

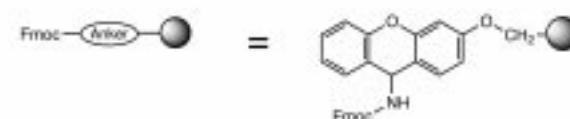
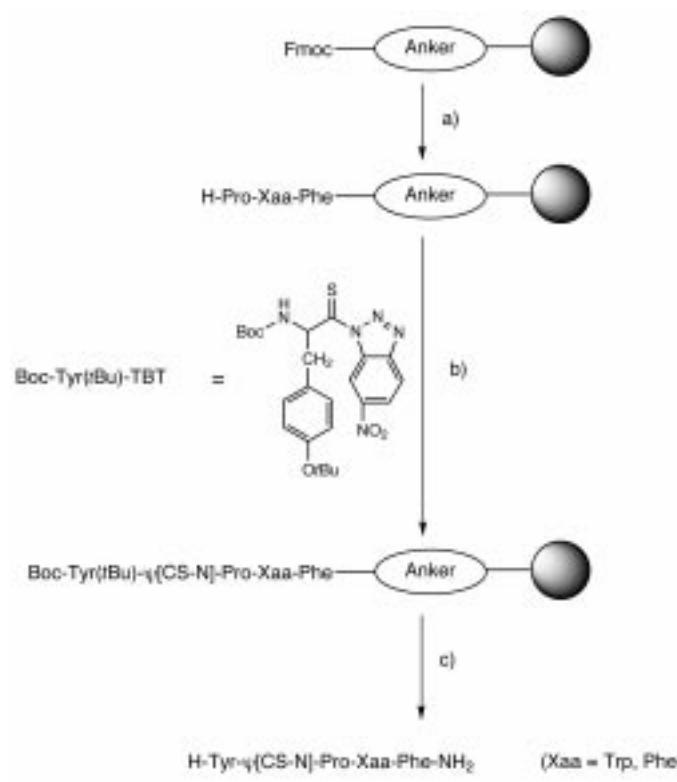
Ein-Atom-Substitution in Peptiden: Bildung eines photoschaltbaren Elements im Peptidrückgrat durch Thioxylierung**

Robert Frank, Mario Jakob, Frank Thunecke,
Gunter Fischer* und Mike Schutkowski

Die Thioxopeptidbindung $-CS-NR-$ ($R = H$, Alkyl) ist ein isosterer Ersatz der Peptidbindung, in dem die Elektronenverteilung im Grundzustand nur wenig beeinflusst ist.^[1] Trotzdem findet diese O/S-Substitution in Oligopeptiden Interesse wegen der erhöhten Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau^[2] sowie wegen der modulierten Aktivität und Selektivität biologisch aktiver Peptide.^[3] Prolin spielt als einzige cyclische der genkodierten Aminosäuren eine besondere Rolle für die Rückgratkonformation. Die Peptidyl-Prolyl-Bindungen liegen in den energetisch ähnlichen *cis*- und/oder *trans*-Konformationen vor und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ist durch Halbwertszeiten zwischen 10 und 100 s bei 298 K charakterisiert.^[4] Aufgrund dieser Eigenschaften werden biologische Effekte mit dem Phänomen der isomerspezifischen Wechselwirkung in Beziehung gebracht.^[5] Der Isomerenstatus der Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist somit eine empfindliche Sonde für die biologisch aktive Konformation, und das „Einfrieren“ der Dynamik dieser Peptidrückgratkonformation durch Thioxylierung^[2a,c, 6] ist hilfreich für die Analyse solcher Wechselwirkungen.

