

Photoschaltbare cyclische Bis(cysteinyl)peptide katalysieren die oxidative Proteininfaltung**

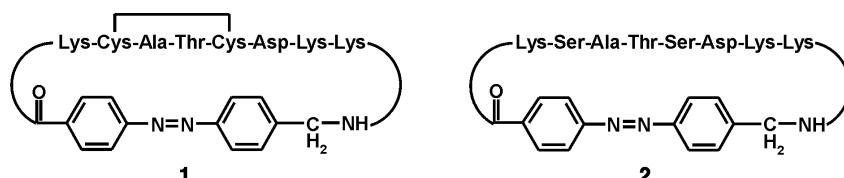
Anna Cattani-Scholz, Christian Renner,
Chiara Cabrele, Raymond Behrendt, Dieter Oesterhelt
und Luis Moroder*

Die Faltung und Disulfidverbrückung von cysteinhaltigen Proteinen sind thermodynamisch gekoppelte langsame Prozesse, bei denen schnell gebildete, nicht native Zwischenzustände durch Redoxsysteme zum nativen Cysteinnetzwerk umgewandelt werden.^[1] Disulfidverbrückung und Umordnung werden *in vivo* durch spezialisierte Enzyme katalysiert, wie PDI (Proteindisulfid-Isomerase) in Eukaryonten^[2] und Dsb (Disulfidbindungs)-Proteine in Prokaryonten.^[3] Diese Enzyme gehören zur Thioredoxin-Superfamilie, weisen eine Thioredoxin-Faltung auf^[4] und enthalten im aktiven Zentrum das Konsensus-Motiv Cys-Xaa-Yaa-Cys, welches sich am N-Terminus einer α -Helix befindet. Das näher am N-Terminus liegende Cystein ist lösungsmittelzugänglich und agiert wegen seines niedrigen pK_a -Wertes als Nucleophil in der Thiol/Disulfid-Austauschreaktion, die zur korrekten oxidativen Faltung notwendig ist.^[5] In vitro wird üblicherweise das Glutathion-Redoxsystem (GSH/GSSG) als Hilfsagens für die oxidative Faltung verwendet,^[6] um die natürliche Umgebung im endoplasmatischen Reticulum zu imitieren.^[7] Dabei wird durch Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen die Bildung des thermodynamisch günstigsten Oxidationsproduktes ermöglicht, häufig jedoch mit geringerer Ausbeute als in Gegenwart von Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen.

Obwohl die Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen alle wie Thioredoxin gefaltet sind, variieren die Redoxpotentiale (E'_0) von -270 mV für Thioredoxin^[8] bis -122 mV für DsbA,^[9] ebenso wie die pK_a -Werte des N-terminalen Cysteins (3.5 für DsbA, 4.5 für PDI und ungefähr 7 für Thioredoxin).^[9] Diese großen Unterschiede in Redoxeigenschaften und Nucleophilie der Thiole wurden den unterschiedlichen Sequenzen der α -helicalen Sequenz des aktiven Zentrums zugeschrieben,^[8–10] wohingegen eine entscheidende Rolle benachbarter geladener Gruppen umstritten ist.^[11] In einer früheren Arbeit hatten wir untersucht, ob die unterschiedlichen Redoxeigenschaften von Thioredoxin-Enzymen bei synthetischen linearen Peptiden, die den Sequenzen des aktiven Zentrums der Enzyme entsprechen, erhalten bleiben.^[12] Obwohl die Bis(cysteinyl)peptide etwas unterschiedliche Redoxpotentiale zeigten, waren alle Werte nahe -200 mV und ermöglichen daher nur geringe katalytische Effekte bei der oxidativen Faltung von RNase A als Modell-

