

- 9305–9308; c) H. Weirer, J. Blum, Y. Sasson, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4481–4486.
- [6] Ein interessanter Ansatz zur Multipolymerkatalyse unter Verwendung löslicher Polymere: K. D. Janda, H. Han, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1835–1837, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1731–1733.
- [7] a) Y. Okude, S. Hirano, T. Hiyama, H. Nozaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3179–3181; b) T. Hiyama, Y. Okude, K. Kimura, H. Nozaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, 55, 561–568; c) K. Takai, K. Kimura, T. Kuroda, T. Hiyama, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5281–5284.
- [8] a) K. Takai, K. Nitta, K. Utimoto, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5263–5266; b) O. Fujimura, K. Takai, K. Utimoto, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1705–1706; c) K. Takai, Y. Kataoka, K. Utimoto, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4389–4392.
- [9] a) A. Fürstner, N. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12349–12357; b) A. Fürstner, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 567–570; c) R. K. Boeckman, Jr., R. A. Hudack, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3524–3525.
- [10] Das Konzept des Transfers einer äquimolaren Menge eines reaktiven Zwischenprodukts zwischen zwei Festphasen wurde von Rebek et al. für eine mechanistische Untersuchung genutzt: J. Rebek, Jr., F. Gaviña, C. Navarro, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 8113–8117.

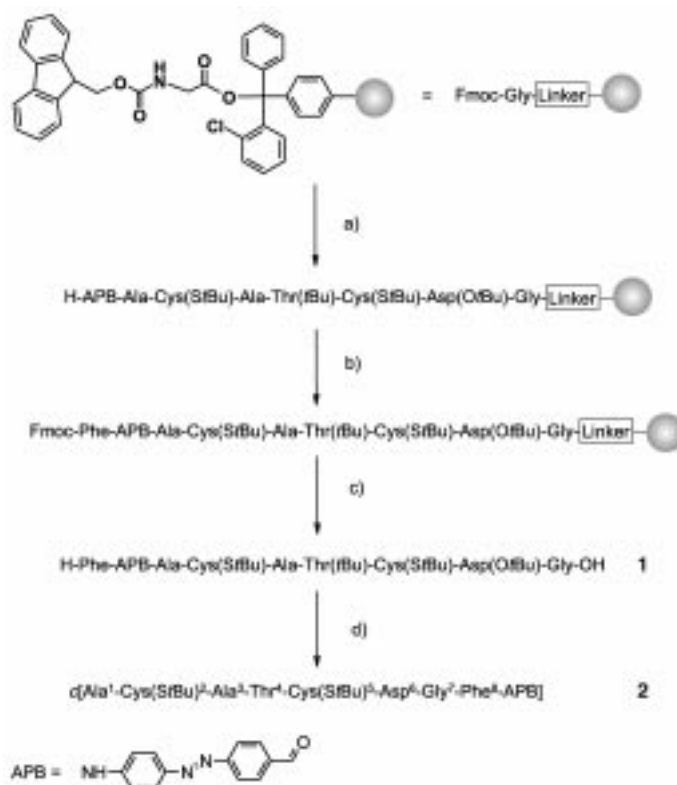
Photomodulierung der Konformation cyclischer Peptide mit Azobenzol-Bausteinen im Peptidrückgrat**

Raymond Behrendt, Christian Renner,
Michaela Schenk, Fengqi Wang, Josef Wachtveitl,
Dieter Oesterheld und Luis Moroder*

Zur Photomodulierung konformativer, physikalisch-chemischer und biologischer Eigenschaften von Peptiden, Proteinen und Phospholipiden wird vielfach die *cis/trans*-Isomerisierung von Azobenzolderivaten genutzt. Der Azobenzol-Baustein wird dazu in spezifische Positionen solcher Naturstoffe oder verwandter Modellsysteme eingeführt.^[1, 2] Da eine lichtinduzierte Isomerisierung der Azobenzoleinheit mit signifikanten Veränderungen in der Geometrie und Polarität des Chromophors einhergeht,^[3] ist dieser auch gut geeignet, gezielte topochemische Änderungen in konformativ stärker eingeschränkten, kleinen Systemen zu induzieren.^[4–10] Niedermolekulare cyclische Peptide wurden wegen ihrer starren Strukturen vielfach zum Aufbau von Bibliotheken von Konformeren mit definierten Bioaktivitäten verwendet.^[11, 12] Daher ist zu erwarten, daß durch die Einführung eines Azobenzol-Bausteins in das Peptidrückgrat solcher cyclischer Peptide die Effizienz dieses „Lichtschalters“ zur Induktion von Konformationsübergängen untersucht werden kann. Wir konnten nun ein sehr starres, konformativ eingeschränktes cyclisches