Hier soll über die Nutzung der Thioxopeptidbindung als Sonde für den Isomerenstatus und als photoschaltbares Element im Peptidrückgrat am Beispiel von Endomorphinen^[7] berichtet werden. Die thioxilierten Endomorphine Tyr- $\psi[CS-N] \text{-Pro-Trp-Phe-NH}_2$ **1** und Tyr- $\psi[CS-N] \text{-Pro-Phe-Phe-NH}_2$ **2** sind effektive μ -Rezeptor-Agonisten, die eine Affinität zum μ -Rezeptor aufweisen, welche derjenigen natürlicher Endomorphine ähnelt (unveröffentlichte Ergebnisse). Sie wurden durch Thioacylierung des harzgebundenen Tripeptids Pro-Xaa-Phe mit dem thioxilierten Tyrosyl-6-nitrobenzotriazolid Boc-Tyr(*t*Bu)-TNB^[8] synthetisiert (Boc = *t*BuOCO). Um die beschriebenen Schwierigkeiten bei der acidolytischen Entschützung von Thioxopeptiden^[9] zu umgehen, nutzten wir eine von uns entwickelte, milde Methode^[10] für die Abspaltung vom Harz und die gleichzeitige Entfernung der Tyrosin-Schutzgruppen in Anwesenheit von Thioxopeptidbindungen (Schema 1).

Die UV/Vis- und CD-Spektren der Peptide **1** und **2** in wässriger Lösung zeigen die charakteristische Absorptions-



Schema 1. Synthese der Peptide **1** und **2** am Sieber-Amid-Harz (Anker): a) 5 Äquiv. Fmoc-Aminosäure, Kupplungsbedingungen: TBTU/HOBt/DIEA (1/1/2) in NMP; Fmoc-Abspaltungen: 20 % Piperidin in NMP; b) 2 Äquiv. Boc-Tyr(*t*Bu)-TBT, 6 Äquiv. DIEA, 277 K, CH_2Cl_2 ; c) 2 M $SnCl_4$ in CH_3CN , CH_2Cl_2 , 1 h, 298 K, oder 2.2 M $ZnCl_2 \cdot Et_2O$, CH_2Cl_2 , 10 h, 298 K. Xaa = Trp (Peptid **1**), Phe (Peptid **2**). TBTU = *O*-(1-Benzotriazolyl)tetra-*N*-methyluronium; HOBt = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol; DIEA = Diisopropylethylamin; NMP = *N*-Methylpyrrolidon.

bande bzw. einen negativen Cotton-Effekt für den $^1\pi-^1\pi^*$ -Übergang der Thioxopeptidbindung (Abbildung 1 bzw. 2 sowie Tabelle 1). Für den $^1n-^3\pi^*$ -Übergang wird ein positiver Cotton-Effekt erhalten (Tabelle 1, Abbildung 2), der für die Konfiguration des Asymmetriezentrums in Nachbarschaft der Thioxoamidbindung charakteristisch ist.^[11] Die durch Anregung des $^1n-^3\pi^*$ -Übergangs mit einem N_2 -Laser bei 337 nm hervorgerufene *cis/trans*-Photoisomerisierung der Tyr- $\psi[CS-N] \text{-Pro}$ -Bindung (Abbildung 3) weist für beide Thioxopeptide einen isosbestischen Punkt bei 251 nm auf, der auf eine einheitliche Umwandlung hindeutet (für **2** in Abbildung 1 gezeigt). An thioxilierten Oligopeptiden, die keine aromatischen Aminosäuren enthalten, konnte durch Anregung des $^1\pi-^1\pi^*$ -Übergangs bei 272 nm ebenfalls *cis/trans*-Photoisomerisierung nachgewiesen werden. Die in Abbildung 1 gezeigte Isomerisierung ist reversibel und verläuft ohne Photozerstörung. Selbst nach vier Bestrahlungs-/Äquilibrierungs-Cyclen wird das Ausgangsspektrum des Thioxopeptids erhalten. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der

[*] Prof. Dr. G. Fischer, R. Frank, Dr. M. Jakob, Dr. F. Thunecke, Dr. M. Schutkowski
Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft
Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale (Deutschland)
Fax: (+49) 345-5511972
E-mail: fischer@enzyme-halle.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Fi 455/1-3), vom Fond der Chemischen Industrie, von der Boehringer-Ingelheim-Stiftung und vom Land Sachsen-Anhalt (Habilitationsscholarship für FT.) gefördert. Wir danken Herrn Dr. Peter Bayer für die NMR-Untersuchungen und Herrn Dipl.-Biochem. Dirk Willemann für die Hilfe bei der Peptidsynthese.