protein.^[13] Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Unterschiede der sequenzintrinsischen freien Energie der Disulfidbildung und der pK_a -Werte der beiden Thiolgruppen signifikant durch die Einschränkungen der globalen Proteinstruktur beeinflusst und verstärkt werden. Demzufolge entsprechen konformativ eingeschränkte cyclische Bis(cysteinyl)peptide im Hinblick auf Redoxeigenschaften und Disulfidaustauschaktivität besser den aktiven Zentren der Enzyme. Tatsächlich führte die Cyclisierung der oben erwähnten Peptidfragmente der aktiven Zentren zu wesentlich höheren Redoxpotentialen (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Rückgrat-Cyclisierung der Sequenz des aktiven Zentrums *H-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe-OH* [134–141] der *E.coli*-Thioredoxin-Reduktase mit der photoschaltbaren 4-(4-Aminophenylazo)benzoësäure oder 4-(4-(Aminomethyl)phenylazo)benzoësäure ergab Peptidsysteme, die durch eine vollständig reversible *cis* \leftrightarrow *trans*-Photoisomerisierung der Azobenzolgruppe gekennzeichnet sind.^[14] Diese Isomerisierung wird sowohl in der reduzierten monocyclischen Form als auch in der oxidierten bicyclischen Form von Konformationsübergängen im Peptidteil begleitet. Die Zustände niedriger Energie sind beim *trans*-Azo-Isomer gut definiert, während sie beim *cis*-Azo-Isomer durch weniger eingeschränkte Konformationsanordnungen repräsentiert sind.^[15] Da diese photoaktiven Peptide wasserunlöslich sind, wurden in der vorliegenden Arbeit wasserlösliche cyclische Peptide synthetisiert, in denen drei Aminosäurereste außerhalb des Cys-Ala-Thr-Cys-Motivs durch Lysinreste ersetzt wurden (**1**, Schema 1). Die Redoxeigenschaften dieser



Schema 1. Synthetische cyclische Peptide mit einer Sequenz entsprechend der des aktiven Zentrums der *E.coli*-Thioredoxin-Reduktase und mit 4-(4-(Aminomethyl)phenylazo)benzoësäure als Chromophor.

Analoga in wässriger Lösung konnten photoreguliert werden, was genutzt wurde, um die oxidative Faltung von RNase A im Redoxpuffer mit verschiedener Effektivität zu beeinflussen.

Um mit NMR-Spektroskopie die Konformation der Bis(cysteinyl)peptide in Lösung als *trans*- und *cis*-Isomere charakterisieren zu können,^[16] wurde zusätzlich zur bicyclischen Verbindung **1** das mit der reduzierten Form isomorphe monocyclische Bis-Seryl-Peptid **2** (Schema 1) synthetisiert.^[17] Der Austausch Cys \rightarrow Ser sorgt für vollständige Stabilität unter den nicht völlig anaeroben Messbedingungen der NMR-Experimente (Gefahr der Oxidation). Wie zuvor in unseren Untersuchungen an den wasserunlöslichen cyclischen Azobenzol-Peptiden in DMSO festgestellt wurde,^[15] wird die Konformation von **1** und **2** in der *trans*-Azo-Konfiguration primär durch die gestreckte Struktur des Chromophors bestimmt. Dieser richtet den C-terminalen Teil der Peptidsequenz parallel zum Azobenzol aus und erlaubt die Bildung einer Schleife nur im N-terminalen Bereich, eher als Konse-

[*] Prof. L. Moroder, Dr. A. Cattani-Scholz, Dr. C. Renner, Dr. C. Cabrele, Dr. R. Behrendt, Prof. D. Oesterhelt Max-Planck-Institut für Biochemie Am Klopferspitz 18 A, 82152 Martinsried (Deutschland) Fax: (+49) 89-8578-2847 E-mail: moroder@biochem.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde durch den SFB 533 der Ludwig-Maximilians-Universität München unterstützt (Teilprojekt A8 Moroder/Oesterhelt).

quenz der cyclischen Natur der Verbindung als wegen der Disulfidverbrückung (Abbildung 1). Tatsächlich bleibt im Bis-Seryl-Analogon **2** die Gesamtstruktur in Abwesenheit der Disulfidbrücke und somit ohne die Einschränkung durch den 14-gliedrigen Ring größtenteils erhalten. Die