Peptid mit dem ω -Aminosäurerest 4-(4-Aminophenyl-azo)benzoyl (APB) in der *trans*-Konfiguration herstellen, das nach der Bestrahlung als *cis*-Isomer in einen überwiegend freien Konformationsraum relaxiert.

Der Abstand der beiden *para*-Kohlenstoffatome der Azobenzoleinheit beträgt in der *trans*-Konfiguration 9 Å und in der *cis*-Konfiguration 5.5 Å. Um diese Strukturänderung optimal auf Peptidrückgrate zu übertragen, wurde zunächst H-APB-OH nach bekannten Methoden^[13] synthetisiert und in seinen photochemischen Eigenschaften vollständig charakterisiert.^[14, 15] Anschließend wurde dieser Baustein in ein Octapeptid mit der Sequenz des aktiven Zentrums der Thioedoxin-Reduktase eingebaut (Schema 1). Wegen der



Schema 1. Synthese von **1** und **2**: a) Die Kupplungen erfolgten mit HBTU/HOBt/DIEA (1/1/2), nur bei Fmoc-Cys(SiBu)-OH wurde HBTU/HOBt/DIEA (1/1/1.2) eingesetzt; H-APB-OH wurde ohne Amino-Schutz eingebaut; Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin in NMP; b) DIEA, CH₃CON(SiMe₃)₂; Fmoc-Phe-F; c) 20 % Piperidin in NMP; CH₂Cl₂/Trifluoethanol/AcOH/Triethylsilan (8/1/1/0.15); d) PyBOP/HOBt/DIEA (1/1/2); Trifluoressigsäure/CH₂Cl₂/Triethylsilan (95/3.5/1.5). – HBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DIEA = Ethyldiisopropylamin, NMP = *N*-Methylpyrrolidon, PyBOP = Benzotriazolyl-1-oxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat.

geringen Nucleophilie seiner *para*-Aminogruppe mußte H-APB-OH bei der Acylierung des am Harz gebundenen Peptids nicht weiter geschützt werden. Allerdings führte die geringe Nucleophilie auch zu Schwierigkeiten bei der darauffolgenden Acylierung der Aminogruppe. Diese konnten durch Silylierung überwunden werden, wobei dann allerdings zur Peptidkettenverlängerung die Aminosäurefluorid-Methode eingesetzt werden mußte. Schließlich führte die saure Abspaltung vom Harz unter milden Bedingungen zum linearen,

[*] Prof. Dr. L. Moroder, Dipl.-Chem. R. Behrendt, Dr. C. Renner, Dr. M. Schenk, Dr. F. Wang, Prof. Dr. D. Oesterheld
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18A, D-82152 Martinsried
Fax: (+49) 89-8578-2847
E-mail: moroder@biochem.mpg.de
Dr. J. Wachtveitl
Institut für Medizinische Optik der Universität
Oettingenstraße 67, D-80538 München

[**] Diese Arbeit wurde vom Sonderforschungsbereich SFB 533 (TPA8, Moroder/Oesterheld) gefördert.

seitenkettengeschützten Pseudo-Nonapeptid **1**, das unter Verwendung von PyBOP/HOBt/DIEA cyclisiert wurde. Die abschließende saure Entschützung ergab das gewünschte cyclo(Ala-Cys(SrBu)-Ala-Thr-Cys(SrBu)-Asp-Gly-Phe-APB) **2**.

Die Peptide **1** und **2** wurden spektroskopisch charakterisiert (Tabelle 1). Verglichen mit H-APB-OH [$\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$

Tabelle 1. Spektroskopische Parameter von **1** und **2** in DMSO. Die Extinktionskoeffizienten ($\text{M}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$) wurden aus zwei Isomerengemischen berechnet, wobei die unterschiedlichen *cis/trans*-Isomerenverhältnisse quantitativ $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch ermittelt wurden.