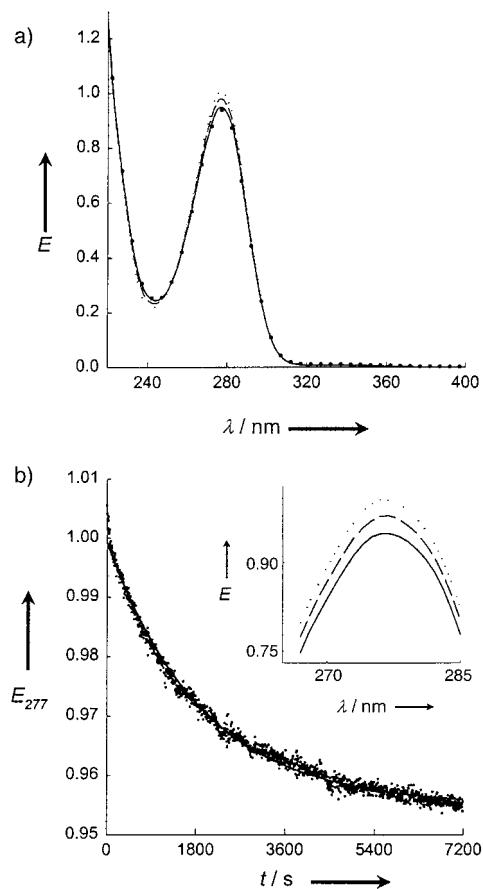


Abbildung 1. a) UV/Vis-Absorptionsspektren des Peptids **2** in 0.01M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4), 7×10^{-5} M, 313 K. Äquilierte Probe vor der Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 337 nm (—), Probe direkt nach 30 min Bestrahlung (···), Probe 40 min nach der Bestrahlung (---), Probe nach vier Bestrahlungs-/Äquilibrierungs-Cyclen (····). Quantitative Auswertung der ^1H -NMR-Spektren unter gleichen Bedingungen ergab für den Grundzustand einen *cis*-Gehalt von 21 % und für das Photoprodukt eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes auf 58 %. b) Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids **2**: 0.01M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4), 7×10^{-5} M, 313 K. Die bei 277 nm gemessene Änderung der Extinktion folgt einer Reaktion erster Ordnung mit einer beobachteten Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = (5.23 \pm 0.03) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Einschub: vergrößerter Bereich der UV/Vis-Absorptionsspektren von 265 bis 285 nm.

Bestrahlung des sekundären Thioxoamids *N*-Methylthioacetamid mit UV- oder Laserlicht verschiedener Wellenlängen.^[12] Die Autoren konnten Raman- und UV-spektroskopisch nachweisen, dass die Quantenausbeute für die *cis/trans*-Photoisomerisierung der für die Photozersetzung ähnelt.^[12c] Damit scheint diese Modifikation nicht als Sonde für die *cis/trans*-Photoisomerisierung sekundärer, „normaler“ Peptidbindungen geeignet zu sein. Jedoch ist die thioxylierte tertiäre Peptidbindung (Thioxoprolylbinding) gut als photoschaltbares Element im Peptidrückgrat verwendbar (Abbildung 3). Die Wiedereinstellung des Gleichgewichtes nach der Bestrahlung folgt einer Reaktion erster Ordnung mit $k_{\text{obs}} = k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} + k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$. Die temperatur- und zeitabhängige Analyse dieser Reaktion bei 277 nm ermöglicht die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierung (Abbildung 1). Die *cis/trans*-Isomerisierung der Tyr- ψ [CS-N]-Pro-Bindung in **2** ist 245-mal langsamer als die der nativen Tyr-Pro-Bindung. Somit ist die Trennung der *cis/trans*-Thio-