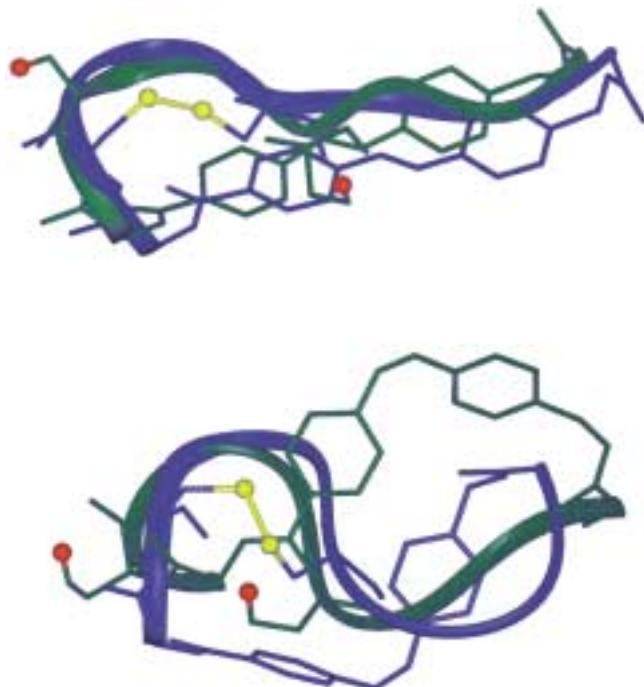


Abbildung 1. Durch NMR-Konformationsanalyse bestimmte repräsentative Strukturen der Konformationsfamilien niedrigster Energie in wässriger Lösung: Das *trans*-Isomer (oben) und das *cis*-Isomer (unten) der bicyclischen Verbindung **1** und des Bis(seryl)peptids **2** als Analogon der reduzierten Verbindung **1**. Rückgrat-Konformationen sind im Bändermodell dargestellt. Cystein/Serin und der Azobenzol-Chromophor sind im Kugel-Stab-Modell gezeigt: blau für **1** und grün für **2**.

Seitenketten der beiden Cysteinreste, in **2** durch Serinreste ersetzt, orientieren sich dabei mit einer minimalen Translations- oder Rotationsbewegung des Peptidrückgrats ins Lösungsmittel. Im Unterschied dazu erlaubt die gebogene Struktur des Chromophors in der *cis*-Azo-Konfiguration eine größere konformativ Freiheit des Peptidteils in der monocyclischen (**2**) und der bicyclischen Form (**1**). Dies begünstigt in **1** eine eher Helix-artige Schleife, die die Cys-Ala-Thr-Cys-Sequenz enthält. Die Einschränkung durch die Disulfidbrücke führt jedoch zu einem frustrierten System, das sich zwischen verschiedenen Konformationszuständen hin- und herbewegt. Im monocyclischen Peptid **2** wird eine wesentlich konvergentere Familie von energetisch entspannten Konformeren beobachtet, die durch eine S-förmige Konformation charakterisiert sind. Die Aktivierungsenergie für die thermische *cis* → *trans*-Isomerisierung der monocyclischen Verbindung **2** ist um 12 kJ mol⁻¹ höher als die der bicyclischen Verbindung **1**, was ebenfalls auf eine höhere Energie der bicyclischen gegenüber der monocyclischen *cis*-Konfiguration deutet.

Wie auch für die analogen Systeme in DMSO beobachtet wurde,^[15] ist die *trans* → *cis*-Photoisomerisierung von **1** bei

Bestrahlung bei 360 nm bzw. 450 nm völlig reversibel und findet mit hoher Quantenausbeute entsprechend einer Kinetik erster Ordnung mit zwei isosbestischen Punkten bei 396 nm und 291 nm statt. Basierend auf diesen optischen Eigenschaften und der langsamen thermischen Relaxation des *cis*-Zustandes bei Raumtemperatur konnten die Redox-eigenschaften von **1** in der *trans*-Azo- und *cis*-Azo-Konfiguration bestimmt werden.^[18] Dazu wurden Thiol/Disulfid-Austauschexperimente mit GSH/GSSG als Redoxreferenzpaar durchgeführt, so wie es bereits für die linearen Fragmente des aktiven Zentrums der Thioredoxin-Enzyme beschrieben ist.^[12a] Ein typisches HPLC-Chromatogramm einer Redoxmischung von *cis*- und *trans*-Isomeren mit Glutathion im Überschuss zeigt Abbildung 2. Reproduzierbare K_{ox} -Werte wurden