Verbindung	Konfiguration der Azobenzoleinheit	$\pi-\pi^*$		$n-\pi^*$	
		$\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$	$\epsilon \times 10^{-4}$	$\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$	$\epsilon \times 10^{-3}$
1	<i>trans</i>	370	2.0	450	4.7
1	<i>cis</i>	260	1.3	450	5.2
2	<i>trans</i>	370	3.4	450	2.8
2	<i>cis</i>	260	2.4	450	3.6

($\pi-\pi^*$) und 440 nm ($n-\pi^*$)]^[14] sind die $\pi-\pi^*$ -Übergänge sowohl im linearen als auch im cyclischen Peptid erheblich blauverschoben, während die $n-\pi^*$ -Übergänge bei annähernd unveränderter Wellenlänge lokalisiert sind. Die spektroskopische Verfolgung der *cis/trans*-Photoisomerisierung durch Einstrahlen von Licht der Wellenlänge 360 nm bzw. 450 nm ergab für beide Peptide zwei isosbestische Punkte bei jeweils 330 und 440 nm , die auf eine Photoreaktion erster Ordnung hinweisen. Das Spektrum von **2** ist in Abbildung 1 wieder-

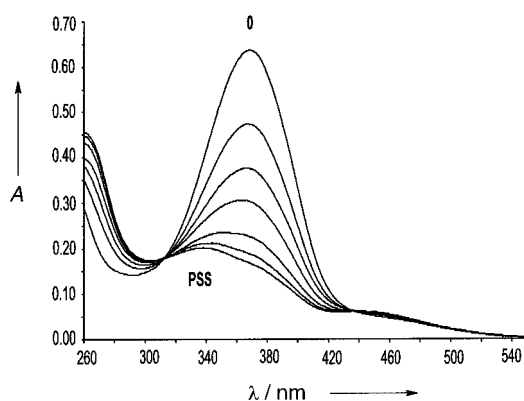


Abbildung 1. Absorptionsspektren von **2** in DMSO (Konzentration 10^{-5} M , $T = 25^\circ \text{C}$) vor der Belichtung (0) und nach der Belichtung (360 nm) mit einer Lichtintensität von 0.5 mW cm^{-2} für 0.1, 0.25, 0.5, 0.6, 1 und 4 min. Die quantitative Auswertung der zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ergab, daß der Grundzustand zu nahezu 100% *trans*-konfiguriert ist und daß im photostationären Zustand (PSS) das *cis/trans*-Isomerenverhältnis etwa 78:22 beträgt; die Ungenauigkeit ist ± 2 bis ± 3 .

gegeben. Die thermischen Isomerisierungsgeschwindigkeiten der beiden Peptide deuten darauf hin, daß die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung durch das Peptidrückgrat im cyclischen Peptid **2** stärker behindert ist als im linearen Peptid **1** (Tabelle 2). Der Unterschied der Aktivierungsenergien von 24 kJ mol^{-1} entspricht der Erhöhung der Energiebarriere des *cis* \rightarrow *trans*-Übergangs durch die Einschränkung des Konformationsraums in **2**. Die thermische Isomerisierung beider Peptide bei 22°C ist merklich langsamer als die des freien Azobenzolderivats H-APB-OH, bei dem dieser Prozeß nach ungefähr

Tabelle 2. $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch ermittelte Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{et} der thermischen *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung von **1** und **2** in DMSO bei mehreren Temperaturen (Peptidkonzentration $3 \times 10^{-3} \text{ M}$). Die Aktivierungsenergie E_{a} wurde aus Arrhenius-Plots abgeleitet; die Fehlergrenze beträgt $\pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Verbindung	$k_{\text{et}} [\text{h}^{-1}]$					$E_{\text{a}} [\text{kJ mol}^{-1}]$
	22°C	30°C	40°C	45°C	50°C	
1	0.057	0.16	0.57	0.91	1.6	96
2	0.011	0.042	0.20	0.38	0.72	120

10 min abgeschlossen ist. Die langsame thermische Relaxierung von **2** ($t_{1/2} = 62 \text{ h}$ bei 22°C) ermöglichte eine Konformationsanalyse am *cis*-Isomer mittels $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten.