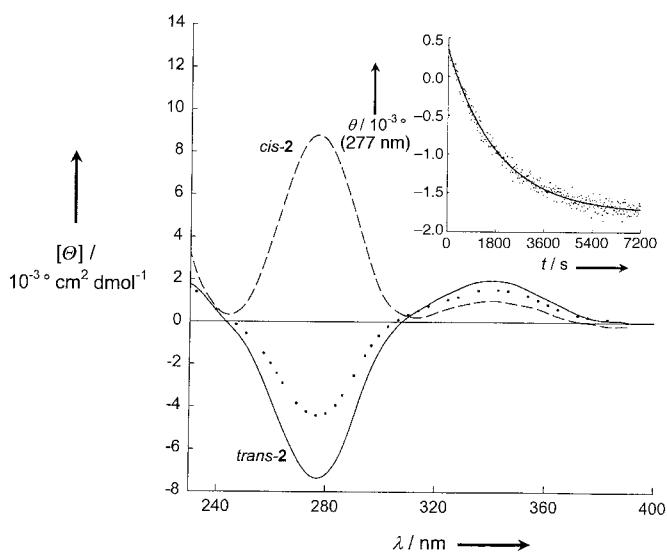


Abbildung 2. CD-Spektren der reinen *cis/trans*-Isomere des Peptids **2** und der äquilibrierten Lösung in 0.01M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4), 2×10^{-4} M, 313 K; äquilierte Probe (····), *trans*-**2** (—) und *cis*-**2** (---). Einschub: Zeitabhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids **2**: 0.01M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4), 2×10^{-4} M, 313 K. Die bei 277 nm gemessene Änderung der Elliptizität folgt einer Reaktion erster Ordnung mit $k_{\text{obs}} = (5.38 \pm 0.02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Tabelle 1. UV/Vis- und CD-spektroskopische Parameter der Thioxopeptidbindung der reinen *cis/trans*-Isomere des Peptids **2** in 0.01M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) bei 277 K.

Isomer	UV/Vis		CD	
	λ [nm] ${}^1\pi-{}^1\pi^*$	$(\epsilon [\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}])$ ${}^1\text{n}-{}^3\pi^*$	λ [nm] ${}^1\pi-{}^1\pi^*$	$(\theta [\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}])$ ${}^1\text{n}-{}^3\pi^*$
<i>trans</i> - 2	277 (13780)	335 (104)	277 (-7366)	341 (1962)
<i>cis</i> - 2	276 (15153)	334 (122)	277 (8988)	340 (1219)

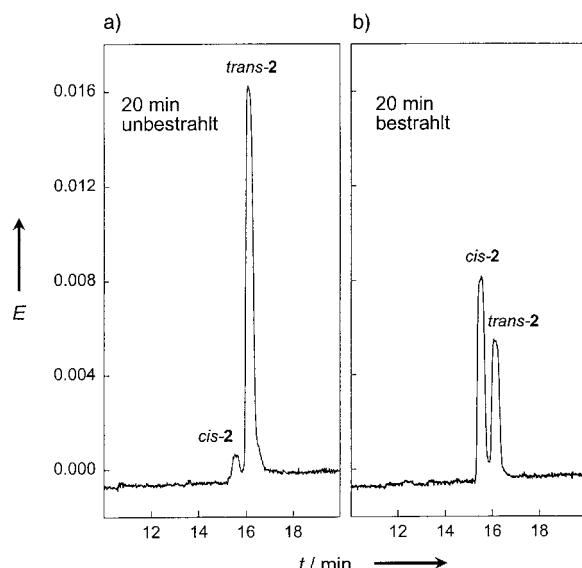


Abbildung 3. a) Elektropherogramm von *trans*-**2** 20 min nach Aulösen in 0.05M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) bei 298 K. b) Elektropherogramm von *trans*-**2** nach 20 min Bestrahlung mit einem N₂-Laser (Wellenlänge 337 nm, Pulsbreite 500 ps, Pulsfrequenz 30 Hz, 400 μJ pro Puls, 298 K). CE-Bedingungen: 0.05M Natriumphosphatpuffer (pH 2.5), 285 K, Quarz-Kapillare: 60 cm × 50 μm , 30 kV, UV-Detektion bei 200 nm.