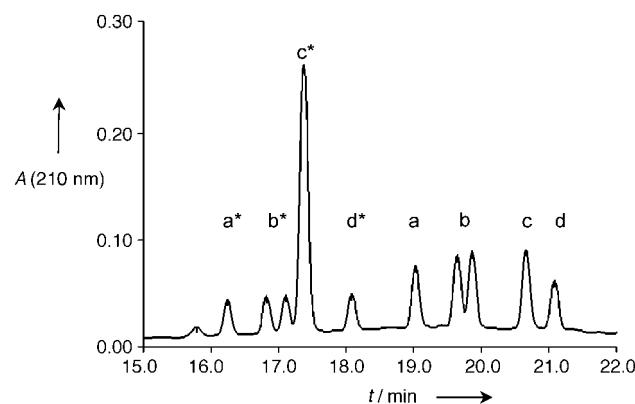


Abbildung 2. HPLC-Chromatogramm einer äquilibrierten Redoxmischung von **1** (*cis*- und *trans*-Isomer) mit einem Glutathion-Überschuss (siehe Lit. [18]). Die *cis*-Isomere sind mit * markiert: a) gemischtes Bis(glutathion)/Peptid-Disulfid; b) gemischte Mono(glutathion)/Peptid-Disulfide; c) reduziertes Peptid und d) oxidiertes Peptid.

mit verschiedenen GSH/GSSG-Verhältnissen gemessen. Aus den Mittelwerten wurden Redoxpotentiale bezogen auf Glutathion ($E'_0 = -240$ mV)^[19] berechnet (Tabelle 1). Trotz der Cyclisierung und des Einbaus dreier Lysinreste zeigt das *trans*-Isomer ein Redoxpotential von -200 mV, welches sich nur marginal von dem des linearen Fragments des aktiven Zentrums *H*-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe-OH [134–141] unterscheidet (-210 mV).^[12a] Damit wird der geringe Einfluss der geladenen Reste auf das Redoxpotential bestätigt.

Tabelle 1. Redoxpotentiale der linearen und cyclischen Peptide mit der Sequenz des aktiven Zentrums der *E. coli*-Thioredoxin-Reduktase.

Verbindung	K_{ox} [M]	E'_0 [mV]
Thioredoxin-Reduktase		-250 ^[a]
lineares Aktives-Zentrum-Fragment [134–141]	0.123 ^[b]	-210 ^[b]
cyclisches Peptid 1 als <i>trans</i> -Azo-Isomer	0.050 ^[c]	-200 ^[c]
cyclisches Peptid 1 als <i>cis</i> -Azo-Isomer	0.0008 ^[c]	-146 ^[c]

[a] Bei pH 7 bestimmt.^[21] [b] Gemessen in 0.1 M Phosphatpuffer mit 0.1 M NaCl und 1 mM EDTA (pH 7.0) bei 20 °C und bezogen auf ein Redoxpotential von -240 mV für GSH/GSSG.^[12a] [c] In dieser Arbeit bestimmt in 0.1 M Phosphatpuffer mit 0.1 M NaCl und 1 mM EDTA (pH 7.0) bei 25 °C und mit $E'_0 = -240$ mV für GSH/GSSG.^[18, 19] Die K_{ox} - und E'_0 -Werte sind Mittelwerte dreier Experimente.