Das Octapeptid-Fragment des aktiven Zentrums der Thio-redoxin-Reduktase, H-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe-OH, weist in der oxidierten Form die gleiche 3_{10} -Helixschleife auf, die auch im intakten Enzym vorliegt.^[16] Dies deutet auf eine hohe Tendenz der Teilsequenz Ala-Thr-Cys-Asp zur Schleifen-Konformation hin.^[17] Hauptziel unserer Arbeit war das Auffinden eines photoschaltbaren Zwei-Zustände-Systems mit einem Übergang von einer starren in eine flexible Peptidkonformation. Deshalb wählten wir dieses Bis(cysteinyl)-Peptid, das, falls notwendig, eine zusätzliche konformative Restriktion über Disulfidverbrückung zur bicyclischen Verbindung erlaubt. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, ist

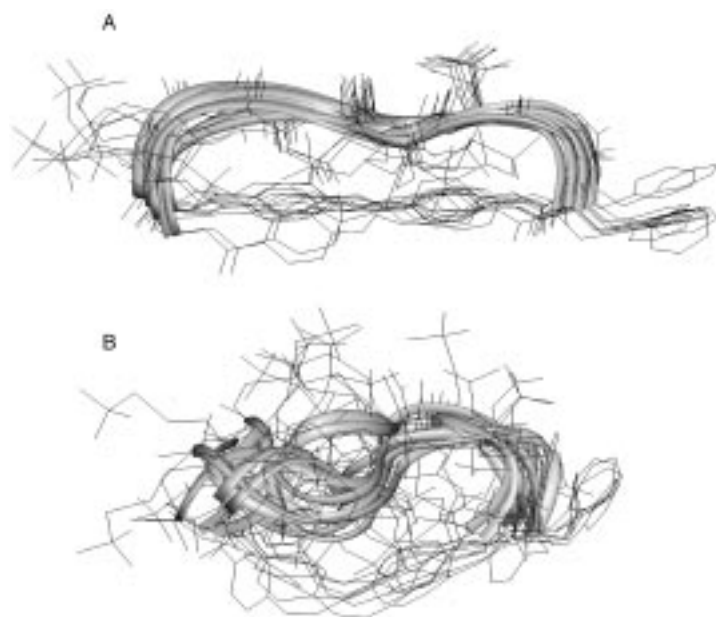


Abbildung 2. Darstellung der zehn energieärmsten Strukturen von cyclo(Ala-Cys(SrBu)-Ala-Thr-Cys(SrBu)-Asp-Gly-Phe-APB-) **2** in der *trans*- (A) und *cis*-Konfiguration (B).

bereits das monocyclische Peptid mit *trans*-konfigurierter Azobenzoleinheit in seinem Konformationsraum sehr stark eingeschränkt. Die Azobenzoleinheit ist planar, und das Peptidrückgrat liegt weitgehend gestreckt und starr vor, wobei nur der Rest 5 die typischen Diederwinkel einer α -Helix aufweist. Während im *trans*-Isomer primär ein Flip-Flop der Azobenzoleinheit um 180° beobachtet wird, ist die freie Rotation der beiden Benzolringe im *cis*-Isomer durch

gegenseitige Hinderung und durch sterische Effekte des Peptidgerüsts eingeschränkt. Sogar das Peptidrückgrat relaxiert im *cis*-Isomer in einen signifikant weniger stark eingeschränkten Konformationsraum (Abbildung 2B). Im C-terminalen Sequenzbereich ist eine γ -Schleife um Gly-7 häufig populierte, die aber in einer mit dem Rest des Peptids unkonzentrierten Weise fluktuiert. Der übrige Teil des Peptids wölbt sich in einer lockeren Schleifenstruktur mit einem stark 3_{10} -helicalen Rest in Position 4 und schwächer helicalen Ala-3- und Cys-5-Resten, was wiederum die inhärente Tendenz dieses Peptidteils reflektiert, geordnete Strukturen zu bilden. Daraus resultiert für das *cis*-Isomer ein frustriertes System, das aus einer Ansammlung energetisch entarteter Zustände besteht. Der N-Terminus des Peptidteils bildet schließlich eine kurze Schleife zum Azobenzol-Baustein.