xoprolylbindungskonformere per HPLC prinzipiell möglich. Bisher wurden *cis/trans*-Thioxoprolylbindungskonformere nur im analytischen Maßstab durch Kapillarzonen-Elektrophorese (CE) getrennt.^[13] Uns ist es gelungen, **cis-1**, **trans-1**, **cis-2** und **trans-2** im präparativen Maßstab durch Umkehrphasen-HPLC zu isolieren. Die gefriergetrockneten Konformere sind bei 253 K mehr als vier Wochen stabil. In den CD-Spektren zeigt sich eine erhebliche Isomerspezifität des Cotton-Effektes für den $^1\pi-^1\pi^*$ -Übergang (Abbildung 2), die wir für kinetische Untersuchungen der *cis/trans*-Isomerisierung nutzten. Bei 313 K erhielten wir für die Summe der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten einen Wert von $5.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 2), der gut mit den unter identischen Bedingungen gemessenen Werten von $5.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ aus den UV-spektroskopischen Messungen (Abbildung 1) und von $5.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ aus $^1\text{H-NMR}$ -pH-Sprung-Experimenten übereinstimmt. Aus den Ergebnissen der CE-Messungen wurden die Quantenausbeuten zu 0.05 für **cis-2** und zu 0.19 für **trans-2** berechnet. Diese Quantenausbeuten sind niedriger als die der als Photoschaltsysteme genutzten, allerdings sterisch anspruchsvolleren Azobenzole.^[14]

Damit sind Thioxopeptidbindungen eine empfindliche Sonde, die es ermöglicht, durch *cis/trans*-Photoisomerisierung Konformationsänderungen im Peptidrückgrat zu induzieren. Aufgrund der besonderen spektroskopischen Eigenschaften der Thioxopeptidbindung kann die Kinetik und Thermodynamik dieser Änderungen regiospezifisch analysiert werden. Es ist besonders hervorzuheben, dass im Unterschied zur nativen Peptidbindung das Messsignal für die Thioxopeptidbindung in einem Bereich liegt, der Messungen im Bereich der Proteinabsorption erlaubt. Über die Isomerspezifität der Wechselwirkung der Peptide **1** und **2** mit dem μ -Rezeptor werden wir an anderer Stelle berichten.

Experimentelles

Der Aufbau der Peptide **1** und **2** erfolgte am Sieber-Amid-Harz (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) nach der (9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl(Fmoc)-Methode, die Kupplung von Boc-Tyr(*iBu*)- ψ [CS-N]-6-Nitrobenzotriazolid in 12 h bei 277 K in CH_2Cl_2 . Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren entsprechen denen der thioxylierten Verbindungen.

Peptid 1: Simultanabspaltung der Schutzgruppen und des Peptids vom Harz: 2 M SnCl_4 in CH_3CN , 1 h, 298 K. Die Reinigung erfolgte mit einem HPLC-Hochdruckgradientensystem der Firma Sykam (LiChrospher, Nucleosil RP-18, 250×25 mm). Wir nutzten 0.05-proz. Trifluoressigsäure (TFA) als mobile Phase A und Acetonitril mit 0.05 % TFA als mobile Phase B. MS: m/z : 627 [M^+], ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$: 626 (monoisotop).

Peptid 2: Simultanabspaltung der Schutzgruppen und des Peptids vom Harz: 2.2 M $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Komplex in CH_2Cl_2 , 10 h, 298 K. Reinigung: HPLC analog Peptid **1**. MS: m/z : 588 [M^+], ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$: 587 (monoisotop).

Konformerentrennung: Um den *cis*-Gehalt zu erhöhen, bestrahlten wir die wässrigen Peptidlösungen unmittelbar vor der Trennung mit einem N_2 -Laser (Wellenlänge 337 nm, Pulsbreite 500 ps, Pulsfrequenz 30 Hz, 400 μJ Puls $^{-1}$, 1 h, 277 K). HPLC-Bedingungen: LiChrospher, Nucleosil RP18, 250×25 mm, 29 % Acetonitril, 0.05 % TFA; 277 K. Die reinen Konformere ($t_{R,\text{trans-1}} = 12.3$ min; $t_{R,\text{cis-1}} = 19.8$ min; $t_{R,\text{trans-2}} = 10.4$ min; $t_{R,\text{cis-2}} = 17.2$ min) wurden in flüssigem Stickstoff aufgefangen und gefriergetrocknet.

Bestimmung der Quantenausbeuten per CE: Unter Nutzung eines N_2 -Lasers, dessen Strahl über ein Lichteiterkabel im rechten Winkel 15 cm vor dem Detektor auf die Kapillare gerichtet wurde, konnten die getrennten Isomere, sobald sie den Laserstrahl passieren, einer *cis/trans*-

Photoisomerisierung unterworfen werden. Die Daten wurden bei 251 nm (isosbestischer Punkt der Isomerenspektren) aufgenommen. Aus den gegen die Migrationszeit korrigierten Signalfächten können die isomerspezifischen Quantenausbeuten berechnet werden.

Eingegangen am 3. September 1999 [Z13957]

- [1] a) T. F. M. La Cour, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 564–571; b) D. R. Artis, M. A. Lipton, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12200–12206.
- [2] a) M. Schutkowski, K. Neubert, G. Fischer, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 455–461; b) S. Yao, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 699–704; c) M. Schutkowski, M. Jakob, G. Landgraf, I. Born, K. Neubert, G. Fischer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 381–385.
- [3] a) B. D. Sherman, A. F. Spatola, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 433–441; b) D. Seebach, S. Y. Ko, H. Kessler, M. Köck, M. Reggelin, P. Schmieder, M. Walkinshaw, J. Böslsterli, D. Bevec, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1953–1990; c) H. Kessler, A. Geyer, H. Matter, M. Köck, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 25–40; d) H.-T. Le, R. Michelot, M. Dumont, V. K. Shukla, M. Mayer, K. P.-P. Nguyen, H. Ruan, S. Lemaire, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, *75*, 9–14; e) J. Lehmann, A. Linden, H. Heimgartner, *Tetrahedron* **1998**, *98*, 8721–8736.
- [4] a) C. Grathwohl, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1981**, *20*, 2623–2633; b) U. Reimer, G. Scherer, M. Drewello, S. Kruber, M. Schutkowski, G. Fischer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 449–460.
- [5] a) G. Vanhoof, F. Goosens, I. De Meester, D. Hendriks, S. Scharpe, *FASEB J.* **1995**, *9*, 736–744; b) M. Brandsch, F. Thunecke, M. Schutkowski, G. Fischer, K. Neubert, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3861–3864.
- [6] M. Schutkowski, S. Wöllner, G. Fischer, *Biochemistry* **1995**, *34*, 13016–13026.
- [7] J. E. Zadina, L. Hackler, L. J. Ge, A. J. Kastin, *Nature* **1997**, *386*, 499–502.
- [8] M. A. Shalaby, C. W. Grote, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9045–9048.
- [9] a) D. W. Brown, M. M. Campbell, M. S. Chambers, C. V. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2171; b) F. S. Guziec, L. M. Wasmund, *J. Chem. Res.* **1989**, 1301–1312.
- [10] a) R. Frank, M. Schutkowski, *Chem. Commun.* **1996**, 2509–2510; b) D. Wildemann, M. Drewello, G. Fischer, M. Schutkowski, *Chem. Commun.* **1999**, 1809–1810.
- [11] J. V. Burakevich, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 51–60.
- [12] a) I. Harada, M. Tasumi, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *70*, 279–282; b) S. Ataka, H. Takeuchi, I. Harada, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 449–451; c) C. Kato, H. O. Hamaguchi, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.* **1984**, *89*.
- [13] S. Meyer, A. Jabs, M. Schutkowski, G. Fischer, *Electrophoresis* **1994**, *15*, 1151–1157.
- [14] a) L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8466–8467; b) R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt, L. Moroder, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2771–2774.