tigt.^[11] Im Unterschied dazu ist das Redoxpotential des *cis*-Isomers deutlich zu einem stärker oxidierenden Wert ($E'_0 = -146$ mV) verschoben, wodurch dieses Peptidsystem den nativen Enzymen PDI ($E'_0 = -147/-159$ mV) und DsbA ($E'_0 = -122$ mV) ähnlicher wird.^[9] Die Unterschiede im Redoxverhalten zwischen dem *trans*- und dem *cis*-Isomer korrelieren gut mit der NMR-Konformationsanalyse. In der *trans*-Azo-Konfiguration haben beide Spezies, oxidiert und reduziert, eine sehr ähnliche Konformation, und die freie Energie für die Bildung des 14-gliedrigen Rings in der oxidierten Form sollte von entropischen Beiträgen durch die benachbarte Anordnung der Cysteinseitenketten dominiert sein, während Konformationsenthalpie und -entropie den K_{ox} -Wert nur geringfügig beeinflussen dürften. In der *cis*-Azo-Konfiguration hingegen ist die Bildung einer Disulfidbrücke sehr ungünstig: Der K_{ox} -Wert ist fast drei Größenordnungen kleiner als der des *trans*-Isomers. Die geringe Neigung, einen Bicyclus zu bilden, könnte dem Entropieverlust zuzuordnen sein, der entsteht, wenn die Seitenketten des Cysteins in einer definierten Topologie eingefroren werden, ohne dies durch eine günstige Änderung der Konformationsenthalpie zu kompensieren. Tatsächlich findet in der oxidierten Form ein Übergang von einer Konformation niedriger Energie zu einem frustrierten System statt, wie die niedrigere Aktivierungsenergie für die thermische *cis* → *trans*-Relaxation von **1** zeigt. Ein zusätzlicher Beitrag zum Unterschied in den Redoxpotentialen und ein Einfluss auf die pK_a -Werte der beiden Thiole könnten auch durch elektronische Beiträge der Azobenzolgruppe entstehen, die in der *trans*-Azo- und der *cis*-Azo-Konfiguration eine unterschiedliche Orientierung relativ zu den Thiolen aufweist. Wegen der hohen Empfindlichkeit des Azobenzols gegenüber starken Reduktionsmitteln wie 1,4-Dithiothreit oder Tricarboxyethylphosphoran war eine quantitative Reduktion des Cystinsystems in **1** zur Messung der pK_a -Werte der Thiole nicht möglich. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass die pK_a -Werte der beiden Cysteinreste in den oben erwähnten cyclischen Bis(cysteinyl)peptiden bei ungefähr 8 und 10 liegen, unabhängig von den Redoxpotentialen, die zwischen -130 mV und -200 mV variieren (unveröffentlichte Ergebnisse).

In der Regel haben natürliche Proteindisulfid-Isomerasen hohe Redoxpotentiale, niedrige pK_a -Werte für die Thiole und eine Peptidbindungsstelle, d.h. Chaperon-Aktivität, die eine gezielte Wechselwirkung mit dem Substrat ermöglicht. Obwohl man von kleinen Bis(cysteinyl)peptidsystemen keine Chaperon-Aktivität erwarten kann, sollten Redoxpotential und pK_a -Wert der Thiole die katalytische Effizienz bei der oxidativen Faltung von Proteinen bestimmen. Dieser katalytische Effekt auf die oxidative Rückfaltung von reduzierter und denaturierter RNase A wurde für **1** in der *trans*- und der *cis*-Konfiguration untersucht.^[20] Zu diesem Zweck wurden nichtoptimale GSH/GSSG-Konzentrationen verwendet, d.h. ein RNase A/GSH/GSSG-Verhältnis von 1:20:4, um eine puffernde Wirkung des Glutathions auf den Hilfskatalysator **1** zu vermeiden. Abbildung 3 zeigt, dass der Austausch eines Äquivalents GSSG durch **1** als *cis*-Isomer eine Beschleunigung der initialen Aktivierungsgeschwindigkeit um 30% bewirkt und, noch signifikanter, nach 30 Stunden eine Erhöhung der Ausbeute an aktiver RNase A von 56%