Mit 4-(4-(Aminomethyl)phenylazo)benzoesäure als Baustein in einem cyclischen Octapeptid, wie früher von Ulysse et al. vorgeschlagen,^[9] führt die *cis* \rightleftharpoons *trans*-Photoisomerisierung zwar auch zu Konformationsübergängen, doch diese sind weitaus weniger stark ausgeprägt. Es entstehen bereits bei *trans*-konfigurierter Azobenzoleinheit unter identischen Bedingungen zwei durch NMR-Konformationsanalyse ermittelte Konformationen im Verhältnis 3:1. Mit dem Chromophor APB als „Lichtschalter“ dagegen entstand ein Peptidtemplat, dessen Photoisomerisierung als Zwei-Zustände-Übergang verläuft. Es ist deswegen ein vielversprechendes System für spektroskopische Analysen dieses Konformationsübergangs auf verschiedenen Zeitskalen, auch aufgrund der hohen Quantenausbeuten ($\Phi_{ic} \approx 20\%$ und $\Phi_{ct} \approx 50\%$ für den $n\pi^*$ -Übergang).^[18] Entsprechend sollten sich mit diesem Templat biologische Eigenschaften peptidischer Rezeptorliganden ebenfalls photomodulieren lassen.

Experimentelles

1: Das lineare Peptid wurde nach der Fmoc/tBu-Chemie an einem Chlotrityl-Harz (PepChem, Tübingen) synthetisiert und von diesem mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Trifluoethanol}/\text{AcOH}/\text{Triethylsilan}$ abgespalten. HPLC (Nucleosil 300/C18 (Machery & Nagel, Düren), linearer Gradient Acetonitril/2proz. H_3PO_4 von 5/95 bis 80/20 in 30 min); $t_r = 28$ min; FAB-MS: m/z : 1320 $[(M+\text{Na})^+]$; $M_r = 1297.4$ ber. für $\text{C}_{60}\text{H}_{87}\text{N}_{11}\text{O}_{13}\text{S}_4$; Aminosäureanalyse (6M HCl; 110 °C; 24 h): Asp 1.00 (1) Thr 0.75 (1) Gly 1.00 (1) Ala 1.94 (2) Cys 1.64 (2) Phe 0.94 (1); Peptidgehalt: 95 %.

2: Das lineare Peptid **1** wurde mit PyBOP/HOBt/DIEA cyclisiert und mit Trifluoressigsäure/ CH_2Cl_2 /Triethylsilan geschützt. Das Rohprodukt wurde mit Ether gefällt und mit MeOH gewaschen. HPLC (Nucleosil 300/C18 (Machery & Nagel, Düren), linearer Gradient Acetonitril/2proz. H_3PO_4 von 5/95 bis 80/20 in 30 min); $t_r = 24.35$ min; ESI-MS: m/z : 1168.4 $[\text{MH}^+]$; $M_r = 1167.4$ ber. für $\text{C}_{52}\text{H}_{69}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}_4$; Aminosäureanalyse (6M HCl; 110 °C; 24 h): Asp 1.01 (1) Thr 0.85 (1) Gly 1.00 (1) Ala 1.96 (2) Cys 1.65 (2) Phe 0.99 (1); Peptidgehalt: 93 %.

Die UV-Spektren wurden bei einer Peptidkonzentration von 10^{-5} M in DMSO mit einem Lambda-19-Spektrometer (Perkin Elmer) aufgenommen. Zur Bestrahlung bei 360 nm (Filter Itos, Mainz) mit einer Lichtintensität von 0.5 mW cm^{-2} wurde eine 450-XBO-Xenonlampe (Osram, München) verwendet.

