, *cis-trans Isomerization in Biochemistry*, ed. C. edited by Dugave. 2006, Weinheim: WILEY-VCH.
 2. Fanghanel, J., et al., *Isothermal calorimetry as a tool to investigate slow conformational changes in proteins and peptides*. *Anal Chem*, 2006. **78**(13): p. 4517-23.
 3. Fischer, G. and S. Wawra, *Polypeptide binding proteins: what remains to be discovered?* *Mol Microbiol*, 2006. **61**(6): p. 1388-96.
-

Lebenslauf

Zur Person

Stephan Wawra

Geboren am 14.05.1977 in Halle/Saale

ledig

Ausbildung

- 8/1983–1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Hans Beimler“ in Könnern
- 9/1991–1995 Besuch des „Elisabeth Gymnasiums“ in Halle/Saale
- 1995 Abschluss Abitur
- 9/1995 Aufnahme des Studiums der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 9/1996–7/1997 Krankheitsbedingte Unterbrechung des Studiums
- 8/1997–9/1998 Zivildienst an der Montessori-Schule in Halle
- 10/1998–2002 Wiederaufnahme des Biochemiestudiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit zum Thema „Klonierung und Expression des humanen FKBP24 und des humanen FKBP26“ an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Abschluss: Diplom Biochemiker (Prädikat: „Sehr Gut“)
- 10/2002–4/2007 Promotion an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung zum Thema „Die Auswirkung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen auf die Polyprolin II Sekundärstruktur
- 5/2007– wissenschaftlicher Mitarbeiter am *Institute of Medical Science* an der Universität Aberdeen, Großbritannien
-

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, April 2007

Stephan Wawra