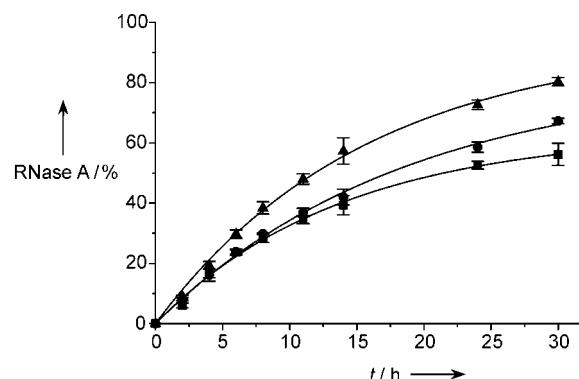


Abbildung 3. Zeitverlauf der Reaktivierung von reduzierter RNase A bei 30 °C und pH 7.4 mit Glutathion bei einem molaren RNase A/GSH/GSSG-Verhältnis von 1:20:4 (■), Glutathion plus **1** als *trans*-Isomer (●) oder *cis*-Isomer (▲) bei einem molaren RNase A/GSH/GSSG/**1**-Verhältnis von 1:20:3:1. Jeder Punkt ist der Mittelwert dreier Experimente. Die Datenpunkte wurden an folgende Gleichung angepasst: [aktive RNase A]/[reduzierte RNase A]_{t=0} = $a(1 - e^{-kt})$, wobei a die extrapolierte maximale Reaktivierung darstellt und k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Kinetik erster Ordnung ist.

auf 80%. Die extrapolierte maximale Reaktivierung beträgt 94% ($\pm 3\%$) gegenüber 64% ($\pm 2\%$) in Abwesenheit von **1**. Im Unterschied dazu bleibt bei Verwendung des *trans*-Isomers die initiale Aktivierungsgeschwindigkeit gleich, aber die Effizienz des Redoxsystems ist erhöht (extrapolierte maximale Reaktivierung von 83% $\pm 3\%$). Dieser Effekt könnte durch die höhere Nucleophilie zumindest eines der zwei Peptidthiole verglichen mit Glutathion bedingt sein, wie die unterschiedlichen pK_a -Werte der oben erwähnten cyclischen Bis(cysteinyl)peptide erwarten lassen. Eine Erhöhung des Anteils an **1** als *cis*-Isomer am Rückfaltungsgemisch auf zwei Äquivalente führt zu einer stärkeren Beschleunigung der initialen Rückfaltungsgeschwindigkeit (52% höher als GSH/GSSG), während eine Erhöhung des Anteils an *trans*-Isomer „nur“ eine Erhöhung der Ausbeute bewirkt (extrapolierte maximale Reaktivierung von 100%!).

Die experimentellen Befunde bestätigen, dass konformativ eingeschränkte Bis(cysteinyl)peptidsysteme die aktiven Zentren der Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen imitieren können. Dabei ist die Aktivität bei der Disulfidisomerisierung ähnlich wie bei natürlichen Protein-Disulfid-Isomerasen. Zusätzlich wurde durch den Einbau einer Azobenzolgruppe in die cyclischen Bis(cysteinyl)peptide die Photomodulierung der Effizienz solcher Faltungsadjunktien möglich. Dies könnte eine zeitaufgelöste Steuerung funktioneller Eigenschaften ermöglichen.

Eingegangen am 21. März,
veränderte Fassung am 2. Oktober 2001 [Z 16826]

- [1] a) R. Jaenicke, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 385–402; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 395–413; b) R. Jaenicke, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1987**, *49*, 117–237; c) T. E. Creighton, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1995**, *348*, 5–10; d) J. B. Hupp, H. L. Ploegh, *Cell* **1998**, *92*, 145–148.
- [2] a) R. B. Freedman, T. R. Hirst, M. F. Tuite, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 331–336; b) H. F. Gilbert, *Methods Enzymol.* **1998**, *290*, 26–50.
- [3] a) J. C. A. Bardwell, K. McGovern, J. Beckwith, *Cell* **1991**, *67*, 581–589; b) S. Kamitani, Y. Akiyama, K. Ito, *EMBO J.* **1992**, *11*, 57–62.