Die ^1H -NMR-Spektren (500.13 MHz, 295 K) wurden mit einem AMX-500-Spektrometer (Bruker), ausgestattet mit gepulsten Feldgradienten (PFG), aufgenommen. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach der Methode von Wüthrich.^[19] Die 2D-TOCSY-Spektren wurden mit einem Spinlock von 70 ms aufgenommen, wobei die MLEV-17-Sequenz zum isotropen Mischen verwendet wurde.^[20] Proton-Proton-Abstände (*trans*-azo: 44; *cis*-azo: 41) wurden mit Hilfe von 2D-NOESY-Experimenten^[21] mit Misch-

zeiten von 50 ms und 200 ms und ROESY-Experimenten mit einer Mischzeit von 100 ms bestimmt. Diederwinkel-Beschränkungen (*trans*-azo: 18; *cis*-azo: 12) wurden aus 2D-DQF-COSY^[22] und einfachen ^1H -1D-Spektren abgeleitet. Strukturberechnungen und Auswertungen wurden mit dem INSIGHT-II-Programm (Version 97.0) von MSI durchgeführt, wobei das Lösungsmittel DMSO mit einer relativen Dielektrizitätskonstante von 46.7 simuliert wurde. Die Strukturen wurden zunächst mit einem Distanz-Geometrie-Algorithmus erzeugt und anschließend mit einem kurzen Simulated-Annealing-MD-Protokoll verbessert. Die experimentell bestimmten Beschränkungen wurden in jedem Rechnungsschritt eingesetzt. Um die Stabilität der resultierenden Strukturen zu überprüfen, wurden freie Moleküldynamik-Simulationen über eine Zeitspanne von 1 ns für repräsentative Mitglieder der einzelnen Strukturfamilien durchgeführt. Keine der berechneten Strukturen zeigte signifikante Verletzungen der experimentellen Beschränkungen.

Eingegangen am 25. Februar 1999 [Z13081]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2771–2774

Stichwörter: Azoverbindungen • Festphasensynthesen • Iso-merisierungen • Konformationsanalyse • Peptide

- [1] I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 419–439; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 367–385.
- [2] I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 347–356.
- [3] H. Rau in *Studies in Organic Chemistry: Photochromism, Molecules and Systems*, Vol. 40 (Hrsg.: H. Dürr, H. Bonas-Laurent), Elsevier, Amsterdam, **1990**, S. 165–192.
- [4] H.-W. Losensky, H. Spelthann, A. Ehlen, F. Vögtle, J. Bargon, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1225–1227; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1189–1191.
- [5] K. H. Neumann, F. Vögtle, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 520–522.
- [6] M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1703–1706; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1598–1601.
- [7] T. Aoyagi, A. Ueno, M. Fukushima, T. Osa, *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, 19, 103–105.
- [8] T. Nagasaki, S. Tamagaki, K. Ogino, *Chem. Lett.* **1997**, 717–718.
- [9] L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8466–8467.
- [10] S. Rudolph-Böhner, M. Krüger, D. Oesterhelt, L. Moroder, T. Nägele, J. Wachtveitl, *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, 105, 235–248.
- [11] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8, 709–730.
- [12] H. R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1375–1389.
- [13] K. H. Schündehütte in *Houben-Weyl, Methoden Org. Chem.* **1965**, Vol. 10/3, S. 240.
- [14] J. Wachtveitl, T. Nägele, B. Puell, W. Zinth, M. Krüger, S. Rudolph-Böhner, D. Oesterhelt, L. Moroder, *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, 105, 283–288.
- [15] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 272, 489–495.
- [16] L. Moroder, D. Besse, H.-J. Musiol, S. Rudolph-Böhner, F. Siedler, *Biopolym. Pept. Sci.* **1996**, 40, 207–234.
- [17] J. Kuriyan, T. S. R. Krishna, L. Wong, B. Guenther, A. Pahler, C. H. Williams, Jr., P. Moldel, *Nature* **1991**, 352, 172–174.
- [18] J. Wachtveitl, T. Nägele, A. J. Wurzer, M. Schenk, L. Moroder in *Springer Series in Chemical Physics*, Vol. 63 (Hrsg.: T. Elsaesser, J. G. Fujimoto, D. A. Wiersma, W. Zinth), Springer, Stuttgart, **1998**, S. 609–611.
- [19] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [20] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355–360.
- [21] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachman, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546–4553.
- [22] M. Rance, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 117, 479–485.