- [4] a) J. L. Martin, *Structure* **1995**, *3*, 245–250; b) J. Kemmink, N. Darby, K. Dijkstra, M. Nilges, T. E. Creighton, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7684–7691.
- [5] a) M. Wunderlich, A. Otto, K. Maskos, M. Mücke, R. Seckler, R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 28–33; b) A. Zapun, L. Cooper, T. E. Creighton, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1907–1914; c) A. Zapun, D. Missiakis, S. Raina, T. E. Creighton, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5075–5089; d) L. W. Guddat, J. C. A. Bardwell, T. Zander, J. L. Martin, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1148–1156.
- [6] a) V. P. Saxena, D. B. Wetlauffer, *Biochemistry* **1970**, *9*, 5015–5023; b) R. Jaenicke, R. Rudolph in *Protein Structure, A Practical Approach* (Hrsg.: T. E. Creighton), IRL, Oxford, S. 191–223.
- [7] a) C. Hwang, A. J. Sinskey, H. F. Lodish, *Science* **1992**, *257*, 1496–1502; b) P. T. Chivers, M. C. A. Laboissière, R. T. Raines, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2659–2667.
- [8] G. Krause, J. Lunström, J. L. Barea, C. Pueyo de la Cuesta, A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9494–9500.
- [9] M. Huber-Wunderlich, R. Glockshuber, *Folding Des.* **1998**, *3*, 161–171.
- [10] a) X. Lu, H. F. Gilbert, J. W. Harper, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4205–4210; b) U. Grauschopf, J. R. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger, J. C. A. Bardwell, *Cell* **1995**, *83*, 947–955.
- [11] A. Jacobi, M. Huber-Wunderlich, J. Hennecke, R. Glockshuber, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 213692–21699; b) J. Hennecke, C. Spleiss, R. Glockshuber, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 189–195.
- [12] a) F. Siedler, S. Rudolph-Böhner, D. Masamitsu, H.-J. Musiol, L. Moroder, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7488–7495; b) F. Siedler, D. Quarzago, S. Rudolph-Böhner, L. Moroder, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1563–1572.
- [13] L. Moroder, D. Besse, H.-J. Musiol, S. Rudolph-Böhner, F. Siedler, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1996**, *40*, 207–234.
- [14] R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 519–529.
- [15] a) 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; b) C. Renner, J. Cramer, R. Behrendt, L. Moroder, *Biopolymers* **2000**, *54*, 501–514; c) C. Renner, R. Behrendt, S. Spörlein, J. Wachtveitl, L. Moroder, *Biopolymers* **2000**, *54*, 489–500.
- [16] ¹H-NMR-Experimente wurden mit einer 3 mM Probe in 9:1 (v:v) H₂O/D₂O bei 500 MHz (Bruker-DRX500-Spektrometer), wie in Lit. [15b,c] beschrieben, durchgeführt. Wasserunterdrückung wurde durch Vorsättigung oder mit der WATERGATE-Sequenz (V. Sklenár, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *102*, 241–245) erreicht. Die Umrechnung von NMR-Daten zu geometrischen Randbedingungen sowie die Strukturrechnungen (100 Strukturen) wurden wie zuvor in Lit. [15b,c] beschrieben durchgeführt.
- [17] Die linearen Peptidvorläufer wurden an Chlortritylharz (Fmoc/tBu-Chemie) synthetisiert (siehe Lit. [14]). Cyclisierung der Peptide mit geschützten Seitenketten fand in DMF bei 0.5 mM Konzentration durch PyBOP/HOBt (Benzotriazolyl-1-oxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat/1-Hydroxybenzotriazol) statt und entschützt wurde mit Trifluoressigsäure/CH₂Cl₂ (95:5) in Gegenwart von Triethylsilan. Das cyclische Bis(cysteinyl)peptid wurde durch Luftsauerstoff in Ammoniumacetatpuffer (pH 8) bei einer Konzentration von 10⁻⁴M oxidiert. **1**: ESI-MS: *m/z*: 1113.6 [M+H⁺]; *M_r*= 1112.4 ber. für C₄₉H₇₂N₁₄O₁₂S₂; Aminosäureanalyse (6 M HCl, 110°C, 24 h): Asp 1.00 (1), Thr 0.90 (1), Ala 0.97 (1), Cys 1.46 (2), Lys 2.95 (3); Peptidgehalt: 71 %. **2**: ESI-MS: *m/z*: 1085.8 [M+H⁺]; *M_r*= 1082.6 ber. für C₄₉H₇₄N₁₄O₁₄; Aminosäureanalyse (6 M HCl, 110°C, 24 h): Asp 1.00 (1), Thr 0.99 (1), Ser 1.98 (2), Ala 0.98 (1), Lys 2.90 (3); Peptidgehalt: 75 %.
- [18] Um *K_{ox}*-Werte zu bestimmen, wurden das *trans*-Isomer und Mischungen von *cis/trans*-Isomeren von **1** (0.1 mM) in Argon-gesättigtem 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7, 0.1 M NaCl und 1 mM EDTA) bei 25°C 3–4 h unter Argon mit 100fachem Überschuss Glutathion bei unterschiedlichen GSH/GSSG-Verhältnissen äquilibriert. Proben der äquilibrierten Redoxmischung wurden mit 1 M Phosphorsäure versetzt und mit HPLC analysiert, Basislinientrennung konnte für alle Komponenten erreicht werden. Eine Zuordnung der Signale und Identifizierung der *cis*- und *trans*-Isomere konnte mit ESI-MS und durch Vergleich mit dem reinen *trans*-Isomer erreicht werden (siehe Abbildung 2). Die Konzentrationen der reduzierten und oxidierten Form von Verbindung **1** wurden durch Integration der HPLC-Signale bestimmt.
- [19] J. Rost, S. Rapoport, *Nature* **1964**, *201*, 185.
- [20] Vollständig reduzierte und denaturierte RNase A war aus Rinderpankreas-RNase A hergestellt (Aldrich, approx. 100 Kunz units mg⁻¹ protein), und Rückfaltungsversuche wurden ähnlich wie in Y. Konishi, T. Ooi, H. A. Sheraga, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4734–4740 beschrieben durchgeführt. 24 µM der reduzierten RNase A wurden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, bei 30°C unter Argon im Glutathion-Redoxpuffer bei einem molaren Verhältnis RNase A/GSH/GSSG/**1** von 1:20:4 sowie in Gegenwart von **1** bei einem molaren Verhältnis RNase A/GSH/GSSG/**1** von 1:20:3:1 und 1:20:2:2 reoxidiert. **1** wurde als *trans*-Isomer (100% nach thermischer Relaxation, 12 h, 50°C) eingesetzt und nach der Belichtung bei 360 nm als *cis*-Isomer, also im photostationären Zustand (*cis/trans*-Verhältnis: 80:20±3). Die Reaktivierung wurde durch Zugabe von RNase A zur äquilibrierten Rückfaltungsmischung (>2 h bei Raumtemperatur) initiiert. Proben mit dem *cis*-Isomer wurden während der ersten 14 h alle 2 h 4 min belichtet; danach jeweils 4 min nach 21 h und 28 h. Der Zeitverlauf des Anteils an korrekt gefalteter RNase A wurde bestimmt, indem an entnommenen Proben der Rückfaltungsmischung die initiale Geschwindigkeit der enzymatischen cCMP-Hydrolyse (432 µM in 0.1 M MOPS-Puffer, pH 7.0) bei 284 nm und einer Gesamtconcentration an RNase A von 1.7 µM gemessen wurde.
- [21] M. E. O'Donnell, H. W. Williams, Jr., *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 13795–13805.

Oligo(phenylenvinylene) mit terminaler Donor-Acceptor-Substitution**

Herbert Meier,* Jürgen Gerold, Heinz Kolshorn, Wolfram Baumann* und Michael Bletz

Konjugierte Oligomere^[1] wie die Oligo(phenylenvinylene) (OPVs) werden seit einigen Jahren intensiv untersucht, da sie materialwissenschaftlich interessante Eigenschaften in Hinblick auf eine Verwendung in der nichtlinearen Optik (NLO) sowie als Photoleiter und Elektroluminophore aufweisen. Typisch für eine solche Verbindungsklasse ist die Konvergenz von Absorption und Fluoreszenz mit wachsender Zahl *n* der Wiederholungseinheiten.^[2] Die Bestimmung der effektiven Konjugationslänge (EKL)^[1a] ist für die Charakterisierung der Oligomere wichtig, auch in ihrer Funktion als Modellverbindungen für die entsprechenden Polymere. Für die Bestimmung der Konvergenz und der EKL hat sich ein einfacher

[*] Prof. Dr. H. Meier, Dipl.-Chem. J. Gerold, Dipl.-Chem. H. Kolshorn
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-25396
E-mail: hmeier@mail.uni-mainz.de

Prof. Dr. W. Baumann, Dipl.-Chem. M. Bletz
Institut für Physikalische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-22980
E-mail: wbaumann@mail.uni-mainz.de

[**] Für die Unterstützung dieser Arbeit danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie.