



---

**Synthese lichtschtbarer Azobenzol-enthaltender Peptide und  
deren biophysikalische Charakterisierung**

Dissertation

**Markus Löweneck**

München 2005



Technische Universität München

Max-Planck-Institut für Biochemie

**Synthese lichtschtbarer Azobenzol-enthaltender Peptide und  
deren biophysikalische Charakterisierung**

**Markus Löweneck**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. L. Moroder

2. Univ.-Prof. Dr. Th. Bach

Die Dissertation wurde am 24.02.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.04.05 angenommen.

*Meiner geliebten Ehefrau Veronika.*

*Gebt mir einen Hebel, der lang genug,  
und einen Angelpunkt, der stark genug ist,  
dann kann ich die Welt mit einer Hand bewegen.*

*(Archimedes, 287-212 v. Chr.)*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Februar 2005 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, unter Anleitung von Prof. Dr. Luis Moroder angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Luis Moroder, der mir diese abwechslungsreiche, interessante und vielfältige Aufgabe gegeben hat und mir bei ihrer Bearbeitung durch seine unkomplizierte „Südtiroler-Art“ immer hilfsbereit zur Seite stand. Er gab mir genügend Freiräume, jedoch auch Lenkung und Zielorientierung für die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Christian Renner. Sein fundiertes Fachwissen, seine guten Ideen und Problemlösungen sowie seine Gabe, wissenschaftliche Ergebnisse vortrefflich zu Papier zu bringen, waren mir eine unschätzbare Hilfe. Für diese konnte ich mich in so manchen Weißwurstessen mit der Besorgung „einer Semmel“ leider nur geringfügig revanchieren. Desweiteren gab er mir in wissenschaftlichen Diskussionen immer das Gefühl, ein „gleichwertiger“ Gesprächspartner zu sein.

Ein ebenso herzlicher Dank geht für die Aufnahme und Interpretation der SPFS-Messungen an Simone Krupka und Eva-Kathrin Sinner. Tobias Schrader und Helmut Satzger danke ich für ihre aufopfernde Arbeit und für nächtelanges Messen meiner Verbindungen. Euer Versuchsaufbau und meine damit verbundene Frage: „... und wo ist denn nun endlich die Küvette?“ werden mir unvergessen bleiben.

Meinem Arbeitskollegen Alexander G. Milbradt danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Erstellung so mancher „bunter Bilder“. Ich hoffe, dass wir zusammen noch so manche Esoterikmesse besuchen werden, um uns dort die neuesten Erkenntnisse in der spagyrischen Aufarbeitung von Doktorarbeiten anzueignen.

Meinem Laborkollegen Jose Pfizer danke ich für seine praxisorientierte Art, chemisch zu arbeiten, von welcher ich in Zukunft bestimmt noch profitieren werde, für diverse Streitgespräche über Musikrichtungen, seinen EDV-Einsatz in unserer Arbeitsgruppe und für so manche Drei...???-Folgen. Ich hoffe, wir werden in Zukunft zusammen noch so manches mal zu Ferragosto nach Italien fahren und in „Zozzomarina“ eine Pizza „Pippistrello“ und „patatine passaggio a livello“ essen, bevor wir uns auf den Weg nach „Patatine Therme“ machen, um dort einen „granita menta e liquirizia“ zu uns zu nehmen.

Elisabeth „Lissy“ Weyher-Stingl danke ich für die unzähligen LC-MS-Analysen, die Einführung in das UV-, CD- und Fluoreszenzspektrometer und die vielen analytisch-chemischen Hilfestellungen. Und Lissy denk immer daran: „Die Masse ist sauber!“

Hans-Jürgen Musiol danke ich für sein umfangreiches chemisches Wissen und für die Versorgung mit diversen Literaturstellen. Seine freundliche und lustige Art machten ihn für mich zur „guten Seele“ des Arbeitskreises. Zudem danke ich ihm für seine exzellenten Kenntnisse auf dem Gebiet der „Weißwurst-Chemie“ und für die zuverlässigen Reservierungen für die Oper und den Nockherberg.

Dr. Cyril Boulegue danke ich für das stetige „Immerwiederaufsneueerklären“ der diversen Peptidsynthesizer und für sein umfangreiches Wissen in der Peptidchemie, welches mir sehr geholfen hat. Sein französischer Akzent in der Interpretation von „Schnappi“ wird mir noch lange im Gedächtnis bleiben.

Dr. Norbert Schaschke danke ich für die ausführlichen Erörterungen chemischer Fragestellungen sowie für das allmorgendliche Kaffee kochen und die lustige Zeit beim APS 2003 und DPS 2005.

Dr. Markus M. Müller (TripleM) danke ich für seine lustige Begleitung während des Studiums und für die Einführung in die optimale Proteinaufnahme beim Kraftsport. Unvergesslich werden mir die Geschichten über „Bergwertungen beim Dachauer-Volksfest“ und „Synthol in der Bodybuilding-Szene“ bleiben. Als letztes möchte ich

ihm und vor allem seiner Mutter nochmals ins Gedächtnis rufen, dass der versprochene Sauerbraten immer noch ausständig ist.

Dr. Dirk Barth danke ich für seine unkomplizierte Art und Einführung in die hessische Lebensart. Unvergessen wird mir unsere gemeinsame Autofahrt mit Stefan Sperl auf der Würmtalstraße sowie der „Fön“, den er mir nach unserem gemeinsamen Discobesuch im Soul-City erteilt hat, bleiben.

Bei meinen Nachbarlaborkolleginnen Marion Götz und Alessandra Barazza bedanke ich mich für ihre Salatkreationen, die Versorgung mit Kaugummis und deren zahlreiche Lacher, die durch so manche geschlossene Labortür gedrungen sind.

Bei meiner Azomitstreiterin Ulrike Kusebauch möchte ich mich für so manches Massenspektrum bedanken und vielleicht schaffen wir es ja mal, zusammen einen Berggipfel zu erklimmen... natürlich mit Hüttenübernachtung!

Bei Leslie Hötzer bedanke ich mich, dass sie meinem Laborkollegen Jose Pfizer das Schwimmen beigebracht hat und somit ein Ertrinken in „Zozzomarina“ auch nach Genuß so mancher „Sprize“ auf ein Mindestmaß reduzieren sollte.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinem Freund und Trauzeugen Markus Kaiser, mit dem ich nicht nur bis 3 Uhr morgens sein Zimmer streichen durfte, sondern auch so manche Todesfahrten zu Doktorprüfungen bestehen mußte. Ich möchte die Zeit, die wir zusammen mit seiner Frau und meiner ehemaligen Laborkollegin Dr. Barbara „Babsina“ Saccà im Garten ihrer Eltern in Piove di Sacco verbracht haben nicht missen und hoffe, dass diese Treffen auch in Zukunft weiter stattfinden können. Babsina habe ich zudem meinen ersten italienischen Satz zu verdanken: „Io scrivo sul bicchiere!“ ... Grazie!

Bei Dr. Stefan Übel möchte ich mich für die Benutzung der HPLC-Anlagen bedanken und für seine Einführung in die Geländefahrzeuge Österreichs.

Ein weiterer Dank gilt Silva Andric, die mich mit ihrer lustigen Art und exzellenten Kochkünsten immer wieder begeistert hat. Unseren Osterurlaub in Rovinj werde ich genau so wenig vergessen wie die Tischarrangements für diverse Arbeitskreisfeiern.

Desweiteren danke ich Bernhard Jehle sowohl für die Unterstützung in der Fertigstellung meines Modellflugzeugs als auch für die Erteilung erster Flugstunden. Für diverse Reparaturen und Spezialanfertigungen verschiedener Teile danke ich der gesamten Werkstatt des MPI.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Firmen Dussman und Aramark für die „exquisite und preiswerte Bewirtung“ sowie meinem Ausdauertrainer Klaus Ruscher, der es mit seinen anspruchsvollen und abwechslungsreichen Trainingsplänen geschafft hat, etwaige Gewichtszunahmen im Rahmen zu halten, bedanken.

Ein riesiger Dank geht natürlich an meine geliebte Ehefrau Veronika, auf die ich mich jeden Tag immer wieder aufs neue freue und die mir viel Kraft für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.

Mein letzter, jedoch nicht minder herzlicher Dank gilt natürlich meiner Mutter, meinem Stiefvater, meiner Oma, meinen Schwiegereltern und dem Rest der Familie.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 533) finanziell unterstützt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits teilweise in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

**Schütt, M.**, Krupka, S. S., Milbradt, A. G., Deindl, S., Sinner, E.-K., Oesterheld, D., Renner, C., Moroder, L. (2003) *Photocontrol of cell adhesion processes: Model studies with cyclic azobenzene-RGD peptides*. *Chemistry & Biology* **10**, 487-490.

Milbradt, A. G., **Löweneck, M.**, Krupka, S. S., Reif, M., Sinner, E.-K., Moroder, L., Renner, C. (2004) *Photomodulation of conformational states. IV. Integrin binding RGD-peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*. *Biopolymers*, online.

Renner, C., Kusebauch, U., **Löweneck, M.**, Milbradt, A. G., Moroder, L. (2005) *Azobenzene as photoresponsive conformational switch in cyclic peptides*. *J. Peptide Res.* **65**, 4-14.

**Löweneck, M.**, Milbradt, A. G., Satzger, H., Root, C., Moroder, L., Zinth, W., Renner, C. (2005) *A conformational two-state peptide model system containing an ultrafast, but soft light-switch*. Manuscript in preparation.

Dong, S.-L., **Löweneck, M.**, Schrader, T. E., Schreier, W., Zinth, W., Moroder, L., Renner, C. (2005) *A photo-controlled  $\beta$ -hairpin peptide*. *Angewandte Chemie*, submitted.

Weitere Veröffentlichungen:

Barth, D., Musiol, H.-J., **Schütt, M.**, Fiori, S., Milbradt, A. G., Renner, C., Moroder, L. (2003) *The role of cystine knots in collagen folding and stability. I. Conformational properties of (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> and (Pro-(4S)-FPro-Gly)<sub>5</sub> model trimers with an artificial cystine knot*. *Chemical European Journal* **9**, 3692-3702.

Posterpräsentationen:

2003: 18<sup>th</sup> American Peptide Symposium, Boston, Massachusetts, USA.

2004: Dynamics of Proteins, Freising, Deutschland.

Vorträge:

2000: MPG workshop, "*The role of cystine knots in collagen folding and stability. Model trimers with an artificial cystine knot.*", Schloß Ringberg, Deutschland.

## Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden Standardabkürzungen nach *ACS Style Guide: A manual for Authors and Editors* verwendet. Zusätzliche Abkürzungen sind im Folgenden angegeben:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AMPB	4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure
APB	4-(4-Amino-phenylazo)-benzoesäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIEA	Diisopropylethylamin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPE	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
DPPA	Diphenylphosphorylazid
EE	Essigsäureethylester
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
EDT	Ethandithiol
eq.	Äquivalente
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion, L-Glutamyl-L-Cysteinyl-L-Glycin
GSSG	Glutathiondisulfid
HATU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HOAc	Essigsäure
HOAT	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol

## Abkürzungsverzeichnis

---

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50%, benötigte Konzentration für eine 50%ige Inhibition des Enzyms
MTB	Methyl- <i>tert</i> -butyl-ether
Mtr	N <sup>G</sup> -4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzylsulfonyl
NMP	<i>N</i> -methyl-pyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p. a.	pro analysi
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PDB	Protein Data Bank
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Petrolether
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
SPFS	surface plasmon fluorescence resonance, Oberflächen-Plasmon-Fluoreszenz-Resonanz
Tab.	Tabelle
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
Trr	Thioredoxin-Reduktase
Trt	Tryl
Trx	Thioredoxin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Azobenzol als reversibler Photoschalter .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Photochemische Eigenschaften .....	1
1.1.2	Anwendungen.....	5
1.1.2.1	Azobenzol als Bauteil molekularer Maschinen.....	5
1.1.2.2	Azobenzol in der Mikro-HPLC-Chromatographie .....	7
1.1.2.3	Azobenzol als Konformationsschalter .....	8
1.2	<b>Integrine .....</b>	<b>10</b>
1.3	<b>Das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI).....</b>	<b>15</b>
1.4	<b><math>\beta</math>-Hairpins als Tertiärstrukturelemente in Proteinen.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>23</b>
3.1	<b>4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (AMPB) als reversibler Photoschalter .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors.....	25
3.2	<b>Monocyclische RGD-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Modellverbindung .....	27
3.2.2	Design von monocyclischen RGD-Azopeptiden .....	29
3.2.3	Synthesen .....	32
3.2.3.1	Schutzgruppenabspaltung.....	35
3.2.3.2	Optimierte Synthesen .....	35
3.2.4	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung.....	36
3.2.5	CD-spektroskopische Charakterisierung.....	38
3.2.6	Bestimmung der thermischen Relaxationsraten $k_{ct}$ von RGD1 .....	39
3.2.7	Derivatisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 .....	40
3.2.8	SPFS-Messungen .....	42
3.2.9	NMR-spektroskopische Charakterisierung von RGD1 .....	45
3.2.10	Diskussion der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von RGD1.....	48
3.2.11	Vorgeschlagene Bindungsmodi an $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin.....	51
3.2.12	MD-Experimente zur Optimierung der monocyclischen RGD-Azopeptide....	52
3.3	<b>Mono- und bicyclische Biscysteinyl-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter 55</b>	<b>55</b>
3.3.1	Modellverbindungen .....	55
3.3.2	Synthesen .....	55
3.3.2.1	Schutzgruppenabspaltung.....	56
3.3.2.2	Oxidation zum Bicyclus .....	57
3.3.2.3	Optimierte Synthesen .....	58
3.3.3	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung.....	60
3.3.4	CD-spektroskopische Charakterisierung.....	63
3.3.5	NMR-spektroskopische Charakterisierung .....	64
3.3.6	Bestimmung der thermischen Relaxationsraten.....	68
3.3.7	Bestimmung der Redoxpotentiale von Azo-PDI.....	69
3.3.8	Verhalten von Azopeptiden in GSH/GSSG-Redoxpuffer.....	72

## Inhaltsverzeichnis

---

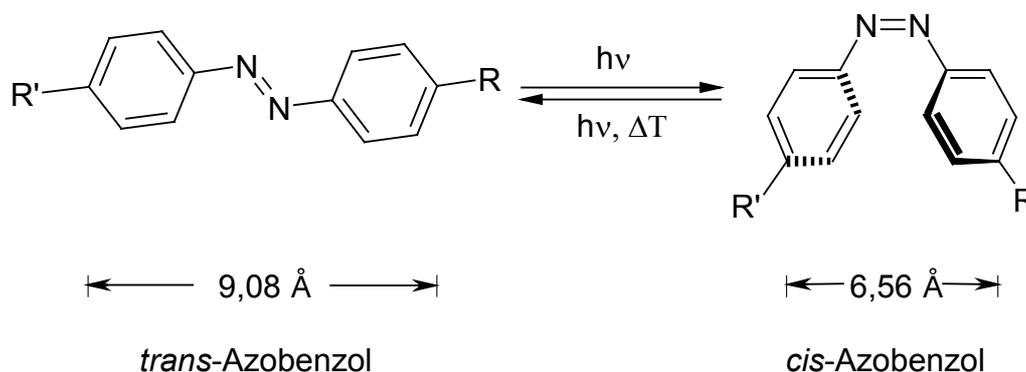
3.3.9	Autoxidation und –reduktion monocyclischer Biscysteiny-Azo peptide.....	75
3.3.10	Diskussion der Redoxpotentiale.....	76
3.3.11	UV/Vis-Femtosekundenspektroskopie.....	80
<b>3.4</b>	<b><math>\beta</math>-Hairpin-Modellverbindungen mit AMPP als Photoschalter .....</b>	<b>85</b>
3.4.1	3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (AMPP) als reversibler Photoschalter.....	85
3.4.1.1	Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors.....	85
3.4.1.2	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung.....	86
3.4.2	Modellverbindung AzoHP1 .....	87
3.4.3	Synthese .....	88
3.4.4	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung.....	89
3.4.5	CD-spektroskopische Charakterisierung.....	90
3.4.6	Modellverbindung AzoTrpZip2 .....	91
3.4.7	Synthese .....	91
3.4.8	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung.....	92
3.4.9	CD-spektroskopische Charakterisierung.....	92
3.4.10	Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung .....	96
3.4.11	FTIR-spektroskopische Charakterisierung.....	97
3.4.12	NMR-spektroskopische Charakterisierung .....	98
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>101</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>105</b>
5.1	Material und Methoden .....	105
5.2	Synthesevorschriften .....	112
5.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	112
5.2.2	Spezielle Synthesen.....	116
5.2.2.1	Synthese des Chromophors Fmoc-AMPB-OH .....	116
5.2.2.2	Synthesen der monocyclischen RGD-Azo peptide mit AMPB als Photoschalter .....	119
5.2.2.3	Synthesen der mono- und bicyclischen PDI-Azo peptide mit AMPB als Photoschalter .....	123
5.2.2.4	Synthese des wasserlöslichen AMPB-Photoschalters.....	128
5.2.2.5	Synthese des Chromophors Fmoc-AMPP-OH.....	128
5.2.2.6	Synthese der $\beta$ -Hairpin-Modellpeptide mit AMPP als Photoschalter.....	130
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Azobenzol als reversibler Photoschalter

### 1.1.1 Photochemische Eigenschaften

Azobenzol gehört zur Substanzklasse der Azoverbindungen und besitzt die für diese Verbindungen charakteristische Azogruppe  $-N=N-$ . Azoverbindungen zeichnen sich besonders durch ihre hohe thermische Stabilität und eher geringe Reaktivität aus. Die bedeutendste Eigenschaft der Azoverbindungen ist jedoch das Auftreten von zwei stabilen Konformationen, welche durch Isomerisierung der  $N=N$ -Doppelbindung gebildet werden. Diese werden als *cis*- bzw. *trans*-Konformation bezeichnet und konnten durch Röntgenbeugungsexperimente nachgewiesen werden (Hampson und Robertson, 1941). Die *trans*-Form ist im Allgemeinen die energieärmere und deshalb stabilere Spezies, während die *cis*-Form einen metastabilen Zustand darstellt (Rau, 1973). Unter geeigneten Bedingungen ist es sogar möglich, reine *cis*- und *trans*-Formen zu isolieren (Hartley, 1938). Die Umwandlung beider Konformere ineinander bezeichnet man als *cis*⇌*trans* Isomerisierung. Sie ist reversibel und wird hauptsächlich photochemisch durch Belichten mit blauem Licht oder UV-Strahlung geeigneter Wellenlänge initiiert. Dabei ist es möglich, sowohl von *trans* auf *cis*, als auch von *cis* auf *trans* zu isomerisieren. Ebenso kann sie thermisch oder elektrochemisch erfolgen.



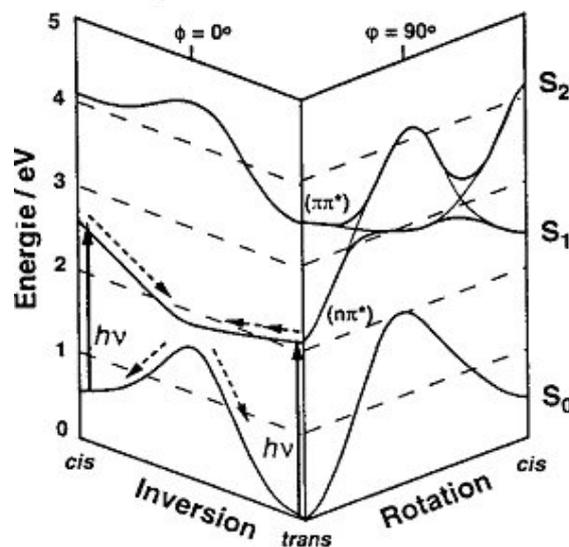
**Abb. 1-1:** *cis*⇌*trans* Isomerisierung von Diarylazoverbindungen.

Die *cis*⇌*trans* Isomerisierung ist eine Reaktion erster Ordnung und verläuft im Allgemeinen mit guten Quantenausbeuten. Infolge der Überlappung der *cis*- und

*trans*-Spektren treten photostationäre Zustände auf, die aus einer Mischung der beiden Isomere bestehen. Abb. 1-1 zeigt eine solche Isomerisierung mit Hilfe von Licht geeigneter Wellenlänge. Wie der Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol im Detail abläuft, wird seit ca. 60 Jahren experimentell und theoretisch untersucht, ist bis heute jedoch noch nicht endgültig verstanden. Man unterscheidet drei mögliche Isomerisierungsmechanismen (Rau, 1984; Lednev *et al.*, 1996; Biswas und Umpathy, 1995):

1. den Inversionsmechanismus;
2. den Rotationsmechanismus;
3. den „Hula-Twist“-Mechanismus.

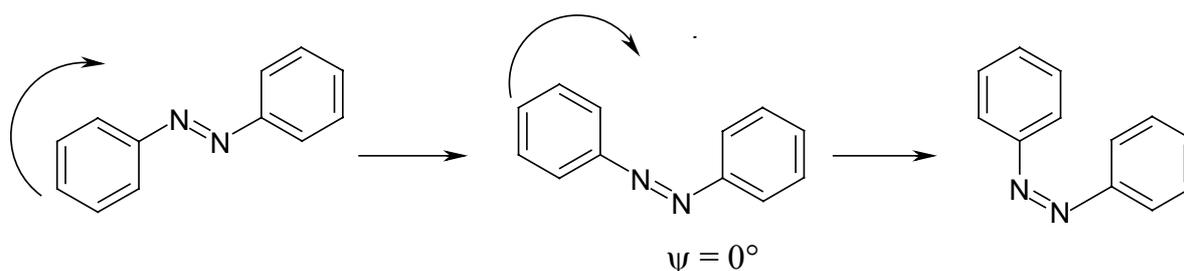
Welchen Isomerisierungsweg ein Molekül wählt, hängt von der Art seiner Anregung ab. Abb. 1-2 zeigt die für eine Photoreaktion theoretisch berechneten und mit Ultrakurzzeit-Messungen im UV/Vis-Bereich bestätigten Potentialkurven  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  der *cis*- und *trans*-Isomere des Azobenzols (Monti *et al.*, 1982).



**Abb. 1-2:** Die für die verschiedenen Isomerisierungsmechanismen des Azobenzols verantwortlichen Potentialkurven  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  (Monti *et al.*, 1982).

Geht ein Molekül nach Absorption eines Photons ( $h\nu$ ) geeigneter Wellenlänge vom Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  über ( $n\text{-}\pi^*$ -Übergang), so erfolgt die Relaxation des angeregten Moleküls zurück in den Grundzustand erst entlang der  $S_1$ -Potentialkurve der Inversion in ein gemeinsames Minimum ( $\psi = 0^\circ$ ) der *cis*- und

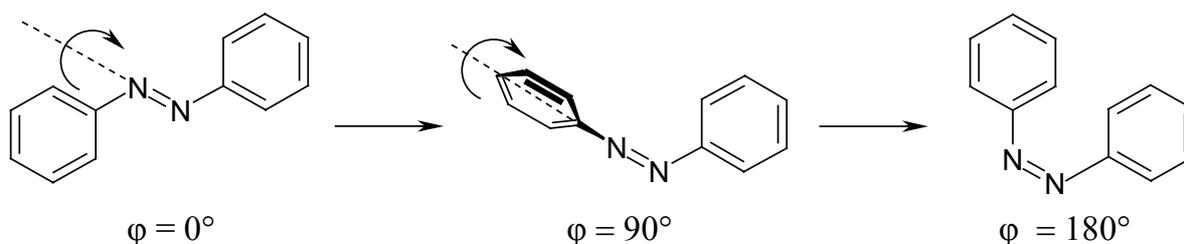
*trans*-Form. Die Steilheit beider Kurven in diesem Bereich lässt Rückschlüsse auf die Geschwindigkeiten dieser Prozesse zu. Für *cis*-Azobenzol wurden dafür experimentell 170 fs, für *trans*-Azobenzol 320 fs bestimmt (Nägele *et al.*, 1997). Die Energiebarriere für eine Isomerisierung über den Rotationsmechanismus liegt zu hoch. Ab diesem Punkt kann das Molekül mittels interner Konversion entweder durch Isomerisierung oder unter Beibehaltung seiner Konformation in den  $S_0$ -Zustand übergehen. Diesen Mechanismus nennt man den **Inversionsmechanismus** (siehe Abb. 1-3).



**Abb. 1-3:** *Inversionsmechanismus des Azobenzols bei Anregung in seinen  $S_1$ -Zustand.*

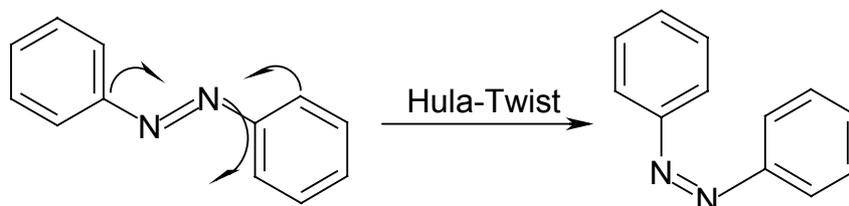
Er verläuft geometrisch in der Ebene entlang der Reaktionskoordinate  $\psi$  und durchschreitet für  $\psi = 0^\circ$  eine lineare N-N-Phenyl-Konformation.

Regt man mit Licht geeigneter Wellenlänge ein Molekül aus seinem Grundzustand  $S_0$  in seinen zweiten angeregten Zustand  $S_2$  an ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang), so wird, wie man an den Potentialkurven des  $S_2$ -Zustandes leicht erkennen kann (siehe Abb. 1-2), der **Rotationsmechanismus** favorisiert, da dieser die niedrigere Energiebarriere besitzt. Der Rotationsmechanismus besteht geometrisch aus einer Rotation des Phenylrings um die N-N-Bindungsachse um  $\varphi = 180^\circ$ . Für  $\varphi = 90^\circ$  stehen die Ebenen der beiden Phenylringe senkrecht zueinander (siehe Abb. 1-4).



**Abb. 1-4:** *Rotationsmechanismus des Azobenzols bei Anregung in seinen  $S_2$ -Zustand.*

Eine weitere Möglichkeit der Isomerisierung des Azobenzols könnte der „Hula-Twist“-Mechanismus sein (siehe Abb. 1-5). Dieser wurde 1985 von Liu und Asato (1985) postuliert, ehe er 1998 von Muller *et al.* (1998) an einem geeigneten Molekül erstmals spektroskopisch bewiesen wurde. Er findet meist in festen Lösungen und bei tiefen Temperaturen statt (Liu und Hammond, 2000). Da hier nur der Mittelteil des Moleküls rotiert, spricht man von einer „Hula-Twist-Isomerisierung“. Seine Bewegungsart ist räumlich wenig anspruchsvoll und so sogar in einer festen Matrix möglich. Die „Hula-Twist-Isomerisierung“ wurde auch für die Rhodopsin-Isomerisierung postuliert, da sich nur auf diese Weise plausibel erklären lässt, wie in der engen Opsinmatrix die steife Polyenkette des Retinalchromophors um eine zentrale Doppelbindung isomerisieren kann (Liu und Hammond, 2001).



**Abb. 1-5:** Postulierter „Hula-Twist“-Mechanismus des Azobenzols.

Allen Isomerisierungen ist dabei gemein, dass sich die Eigenschaften des Moleküls ändern. So ändert sich sowohl dessen Geometrie als auch dessen Polarität. Die Geometrieänderung wird dabei durch die abgewinkelte *cis*-Konformation, in der sich die beiden *para*-C-Atome der beiden Phenylringe wesentlich näher kommen als in der langgestreckteren *trans*-Konformation, hervorgerufen. Zudem geht die in der *trans*-Konformation vorliegende Planarität in der *cis*-Konformation verloren, da aus sterischen Gründen ein leichtes Verdrillen der Phenylringe zueinander stattfindet. Das Dipolmoment ändert sich dabei von 0,5 D auf 3,1 D. Diese Eigenschaft macht es experimentell möglich reine *cis*- und *trans*-Formen zu isolieren (Brown, 1966).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Azobenzolderivate allen Anforderungen eines reversiblen Photoschalters genügen. Die Geschwindigkeit der Photoisomerisierung ist hoch (Nägele *et al.*, 1997), die Quantenausbeuten sind gut und Nebenreaktionen wie Photoreduktion, Photooxidation oder Photocyclisierung treten

gar nicht bzw. nur mit Quantenausbeuten von unter  $10^{-3}$  auf (Dürr und Bouas-Laurent, 1990).

Nachteile von Azobenzolderivaten sind die teilweise Überlappung der UV-Absorptionsbanden, welche zu einem Auftreten von photostationären Zuständen führen, die aus einer Mischung beider Isomere bestehen, sowie deren oft schwierige Synthese und schlechte Löslichkeit in sowohl wäßrigen als auch organischen Lösemitteln.

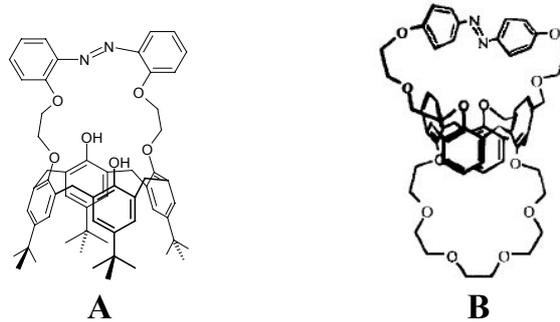
### 1.1.2 Anwendungen

#### 1.1.2.1 Azobenzol als Bauteil molekularer Maschinen

Azobenzolderivate werden aufgrund ihrer einfachen Isomerisierung durch Licht geeigneter Wellenlänge in Verbindung mit schnellen Isomerisierungsgeschwindigkeiten in der Synthese künstlicher molekularer Maschinen eingesetzt. Diese könnten in Zukunft eine große Rolle spielen und die heutige „top-down“-Strategie, d. h. die Miniaturisierung bestehender Systeme, um eine „bottom up“-Strategie ergänzen. So wurden bis heute z. B. molekulare Schalter (Shinikai *et al.*, 1985), molekulare Shuttles (Murakami *et al.*, 1997) und molekulare Rotoren (Feringa *et al.*, 1991) auf Basis von Azobenzolbausteinen synthetisiert.

Hamada *et al.* (1995) synthetisierten Calix[4]arene, die mit einem Azobenzolphotoschalter ausgestattet sind. Diese Moleküle besitzen die Fähigkeit, abhängig von ihrer Konformation Metallionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Al}^{3+}$  mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, welche mittels NMR-Spektroskopie bestimmt wurden, zu komplexieren. Im Gegensatz dazu beobachteten Saadioui *et al.* (1997a, b) eine Veränderung des *cis/trans*-Verhältnisses, welche in Folge einer Metallionkomplexierung eintrat. Sie modifizierten dazu 1,3-Calix[4]-*bis*-Kronenether mit einem Azobenzolchromophor, um künstliche allosterische Systeme herzustellen, in welchen eine Information von einer Seite der Calix[4]aren-Einheit auf die andere übermittelt werden sollte. Ihre Experimente mit dem Calix[4]aren **B** (siehe Abb. 1-6) zeigten, dass sich das *cis/trans*-Verhältnis des relaxierten Zustandes von 70:30 nach Zugabe der Metallkationen  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  zu 80:20, 80:20, 75:25 und 85:15

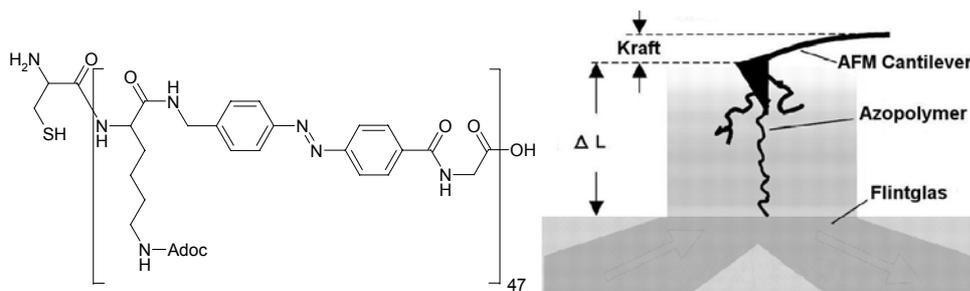
verändern ließ. Diese Verbindungen könnten in Zukunft vielleicht als Schalter für Konformationsänderungen verwendet werden.



**Abb. 1-6:** Molekülstrukturen der Calix[4]arene **A** und **B**.

Ziel der Arbeiten von Pipoosananakaton *et al.* (2000) war es, ein lichtschtbares System zu synthetisieren, welches selektiv  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Ionen bindet, um auf diesem Wege die biologische  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe nachzuahmen. Das Calix[4]aren **A** (siehe Abb. 1-6) ist nach Messungen in der Lage, in der *cis*-Konformation selektiv  $\text{Na}^+$  zu komplexieren, während es in seiner *trans*-Konformation selektiv  $\text{K}^+$  zu binden vermag. Dieses System könnte somit in der Lage sein, je nach Isomerisierungszustand des Azobenzols, als lichtschtbarer Rezeptor oder Sensor für  $\text{Na}^+$ - bzw.  $\text{K}^+$ -Ionen in molekularen Maschinen zu arbeiten.

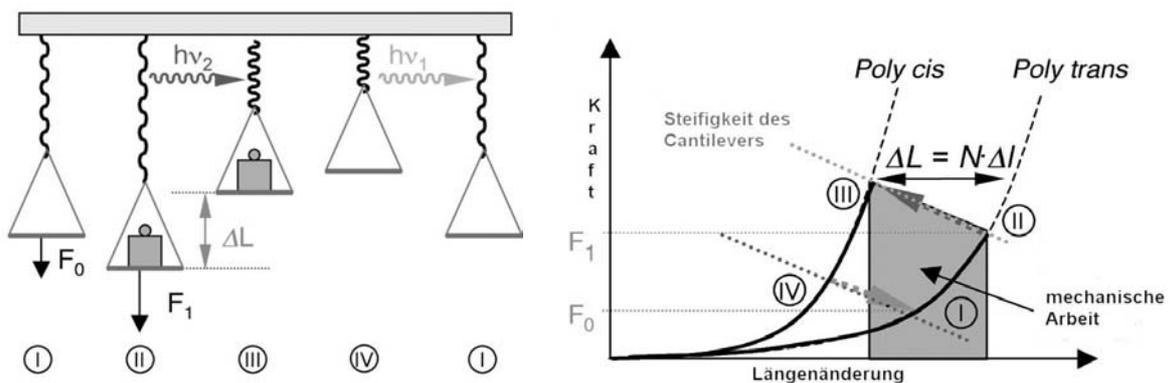
Ein Highlight in der Forschung an molekularen Maschinen stellt eine von Hugel *et al.* (2002) vorgestellte lichtgetriebene molekulare Maschine dar, in welcher ein sog. Azopolymer bestehend aus 47 (Lys-AMPB-Gly)-Triplets als lichtschtbare Einheit fungiert (siehe Abb. 1-7). Diese ist kovalent zwischen einem goldbeschichteten Cantilever (Au-S-Bindung) und einem mit *N'*-[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]-diethylentriamin aminofunktionalisiertem Flintglas (Amidbindung mit endständigem Glycin) gebunden.



**Abb. 1-7:** Molekülstruktur des Azopolymers und schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (Hugel *et al.*, 2002).

Das Belichten mit Laserpulsen bei 365 nm führt zu einer Verkürzung des im gestreckten *trans*-Zustand vorliegenden Polymers um  $\Delta L = 2,8$  nm, welche durch Einstrahlen von Laserpulsen bei 420 nm rückgängig gemacht werden kann. Es ist also in einem Gedankenexperiment möglich, einen Kreisprozeß zu konstruieren, der mechanische Arbeit liefert (siehe Abb. 1-8).

Das Polymer wird zunächst mit einer Kraft  $F_0$  vorgedehnt (I) und dann ein Gewicht  $F_1$  addiert (II), durch welches das Polymer gestreckt wird. Anschließendes Belichten verkürzt das Polymer, wobei es das Gewicht anhebt (III). Dieses wird entfernt (IV) und darauf das Polymer in seinen ursprünglichen Zustand zurückbelichtet (I). Durch alternierende Einstrahlung der Laserpulse sollte man so bei jedem Durchlaufen des Kreisprozesses mechanische Arbeit verrichten können.



**Abb. 1-8:** Gedankenexperiment und schematische Darstellung des Kreisprozesses (Hugel et al., 2002).

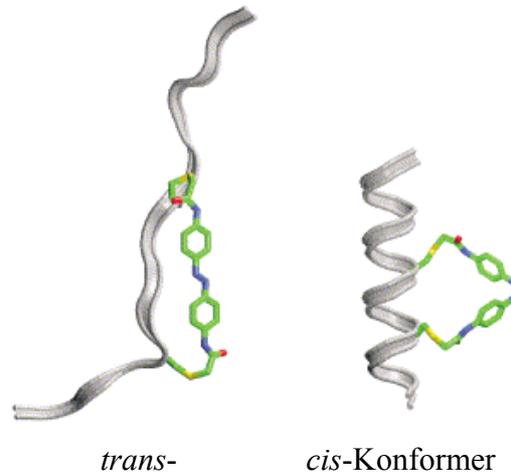
SMFS (single molecule force spectroscopy)-Versuche zeigen, dass mit einer geeigneten Versuchsanordnung das obige Gedankenexperiment bestätigt werden kann. Es wird jedoch lediglich ein Wirkungsgrad von  $\eta = 0,1$  erreicht. Dieses System ist somit in der Lage mit Hilfe optischer Anregung mechanische Arbeit zu verrichten.

### 1.1.2.2 Azobenzol in der Mikro-HPLC-Chromatographie

Azobenzolderivate kommen auch in der Chromatographie zum Einsatz. Dabei werden Azobenzol-modifizierte stationäre Phasen in HPLC-Trennsäulen verwendet. Diese werden, sowohl durch Belichten mit geeigneter Wellenlänge, als auch durch Temperaturänderung in ihrer Geometrie so verändert, dass sich daraus



symmetrischen Azobenzolbaustein, der über zwei Cysteinreste an ein lineares Peptid, welches als Struktur bevorzugt eine  $\alpha$ -Helix ausbildet, angeknüpft wurde (siehe Abb. 1-10).



**Abb. 1-10:** Strukturen des Azopeptids in *cis*- und *trans*-Konformation (Flint et al., 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, den Helixgehalt dieses Peptids durch *cis*⇌*trans* Isomerisierung des Azobenzolteils zu modulieren. Eine CD-spektroskopische Charakterisierung des synthetischen Azopeptids ergab, dass das Peptid in seiner *trans*-Konformation eine relativ ungeordnete Struktur mit leichten  $\alpha$ -Helix-Anteilen (ca. 12%) einnimmt, welcher nach Belichten bei 380 nm abhängig vom Lösemittel jedoch auf 48% erhöht werden konnte. Der in seiner *cis*-Konformation geometrisch kürzere Azobenzolbaustein erzwingt dabei eine Konformationsänderung im restlichen Peptidrückgrat, so dass  $\alpha$ -Helix-stabilisierende Faktoren besser erfüllt werden können. Da die Funktion von Proteinen stark mit deren Struktur verknüpft ist, könnte somit die Aktivität von Proteinen mit hohem  $\alpha$ -Helix-Anteil gesteuert werden.

### 1.2 Integrine

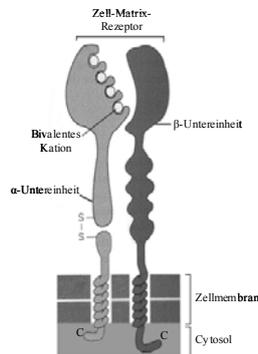
Integrine sind in der Zellmembran lokalisierte Oberflächenrezeptoren, die erstaunlich ähnliche Strukturen und Funktionen aufweisen. Sie unterscheiden sich von Oberflächenrezeptoren für Hormone oder andere kleine Signalmoleküle hauptsächlich darin, dass sie 10-100fach häufiger in Zellmembranen vorkommen und ihre Liganden mit relativ geringer Affinität zu binden vermögen (Alberts *et al.*, 1994). Viele intra- und interzelluläre Signalwege werden mit Hilfe von Integrinen gesteuert, da sie sowohl *inside-out* als auch *outside-in* Signale verarbeiten können (Takagi *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft ermöglicht es ihnen, intrazelluläre Signale an ihre extrazelluläre Umgebung weiterzugeben, und umgekehrt auf extrazelluläre Signale intrazellulär zu reagieren. So sind sie an vielen zellulären Prozessen wie Embryogenese, Differenzierung, Proliferation, Stressantwort, Morphogenese, Tumorwachstum und Apoptose direkt oder indirekt beteiligt (Gottschalk und Kessler, 2002). Hauptsächlich sind sie jedoch für Zell-Matrix-Adhäsionen und den damit verbundenen Signalen zuständig. Hierbei kommt es zur Interaktion mit Glycoproteinen der Extrazellulären-Matrix wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin (Berman *et al.*, 2003). Diese Interaktionen können zur Bildung von homo- oder heterogenen Integrinclustern führen, welche ihrerseits durch Reaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts (Aktin, Paxillin, Vinkulin, usw.) sog. fokale Adhäsionen auslösen können. Die Entdeckung der Überexpression spezieller Integrintypen auf Tumorzellen, machte Integrine in den letzten Jahren zu vielversprechenden Zielmolekülen in der Krebsforschung (Ling *et al.*, 2000; Curley *et al.*, 1999).

Jeder Rezeptor der Integrinfamilie ist ein Heterodimer und besteht aus einer ca. 150-180 kDa schweren  $\alpha$ - und einer ca. 95-117 kDa schweren  $\beta$ -Untereinheit, welche jedoch nicht kovalent miteinander verbunden sind (Arnaout, 2002). Bis heute sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und acht verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten bekannt (Plow *et al.*, 2000), welche sich in bestimmten Kombinationen zu den heterodimeren Integrinen zusammenlagern. Verschiedene Subtypkombinationen führen zu unterschiedlichen Spezifitäten in der Ligandenerkennung und bestimmen somit die Funktion und Wirkungsweise des Integrins.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind Transmembranglycoproteine und bestehen aus einer extrazellulären Domäne

## Einleitung

---

(Kopffregion), einer cytoplasmatischen Domäne und aus einer diese Domänen verbindenden Transmembrandomäne (siehe Abb. 1-11).



**Abb. 1-11:** Schematische Darstellung eines Integrin-Heterodimers und dessen Lokalisierung in der Zellmembran; zu erkennen sind die cytosolischen Integrinschwänze, die Transmembrandomäne sowie die extrazellulären Domänen des Integrins.

Die Kopfgruppen beider Untereinheiten assoziieren außerhalb der Zelle und bilden gemeinsam den Integrinrezeptor. Für Ligandenbindung und Signaltransduktion spielen dabei sowohl die Kopfgruppen als auch die cytoplasmatischen Domänen eine entscheidende Rolle (Berman *et al.*, 2003).

Die Kopffregionen der  $\alpha$ -Untereinheiten bestehen aus sieben aneinander gereihten homologen Domänen (I-VII), welche zusammen eine siebenblättrige  $\beta$ -Propellerstruktur ausbilden (Springer, 1997). Manche  $\alpha$ -Untereinheiten tragen zwischen Domäne II und III eine zusätzliche, für die Ligandenbindung überaus wichtige Domäne, die sog. I- oder  $\alpha$ A-Domäne. Diese nimmt als Struktur eine Rossmann-Faltung ein (Lee *et al.*, 1995). An der Spitze dieser Einheit ist eine weitere Region, die MIDAS (**m**etal **i**on **d**ependent **a**dhesion **s**ite)-Region lokalisiert.

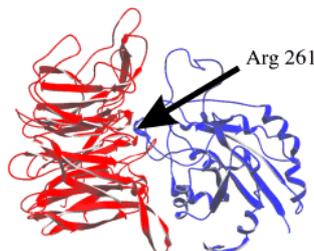
Diese Bindungstasche ist für die Funktion von Integrinen mit I-Domänen enorm wichtig. Sie kann Glutamat- oder Aspartatreste binden, und so verwundert es nicht, dass alle Integrinliganden einen entscheidenden Glutamat- oder Aspartatrest in ihrer Sequenz aufweisen. Die Kopffregionen der  $\beta$ -Untereinheiten besitzen eine zur I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheiten strukturell sehr ähnliche Domäne, die sog. I-ähnliche, oder  $\beta$ A-Domäne. Sie nimmt als Struktur ebenfalls eine Rossmann-Faltung ein und besitzt eine MIDAS-Region mit zugehörigem MIDAS-Motiv.

Die Struktur des  $\alpha V\beta 3$ -Integrins, welches keine I-Domäne besitzt, wurde 2001 von Xiong *et al.* (2001 ; PDB-Eintrag: 1JVC) gelöst. Sie ist in Abb. 1-12 gezeigt.



**Abb. 1-12:** Domänenstruktur des  $\alpha V\beta 3$ -Integrins; zum besseren Verständnis wurde die tatsächliche V-förmige Struktur um ca.  $135^\circ$  (siehe  $\blackrightarrow$ ) im Uhrzeigersinn gedreht (Xiong *et al.*, 2001).

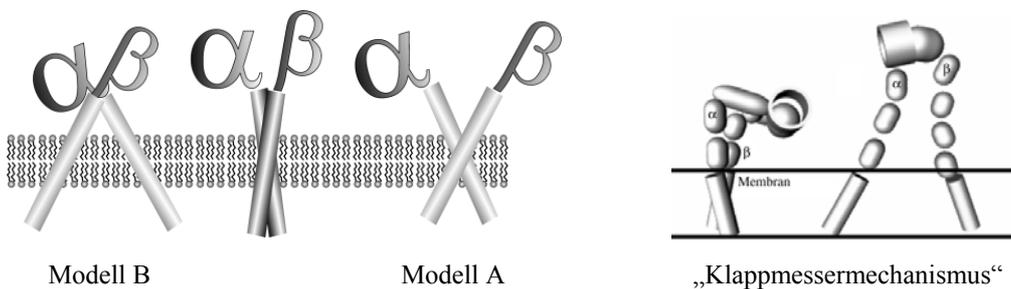
Die eiförmige Kopfgruppe des  $\alpha V\beta 3$ -Integrins besitzt im  $\alpha V$ -Teil eine siebenblättrige  $\beta$ -Propeller-Struktur, in der jedes Blatt aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt besteht. In der  $\beta 3$ -Untereinheit befindet sich eine  $\alpha A$ -ähnliche Domäne, die  $\beta\alpha$  bezeichnet wird und eine Roßmann-Faltung ausbildet. Zusammen bilden sie eine enge Grenzfläche aus, wobei sich das ( $\beta$ )-Arg 261 in den Propeller der  $\alpha$ -Untereinheit einschreibt (siehe Abb. 1-13). Diese Struktur ist für die Ligandenbindung und Ligandenspezifität verantwortlich.



**Abb. 1-13:** Kopfgruppen des  $\alpha V\beta 3$ -Integrins;  $\alpha$ -(rot) und  $\beta$ -(blau) Untereinheiten bilden eine enge Grenzfläche, wobei sich das ( $\beta$ )-Arg 261 in den Propeller der  $\alpha$ -Untereinheit einschreibt (Gottschalk und Kessler, 2002).

Integrine können eine Vielzahl verschiedener Liganden binden. Das Fibronectin-Integrin  $\alpha 5\beta 1$  war dabei der erste Matrix-spezifische Rezeptor, der identifiziert wurde. Fibronectin enthält ein Aminosäuremotiv, das aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, genannt RGD-Motiv, gebildet wird und somit für die

Wechselwirkung des Fibronektins mit dem Rezeptor-Integrin und dessen Bindung verantwortlich ist (Plantefaber und Heynes, 1989). Bis heute sind weitere Integrine bekannt, die spezifisch RGD-Motive in Liganden erkennen und binden können (z. B.  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ). Die meisten Integrine binden jedoch nicht ausschließlich ein und denselben Liganden. So weisen Integrine Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Proteinen auf ( $\alpha V\beta 3$ -Integrin bindet z. B. Vitronektin, denaturiertes Kollagen, von Willebald Faktor, Fibrinogen, Thrombospondin, Fibulin und Osteopontin), welche ihrerseits wiederum an diverse Integrine binden können. So ist Vitronektin in der Lage, die Integrine  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha V\beta 5$  zu binden. Diese breite Ligandenspezifität wurde bis heute nicht eindeutig erklärt, ermöglicht der Integrinfamilie jedoch durch ihre Signalwirkungen an einer Vielzahl biologischer Funktionen teilzunehmen. Diese Signaltransduktionsprozesse verlaufen bidirektional, d.h. einige Signale laufen ins Zellinnere hinein (*Outside-in Signalling*) und führen dort zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, während andere Signale aus der Zelle heraus laufen (*Inside-out Signalling*) und durch Aktivierung und eventueller Umstrukturierung der Kopfgruppen z.B. eine Ligandenbindung ermöglichen (Takagi *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 1995). Für den Mechanismus der Signaltransduktion werden hauptsächlich zwei Mechanismen diskutiert (Hantgan *et al.*, 1999; Takagi *et al.*, 2001). Sie gehen beide von einer scherenförmigen Bewegung des Integrins aus, unterscheiden sich jedoch in der Lage des Drehpunktes (siehe Abb. 1-14).



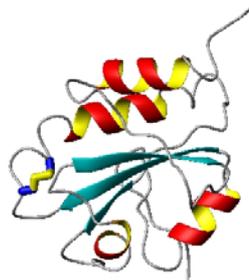
**Abb. 1-14:** Mögliche Mechanismen der Signaltransduktion von Integrinen; links: Modell A und B; rechts: „Klappmessermechanismus“ (Gottschalk und Kessler, 2002).

Modell A besitzt den Drehpunkt in der Membranregion und weist nach Ligandenbindung dissoziierte Kopfgruppen auf. Modell B nimmt den Drehpunkt nahe der Kopfgruppen an und postuliert weiterhin assoziierte Kopfgruppen. Modell B

wurde in letzter Zeit durch neuere Untersuchungen weiter verfeinert, indem ein sog. „Klappmesser“-Mechanismus vorgeschlagen wurde (siehe Abb. 1-14). Er besteht aus einer scherenförmigen Bewegung mit zusätzlichem Öffnen der geknickten Integrinstruktur, wie sie in der Kristallstruktur gefunden wird (Beglova *et al.*, 2002).

### 1.3 Das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)

Das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) wurde 1963 erstmals von Goldberger *et al.* (1963) aus Rattenleber isoliert. Es gehört zur Superfamilie der Protein-Thiol-Oxidoreduktasen, zu welcher auch die eukaryotischen Enzyme Thioredoxin, Glutaredoxin, Erp72 und die prokaryotischen Enzyme DsbA-C gehören. PDI besitzt eine Multidomänenstruktur, von denen vier eine sog. Thioredoxin-Faltung (siehe Abb. 1-15) aufweisen (Martin, 1995; Kemmink *et al.*, 1996).



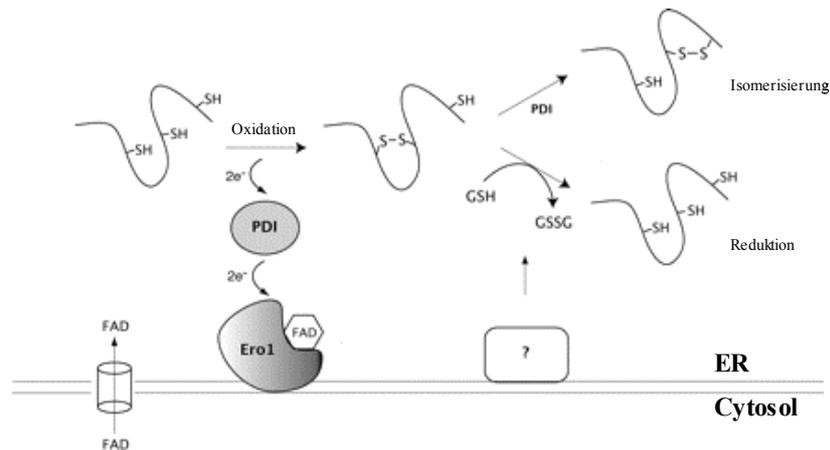
**Abb. 1-15:** Struktur der N-terminalen Domäne der Protein-Disulfid-Isomerase; die Disulfidbrücke des Biscysteinyl-Motivs ist in gelb veranschaulicht.

Zusätzlich existiert eine *c*-Domäne, die wahrscheinlich keine definierte Sekundär- oder Tertiärstruktur ausbildet, jedoch eine KDEL-Sequenz an dessen carboxyterminalem Ende enthält. Diese ist dafür verantwortlich, dass das Enzym im ER zurückgehalten wird und dort in bis zu millimolaren Konzentrationen auftritt (Zapun *et al.*, 1992; Kemmink *et al.*, 1997). Es gibt jedoch auch Bereiche ausserhalb des ER, in denen man PDI finden kann. Von den fünf Proteindomänen sind zwei redoxaktiv. Ihre redoxaktiven Zentren werden von den Aminosäuren -Cys<sup>35</sup>-Gly<sup>36</sup>-His<sup>37</sup>-Cys<sup>38</sup>- bzw. -Cys<sup>379</sup>-Gly<sup>380</sup>-His<sup>381</sup>-Cys<sup>382</sup>- gebildet (Edman *et al.*, 1985). Die zwei Biscysteinyl-Systeme sind in der Lage, unter physiologischen Bedingungen reversible Oxidations-Reduktionsreaktionen zu durchlaufen und ermöglichen die Funktion des PDI als Oxidoreduktase und Disulfidisomerase. Die beiden Cysteine können dabei jeweils mit freien SH-Gruppen (reduziertes PDI), als gemischte Disulfide, gebildet mit freien SH-Gruppen geeigneter Substrate, oder als einzelnes oxidiertes Disulfid (oxidiertes PDI) vorliegen. Für eine vollständige Funktion des PDI sind beide redoxaktive Zentren nötig. So führt die gezielte Mutation eines redoxaktiven Zentrums zu einer um 50% erniedrigten Aktivität, während Mutation beider redoxaktiver Zentren das PDI vollständig inaktiviert (Vouri *et al.*, 1992). Um diese Funktion aufrecht zu erhalten,

## Einleitung

benötigt PDI zusätzlich einen sog. Redoxregenerator. Dieser ist im Falle des PDI nicht wie ursprünglich vermutet Glutathion, sondern zusammen mit FAD das Protein Ero1p (Tu *et al.*, 2000).

Abb 1-16 zeigt den postulierten Mechanismus der oxidativen Proteinfaltung in Eukaryoten, in der PDI eine essentielle Rolle spielt.

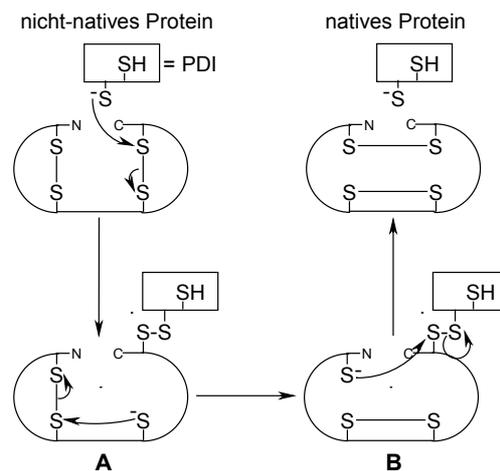


**Abb. 1-16:** Mechanismus der oxidativen Proteinfaltung in Eukaryoten (Tu und Weissmann, 2004).

Für eine effektive Aktivität des PDI ist zum einen der  $pK_a$ -Wert der Thiolgruppen der Cysteinreste und zum anderen der pH-Wert der Umgebung maßgebend. Die Thiolgruppe des N-terminalen Cysteinrestes besitzt im PDI einen  $pK_a$ -Wert von 4,5 (Kortemme *et al.*, 1996) und wird durch ein benachbartes Histidin stabilisiert (Huber-Wunderlich und Glockshuber, 1998). Dieser liegt dabei deutlich niedriger als der von Thiolen in Proteinen oder Peptiden. Hier werden typische  $pK_a$ -Werte von ca. 8,5 beobachtet. Da Thiolgruppen für einen nukleophilen Angriff deprotoniert sein müssen, bedingt dieser niedrige  $pK_a$ -Wert, dass PDI bei physiologischem pH-Wert im ER aktiv sein kann. Dabei wird mit einem geeigneten Substrat zuerst ein PDI-S-S-Substrat-Komplex als Zwischenprodukt gebildet, welcher von der Thiolgruppe des zweiten Cysteinrestes im Biscysteinyl-Motiv intramolekular angegriffen wird und ein reduziertes Substrat und ein oxidiertes PDI ergibt.

Obwohl PDI sequenziell und strukturell eng mit der Oxidoreduktase Thioredoxin verwandt ist, unterscheiden sich die zwei Proteine deutlich voneinander. Das Redoxpotential des PDI von -110 mV (Hawkins *et al.*, 1991)/ -175 mV (Lundström

und Holmgren, 1993) liegt im Vergleich zum Thioredoxin, welches ein Redoxpotential von -270 mV (Lin und Kim, 1989) besitzt, wesentlich höher und ermöglicht, dass PDI auch als oxidierendes Enzym auftreten kann. Zudem ist PDI aufgrund zusätzlicher Domänen in der Lage, Peptide und Proteine zu binden und die Rolle eines ATP-unabhängigen, redox-regulierten Chaperones zu spielen (Tsai *et al.*, 2001). Die Hauptaufgaben des PDI sind jedoch die Oxidation und Isomerisierung von Disulfidbrücken in Proteinen (siehe Abb. 1-17). In dieser Funktion hat PDI eine 40fach höhere Aktivität als Thioredoxin (Hawkins *et al.*, 1991). Dies hängt hauptsächlich mit der Struktur des PDI und mit dessen zur Isomerisierung geeigneten Redoxpotentialen und  $pK_a$ -Werten der beiden Biscysteinyll-Motive zusammen. Mit Hilfe des PDI können so nicht-native Disulfidbrücken in fehlgefalteten Proteinen in ihre native Form isomerisiert werden.

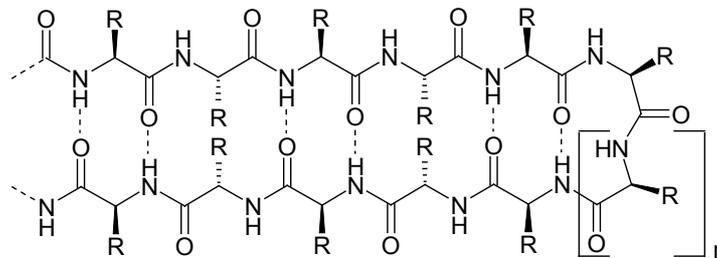


**Abb. 1-17:** PDI-katalysierter Isomerisierungsmechanismus von Disulfidbindungen.

Erster Schritt, des durch PDI katalysierten Isomerisierungsmechanismus von nicht-nativen Proteinen, ist der nukleophile Angriff des reduzierten PDI. Dieses greift mit dem Thiolatanion des N-terminalen Cysteinrestes das Substrat zuerst unter Bildung des gemischten Disulfides (A) an. Dieses kann durch intramolekularen Angriff des im Substrat neu gebildeten Thiolatanions zum gemischten Disulfid (B) umlagern. Das wiederum neu gebildete Thiolatanion greift schließlich unter Ausbildung des nativen Proteins die Substrat-PDI-S-S-Bindung an. Nach Katalyse der Isomerisierung liegt das PDI wieder als reduzierte Form vor.

## 1.4 $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelemente in Proteinen

Die wichtigsten Sekundärstrukturelemente in Proteinen sind  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter und Turns. Während in  $\alpha$ -Helices lokale (i, i+3)- und (i, i+4)-Wasserstoffbrückenbindungen für deren Stabilität verantwortlich sind, benötigen  $\beta$ -Stränge eine sie umgebende definierte räumliche Struktur, um stabil zu sein. Darunter sind die sog.  $\beta$ -Hairpins, in welchem zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge durch einen kleinen Loop miteinander verbunden sind, die kleinsten Strukturvertreter. Die Größe der Loops ist variabel und liegt zwischen zwei (n=1) und sechs (n=5) Aminosäuren (siehe Abb. 1-18). Am häufigsten werden jedoch zwei Aminosäuren angetroffen, welche sich in der Mitte eines  $\beta$ -Turns befinden (Sibanda und Thornton, 1986).



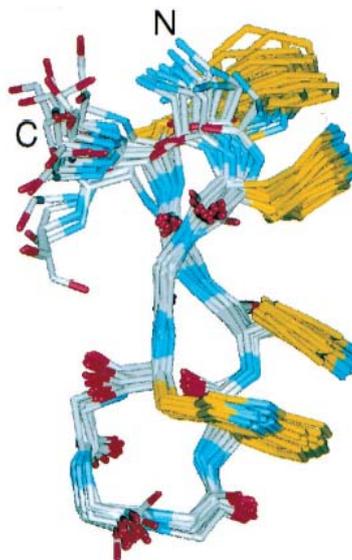
**Abb. 1-18:** Molekülstruktur eines  $\beta$ -Hairpins; die am häufigsten anzutreffende Loopgröße ist  $n=1$ ; R repräsentiert Aminosäureseitenketten; die gestrichelten Linien deuten Wasserstoffbrückenbindungen an.

$\beta$ -Hairpins tragen oft Bindungsepitope für spezielle Liganden und sind somit an biologisch relevanten Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligt. Blanco *et al.* (1991) synthetisierten das erste Modellpeptid, welches in wässriger Lösung eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur ausbildete. Die Sequenz dieses Peptids wurde aus den Aminosäuren 15-23 des Proteins Tendamistat abgeleitet, die im nativen Protein eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur ausbilden. Später wurden weitere  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptide synthetisiert und hauptsächlich in Bezug auf Struktur und Stabilität hin charakterisiert. Ihre Aminosäuresequenzen leiteten sich z. B. von Ubiquitin (Searle *et al.*, 1995) und der B1-Domäne des Proteins G (Blanco *et al.*, 1994) ab. Während  $\alpha$ -Helices seit Jahrzehnten charakterisiert wurden und immer noch werden, wurden  $\beta$ -Strukturen eher wenig untersucht. Ein Grund hierfür ist, dass  $\beta$ -Stränge, die einen  $\beta$ -Hairpin ausbilden, oft zur Aggregation neigen und  $\beta$ -Hairpins in wässriger Lösung, aufgrund fehlender Stabilisierung, durch zusätzliche Tertiärstrukturelemente nur wenig stabil sind (Blanco

*et al.*, 1991; Cox *et al.*, 1993). Diese Eigenschaften erschweren spektroskopische Untersuchungen an solchen Modellpeptiden. Synthetische  $\beta$ -Hairpin-Peptide könnten auch interessante pharmakologische Interferenzen in Protein/Protein-Interaktionen darstellen. Aufgrund dessen ist die Synthese und biophysikalische Charakterisierung solcher  $\beta$ -Hairpin-Peptide von aktuellster Bedeutung. So ist z.B. das  $\beta$ -Hairpin-Peptid H-WRYYESLEPYPD-OH in der Lage das normalerweise an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor bindende Schlangengift  $\alpha$ -Bungarotoxin mit hoher Affinität zu binden und dessen Giftigkeit für den Menschen zu neutralisieren (Scherf *et al.*, 2001).

### *Tryptophanzipper*

Eine bemerkenswerte Ausnahme von  $\beta$ -Hairpin-Strukturen, in Bezug auf Stabilität und spektroskopische Charakterisierbarkeit, bilden die erstmals von Cochran *et al.* (2001) vorgestellten Tryptophanzipper, welche in wässriger Lösung stabile  $\beta$ -Hairpins ausbilden. Diese Autoren synthetisierten vier Peptide mit einer Länge von zwölf bis 16 Aminosäuren, welche vier unterschiedliche Turnsequenzen aufwiesen. Die Aminosäuresequenzen ergaben sich dabei aus Stabilitätsstudien, welche Russel und Cochran (2000) an cyclischen, disulfidverbrückten Peptiden durchführten. Diese vier untersuchten Peptide bilden in wässriger Lösung äußerst stabile  $\beta$ -Hairpin-Strukturen aus. Abb. 1-19 zeigt repräsentativ die Struktur eines dieser vier Peptide. Es besitzt einen  $\beta$ II'-Turn.



**Abb. 1-19:** Struktur eines synthetischen Tryptophanzippers mit  $\beta$ II'-Turn; gut zu erkennen sind die strukturstabilisierenden Tryptophan/Tryptophan-Wechselwirkungen (Cochran *et al.* 2001).

Die Stabilität dieser  $\beta$ -Hairpin-Strukturen konnte mittels NMR-Strukturaufklärung den Tryptophan/Tryptophan-Wechselwirkungen zwischen den in der Struktur benachbarten, jedoch auf unterschiedlichen Strängen lokalisierten Tryptophanen zugeschrieben werden. Tryptophanzipper sind bis heute die kleinsten bekannten Modellverbindungen, welche eine stabile  $\beta$ -Hairpin-Struktur ausbilden und für ihre Stabilität weder eine Metallbindung, noch unnatürliche Aminosäuren oder Disulfidbrücken benötigen. Diese Strukturen scheinen in der Natur nicht vorzukommen, jedoch wird ein mögliches Auftreten eines Tryptophanzippers im V4-Loop des Glycoproteins GP120 des HIV diskutiert, da das diesen Loop ausbildende Peptidfragment H-TWTWNGSAWTWN-OH in wässriger Lösung in der Lage ist, eine stabile  $\beta$ -Hairpin-Struktur auszubilden (Cochran *et al.*, 2001). Da in der Kristallstruktur dieser Bereich jedoch nicht sichtbar ist (Kwong *et al.*, 1998), kann das Auftreten dieser Struktur nur vermutet werden.

## 2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, lichtsichtbare Peptide zu entwickeln, um biophysikalische und konformationelle Eigenschaften mit Licht zu steuern. Als reversible Lichtschalter sollten Azobenzolderivate verwendet werden, welche in synthetische Peptide mit „active-site“-Sequenzen von Enzymen und Zelladhäsionsmotiven eingebaut werden sollten. Diese Modellverbindungen sollten somit eine Photomodulation ihrer biologischen Funktion erlauben.

Als biologisch relevante Modellsysteme wurden die Bindung von Liganden an den Zelladhäsionsrezeptor  $\alpha V\beta 3$ -Integrin, das Redoxpotential der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und die Konformationsänderung eines  $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelement ausgewählt.

### *Integrine*

Es sollten an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin bindende, Azobenzol-enthaltende monocyclische Integrinliganden entworfen, synthetisiert und charakterisiert werden. Mittels Oberflächen-Plasmon-Fluoreszenz-Resonanz (SPFS, surface plasmon fluorescence)-Messungen sollten deren Bindungsaffinitäten an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin in ihren jeweiligen Isomerisierungszuständen gemessen und bei erfolgreicher Photomodulation (unterschiedlichen Bindungsaffinitäten) deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

### *Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)*

Es sollte ein, das Konsensusmotiv -Cys-Gly-His-Cys- des PDI aufweisendes, Azobenzol-enthaltendes bicyclisches Modellpeptid entworfen, synthetisiert und charakterisiert werden. Zudem sollte dessen Redoxpotential in seiner *cis*- und *trans*-Form mittels eines physiologisch relevanten GSH/GSSG-Redoxpuffers als Bezugssystem bestimmt werden und die so erhaltenen Ergebnisse mit früher synthetisierten, das Redoxmotiv der Thioredoxin-Reduktase aufweisenden, bicyclischen Azopeptiden verglichen werden. Die Strukturen der jeweiligen *cis*- und *trans*-Konformere sollten mittels NMR-Strukturanalyse gelöst und zur Erklärung des

Redoxverhaltens der Modellverbindungen herangezogen werden. Abschließend sollten die Peptide mittels Ultrakurzzeitspektroskopie untersucht werden, um etwaige Geschwindigkeitskonstanten, zum einen für den Azobenzolteil, zum anderen für das auf die Photomodulation reagierende Peptidrückgrat zu ermitteln.

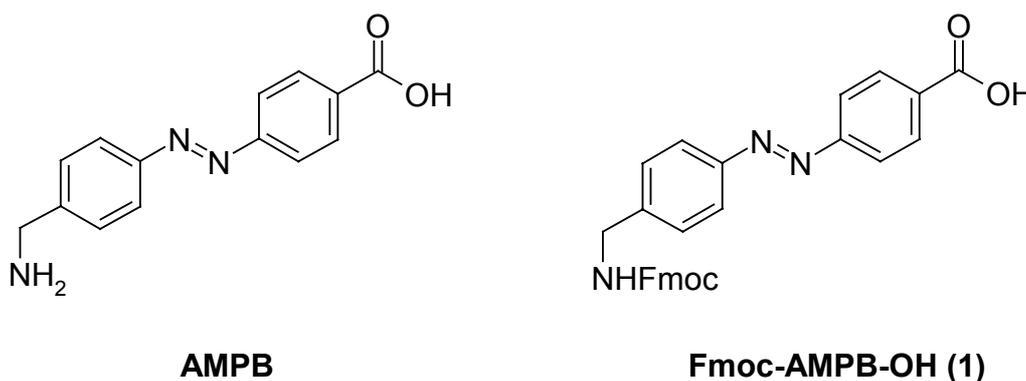
### *$\beta$ -Hairpins*

Die Photomodulation von  $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelemente von Proteinen sollte durch Einbau eines Azobenzolderivats in geeignete, die Struktur eines  $\beta$ -Hairpins ausbildende Modellverbindungen ausgeführt werden. Das geeignete Azobenzolderivat sollte mittels einfachem Molecular Modeling ermittelt und anschließend synthetisiert und charakterisiert werden. Dieser Photoschalter sollte in kleine stabile  $\beta$ -Hairpin-Modellverbindungen eingebaut, und diese anschließend charakterisiert werden. Bei erfolgreicher Photomodulation sollten die Strukturen der jeweiligen Konformere zusätzlich mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

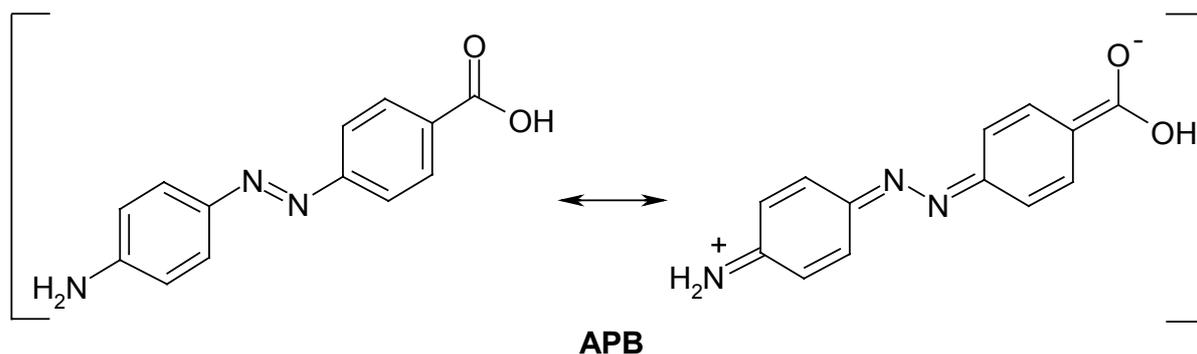
#### 3.1 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (AMPB) als reversibler Photoschalter

In der vorliegenden Arbeit wurde als reversibler Photoschalter die *para*-substituierte  $\omega$ -Aminosäure 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (AMPB) verwendet, welche in allen Synthesen als 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (Fmoc-AMPB-OH) **1** eingesetzt wurde (siehe Abb. 3-1). *Meta*- oder *ortho*-Substitutionen führen bei photochemisch induzierten *cis* $\rightleftharpoons$ *trans* Isomerisierungen erwartungsgemäß nur zu geringeren geometrischen Veränderungen des Azobenzolderivats und somit zu einer geringeren Effizienz der Photomodulation des Peptidrückgrats.



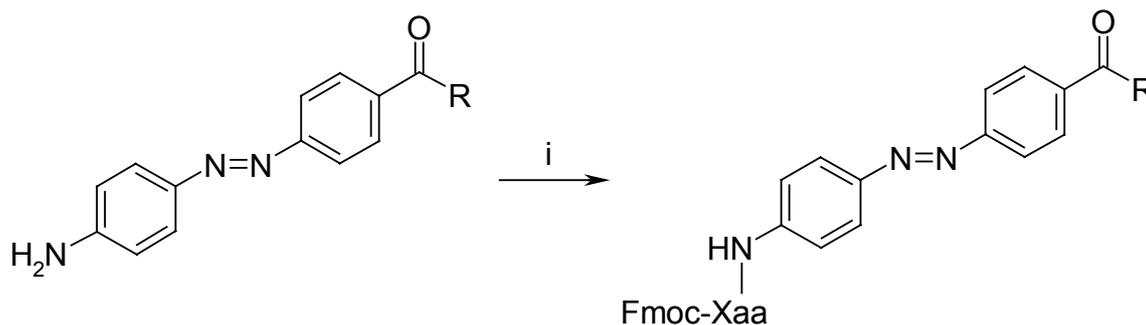
**Abb. 3-1:** 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (AMPB) und 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (Fmoc-AMPB-OH) **1**.

AMPB unterscheidet sich zu der in früheren Arbeiten häufig verwendeten 4-(4-Amino-phenylazo)-benzoesäure (APB) durch eine zusätzliche Methylengruppe (Renner *et al.*, 2000a; Behrendt *et al.*, 1999). Diese ist zwischen der 4'-Aminofunktion und dem Phenylring des Azobenzols lokalisiert und verhindert eine Delokalisation des freien Elektronenpaares der Aminogruppe über ein vollständig konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem des Azobenzols (siehe Abb. 3-2). Im APB ist diese Delokalisation durch den sog. Push-pull-Effekt der Amino- und Carboxygruppe derart stark ausgeprägt, dass die Nukleophilie und Reaktivität der Aminogruppe drastisch herabgesetzt wird.



**Abb. 3-2:** Push-pull-Effekt der 4-(4-Amino-phenylazo)-benzoesäure (APB).

Diese Eigenschaft bereitet in weiteren Syntheseschritten große Schwierigkeiten. So muß z. B. für die Reaktion des APB mit einer Fmoc-Aminosäure diese, wie in Abb. 3-3 gezeigt, häufig als Carbonsäurefluorid eingesetzt werden und die Aminogruppe des APB selbst mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid *in situ* silyliert werden.



i: 1. *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid/DIEA; 2. Fmoc-Xaa-F.

**Abb. 3-3:** Reaktion von APB mit Fmoc-Aminosäuren.

AMPB kann hingegen unter Standardbedingungen als Fmoc-AMPB-OH in der Peptidsynthese sowohl am Harz als auch in Lösung eingesetzt werden.

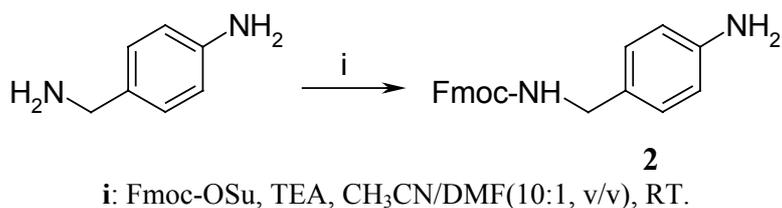
Die zusätzliche Methylengruppe des AMPB bietet zudem noch weitere Vorteile. Während APB als starrstes System aller  $\omega$ -Aminosäuren dieses Typus in der Synthese cyclischer Azopeptide einen Ringschluß erschwert, ist AMPB durch die zusätzliche Methylengruppe ein etwas flexiblerer Photoschalter, der sich deswegen auch leichter in kleinere Cyclopeptide einbauen lässt und diesen durch Bereitstellung zusätzlicher Konformationsfreiheitsgrade eine bessere Strukturausbildung ermöglichen kann. Die Effizienz der Lichtschaltung durch *cis*⇌*trans* Isomerisierung wird durch die

zusätzliche Methylengruppe nur gering beeinflusst (Ulysse *et al.*, 1995; Renner *et al.*, 2002).

### 3.1.1 Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors

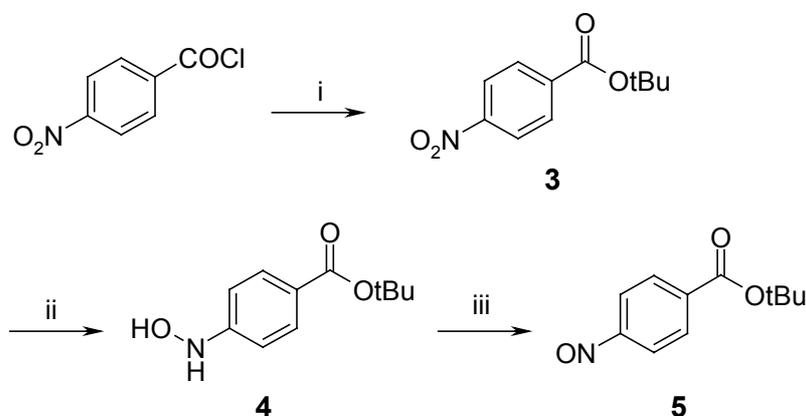
Die Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethylphenylazo)-benzoesäure (Fmoc-AMPB-OH) **1** wurde an einer Arbeit von Ulysse und Chmielewski (1994) ausgerichtet, in welcher die Azokupplung über eine Nitroso/Amin-Reaktion in Eisessig erfolgt.

Die dazu nötige Aminokomponente *N*-Fmoc-(4-Amino)-benzylamin **2** wurde jedoch nicht durch Hydrierung des *N*-Fmoc-(4-Nitro)-benzylamins synthetisiert, sondern durch direkte Acylierung von 4-Amino-benzylamin mit Fmoc-OSu in Acetonitril erhalten (siehe Abb. 3-4). Die geringere Nukleophilie von Phenylaminen gegenüber Benzylaminen ermöglicht dabei diese einfache Umsetzung zum gewünschten Produkt.



**Abb. 3-4:** Synthese der Aminokomponente *N*-Fmoc-(4-Amino)-benzylamin **2**.

Die Darstellung der Nitrosokomponente 4-Nitroso-benzoesäure-*tert*-butylester **5** erfolgte über drei Stufen (siehe Abb. 3-5).

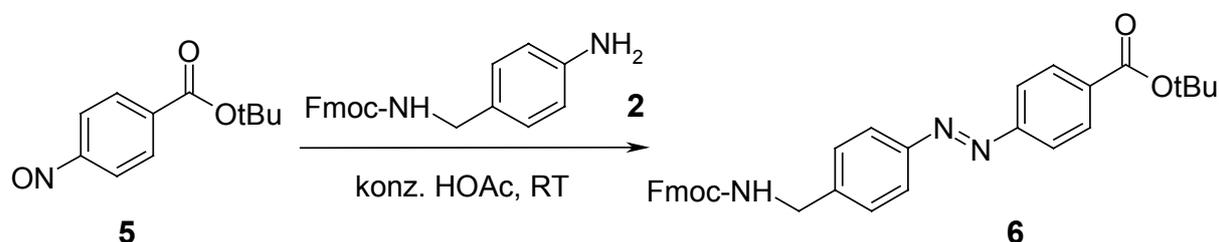


i: LiOtBu, 0 °C, THF; ii: Zn, NH<sub>4</sub>Cl, 2-Methoxyethanol, RT; iii: FeCl<sub>3</sub>, EtOH/H<sub>2</sub>O(1:10, v/v), 0 °C.

**Abb. 3-5:** Synthese der Nitrosokomponente 4-Nitroso-benzoesäure-*tert*-butylester **5**.

Im ersten Schritt wird 4-Nitro-benzoesäurechlorid in THF mit Lithium-*tert*-butanolat zum gewünschten 4-Nitro-benzoesäure-*tert*-butylester **3** umgesetzt. Dieser wird im darauf folgenden Schritt in 2-Methoxyethanol mit Zink zum Hydroxylaminoderivat **4** reduziert. Dabei wurde zur Aufrechterhaltung eines günstigen pH-Wertes der Reaktionslösung zuerst die gesamte berechnete Menge an Ammoniumchlorid zugegeben, bevor mit der portionsweisen Zugabe des Zinkstaubes begonnen wurde. Zu jeder Portion Zinkstaub wurde zudem eine äquivalente Menge zusätzliches Ammoniumchlorid gegeben. Die gewünschte Nitrosokomponente **5** wird abschließend durch Oxidation des 4-Hydroxylamino-benzoesäure-*tert*-butylesters **4** mit FeCl<sub>3</sub> in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (1:10, v/v) erhalten.

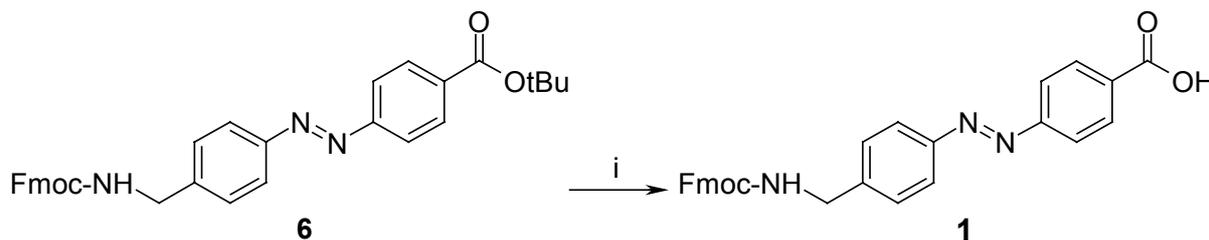
Die Azokupplung via Nitroso/Amin-Reaktion erfolgt, wie in Abb. 3-6 gezeigt, in Eisessig. Dabei wurden zuerst 1,5 eq. 4-Nitroso-benzoesäure-*tert*-butylester **5** in so wenig Eisessig wie möglich vorgelegt, bevor das *N*-Fmoc-(4-Amino)-benzylamin **2** zugegeben wurde. Bei umgekehrter Reihenfolge kann ein partielles Ausfallen der Aminokomponente als Acetatsalz aus der Reaktionslösung zu einem unvollständigen Reaktionsverlauf führen, während eine Reaktion in zu verdünnter Lösung nicht zum Ausfallen des gewünschten Azobenzolderivats 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure-*tert*-butylester **6** aus der Reaktionslösung führt und einen zusätzlichen Reinigungsschritt nach sich zieht. Überschüssige Nitrosokomponente lässt sich sehr leicht durch Waschen des ausgefallenen Produktes mit wenig Eisessig entfernen.



**Abb. 3-6:** Darstellung von 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure-*tert*-butylester **6** via Nitroso/Amin-Reaktion in Eisessig.

Der letzte Schritt in der Synthese der 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (Foc-AMPB-OH) **1** war die Spaltung des *tert*-Butylesters **6**, welche mit kat. *p*-Toluolsulfonsäure in Benzol durchgeführt wurde (siehe Abb. 3-7). Das

gewünschte Produkt fällt dabei nach ca. 30 min Reaktionszeit aus der Reaktionslösung aus.



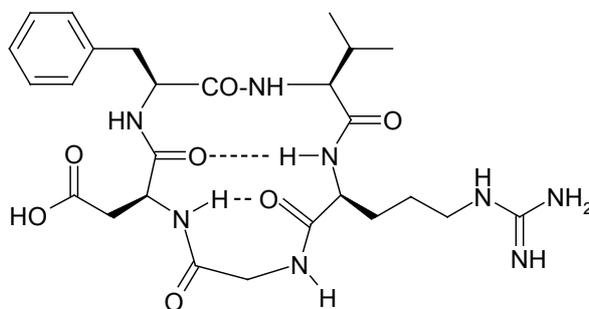
i: Benzol, kat. *p*-Toluolsulfonsäure, Rückfluß.

**Abb. 3-7:** Darstellung von 4-(4-N-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (Fmoc-AMPB-OH) **1** durch Esterspaltung von **6** mit kat. *p*-Toluolsulfonsäure.

## 3.2 Monocyclische RGD-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter

### 3.2.1 Modellverbindung

Das Design der monocyclischen RGD-Azopeptide stützte sich auf das von Kessler und Mitarbeitern vorgestellte Cyclopentapeptid *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-] (siehe Abb. 3-8). Dieses ist in der Lage, das  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $0,049 \pm 0,019 \mu\text{M}$  zu binden (Pfaff *et al.*, 1994).

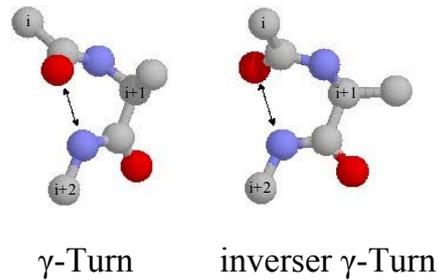


**Abb. 3-8:** Strukturformel des *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-]; der  $\beta$ II'-Turn ist in der oberen Hälfte des Moleküls lokalisiert, der  $\gamma$ -Turn in der unteren Hälfte; die zur Ausbildung der Struktur verantwortlichen Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt eingezeichnet.

Es besitzt eine all-*trans* Konformation mit einem  $\beta$ II'- und einem  $\gamma$ -Turn (Aumailley *et al.*, 1991).

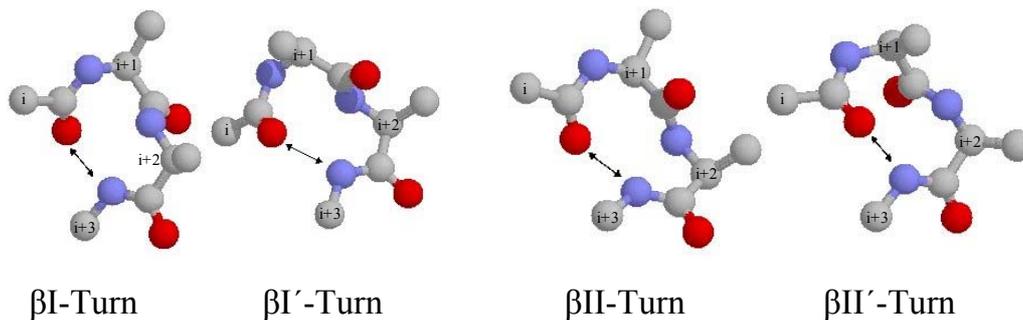
Ein  $\gamma$ -Turn besteht aus drei Aminosäuren und gibt dem Peptidrückgrat die Möglichkeit, seine Richtung zu ändern (siehe Abb. 3-9). Die den Turn stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure in (i) Position und dem Amidwasserstoffatom der Aminosäure in (i+2)

Position gebildet.



**Abb. 3-9:**  $\gamma$ -Turns; die den jeweiligen Turn stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung ist durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet.

Ein  $\beta$ -Turn besteht aus vier Aminosäuren und gibt dem Peptidrückgrat die Möglichkeit, seine Richtung zu ändern. Die den Turn stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure in (i) Position und dem Amidwasserstoffatom der Aminosäure in (i+3) Position gebildet. Man kennt drei verschiedene Arten von  $\beta$ -Turns, den  $\beta$ I-, den  $\beta$ II- und den  $\beta$ III-Turn. Letzterer stellt jedoch nur einen einfachen Turn einer  $3_{10}$ -Helix dar. Sämtliche  $\beta$ -Turns existieren, wie in Abb. 3-10 gezeigt, zusätzlich in einer in Bezug auf das Peptidrückgrat spiegelbildlichen Konformation und werden als  $\beta$ I'-,  $\beta$ II'- und  $\beta$ III'-Turn bezeichnet. Diese treten bis auf den  $\beta$ I'-Turn, welcher bevorzugt in  $\beta$ -Hairpins vorkommt, sehr selten auf.



**Abb. 3-10:**  $\beta$ -Turns; die den Turn stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung ist durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet.

Im monocyclischen Pentapeptid  $c$ [Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-] wird der  $\beta$ II'-Turn von den vier Aminosäuren Asparaginsäure, D-Phenylalanin, Valin und Arginin gebildet, in welchem D-Phenylalanin die (i+1) Position besetzt. Die stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung wird vom Amidwasserstoffatom des Arginins und vom

Carbonylsauerstoffatom des Aspartats ausgebildet. Der  $\gamma$ -Turn wird von den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat, dem sog. RGD-Motiv gebildet, mit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidwasserstoffatom des Aspartats und dem Carbonylsauerstoffatom des Arginins.

### 3.2.2 Design von monocyclischen RGD-Azozeptiden

Laut Molecular Modeling wurde vermutet, dass sich durch Einbau des AMPB-Photoschalters die Struktur des Cyclopeptids zwar in gewissem Maße verändert, der  $\gamma$ -Turn des RGD-Motivs jedoch weitgehend erhalten bleibt und das Peptid weiter in der Lage ist,  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin zu binden. Aus diesem Grunde darf der AMPB-Photoschalter die RGD-Sequenz nicht unterbrechen. Die Abfolge der restlichen Aminosäuren sollte beibehalten werden, da die Synthese der cyclischen RGD-Azozeptide mit der an der Ausbildung des  $\beta$ II'-Turns beteiligten Aminosäuren D-Phenylalanin und Valin leichter erfolgen sollte.

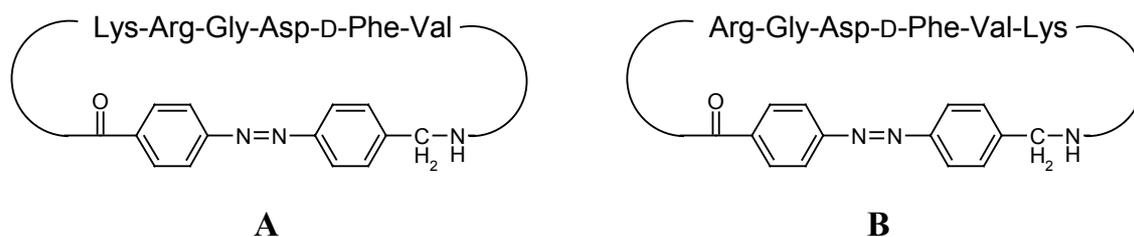
Ursprüngliche Idee war es, die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der synthetischen monocyclischen RGD-Azozeptide in ihrer *cis*- und *trans*-Konformation an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR, surface plasmon resonance) zu quantifizieren.

Bei dieser Methode wird einer der beiden Reaktionspartner chemisch auf einer Goldoberfläche fixiert. Lässt man nun über diese modifizierte Goldoberfläche eine Lösung des Analyten strömen, so erhält man bei dessen Bindung an den Liganden ein Signal, das auf eine Änderung der Massendichte in der Grenzschicht zurückzuführen ist. Die Stärke des Signales ist dabei zur Menge an gebundenem Analyten direkt proportional.

Der Analyt sollte in diesem Experiment lösliches  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin sein, der Ligand das synthetische monocyclische RGD-Azozeptid.

Da unserer Arbeitsgruppe lösliches  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin für Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen jedoch nicht zugänglich war, mußte eine andere Meßmethode verwendet werden und zwar die Oberflächen-Plasmon-Fluoreszenz-Resonanz-Spektroskopie (SPFS, surface plasmon fluorescence resonance).

Bei dieser Methode können experimentell bedingt nur mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyten verwendet werden.  $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-AMPB-}]$  lässt eine solche Derivatisierung jedoch nicht zu. Folglich mußte ein zusätzlicher derivatisierbarer Aminosäurerest in das Peptidrückgrat eingebaut werden, der diese Fluoreszenzmarkierung ermöglicht. Die Wahl fiel auf ein zusätzliches Lysin im Peptidrückgrat, welches über seine  $\epsilon$ -Aminofunktion eine einfache Derivatisierungsmöglichkeit eröffnet. Instrumentell bedingt war dafür der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 der Firma *Amersham Pharmacia* (Uppsala, S) vorgesehen. Da das zusätzliche Lysin entweder vor oder nach dem AMPB-Photoschalter in die Peptidsequenz eingebaut werden kann, ergaben sich zwei, in Abb. 3-11 dargestellte, mögliche konstitutionsisomere monocyclische RGD-Azopeptide  $c[\text{Asp-D-Phe-Val-AMPB-Lys-Arg-Gly-}]$  (**A**) und  $c[\text{Asp-D-Phe-Val-Lys-AMPB-Arg-Gly-}]$  (**B**).



**Abb. 3-11:** Molekülstrukturen der konstitutionsisomeren monocyclischen RGD-Azopeptide *A* und *B*.

Die Synthese kleiner Cyclopeptide kann jedoch Schwierigkeiten bereiten. Obwohl eine große Anzahl von Kupplungsreagenzien und Kupplungsmethoden existieren, kann es möglich sein, dass ein gewünschtes Cyclopeptid synthetisch nicht zugänglich ist (Gilon *et al.*, 2003).

Die Effizienz von Makrocyclisierungs-Methoden wird besonders von der Anzahl und Art der Aminosäuren der linearen Peptide beeinflusst. Kleine Cyclopeptide sind, aufgrund der Ringgröße, meist schlecht oder gar nicht darstellbar. So werden bei der Cyclisierung der meisten linearen Tripeptide nur deren entsprechende Cyclohexapeptide erhalten (Davies, 2003). Mit zunehmender Ringgröße erfolgen Makrocyclisierungen jedoch besser und mit höheren Ausbeuten. Die Synthese von Cyclopentapeptiden wird vor allem durch die vorhandenen Aminosäuren und der Wahl

der Kupplungsreagenzien bestimmt. Das Auftreten einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure am N-Terminus erschwert, das Auftreten einer D-Aminosäure erleichtert im Allgemeinen die Synthese. Zwei oder drei D-Aminosäuren können eine Synthese jedoch erheblich erschweren. Lineare Peptide mit L-L-L-D-D-Aminosäuren sind leichter zu cyclisieren als Peptide mit einer Abfolge von D-L-L-D-D-Aminosäuren (Gao *et al.*, 2002). Die Synthese von Cyclohexapeptiden, bei der die Ausbildung von zwei  $\beta$ -Turns möglich ist, sollte im Allgemeinen leicht verlaufen, jedoch liegen die Ausbeuten nur um die 50%. Die Cyclisierung von Hexapeptiden, welche ausschließlich aus L-Aminosäuren bestehen, sollte ebenfalls leicht verlaufen, kann unter Umständen jedoch ganz ausbleiben (Kessler *et al.*, 1992). Die besten Cyclisierungsergebnisse werden mit linearen Hexapeptiden erreicht, die mindestens eine  $\beta$ -Turn-induzierende Aminosäure wie Glycin, Prolin oder eine D-Aminosäure in ihrer Sequenz aufweisen. Die Synthese von Cyclohepta-, Cycloocta- und Cyclononapeptiden ist weniger durch die Aminosäuresequenz beeinflusst, da aufgrund der Ringgröße eine erhöhte Flexibilität des linearen Peptids möglich ist und eine Cyclisierung erleichtern sollte. Ringgrößen ab Decapeptiden sind ebenfalls relativ unabhängig von den anwesenden Aminosäuren, jedoch sind die Ausbeuten im Allgemeinen eher nur durchschnittlich, da hier hauptsächlich entropische Effekte eine Rolle spielen.

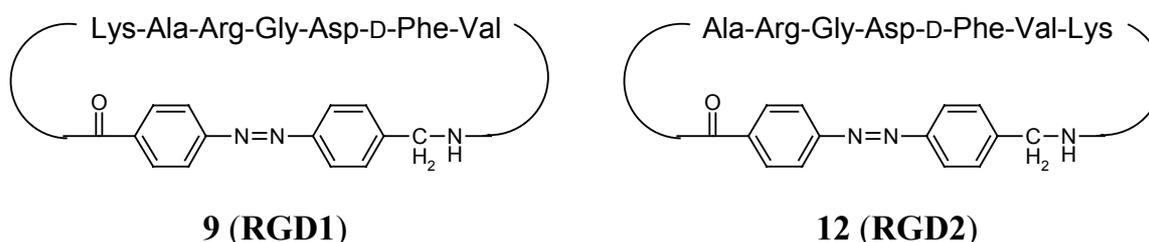
Die Effizienz von Makrocyclisierungen wird ebenfalls von den Aminosäuren beeinflusst, über die eine Cyclisierung erfolgen soll. Sterisch anspruchsvolle Aminosäuren am N- und C-Terminus reagieren im Allgemeinen schlechter als sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäuren wie Glycin oder Alanin in diesen Positionen. Zudem ist eine Cyclisierung über Glycin am C-Terminus zu bevorzugen, da während der meist längeren Cyclisierungsreaktion keine Epimerisierung auftreten kann. Solche Epimerisierungen können jedoch durch Einsatz geeigneter Kupplungsreagenzien verringert oder gänzlich unterdrückt werden.

Die Synthese der monocyclischen RGD-Azopeptide **A** und **B** (siehe Abb. 3-11) aus ihren seitenkettengeschützten linearen Vorstufen, bereitete große Schwierigkeiten. Zwar ist es günstig, über Glycin am C-Terminus cyclisieren zu können, da erstens eine Epimerisierung vermieden wird und zweitens Glycin die Ausbildung eines die Cyclisierung fördernden  $\gamma$ -Turns ermöglichen sollte, jedoch machte der eher starre,

langgestreckte und recht unflexible AMPB-Photoschalter auch unter Einsatz unterschiedlichster Cyclisierungsmethoden und -reagenzien, wie PyBOP/HOBt, HATU/HOAt, HATU, HBTU/HOBt, HBTU, EDC/HOAt, EDC/HOBt und DPPA, eine Cyclisierung unmöglich.

Dieses synthetische Ergebnis stand im Widerspruch zum Molecular Modeling, welches einen möglichen Ringschluß ohne energetisch ungünstige Verzerrungen ab sechs Aminosäuren plus AMPB-Photoschalter vorraussagte.

Um jedoch eine Cyclisierung zu RGD-Azopeptiden zu ermöglichen, wurde vor Arginin ein zusätzliches Alanin in das Peptidrückgrat eingebaut, um eine flexiblere Struktur zu erhalten. Die Molekülstrukturen der synthetisierten konstitutionsisomeren monocyclischen RGD-Azopeptide *c*[Asp-D-Phe-Val-AMPB-Lys-Ala-Arg-Gly-] (**9**, **RGD1**) und *c*[Asp-D-Phe-Val-Lys-AMPB-Ala-Arg-Gly-] (**12**, **RGD2**) sind in Abb. 3-12 gezeigt.



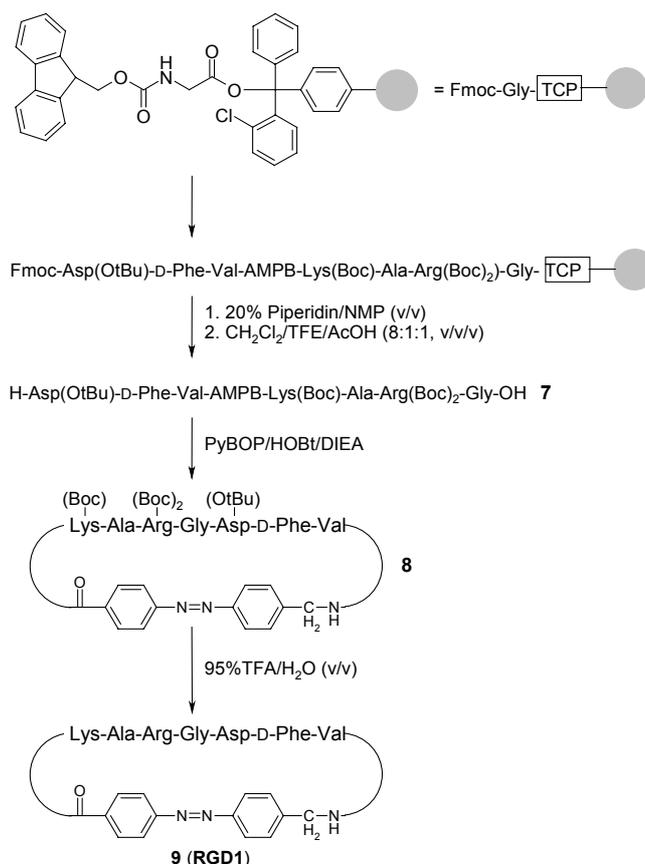
**Abb. 3-12:** Molekülstrukturen der synthetisierten monocyclischen RGD-Azopeptide **RGD1** und **RGD2**.

### 3.2.3 Synthesen

Die Synthese der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 sollte in drei Schritten erfolgen:

1. Synthese der linearen seitenkettengeschützten RGD-Azopeptide am polymeren Träger;
2. Makrocyclisierung der linearen seitenkettengeschützten RGD-Azopeptide in verdünnter Lösung;
3. Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und Aufreinigung der Rohpeptide mittels präparativer HPLC.

Abb. 3-13 zeigt die optimierte Synthese des monocyclischen Azopeptids RGD1.



**Abb. 3-13:** Synthese des  $c[\text{Asp-D-Phe-Val-AMPB-Lys-Ala-Arg-Gly-}]$  **9 (RGD1)**; Festphasensynthese der seitenkettengeschützten linearen Vorstufe **7**, Makrocyclisierung zum seitenkettengeschützten cyclischen RGD-Azopeptid **8** in verdünnter Lösung und abschließende Schutzgruppenabspaltung zum gewünschten monocyclischen RGD-Azopeptid.

RGD2 konnte auf gleichem Wege über das lineare (**10**)- und cyclische Azopeptid (**11**) synthetisiert werden. Die Synthesen konnten jedoch nicht unter Standardbedingungen der Festphasensynthese durchgeführt werden, da hier zum einen standardmäßig Fmoc-Arg(Pbf)-OH als Derivat des Arginins verwendet wird und zum anderen thiolische Verbindungen für die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen eingesetzt werden. Beide Sachverhalte verhinderten hier die erfolgreichen Synthesen der monocyclischen Azopeptide.

#### *Synthese der linearen seitenkettengeschützten RGD-Azopeptide am polymeren Träger*

In einem ersten Syntheseschritt sollten die linearen seitenkettengeschützten RGD-Azopeptide am polymeren Träger standardmäßig mit Fmoc/tBu-Strategie und HOBt/HBTU/DIPEA-Aktivierung aufgebaut werden, wobei das Azobenzolderivat

Fmoc-AMPB-OH genauso wie die restlichen Aminosäuren gekuppelt werden kann. Die Vollständigkeit der Kupplungsschritte sollte mit Hilfe des Kaiser-Testes, der auch bei der Kupplung des Fmoc-AMPB-OH möglich ist, festgestellt und bei gegebener Unvollständigkeit ein weiterer Kupplungsschritt durchgeführt werden. Der Seitenkettenschutz ist nötig, da es bei Makrocyclisierungen freier ungeschützter Peptide zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann. Diese könnten Seitenkettencyclisierungen von Asp- und Lys-Resten oder intermolekulare Polymerisierungsreaktionen (zu linearen Dimeren, Trimeren, u.s.w.) sein. Als polymerer Träger wurde deshalb Chlortrityl-Harz verwendet. Dieses Harz ermöglicht die Synthese seitenkettengeschützter Peptide, da eine milde Abspaltung des Peptids mit einer Mischung aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFE}/\text{AcOH}$  (8:1:1, v/v/v) bzw. 20% Hexafluoroisopropanol/DCM (v/v) durchgeführt werden kann und sämtliche Schutzgruppen dabei intakt lässt.

### *Makrocyclisierung der linearen seitenkettengeschützten RGD-Azo-peptide in verdünnter Lösung*

Die Makrocyclisierung der seitenkettengeschützten linearen RGD-Azo-peptide wurde in einer Peptidkonzentration von  $2 \cdot 10^{-4}$  M mit PyBOP/HOBt/DIPEA in DMF ausgeführt und der Reaktionsverlauf mittels analytischer HPLC verfolgt. Die Peptidkonzentration mußte deshalb so niedrig gewählt werden, da in konzentrierteren Reaktionslösungen Nebenreaktionen auftreten können. Dabei werden vor allem lineare Dimere, Trimere oder Oligomere gebildet, welche auf intermolekulare Polymerisierungsreaktionen zurückzuführen sind.

### *Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und Aufreinigung der Rohpeptide mittels präparativer HPLC*

Der letzte Schritt in der Synthese der monocyclischen RGD-Azo-peptide sollte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen in Lösung sein. Sie erfolgt, bei Abwesenheit von Arg(Mtr) und ungeschützten Tryptophanen in der Peptidsequenz, standardmäßig mit einem Abspaltcocktail aus 95% TFA/2,5%  $\text{H}_2\text{O}$ /2,5% TIS (v/v/v), bei Anwesenheit von Cys(Trt) oder Methionin, besser mit 94% TFA/2,5%  $\text{H}_2\text{O}$ /2,5%

EDT/1% TIS (v/v/v/v).

### 3.2.3.1 Schutzgruppenabspaltung

Da der AMPB-Photoschalter anfällig gegenüber thiolischen Verbindungen und Reduktionsmitteln ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von Merkaptanen oder Trialkylsilanen als Scavanger gänzlich vermieden, nachdem das Entschützen mehrerer monocyclischer RGD-Azopeptide mit 95% TFA/2,5% H<sub>2</sub>O/2,5% TIS (v/v/v) die entsprechenden Hydrazobenzolverbindungen zu einem sehr hohen Prozentsatz lieferte und, hervorgerufen durch den geringen Unterschied der Azo- bzw. Hydrazocyclopetide, eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC unmöglich war.

Für die Entschützungsreaktion wurde deshalb lediglich eine Mischung von 95% TFA/5% H<sub>2</sub>O (v/v) verwendet, um eine etwaige Bildung der korrespondierenden Hydrazoverbindungen auszuschließen.

Als weiteres Problem der Entschützungsreaktion stellte sich der Einsatz von Fmoc-Arg(Pbf)-OH als Argininderivat für die Festphasensynthese heraus. Wurden mit der Schutzgruppe Pbf geschützte monocyclische RGD-Azopeptide mit einer Mischung aus 95% TFA/5% H<sub>2</sub>O (v/v) behandelt, färbte sich die Reaktionslösung nach kurzer Zeit grün, was auf das Auftreten von Nebenreaktionen deutete. Analytische HPLC ergab einen Abbau der Peptide zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten, welche jedoch nicht weiter untersucht wurden. Aufgrund dessen wurde Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH als Argininderivat verwendet, welches bei der Abspaltung sowohl das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte als auch eine Grünfärbung der Reaktionslösung verhindern konnte.

### 3.2.3.2 Optimierte Synthesen

Die endgültige Synthese der monocyclischen Azopeptide RGD1 und RGD2 ist in Abb. 3-13 am Beispiel des RGD1 veranschaulicht.

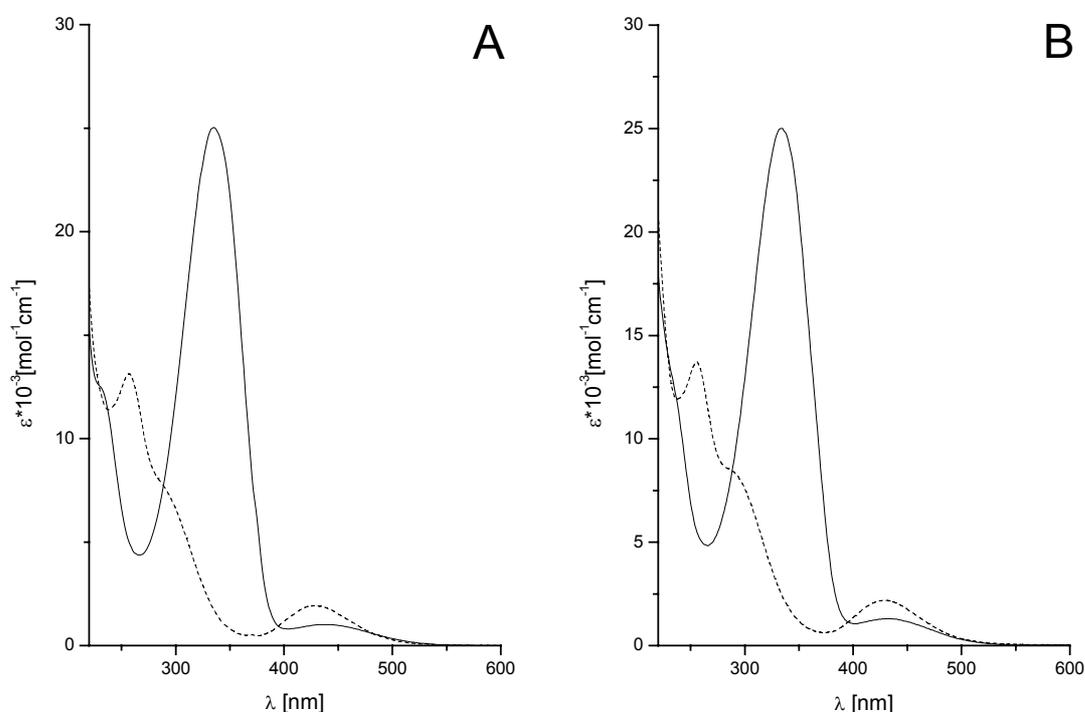
Das lineare, vollständig seitenkettengeschützte AMPB-Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Val-AMPB-Lys(Boc)-Ala-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Gly-OH **7** wurde am polymeren Träger standardmäßig mit Fmoc/tBu-Strategie und HOBt/HBTU/DIPEA-Aktivierung aufgebaut und mit einer Mischung aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFE/AcOH (8:1:1, v/v/v) bzw. 20%

Hexafluoroisopropanol/DCM (v/v) vom Harz abgespalten. Die Vollständigkeit der Kupplungsschritte wurde mit Hilfe des Kaiser-Testes festgestellt und bei gegebener Unvollständigkeit ein weiterer Kupplungsschritt durchgeführt. Die anschließende Makrocyclisierung in Lösung wurde mit PyBOP/HOBt/DIPEA in DMF mit einer Peptidkonzentration von  $2 \cdot 10^{-4}$  M ausgeführt. Das Entschützen des cyclischen RGD-Azopeptids **8** erfolgte abschließend mit 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) bevor das Rohprodukt mittels präparativer HPLC erfolgreich gereinigt werden konnte.

Die monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 konnten als analytisch bestens charakterisierte Endprodukte in guten Ausbeuten isoliert werden.

### 3.2.4 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der *cis*- bzw. *trans*-Konformere der Azopeptide RGD1 und RGD2 auf einer analytischen HPLC-Anlage ermöglichten die Aufnahme ihrer reinen *cis*- (----) bzw. *trans*- (—) UV-Spektren mittels eines angeschlossenen Photodiodenarrays (siehe Abb. 3-14).



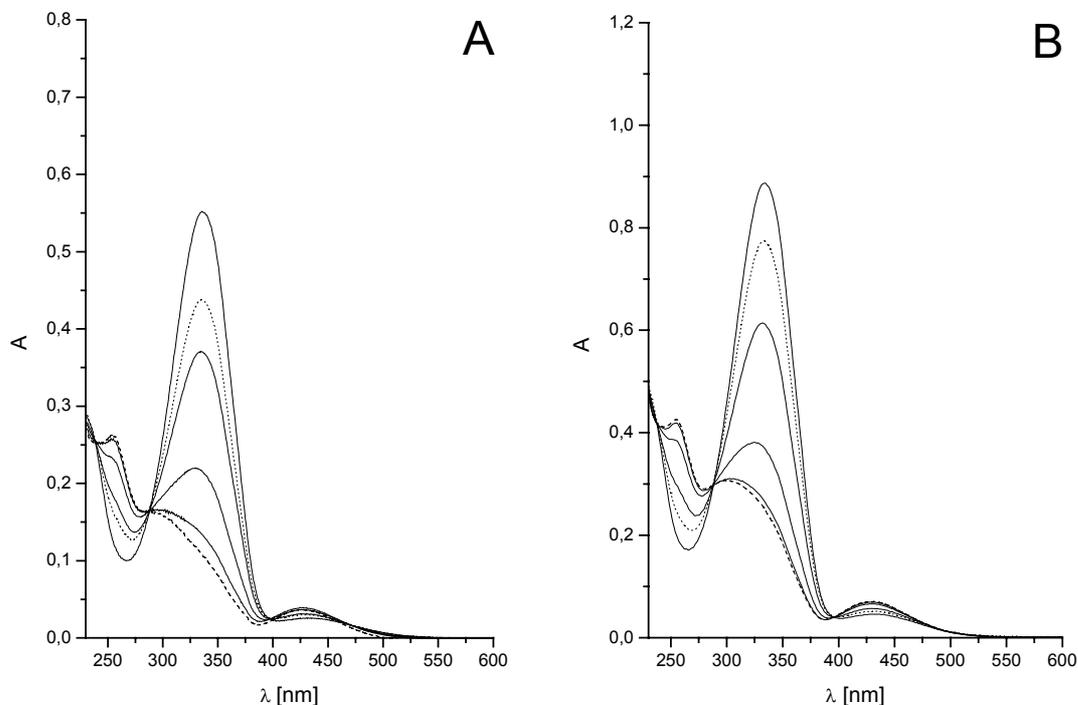
**Abb. 3-14:** UV-Spektren der reinen *trans*- (—) bzw. *cis*- (----) Konformere der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 (A) und RGD2 (B).

Die Skala der Absorption errechnet sich dabei aus einem Vergleich mit einem

UV-Spektrum des reinen *trans*-Isomers, welches nach thermischer Relaxation bei ca. 50 °C für 48 h unter Lichtausschluß erhalten wurde, unter Berücksichtigung identischer Absorption beider Isomere an den isosbestischen Punkten bei 395 nm bzw. 288 nm. Aus diesen Spektren lassen sich die Beiträge der *cis*- bzw. *trans*-Anteile der einzelnen Konformere in ihren jeweiligen photostationären Zuständen berechnen. Sie stimmen mit UV-Spektren früher synthetisierter monocyclischer Azopeptide mit AMPB als Photoschalter bestens überein (Renner *et al.*, 2002).

Eine Prüfung der Stabilität beider Azopeptide RGD1 und RGD2 mittels analytischer HPLC lieferte keine Abbauprodukte, welche auf Belichtung oder thermische Relaxation zurückzuführen wären.

Die UV-spektroskopische Bestimmung der Photokinetiken der Azopeptide RGD1 und RGD2 erfolgte nach deren thermischer Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 48 h unter Lichtausschluß. Sie sind in Abb. 3-15 dargestellt. Die Messungen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,0 durchgeführt und durch Belichtung bei 360 nm bzw. 450 nm induziert.



**Abb. 3-15:** Photokinetiken der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 (A) und RGD2 (B); die Spektren wurden im Bereich von 220 bis 600 nm nach einer Belichtungsdauer von 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,50 und 5 min (----) bei 350 nm sowie 5 min (.....) bei 450 nm in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen.

In den Photokinetiken von RGD1 (A) und RGD2 (B) sind jeweils drei isosbestische Punkte erkennbar, welche durch Überschneidung der Banden der  $n-\pi^*$  und  $\pi-\pi^*$ -Übergänge der *cis*- und *trans*-Isomere entstehen. Jede Bande wird von zwei isosbestischen Punkten eingegrenzt, was auf eine Kinetik erster Ordnung hinweist.

Die isosbestischen Punkte des RGD1 liegen bei 239 nm, 288 nm und 395 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 335 nm das Maximum für den  $\pi-\pi^*$ -Übergang. Die isosbestischen Punkte des RGD2 liegen bei 238 nm, 288 nm und 396 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 335 nm das Maximum für den  $\pi-\pi^*$ -Übergang.

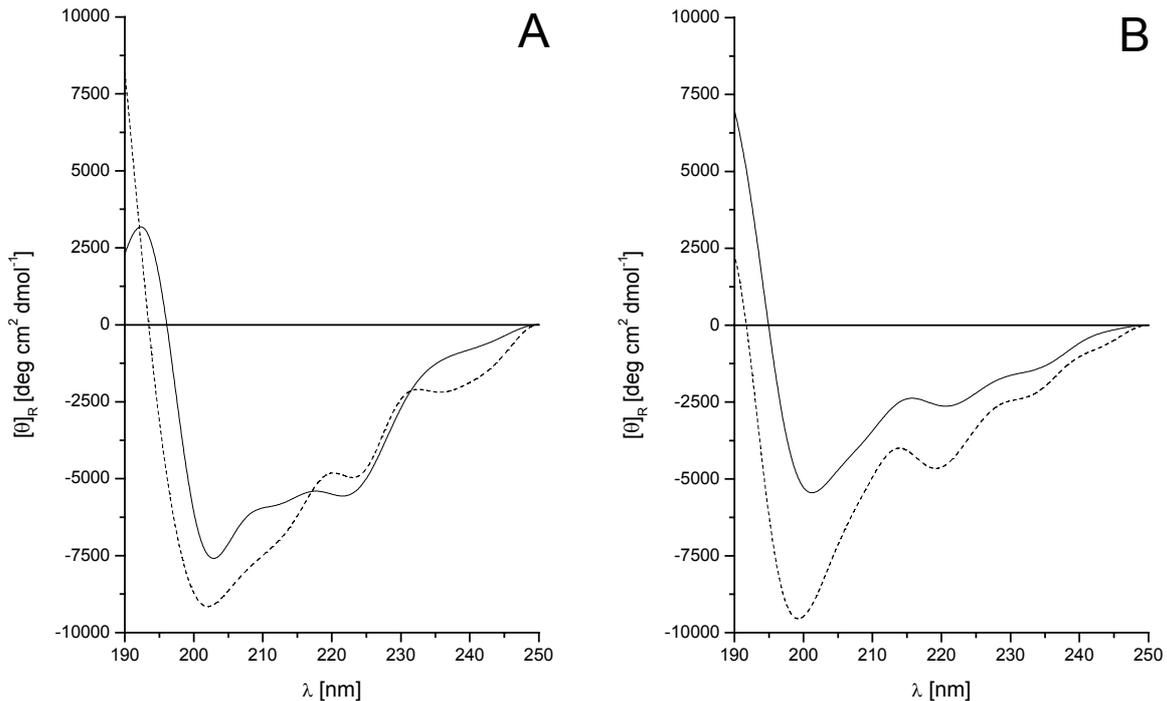
Die nahezu identische Lage der isosbestischen Punkte spiegelt die Ähnlichkeit der beiden Cyclopeptide wider. Der photostationäre *cis*-Zustand wird in beiden Azopeptiden bereits nach 1,5 min erreicht. Photoisomerisierung zurück in ihre photostationären *trans*-Zustände erfolgt ebenfalls binnen 1,5 min, liefert jedoch auch nach verlängerter Belichtungszeit nicht den ursprünglichen *trans*-Gehalt. Dieser kann jedoch durch thermische Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 48 h unter Lichtausschluß wieder hergestellt werden.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigte den ausschließlichen *trans*-Gehalt dieser thermisch relaxierten Proben.

Photoisomerisierung von RGD1 und RGD2 liefert ihre jeweiligen *cis*- und *trans*-Zustände also nicht in reiner Form. Es stellen sich lediglich zwei photostationäre Zustände für *cis*- bzw. *trans* ein, zwischen welchen der Azobenzolchromophor reversibel photoschaltbar ist. Diese Eigenschaft ist jedoch allen Azobenzolverbindungen gemein.

### 3.2.5 CD-spektroskopische Charakterisierung

Die CD-Konformationsanalysen wurden im Bereich von 190-250 nm in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Sie sind in Abb. 3-16 gezeigt.

Beide Konformere des RGD-Azopeptids RGD1 (A) besitzen bei 218 nm eine Schulter mit nahezu identischen Intensitäten und ein Minimum bei 203 nm, welches im *cis*-Konformer jedoch deutlich ausgeprägter ist. Die Ähnlichkeit beider CD-Spektren ist überraschend, da mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie weitaus größere Unterschiede in den Strukturen beider Isomere bestimmt wurden.



**Abb. 3-16:** CD-Spektren der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 (A) und RGD2 (B) in ihren *trans*-(—, rein) und *cis*-Konformationen (---, photostationärer Zustand).

In den CD-Spektren von RGD2 sind für seine jeweiligen Isomerisierungszustände größere Unterschiede, vor allem Intensitätsunterschiede erkennbar. Die zwei Minima des *trans*-Isomers bei 201 nm und 221 nm werden durch Photoisomerisierung um 2 nm blauverschoben und deren Intensitäten um ca. 70% verstärkt. Das Spektrum des *trans*-Isomers ist zwar insgesamt schwächer, weist jedoch ein starkes positives Signal unter 195 nm auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Interpretation der CD-Spektren schwierig ist und durch das Auftreten irregulärer Turns und Biegungen in den Strukturen dieser Cyclopeptide zudem erschwert wird. Es lassen sich jedoch Unterschiede erkennen, welche auf eine geometrische Veränderung des Peptidrückgrats durch Isomerisierung des AMPB-Photoschalters zurückzuführen sind. Eine Photomodulation der Bindungsaffinität beider RGD-Azopeptide für  $\alpha V\beta 3$ -Integrin sollte somit möglich sein.

### 3.2.6 Bestimmung der thermischen Relaxationsraten $k_{ct}$ von RGD1

Die thermischen Relaxationsraten  $k_{ct}$  des RGD1 wurden mittels

<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  wurde über die Arrhenius-Gleichung ermittelt. Die Ergebnisse sind zusammen mit den Werten der früher bereits synthetisierten mono- bzw. bicyclischen TRR-Azo peptide  $c[\text{Lys-AMPB-Lys-Ser-Ala-Thr-Ser-Asp-Lys-}]$  und  $bc[\text{Lys-AMPB-Lys-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Lys-}]$  in Tab. 3-1 aufgelistet.

**Tab. 3-1:** *Geschwindigkeitskonstanten der thermischen cis $\rightleftharpoons$ trans Isomerisierung.*

Azo peptide	Thermische Relaxation, $k_{ct}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]							$E_a$ ( $\text{kJ}\times\text{mol}^{-1}$ )
	7 °C	10 °C	20 °C	22 °C	30 °C	40 °C	50 °C	
TRR monocyclisch <sup>a</sup>	<0,001	-	-	0,0029	0,0080	0,0278	0,091	97±1
TRR bicyclisch <sup>a</sup>	-	-	-	0,0048	0,0143	0,0417	0,101	85±3
<b>RGD1</b>	-	0,006	0,0022	-	0,0040	0,0170	0,051	83±1

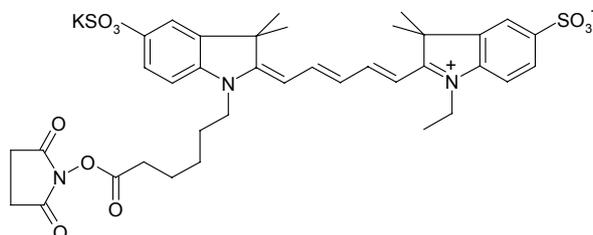
*Die Geschwindigkeitskonstanten der thermischen cis $\rightleftharpoons$ trans Isomerisierung wurden bei einer Peptidkonzentration von ca.  $3\cdot 10^{-3}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$  mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen bestimmt; die Aktivierungsenergie  $E_a$  wurde über die Arrhenius-Gleichung ermittelt; a: (Renner et al., 200c).*

Die thermischen Relaxationsraten  $k_{ct}$  des RGD1 sind ungefähr halb so schnell wie die der TRR-Azo peptide. Diese Eigenschaft ist wohl auf die verringerte Ringgröße des RGD1 zurückzuführen. So besitzt das RGD-Azo peptide RGD1 sieben, die beiden TRR-Azo peptide dagegen acht Aminosäurereste. Das Peptidrückgrat sollte somit in den beiden TRR-Azo peptiden flexibler sein und folglich einen geringeren Einfluss auf den Chromophor besitzen.

### 3.2.7 Derivatisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5

Für die Messung der Integrinbindungsaffinitäten mittels Oberflächen-Plasmon-Fluoreszenz-Resonanz-Spektroskopie war es nötig, die monocyclischen RGD-Azo peptide über die  $\epsilon$ -Aminogruppe ihrer Lysinseitenketten mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Instrumentell bedingt wurde der

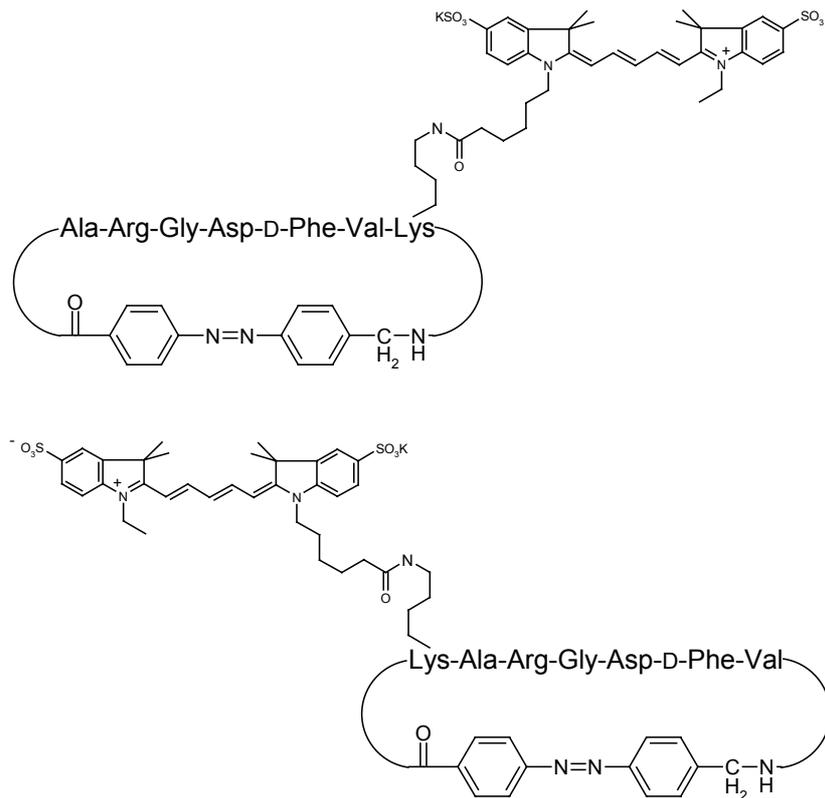
Fluoreszenzfarbstoff Cy5 der Firma *Amersham Pharmacia* (Uppsala, S) als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, welcher als *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (Cy5-NHS-Ester) käuflich ist (siehe Abb. 3-17).



**Abb. 3-17:** Molekülstruktur des für die Derivatisierung der monocyclischen RGD-Azopeptide eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs Cy5-NHS-Ester.

Die Markierungsreaktionen wurden in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert ist die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette deprotoniert und greift den Aktivester des Fluoreszenzfarbstoffs unter Ausbildung einer Amidbindung nukleophil an. Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Nach 30 min war kein unmarkiertes Peptid mehr nachweisbar, die Reaktion zu den gewünschten fluoreszenzmarkierten Azopeptiden (siehe Abb. 3-18) somit quantitativ. Ein möglicher Überschuß an reaktivem Cy5-NHS-Ester wurde mit Ethanolamin abgefangen. Eine Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten Azopeptide RGD1 und RGD2 war nicht nötig.

Belichtungsversuche der sich ergebenden Reaktionslösungen zeigten jedoch eine geringe Effektivität der Lichtschaltung, da der Fluoreszenzfarbstoff ebenfalls UV-Banden im Bereich der Isomerisierungswellenlängen aufweist und in der Reaktionslösung in einem zu großem Überschuß vorliegt. Diese geringere Isomerisierungseffizienz wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt und umgangen, indem die Markierungsreaktionen in ihren jeweiligen photostationären *cis*- und *trans*-Zuständen durchgeführt wurden.

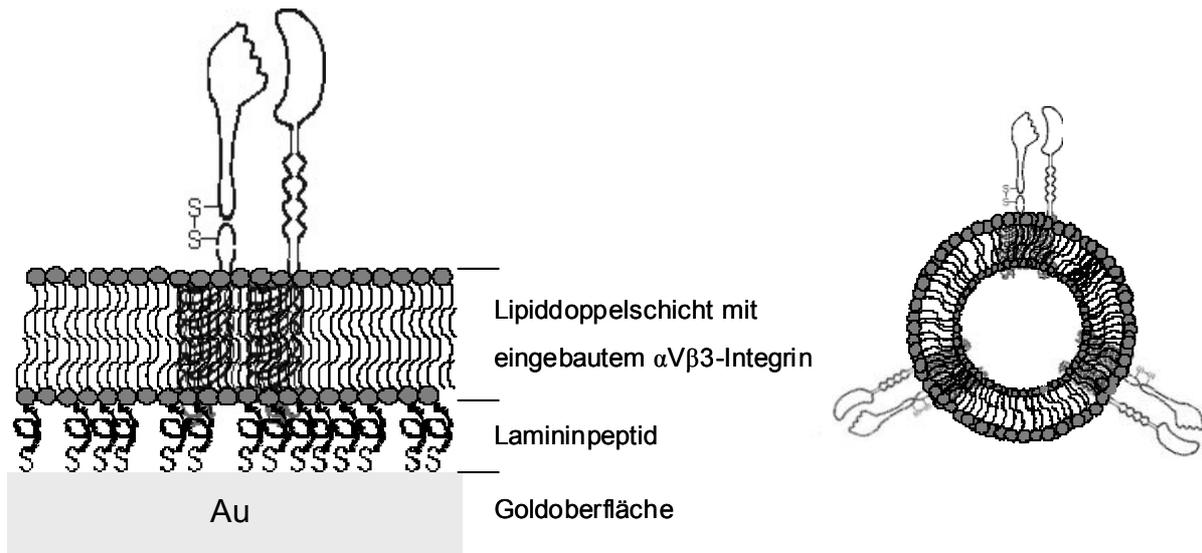


**Abb. 3-18:** Molekülstrukturen der mit Cy5-NHS-Ester fluoreszenzmarkierten RGD-Azopeptide RGD1 (oben) und RGD2 (unten).

### 3.2.8 SPFS-Messungen

Die Bindung von RGD-Peptiden an intakte Integrine ist generell nicht einfach zu bestimmen. Es gelang jedoch, SPFS-Bindungsmessungen der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 an einer in der Arbeitsgruppe von Prof. Oesterhelt (MPI für Biochemie, Martinsried) entwickelten künstlich aufgebauten Biomembran durchzuführen.

Dazu wird in einem ersten Schritt die Goldoberfläche mit dem aus Laminin stammendem Nonadcapeptid H-CSRARKQAASIKVAVSADR-OH beschichtet, welches über die freie SH-Gruppe des Cysteins eine kovalente Bindung zur Goldoberfläche eingeht. Nach Aktivierung des Aspartats mit EDC/HOSu wird DMPE unter Ausbildung einer Lipidmonoschicht zugegeben. Gibt man darauf aus DMPG und DMPC gebildete Vesikel mit darin rekonstituiertem  $\alpha V\beta 3$ -Integrin, so spreiten sich diese unter Ausbildung einer Lipiddoppelschicht mit eingebautem  $\alpha V\beta 3$ -Integrin aus. Dies ist in Abb. 3-19 gezeigt.



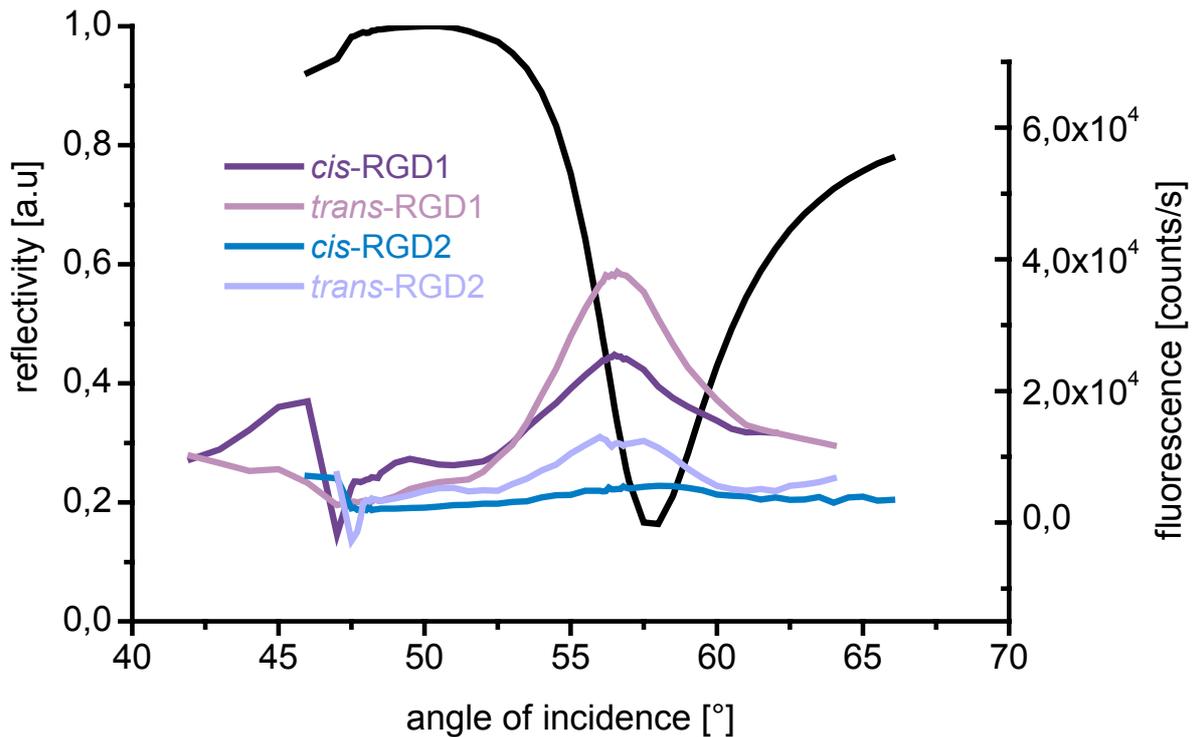
**Abb. 3-19:** Aufbau der für die SPFS-Bindungsmessungen benutzten künstlichen Biomembran mit darin inkorporiertem  $\alpha V\beta 3$ -Integrin (links); in DMPG/DMPC-Vesikel rekonstituiertes  $\alpha V\beta 3$ -Integrin (rechts).

Diese künstliche Biomembran ist zur Messung von Bindungsaffinitäten oder anderer Biointeraktionen hervorragend geeignet, da unspezifische Wechselwirkungen jeglicher Art reduziert werden und die auf natürlichen Zelloberflächen vorherrschenden Bedingungen sehr gut wiedergegeben werden.

Dieses System wurde bereits zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten verschiedener synthetischer heterotrimerer Kollagenpeptide, welche das  $\alpha 1\beta 1$  Bindungsmotiv für Kollagen Typ IV aufweisen, erfolgreich eingesetzt (Saccà *et al.*, 2002).

Als Analyten wurden für diese Messung die fluoreszenzmarkierten RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 verwendet. Diese wurden in ihren jeweiligen *cis*- bzw. *trans*-Zuständen bei Raumtemperatur im Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  und 10 mM  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ ) gelöst und für 30 min auf die oben beschriebene künstliche Membran gegeben, welche vor der eigentlichen Messung mit Bindungspuffer gewaschen wurde. Ein Ablösen der gebundenen fluoreszenzmarkierten RGD-Azopeptide konnte mit 0,5 M EDTA erfolgen.

Abb. 3-20 und Abb. 3-21 zeigen die Ergebnisse der SPFS-Bindungsmessungen der fluoreszenzmarkierten, monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 in ihrer *cis*- bzw. *trans*-Konformation an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin.

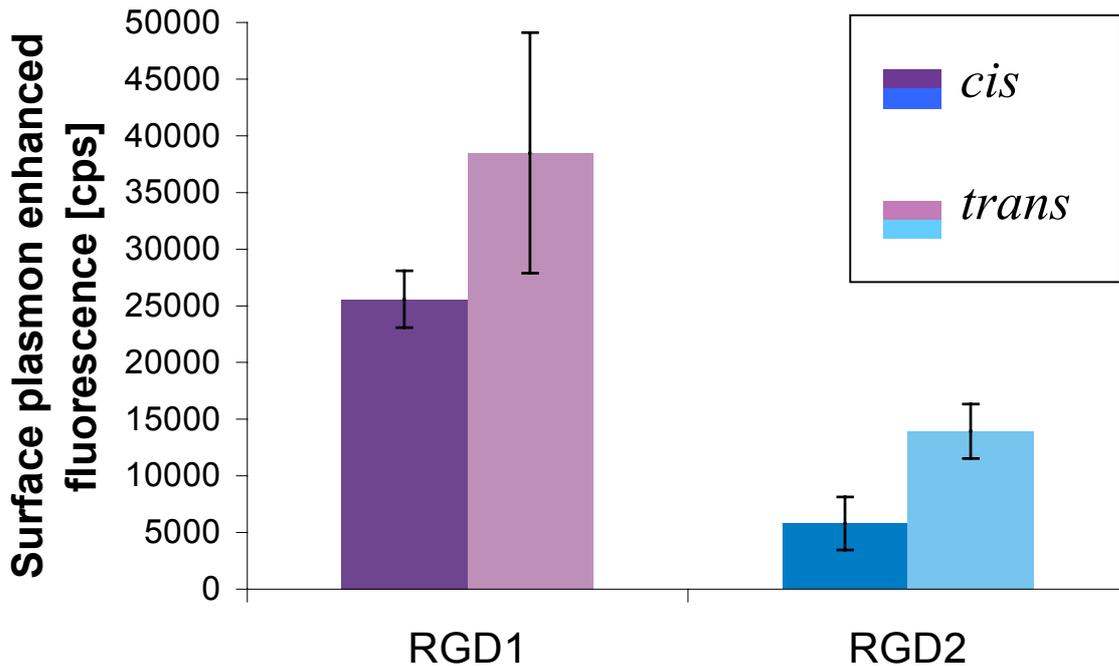


**Abb. 3-20:**  $\alpha V\beta 3$ -Integrinbindung der fluoreszenzmarkierten, monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 in ihrer cis- bzw. trans-Konformation; für die jeweiligen Isomere sind ihre Fluoreszenzscans abgebildet; zusätzlich ist ein repräsentativer Plasmonscaan (schwarz) abgebildet; Untergrundsignale sind von den Fluoreszenzsignalen abgezogen.

Man erkennt, dass beide Azopeptide in der Lage sind  $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu binden, wobei RGD2 in der Summe jedoch deutlich schlechter als RGD1 bindet.

Beide Azopeptide zeigen in ihren *trans*-Konformationen höhere Bindungsaffinitäten als in ihren *cis*-Konformationen. So bindet das *trans*-RGD1 ca. 40% stärker als das *cis*-RGD1 und das *trans*-RGD2 ca. doppelt so stark als das *cis*-RGD2.

RGD2 weist zwar eine höhere Effizienz in der Photomodulierbarkeit der Integrinbindung auf, wurde jedoch aufgrund der signifikant schlechteren Bindungsaffinitäten nicht mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Um unspezifische Bindung der Azopeptide RGD1 und RGD2 auszuschließen, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde mit gleichem Setup der Farbstoff alleine vermessen, zum anderen wurden die fluoreszenzmarkierten Azopeptide an Oberflächen vermessen, die keine inkorporierten Integrine aufwiesen.



**Abb. 3-21:**  $\alpha V\beta 3$ -Integrinbindung der fluoreszenzmarkierten, monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 in ihren cis- bzw. trans-Konformationen.

Ebenso wurde eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt, um die Richtigkeit der Messungen zu bestätigen. Dafür wurde als Positivkontrolle das bekannte cyclische Hexapeptid  $c[\text{Asp-D-Phe-Lys-Gly-Arg-Gly-}]$  und als Negativkontrolle das oxidierte bicyclische Azopeptid  $c[\text{Lys-AMPB-Lys-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Lys-Lys-}]$ , welches kein RGD-Bindungsmotiv in seiner Sequenz aufweist, verwendet. Positiv- und Negativkontrolle wurden vor der Messung standardmäßig mit Cy5 fluoreszenzmarkiert.

### 3.2.9 NMR-spektroskopische Charakterisierung von RGD1

Die durch SPFS-Messungen gemessenen unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des Azopeptids RGD1 sollten mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Konformationsanalyse erklärt werden.

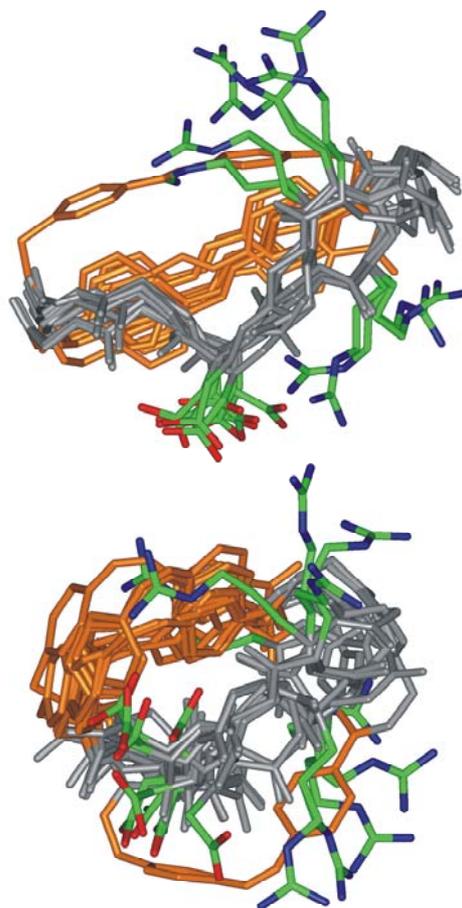
Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des *trans*-RGD1 wurden nach thermischer Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 72 h unter Lichtausschluß aufgenommen. Sie ergaben ein fast ausschließliches Vorliegen des *trans*-Konformers (> 99%). Nach intensivem Belichten mit Licht der Wellenlänge 360 nm wurde ein photostationärer *cis*-Zustand mit einem maximalen Anteil des *cis*-Konformers von  $80 \pm 5\%$  erhalten. Dieses Verhältnis wurde ebenfalls mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt und ist für eine

Strukturbestimmung des *cis*-Konformers absolut ausreichend.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des monocyclischen RGD-Azopeptids RGD1 in der *trans*- bzw. *cis*-Konformation sind durch zwei verschiedene Resonanz-Sätze charakterisiert. Diese unterscheiden sich in ihren chemischen Verschiebungen so stark voneinander, dass eine Strukturbestimmung des *cis*-Konformers in seinem photostationären Zustand möglich wird. Aus den NOESY-Spektren konnten dafür genügend Interproton-Abstandsbedingungen extrahiert werden, um strukturelle Präferenzen der beiden Isomere in wässriger Lösung zu erhalten. Zum besseren Verständnis wurden die jeweiligen Aminosäuren des Cyclopeptids wie folgt bezeichnet:



Die Strukturen der beiden Konformere des Azopeptids RGD1 sind in Abb. 3-22 wiedergegeben (oben: *trans*-Konformer; unten: *cis*-Konformer).



**Abb. 3-22:** NMR-Struktur-Ensembles der beiden Konformere des monocyclischen RGD-Azopeptids RGD1; Stabmodelle der zehn energieärmsten Strukturen des *trans*- (oben) und *cis*-Isomers (unten); das Peptidrückgrat ist grau, der AMPB-Photoschalter orange und die Seitenketten des Arg und Asp in ihren Atomfarben eingefärbt.

### *Die Struktur des trans-Konformers:*

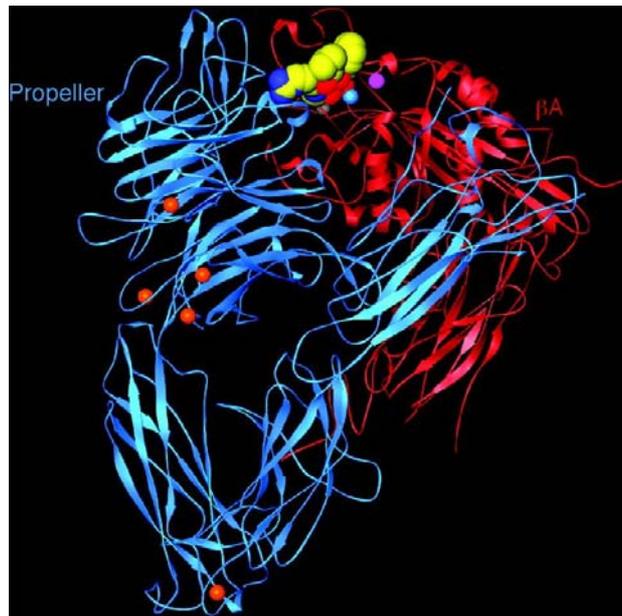
Die im Vergleich zu früher untersuchten monocyclischen und bicyclischen Azopeptiden kleinere Ringgröße - sieben Aminosäurereste im Vergleich zu acht Aminosäureresten - liefert für das *trans*-Isomer ein hoch frustriertes System, welches zwischen zwei Konformationsunterfamilien hin- und herschalten kann. In diesen Unterfamilien besitzen der Azobenzolchromophor und der Peptidteil Lys<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> verschiedene Orientierungen. Die Umwandlung der Unterfamilien ineinander erfolgt in einer Art Drehbewegung um Val<sup>7</sup>/Lys<sup>1</sup> und Lys<sup>1</sup>/Gly<sup>4</sup>. Alle *trans*-Strukturen besitzen einen offenen  $\beta$ III-Turn, an welchem hauptsächlich Lys<sup>1</sup> und Ala<sup>2</sup> beteiligt sind und einen auf Asp<sup>5</sup> zentrierten verdrehten  $\gamma$ -Turn. Die darauf folgenden Aminosäuren D-Phe<sup>6</sup> und Val<sup>7</sup> sind in einer mehr gestreckten Konformation. Arg<sup>3</sup> ist entweder das Zentrum eines inversen  $\gamma$ -Turns oder mehr gestreckt. Die Tendenz, reguläre  $\gamma$ -Turns auszubilden, wird für Gly<sup>4</sup>, Asp<sup>5</sup>, D-Phe<sup>6</sup> und Val<sup>7</sup> beobachtet, wenn auch mit geringer Häufigkeit. Die gesamte Peptidkette ist relativ gestreckt und parallel zum Azobenzolchromophor angeordnet. Die Seitenketten der Aminosäuren Arg<sup>3</sup> und Asp<sup>5</sup> nehmen im Raum eine relativ definierte Orientierung zueinander ein.

### *Die Struktur des cis-Konformers:*

Photoisomerisierung mit Licht der Wellenlänge 360 nm entspannt das System in einen größeren Konformationsraum, der von einem Ensemble von Strukturen, welche sich deutlich von den Strukturen des *trans*-Isomers unterscheiden, eingenommen wird. Die gesamte Peptidkette ist relativ flexibel, unterscheidet sich in ihrer Gestalt jedoch deutlich vom *trans*-Isomer. Dies führt vor allem zu einer Veränderung der räumlichen Orientierung der Aminosäureseitenketten des Arg<sup>3</sup> und Asp<sup>5</sup> im RGD-Bindungsmotiv. Diese ist im Vergleich zum *trans*-Konformer nahezu zufällig. Lys<sup>1</sup> und Arg<sup>3</sup> zeigen die Tendenz zu einer helikalen Konformation, obwohl ein offener  $\beta$ III-Turn, wie er auch im *trans*-Isomer auftritt, beobachtet wird. Ein auf Gly<sup>4</sup> zentrierter  $\gamma$ -Turn ist stark populiert, jedoch ist dieser deutlich verzerrt. Wie im *trans*-Isomer liegt ab D-Phe<sup>6</sup> eine gestreckte Konformation vor.

### 3.2.10 Diskussion der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von RGD1

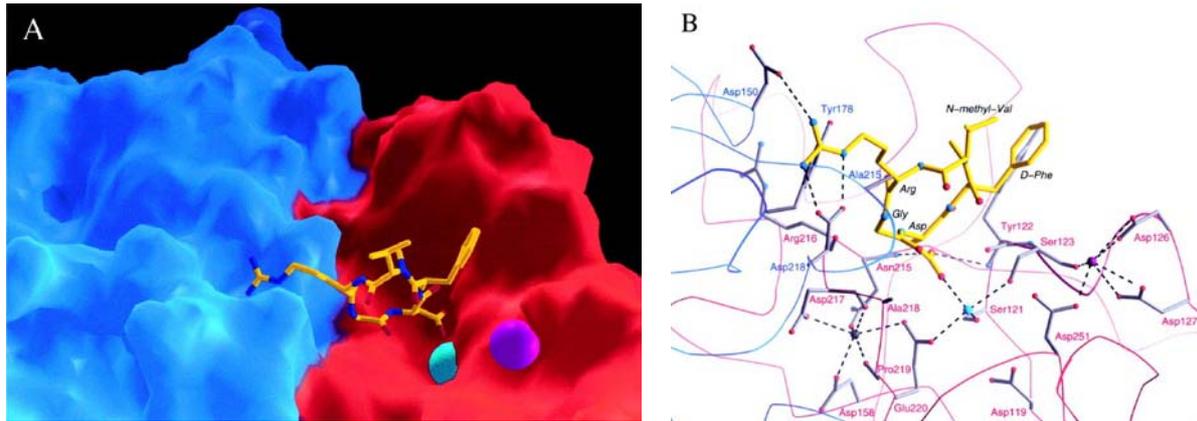
Eine Erklärung der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des RGD1 wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Molecular Modeling und der bekannten Kristallstruktur des  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrins mit gebundenem RGD-Peptid  $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-}]$  (Xiong *et al.*, 2002; PDB-Eintrag: 1L5G) versucht.



**Abb. 3-23:** Kristallstruktur von  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin mit gebundenem  $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-}]$ ;  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen sind türkis (MIDAS) bzw. violett (ADMIDAS) eingefärbt; die  $\alpha\text{V}$ -Untereinheit ist blau, die  $\beta\text{3}$ -Untereinheit rot dargestellt (Xiong *et al.*, 2002).

Die Struktur des  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin-RGD-Mn-Komplexes ist in Abb. 3-23 abgebildet und zeigt, dass das cyclische Pentapeptid  $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-}]$  am Kopf des Integrins in einer Spalte gebunden wird, welche zwischen der Propeller-Region der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta\text{A}$ -Region der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert ist (Xiong *et al.*, 2002).

In Abb. 3-24 sind die spezifischen Wechselwirkungen, welche das cyclische Pentapeptid  $c[-\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-}]$  mit  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin eingeht, veranschaulicht (Xiong *et al.*, 2002).

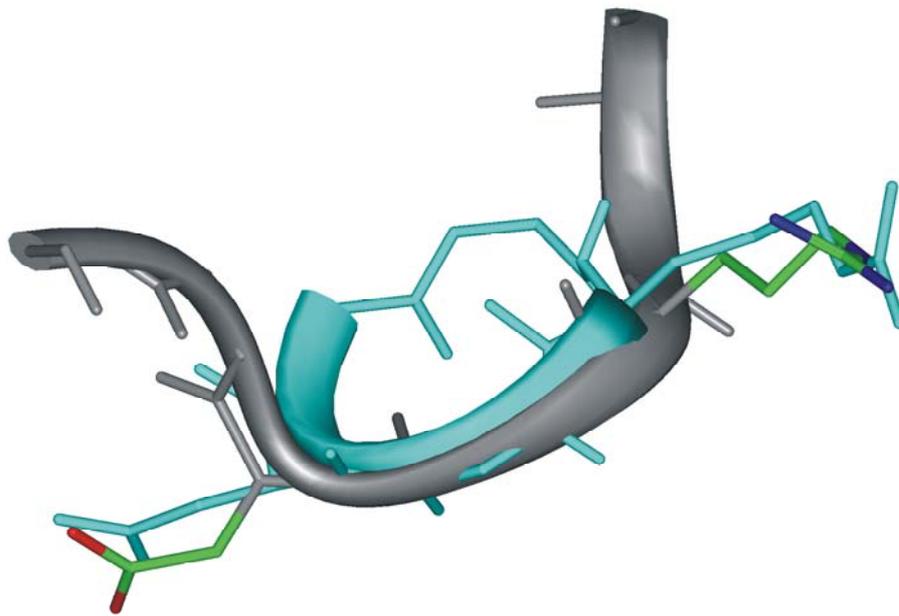


**Abb. 3-24:** (A) Kristallstruktur der  $\alpha V\beta 3$ -Integrinbindungstasche mit gebundenem  $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-}]$ ; (B) spezifische Integrin-Ligand-Wechselwirkungen;  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen sind türkis (MIDAS) bzw. violett (ADMIDAS) eingefärbt; die  $\alpha V$ -Untereinheit ist blau, die  $\beta 3$ -Untereinheit rot dargestellt, H-Brückenbindungen und Salzbrücken sind gestrichelt gezeichnet (Xiong et al., 2002).

Bei Bindung eines Liganden wird die im freien Integrin nicht besetzte Metallion-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS-Region) besetzt. Eine benachbarte Schleife verschiebt sich dazu in Richtung der  $\alpha$ -Untereinheit und ermöglicht es dem Liganden, welcher in seinem Bindungsmodus einem verdrehten Pentagon ähnlich ist, Wechselwirkungen mit beiden Untereinheiten des  $\alpha V\beta 3$ -Integrins einzugehen.

Der anionische Aspartatrest des RGD-Liganden bindet mit einem seiner Carboxylat-Sauerstoffatome das  $\text{Mn}^{2+}$ -Ion in der MIDAS-Region der  $\beta$ -Untereinheit. Das zweite Carboxylat-Sauerstoffatom bildet zwei H-Brückenbindungen zum Amid-Rückgrat von Tyr122 and Asn215 aus. Die Seitenkette des Arginins bindet in eine tiefe Furche, die an der Spitze der Propeller-Region lokalisiert ist. Es wird eine zweizählige Salzbrücke zu dem auf dem Grund dieser Furche sitzenden Asp218 und eine normale Salzbrücke zu dem weiter hintersitzenden Asp160 ausgebildet. Der obere Teil der Arg-Seitenkette ist hauptsächlich dem Lösemittel ausgesetzt. Der zentrale Glycinrest befindet sich zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten direkt auf der Integrin-Oberfläche und trägt vermutlich ebenfalls zur Stabilität des Komplexes bei, da dessen Substitution mit Ala oder D-Ala keine Bindung des Liganden liefert, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass Glycin eine kleine und sehr flexible Aminosäure ist (Haubner *et al.*, 1996). Die restlichen zwei Aminosäuren D-Phe und (Met)Val zeigen von der Kontaktgrenzfläche weg und sind für die Ligandenbindung somit relativ unwichtig (Xiong *et al.*, 2002).

Anfängliche Modellierungsstudien ergaben, dass das *cis*-Konformer besser in die Bindungstasche des Integrins passen sollte. Die durchgeführten SPFS-Messungen der beiden Isomere ergaben jedoch eine höhere Bindungsaffinität des *trans*-Isomers, in welchem die gesamte Peptidkette relativ gestreckt und parallel zum Azobenzolchromophor angeordnet ist. Zum besseren Verständnis dieser Ergebnisse wurde eine Superposition einer bevorzugten Konformation des *trans*-Isomers (grau) mit der Struktur des an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin gebundenen *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] (hellblau) in seiner Kristallstruktur durchgeführt (siehe Abb. 3-25).



**Abb. 3-25:** Orientierung der Aminosäure-Seitenketten des gebundenen *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] und des freien *trans*-RGD1; Überlagerung einer bevorzugten Konformation des *trans*-RGD1 (grau) mit der Struktur des an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin gebundenen *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] (hellblau) in seiner Kristallstruktur; die Konformation des Peptidrückgrats ist dementsprechend grau bzw. hellblau eingefärbt; die Seitenketten des Arg bzw. Asp sind für das Pentapeptid hellblau, für das Azozeptid in Atomfarben eingefärbt.

Man erkennt, dass der RGD-Teil des monocyclischen Azozeptids RGD1 in seiner *trans*-Form im Vergleich zum *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] eine sehr ähnliche Orientierung der Seitenketten des Arginins und Aspartats im Raum liefert. Da diese zwei Aminosäurereste die stärksten Wechselwirkungen mit dem Integrin eingehen, könnte somit die durch SPFS-Messung festgestellte Bindung erklärt sein. Im deutlich flexibleren *cis*-RGD1 sind die Seitenketten des Arginins und Aspartats nahezu zufällig im Raum verteilt, was die schlechtere Bindung dieses Konformers an das Integrin

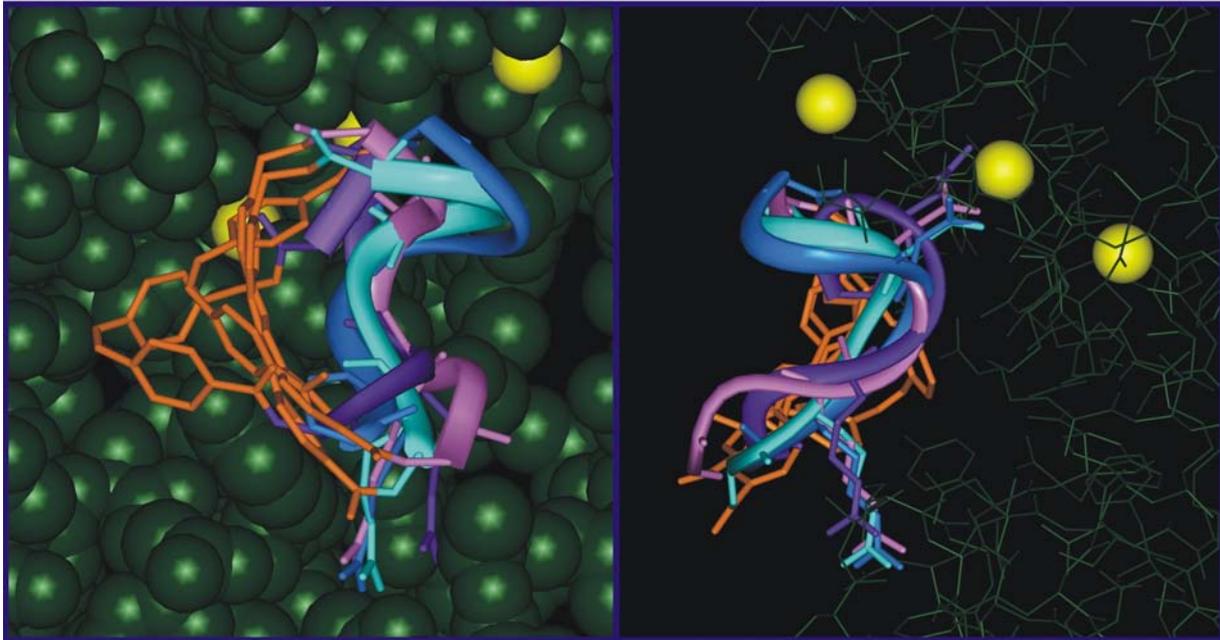
erklären könnte. Zudem ist eine Bindung des *cis*-RGD1, welchem ein größerer Konformationsraum zur Verfügung steht, entropisch ungünstig und könnte deshalb ebenfalls einen Beitrag zur geringeren Bindungsaffinität dieses Isomers leisten. Dieser Sachverhalt ist für konformationell uneingeschränkte Peptide bekannt.

Es sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass beide Konformere im Vergleich zum *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] weitaus ausgedehntere Modellsysteme sind, deren Strukturen vor allem durch den Azobenzolchromophor bestimmt werden. Alleinige Betrachtung der Orientierung der Seitenketten des Arginins und Aspartats könnten somit der Erklärung der Bindungsaffinität zwar nahe kommen, diese jedoch eventuell nicht vollständig erklären. So ist im *trans*-RGD1 eine Wende im D-Phe-Val-Teil des Peptids, welche bei Bindung an das Integrin mit einer Schleife des Propellers der  $\alpha$ -Untereinheit kollidieren würde. Es wäre jedoch auch denkbar, dass das Peptid oder das Protein selbst eine erhöhte Flexibilität aufweist und so eine bessere Bindung ermöglicht.

### **3.2.11 Vorgeschlagene Bindungsmodi an $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin**

Zum weiteren Verständnis der Bindungsmodi der synthetisierten Azopeptide RGD1 und RGD2 an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin wurden mit diesen weitere Modellierungsstudien durchgeführt. Dabei wurde allein die Integrinbindungstasche und Wassermoleküle, die diese im Radius von 18 Å umgeben, ausgeschnitten. Dieses Modell kann die in wässriger Lösung tatsächlich vorherrschenden Bedingungen zwar nicht vollständig wiedergeben, jedoch sollte es sowohl durch Wasser vermittelte Wasserstoffbrücken als auch Eigenschaften, die durch die Dielektrizitätskonstante des Wassers beeinflusst werden, ausreichend wiedergegeben.

Abb. 3-26 zeigt die durch diese Modellierungsstudien erhaltenen Bindungsmodi der *cis*- und *trans*-Konformere der RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2.



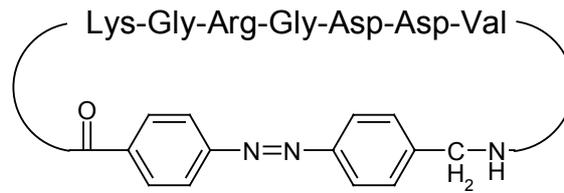
**Abb. 3-26:** *Modellierte Strukturen der Integrin/Azo-peptid-Komplexe; die  $\alpha V\beta 3$ -Integrin-Bindungstasche ist dunkelgrün, der AMPB-Photoschalter orange und die Metallionen in gelb dargestellt; trans-RGD1 ist in pink, cis-RGD1 in lila, trans-RGD2 in hellblau und cis-RGD2 in dunkelblau gezeigt; die Peptidrückgrate sind mit Bändern veranschaulicht.*

Man erkennt, dass im Vergleich zur Röntgenstruktur das RGD-Bindungsmotiv unverändert bleibt. Die synthetisierten Azo-peptide sollten somit den gleichen Bindungsmodus wie das cyclische RGD-Pentapeptid *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-] besitzen.

Zusätzlich lieferte diese Bindungsstudie das Ergebnis, dass der AMPB-Photoschalter der beiden Azo-peptide in ihren *cis*- und *trans*-Konformationen die gleiche Orientierung besitzt.

### 3.2.12 MD-Experimente zur Optimierung der monocyclischen RGD-Azo-peptide

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen von RGD1 und RGD2, welche mittels SPFS-Messungen, NMR-Strukturaufklärung und Molecular Modeling erhalten wurden, wurde ein weiteres optimiertes monocyclisches RGD-Azo-peptid, das **RGD3 (15)** entworfen (siehe Abb. 3-27).



**Abb. 3-27:** Molekülstruktur des monocyclischen RGD-Azopeptids RGD3 (15).

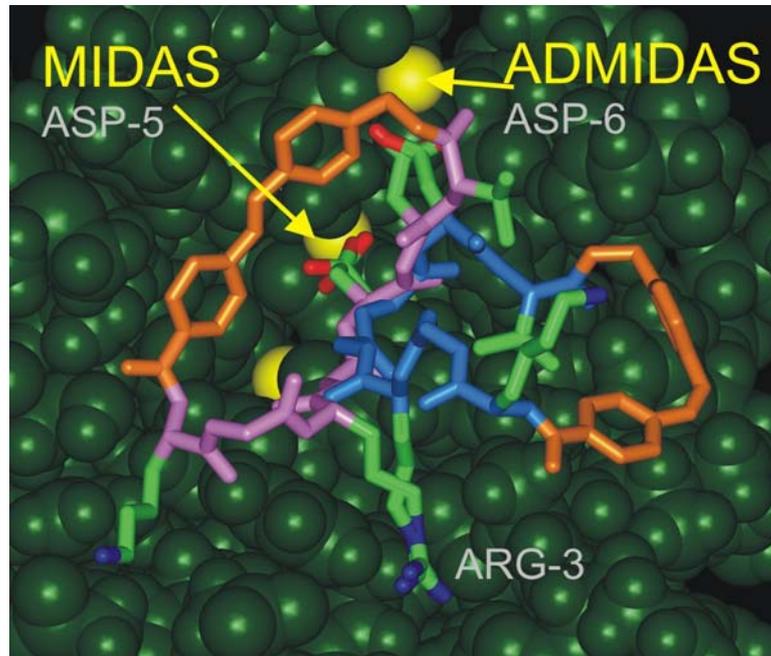
Es besitzt im Vergleich zu RGD1 und RGD2 ebenfalls sieben Aminosäuren und AMPB als reversiblen Photoschalter, unterscheidet sich von diesen jedoch in seiner Aminosäuresequenz. So wurde Alanin durch Glycin und D-Phenylalanin durch ein weiteres Aspartat ersetzt.

Der Ersatz von Alanin durch Glycin sollte dieser Position eine höhere Flexibilität ermöglichen und es der RGD-Erkennungssequenz erleichtern ihre beste Struktur für die Bindung an den Rezeptor zu finden. Das RGD-Motiv muß dazu bekanntlich einen  $\gamma$ -Turn ausbilden, welcher sich aufgrund sterischer Gegebenheiten mit Glycin leichter realisieren lassen sollte. Zudem wird es in diesem Peptid vermieden, dass die hydrophobe Methylgruppe des Alanins in das Lösemittel hineinzeigt (siehe Abb. 3-28).

Der Ersatz von D-Phenylalanin durch ein weiteres Aspartat sollte die Aufgabe erfüllen vorhandene hydrophobe Oberflächen zu reduzieren. Es wurde Aspartat als hydrophiler Ersatz gewählt, da die Aminosäuresequenz RGDD ein bekanntes Bindungsmotiv mit hoher Affinität für Integrine ist.

Der durch durch Molecular Modeling vorgeschlagene Bindungsmodus von RGD3 an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist in Abb. 3-28 gezeigt. Man erkennt, dass RGD3 in der Lage ist, über seine beiden Aspartatreste Asp5 und Asp6 die Metallionen sowohl der MIDAS- als auch der ADMIDAS-Region zu koordinieren. MD-Berechnungen ergaben einen großen Energieunterschied (ca.  $280 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) zwischen RGD1 und RGD3, welcher hauptsächlich auf den Austausch von D-Phe gegen Asp zurückzuführen ist. Während D-Phe in RGD1, aufgrund ungünstiger sterischer Wechselwirkungen einen stark positiven Energiebeitrag liefert, erzeugt das Asp in RGD3, hervorgerufen durch

äußerst günstige elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Metallion der ADMIDAS-Region einen negativen Energiebeitrag.



**Abb. 3-28:** Modellierte Strukturen der Integrin/Azopeptid-Komplexe; die  $\alpha V\beta 3$ -Integrin-Bindungstasche ist dunkelgrün, der AMPB-Photoschalter orange und die Metallionen in gelb dargestellt; das Peptidrückgrat des trans-RGD3 ist in pink, das des cis-RGD3 in blau gezeigt; Peptidseitenketten sind in Atomfarben eingefärbt.

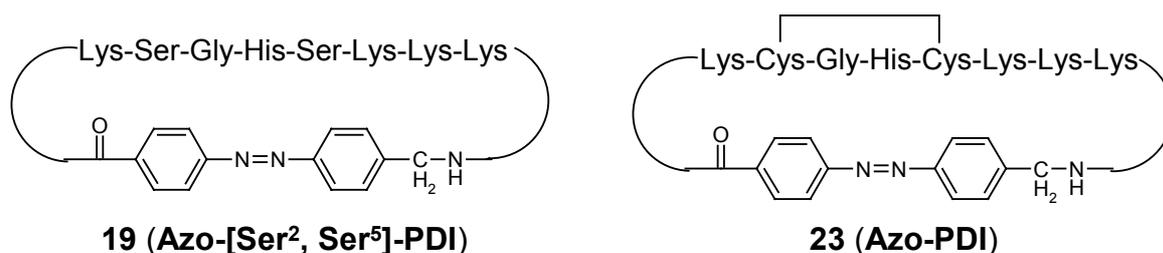
RGD3 sollte somit eine wesentlich höhere Bindungsaffinität als RGD1 und RGD2 für  $\alpha V\beta 3$ -Integrin aufweisen.

Um diese theoretisch erhaltenen Ergebnisse experimentell bestätigen zu können, wurde das RGD-Azopeptid RGD3 synthetisiert und UV- und CD-spektroskopisch charakterisiert. Entsprechende Bindungsmessungen von RGD3 an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin sind in Bearbeitung.

### 3.3 Mono- und bicyclische Biscysteinyl-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter

#### 3.3.1 Modellverbindungen

Die synthetisierten Modellverbindungen sollten neben dem reversiblen Photoschalter AMPB die Aminosäuresequenz -Cys-Gly-His-Cys- des Redoxmotivs der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) aufweisen. Um die synthetischen Modellverbindungen ihren natürlich vorkommenden Vertretern möglichst ähnlich zu gestalten, sollte diese Sequenz in das Peptidrückgrat eines cyclischen Peptids eingebaut werden, welches für dessen Wasserlöslichkeit zudem vier Lysinreste aufweist (siehe Abb. 3-29). Der Photoschalter ermöglicht eine Photomodulation der Struktur des Redoxmotivs und könnte dadurch unterschiedliche Redoxpotentiale für die *cis*- und *trans*-Konformere hervorrufen. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit freier Cysteinreste wurden diese durch das isostere Serin ersetzt, um eine strukturelle Charakterisierung des Bisseryl-Azopeptids als Analogon des reduzierten Biscysteinyl-Azopeptids zu ermöglichen. Die Molekülstrukturen des cyclischen Azopeptids *c*[His-Ser-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Ser-Gly-] (**19**, Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI) und des oxidierten bicyclischen Azopeptids *c*[His-Cys-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Cys-Gly-] (**23**, Azo-PDI) sind in Abb. 3-29 gezeigt.



**Abb. 3-29:** Molekülstrukturen von Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI.

Diese beiden Modellverbindungen sollten nach deren vollständiger Charakterisierung letztendlich etwaige Analogien zu früheren Ergebnissen mit ähnlichen AMPB-Peptiden ermöglichen, die das Redoxmotiv -Cys-Ala-Thr-Cys- der Thioredoxin-Reduktase in ihrer Sequenz enthielten (Cattani-Scholz *et al.*, 2002).

#### 3.3.2 Synthesen

Die Synthese der mono- und bicyclischen Biscysteinyl-Azopeptide

Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI sollte ähnlich den Synthesen der RGD-Azopeptide RGD1-3 wiederum in drei Schritten erfolgen:

1. Synthese der linearen seitenkettengeschützten PDI-Azopeptide am polymeren Träger;
2. Makrocyclisierung der linearen seitenkettengeschützten PDI-Azopeptide in verdünnter Lösung;
3. Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen, eventuelle Oxidation in verdünnter Lösung und Aufreinigung der Rohpeptide mittels präparativer HPLC.

### 3.3.2.1 Schutzgruppenabspaltung

Der letzte Schritt in der Synthese von Peptiden ist immer die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen. Dabei werden normalerweise thiolische Verbindungen, wie EDT oder Trialkylsilane wie TIS als Scavanger eingesetzt. Sie verhindern die Alkylierung von Methionin-, Tryptophan- oder Cysteinseitenketten durch Reaktion mit Carbokationen, die während der Acidolyse entstehen. Diese werden z. B. bei der Abspaltung von Tritylschutzgruppen von Histidin und Cystein gebildet, die in der Festphasensynthese standardmäßig als Fmoc-His(Trt)-OH bzw. Fmoc-Cys(Trt)-OH eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Stabilität des Tritylkations einerseits und der starken Nukleophilie der Thiolgruppe andererseits, kann es ohne Zusatz von Scavangern zu unvollständigen Schutzgruppenabspaltungen kommen.

Da sich, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, in der Synthese der monocyclischen RGD-Azopeptide RGD1 und RGD2 eine Anfälligkeit des AMPB-Photoschalters gegenüber thiolischen Verbindungen und Reduktionsmitteln herausgestellt hat, sollte in der Synthese der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI der Einsatz von Merkaptanen oder Trialkylsilanen als Scavanger gänzlich vermieden bzw. auf ein Mindestmaß verringert werden.

Im Vorfeld wurde deswegen eine Reduktion des AMPB-Photoschalters mit verschiedenen Scavangern untersucht. Fmoc-AMPB-OH wurde in DMF gelöst und in gleichem Verhältnis mit verschiedenen Scavangern bei Raumtemperatur behandelt. Der Reaktionsfortschritt wurde dabei mittels analytischer HPLC und analytischer HPLC-MS verfolgt. Der Versuch ergab, dass TIS gegenüber dem in früheren Arbeiten

häufig verwendeten TES geringere Mengen an Reduktionsprodukt liefert, während EDT die entsprechenden Hydrazoverbindungen in verstärktem Maße bildet.

Für die Entschützungsreaktion wurde deshalb lediglich eine Mischung von 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) verwendet, um jegliche Bildung der Hydrazoverbindungen auszuschließen, welche aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften zu den gewünschten Peptiden von diesen mittels präparativer HPLC nicht abgetrennt werden können.

Wasser selbst ist jedoch nur ein schlechter Scavanger und entfernt entstandene Tritylkationen nur unvollständig. Als beste Methode erwies sich nach mehreren Versuchen, das Peptid für 30 min mit 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) zu behandeln und die Reaktionslösung anschließend sofort mit kaltem Wasser zu verdünnen. Diese Mischung wird dreimal mit eiskaltem Diethylether extrahiert und das Lösemittel abschließend an der Gefriertrocknungsanlage im Hochvakuum entfernt. Mit dieser Methode konnte zwar die Reduktion des Photoschalters vollständig eliminiert werden, jedoch kein vollständiger Umsatz zu den gewünschten freien Azopeptiden erhalten werden. Zu ca. 25% erhält man Peptide, die durch Realkylierung mit Tritylkationen gebildet wurden, jedoch aufgrund ihrer höheren Hydrophobizität mittels präparativer HPLC leicht abzutrennen waren.

### **3.3.2.2 Oxidation zum Bicyclus**

Es sind viele Methoden zur Synthese von Cystinpeptiden bekannt. Allen gemein ist der Einsatz von verdünnten Lösungen des Peptids in wässrigen oder wässrig-organischen Lösemitteln, um Polymerisierungsreaktionen auszuschließen und die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke zu begünstigen. Als Oxidationsmittel werden häufig Luft, Sauerstoff, DMSO, Jod und GSH/GSSG-Mischungen verwendet und der pH-Wert der Reaktionslösung dabei schwach alkalisch gehalten. Die wohl am häufigsten verwendete Methode ist dabei die Oxidation des Peptids mit Luft oder reinem Sauerstoff in verdünnter Lösung. Diese Methode schlug in der Synthese des Azo-PDI jedoch fehl. Es wurde weder die Bildung von Nebenprodukten, noch die Bildung des gewünschten Cystinpeptids beobachtet. Permanentes Belichten bei 350 nm konnte eine Disulfid-Cyclisierung ebenfalls nicht begünstigen. Azo-PDI konnte letztendlich mit Jod in 50% HOAc/H<sub>2</sub>O (v/v) erfolgreich oxidiert werden.

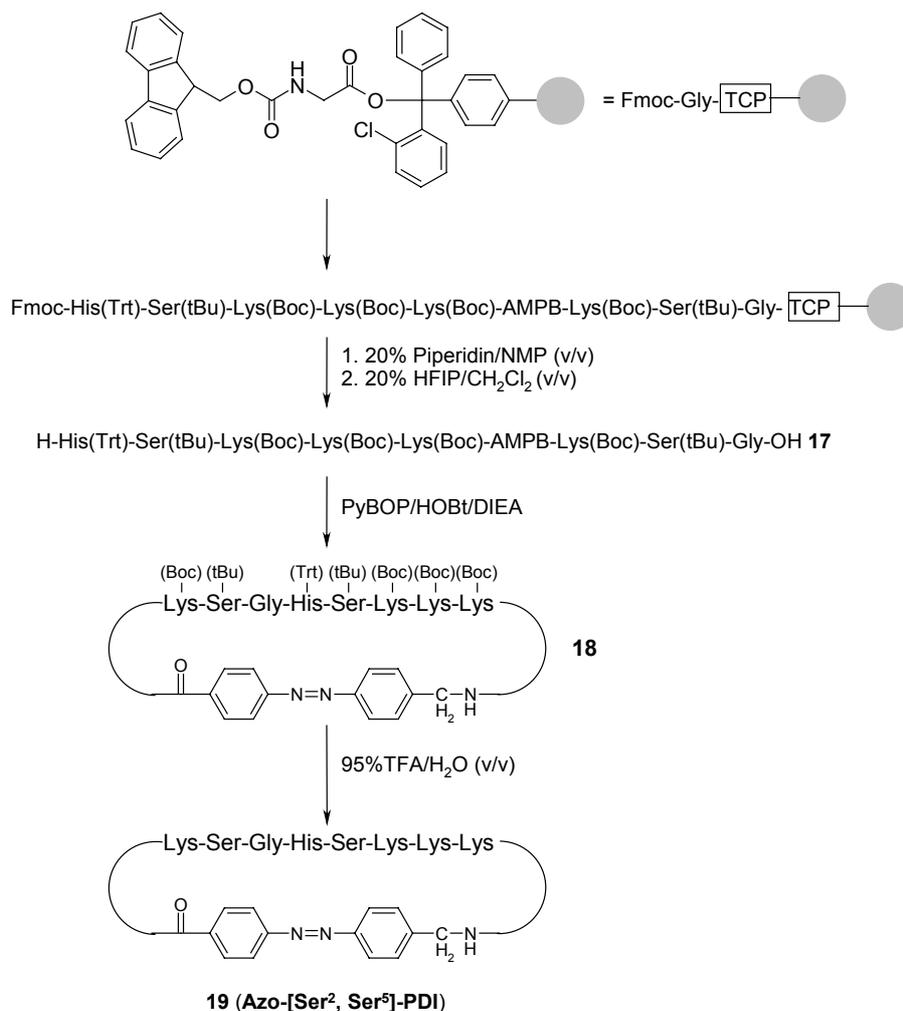
### 3.3.2.3 Optimierte Synthesen

Abb. 3-30 und Abb. 3-31 zeigen die optimierten Synthesen der mono- und bicyclischen Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (**19**) und Azo-PDI (**23**).

#### *Synthese des Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (**19**)*

Das lineare seitenkettengeschützte AMPB-Peptid H-His(Trt)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-AMPB-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Gly-OH **17** wurde am polymeren Träger standardmäßig mit Fmoc/tBu-Strategie und HOBt/HBTU/DIPEA-Aktivierung aufgebaut und mit einer Mischung aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFE/AcOH (8:1:1, v/v/v) bzw. 20% Hexafluoroisopropanol/DCM (v/v) vom Harz abgespalten. Die Vollständigkeit der Kupplungsschritte wurde mit Hilfe des Kaiser-Testes festgestellt und bei gegebener Unvollständigkeit ein weiterer Kupplungsschritt durchgeführt. Die anschließende Makrocyclisierung in Lösung wurde mit PyBOP/HOBt/DIPEA in DMF bei einer Peptidkonzentration von  $2,6 \cdot 10^{-4}$  M ausgeführt. Das Entschützen des cyclischen Azopeptids **18** erfolgte abschließend mit 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v). Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC, unter Verwendung eines geeigneten Gradienten gereinigt und lieferte das monocyclische Azopeptid **19** als einheitliche Verbindung. Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI wurde für zusätzliche NMR-spektroskopische Messungen mit Fmoc<sup>15</sup>N-Gly-OH synthetisiert.

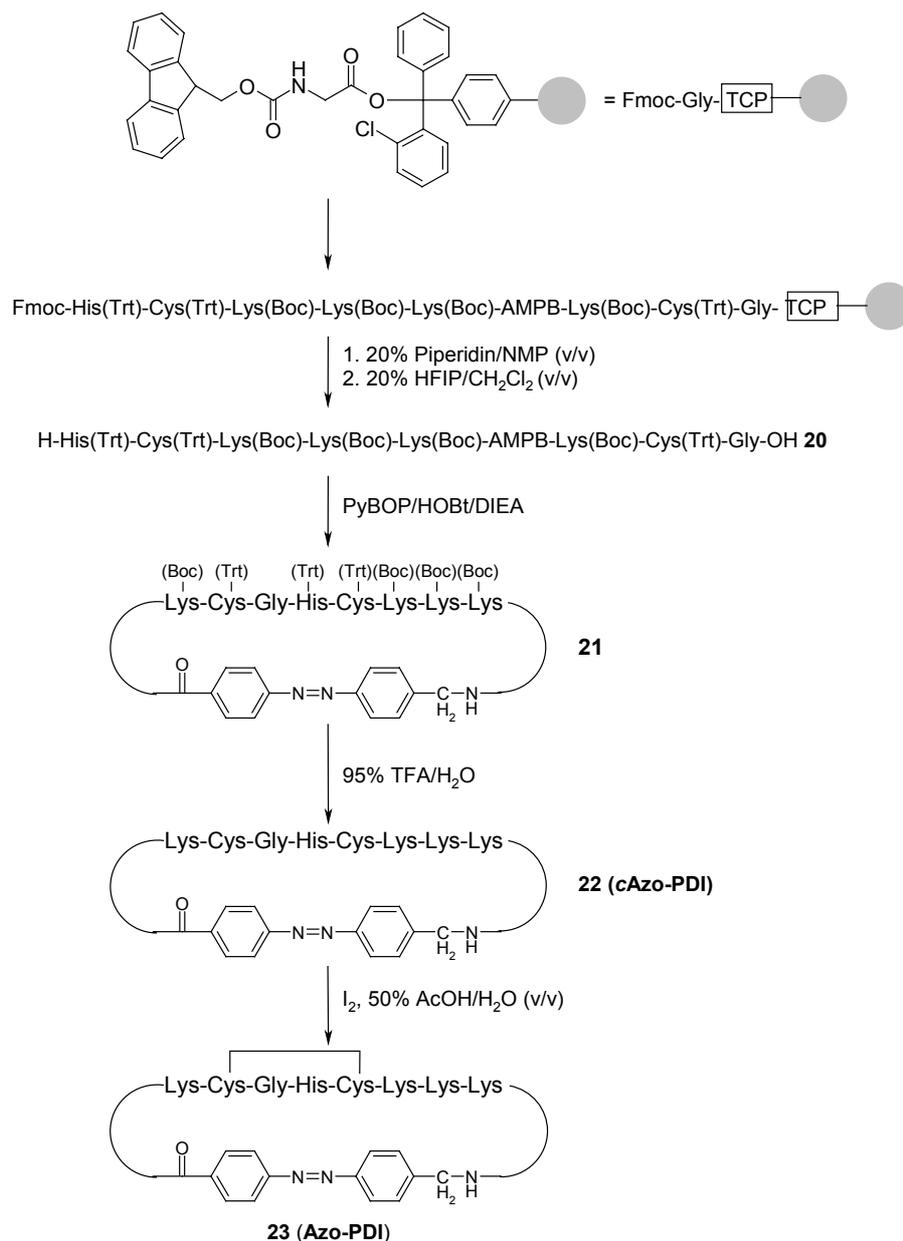
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3-30:** Synthese des *c*[His-Ser-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Ser-Gly-] (**19**, Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI); Festphasensynthese der linearen seitenkettengeschützten Vorstufe **17**, Makrocyclisierung zum seitenkettengeschützten cyclischen Azopeptid **18** in verdünnter Lösung und abschließende Schutzgruppenabspaltung zum gewünschten monocyclischen PDI-Azopeptid **19**.

### Synthese des Azo-PDI (**23**)

Das bicyclische Azopeptid Azo-PDI (**23**) wurde bis zum Monocyclus **22** (*c*Azo-PDI), analog dem Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI synthetisiert. Für die Oxidation des Biscysteinyl-Peptids wurde das Peptid bei einer Konzentration von  $0,9 \cdot 10^{-4}$  M in 50% HOAc/H<sub>2</sub>O (v/v) gelöst und mit einer 0,1 M Lösung von Jod in 50% HOAc/H<sub>2</sub>O (v/v) versetzt (2 eq./Thiolgruppe). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels analytischer HPLC verfolgt und das oxidierte Peptid abschließend mittels präparativer HPLC unter Verwendung eines geeigneten Gradienten gereinigt.

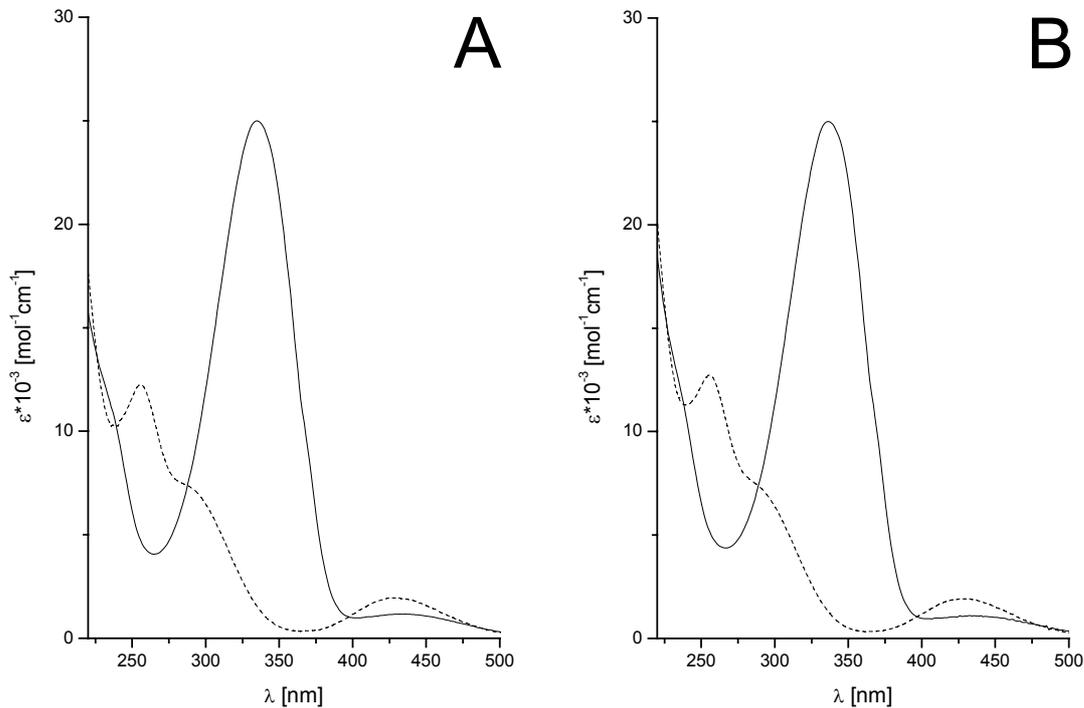


**Abb. 3-31:** Synthese des oxidierten Azopeptids *c*[His-Cys-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Cys-Gly-] (**23**, Azo-PDI); Festphasensynthese der linearen seitenkettengeschützten Vorstufe **20**, Makrocyclisierung zum seitenkettengeschützten cyclischen Azopeptid **21** in verdünnter Lösung, Schutzgruppenabspaltung zum monocyclischen Azopeptid **22** (cAzo-PDI) und abschließende Iodoxidation in 50% HOAc/H<sub>2</sub>O (v/v) zum gewünschten bicyclischen Azopeptid **23**.

### 3.3.3 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung

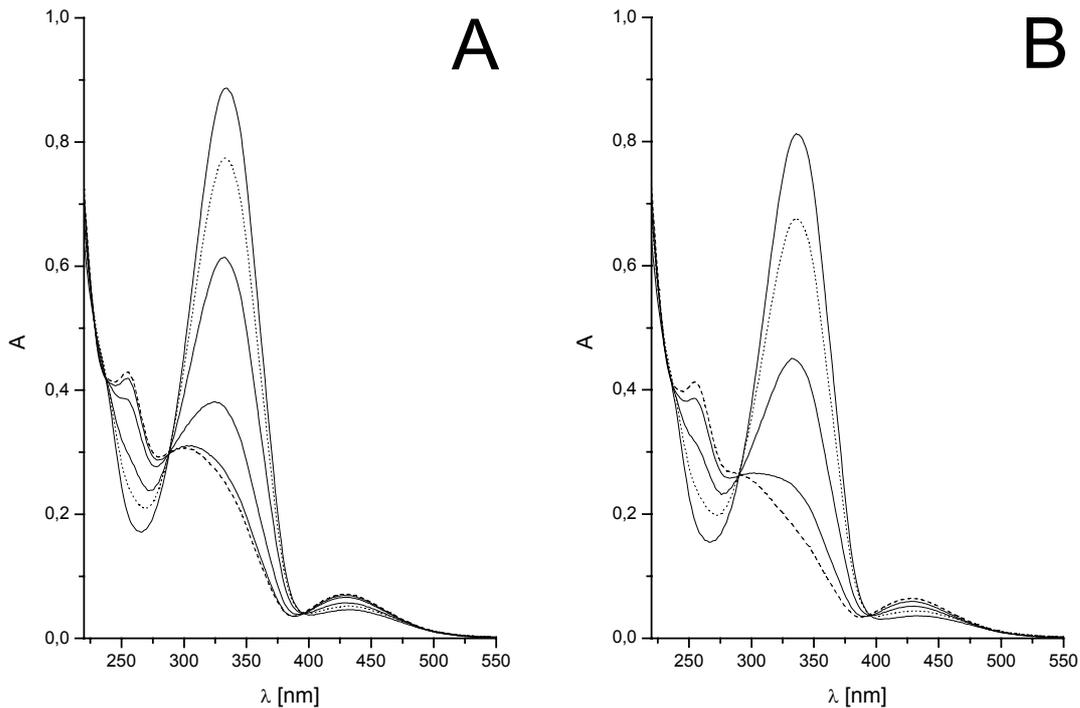
Die unterschiedlichen Retentionszeiten der *cis*- bzw. *trans*-Konformere der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI auf einer analytischen HPLC-Anlage ermöglichten die Aufnahme ihrer reinen *cis*- (----) bzw. *trans*- (—) UV-Spektren mittels eines angeschlossenen Photodiodenarrays. Sie sind in Abb. 3-32 gezeigt und stimmen mit UV-Spektren anderer synthetisierter mono- und bicyclischer Azopeptide

mit AMPB als Photoschalter überein (Renner *et al.*, 2002).



**Abb. 3-32:** UV-Spektren der reinen trans- (—) bzw. cis- (----) Konformere der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (A) und Azo-PDI (B).

Die UV-spektroskopische Bestimmung der Photokinetiken der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI erfolgte nach deren thermischer Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 48 h unter Lichtausschluß. Sie sind in Abb. 3-33 dargestellt. Die Messungen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,0 durchgeführt und durch Belichtung bei 360 nm bzw. 450 nm induziert. Wie bereits erwähnt, lieferte Bestrahlung oder thermische Relaxation auch für diese beiden Peptide keine Abbauprodukte.



**Abb. 3-33:** Photokinetiken der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (A) und Azo-PDI (B); die Spektren wurden im Bereich von 220 nm bis 600 nm nach einer Belichtungsdauer von 0,0; 0,1; 0,25; 0,50 (—) und 5,0 min (---) bei 350 nm sowie 5 min (.....) bei 450 nm für Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und einer Belichtungsdauer von 0,0; 0,10; 0,25 (—) und 5,00 min (---) bei 350 nm und 5 min (.....) bei 450 nm für Azo-PDI in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen.

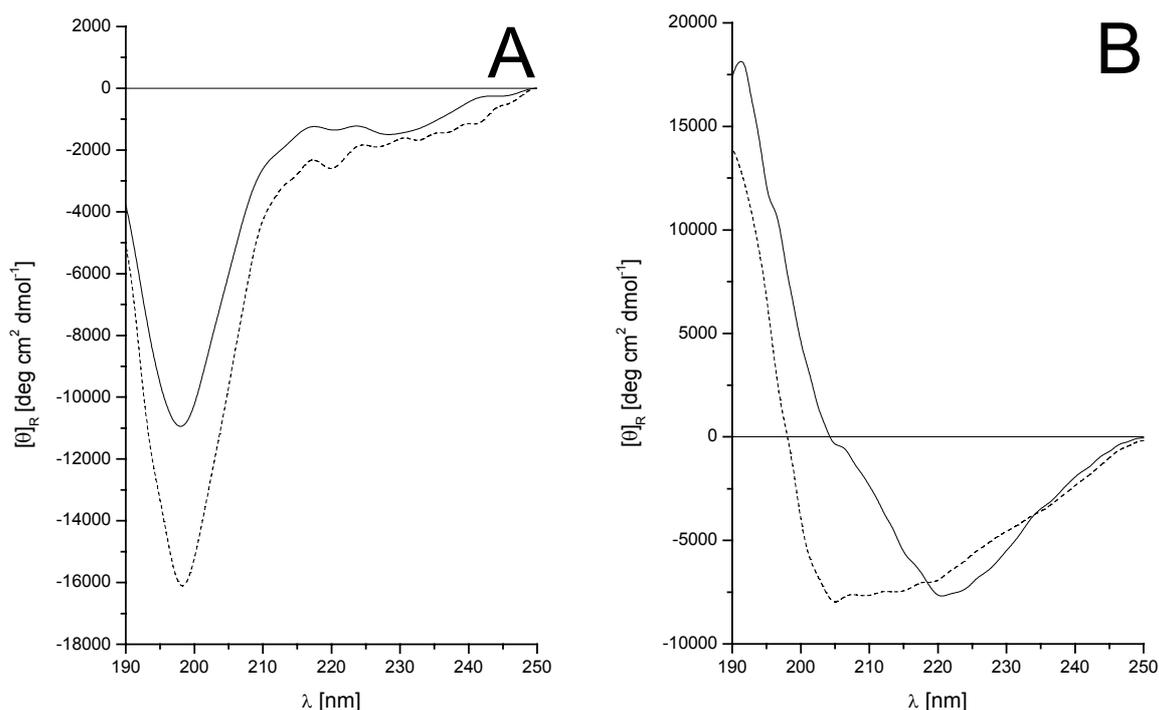
In den Photokinetiken der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (A) und Azo-PDI (B) sind jeweils drei isosbestische Punkte erkennbar. Diese liegen für das monocyclische Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI bei 239 nm, 288 nm und 397 nm. Dessen *trans*-Isomer besitzt bei 335 nm das Maximum für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang. Die isosbestischen Punkte des bicyclischen Azo-PDI liegen bei 239 nm, 288 nm und 397 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 337 nm das Maximum für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang.

Die nahezu identische Lage der isosbestischen Punkte spiegelt die Ähnlichkeit der beiden Azopeptide wieder. Der Austausch von Cystein gegen das isostere Serin im monocyclischen Peptid wirkt sich folglich auf die Banden des AMPB-Photoschalters nicht aus. Der photostationäre *cis*-Zustand wird im Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI nach 0,75 min, im bicyclischen Azo-PDI bereits nach 0,5 min erreicht. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen von mono- und bicyclischen TRR-Azopeptiden mit AMPB als Photoschalter überein, in denen eine etwas schnellere Kinetik der bicyclischen

gegenüber deren korrespondierenden monocyclischen Verbindungen beobachtet wurde (Behrendt, 2000). Photoisomerisierung zurück in ihre photostationären *trans*-Zustände erfolgt binnen 1,5 min, liefert jedoch wie üblich auch nach verlängerter Belichtungszeit nicht den ursprünglichen *trans*-Gehalt. Dieser kann jedoch durch thermische Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 48 h unter Lichtausschluß wiederhergestellt werden. <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestätigte den ausschließlichen *trans*-Gehalt dieser thermisch relaxierten Proben.

### 3.3.4 CD-spektroskopische Charakterisierung

Die CD-Konformationsanalysen der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI wurden im Bereich von 190-250 nm in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen und in Abb. 3-34 gezeigt.



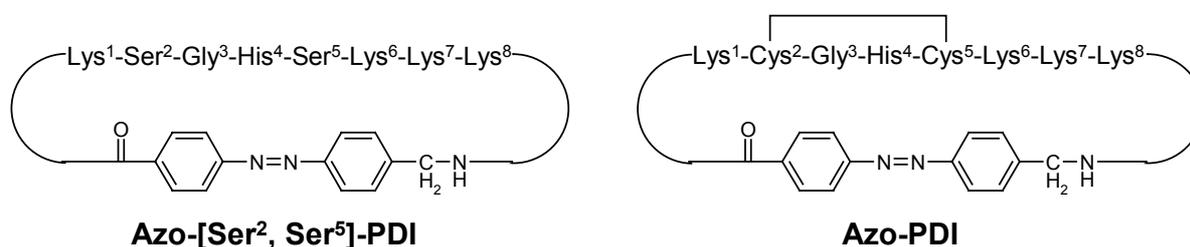
**Abb. 3-34:** CD-Spektren der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI (A) und Azo-PDI (B) in ihrer *trans*- (—, rein) und *cis*-Konformation (----, photostationärer Zustand).

Die CD-Spektren der Isomere des Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI besitzen einen relativ ähnlichen Kurvenverlauf mit einem Minimum bei 198 nm, welches sensitiv auf eine Photoisomerisierung reagiert. Die Spektren zeigen Ähnlichkeit zu Spektren der Random-coil-Konformation und weisen auf das Vorliegen ungeordneter Strukturen

hin. Das Minimum bei 198 nm ist im *cis*-Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI stärker ausgeprägt und deutet auf eine im Vergleich zum *trans*-Konformer ungeordnetere Struktur hin. Diese Eigenschaft konnte mittels NMR-Konformationsanalyse bestätigt werden. Die CD-Spektren der Isomere des Azo-PDI unterscheiden sich deutlicher voneinander. Das breite Minimum des *cis*-Isomers bei 205 nm könnte zusammen mit dem Maximum unter 190 nm auf eine helikale Konformation des Peptidrückgrats hinweisen. Die Intensitäten sind jedoch nur mit maximal 25% an helikalen Konformationen vereinbar, also mit z. B. zwei von acht Aminosäureresten. Das *trans*-Azo-PDI mit einem Maximum bei 191 nm und einem Minimum bei 220 nm könnte auf eine  $\beta$ -Turn-ähnliche Struktur schließen lassen.

### 3.3.5 NMR-spektroskopische Charakterisierung.

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des *trans*-Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und *trans*-Azo-PDI wurden nach deren thermischer Relaxation im Wasserbad bei ca. 50 °C für 72 h unter Lichtausschluß aufgenommen. Sie ergaben ein fast ausschließliches Vorliegen der *trans*-Konformere (> 99%). Nach intensivem Belichten mit Licht bei 360 nm wurde jeweils ein photostationärer *cis*-Zustand mit einem maximalen Anteil des jeweiligen *cis*-Konformers von 80% ± 5% erhalten. Dieses Verhältnis wurde ebenfalls mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt und ist für die Strukturbestimmung der *cis*-Konformere ausreichend. Zum besseren Verständnis wurden die jeweiligen Aminosäuren wie in Abb. 3-35 bezeichnet.

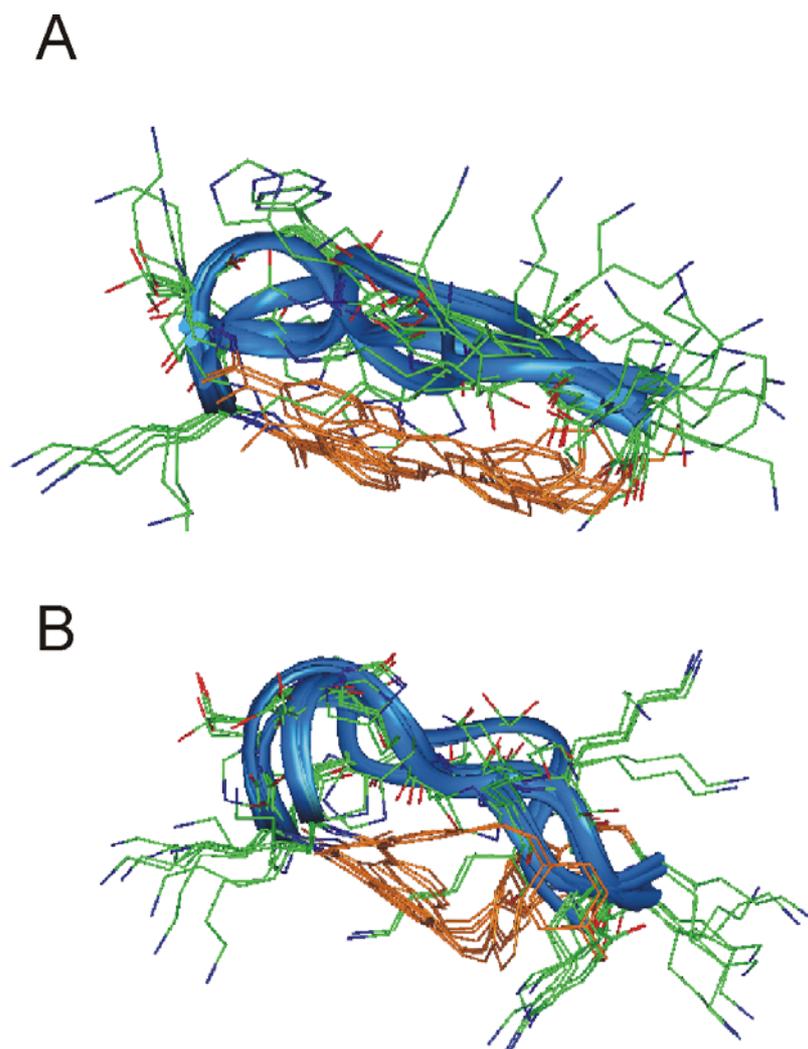


**Abb. 3-35:** Die für die NMR-Konformationsanalyse der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI verwendeten Bezeichnungen der einzelnen Aminosäuren.

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Azopeptide Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und Azo-PDI in ihrer *trans*- bzw. *cis*- Konformation sind durch zwei verschiedene Resonanz-Sätze charakterisiert. Diese unterscheiden sich in ihren jeweiligen chemischen Verschiebungen so stark voneinander, dass eine Strukturbestimmung der

*cis*-Konformere aus ihrem photostationären Zustand möglich ist. Aus den NOESY-Spektren konnten dafür genügend Interproton-Abstandsbedingungen extrahiert werden, um strukturelle Präferenzen der beiden Isomere in wässriger Lösung zu erhalten.

Abb. 3-36 zeigt die NMR-Strukturfamilien der *trans*- und *cis*-Konformere des Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI.

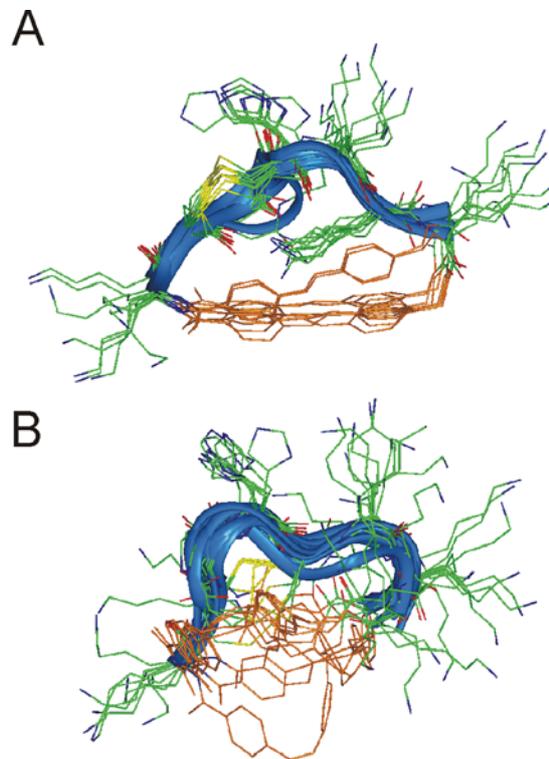


**Abb. 3-36:** NMR-Strukturfamilien der beiden Konformationsisomere des monocyclischen Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI; gezeigt sind die jeweils zehn energieärmsten Strukturen des Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI in seiner *trans*- (A) und *cis*-Konformation (B); das Peptidrückgrat ist blau, der AMPB-Photoschalter orange und die restlichen Atome in ihren Atomfarben eingefärbt.

Man erkennt, dass die Strukturen beider Konformere relativ schlecht definiert sind. Die im Vergleich zu den monocyclischen RGD-Azopeptiden RGD1, RGD2 und RGD3 um eine Aminosäure größere Ringform erschwert hier die

Photomodulierbarkeit, da der verfügbare Konformationsraum nur ungenügend eingeschränkt ist. *Cis*- und *trans*- Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI weisen zwischen Lys1 und His4 eine enge Schleife auf, nach welcher das *trans*-Konformer in eine mehr ausgestreckte Form, das *cis*-Konformer in eine eher gewundene Form übergeht. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um einen regulären Turn, da weder Temperaturverschiebungen von Amidresonanzen noch D<sub>2</sub>O-Austauschexperimente eine Wasserstoffbrücke ergaben.

Abb. 3-37 zeigt die NMR-Strukturfamilien der *trans*- und *cis*-Konformere des Azo-PDI.



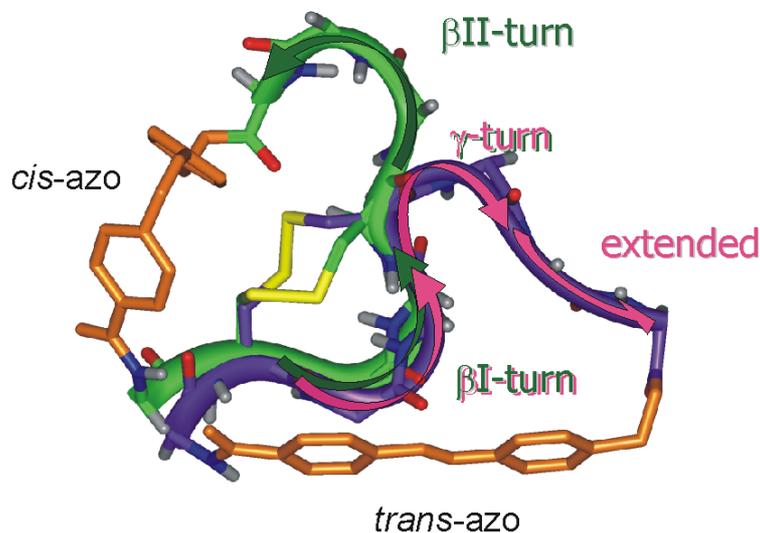
**Abb. 3-37:** NMR-Strukturfamilien der beiden Konformationsisomere des bicyclischen Azo-PDI; gezeigt sind die jeweils zehn energieärmsten Strukturen des Azo-PDI in seiner *trans*- (A) und *cis*-Konformation (B); das Peptidrückgrat ist blau, der AMPB-Photoschalter orange und die restlichen Atome in ihren Atomfarben eingefärbt; die Disulfidbrücke ist in gelb gezeigt.

Man erkennt, dass die Strukturen beider Konformere, im Vergleich zum Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI und zu allen früher synthetisierten mono- und bicyclischen Azopeptiden sehr gut definiert sind. Es konnten keine Nebenkongformationen gefunden werden. Die RMSD-Werte betragen 0,61 Å für *trans*-Azo-PDI bzw. 1,09 Å für *cis*-Azo-PDI. Dies ist vor allem auf die konformationelle Einschränkung des

Peptidrückgrats, welche durch die zusätzliche Disulfidbrücke des Biscysteinyl-Motivs hervorgerufen wird, zurückzuführen. Die Aminosäuren des Biscysteinyl-Motivs -Cys-Gly-His-Cys- formen in beiden Isomeren einen verzernten  $\beta$ -Turn, welcher durch die Disulfidbrücke fixiert wird. *Cis*-Azo-PDI besitzt im weiteren Verlauf einen auf Lys6 zentrierten regulären  $\gamma$ -Turn und einen weiteren verzernten  $\beta$ -Turn. *Trans*-Azo-PDI besitzt eine weitaus langgestrecktere Struktur. Der auf Lys6 zentrierte reguläre  $\gamma$ -Turn ist folglich stärker verzerrt als im *cis*-Isomer und die Reste Lys6, Lys7 und Lys8 nehmen eine ausgestreckte  $\beta$ -Konformation ein. Die Seitenkette des Lys7 befindet sich überraschenderweise zwischen dem Peptidrückgrat und dem AMPB-Photoschalter.

Der Einbau des -Cys-Gly-His-Cys- Motivs der Protein-Disulfid-Isomerase ermöglichte es somit erstmals ein *two-state*-System, also ein System mit zwei definierten Zuständen zu verwirklichen, welches als einfaches Modell für allosterische Konformationsänderungen dienen kann.

Abb. 3-38 veranschaulicht die oben erklärten Strukturelemente und die bei der Isomerisierung auftretenden Strukturänderungen.



**Abb. 3-38:** Strukturelemente des bicyclischen Azo-PDI in seiner *trans*- (A) und *cis*-Konformation (B); Strukturelemente des *cis*-Azo-PDI sind pink, das zugehörige Peptidrückgrat ist violett eingefärbt; Strukturelemente des *trans*-Azo-PDI sind dunkelgrün, das zugehörige Peptidrückgrat ist hellgrün eingefärbt; die Cysteinbrücke ist in gelb angedeutet.

Während das Biscysteinyl-Motiv durch seine Disulfidbrücke in einer ähnlichen Lage bleibt, verändert sich sowohl die Konformation des restlichen Peptidrückgrats als auch

die Position des AMPB-Photoschalters. Die gesamte Isomerisierung des *trans*-Konformers in sein *cis*-Konformer könnte dabei als eine Art 180°-Drehbewegung um Cys2/Cys5, mit gleichzeitiger Konformationsänderung des ausgestreckten Lys6-Lys8 Peptidteils in einen  $\beta$ II-Turn bezeichnet werden. Zusätzlich kommt die im *trans*-Konformer vom AMPB-Photoschalter eher weit entfernte Disulfidbrücke des Biscysteinyln-Motivs diesem im *cis*-Konformer ziemlich nahe.

In diesem Zusammenhang sollte man zudem erwähnen, dass sich die mono- und bicyclischen Peptide Azo-PDI und Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI von früher synthetisierten mono- und bicyclischen Azo-TRR-Peptiden bei gleicher Ringgröße nur in drei Aminosäuren unterscheiden. Der Ersatz von Ala mit Gly in den Azo-PDI-Peptiden ermöglicht diesen eine erhöhte Flexibilität des Peptidrückgrats, da Gly aufgrund des Fehlens einer Seitenkette mehr Konformationen des Peptidrückgrats zulässt, als alle anderen Aminosäuren. Zudem ermöglicht Gly dem Peptid seine konformationelle Einschränkung durch den AMPB-Photoschalter zu einem gewissen Grade zu neutralisieren und bietet somit beiden Konformeren die Möglichkeit eindeutig definierte Strukturen einzunehmen. Der Ersatz von Thr mit His verändert die Strukturen ebenso wenig wie der Austausch von Asp gegen Lys, obwohl diese unterschiedlich geladen sind. Die Tatsache, dass Gly in der Lage ist, strukturelle Präferenzen von Peptiden zu beeinflussen, steht im Einklang zu früheren Ergebnissen von mono- und bicyclischen Peptiden mit Azobenzolphotoschaltern, in welchen der Einbau einer zusätzlichen Methylengruppe zu einer kompletten Veränderung ihrer Strukturen führte (Renner *et al.*, 2000a,b).

### 3.3.6 Bestimmung der thermischen Relaxationsraten

Die thermischen Relaxationsraten  $k_{ct}$  der Azopeptide Azo-PDI und Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI sind zusammen mit ihren entsprechenden Aktivierungsenergien  $E_a$  in Tab. 3-2 gezeigt.

**Tab. 3-2:** Geschwindigkeitskonstanten der thermischen *cis*⇌*trans* Isomerisierung von bicyclischen AMPB-Peptiden und ihren monocyclischen Analoga.

Azopeptid	Thermische Relaxation, $k_{ct}$ [ $h^{-1}$ ]				
	10 °C	20 °C	30 °C K	40 °C	$E_a$ ( $kJ \times mol^{-1}$ )
Azo-PDI <sup>a</sup>	0,00044	0,0019	0,00672	0,0274	101
Azo-[Ser <sup>2</sup> , Ser <sup>5</sup> ]-PDI <sup>b</sup>	-	0,0015	0,0049	-	87
	7 °C	22 °C			
Azo-TRR (bicyclisch) <sup>c</sup>	-	0,0048	0,0143	0,0417	85
Azo-TRR (monocyclisch) <sup>c</sup>	<0,001	0,0029	0,0080	0,0278	97

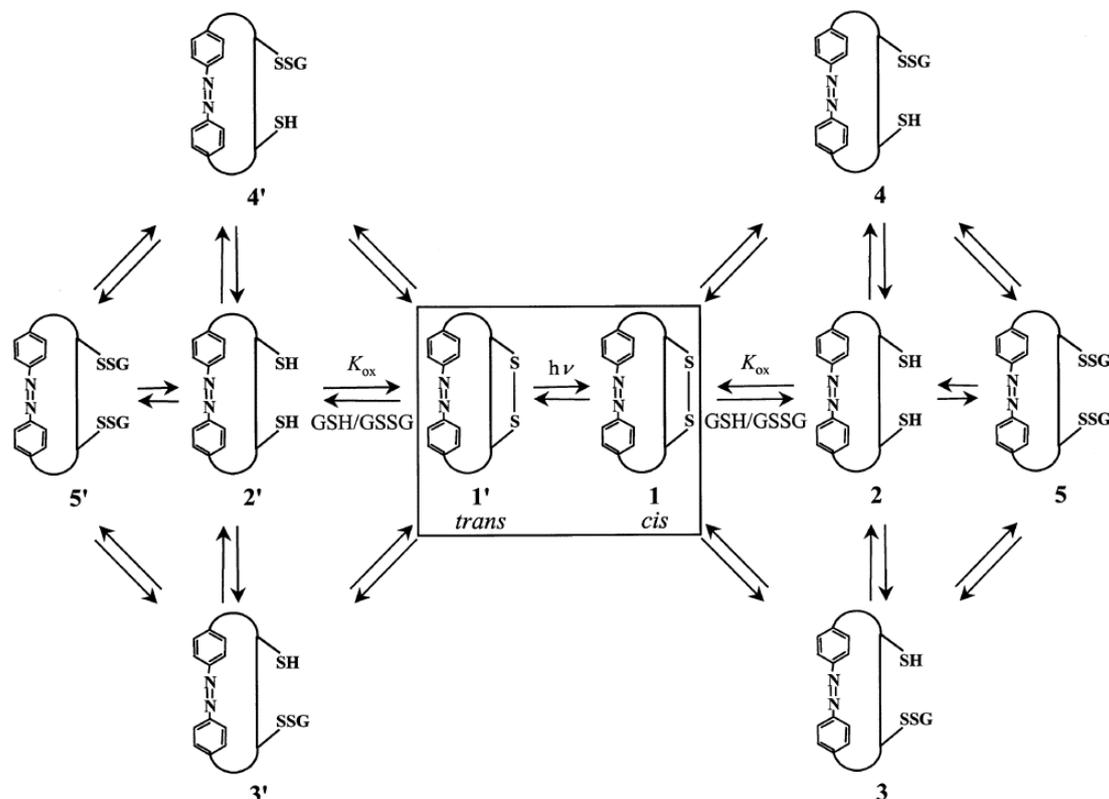
*a:* bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie; *b:* bestimmt mittels UV/Vis-Spektroskopie; *c:* bereits veröffentlichte Ergebnisse (Renner *et al.*, 2002).

Die für Azo-PDI und Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI ermittelten Aktivierungsenergien sind mit früher ermittelten Werten von wasserlöslichen mono- und bicyclischen Azopeptiden vergleichbar (Renner *et al.*, 2002). Die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen wirken sich somit nur äußerst gering auf die vorhandenen Energiebarrieren aus. Während jedoch in den Azo-TRR-Peptiden die Energiebarriere für die bicyclische Struktur geringer ist als für die monocyclische, zeigen die Energiebarrieren der Azo-PDI-Peptide ein dazu genau umgekehrtes Verhalten. Die weitere Konformationseinschränkung durch die zusätzliche Disulfidbrücke im Azo-PDI verhindert hier, dass das *cis*-Konformer einen einfacheren Weg in sein entsprechendes *trans*-Konformer einschlagen kann und eine höhere Energiebarriere dafür überwinden muß.

### 3.3.7 Bestimmung der Redoxpotentiale von Azo-PDI

Die Bestimmung der Redoxpotentiale von Thiol/Disulfid-Redoxsystemen ist aufgrund der Bildung von stabilen Metallthiolat-Komplexen auf elektrochemischem Wege nicht durchführbar (Jocelyn, 1972). Sie erfolgte deshalb über eine indirekte Bestimmungsmethode mittels Thiol-Disulfidaustausch mit einem zweiten RSH/RSSR-Redoxpaar (Lees und Whitesides, 1993). Diese Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe zur Ermittlung von Redoxpotentialen verschiedener Biscysteinyl-Peptide mit und ohne Azobenzolphotoschalter erfolgreich eingesetzt (Siedler *et al.*,

1993; Cattani-Scholz *et al.*, 2002; Cabrele *et al.*, 2002). Als Referenz-Redoxpaar wurde GSH/GSSG verwendet, dessen  $E_0'$ -Wert bekannt ist ( $E_0'$ (GSSG)= -240 mV) (Rost und Rapoport, 1964).



**Abb. 3-39:** Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen bicyclischer Azopeptide; die möglichen Spezies der *trans*-Isomere sind mit ' gekennzeichnet.

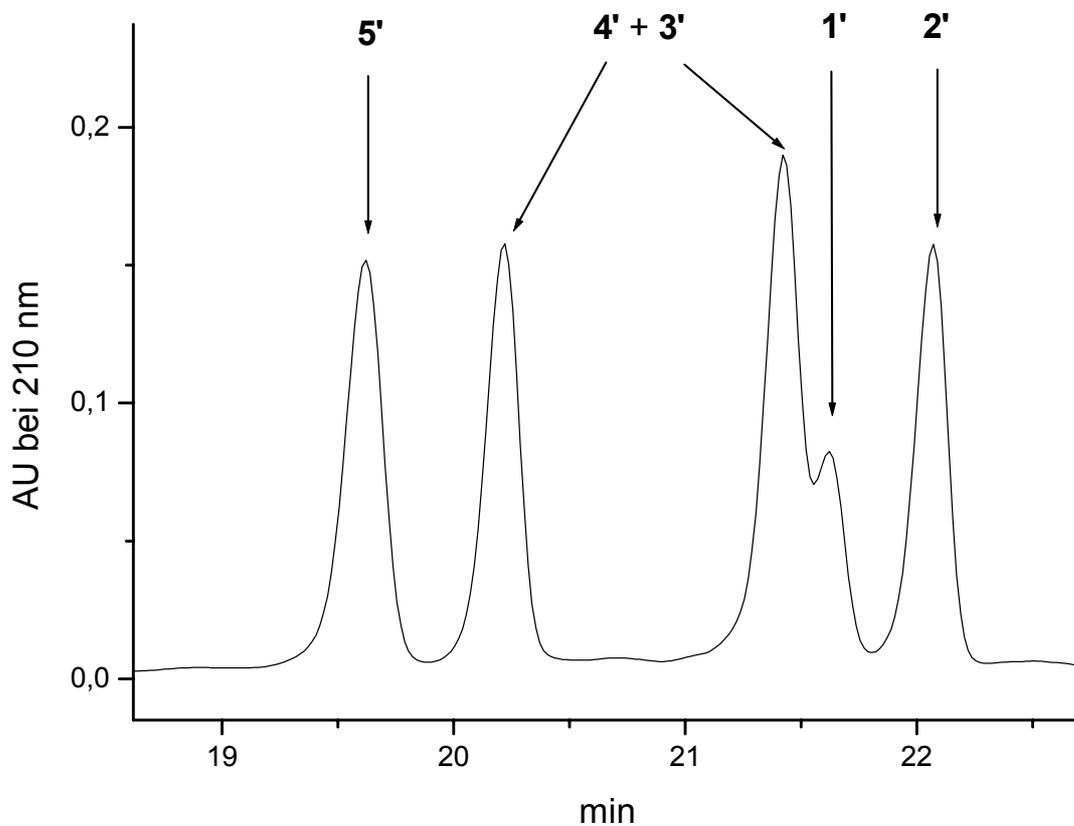
Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen sind nukleophile Substitutionen. Ein Thiol (RSH) oder Thiolanion (RSH<sup>-</sup>) greift als Nukleophil an einer Disulfidbindung (RS-SR bzw. RS-SR') an. Dies führt zur formalen Oxidation des Nukleophils und zur formalen Reduktion der ausgetauschten Abgangsgruppe (Jacob *et al.*, 2003).

Abb. 3-39 zeigt alle möglichen Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen bicyclischer Azopeptide in ihren *cis*- und *trans*-Konformationen in GSH/GSSG-Redoxpuffer.

Die mit ' gekennzeichneten Spezies repräsentieren *trans*-Verbindungen, die übrigen Spezies stehen für ihre entsprechenden *cis*-Verbindungen. Das oxidierte PDI-Peptid ist in seiner *cis*-Konformation mit **1**, in seiner *trans* Konformation mit **1'**, das reduzierte PDI-Peptid entsprechend mit **2** bzw. **2'** bezeichnet. **3**, **3'**, **4** und **4'** stehen für Monoglutathionylazopeptide, wobei **3** und **4** zueinander konstitutionsisomer sind. **5** und **5'** sind Bisglutathionylazopeptide. Sämtliche Spezies stehen dabei untereinander

wiederum im Gleichgewicht, wodurch ein kompliziertes Gesamtsystem entsteht. Zur Bestimmung des *cis*-Redoxpotentials muß jedoch nur **1** und **2**, zur Bestimmung des *trans*-Redoxpotentials nur **1'** und **2'** quantitativ ermittelt werden.

Zur experimentellen Bestimmung des Redoxpotentials der *cis*- und *trans*-Isomere wurden HPLC-Chromatogramme des stationären Produktgemisches aufgenommen. Abb. 3-40 zeigt einen Ausschnitt aus einem für die Bestimmung des Redoxpotentials des *trans*-Azo-PDI verwendeten HPLC-Chromatogramms. Die Trennung der erwähnten Spezies war dabei so gut, dass eine Integration aller Peaks möglich war.



**Abb. 3-40:** HPLC-Chromatogramm eines stationären Produktgemisches von Azo-PDI in GSH/GSSG-Redoxpuffer; gezeigt ist ein Ausschnitt eines HPLC-Chromatogramms bei einer Wellenlänge von 210 nm; die Zuordnung der Peaks erfolgte mittels analytischer HPLC-MS; die Beschriftung der Peaks entspricht der im Text verwendeten Bezeichnungen.

Die Zuordnung der Peaks wurde mittels HPLC-MS durchgeführt. Dabei konnten die beiden Peaks der konstitutionsisomeren Monoglutathionylazopeptide **3'** und **4'** natürlich nicht unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Redoxpotentiale des *cis*- und *trans*-Azo-PDI wurden drei Versuche mit unterschiedlichen GSH/GSSG-Verhältnissen durchgeführt: 10 mM

GSH/10 mM GSSG, 5 mM GSH/10 mM GSSG und 10 mM GSH/3 mM GSSG. Ebenso wurde die Konzentration des Redoxpuffers im Verhältnis zum Azo-PDI variiert. Die Peptidkonzentrationen lagen bei allen Versuchen zwischen 0,1 und 0,3 mM. Die Peaks **1'** und **2'** wurden integriert und daraus  $K_{ox}$  bzw.  $E_0$  über die im Material und Methoden-Teil angegebene Formel bestimmt, wobei über drei Messungen gemittelt wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-3 aufgelistet.

**Tab. 3-3:** Gleichgewichtskonstante und Redoxpotential des *trans*-Azo-PDI.

Azopeptid	$K_{ox}$ [mM]	$E_0'$ [mV]
<i>trans</i> -Azo-PDI	$3,72 \pm 0,08$	-0,167

Das Redoxpotential wurde mit  $E_{0, GSH/GSSG} = -240mV$  (Rost und Rapoport, 1964) ermittelt.

Die Bestimmung des Redoxpotentials von *cis*-Azo-PDI war auf diesem Wege jedoch nicht möglich, da in Zeitabhängigkeit zum einen unerwünschte Nebenprodukte auftraten und zum anderen eine Transformation der *cis*-Spezies beobachtet werden konnte.

Dies kann durch eine mögliche Reduktion des AMPB-Photoschalters mittels GSH in Verbindung mit einer beschleunigten Relaxation von *cis*-Verbindungen in ihre jeweiligen *trans*-Verbindungen erklärt werden.

### 3.3.8 Verhalten von Azopeptiden in GSH/GSSG-Redoxpuffer

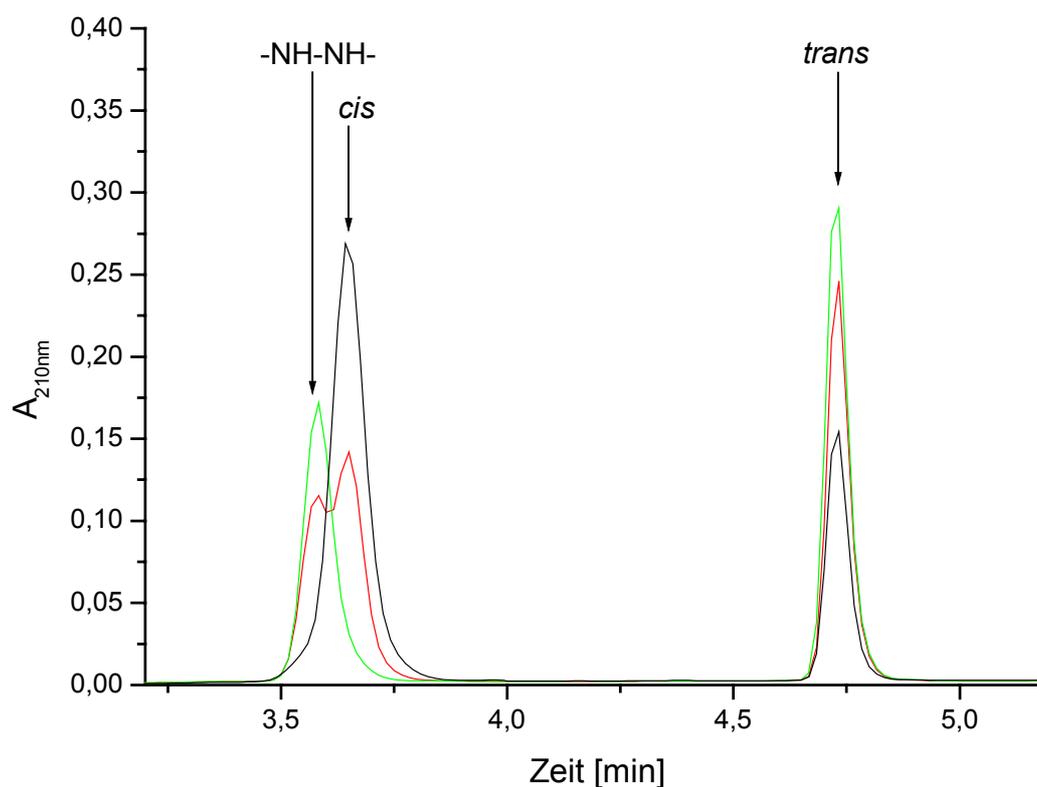
Da bislang eine schnelle Reduktion in Verbindung mit einer beschleunigten Relaxation von Azopeptiden in GSH/GSSG-Redoxpuffer nicht bekannt war, wurde ein Modellpeptid synthetisiert und untersucht. Diese Modellverbindung sollte wasserlöslich sein, um ebenfalls Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen mit GSH/GSSG zu simulieren.

Das Tripeptid Ac-K-AMPB-K-NH<sub>2</sub> **16** (wlAMPB) erwies sich mit seinen zwei Lysinresten bei allen pH-Werten in Wasser löslich und zeigte im Vergleich zu anderen Azopeptiden mit AMPB-Photoschalter identische UV-Spektren und isosbestische Punkte.

Die Relaxationsrate  $k_{ct}$  des Tripeptids wurde UV/Vis-spektrometrisch in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) bei 15 °C bestimmt. Dazu wurde die zeitabhängige

Absorptionsbande bei 333 nm, dem Maximum des *trans*-Isomers, gemessen und aus den so erhaltenen Absorptionwerten die Relaxationsrate  $k_{ct}$  errechnet. Diese beträgt  $0,00048 \text{ h}^{-1}$  und ist somit etwas langsamer als die Relaxationsraten des RGD1 bzw. Azo-PDI.

Zur Bestimmung der möglichen Reduktion und eines veränderten Relaxationsverhaltens des AMPB-Photoschalters in Gegenwart von GSH/GSSG, wurde das Tripeptid unter den gleichen Bedingungen eingesetzt, wie sie zur Bestimmung des Redopotentials von *cis*- und *trans*-Azo-PDI verwendet wurden. Das Verhältnis von GSG/GSSG betrug 1:1. Das Tripeptid lag im Vergleich zu GSH/GSSG in einem Verhältnis von 1:100 in der Reaktionslösung vor. Im Abstand von 20 min wurden HPLC-Chromatogramme der Reaktionslösung aufgenommen und die Peakflächen integriert. Abb. 3-41 zeigt die bei 210 nm nach 5 min (schwarz), 65 min (rot) und 325 min (grün) aufgenommenen Chromatogramme.



**Abb. 3-41:** Ausschnitt eines bei 210 nm aufgenommenen HPLC-Chromatogramms (3,2 min bis 5,2 min) der Inkubation des Tripeptids wAMPB mit GSH/GSSG (1:1) nach 5, 65 und 325 min; -NH-NH- bezeichnet die entsprechende Hydrazoverbindung.

Der Versuch zeigt, dass zwei Prozesse nebeneinander ablaufen und sich das System nach 325 min im Gleichgewicht befindet. Zu Beginn der Reaktion erkennt man neben

den Peaks von GSH und GSSG zwei weitere Peaks, den *cis*-wlAMPB-Peak bei 3,7 min und den *trans*-wlAMPB-Peak bei 4,7 min. Das *cis/trans*-Verhältnis beträgt 74:26. Nach 25 min tritt ein zusätzlicher Peak bei 3,6 min auf, welcher mit fortschreitendem Reaktionsverlauf intensiver wird. HPLC-MS-Analysen ergaben, dass es sich bei dieser Verbindung um das reduzierte Azobenzolderivat, dem sog. Hydrazobenzolderivat des wlAMPB handelt. Gleichzeitig tritt eine deutlich beschleunigte *cis/trans*-Relaxation des AMPB-Photoschalters auf. Wie oben bereits erwähnt, beträgt die Relaxationsrate  $k_{ct}$  des *cis*-wlAMPB  $0,00048 \text{ h}^{-1}$ . Nach 325 min sollte sich das *cis/trans*-Verhältnis folglich nur marginal ändern. Tatsächlich liegt nach dieser Zeit der *cis*-wlAMPB-Peak unterhalb der Nachweisgrenze und man findet ausschließlich die Peaks der Hydrazoverbindung (43%) und des *trans*-wlAMPB (57%).

Aus diesen Ergebnissen wurde die Relaxationsrate des *cis*-wlAMPB von  $k_{ct}=0,28 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Sie ist im Vergleich zur Relaxation in reinem Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) ca. 550fach beschleunigt. Die Reduktionsrate des *cis*-wlAMPB beträgt  $k_{\text{Red}}=0,19 \text{ h}^{-1}$ .

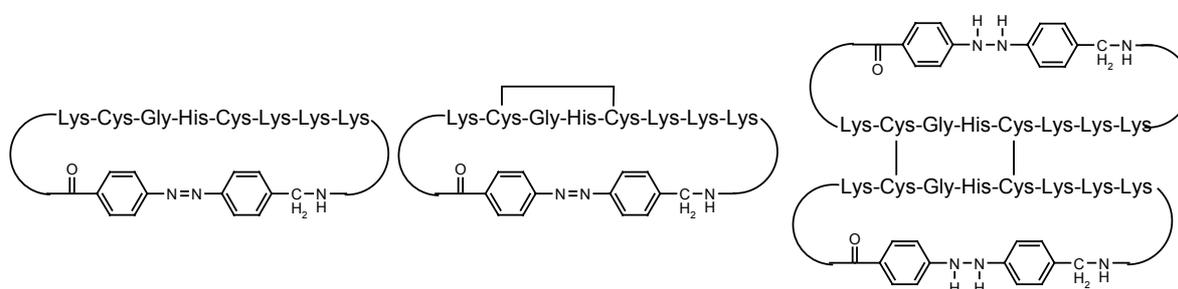
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Redoxpotentiale von *cis*-wlAMPB und *trans*-wlAMPB unterschiedlich sind, da innerhalb der Nachweisgrenze keine Reduktion des *trans*-wlAMPB durch GSH festgestellt werden konnte.

Letztere Beobachtung wird durch Untersuchungen von Gupta und Raina (1988) an Azobenzol unterstützt. Sie untersuchten hauptsächlich die Reduktionseigenschaften von *cis*- und *trans*-Azobenzol mittels Polarographie, jedoch verwendeten sie aufgrund der schlechten Löslichkeit des Azobenzols in wässrigen Medien eine Mischung aus 0,1 M AcOH/0,05 M NaClO<sub>4</sub>/EtOH (9:1, v/v). Das *cis*-Azobenzol erwies sich in diesen Versuchen deutlich leichter reduzierbar als *trans*-Azobenzol. Als Erklärung für diese Eigenschaft wurde hauptsächlich die unterschiedliche Delokalisation der  $\pi$ -Elektronenwolken der beiden Azobenzolisomere angeführt. Während *trans*-Azobenzol coplanar ist und eine hohe Resonanzstabilisierung durch Delokalisation ihrer  $\pi$ -Elektronenwolke erfährt, sind im *cis*-Azobenzol die Ebenen der Phenylringe zueinander verdreht und die sich ergebende Delokalisation geringer. Das *cis*-Azobenzol sollte somit eine geringere Elektronendichte in der N=N-Doppelbindung

besitzen und somit leichter reduzierbar sein. Für eine Reduktion des *trans*-Azobenzols dagegen muß zuvor Energie aufgewendet werden, um die hohe Resonanzstabilisierung zu überwinden.

### 3.3.9 Autoxidation und –reduktion monocyclischer Biscysteinyl-Azopeptide

Ein überraschendes Ergebnis war, dass das reduzierte Biscysteinyl-Azopeptid (*c*Azo-PDI) gelöst in einer ca. 3 mM wässrigen Lösung nach 48 h eine definierte Mischung der in Abb. 3-42 aufgezeigten Verbindungen lieferte.



**Abb. 3-42:** Molekülstrukturen der im Reaktionsgemisch einer ca. 3 mM wässrigen Lösung von *c*Azo-PDI in Wasser nach 48 h identifizierten Verbindungen; *c*Azo-PDI (links), Azo-PDI (Mitte), Azo-PDI-Dimer (rechts).

Die HPLC-MS-Analyse ergab fünf Verbindungen: reduziertes *cis*- und *trans*-Azo-PDI, oxidiertes *cis*- und *trans*-Azo-PDI und ein S-S verbrücktes PDI-Dimer. Letzteres besitzt keine UV-Absorption des Azobenzols und konnte aufgrund dessen eindeutig zugeordnet werden. Das monocyclische Peptid ist folglich in der Lage, sich selbst zu reduzieren. Dies bestätigt wiederum obige Beobachtung der Reduktion des AMPB-Photoschalters durch Cysteinpeptide.

Da es in einer früheren Arbeit jedoch gelungen war, Redoxpotentiale beider Isomere des *c*[Lys-AMPB-Lys-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Lys-] zu bestimmen (Cattani-Scholz et al., 2002), könnte man zudem über einen Einfluss des Redoxmotivs oder einen Einfluss der Struktur des *cis*-Isomers auf dessen Reduktion spekulieren.

Eine Erklärung für die beschleunigte Relaxation des *cis*-wlAMPB erweist sich jedoch als schwieriger. Zwar sind Relaxationsvorgänge verschiedener lichtschaltbarer Modellverbindungen untersucht worden, für Azobenzolderivate liegen jedoch bisher

nur wenige Ergebnisse vor. Die Relaxation wird hauptsächlich durch den pH-Wert, der Polarität und der Viskosität des Lösemittels, durch Wasserstoffbrückenbindungen und Temperatur beeinflusst. Ein Beispiel einer beschleunigten *cis/trans*-Relaxation wurde bei Einelektronen-Reduktionen von *Z*-4-Nitrophenylazo-*tert*-Butylsulfiden beobachtet (Guiirec *et al.*, 1999). Im ersten Schritt wird hier ein Azo-Radikal und ein Thiolanion gebildet. Letzteres greift das Azo-Radikal unter Bildung von *E*-4-Nitrophenylazo-*tert*-Butylsulfid von seiner sterisch günstigeren Seite an.

Bei elektrochemischen Reduktionen wurde ferner beobachtet, dass sich gebildete *cis*-Azo-Radikale instantan in ihre entsprechenden *trans*-Azo-Radikale umwandeln.

Diese zwei Beispiele können jedoch lediglich einen Denkanstoß für eventuell real ablaufende Vorgänge bieten. Ebenso wurde die beschleunigte Relaxation des AMPB-Photoschalters bis jetzt nur in einem repräsentativen Modellexperiment nachgewiesen. Es müssen jedoch noch weitere Einflüsse auf dieses Phänomen untersucht werden, wie z. B. Temperatur, Konzentration oder GSH/GSSG-Verhältnis. Aus diesen Ergebnissen soll schließlich der Versuch unternommen werden, einen plausiblen Mechanismus der beschleunigten Relaxation zu entwerfen.

### 3.3.10 Diskussion der Redoxpotentiale

Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen wie Thioredoxin, Glutaredoxin, Thioredoxin-Reduktase, Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und DsbA unterscheiden sich deutlich in ihren Redoxpotentialen. Die aktiven Zentren befinden sich am N-terminalen Ende einer  $\alpha$ -Helix (Martin, 1995; Kemmink *et al.*, 1996) und werden von einem Biscysteinyl-System des Typs -Cys-Xaa-Yaa-Cys- gebildet. Xaa und Yaa sind in diesem Konsensus-Motiv recht variabel. So besitzt PDI -Cys-Gly-His-Cys- als Redoxmotiv, Thioredoxin-Reduktase dagegen die Sequenz -Cys-Ala-Thr-Cys-. Das näher am N-Terminus liegende Cystein ist lösungsmittelzugänglich und agiert aufgrund seines niedrigen  $pK_a$ -Wertes als Nukleophil in den Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen, die zur korrekten oxidativen Faltung notwendig sind (Wunderlich *et al.*, 1995; Zapun *et al.*, 1994; Zapun *et al.*, 1995; Guddat *et al.*, 1997).

Die verschiedenen Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen besitzen jedoch trotz ihrer sequenziellen Gemeinsamkeiten deutlich unterschiedliche Redoxpotentiale und

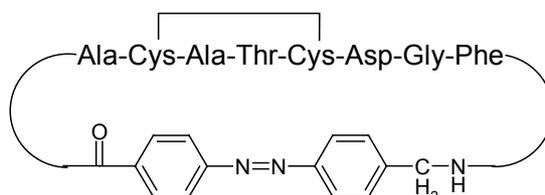
$pK_a$ -Werte ihrer Cysteine. Die Redoxpotentiale liegen dabei zwischen stark reduzierenden Werten von  $-270$  mV für Thioredoxin (Lin und Kim, 1989) und eher oxidierenden Werten von  $-89$  mV für DsbA (Wunderlich und Glockshuber, 1993) und  $-110$  mV für PDI (Hawkins *et al.*, 1991). Die  $pK_a$ -Werte ihrer N-terminalen Cysteine weisen Werte von 3,5 für DsbA, 4,5 für PDI und 7,0 für Thioredoxin auf (Huber-Wunderlich und Glockshuber, 1998).

Diese Unterschiede wurden den unterschiedlichen Sequenzen der  $\alpha$ -helicalen Sequenz des aktiven Zentrums zugeschrieben. Ein Einfluss benachbarter geladener Gruppen wurde untersucht, ist jedoch zum Teil umstritten (Jacobi *et al.*, 1997; Hennecke *et al.*, 1997). Die Ermittlung des  $pK_a$ -Wertes des N-terminalen Cysteins einer Thioredoxin-Mutante, in der ein dem Konsensus-Motiv benachbartes Tryptophan durch Alanin ersetzt wurde, ergab jedoch einen deutlichen Unterschied zum nativen Enzym. Der  $pK_a$ -Wert stieg dabei von 7,0 im nativen Enzym auf 8,3 in der Mutante. Erstaunlicherweise blieb das Redoxpotential unverändert, während die Mutante seine Aktivität komplett verlor (Krimm *et al.*, 1998). In diesem Falle scheint die Aktivität folglich nicht direkt vom Redoxpotential abhängig zu sein.

Alle bisherigen Untersuchungen weisen somit auf einen starken Zusammenhang der Aktivität des Enzyms mit dem Konsensus-Motiv, den Nachbargruppen und der gesamten räumlichen Umgebung des aktiven Zentrums hin.

Zum besseren Verständnis der Redoxeigenschaften von Thiol/Protein-Oxidoreduktasen wurden in früheren Arbeiten lineare Octapeptide synthetisiert, die den Sequenzen der aktiven Zentren verschiedener Oxidoreduktasen entsprachen (Siedler *et al.*, 1993; Siedler *et al.*, 1994). Die Redoxpotentiale dieser Peptide lagen alle nahe bei  $-200$  mV und zeigen, dass die Unterschiede der sequenzintrinsischen freien Energie der Disulfidbildung und die  $pK_a$ -Werte der beiden Thiolfunktionen signifikant durch die Einschränkungen der globalen Proteinstruktur beeinflusst und verstärkt werden. In weiteren Studien wurden diese Peptide deshalb konformationell eingeschränkt, indem sie über das Peptidrückgrat cyclisiert wurden. Die Redoxpotentiale wiesen wesentlich höhere und für die einzelnen Fragmente unterschiedliche Werte auf, was darauf schließen lässt, dass entsprechend konformativ eingeschränktere cyclische Biscysteinyl-Peptide den aktiven Zentren der Enzyme im

Hinblick auf Redoxeigenschaften und Disulfidaustauschaktivität besser entsprechen (Cabrele *et al.*, 2002). In neueren Studien wurde AMPB als Photoschalter in das Peptidrückgrat eines bicyclischen Azopeptids (Azo-TRR) mit dem Thioredoxin-Reduktase-Motiv -Cys-Ala-Thr-Cys- eingebaut (siehe Abb. 3-43).



**Abb. 3-43:** Molekülstruktur des bicyclischen Azopeptids Azo-TRR.

Die Redoxpotentiale der *cis*- und *trans*-Isomere betragen  $-146$  mV bzw.  $-200$  mV. Der Redoxpotentialunterschied der Isomere konnte mittels NMR-Strukturaufklärung auf ihre unterschiedlichen Strukturen zurückgeführt werden (Cattani-Scholz *et al.*, 2002). Obwohl sich zeigen ließ, dass die Struktur des *trans*-Isomers dem des aktiven Zentrums der Thioredoxin-Reduktase äußerst ähnlich ist, unterscheiden sich beide in ihren Redoxpotentialen um etwa 50 mV. Dies bestätigt die Theorie, dass zur endgültigen Aktivität des Enzyms die globale Proteinstruktur nötig ist.

**Tab. 3-4:** Redoxpotentiale von verschiedenen nativen Oxidoreduktasen, von ihren linearen und cyclischen Fragmentanaloga und von von diesen abgeleitete bicyclische Biscysteinyl-Azopeptide soweit bisher synthetisiert und charakterisiert.

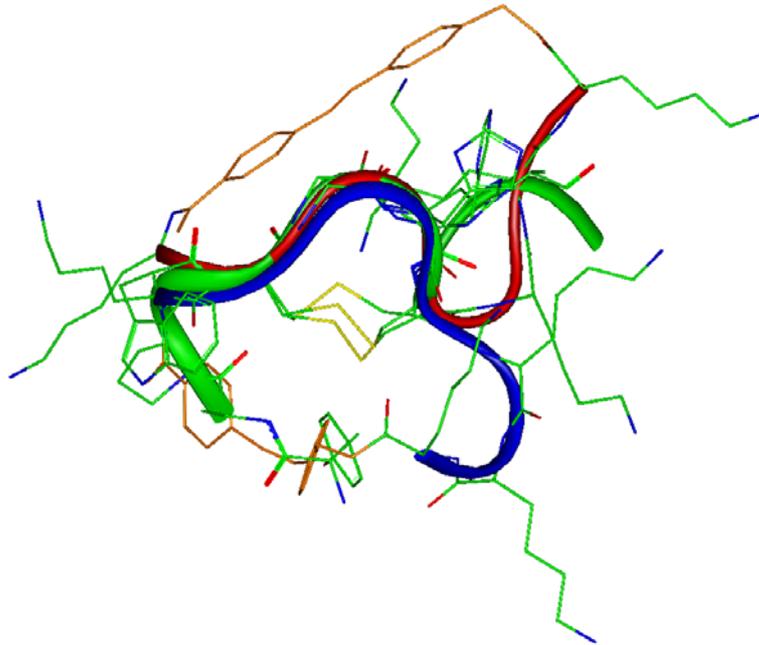
	$E_0$ [mV]	$E_0$ [mV]	$E_0$ [mV]	$E_0$ [mV]
Sequenzherkunft	Natives Enzym	Lineare Octapeptidfragmente <sup>a</sup>	Cyclische Hexapeptidfragmente	Bicyclische Biscysteinyl-Azopeptide
Grx	$-233^c$	$-215$	$-179^{b,1}$	
Trx	$-270^d$	$-190$	$-152^{b,2}$	
PDI	$-110^e/-145^f/-175^g$	$-205$	$-130^{b,2}$	<i>trans</i> -Azo-PDI: $-167$
Trr	$-254/-271^h$	$-210$	$-201^{b,1}$	<i>trans</i> -Azo-TRR: $-200^i$ <i>cis</i> -Azo-TRR: $-146^i$

*a:* (Siedler *et al.*, 1993), *b:* (Cabrele *et al.*, 2002), *c:* (Åslund *et al.*, 1997), *d:* (Lin und Kim, 1989), *e:* (Hawkins *et al.*, 1991), *f:* (Darby und Creighton, 1995), *g:* (Lundström und Holmgren, 1993), *h:* (O'Donnell und Williams, 1983), *i:* (Cabrele *et al.*, 2002); 1:  $E'_0(GSH/GSSG) = -240$  mV (Rost und Rapoport, 1964), 2:  $E'_0(Cystein/Cystin) = -223$  mV (Millis *et al.*, 1993).

Das Redoxpotential des *trans*-Azo-PDI beträgt  $-167$  mV und ist folglich ca. 30 mV positiver als das des Azo-TRR-Peptids in seiner *trans*-Konformation. Im Vergleich

zum nativen Enzym PDI (Hawkins *et al.*, 1991) besitzt *trans*-Azo-PDI ein um 57 mV negativeres Redoxpotential, das lineare Peptidfragment ein um 95 mV negativeres und sein bicyclisches Fragment ein um 20 mV negativeres Redoxpotential.

Abb. 3-44 zeigt eine Überlagerung der Strukturen der *cis*- und *trans*-Konformere des Azo-PDI, mit der Struktur des aktiven Zentrums des nativen PDI-Enzyms (Kemink *et al.*, 1996; PDB-Eintrag: 1MEK).



**Abb. 3-44:** Überlagerung der Strukturen des nativen PDI-Enzyms mit Azo-PDI; das Peptidrückgrat des nativen PDI ist als grünes Band, das des *trans*-Azo-PDI als rotes Band und das des *cis*-Azo-PDI als blaues Band veranschaulicht; die Disulfidbrücken sind in gelb, der AMPB-Photoschalter orange und die restlichen Atome in ihren Atomfarben dargestellt.

Ähnlich dem bicyclischen TRR-Azopeptid stimmen die Strukturen der beiden Konformere des Azo-PDI im -Cys-Gly-His-Cys- Bereich sehr gut mit der Struktur des aktiven Zentrums des nativen PDI-Enzyms überein. In allen drei Fällen wird ein Turn ausgebildet.

Wenn dessen Redoxaktivität also alleine von der Geometrie seines Biscysteinyl-Motivs abhängig wäre, so sollte man keinerlei Unterschied im Redoxpotential zu seiner Modellverbindung Azo-PDI finden. Dass dies nicht der Fall ist beweist erneut den starken Einfluss der globalen Proteinstruktur. Im nativen PDI kann zudem das Thiolat des N-terminalen Cysteins durch ein bei physiologischem pH-Wert teilweise positiv geladenes Histidin stabilisiert werden (Huber-Wunderlich

und Glockshuber, 1998). Diese Stabilisierung ist im Azo-PDI-Modellpeptid nicht optimal möglich und kann sich folglich auf das Redoxpotential und die  $pK_a$ -Werte der Cysteine auswirken. Man könnte jedoch eine mögliche Stabilisierung des Thiolats durch die vier positiv geladenen Lysinreste diskutieren. Ebenso könnte der AMPB-Photoschalter durch seine elektronische Struktur die Redoxpotentiale des Biscysteinyl-Motivs beeinflussen.

### 3.3.11 UV/Vis-Femtosekundenspektroskopie

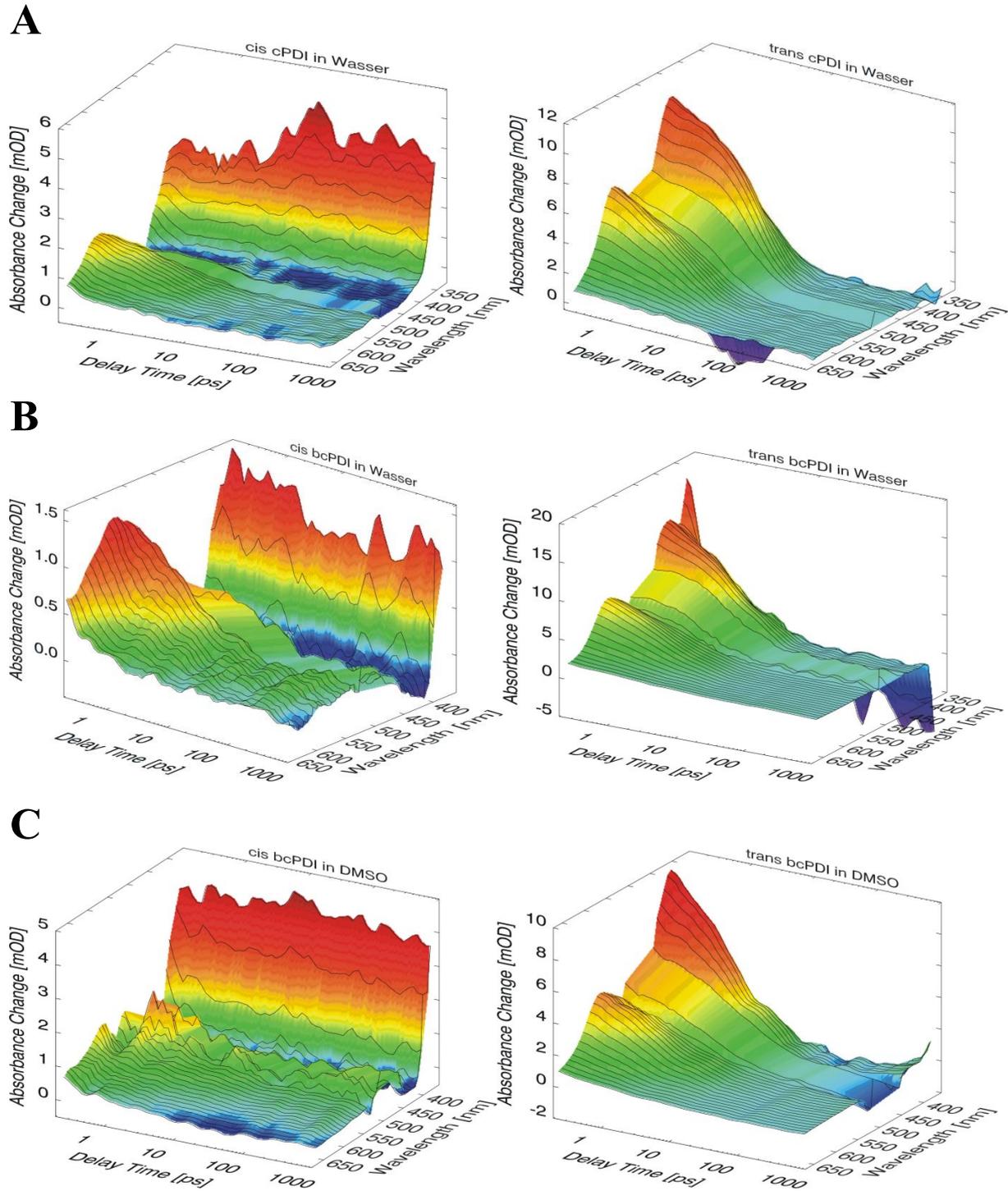
Kenntnis des genauen zeitlichen Ablaufs und das Entwickeln eines quantitativen kinetischen Schemas ist eine zentrale Aufgabe bei mechanistischen Studien biologischer Prozesse, wie der Proteinfaltung, d.h. der Frage, wie sich eine lineare Aminosäurekette in ihre bioaktive, räumlich wohldefinierte Struktur umlagert. Dabei stellen Strukturänderungen in Peptiden und Proteinen ganz besondere Herausforderungen an die Methodik der experimentellen Beobachtung und der theoretischen Beschreibung. Bei Faltungsvorgängen erstreckt sich der Zeitbereich, in dem die wichtigsten Teilschritte ablaufen, über viele Größenordnungen (Frauenfelder, 1999; Johnson *et al.*, 1996). Experimentelle Messungen dieser schnellen Faltungsvorgänge sind jedoch sehr schwierig. So muß zum einen die Konformationsänderung äußerst schnell und effizient initiiert werden, zum anderen muß eine schnelle Erfassung der Daten des Faltungsvorgangs möglich sein. Konformationsänderungen sind bis heute durch schnelle Veränderung experimenteller Parameter wie Temperatur, pH-Wert oder Redoxzustand (Phillips *et al.*, 1995; Ballew *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1997), durch Elektrontransfer oder durch Ligandendissoziation von einem Chromophor (Pascher *et al.*, 1996; Hagen *et al.*, 1996) initiiert worden. Erst in jüngster Zeit wurden methodische Ansätze entwickelt, die nach schnellem Auslösen einer Konformationsänderung ein lückenloses Verfolgen der induzierten Prozesse mit hoher Zeitauflösung ermöglichen.

Die moderne Ultrakurzzeitspektroskopie erlaubt heute dynamische Vorgänge bis hin zu Schwingungsbewegungen auf einer Femtosekundenzeitskala zu messen. Durch die geeignete Wahl der zu untersuchenden Probe und experimentellen Parametern, wie z. B. der Abtastwellenlänge, können so Strukturänderungen von schnellsten

Bewegungen (im Femtosekunden- und Pikosekundenbereich) bis hin zu Änderungen von Tertiärstrukturen (im Sekundenbereich) beobachtet werden. Diese Ergebnisse können, wenn sie sich auf recht kleine Modellsysteme beziehen, mit MD-Simulationen verglichen werden. Der AMPB-Photoschalter liefert hier ein effizientes Werkzeug, um schnelle strukturelle Umordnungsprozesse in mono- und bicyclischen Modellpeptiden mittels UV/Vis-Femtosekundenspektroskopie zu untersuchen. Er ist ein schneller und effizienter Lichtschalter, der zum Starten der Isomerisierung und gleichzeitig als Sensor für die Beobachtung der Nichtgleichgewichtsdynamik dient. Die Isomerisierung von AMPB bewirkt in den mono- und bicyclischen Modellpeptiden eine lokale geometrische Änderung, welche zu einer Spannung im Peptidring führt. Diese Ringspannung bewirkt eine Verzerrung des AMPB-Photoschalters und verändert dessen optische Eigenschaften. Diese Veränderungen werden gemessen und ausgewertet. In früheren Untersuchungen an linearen, mono- und bicyclischen Azopeptiden mit AMPB als Photoschalter, welche die Sequenz der Thioredoxin-Reduktase aufwiesen, konnten so neben den Zeitkonstanten der Isomerisierung des AMPB-Photoschalters auch die langsamen Prozesse der Konformationsübergänge in Peptiden gemessen werden. (Satzger *et al.*, 2004; Spörlein *et al.*, 2002).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zinth (LMU, München) wurden das bicyclische Bisysteinyl-Azopeptid und sein monocyclisches Ser, Ser-Analogon, mittels UV/Vis-Femtosekundenspektroskopie in Wasser und DMSO als Lösemittel untersucht und die gewonnenen Ergebnisse mit Ergebnissen früherer Arbeiten verglichen. Da sich beide Azopeptide sowohl in Wasser als auch in DMSO lösen lassen, konnte zudem eine Aussage über eine Lösemittelabhängigkeit auf die erhaltenen Messergebnisse abgeleitet werden.

Abb. 3-45 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen in anschaulichen 3D-Diagrammen. Das bicyclische Azo-PDI ist hier mit *bcPDI* das monocyclische *cAzo-PDI* mit *cPDI* bezeichnet.



**Abb. 3-45:** UV/Vis-Femtosekundenspektroskopie von cAzo-PDI und Azo-PDI in Wasser und DMSO; A: cAzo-PDI in Wasser; B: bcPDI in Wasser; C: bcPDI in DMSO; cAzo-PDI ist hier mit cPDI, Azo-PDI mit bcPDI bezeichnet.

Aus den so erhaltenen Daten wurden die in Tab. 3-5 angegebenen Zeitkonstanten abgeleitet.

**Tab 3-5:** Zeitkonstanten der *cis*→*trans*- und *trans*→*cis*-Isomerisierungen von *cAzo-PDI* und *Azo-PDI* in Wasser und DMSO.

Azopeptid	Lösemittel	Isomerisierung	Zeit [ps]	Zeit [ps]	Zeit [ps]
<i>cAzo-PDI</i>	Wasser	<i>trans</i> → <i>cis</i>	0,2	1,2	6,6
<i>cAzo-PDI</i>	Wasser	<i>cis</i> → <i>trans</i>	0,2	1,3	5,8
<i>Azo-PDI</i>	Wasser	<i>trans</i> → <i>cis</i>	0,2	1,2	6,6
<i>Azo-PDI</i>	Wasser	<i>cis</i> → <i>trans</i>	0,2	1,0	5,6
<i>Azo-PDI</i>	DMSO	<i>trans</i> → <i>cis</i>	0,2	1,2	9,8
<i>Azo-PDI</i>	DMSO	<i>cis</i> → <i>trans</i>	0,2	1,0	13,0

Die ermittelten Zeitkonstanten stimmen mit früheren Ergebnissen für mono- und bicyclische Azo-Peptide überein und beziehen sich hauptsächlich auf den Azobenzolphotoschalter. Die Zeitkonstanten um 5-15 ps leiten sich aus *vibrational cooling* und anfänglichen Umordnungen im Peptidrückgrat ab. Leider konnten keine Zeitkonstanten jenseits von 20 ps gefunden werden. Diese Prozesse wurden in früheren Untersuchungen den Bewegungen des Peptidrückgrats und dessen Einfluss auf den AMPB-Photoschalter zugeschrieben (Satzger *et al.*, 2004). Die erhaltenen Daten spiegeln jedoch eine Lösemittelabhängigkeit langsamer Prozesse um die 20 ps wider. So verlaufen diese in Wasser ca. 1,5-2,5mal schneller als in DMSO. Dies wird hauptsächlich den unterschiedlichen Wärmekapazitäten und Viskositäten der beiden Lösemitteln zugeschrieben.

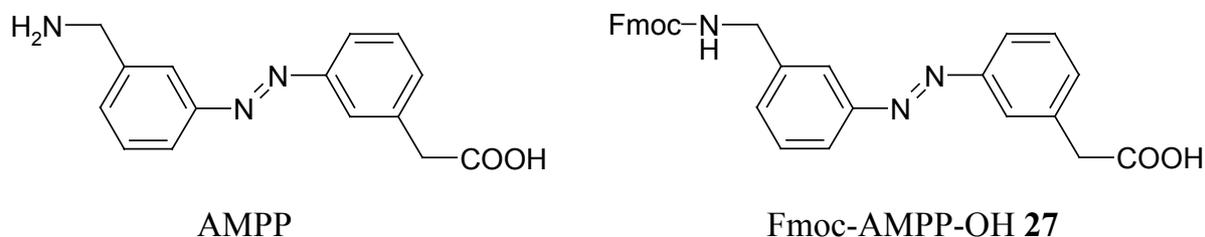
Aufgrund all dieser Ergebnisse könnte man AMPB als eine Art „sanften“ Photoschalter bezeichnen. Seine Isomerisierung liefert einen Impuls auf das Peptidrückgrat und zwingt dieses, sich daraufhin umzuorientieren. Da die Prozesse des AMPB bereits nach ca. 20 ps vorüber sind, kann man davon ausgehen, dass er den Großteil seiner gesamte Energie hauptsächlich durch Abgabe von Wärme an das Lösemittel verloren hat. Das Peptidrückgrat bekommt somit nur eine äußerst geringe Energiemenge geliefert, die es zu seiner Umorientierung verwenden kann. Da natürlichen Enzymen in der Regel ebenfalls nur geringe Energiemengen z.B. für allosterische Strukturänderungen zur Verfügung stehen, ist AMPB als Auslöser für Untersuchungen von Strukturänderungen in Peptiden sehr gut geeignet. Azo-PDI stellt

somit in Verbindung mit seiner Eigenschaft, ein *two-state*-System zu sein, ein einfaches Modellsystem zur Untersuchung allosterischer Strukturänderungen dar.

### 3.4 $\beta$ -Hairpin-Modellverbindungen mit AMPP als Photoschalter

Durch Untersuchungen von Ciani *et al.* (2003) an  $\beta$ -Hairpin-Peptiden motiviert, wurde die Idee eines lichtschtbaren  $\beta$ -Hairpin-Peptids geboren.

Einfaches Molecular Modeling ergab, dass für solche Modellverbindungen der Photoschalter AMPB nicht geeignet ist. Er ist *para*-substituiert und kann in seinen beiden Isomerisierungszuständen den Ansprüchen eines  $\beta$ -Turn-Mimetikums nicht genügen. Das *meta*-substituierte Azobenzolderivat 3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (AMPP) könnte hier die geeignetere Wahl sein und in der Synthese als 3-(3-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (Fmoc-AMPP-OH) **27** eingesetzt werden (siehe Abb. 3-46).



**Abb. 3-46:** 3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (AMPP) und 3-(3-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (Fmoc-AMPP-OH) **27**.

Der zusätzliche Einbau zweier Methylengruppen erleichtert dabei zum einen die Synthese, zum anderen sorgt er für eine noch bessere Geometrie des Photoschalters. AMPP sollte laut Molecular Modeling in seiner *cis*-Konformation den Ansprüchen eines  $\beta$ -Turn-Mimetikums genügen und die Ausbildung einer  $\beta$ -Hairpin-Struktur ermöglichen.

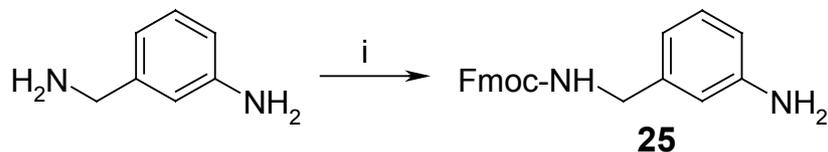
#### 3.4.1 3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (AMPP) als reversibler Photoschalter

##### 3.4.1.1 Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors

Die Synthese des Fmoc-geschützten Chromophors 3-(3-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (Fmoc-AMPP-OH) **27** erfolgte ähnlich der Synthese des in Kap. 3.3.1 beschriebenen Fmoc-AMPB-OH **1**. Sie ist jedoch wesentlich leichter durchzuführen, da 3-Nitroso-phenylelessigsäure **26** in einem einzigen Reaktionsschritt aus 3-Nitro-phenylelessigsäure erhalten werden kann und einen Umweg über die

geschützte Hydroxylaminverbindung überflüssig macht.

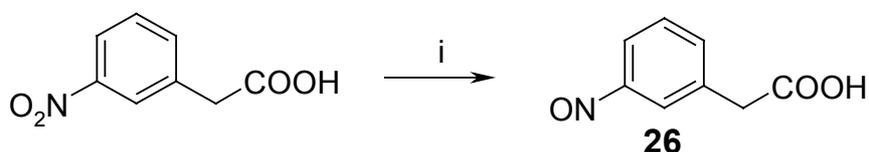
Das *N*-Fmoc-(3-Amino)-benzylamin **25** wurde durch direkte Acylierung von 3-Amino-benzylamin mit Fmoc-OSu in Acetonitril erhalten.



i: Fmoc-OSu, TEA, CH<sub>3</sub>CN/DMF(10:1, v/v), RT.

**Abb. 3-47:** Synthese der Aminokomponente *N*-Fmoc-(3-Amino)-benzylamin **25**.

Die Darstellung der Nitrosokomponente erfolgte direkt aus 3-Nitro-phenylessigsäure.

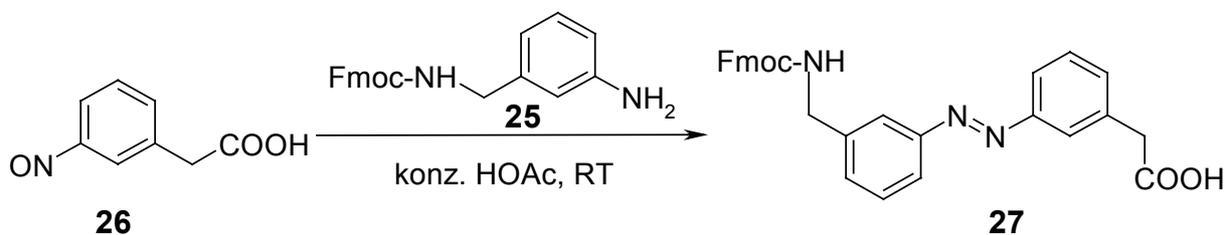


i: 1. Zn, NH<sub>4</sub>Cl, 2-Methoxyethanol, RT; 2. FeCl<sub>3</sub>, EtOH/H<sub>2</sub>O (5:1, v/v), 0 °C.

**Abb. 3-48:** Synthese der Nitrosokomponente 4-Nitroso-phenylessigsäure **26**.

4-Nitro-benzoesäurechlorid wurde dazu in 2-Methoxyethanol mit Zink zum entsprechenden Hydroxylaminderivat reduziert und dieses anschließend *in situ* mit FeCl<sub>3</sub> zur 4-Nitroso-phenylessigsäure **26** oxidiert.

Die Azokupplung via Nitroso/Amin-Reaktion erfolgt, wie in Kap. 3.1.1 beschrieben in Eisessig. Das Produkt 3-(3-*N*-Fmoc-aminomethyl-phenylazo)-phenylessigsäure (Fmoc-AMPP-OH) **27** fällt hier ebenfalls aus der Reaktionslösung aus.



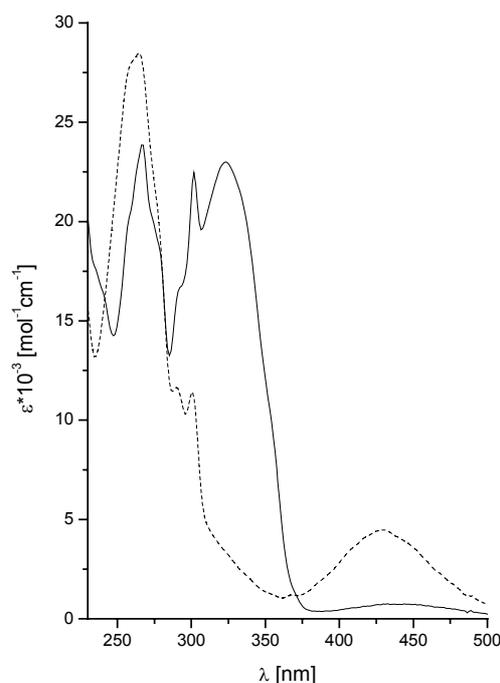
**Abb. 3-49:** Darstellung von 3-(3-*N*-Fmoc-aminomethyl-phenylazo)-phenylessigsäure (Fmoc-AMPP-OH) **27** via Nitroso/Amin-Reaktion.

### 3.4.1.2 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der *cis*- bzw. *trans*-Isomere des

Fmoc-AMPP-OH auf einer analytischen HPLC-Anlage ermöglichten die Aufnahme ihrer reinen *cis*- (----) bzw. *trans*- (—) UV-Spektren mittels eines angeschlossenen Photodiodenarrays.

Abb. 3-50 zeigt die UV-Spektren der reinen *cis*- und *trans*-Isomere des Fmoc-AMPP-OH **27** im Bereich von 230-500 nm.

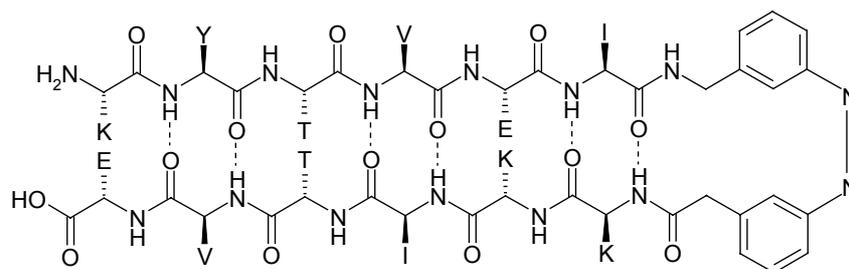


**Abb. 3-50:** UV-Spektren der reinen *trans*- (—) bzw. *cis*- (----) Konformere des Fmoc-AMPP-OH **27**.

Die isosbestischen Punkte liegen bei 242 nm, 281 nm und 371 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 323 nm das Maximum für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang, ist also im Vergleich zum AMPB-Photoschalter um ca. 10 nm blauverschoben. Dies ist auf den Einbau der zusätzlichen Methylengruppen, welche die Konjugation des  $\pi$ -Elektronensystems verringern, zurückzuführen.

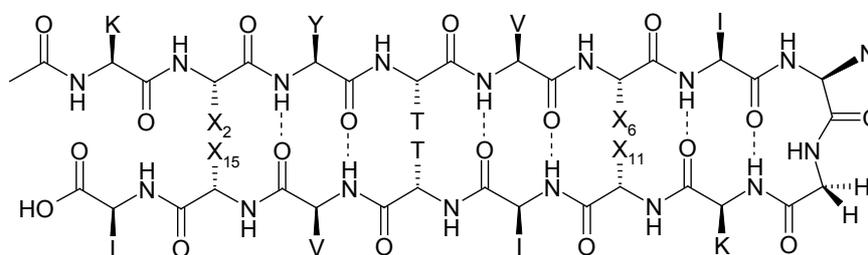
### 3.4.2 Modellverbindung AzoHP1

Als erste Modellverbindung eines lichtschaltbaren  $\beta$ -Hairpins wurde das Azopeptid H-Lys-Tyr-Thr-Val-Glu-Ile-AMPP-Lys-Lys-Ile-Thr-Val-Glu-OH (**28**, AzoHP1), synthetisiert und charakterisiert (siehe Abb. 3-51).



**Abb. 3-51:** Molekülstruktur des  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptids (**28**, AzoHP1); der Photoschalter AMPP ist in seiner cis-Konformation dargestellt.

AzoHP1 leitet sich von einem von Ciani *et al.* (2003) charakterisierten Peptid ab. Diese Autoren untersuchten den Einfluss von Salzbrücken auf die Stabilität von  $\beta$ -Hairpins an folgenden vier Modellpeptiden (siehe Abb. 3-52).



**Abb. 3-52:**  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptide von Ciani *et al.* (2003);  $\beta_1$ : K<sub>2</sub>-S<sub>15</sub>, S<sub>6</sub>-K<sub>11</sub>;  $\beta_2$ : K<sub>2</sub>-E<sub>15</sub>, S<sub>6</sub>-K<sub>11</sub>;  $\beta_3$ : K<sub>2</sub>-S<sub>15</sub>, E<sub>6</sub>-K<sub>11</sub>;  $\beta_4$ : K<sub>2</sub>-E<sub>15</sub>, E<sub>6</sub>-K<sub>11</sub>.

Der Ersatz von Serin durch Glutamat im relativ stabilen  $\beta$ -Hairpin  $\beta_1$ , bewirkt bei Ausbildung einer zusätzlichen Salzbrücke eine Stabilitätszunahme von ca. 1,2-1,3 kJ mol<sup>-1</sup>. Somit sollte das Peptid  $\beta_4$  aufgrund seiner höchsten Stabilität für erste Untersuchungen an photoschaltbaren  $\beta$ -Hairpin-Verbindungen bestens geeignet sein, da der Einbau des AMPP-Photoschalters vermutlich zu einer Destabilisierung der  $\beta$ -Hairpin-Struktur führen würde. AMPP wurde anstelle des  $\beta$ -Turn-bildenden Dipeptids -Gly-Asn- in die Aminosäuresequenz eingebaut und sollte dem Peptid durch Photoisomerisierung einen Übergang von gefaltetem zu ungefaltetem Zustand ermöglichen. Aufgrund eventueller Signalüberlappungen in der NMR-Spektroskopie wurde die ursprüngliche Sequenz zusätzlich um die endständigen Aminosäurereste Lys und Ile verkürzt.

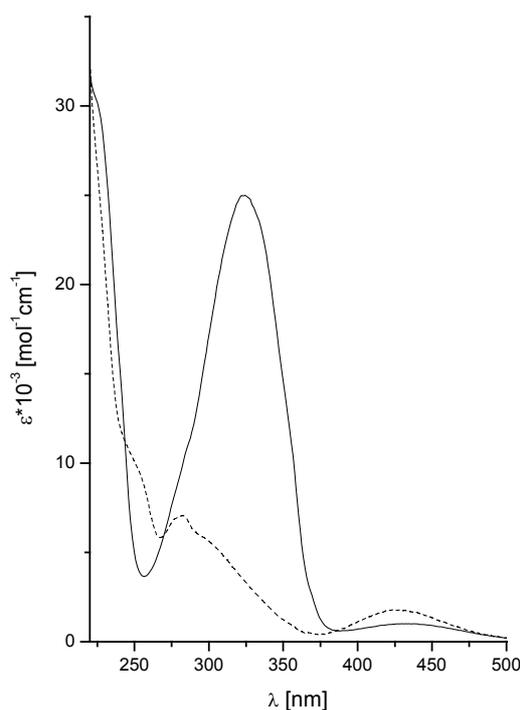
### 3.4.3 Synthese

AzoHP1 wurde mit freiem N- und C-Terminus synthetisiert. Die ersten sechs

Aminosäuren wurden standardmäßig mit einem Peptidsynthesizer an Fmoc-Glu(OtBu)-TCP-Harz, unter Verwendung des Pseudoprolin-Dipeptids Fmoc-Ile-Thr( $\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$ )-OH gekuppelt. Fmoc-AMPP-OH wurde anschließend manuell, die restlichen Aminosäuren wiederum am Peptidsynthesizer gekuppelt. Das Rohpeptid wurde mit 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC, unter Verwendung eines geeigneten Gradienten aufgereinigt.

### 3.4.4 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung

In Abb. 3-53 sind die UV-Spektren der reinen *cis*- und *trans*-Konformere des  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptids AzoHP1 im Bereich von 230-500 nm gezeigt. Die unterschiedlichen Retentionszeiten der *cis*- bzw. *trans*-Konformere auf einer analytischen HPLC-Anlage ermöglichten die Aufnahme ihrer reinen *cis*- (----) bzw. *trans*- (—) UV-Spektren mittels eines angeschlossenen Photodiodenarrays.



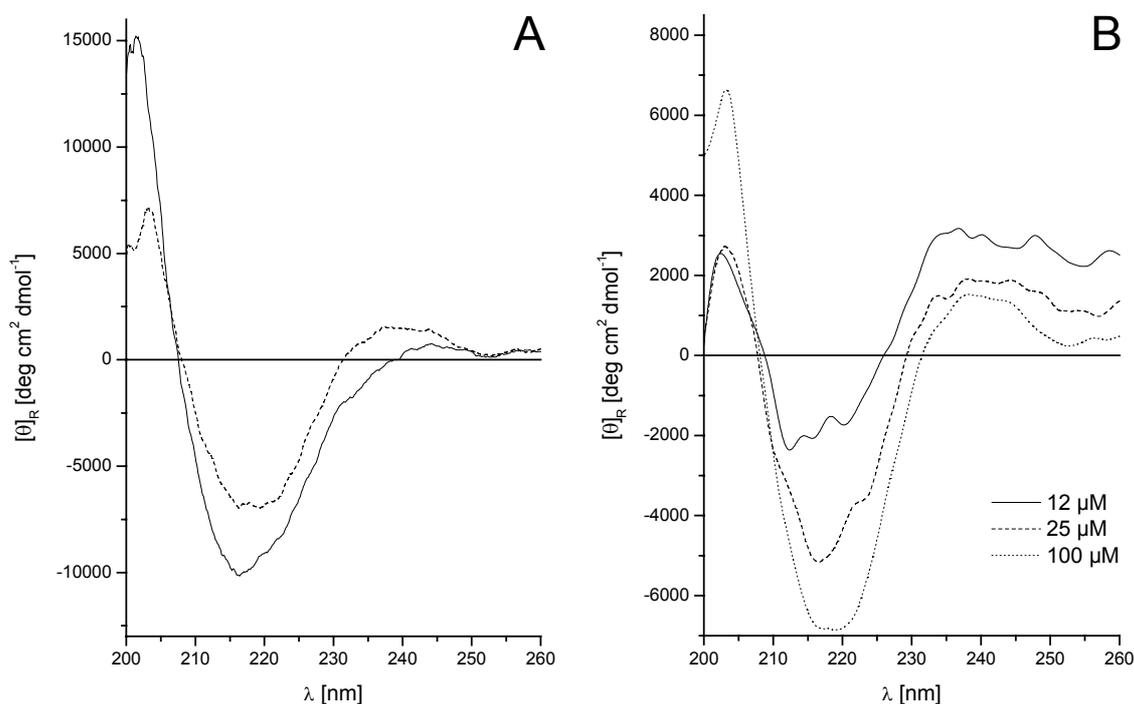
**Abb. 3-53:** UV-Spektren der reinen *trans*-(—) bzw. *cis*-(----) Konformere des  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptids AzoHP1.

Sie unterscheiden sich aufgrund des unterschiedlichen Photoschalters von UV-Spektren der mono- und bicyclischen Azopeptide RGD1-3, Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI, und Azo-PDI in der Lage der isosbestischen Punkte und der Wellenlänge des Maximums für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang. Die isosbestischen Punkte des AzoHP1 liegen bei

244 nm, 270 nm und 386 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 323 nm das Maximum für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang.

### 3.4.5 CD-spektroskopische Charakterisierung

In Abb. 3-54 sind die CD-Spektren von AzoHP1 im Bereich von 200-250 nm in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) (A) und von *trans*-AzoHP1 in Wasser bei verschiedenen Peptidkonzentrationen (B) gezeigt.



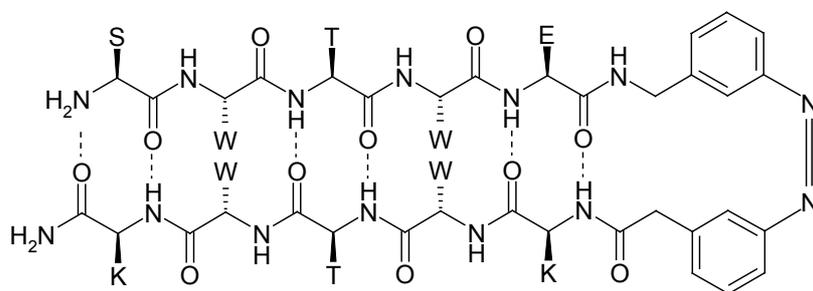
**Abb. 3-54:** CD-Spektren des AzoHP1; (A) AzoHP1 in seiner *trans*- (—) und *cis*-Konformation (---) in MeOH/Wasser (1:1, v/v); (B): Konzentrationsabhängigkeit der CD-Spektren von AzoHP1 in seiner *trans*-Konformation in Wasser; alle Spektren sind im photostationären Zustand aufgenommen.

Laut CD-Spektren könnte AzoHP1 in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) sowohl in seiner *cis*- als auch in seiner *trans*-Konformation eine gestreckte  $\beta$ -artige Struktur einnehmen. Die Konformation ist jedoch kaum photomodulierbar, da sich die Spektren der jeweiligen Isomerisierungszustände nur wenig voneinander unterscheiden. Zudem zeigen die CD-Spektren des *trans*-AzoHP1 in Wasser eine Konzentrationsabhängigkeit. So setzt sich die von 12-25  $\mu$ M beobachtete linear ansteigende Intensivierung der negativen Bande ab 25  $\mu$ M nicht weiter fort. Dies spricht für intermolekulare Aggregation der gestreckten Strukturen des AzoHP1.

NMR-spektroskopische Untersuchungen lieferten jedoch keine Anzeichen auf eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur des AzoHP1.

### 3.4.6 Modellverbindung AzoTrpZip2

Aufgrund der unsicheren Strukturbestimmung des AzoHP1 wurde H-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub> (**29**, **AzoTrpZip2**) als weiteres  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptid synthetisiert und charakterisiert, in welchem der AMPP-Photoschalter als  $\beta$ -Turn-Mimetikum wiederum die Ausbildung und Lichtschaltung einer  $\beta$ -Hairpin-Struktur ermöglichen sollte (siehe Abb. 3-55).



**Abb. 3-55:** Molekülstruktur der  $\beta$ -Hairpin-Modellverbindung **AzoTrpZip2**; der Photoschalter AMPP ist in seiner cis-Konformation dargestellt.

AzoTrpZip2 leitet sich dabei von dem von Cochran *et al.* (2001) synthetisierten und charakterisierten Tryptophanzipper TrpZip2 ab, dessen äußerst stabile Struktur hauptsächlich auf Tryptophan-Tryptophan-Wechselwirkungen beruht. Aufgrund dieser großen Stabilität sollte es möglich sein, nach Ersatz des Dipeptids -Asn-Gly- durch AMPP als  $\beta$ -Turn-Mimetikum einen stabilen lichtschaltbaren Tryptophanzipper zu erhalten.

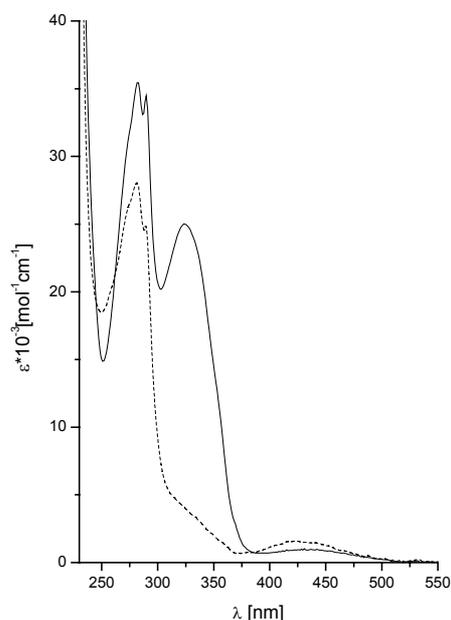
### 3.4.7 Synthese

AzoTrpZip2 wurde als C-terminales Amid wie AzoHP1 synthetisiert. Trotz seiner hohen Hydrophobizität (vier Tryptophanreste und das Azobenzolderivat AMPP) löst sich AzoTrpZip2 erstaunlich gut in Wasser und Methanol. Bei hohen Konzentrationen konnte in wässriger Lösung jedoch eine Tendenz zur Aggregation beobachtet werden. In Methanol liegt das Peptid laut NMR-Diffusions- und Verdünnungsstudien dagegen stets als Monomer vor.

### 3.4.8 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der *cis*- bzw. *trans*-Konformere des AzoTrpZip2 auf einer analytischen HPLC-Anlage ermöglichten die Aufnahme ihrer reinen *cis*- (----) bzw. *trans*- (—) UV-Spektren mittels eines angeschlossenen Photodiodenarrays.

Abb. 3-56 zeigt die UV-Spektren der reinen *cis*- und *trans*-Konformere des  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptids AzoTrpZip2 im Bereich von 230-550 nm.



**Abb. 3-56:** UV-Spektren der reinen *trans*- (—) bzw. *cis*- (----) Konformere des  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptids AzoTrpZip2.

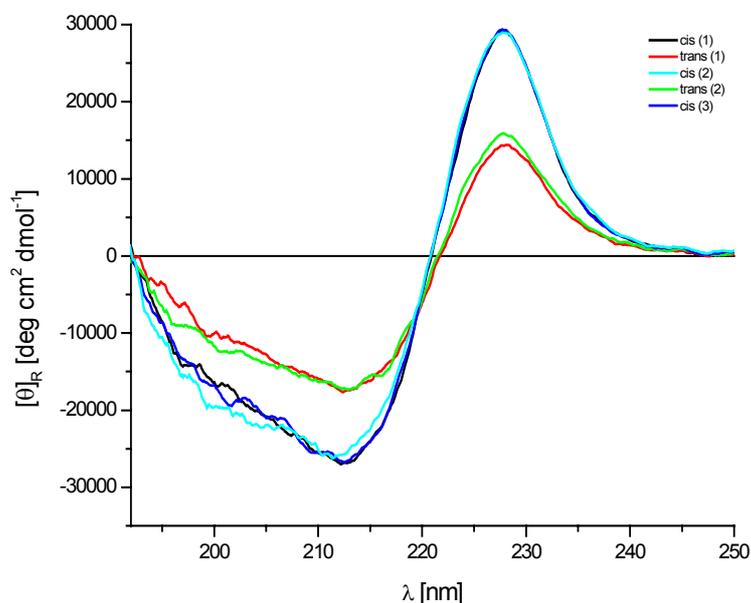
Den UV-Spektren des AzoTrpZip2 ist die UV-Absorption der vier im Molekül anwesenden Tryptophane überlagert. Die isosbestischen Punkte liegen bei 245 nm, 262 nm und 385 nm. Das *trans*-Isomer besitzt bei 324 nm das Maximum für den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang.

### 3.4.9 CD-spektroskopische Charakterisierung

Für eine vollständige Charakterisierung des AzoTrpZip2 wurde dieser unter verschiedenen Bedingungen CD-spektroskopisch untersucht. Dabei wurde vor allem eine Abhängigkeit seiner Struktur in Bezug auf Lösemittel und pH-Wert der Lösung analysiert. Alle CD-Spektren wurden in den jeweiligen photostationären *cis*- und

*trans*-Zuständen aufgenommen.

Die CD-Spektren der Lichtschaltung von AzoTrpZip2 in H<sub>2</sub>O (pH 3,65) sind in Abb-3-57 im Bereich von 195-250 nm gezeigt.

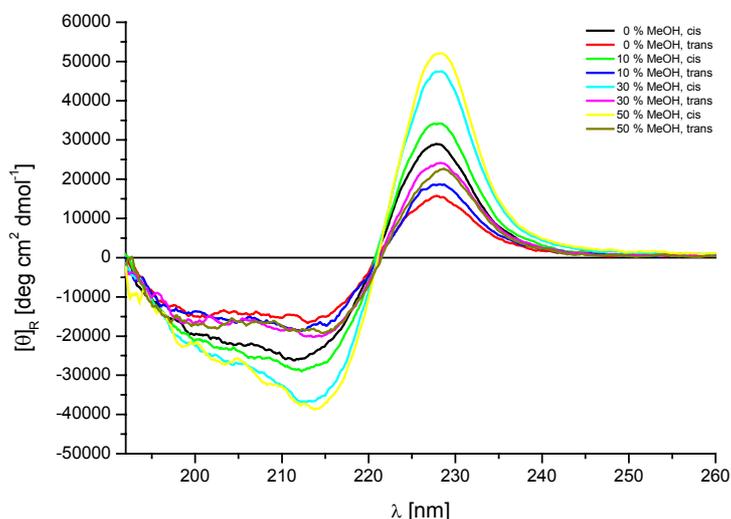


**Abb. 3-57:** Lichtschaltung des AzoTrpZip2 in H<sub>2</sub>O (pH 3,65); Reihenfolge der Messungen: cis (1), trans (1), cis (2), trans (2), cis (3).

Das *cis*-Isomer besitzt ein Maximum bei 228 nm und ein Minimum bei 213 nm. Diese Werte stimmen in der Lage und Intensität mit den veröffentlichten Werten der Ausgangsmodellverbindung TrpZip2 hervorragend überein (Cochran *et al.*, 2001). AzoTrpZip2 sollte somit in seiner *cis*-Konformation die Struktur eines  $\beta$ -Hairpins einnehmen. Die  $\beta$ -Hairpin-Struktur lässt sich zudem reversibel schalten, da sich die Intensitäten der Maxima und Minima in ihren jeweiligen Isomerisierungszuständen deutlich voneinander unterscheiden. Das *trans*-Isomer könnte laut CD-Spektren eine offenere Struktur des  $\beta$ -Hairpins einnehmen. Die starke Bande bei 228 nm ist dabei auf Wechselwirkungen von gepaarten Tryptophanseitenketten zurückzuführen und ermöglicht die Quantifizierung des Anteils an gefalteter  $\beta$ -Hairpin-Struktur (Cochran *et al.*, 2001).

Diese ersten Ergebnisse bestätigten die Molecular Modeling-Vorhersage einer stabileren  $\beta$ -Hairpin-Struktur mit dem AMPP-Photoschalter in seiner *cis*-Konformation.

Um einen möglichen Einfluss des Lösemittels auf die  $\beta$ -Hairpin-Struktur zu untersuchen, wurden CD-Spektren in verschiedenen MeOH/Wasser-Mischungen im Bereich von 190-260 nm aufgenommen. Diese sind in Abb. 3-58 gezeigt.

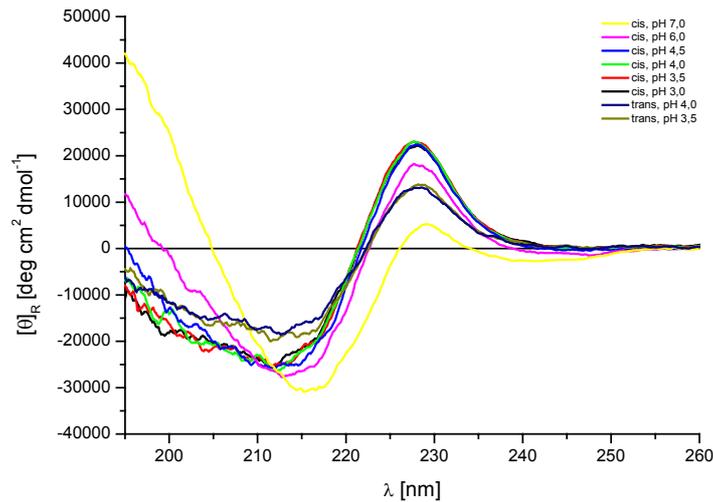


**Abb. 3-58:** Lichtschaltung des AzoTrpZip2 in verschiedenen MeOH/H<sub>2</sub>O-Mischungen.

Man erkennt, dass die Strukturen der jeweiligen Isomerisierungszustände im Vergleich zu reinem Wasser durch Zugabe von MeOH deutlich ausgeprägter sind. Bei 50% MeOH scheint jedoch Sättigung einzutreten, da sich der lineare Anstieg, welcher von 0-30% MeOH zu beobachten ist, bei weiterer Zugabe von MeOH nicht weiter fortsetzt. Dieser Zustand entspricht ziemlich genau dem des vollständig gefalteten TrpZip2 von Cochran *et al.* (2001).

Um einen möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die  $\beta$ -Hairpin-Struktur zu untersuchen, wurde eine pH-Titration (pH 7,0 nach pH 3,0) in H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die pH-abhängigen CD-Spektren wurden im Bereich von 195-260 nm aufgenommen und sind in Abb. 3-59 gezeigt.

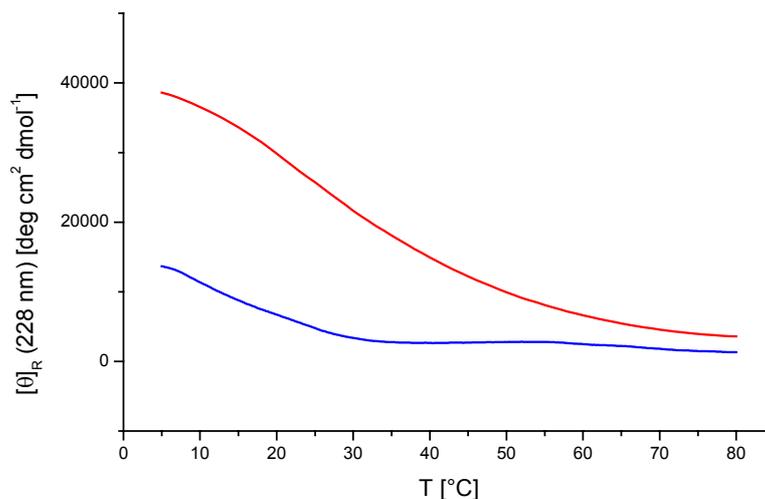
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3-59:** pH-Titration des AzoTrpZip2 in  $H_2O$  (pH 7,0 nach pH 3,0).

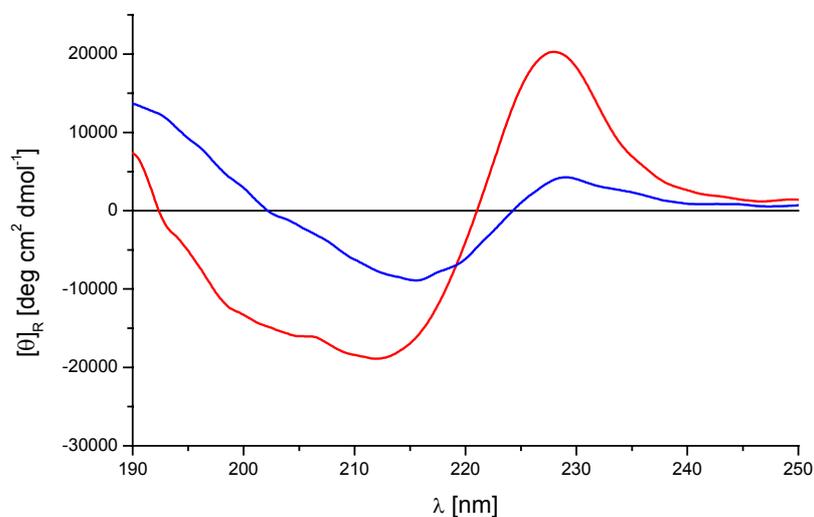
Die Spektren zeigen, dass das *cis*-Isomer bei pH 7,0 keine  $\beta$ -Hairpin-Struktur ausbilden kann. Diese wird jedoch, bei Erniedrigung des pH-Wertes, ab pH 4,5 wieder deutlich ausgebildet und ändert sich bis pH 3,0 nur noch sehr wenig. Zudem zeigen die CD-Spektren, welche bei einem pH-Wert von 3,5 aufgenommen wurden, die immer noch vorhandene Photomodulierbarkeit der Struktur an.

Zur Bestimmung der Strukturstabilitäten von AzoTrpZip2 wurden Schmelzkurven seiner beiden Konformere aufgenommen. Im Abstand von 10 °C wurden zusätzlich CD-Spektren gemessen. Abb. 3-60 zeigt die bei einer Wellenlänge von 229 nm aufgenommenen Schmelzkurven von AzoTrpZip2 in seinen jeweiligen Isomerisierungszuständen in Wasser (pH 3,7).



**Abb. 3-60:** Schmelzkurven von AzoTrpZip2 bei einer Wellenlänge von 229 nm; die Schmelzkurve für das *cis*-Konformer ist in rot, die Schmelzkurve für das *trans*-Konformer in blau gezeigt; beide Schmelzkurven wurden in Wasser (pH 3,7) aufgenommen.

Abb. 3-61 zeigt die dazugehörigen CD-Spektren bei 30 °C im Bereich von 190-250 nm.



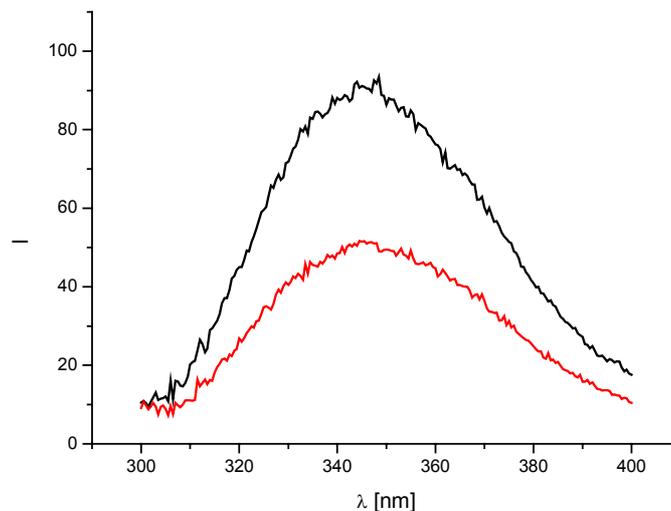
**Abb. 3-61:** CD-Spektren des AzoTrpZip2 in seiner cis (rot)-und trans (blau)-Konformation bei 30 °C; die Spektren wurden in ihren jeweiligen photostationären Zuständen aufgenommen.

Eine sigmoidale Kurvenanpassung liefert für das *cis*-Isomer eine Schmelztemperatur von 25 °C. Im Vergleich dazu besitzt der ursprüngliche Tryptophanzipper TrpZip2 den Übergang der gefalteten in die ungefaltete Form bei 72 °C (Cochran *et al.*, 2001). Der Unterschied von 47 °C ist dabei auf die destabilisierende Wirkung des  $\beta$ -Turn-Mimetikums AMPP zurückzuführen, während die Ausbildung der  $\beta$ -Hairpin-Struktur von *cis*-AzoTrpZip2 hauptsächlich den starken Interaktionen der gepaarten Tryptophanseitenketten zugeschrieben werden muß. Diese Ergebnisse können ebenfalls erklären, warum die in Kap. 3.4.2 untersuchte Modellverbindung AzoHP1 nicht in der Lage ist, eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur auszubilden. Setzt man voraus, dass der destabilisierende Effekt des AMPP hier ebenfalls in einer Größenordnung von 47 °C liegt, so würde man vermutlich eine experimentell nicht bestimmbare Schmelztemperatur kleiner 0 °C erhalten. Die Verstärkung der  $\beta$ -Hairpin-Struktur durch seine zwei Salzbrücken reicht hier nicht aus, die Destabilisierung der Struktur durch AMPP zu kompensieren.

### 3.4.10 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung

Da AzoTrpZip2 vier durch *stacking* interagierende Tryptophanreste in seiner

Aminosäuresequenz besitzt, kann ein Strukturhinweis mittels Fluoreszenzspektroskopie erhalten werden, da die gemessene Fluoreszenz von der räumlichen Umgebung der Tryptophanreste im Peptid abhängig ist. Eine erhöhte Fluoreszenz weist dabei auf eine kompaktere Umgebung der Tryptophanreste im Peptid hin. Es sollte somit möglich sein, den Anteil an gefalteter  $\beta$ -Hairpin-Struktur zu untersuchen. Abb. 3-62 zeigt die Fluoreszenzspektren von AzoTrpZip2 in MeOH/Wasser (1:1, v/v) im Bereich von 300-400 nm.



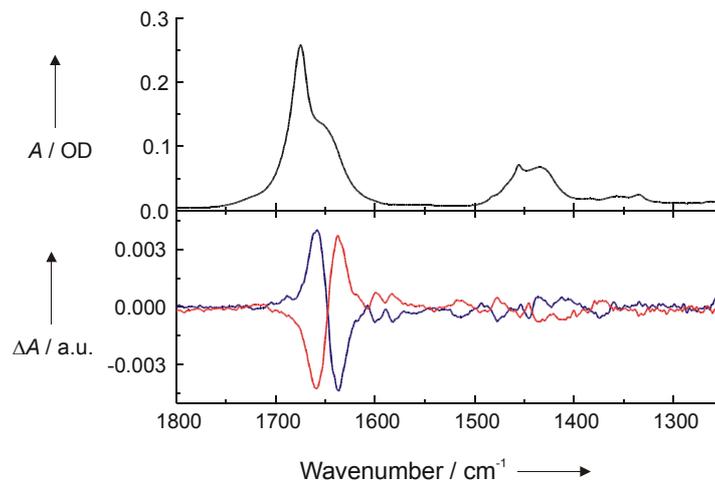
**Abb. 3-62:** Fluoreszenzspektren des AzoTrpZip2 in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v); das *trans*-Konformer ist rot, das *cis*-Konformer schwarz gezeigt.

Man erkennt, dass die Fluoreszenz des *trans*-Konformers im Vergleich zum *cis*-Konformer um 50% erniedrigt ist und die Differenz der Isomerisierungszustände qualitativ mit den bisherigen CD-Messungen übereinstimmt. Dies weist auf eine kompaktere Umgebung der Tryptophanreste, hervorgerufen durch *stacking* der Seitenketten im *cis*-Konformer hin. Der Anteil an gefalteter  $\beta$ -Hairpin-Struktur ist folglich im *cis*-Konformer deutlich erhöht.

### 3.4.11 FTIR-spektroskopische Charakterisierung

Im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie, welche Aussagen über Interaktionen von Seitenketten liefert, werden mittels Infrarotspektroskopie die Geometrie des Peptidrückgrats und Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet. Abb. 3-63 zeigt FTIR-Absorptionsmessungen von AzoTrpZip2 in deuteriertem Methanol bei 25 °C.

Man erkennt eine ausgeprägte Amid-I-Bande bei  $1675\text{ cm}^{-1}$  und eine bis  $1620\text{ cm}^{-1}$  reichende breite Schulter. Photoisomerisierung des AzoTrpZip2 durch Bestrahlen bei  $335\text{ nm}$  in seinen *cis*-Zustand liefert eine Absorptionzunahme bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  und eine Absorptionsabnahme bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Durch Bestrahlen mit Wellenlängen größer als  $400\text{ nm}$  und damit verbundener Photoisomerisierung des *cis*-Isomers zurück in seinen *trans*-Zustand, kann das ursprüngliche Verhalten wiederhergestellt werden. Diese Absorptionsunterschiede weisen auf eine Strukturänderung des Peptids hin.



**Abb. 3-63:** oben: FTIR-Absorptionsspektrum von AzoTrpZip2; unten: mittels Bestrahlen mit Licht von  $335\text{ nm}$  (*trans* -> *cis*, rote Kurve) und größer als  $400\text{ nm}$  (*cis* -> *trans*, blaue Kurve) erhaltene Absorptionsdifferenzspektren; die großen Absorptionsunterschiede bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  sind auf den unterschiedlichen Gehalt an  $\beta$ -Hairpin-Struktur der *cis*- bzw *trans*-Konformere zurückzuführen.

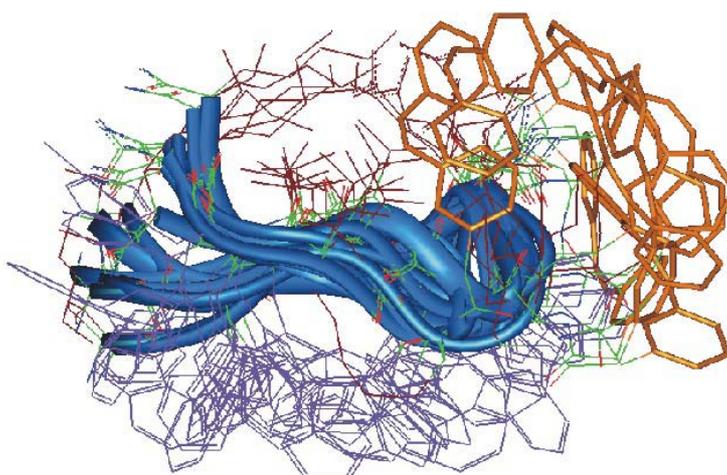
Die erhöhte Absorptionsbande bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  liegt dabei in einem Spektralbereich von Absorptionen, welche sowohl für  $\beta$ -Faltblatt- als auch für  $\beta$ -Hairpin-Strukturen charakteristisch sind (Maness *et al.*, 2003; Krimm und Bandekar, 1986; Wang *et al.*, 2004; Arrondo *et al.*, 1996) und bestätigt den erhöhten Anteil an  $\beta$ -Hairpin-Struktur des *cis*-Konformers. Die großen Absorptionsunterschiede, die für AzoTrpZip2 in seinen jeweiligen Isomerisierungszuständen beobachtet wurden, lassen zudem Untersuchungen des Peptids mittels zeitaufgelöster Ultrakurzzeit-IR-Spektroskopie zu und ermöglichen so einen Einblick in schnellste Faltung- und Entfaltungvorgänge dieser neuen lichtschtbaren  $\beta$ -Hairpin-Strukturen.

### 3.4.12 NMR-spektroskopische Charakterisierung

Alle bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass AzoTrpZip2 in seiner

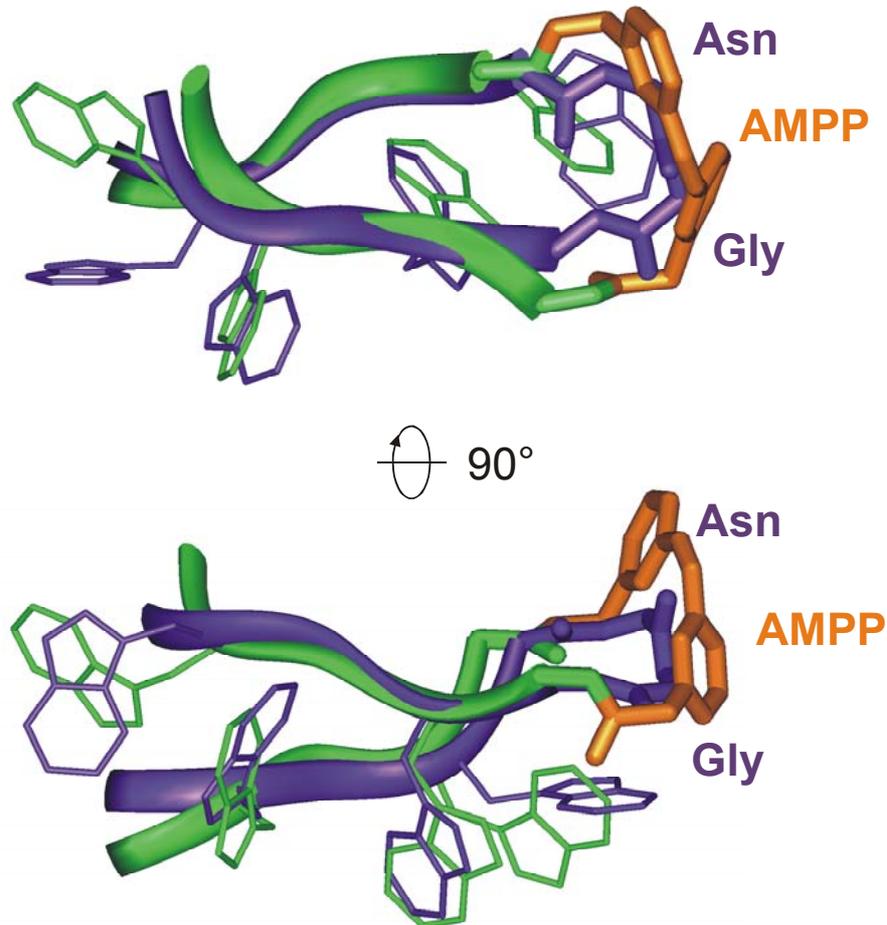
*cis*-Konformation eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur ausbildet. Diese sollte jedoch durch Konformationsanalyse mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Die NMR-Experimente gestalteten sich jedoch relativ schwierig, da die Struktur des AzoTrpZip2 sowohl vom Lösemittel als auch vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Als Lösemittel schien MeOH das beste zu sein, da die  $\beta$ -Hairpin-Struktur in Wasser weniger ausgeprägt ist und mit dem pH-Wert zudem sehr stark variiert. Die Struktur ist jedoch auch in MeOH vom pH-Wert abhängig. Ein weiterer Nachteil aller  $\beta$ -Hairpin-Strukturen für die NMR-Konformationsanalyse ist, dass sich diese Strukturen mit ihren offenen Formen im Gleichgewicht befinden. Die Austauschgeschwindigkeit kann in manchen Fällen eine Strukturbestimmung sogar unmöglich machen. Mit Verwendung von 100% MeOH als Lösemittel und eine Temperatur von 30 °C konnten jedoch geeignete Bedingungen für eine NMR-Konformationsanalyse gefunden werden, bei welchen für das *cis*-Konformer ein Anteil an  $\beta$ -Hairpin-Struktur von 45%, ermittelt mittels CD-Messungen vorliegt. Das *trans*-Konformer zeigt unter diesen Bedingungen laut CD-Spektrum kaum strukturelle Präferenzen (siehe Abb. 3-61).

Abb. 3-64 zeigt die durch NMR-Konformationsanalyse erhaltenen Struktur-Ensembles des AzoTrpZip2 in seiner *cis*-Konformation.



**Abb. 3-64:** NMR-Struktur-Ensembles des AzoTrpZip2 in seiner *cis*-Konformation; gezeigt sind die zehn energieärmsten Strukturen; das Peptidrückgrat ist blau, der AMPP-Photoschalter orange eingefärbt; die Tryptophanseitenketten des einen  $\beta$ -Stranges sind rot, die des anderen  $\beta$ -Stranges blau gekennzeichnet.

Man erkennt deutlich die Ausbildung einer  $\beta$ -Hairpin-Struktur, welche hauptsächlich durch paarweises *stacking* der anwesenden Tryptophanseitenketten stabilisiert wird. Abb. 3-65 zeigt einen Vergleich der NMR-Strukturen von *cis*-AzoTrpZip2 und dem ursprünglichen Tryptophanzipper TrpZip2 von Cochran *et al.* (2001).



**Abb. 3-65:** Überlagerung der Peptidrückgrate von *cis*-AzoTrpZip2 und dem ursprünglichen Tryptophanzipper TrpZip2 von Cochran *et al.* (2001, PDB-Eintrag: 1LE1); das Peptidrückgrat von *cis*-AzoTrpZip2 ist mit grünen Bändern, das Peptidrückgrat von TrpZip2 mit blauen Bändern veranschaulicht; AMPP ist orange eingefarbt; für beide Peptide sind lediglich die Tryptophanseitenketten gezeigt.

Man erkennt eine bemerkenswerte Übereinstimmung sowohl in der Anordnung der antiparallelen  $\beta$ -Stränge als auch in der Lage der Tryptophanseitenketten. In der Region des Turns sind lediglich kleine Unterschiede zwischen den ursprünglichen turnbildenden Aminosäuren Asn und Gly und dem Photoschalter AMPP in seiner gebogenen *cis*-Konformation zu erkennen. Dieser ist somit als *cis*-Isomer in der Lage den geometrischen Anforderungen eines  $\beta$ -Turn-Mimetikums zu genügen, während sein langgestreckter *trans*-Zustand die Ausbildung einer  $\beta$ -Hairpin-Struktur verhindert.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden lichtschaltbare Peptide untersucht. Als reversible Lichtschalter wurden die Azobenzolderivate AMPB und AMPP verwendet, welche zum einen in synthetische Peptide mit „active-site“-Sequenzen von Enzymen und Zelladhäsionsmotiven, zum anderen in  $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelemente von Peptiden eingebaut wurden. Diese Modellverbindungen sollten durch Photoisomerisierung der Photoschalter ihre Konformation und biologische Funktion verändern. Als biologisch relevante Modellsysteme wurden die Bindung von Liganden an den Zelladhäsionsrezeptor  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin, das Redoxpotential der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und die Konformationsänderung eines  $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelement ausgewählt.

Im Falle der  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin-Bindung konnten die zwei konstitutionsisomeren monocyclischen Peptide RGD1 und RGD2 mit RGD-Motiv synthetisiert und charakterisiert werden. Die Synthesen gestalteten sich schwierig, da anfänglich die Ringgröße zu klein gewählt wurde und eine Cyclisierung in Lösung unmöglich machte. Einbau eines zusätzlichen Alanins ermöglichte die gewünschte Cyclisierung, jedoch traten bei der Schutzgruppenabspaltung der geschützten monocyclischen Verbindungen unerwünschte Nebenprodukte auf. Diese konnten zum einen auf die Verwendung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH, zum andern auf die Verwendung von Merkaptanen und Trialkylsilanen als Scavenger bei der Schutzgruppenabspaltung zurückgeführt werden und durch Einsatz von Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH und 95%iger wässriger TFA vermieden werden. SPFS-Messungen der Peptide lieferten eine Bindung beider Azopeptide an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin. Dabei waren die Bindungsstärken sowohl vom Isomerisierungszustand des Azobenzolphotoschalters als auch im Bezug auf das vermessene Peptid unterschiedlich. Beide Azopeptide zeigten in ihren *trans*-Konformationen höhere Bindungsaffinitäten als in ihren *cis*-Konformationen, wobei RGD1 eine stärkere Bindungsaffinität als RGD2 an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin zeigte. Das *trans*-RGD1 zeigte eine um ca. 40% stärkere Bindung als sein *cis*-Isomer, welches seinerseits etwa doppelt so stark wie das *trans*-RGD2 bindet. Die ermittelten unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von RGD1 konnten mittels NMR-

Konformationsanalyse und Molecular Modeling erklärt werden. Während in dem für die Bindung verantwortlichen RGD-Teil des *trans*-Konformers die Seitenketten des Arginins und Aspartats eine relativ definierte Orientierung im Raum einnehmen, sind die Seitenketten des Arginins und Aspartats im *cis*-Konformer nahezu zufällig im Raum verteilt, was die schlechtere Bindung dieses Konformers an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin erklären könnte. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde mittels Molecular Modeling das optimierte RGD-Azopeptid RGD3 entworfen und anschließend synthetisiert und charakterisiert. Dieses Peptid sollte durch seine leicht veränderte Aminosäuresequenz und die damit veränderten Eigenschaften in der Lage sein, besser als alle bisher vermessenen Azopeptide an  $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu Binden. Diese Experimente werden in Zukunft durchgeführt und interpretiert.

Im Falle der Protein-Disulfid-Isomerase konnte das bicyclische Azo-PDI und sein monocyclisches Analogon Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI mit der „active-site“-Sequenz -Cys-His-Gly-Cys- dieses Proteins erhalten werden. Die Synthese wurde wegen der Reduktionsanfälligkeit gegenüber Merkaptanen und Trialkylsilanen in deren Abwesenheit durchgeführt. Die Oxidation des Biscysteinyll- zum Cystinpeptid konnte nach erfolglosen Versuchen mit verschiedenen bekannten Oxidationsmethoden letztendlich mit Jod in 50%iger HOAc erfolgen. NMR-Konformationsanalyse ergab für das durch seine Disulfidbrücke konformationell enger eingeschränkte bicyclische Azo-PDI, im Gegensatz zum strukturell eher schlecht definierten monocyclischen Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI ein *two-state*-System, in dem die beiden Konformere definierte, jedoch unterschiedliche Konformationen einnehmen. Bisher wurden für diese Art von Peptiden lediglich definierte Zustände für ein Konformer beobachtet, während im anderen Konformer ein weniger definiertes Strukturensemble beobachtet wurde. Die beiden Konformere des Azo-PDI können mittels Photoisomerisierung durch eine Art 180°-Drehbewegung ineinander umgewandelt werden. Untersuchungen dieses Systems mit Ultrakurzzeitspektroskopie lieferte eine Lösemittelabhängigkeit der schnellen Prozesse, welche in DMSO hauptsächlich aufgrund der höheren Viskosität ca. 1,5-2,5mal langsamer ablaufen als in Wasser. Zudem könnte man nach Interpretation der erhaltenen Ergebnisse den Photoschalter AMPB als eine Art „sanften“ Photoschalter bezeichnen. Da seine Prozesse bereits nach ca. 20 ps vorüber

sind, kann man davon ausgehen, dass er den Großteil seiner gesamte Energie hauptsächlich durch Abgabe von Wärme an das Lösemittel verloren hat. Das Peptidrückgrat bekommt somit durch Photoisomerisierung des AMPB nur eine äußerst geringe Energiemenge geliefert, die es zu seiner Umorientierung verwenden kann. Da natürlichen Enzymen in der Regel ebenfalls nur geringe Energien für strukturelle Änderungen zur Verfügung stehen, scheint AMPB als Auslöser für Untersuchungen von Strukturänderungen in Peptiden sehr gut geeignet zu sein. Azo-PDI stellt somit, in Verbindung mit seiner Eigenschaft ein *two-state*-System zu sein, ein einfaches Modellsystem zur Untersuchung allosterischer Strukturänderungen dar. Bei der Bestimmung der Redoxpotentiale der beiden Konformere des Azo-PDI konnte lediglich der Wert des *trans*-Konformers (-167 mV) bestimmt werden. Dieser ist im Vergleich zum nativen Enzym PDI um 57 mV negativer (Hawkins *et al.*, 1991). Eine Erklärung dafür konnte jedoch nicht gegeben werden. Das Redoxpotential des *cis*-Konformers konnte aufgrund unerwünschter Nebenreaktionen mit dem zur Bestimmung eingesetzten Bezugssystem GSH/GSSG nicht ermittelt werden, da mit diesem bisher nicht bekannte Reduktions- und Relaxationsvorgänge des AMPB-Photoschalters auftraten. Diese konnten mit dem synthetisierten wasserlöslichen Tripeptid wAMPB in einem ersten Experiment bestätigt werden. Man beobachtete lediglich die Reduktion des *cis*-Konformers in Verbindung mit einer 550fach beschleunigten Relaxation dessen in sein *trans*-Konformer. Um diesen Sachverhalt eindeutig zu bestätigen und einen möglichen Mechanismus dieser Vorgänge zu postulieren, werden in Zukunft weiterführende Experimente unternommen und gegebenenfalls weitere Azopeptide synthetisiert.

Im Falle der Photomodulation von  $\beta$ -Hairpins als Tertiärstrukturelement von Proteinen konnte durch Molecular Modeling der neue *meta*-substituierte Azobenzolschalter AMPP entworfen und anschließend synthetisiert und charakterisiert werden. Konformationsanalysen der ersten synthetisierten Modellverbindung AzoHP1 lieferten keine eindeutige  $\beta$ -Hairpin-Struktur. Dies ist wohl auf die Destabilisierung durch das  $\beta$ -Turn-Mimetikum AMPP zurückzuführen, welche auch durch Ausbildung von zusätzlichen Salzbrücken nicht kompensiert werden kann. Die Synthese des Tryptohanzippers AzoTrpZip2 lieferte jedoch ein photomodulierbares System.

AzoTrpZip2 bildet, wie durch Molecular Modeling vorhergesagt, als *cis*-Konformer eine  $\beta$ -Hairpin-Struktur aus. Die Stabilisierung dieser Struktur mittels paarweisem *stacking* von Tryptophanresten ist hier in der Lage, die Destabilisierung der Struktur durch AMPP zu kompensieren. In Zukunft werden weitere Experimente durchgeführt, um z. B. die Struktur des *trans*-Konformers zu bestimmen. Ebenso sollen Ultrakurzzeitmessungen eingesetzt werden, um schnelle Vorgänge dieser Konformationsänderungen auf einer kurzen Zeitskala zu untersuchen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### *Lösemittel und Chemikalien*

Alle verwendeten Lösemittel wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D), *Fluka* (Buchs, CH), *Merck* (Darmstadt, D) und *Riedel-de Haën* (Seelze, D) in p.a. Qualität bezogen. Für die analytische sowie präparative HPLC wurde LiChrosolv Acetonitril der Firma *Merck* (Darmstadt, D) verwendet. Das Aminosäurederivat Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH war von der Firma *Advanced ChemTech* (Louisville, USA), die <sup>15</sup>N-markierte Aminosäure H-<sup>15</sup>N-Gly-OH von der Firma *CIL* (Andover, USA) und das Pseudoprolin-Dipeptid Fmoc-Ile-Thr(Ψ<sup>Me,Me</sup>pro)-OH von der Firma *Novabiochem* (Läufelfingen, CH). Die übrigen geschützten Aminosäuren wurden bei der Firma *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, D) bezogen. Die beladenen 2-Chlorotriptylharze wurden von der Firma *PepChem* (Tübingen, D), das unbeladene 2-Chlor-Triptylchlorid-Harz von der Firma *Novabiochem* (Läufelfingen, CH) und das TentaGel S RAM Harz von der Firma *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, D) bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D.), *Fluka* (Buchs, CH) und *Merck* (Darmstadt, D) bezogen.

#### *Dünnschichtchromatographie*

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Fertigplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, D) mit Fluoreszenzindikator verwendet. Die eingesetzten Laufmittelsysteme sind bei den einzelnen Syntheseprotokollen explizit angegeben. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Absorption bei 254 bzw. 366 nm.

#### *UV/VIS-Spektroskopie*

Die UV/VIS-Spektren wurden an einem Zweistrahlenspektrometer Lambda 19 der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) aufgenommen und mit der Software UV-WinLab (Version 2.7) der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) ausgewertet. Die Peptidkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 1,0 Absorptionseinheiten lag. Zur Aufnahme der Spektren wurden

Quarz Suprasil<sup>®</sup> Küvetten 114 QS der Firma Hellma (Müllheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Sämtliche Proben wurden bei RT vermessen.

### *CD-Spektroskopie*

Die CD-Spektren wurden an einem Spektrapolarimeter mit thermostatisierbaren Küvettenhalter des Typs J-715 der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D) aufgenommen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Spectra-Manager for Windows 95/NT der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D). Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz Suprasil<sup>®</sup> Küvetten 110 QS der Firma *Hellma* (Müllheim, D) mit Schichtdicken von 1-10 mm verwendet und je nach Konzentration der zu analysierenden Proben die Anzahl der gemessenen Scans angepaßt. Die resultierenden Spektren sind in Elliptizität pro Aminosäurerest gezeigt, welche mit folgender Formel aus den Rohdaten berechnet wurden:

$$[\Theta]_R = [\Theta]/n \text{ [deg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] \quad (1)$$

Hierbei ist n die Anzahl der Aminosäuren des Peptids. Die Photoschalter AMPB und AMPP wurden nicht berücksichtigt.

### *Massenspektrometrie*

LC-MS-Massenspektrometrie wurde an einem PE Sciex API 165 Massenspektrometer der Firma *PE Sciex* (Forster City, USA) durchgeführt. Als HPLC-System wurde ein Microgradient-System 140 C der Firma *Applied Biosystems* (Forster City, USA) mit einem 785 A UV-Vis-Detektor, einem Series 200 Autosampler und einem Nelson 200 Interface der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) eingesetzt. Als Software wurde BioMultiView 1.3.1 der Firma *PE Sciex* (Ontario, CAN) und als Trennsäule eine Nucleosil 100-5 C8 der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, D) mit geeigneten Gradienten von 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) nach 0,1% TFA/Acetonitril (5:95) verwendet.

### *Präparative Säulenchromatographie*

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma *Merck* (Darmstadt, D) verwendet. Die verwendeten

Laufmittelsysteme werden bei den entsprechenden Syntheseprotokollen beschrieben.

### *Analytische HPLC*

Analytische HPLC-Trennungen wurden mit verschiedenen Systemen durchgeführt:

#### **System I:**

Analytische HPLC-Anlage der Firma *Waters* (Eschborn, D), bestehend aus zwei HPLC-Pumpen des Modells 515, einem 717<sub>plus</sub> Autosampler, einem Datamodul und einem 996 Photodiode Array Detektor. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde eine Millennium<sup>32</sup>-Software der Firma *Waters* (Eschborn, D) verwendet.

#### **System II:**

Analytische HPLC-Anlage „Alliance“ 2690 der Firma *Waters* (Eschborn, D) mit Photodiode Array Detektor 996. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde eine Millennium<sup>32</sup>-Software der Firma *Waters* (Eschborn, D) verwendet.

#### **System III:**

Analytische HPLC-Anlage der Firma *Waters* (Eschborn, D) bestehend aus den Teilsystemen Controller 600C, Pump 626 mit Inline-Degasser AF, 717<sub>plus</sub> Autosampler, Datamodul und 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde eine Millennium<sup>32</sup>-Software der Firma *Waters* (Eschborn, D) verwendet.

Dabei kamen folgenden Gradienten und Trennsäulen zum Einsatz. Diese sind bei den einzelnen Syntheseprotokollen in Hochzahlen angegeben .

**1:** linearer Gradient von 0% B auf 100% B in 13 min bei einer Flußrate von 1,5 mL/min auf einer analytischen HPLC-Trennsäule Typ EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8 der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D). Als Eluenten wurden die Puffer A (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 95:5) und B (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 10:90) verwendet.

**2:** linearer Gradient von 0% B auf 30% B in 30 min bei einer Flußrate von 1 mL/min auf einer analytischen HPLC-Trennsäule Typ CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D). Als Eluenten wurden die Puffer A (0,1% TFA in

H<sub>2</sub>O) und B (0,1% TFA in ACN) verwendet.

**3:** linearer Gradient von 0% B auf 100% B in 15 min bei einer Flußrate von 1 mL/min auf einer analytischen HPLC-Trennsäule Typ XTerra C8 150 \* 3,6mm der Firma *Waters* (Eschborn, D). Als Eluenten wurden die Puffer A (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 95:5) und B (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 10:90) verwendet.

**4:** linearer Gradient von 0% B auf 100% B in 13 min bei einer Flußrate von 1,5 mL/min auf einer analytischen HPLC-Trennsäule Typ EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8 der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D). Als Eluenten wurden die Puffer A (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 95:5) und B (2%ige wässrige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril, 10:90) verwendet.

### *Präparative HPLC*

Präparative HPLC-Trennungen wurden auf zwei verschiedenen Systemen durchgeführt:

#### **System A:**

Präparative HPLC-Anlage der Firma *Abimed* (Langenfeld, D), bestehend aus den Teilsystemen Pump 321, Detektor UV-VIS 152, Interface 506 C und einem Fraktionssammler Model 202 der Firma *Gilson* (Middleton, USA). Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde Software des Typs UniPoint V 2.10 der Firma *Gilson* (Middleton, USA) eingesetzt. Als Eluenten wurden die Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet. Die für die Trennung benutzten Gradienten und Säulen werden bei den jeweiligen Reinigungen genau angegeben.

#### **System B:**

Präparative HPLC-Anlage Biotronik der Firma *Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH*, (Maintal, D), bestehend aus zwei HPLC-Pumpen des Typs BT 8100, einem Systemcontroller BT 8300, einem HPLC-UV-VIS-Detektor 8200 und einer Column Unit 3021. Als Fraktionssammler kam das Modell 202 der Firma *Gilson* (Middleton, USA) zum Einsatz. Als Eluenten wurden die Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet. Die für die Trennung benutzten Gradienten und Säulen werden bei den jeweiligen Reinigungen genau angegeben.

### *Semipräparative HPLC*

Semipräparative HPLC-Trennungen wurden auf einer Anlage der Firma *Waters* (Eschborn, D), bestehend aus den Teilsystemen Controller 600 C, Pumpe 626 mit Inline-Degasser AF, 717<sub>plus</sub> Autosampler, Datamodul und 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector ausgeführt. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde eine Millennium<sup>32</sup>-Software der Firma *Waters* (Eschborn, D) verwendet. Die Fraktionen wurden entweder manuell oder mit einem Fraktionssammler Modell 202 der Firma *Gilson* (Middleton, USA) gesammelt. Als Eluenten wurden die Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,1% TFA in ACN) verwendet. Die für die Trennung benutzten Gradienten und Säulen werden bei den jeweiligen Reinigungen genau angegeben.

### *Aminosäureanalyse und Peptidgehaltbestimmung*

Die Hydrolyse der Peptide erfolgte in 1 mL 6 N HCl für 48 h bei 110 °C. Dabei wurden 50-100 nmol Peptid eingesetzt. Die Aminosäurenverhältnisse wurden am Aminosäureanalysator Biotronik LC 6001 der Firma *Biotronik* (Maintal, D) bestimmt und daraus der Peptidgehalt der Probe errechnet. Alternativ wurde dieser UV-spektrometrisch mit dem Absorptionsmaximum ( $\epsilon = 23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) des Azobenzols bestimmt. Alle angegebenen Ausbeuten wurden unter Berücksichtigung des Peptidgehaltes berechnet.

### *Photoisomerisierung*

Die Azopeptide wurden mit einer UV-Lampe der Firma *Müller Elektronik-Optik* (Moosinning, D), ausgestattet mit einem Quarzkondensator, sphärischen Spiegeln und einer Blende belichtet. Als Strahlungsquelle diente eine 450 W XBO Xenonlampe der Firma *Osram* (München, D). Der Lichtstrahl wurde anschließend durch einen Glasfaserlichtleiter (Länge: 3 m, Durchmesser: 3 mm) auf die Probe geführt. Für die *cis*→*trans*-Isomerisierung wurden die Proben bei 450 nm mit einer Kombination von GG 435 und BG 12 Filtern der Firma *Itos* (Mainz, D) belichtet. Für die *trans*→*cis*-Isomerisierung wurden die Proben bei 350nm mit einem UG 1 Filter der Firma *Itos* (Mainz, D) belichtet. Die Belichtungsdauer lag zwischen 5 s und 20 min. Die Belichtung erfolgte bei den NMR-Proben direkt im Lichtstrahl hinter den Filtern,

die restlichen Proben wurden über den angeschlossenen Glasfaserlichtleiter, der auf die Probe gerichtet war, belichtet. Die Leistung des aus dem Lichtleiter austretenden Lichtstrahls wurde mit einem Photodetektor der Firma *Newport Corporation* (Fountain Valley, USA) zu ~25 mV bestimmt.

### *Bestimmung der thermischen cis→trans-Relaxationsraten*

Die thermischen *cis*→*trans*-Relaxationsraten wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR- und UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Für die Bestimmung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurde die Probe gelöst, bis zum Erreichen des photostationären *cis*-Zustandes bei 360 nm belichtet und für bestimmte Zeitintervalle im Spektrometer bei 283 K, 303 K, 313 K und 323 K unter Lichtausschluß gehalten. Bei den jeweiligen Temperaturen wurden 10-30 Spektren aufgenommen. Die Abnahme von gut aufgelösten Signalen des *cis*-Isomers wurde an eine abfallende exponentielle Kurve angepasst. Die Aktivierungsenergien wurden aus dem Arrhenius-Diagramm ( $\ln k_{cis \rightarrow trans}$  gegen  $T^{-1}$ ) erhalten. Für die Bestimmung mittels UV-Spektroskopie wurde die Probe gelöst, bis zum Erreichen des photostationären *cis*-Zustandes bei 360 nm belichtet und im Spektrometer unter Lichtausschluß gehalten. Mit Hilfe der thermostatisierbaren Küvettenhalter wurden die Proben für bestimmte Zeitintervalle bei unterschiedlichen Temperaturen (283 K, 293 K und 303 K) gehalten, die Zunahme der jeweiligen *trans*-Absorptionsmaxima der Proben gemessen und daraus wie oben beschrieben die Relaxationsraten bestimmt.

### *Bestimmung der Gleichgewichtskonstante*

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten wurde das bicyclische Azopeptid in 1,5 mL Eppendorfgefäßen in Redoxpuffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0) gelöst und entweder als reines *trans*-Isomer oder als Isomerenmischung eingesetzt.

Für die Messung des reinen *trans*-Isomers wurde die Azopeptidstammlösung im Wasserbad für 48 h unter Lichtausschluß bei 30 °C relaxiert. Für die Messung der *cis/trans*-Isomerenmischung wurde die Azopeptidstammlösung für ca. 1-5 min mit Licht geeigneter Wellenlänge photoisomerisiert. Letztere Methode bietet den Vorteil,

die Redoxpotentiale der *cis*- bzw. *trans*-Isomere mit einer einzigen Messung zu bestimmen. Die *cis/trans*-Verhältnisse wurden mittels analytischer HPLC (System 1 und System 3) bestimmt.

Die so erhaltenen Peptidstammlösungen wurden anschließend so mit GSH-bzw. GSSG-Stammlösungen versetzt, dass sowohl verschiedene Verhältnisse von GSH zu GSSG (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1 und 0,2:1) als auch verschiedene Konzentrationen des Redoxsystems bezogen auf das Azopeptid (40-200fach) erhalten wurden. Zur Herstellung dieser Stammlösungen wurden GSH bzw. GSSG gewogen und im zuvor entgasten und mit Argon gesättigten Redoxpuffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0) gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft und dieser gegebenenfalls mit NaOH (1,0 M bzw. 0,1 M) und HCl (1,0 M bzw. 0,1 M) auf pH 7,0 eingestellt, bevor durch Zugabe von Redoxpuffer ein Endvolumen von 300  $\mu$ L eingestellt wurde. Die Azopeptidkonzentrationen lagen dabei zwischen 0,3 und 0,1 mM. Abschließend wurde die Reaktionslösung mit Argon gesättigt.

Die Redoxreaktion fand unter Lichtausschluß und bei 25 °C in einem thermostatisierten Wasserbad statt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots von 50  $\mu$ L entnommen und mittels analytischer HPLC (System 1 und System 3) analysiert. Bei Verwendung des dualen UV-Detektors wurde die UV Absorption bei 210 und 335 nm, bei Verwendung des UV-Photodiodenarrays in einem Intervall von 200-600 nm verfolgt. Für die Zuordnung dieser UV-Signale wurden die Reaktionslösungen zusätzlich mittels LC-MS-Massenspektroskopie analysiert. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Elution aller Reaktanten und identischer Extinktionskoeffizienten der Isomere bei 210 nm wurden die Produktverhältnisse aus den Signalintensitäten bei 210 nm berechnet.

Je nach GSH/GSSG Konzentration wurde das Gleichgewicht relativ schnell, spätestens nach einer Stunde erreicht. Obwohl die *cis*→*trans* Isomerisierungsraten temperaturabhängig sind und in mono- und bicyclischen Azopeptiden variieren, wurde die Isomerisierungsrate im Vergleich zur Redoxreaktionsrate als langsam angenommen. Das *cis/trans*-Isomerenverhältnis sollte somit während der Reaktion annähernd konstant sein.

Die Gleichgewichtskonstante  $K_{ox}$  wurde mit Gleichung 2 bestimmt, während die Nernst'sche Gleichung (Gleichung 3) zur Berechnung des Redoxpotentials verwendet wurde. Als Standardredoxpotential des Glutathions wurde ein Wert von  $-240$  mV (Rost und Rapoport, 1964) verwendet.

$$K_{ox} = ([\text{Peptid}_{ox}] \times [\text{GSH}]^2) / ([\text{Peptid}_{red}] \times [\text{GSSG}]) \quad (2)$$

$$E' = E_0' (\text{Glutathion}) - 0,03 \times \log K_{ox} \quad (3)$$

Die GSH- und GSSG Gleichgewichtskonzentration wurde aufgrund des großen Überschusses mit der bekannten Anfangskonzentration gleichgesetzt.

## 5.2 Synthesevorschriften

### 5.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### *Peptidsynthese*

Die Synthesen der linearen Vorstufen der AMPB- bzw. AMPP-Peptide wurden an polymeren Trägern durchgeführt. Dabei kamen ein manueller Synthesizer (mit druckluftbetriebenem Rührer, zwei Einfüllstutzen und einer Fritte, über die die Lösemittel abgesaugt werden können), ein multipler Synthesizer Typ ACT 396 MPS der Firma *Advanced ChemTech* (Louisville, USA), ein Batch-Synthesizer Typ 431A der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) und ein *Continuous-Flow*-Synthesizer Typ Pioneer der Firma *Perseptive Biosystems* (Foster City, USA) zum Einsatz.

Für die Synthesen der linearen Azopeptide wurde die Fmoc/tBu Schutzgruppenstrategie für Peptidsynthesen an der Festphase angewandt. Für die Kupplung der einzelnen Aminosäuren wurden HOBt und HBTU verwendet. Zur Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OH wurde die Menge von DIEA als Hilfsbase von 8 eq. auf 5 eq. reduziert. Die Chromophore AMPB und AMPP konnten als Fmoc-AMPB-OH bzw. Fmoc-AMPP-OH gemäß der Standardprozedur eingebaut werden. Bei manueller Kupplung wurden die eingesetzten Mengen an Aminosäurederivat, Kupplungsreagenzien und Base jedoch modifiziert. Genaue

## Experimenteller Teil

Angaben werden ebenso wie die verwendeten Harze bei den jeweiligen Syntheseprotokollen explizit angegeben. Die Vollständigkeit der Aminosäurekupplungen wurde mit Hilfe des Kaiser-Testes überprüft und gegebenenfalls ein weiteres Mal gekuppelt. Das in dieser Arbeit verwendete Standardprotokoll zur Peptidsynthese ist in Tab. 5-1 angegeben.

**Tab 5-1.** *Protokoll der Peptidsynthese am polymeren Träger.*

Syntheseschritt	Reagenzien und Lösemittel	Reaktionszeit
Fmoc-Spaltung	20% Piperidin/NMP(v/v)	3 x 1 min und 1 x 15 min
Kupplung	Aminoacylierung mit 4 eq. Fmoc-Xaa-OH/4 eq. HBTU/4 eq. HOBt und 8 eq. DIEA in NMP in der Reihenfolge der gewünschten Peptidsequenz Die Kupplung der Cysteinderivate erfolgte mit 4 eq. Fmoc-Cys(Trt)-OH/4 eq. HBTU/4 eq. HOBt und 5 eq. DIEA in NMP	2 x 45 min
Abspaltung der linearen Peptide vom polymeren Träger	a: DCM/HOAc/Trifluorethanol (8:1:1, v/v/v) b: HFIP/DCM (2:8, v/v)	wie angegeben

Die verwendeten Ansatzgrößen werden bei den jeweiligen Syntheseprotokollen angegeben. Als Seitenkettenschutzgruppen wurde Trt für Histidin und Cystein, OtBu für Glutaminsäure und Asparaginsäure, tBu für Serin und Threonin, Boc für Lysin und Tryptophan und (Boc)<sub>2</sub> und Pbf für Arginin verwendet. Für die Dipeptidsequenz -Ile-Thr- wurde das Pseudoprolin-Dipeptid Fmoc-Ile-Thr( $\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH eingesetzt. Die genauen Abspaltbedingungen der Peptide vom polymeren Träger und dessen Aufarbeitsverfahren werden bei den jeweiligen Syntheseprotokollen explizit beschrieben.

### *Kaiser-Test*

Zur Durchführung des Kaiser-Tests werden einige Harzkugeln in ein kleines Reagenzglas gegeben und mit jeweils 25  $\mu$ L folgender drei Lösungen versetzt.

Lösung I: 1,0 g Ninhydrin in 20 mL Ethanol

Lösung II: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

Lösung III: 0,4 mL 1 mM wässr. KCN in 19,6 mL Pyridin

Die Mischung wird in einem Thermostaten für 5 min bei 95 °C erwärmt. Blaufärbung zeigt eine unvollständige Kupplung an, während eine schwach gelbliche Lösung einen vollständigen Kupplungsschritt bestätigt.

### *Aufarbeitsverfahren*

Das wässrige Aufarbeiten eines Reaktionsansatzes besteht in der Extraktion der EE-Lösung des Rohproduktes mit dreimal je 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, entionisiertem H<sub>2</sub>O, 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung, gesättigter Kochsalzlösung und entionisiertem H<sub>2</sub>O. Die organische Phase wird anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

### *Bestimmung der Harzbeladung*

Die effektive Beladung des Harzes mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure wurde UV-spektroskopisch bestimmt. Dafür wurde eine bekannte ausgewogene Menge ( $m_{\text{Harz}}$ ) des zuvor im Vakuum über KOH getrockneten Harzes in einen 10 mL Maßkolben gegeben und dieses mit 1 mL einer frisch bereiteten Mischung aus 20% Piperidin in DMF (v/v) versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde der Maßkolben mit MeOH auf 10 mL aufgefüllt ( $V_{\text{Masskolben}}$ ) und die Absorption des bei der Reaktion entstandenen Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes ( $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei 301 nm ( $A_{301\text{nm}}$ ) bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes errechnet sich daraus die Beladung des Harzes mit nachstehender Formel:

$$\text{Belegung} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{301\text{nm}}}{7800 \cdot \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot D[\text{cm}]} \cdot \frac{V_{\text{Masskolben}}[\text{mL}]}{m_{\text{Harz}}[\text{g}]} \quad (4)$$

$A_{301\text{nm}}$  = gemessene Absorption bei 301 nm,  $V_{\text{Masskolben}}$  [mL] = 10 mL;  $m_{\text{Harz}}$  [g] = Menge an eingewogenem Harz;  $7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = \epsilon$  des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes;  $D$  [cm] = Schichtdicke der verwendeten Küvette.

### *Markierung der Peptide mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5*

Markierung der *cis*-Konformere:

Für die Markierung der *cis*-Konformere wurden 50-100 µg Peptid in 150 µL 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5) gelöst, mit Licht von 360 nm bis zum Erreichen des photostationären *cis*-Zustandes belichtet und die Lösung unter Lichtausschluß zum reaktiven Farbstoffderivat Cy5-NHS-Ester gegeben. Nach 30 min wurde die Vollständigkeit der Markierung mittels analytischer HPLC (System 3) überprüft und zum Abreagieren von überschüssigem Farbstoff 10 µL einer 0,1 M wässriger Ethanolaminlösung zugegeben.

Markierung der *trans*-Konformere:

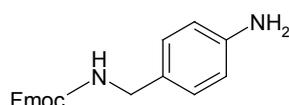
Für die Markierung der *trans*-Konformere wurden 50-100 µg Peptid in 150 µL 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5) gelöst und im Wasserbad für 48 h bei 50 °C unter Lichtausschluß relaxiert. Die Lösung wurde anschließend unter Lichtausschluß zum reaktiven Farbstoffderivat Cy5-NHS-Ester gegeben. Nach 30 min wurde die Vollständigkeit der Markierung mittels analytischer HPLC (System 3) überprüft und zum Abreagieren von überschüssigem Farbstoff 10 µL einer 0,1 M wässriger Ethanolaminlösung zugegeben.

## 5.2.2 Spezielle Synthesen

### 5.2.2.1 Synthese des Chromophors Fmoc-AMPB-OH

Die genannte Substanz wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Ulysse und Chmielewski (Ulysse und Chmielewski, 1994) synthetisiert.

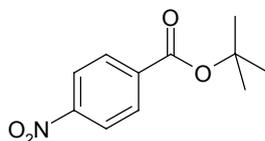
#### (4-N-Fmoc-Amino)-benzylamin (2)



In einem 100 mL Rundkolben wurde zu einer Lösung von 5,0 mL 4-Aminobenzylamin (44 mmol) und 6,1 mL Triethylamin (44 mmol) in 50 mL Acetonitril/5 mL DMF eine Lösung von 14,90 g Fmoc-OSu (44 mmol) in 100 mL Acetonitril zugetropft und die Mischung für 30 min bei RT zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde mit Wasser gefällt, abfiltriert, mit wenig MTB/Trifluorethanol (1:2, v/v) gewaschen und im Exsikkator über NaOH getrocknet.

Ausbeute: 12,15 g (35,28 mmol; 80%); homogen in der DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1, R<sub>f</sub> = 0,9) und in der RP-HPLC<sup>4</sup> (t<sub>r</sub> = 9,3 min); ESI-MS: m/z = 345,4 [M+H]<sup>+</sup>; M<sub>r</sub> = 344,4 berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4-Nitro-benzoesäure-tert-butylester (3)

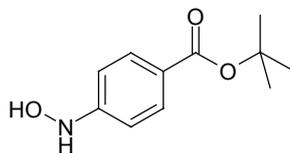


In einem 250 mL Rundkolben wurden in 100 mL THF 19,84 g p-Nitro-benzoesäurechlorid (107 mmol) und 12,9 g Lithium-tert-butylat (161 mmol) erst 1 h bei 0 °C und anschließend 12 h bei RT zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde in EE wässrig aufgearbeitet, aus wenig DCM mit Hexan gefällt und der Niederschlag abfiltriert.

Ausbeute: 17,7 g (79 mmol; 74%); homogen in der DC (EE/PE 1:2, R<sub>f</sub> = 0,9) und in

der RP-HPLC<sup>4</sup> ( $t_r = 11,9$  min).

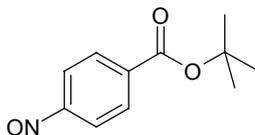
4-Hydroxylamino-benzoessäure-tert-butylester (4)



In einem 250 mL Rundkolben wurde unter Eiskühlung zu einer Lösung aus 10,0 g 4-Nitro-benzoessäure-*tert*-butylester **3** (44,8 mmol) in 200 mL 2-Methoxyethanol portionsweise sukzessiv Ammoniumchlorid (3,83 g; 71,7 mmol) und Zink (8,79 g; 134,4 mmol) gegeben. Nach jeder Zugabe von Zink wurde eine zusätzliche Spatelspitze Ammoniumchlorid zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt. Nach 2 h wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt mit DCM aus dem entstandenen grauen ZnO-Niederschlag herausgelöst. Nach wiederholtem Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt in wenig DCM aufgenommen, mit Hexan gefällt und der Niederschlag abgesaugt. Dabei blieb eine orange Mutterlauge zurück.

Ausbeute: 6,1 g (29,1 mmol; 65%); homogen in der DC (EE /PE 1:6,  $R_f = 0,4$ ) und in der RP-HPLC<sup>4</sup> ( $t_r = 9,8$  min).

4-Nitroso-benzoessäure-tert-butylester (5)



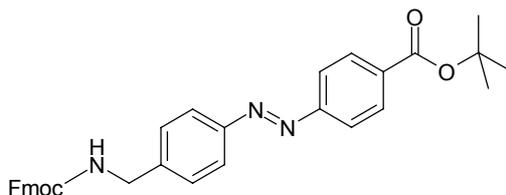
In einem 250 mL Rundkolben wurden unter Eiskühlung in 360 mL Ethanol/H<sub>2</sub>O (3:10, v/v) 5,0 g 4-Hydroxylamino-benzoessäure-*tert*-butylester **4** (23,9 mmol) und 25,84 g FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (95,6 mmol) 3 h bei 0 °C zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether überschichtet und solange mit H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt, bis der pH-Wert der wässrigen Phase neutral war. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das

## Experimenteller Teil

Rohprodukt wurde anschließend über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60) gereinigt (Eluent: EE/PE 1:5, v/v).

Ausbeute: 3,46 g (16,73 mmol; 70%); homogen in der DC (EE/PE 1:5,  $R_f = 0,75$ ).

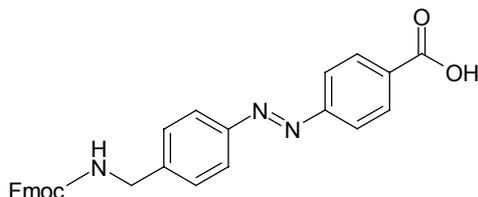
### 4-(4-N-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure-tert-butylester (6)



In einem 10 mL Spitzkolben wurde eine Lösung aus 0,406 g 4-Nitroso-benzoesäure-*tert*-butylester **5** (1,96 mmol, 1,5 eq.) in 3 mL Eisessig vorgelegt. Dazu wurden portionsweise 0,450 g (4-*N*-Fmoc-Amino)-benzylamin (1,31 mmol) zugegeben. Nach 12 h wurde das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit wenig kaltem Eisessig und H<sub>2</sub>O gewaschen. Um Spuren von Wasser zu entfernen, wurde das Produkt in EE aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet, dieses abgesaugt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde abschließend unter leichtem Erwärmen in wenig EE aufgenommen und mit Hexan gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Hexan nachgewaschen.

Ausbeute: 640 mg (1,2 mmol; 90%); homogen in der DC (PE/Hexan, 1:1,  $R_f = 0,92$ ; PE/Hexan, 1:4,  $R_f = 0,32$ ) und in der RP-HPLC<sup>4</sup> ( $t_{cis} = 12,4$  min,  $t_{trans} = 13,2$  min); ESI-MS:  $m/z = 534,4$  [M+H]<sup>+</sup>;  $M_r = 533,6$  berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

### 4-(4-N-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (1, Fmoc-AMPB-OH)



400 mg 4-(4-*N*-Fmoc-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure-*tert*-butylester **6** (0,75 mmol) wurden in 20 ml Benzol gelöst und mit 40 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt.

Das Gemisch wurde für 2 h zum Rückfluß erhitzt, wobei sich das Produkt aus der Reaktionslösung abschied. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Niederschlag abgesaugt, mit Benzol und H<sub>2</sub>O gewaschen und über NaOH im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 310 mg (0,65 mmol; 87%); homogen in der DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HOAc, 4:1:0,1, R<sub>f</sub> = 0,6; CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 4:1, R<sub>f</sub> = 0,3) und in der RP-HPLC<sup>4</sup> (t<sub>cis</sub> = 14,8 min, t<sub>trans</sub> = 15,5 min); ESI-MS: m/z = 478,2 [M+H]<sup>+</sup>; M<sub>r</sub> = 477,4 berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

### 5.2.2.2 Synthesen der monocyclischen RGD-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter

#### 5.2.2.2.1 Synthese des c[Asp-D-Phe-Val-AMPB-Lys-Ala-Arg-Gly-] (9, RGD1)

##### H-Asp(OtBu)-D-Phe-Val-AMPB-Lys(Boc)-Ala-Arg(Boc)-Gly-OH (7)

Das Azopeptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese am multiplen Synthesizer des Typs ACT 396 MPS der Firma *Advanced ChemTech* (Louisville, USA) mit einer Ansatzgröße von 0,12 mmol synthetisiert. Um das vollgeschützte lineare Azopeptid vom Harz abzuspalten, wurde dieses für 30 min mit 10 mL einer Mischung aus DCM/HOAc/Trifluoroethanol (8:1:1, v/v/v) behandelt. Es wurde filtriert und mit zusätzlichen 10 mL der Mischung für weitere 20 min nachgespalten. Nach erneutem Abfiltrieren und mehrmaligem kurzen Waschen mit Spalllösung, wurden die vereinigten Filtrate mit Hexan (5-10faches Volumen) versetzt und die Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 130 mg Rohprodukt (0,094 mmol; 78%).

##### c[Asp(OtBu)-D-Phe-Val-AMPB-Lys(Boc)-Ala-Arg(Boc)-Gly-] (8)

In einem 250 mL Rundkolben wurden 50 mg des linearen Azopeptids **7** (0,036 mmol) in 144 mL trockenem DMF gelöst (c = 2,50·10<sup>-4</sup>M), und mit 75 mg (0,144 mmol; 4 eq.) PyBOP und 22 mg (0,144 mmol; 4 eq.) HOBt versetzt. Nach 1 min Rühren wurden 49 µL DIPEA (0,288 mmol; 8 eq.) zugegeben und die Mischung für 20 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 mL DMF aufgenommen. Dieser

wurde in 20 mL H<sub>2</sub>O getropft. Die Suspension wurde zentrifugiert und das H<sub>2</sub>O abdekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 20 mL H<sub>2</sub>O digeriert und abschließend im Exsikkator über KOH getrocknet. Ausbeute: 38 mg Rohprodukt (0,028 mmol; 78%).

### c[Asp-D-Phe-Val-AMPB-Lys-Ala-Arg-Gly-] (9, RGD1)

38 mg des cyclischen Azopeptids **8** (0,028 mmol) wurden in einem 10 mL Rundkolben mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5% DCM (v/v) versetzt. Nach 25 min Reaktionszeit wurden die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit wenig einer eiskalten Mischung aus MTB/Hexan (2:1, v/v) digeriert. Das Rohpeptid wurde anschließend über eine präparative HPLC-Trennsäule Typ XTerra Prep MS 19\*100mm/C18 der Firma *Waters* (Eschborn, D.) mit einem linearen Gradienten von 10% B nach 40% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 4,1 mg (0,0041 mmol; 15%); homogen in der RP-HPLC<sup>3</sup>:  $t_{cis} = 4,2$  min,  $t_{trans} = 4,5$  min); ESI-MS:  $m/z = 1011,6$  [M+H<sup>+</sup>];  $M_r = 1010,5$  berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub>; Aminosäureanalyse: Arg 1,01 (1) Gly 1,04 (1) Asp 0,99 (1) D-Phe 0,97 (1) Val 0,94 (1) Lys 1,05 (1) Ala 1,01 (1); Peptidgehalt: 68%.

### 5.2.2.2.2 Synthese des c[Asp-D-Phe-Val-Lys-AMPB-Ala-Arg-Gly-] (12, RGD2)

#### H-Asp(OtBu)-D-Phe-Val-Lys(Boc)-AMPB-Ala-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Gly-OH (10)

Das lineare Azopeptid **10** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese am multiplen Synthesizer des Typs ACT 396 MPS der Firma *Advanced ChemTech* (Louisville, USA) mit einer Ansatzgröße von 0,12 mmol synthetisiert. Um das vollgeschützte lineare Azopeptid vom Harz abzuspalten, wurde dieses für 30 min mit 10 mL einer Mischung aus DCM/HOAc/Trifluoroethanol (8:1:1, v/v/v) behandelt. Es wurde filtriert und mit zusätzlichen 10 mL dieser Mischung für weitere 20 min nachgespalten. Nach erneutem Abfiltrieren und mehrmaligem kurzen Waschen mit Spalllösung wurden die vereinigten Filtrate mit Hexan (5-10faches Volumen) versetzt und das Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer abgezogen. Ausbeute:

125 mg Rohprodukt (0,09 mmol; 75%).

c[Asp(OtBu)-D-Phe-Val-Lys(Boc)-AMPB-Ala-Arg(Boc)-Gly-] (11)

In einem 250 mL Rundkolben wurden 50 mg (0,036 mmol) des linearen Azopeptids **10** in 144 mL trockenem DMF gelöst ( $c = 2,50 \cdot 10^{-4}$  M) und mit 75 mg (0,144 mmol; 4 eq.) PyBOP und 22 mg (0,144 mmol; 4 eq.) HOBt versetzt. Nach 1 min Rühren wurden 49  $\mu$ L DIPEA (0,288 mmol; 8 eq.) zugegeben und die Mischung für 20 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 mL DMF aufgenommen. Die sich ergebende Lösung wurde in 20 mL H<sub>2</sub>O getropft und die Suspension zentrifugiert und dekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 20 mL H<sub>2</sub>O digeriert und abschließend im Exsikkator über KOH getrocknet. Ausbeute: 41 mg Rohprodukt (0,029 mmol; 81%).

c[Asp-D-Phe-Val-Lys-AMPB-Ala-Arg-Gly-] (12, RGD2)

41 mg (0,029 mmol) des cyclischen Azopeptids **11** wurden in einem 10 mL Rundkolben mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5% DCM versetzt. Nach 25 min Reaktionszeit wurden die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit wenig einer eiskalten Mischung aus MTB/Hexan (2:1, v/v) digeriert. Das Rohpeptid wurde anschließend über eine präparative HPLC-Trennsäule Typ Xterra Prep MS 19\*100mm/C18 der Firma *Waters* (Eschborn, D) mit einem linearen Gradienten von 10% B nach 40% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 4,6 mg (0,0046 mmol; 16%); homogen in der RP-HPLC<sup>3</sup>:  $t_{cis} = 1,9$  min,  $t_{trans} = 2,1$  min); ESI-MS:  $m/z = 1011,6$  [M+H<sup>+</sup>];  $M_r = 1010,5$  berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub>; Aminosäureanalyse: Arg 0,97 (1) Gly 1,05 (1) Asp 1,00 (1) D-Phe 0,98 (1) Val 0,94 (1) Lys 0,99 (1) Ala 1,00 (1); Peptidgehalt: 66%.

### 5.2.2.2.3 Synthese des *c*[Asp-Asp-Val-AMPB-Lys-Gly-Arg-Gly-] (15, RGD3)

#### *H*-Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-AMPB-Lys(Boc)-Gly-Arg(Boc)-Gly-OH (13)

Das geschützte lineare Azopeptid **13** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese am multiplen Synthesizer des Typs ACT 396 MPS der Firma *Advanced ChemTech* (Louisville, USA) mit einer Ansatzgröße von 0,12 mmol synthetisiert. Um das Peptid vom Harz abzuspalten, wurde dieses für 30 min mit 10 mL einer Mischung aus DCM/HOAc/Trifluoroethanol (8:1:1, v/v/v) behandelt. Das Harz wurde abfiltriert und mit zusätzlichen 10 mL der Mischung für weitere 20 min nachgespalten. Nach erneutem Abfiltrieren und mehrmaligem kurzen Waschen mit Spalllösung wurden die vereinigten Filtrate mit Hexan (5-10faches Volumen) versetzt und die Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 117 mg Rohprodukt (0,084 mmol; 70%).

#### *c*[Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-AMPB-Lys(Boc)-Gly-Arg(Boc)-Gly-] (14)

In einem 250 mL Rundkolben wurden 50 mg (0,036 mmol) des linearen Azopeptids **13** in 144 mL trockenem DMF gelöst ( $c = 2,50 \cdot 10^{-4}$  M), und mit 75 mg PyBOP (0,144 mmol, 4 eq.) und 22 mg HOBt (0,144 mmol, 4 eq.) versetzt. Nach 1 min Rühren wurden 49  $\mu$ L DIPEA (0,288 mmol, 8 eq.) zugegeben und die Mischung für 20 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 2 mL DMF aufgenommen und die Lösung in 20 mL H<sub>2</sub>O getropft. Die Suspension wurde zentrifugiert und das H<sub>2</sub>O abdekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 20 mL H<sub>2</sub>O digeriert und abschließend im Exsikkator über KOH getrocknet. Ausbeute: 40 mg Rohprodukt (0,029 mmol; 81%).

#### *c*[Asp-Asp-Val-AMPB-Lys-Gly-Arg-Gly-] (15, RGD3)

40 mg (0,029 mmol) des cyclischen Azopeptids **14** wurden in einem 10 mL Rundkolben mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5% DCM versetzt. Nach 25 min Reaktionszeit wurden die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der

Rückstand dreimal mit wenig einer eiskalten Mischung aus MTB/Hexan (2:1, v/v) digeriert. Das Rohpeptid wurde anschließend mit dem präparativen HPLC-System über eine semipräparative HPLC-Trennsäule SP 250/10 Nucleosil 100-5 C8 HD der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 0% B nach 40% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,1% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 3 mg (0,0031 mmol; 11%); homogen in der RP-HPLC<sup>1</sup> ( $t_{cis} = 4,8$  min,  $t_{trans} = 5,5$  min); ESI-MS:  $m/z = 965,6$  [M+H<sup>+</sup>];  $M_r = 964,5$  berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>60</sub>N<sub>14</sub>O<sub>12</sub>; Peptidgehalt: 73%, UV-spektroskopisch bestimmt.

### 5.2.2.3 Synthesen der mono- und bicyclischen PDI-Azopeptide mit AMPB als Photoschalter

#### 5.2.2.3.1 Synthese des c[His-Ser-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Ser-<sup>15</sup>N-Gly-] (19, Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI)

##### Fmoc-<sup>15</sup>N-Gly-OH (16)

In einem 250 mL Rundkolben wurde 1,00 g (13,15 mmol) H-<sup>15</sup>N-Gly-OH in 50 mL Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:2, v/v) gelöst, mit 2 M NaOH auf pH 9 gebracht und portionsweise mit 5,32 g Fmoc-OSu (15,78 mmol; 1,2 eq.) versetzt. Während der Reaktion wurde der pH-Wert durch Zugabe von NaOH konstant auf pH 8 gehalten. Die Mischung wurde weitere 30 min gerührt, das Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt und zurückbleibende H<sub>2</sub>O-Phase dreimal mit 25 mL EE extrahiert. Das gewünschte Fmoc-<sup>15</sup>N-Gly-OH wurde aus der gereinigten H<sub>2</sub>O-Phase durch Ansäuern auf pH 2-3 gefällt. Der farblose Feststoff wurde abgesaugt und über KOH für 20 h am Hochvakuum getrocknet. Da das Produkt leicht verunreinigt anfiel, wurde es aus siedendem EE mit Hexan gefällt. Unlösliche Rückstände wurden zuvor abfiltriert. Dabei wurde nur soviel Hexan zugeben, bis eine leichte Trübung auftritt. Das gewünschte Fmoc-<sup>15</sup>N-Gly-OH kristallisierte bei 4 °C über Nacht aus, wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,01 g (10,09 mmol; 76%); homogen in der DC (Cyclohexan/CHCl<sub>3</sub>/HOAc, 45:45:10, R<sub>f</sub> = 0,27); ESI-MS:  $m/z = 299,4$  [M+H]<sup>+</sup>;  $M_r = 298,31$  berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>.

Beladung des 2-Chlor-Tritylchlorid-Harzes mit Fmoc-<sup>15</sup>N Gly-OH

Für die Beladung des 2-Chlor-Tritylchlorid-Harzes mit Fmoc-<sup>15</sup>N Gly-OH wurden aufgrund dessen hoher Reaktivität ausschließlich trockene Edukte und Lösemittel verwendet. Fmoc-<sup>15</sup>N Gly-OH wurde dafür zusammen mit 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz über KOH für 20 h im Exsikkator im Vakuum getrocknet, bevor es zur Synthese verwendet wurde.

In einem vorher unter Vakuum ausgeheizten 100 mL Schlenkkolben wurden unter Schutzgas 0,835 g Fmoc-<sup>15</sup>N Gly-OH (2,8 mmol) mit 10 mL DCM versetzt. Zur vollständigen Lösung wurde 1 mL DMF zugegeben. Diese Mischung wurde anschließend mit 1,918 mL (11,2 mmol) DIPEA versetzt, 1 g 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz (max. Belegungsdichte: 1,4 mmol/g) zugegeben und bei Raumtemperatur für 60 min geschüttelt. Zum Abreagieren freier nicht umgesetzter 2-Chlor-Trityl-Gruppen wurde das Harz in eine 25 mL Spritze mit Fritte überführt und dreimal mit 5 mL einer Mischung aus DCM/Methanol/DIPEA (17:2:1, v/v/v) behandelt. Das Harz wurde anschließend je dreimal mit DCM (10 mL, 2 min), NMP (10 mL, 2 min) und DCM (8 mL, je 2 min) gewaschen. Nach Trocknen des Harzes im Hochvakuum wurde die Beladung anschließend UV-spektroskopisch bestimmt. Diese betrug 0,69 mmol/g.

H-His(Trt)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-AMPB-Lys(Boc)-Ser(tBu)-<sup>15</sup>N Gly-OH (17)

Das lineare Azopeptid **17** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese bis zum Photoschalter AMPB an einem manuellen Synthesizer mit einer Ansatzgröße von 0,5 mmol synthetisiert. 358 mg Fmoc-AMPB-OH (0,75 mmol; 1,5 eq.) wurden anschließend mit 115 mg HOBt (0,75 mmol; 1,5 eq.), 284 mg HBTU (0,75 mmol; 1,5 eq.) und 257 µL DIPEA (1,5 mmol; 3 eq.) für 2 h gekuppelt. Die restlichen fünf Peptidkupplungen wurden an einem automatischen Synthesizer des Typs 433A der Firma *Applied Biosystems* (Darmstadt, D) durchgeführt. Für die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wurde das Harz in eine 10 mL Spritze mit Fritte gegeben und bei RT mit 8 mL einer Mischung aus

DCM/Hexafluorisopropanol (80:20, v:v) für 5 min behandelt. Es wurde abfiltriert, weitere 8 mL der Mischung zugegeben und für weitere 5 min nachgespalten. Nach erneutem Abfiltrieren und mehrmaligem kurzen Waschen mit Spatlösung wurden die vereinigten Filtrate mit Hexan (5-10faches Volumen) versetzt und die Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 430 mg Rohprodukt (0,23 mmol; 46%).

*c[His(Trt)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-AMPB-Lys(Boc)-Ser(tBu)-<sup>15</sup>N Gly-OH-] (18)*

In einem 250 mL Rundkolben wurden 100 mg des linearen Azopeptids **17** (0,053 mmol) in 200 mL trockenem DMF gelöst ( $c = 2,64 \cdot 10^{-4}$  M) und mit 84 mg PyBOP (15,84 mmol; 3 eq.) und 24 mg HOBt (15,84 mmol; 3 eq.) versetzt. Nach 1 min Rühren wurden 56  $\mu$ L DIPEA (31,6 mmol; 6 eq.) zugegeben und die Mischung für 20 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 mL DMF aufgenommen. Dieser wurde in 30 mL H<sub>2</sub>O getropft. Die Suspension wurde zentrifugiert und das H<sub>2</sub>O abdekantiert. Der zurückbleibende Niederschlag wurde zweimal mit 30 mL H<sub>2</sub>O digeriert und abschließend im Exsikkator über KOH getrocknet. Ausbeute: 78 mg Rohprodukt (0,042 mmol; 80%).

*c[His-Ser-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Ser-<sup>15</sup>N Gly-] (19, Azo-[Ser<sup>2</sup>, Ser<sup>5</sup>]-PDI)*

60 mg des cyclischen Azopeptids **18** (0,032 mmol) wurden in einem 10 mL Rundkolben mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5% H<sub>2</sub>O (v/v) versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde die Lösung mit 15 mL kaltem H<sub>2</sub>O verdünnt und die Wasserphase dreimal mit 15 mL eiskaltem Diethylether extrahiert. Die gereinigte Wasserphase wurde mit weiteren 50 mL H<sub>2</sub>O verdünnt und an der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde anschließend mit dem semipräparativen HPLC-System über eine semipräparative Trennsäule SP 250/10 Nucleosil 100-5 C8 HD der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 0% B nach 40% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer

A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,1% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 8,7 mg (0,008 mmol; 25%); homogen in der RP-HPLC<sup>2</sup>:  $t_{cis} = 5,4$  min,  $t_{trans} = 17,7$  min); ESI-MS:  $m/z = 1119,8$  [M+H<sup>+</sup>], 560,6 [M+2H<sup>2+</sup>],  $M_r = 1118,6$  berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>79</sub>N<sub>17</sub>O<sub>11</sub>; Peptidgehalt: 58%, UV-spektrometrisch bestimmt.

### 5.2.2.3.2 Synthese des *c*[His-Cys-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Cys-Gly-] (22, cAzo-PDI)

#### *H*-His(*Trt*)-Cys(*Trt*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-AMPB-Lys(*Boc*)-Cys(*Trt*)-Gly-OH (20)

Das geschützte lineare Azopeptid **20** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese mit einem manuellen Synthesizer an Fmoc-Gly-TCP-Harz (0,5 mmol/g) mit einer Ansatzgröße von 1 mmol synthetisiert. 716 mg Fmoc-AMPB-OH (1,5 mmol; 1,5 eq.) wurden anschließend mit 230 mg HOBt (1,5 mmol; 1,5 eq.), 569 mg HBTU (1,5 mmol; 1,5 eq.) und 514 µL DIPEA (3 mmol; 3 eq.) für 2 h gekuppelt. Um das vollgeschützte lineare Azopeptid vom Harz abzuspalten, wurde dieses in eine 50 mL Spritze mit Fritte gegeben. Bei Raumtemperatur wurden 15 mL einer Mischung aus DCM/Hexafluorisopropanol (80:20, v:v) zugegeben und für 15 min geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert, weitere 15 mL der Mischung zugegeben und mit dieser für weitere 10 min nachgespalten. Nach erneutem Abfiltrieren und mehrmaligem kurzen Waschen mit Spaltlösung wurden die vereinigten Filtrate mit Hexan (5-10faches Volumen) versetzt und die Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 1370 mg Rohprodukt (0,6 mmol; 60%).

#### *c*[His(*Trt*)-Cys(*Trt*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-AMPB-Lys(*Boc*)-Cys(*Trt*)-Gly] (21)

In einem 500 mL Rundkolben wurden 100 mg des linearen Azopeptids **20** (0,044 mmol) in 128 mL trockenem DMF gelöst ( $c = 3,4 \cdot 10^{-4}$  M) und mit 91 mg PyBOP (0,17 mmol; 4 eq.) und 27 mg HOBt (0,17 mmol; 4 eq.) versetzt. Nach 1 min Rühren wurden 45 µL DIPEA (0,26 mmol; 6 eq.) zugegeben und die Mischung für 24 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösemittel wurde am

Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 2 mL DMF aufgenommen. Dieser wurde in 30 mL H<sub>2</sub>O getropft und der Niederschlag abzentrifugiert. Dieser wurde zweimal mit 30 mL H<sub>2</sub>O digeriert und abschließend im Exsikkator über KOH getrocknet. Ausbeute: 85 mg Rohprodukt (0,037 mmol; 85%).

### c[His-Cys-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Cys-Gly-] (22, cAzo-PDI)

50 mg des cyclischen Azopeptids **21** (0,022 mmol) wurden in einem 10 mL Rundkolben mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5% H<sub>2</sub>O (v/v) versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde die Lösung mit 15 mL kaltem H<sub>2</sub>O verdünnt und die H<sub>2</sub>O-Phase dreimal mit je 15 mL eiskaltem Diethylether extrahiert. Die H<sub>2</sub>O-Phase wurde mit weiteren 50 mL H<sub>2</sub>O verdünnt und an der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde anschließend mit dem präparativen HPLC-System 2 über eine präparative HPLC-Trennsäule Typ VP 250/21 Nucleosil 100-5 C8 HD der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 0% B nach 90% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 9,9 mg (0,0086 mmol, 39%); homogen in der RP-HPLC<sup>2</sup>:  $t_{cis} = 14,0$  min,  $t_{trans} = 20,0$  min); ESI-MS:  $m/z = 1150,6$  [M+H<sup>+</sup>],  $M_r = 1149,6$  berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>79</sub>N<sub>17</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>; Peptidgehalt: 66%, UV-spektrometrisch bestimmt.

### **5.2.2.3.3 Synthese des oxidierten c[His-Cys-Lys-Lys-Lys-AMPB-Lys-Cys-Gly-] (23, Azo-PDI)**

In einem 50 mL Rundkolben wurden 23 mg des cyclischen Azopeptids **22** (0,02 mmol) in 20 mL 50% HOAc gelöst und mit 2 mL einer Lösung von I<sub>2</sub> in 50% HOAc (10 mg/mL) versetzt, wobei sich eine Peptidkonzentration von  $0,9 \cdot 10^{-4}$  M ergab. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurden die Lösemittel an der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde anschließend mit dem semipräparativen HPLC-System über eine semipräparative HPLC-Trennsäule Typ SP 250/10 Nucleosil 100-5 C8 HD der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 0% B nach 40% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 6,3 mg (0,0055 mmol; 28%); homogen in der RP-HPLC<sup>2</sup>:  $t_{cis} = 15,3$  min,  $t_{trans} = 20,7$  min); ESI-MS:  $m/z = 1148,6$   $[M+H]^+$ ,  $574,8$   $[M+2H^{2+}]$ ;  $M_r = 1147,6$  berechnet für  $C_{52}H_{77}N_{17}O_9S_2$ ; Peptidgehalt: 63%, UV-spektrometrisch bestimmt.

### 5.2.2.4 Synthese des wasserlöslichen AMPB-Photoschalters

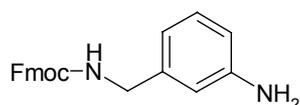
#### 5.2.2.4.1 Synthese des Ac-Lys-AMPB-Lys-NH<sub>2</sub> (24, wAMPB)

wAMPB wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese am manuellen Synthesizer an TentaGel S RAM-Harz der Firma *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, D, 0,28 mmol/g) mit einer Ansatzgröße von 0,028 mmol synthetisiert. 22 mg Fmoc-AMPB-OH (0,044 mmol; 1,55 eq.) wurden anschließend mit 7 mg HOBt (0,044 mmol; 1,55 eq.), 17 mg HBTU (0,044 mmol; 1,55 eq.) und 15  $\mu$ L DIPEA (0,88 mmol; 3,1 eq.) für 2 h gekuppelt. Die Acetylierung wurde mit 2 mL einer Mischung aus 5%  $Ac_2O$ /6% 2,6-Lutidin in DMF für 2 h durchgeführt. Schutzgruppenabspaltung erfolgte mit 2 mL einer Mischung aus 95% TFA/5%  $H_2O$  (v/v). Nach 2 h wurde die Lösung mit 10 mL kaltem  $H_2O$  verdünnt und die  $H_2O$ -Phase dreimal mit je 10 mL eiskaltem Diethylether extrahiert. Die  $H_2O$ -Phase wurde mit weiteren 50 mL  $H_2O$  verdünnt und die Lösemittel lyophyllisiert. Das Rohpeptid wurde anschließend mit dem präparativen HPLC-System 2 über eine präparative HPLC-Trennsäule Typ VP 250/21 Nucleosil 100-5 C8 HD der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 10% B nach 90% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in  $H_2O$ ) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 8 mg (0,015 mmol; 53%); homogen in der RP-HPLC<sup>1</sup> ( $t_{cis} = 3,8$  min,  $t_{trans} = 4,8$  min); ESI-MS:  $m/z = 553,4$   $[M+H]^+$ ;  $M_r = 552,6$  berechnet für  $C_{28}H_{40}N_8O_4$ .

#### 5.2.2.5 Synthese des Chromophors Fmoc-AMPP-OH

##### N-Fmoc-(3-Amino)-benzylamin (25)



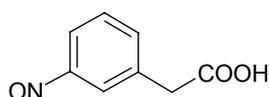
Zu einer Lösung von 5 mL 3-Aminobenzylamin (44 mmol) und 6,1 mL Triethylamin

## Experimenteller Teil

(44 mmol) in 50 mL Acetonitril/5 mL DMF wurde eine Lösung von Fmoc-OSu (14,90 g; 44 mmol) in 100 ml Acetonitril zugetropft. Das Produkt wurde mit Wasser ausgefällt, filtriert, mit MTB/Trifluorethanol (1:1, v/v) gewaschen und im Exsikkator über NaOH getrocknet.

Ausbeute: 8,73 g (28,66 mmol; 58%); homogen in der DC (EE/Hexan 1:1,  $R_f = 0,39$ ) und in der RP-HPLC<sup>3</sup> ( $t_r = 4,9$  min); ESI-MS:  $m/z = 345,4$   $[M+H]^+$ ;  $M_r = 344,4$  berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

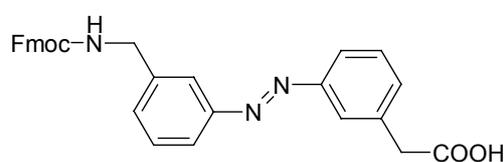
### 3-Nitroso-phenylelessigsäure (26)



In einem 250 mL Rundkolben wurden zu einer Lösung von 0,91 g 3-Nitro-phenylelessigsäure (5,0 mmol) in 25 mL 2-Methoxyethanol portionsweise sukzessiv 0,48 g Ammoniumchlorid (9,0 mmol) und 0,88 g Zinkpulver (13,5 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde diese Mischung in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und 30 mL einer Lösung von FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (2,12 g; 75 mmol) in Ethanol/H<sub>2</sub>O (5:1, v/v) zugetropft. Nach 60 min wurde die Lösung mit Diethylether versetzt und die organische Phase je dreimal mit 50 mL H<sub>2</sub>O und 50 mL gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die gewaschene organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Das ölige Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60) gereinigt (Eluent: EE/Hexan/HOAc 100:5:1).

Ausbeute: 0,39 g (2,36 mmol; 47%); homogen in der DC (EE/Hexan/HOAc 100:5:1,  $R_f = 0,49$ ) und in der RP-HPLC<sup>3</sup> ( $t_r = 2,76$  min).

### 3-(3-N-Fmoc-3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (27, Fmoc-AMPP-OH)



In einem 10 mL Spitzkolben wurden 0,76 g 3-Nitroso-phenylelessigsäure **26**

(4,55 mmol) in 5 mL Eisessig vorgelegt und bei RT portionsweise mit 0,78 g N-Fmoc-(3-amino)benzylamin **25** (2,25 mmol) versetzt. Die Mischung wurde für 12 h bei RT gerührt, das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit wenig Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 0,57 g (1,16 mmol; 51%); homogen in der RP-HPLC<sup>3</sup> ( $t_{cis} = 7,65$  min,  $t_{trans} = 8,65$  min); ESI-MS:  $m/z = 492,4$   $[M+H]^+$ ;  $M_r = 491,5$  berechnet für  $C_{30}H_{25}N_3O_2$ .

### 5.2.2.6 Synthese der $\beta$ -Hairpin-Modellpeptide mit AMPP als Photoschalter

#### 5.2.2.6.1 Synthese des H<sub>2</sub>N-Lys-Tyr-Thr-Val-Glu-Ile-AMPP-Lys-Lys-Ile-Thr-Val-Glu-OH (**28**, AzoHP1)

AzoHP1 wurde mit freiem C- und N-Terminus synthetisiert. Die ersten sechs Aminosäuren wurden standardmäßig mit einem Peptidsynthesizer Typ 431A der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, U.S.A) an Fmoc-Glu(OtBu)-TCP-Harz der Firma *PepChem* (Tübingen, D; 0,55 mmol/g) unter Verwendung des Pseudoprolin-Dipeptids Fmoc-Ile-Thr( $\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH gekuppelt. Die Ansatzgröße betrug 0,25 mmol. Das Harz wurde in eine Spritze überführt und der Photoschalter manuell gekuppelt. Dazu wurden 246 mg Fmoc-AMPP-OH (0,5 mmol; 2 eq.) in 1 mL DMF gelöst und mit 77 mg HOBt (0,5 mmol; 2 eq.), 190 mg HBTU (0,5 mmol; 2 eq.) und 171  $\mu$ L DIPEA (1 mmol; 4 eq.) versetzt. Diese Lösung wurde für 2 h zum Harz gegeben und geschüttelt. Nach Waschen des Harzes wurde dieses mit DCM getrocknet, in das Reaktionsgefäß des oben genannten Peptidsynthesizers überführt und die restlichen sechs Aminosäuren automatisch gekuppelt. Nach erneutem Überführen des Harzes in eine 10 mL Spritze wurde dieses für 2 h mit 10 mL 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) behandelt, mit MTB/Hexan (2:1, v/v) gefällt, zentrifugiert und aus H<sub>2</sub>O lyophilisiert. Ausbeute: 163 mg Rohpeptid (0,096 mmol, 38%);

Die Aufreinigung des Rohpeptids (50 mg, 0,029 mmol) erfolgte mit dem präparativen HPLC-System 2 über einer präparative HPLC-Trennsäule Typ VP 250/21 Nucleosil 100-5 C18 PPN der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 10% B nach 90% B in 90 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 8 mg (0,0047 mmol; 16%); homogen in der RP-HPLC<sup>3</sup> ( $t_{cis} = 3,8$  min,  $t_{trans}$

= 4,0 min); ESI-MS:  $m/z = 851,8 [M+2H]^{2+}$ ;  $M_r = 1702,05$  berechnet für  $C_{82}H_{128}N_{18}O_{21}$ .

#### 5.2.2.6.2 Synthese des H-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub> (29, AzoTrpZip2)

AzoTrpZip2 wurde als C-terminales Amid synthetisiert. Die ersten fünf Aminosäuren wurden standardmäßig mit einem Peptidsynthesizer Typ Pioneer der Firma *PerSeptive Biosystems, Inc.* (Foster City, USA) an TentaGel S RAM-Harz der Firma *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, D; 0,28 mmol/g) gekuppelt. Die Ansatzgröße betrug 0,10 mmol. Das Harz wurde anschließend in eine Spritze überführt und der Photoschalter manuell gekuppelt. Dazu wurden 98 mg Fmoc-AMPP-OH (0,2 mmol; 2 eq.) in 1 mL DMF gelöst und mit 31 mg HOBt (0,2 mmol; 2 eq.), 76 mg HBTU (0,2 mmol; 2 eq.) und 69  $\mu$ L DIPEA (0,4 mmol; 4 eq.) versetzt. Diese Lösung wurde für 2 h zum Harz gegeben und geschüttelt. Nach Waschen des Harzes wurde dieses mit DCM getrocknet, in das Reaktionsgefäß eines Peptidsynthesizers Typ 431A der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, U.S.A) überführt und die restlichen fünf Aminosäuren an diesem standardmäßig gekuppelt. Nach erneutem Überführen des Harzes in eine 10 mL Spritze wurde dieses für 2 h mit 10 mL 95% TFA/H<sub>2</sub>O (v/v) behandelt, mit MTB/Hexan (2:1, v/v) gefällt, zentrifugiert und aus H<sub>2</sub>O lyophilisiert. Die Aufreinigung des Rohpeptids erfolgte mit dem präparativen HPLC-System 2 über einer präparative HPLC-Trennsäule Typ VP 250/21 Nucleosil 100-5 C8 PPN der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 30% B nach 50% B in 60 min gereinigt. Als Eluenten wurden Puffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und B (0,08% TFA in ACN) verwendet.

Ausbeute: 7 mg (0,0041 mmol; 4%); homogen in der RP-HPLC<sup>3</sup> ( $t_{cis} = 7,65$  min,  $t_{trans} = 8,65$  min); ESI-MS:  $m/z = 845,0 [M+2H]^{2+}$ ;  $M_r = 1688,0$  berechnet für  $C_{87}H_{106}N_{20}O_{16}$ .

## 6 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3. Auflage, Garland Publishing Inc., New York, London.

Arnaut, M. A. (2002) *Immunological Reviews* **186**, 125-140.

Arrondo, J. L. R., Blanco, F. J., Serrano, L., Goni, F. M. (1996) *FEBS Let.* **384**, 35-37.

Åslund, F., Berndt, K. D., Holmgren, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30780-30786.

Aumailley, M., Gurrath, M., Müller, G., Calvete, J., Timpl, R., Kessler, H. (1991) *FEBS* **291**, 50-54.

Ballew, R. M., Sabelko, J., Grübele, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5759-5764.

Beglova, N., Blacklow, S. C., Takagi, J., Springer, T. A. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 282-287.

Behrendt, R. *Photoschaltung von Konformation und Bioaktivität cyclischer Modellpeptide*, Diss. München 2000

Behrendt, R., Renner, C., Schenk, M., Wang, F., Wachtveitl, J., Oesterhelt, D., Moroder, L. (1999) *Angew. Chem.* **111**, 2941-2943.

Berman, A. E., Kozlova, N. I., Morezevich, G. E. (2003) *Biochemistry (Moscow)* **68**, 1284-1299.

Biswas, N., Umopathy, S. (1995) *Chem. Phys. Lett.* **236**, 24-29.

Blanco, F. J., Jimenez, A. M., Rivo, M., Santoro, J., Herranz, J., Nieto, J. L. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 345-351.

Blanco, F. J., Rivas, G., Serrano, L. (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 584-590.

Brown, C. J. (1966) *Acta Crystallogr.* **21**, 146-152.

Cabrele, C., Fiori, S., Pegoraro, S., Moroder, L. (2002) *Chem. Biol.* **9**, 731-740.

Cattani-Scholz, A., Renner, C., Cabrele, C., Behrendt, R., Oesterhelt, D., Moroder, L. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 289-292.

Ciani, B., Jourdan, M., Searle, M. S. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9038-9047.

Cochran, A. G., Skelton, N. J., Starovasnik, M. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5578-5583.

Cox, J. P. L., Evans, P. A., Packman, L. C., Williams, D. H., Woolfson, D. N. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 483-492.

Curley, G. P., Blum, H., Humphries, M. J. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 427-441.

Darby, N. J., Creighton, T. E. (1995) *Biochemistry* **34**, 16770-16780.

Davies, J. S. (2003) *J. Peptide Sci.* **9**, 471-501.

Dürr, H., Bouas-Laurent, H. (1990) *Photochromism. Molecules and Systems. Studies in Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam.

Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A., Rutter, W. J. (1985) *Nature* **317**, 267-270.

Feringa, B. L., Jager, W. F., de Lange, B., Meijer, A. W. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5468-5470.

Flint, D. G., Kumita, J. R., Smart, O. S., Woolley, G.A. (2002) *Chem. Biol.* **9**, 391-397.

Frauenfelder, H. (1999) *Rev. Modern Phys.* **71**, 419-430.

Gao, X. M., Ye, Y. H., Bernd, M., Kutscher, B. (2002) *J. Pept. Sci.* **8**, 418-430.

Gellman, S. H. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 717-725.

Gilon C., Mang, C., Lohof, E., Friedler, A., Kessler, H. (2003) Synthesis of Cyclic Peptides aus *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Bd. E 22b, 461-542; Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C. (Hrsg.), Thieme, Stuttgart, New York.

Goldberger, R. F., Epstein, C. J. Anfinsen, C. B. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 628-635.

Gottschalk, K.-E., Kessler, H. (2002) *Ang. Chem.* **114**, 3919-3927.

Gupta, P. N., Raina, A. (1988) *J. Indian. Chem. Soc.* **LXV**, 495-497.

Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A., Zander, T., Martin, J. L. (1997) *Protein Sci.* **6**, 1148-1156.

Guiirec, P., Hapiot, P., Moiroux, J., Neudeck, A., Pinson, J., Tavani, C. (1999) *J. Phys. Chem. A* **103**, 5490-5500.

Hagen, S. J., Hofrichter, J., Szabo, A., Eaton W. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11615-11621.

Hantgan, R. R., Paumi, C., Rocco, M., Weisel, J. W. (1999) *Biochemistry* **38**, 14461-14474]

Hamada, F.; Masuda, T.; Kondo, Y. (1995) *Supramol. Chem.* **5**, 129-131.

Hampson, G. C., Robertson, J. M. (1941) *J. Chem. Soc.* 409-413.

Hartley, G. S. (1938) *J. Chem. Soc.* **1938**, 633-642.

Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S. L., Jonccyc, A., Kessler, H. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7461-7472.

- Hawkins, H. C., Blackburn, E. C., Freedman, R. B. (1991) *Biochem. J.* **275**, 349-353.
- Hawkins, H. C., Freedman, R. B. (1991) *Biochem. J.* **275**, 335–339.
- Hennecke, J., Spleiss, C., Glockshuber, R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 189-195.
- Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R. (1998) *Folding Des.* **3**, 161-171.
- Hugel, T., Holland, N. B., Cattani, A., Moroder, L., Seitz, M., Gaub, H. E. (2002) *Science* **296**, 1103-1106.
- Jacob C., Giles G. I., Giles N. M., Sies H. (2003) *Angew. Chem.* **115**, 4890–4907.
- Jacobi, A., Huber-Wunderlich, M., Hennecke, J., Glockshuber, R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 213692-213699.
- Jocelyn, P. C. (1972) *Biochemistry of the SH Group*, 55-58, Academic Press, New York.
- Johnson, J. B., Lamb, D. C., Frauenfelder, H., Muller, J. D., McMahon, B., Nienhaus, G.U., Young, R. D. (1996) *Biophys. J.* **71**, 1563-1573.
- Kemmink, J., Darby, N., Dijkstra, K., Nilges, M., Creighton, T. E. (1996) *Biochemistry* **35**, 7684-7691.
- Kemmink, J., Darby, N., Dijkstra, K., Nilges, M., Creighton, T. E. (1997) *Current Biology* **7**, 239-245.
- Kessler, H., Haase, B. (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* **39**, 36–40.
- Kortemme, T., Darby, N. J., Creighton, T. E. (1996) *Biochemistry* **35** 14503-14511.
- Krimm, I., Lemaire, S., Ruelland, E., Migniac-Maslow, M., Jaquot, J.-P., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Lancelin, J.-M. (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 185-195.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-364.

- Kumita, J. R., Smart, O. S., Woolley, G. A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3803-3808.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodorski, J., Hendrickson, W. A. (1998) *Nature* **393**, 648-659.
- Lednev, I. K., Ye, T. Q., Hester, R. E., Moore, J. N. (1996) *J. Phys. Chem.* **100**, 13338-13342.
- Lees, W. J., Whitesides, G. M. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 642-647.
- Lee, J.-O., Rieu, P., Arnaout, M. A., Liddington, R. (1995) *Cell* **80**, 631-638.
- Lin, T. Y., Kim, P. S. (1989) *Biochemistry* **28**, 5282-5287.
- Ling, H., Yaremko, B., Liu, M., Varner, J., Smith, E. M., Neustadt, B., Nechuta, T. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* **476**, 169-180.
- Liu, R. S. H., Asato, A. E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 259-263.
- Liu, R. S. H., Hammond, G. S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11153-11158.
- Liu, R. S. H., Hammond, G. S. (2001) *Chem. Eur. J.* **7**, 4537-4544.
- Lundström, J., Holmgren, A. (1993) *Biochemistry* **32**, 6649-6655.
- Maness, S. J., Franzen, S., Gibbs, A. C., Causgrove, T. P., Dyer, R. B. (2003) *Biophys. J.* **84**, 3874-3882]
- Martin, J. L. (1995) *Structure* **3**, 245-250.
- Millis, K. K., Weaver, K. H., Rabenstein, D. L. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 4144-4146.
- Monti, S., Orlande, G., Palmieri, P. (1982) *Chem. Phys.* **71**, 87-99.

- Muller, A. M., Lochbrunner, S., Schmid, W. E., Fuss, W. (1998) *Angew. Chem.* **110**, 520-522.
- Murakami, H., Kawabuchi, A., Kotoo, K., Kunitake, M., Nakashima, N. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7605-7606.
- Murphy, H. R., Harris, H. W. Jr. (1987) *Anal. Biochem.* **165**, 88-95.
- Nakagama, T., Hirasawa, K., Uchiyama, K., Hobo, T. (2001) *Analytical Science* **17**, 119-124.
- Nägele, T., Hoche, R., Zinth, W., Wachtveitl, J. (1997) *Chem. Phys. Lett.* **272**, 489-495.
- O'Donnell, M. E., Williams, C. H. Jr. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13795-13805.
- Pascher, T., Chesick, J. P., Winkler, J. R., Gray, H. B. (1996) *Science* **271**, 1558-1560.
- Pelletier A. J., Kunicki, T., Ruggeri, Z. M., Quaranta V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18133-18140.
- Pfaff, M., Kirsten Tangemann, K., Müller, B. Gurrath, M., Müller, G., Kessler, H., Timpl, R., Engel, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20233-20238.
- Phillips, C. M., Mizutani, Y., Hochstrasser, R. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7292-7296.
- Pipoosananakaton, B., Sukwattanasinitt, M., Jaiboon, N., Chaichit, N., Tuntulani, T. (2000) *Bull. Korean Chem. Soc.* **21**, 867-874.
- Plantefaber, L. C., Hynes, R. O. (1998) *Cell* **56**, 281-290.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21785-21788.
- Rau, H. (1973) *Angew. Chem.* **6**, 248-258.
- Rau, H. (19984) *J. Photochem.* **26**, 221-225.

- Renner, Ch., Behrendt, R., Spörlein, S., Wachtveitl, J., Moroder, L. (2000a) *Biopolymers* **54**, 489-500.
- Renner, Ch., Cramer, J., Behrendt, B., Moroder, L. (2000b) *Biopolymers* **54**, 501-514.
- Renner, C., Behrendt, R., Heim, N., Moroder, L. (2002) *Biopolymers* **63**, 382-393.
- Rost J., Rapoport, S. (1964) *Nature* **201**, 185-187.
- Russell, S. J., Cochran, A. G. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12600-12601.
- Saadioui, M., Asfari, Z., Vicens, J. (1997a) *Tetrahedron Lett.* **38**, 1187-1190.
- Saadioui, M., Asfari, Z., Thuéry, P., Nierlich, M., Vicens, J. (1997b) *Tetrahedron Lett.* **38**, 4643-4646.
- Saccà, B., Sinner, E.-K., Kaiser, J. T., Lübken, C., Eble, J. A., Moroder, L. (2002) *ChemBioChem* **3**, 904-907.
- Satzger, H., C. Root, C., Renner, C., Behrendt, R. Moroder, L., Wachtveitl, J., Zinth, W. (2004) *Chem. Phys. Let.* **396**, 191-197.
- Scherf, T., Kasher, R., Balass, M., Fridkin, M., Fuchs, S., Katchalski-Katzir, E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6629-6634.
- Searle, M. S., Williams, D. H., Rackman, L. C. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 999-1006.
- Shinkai, S., Ishihara, M., Ueda, K., Manabe, O. (1985) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 511-518.
- Sibanda, B. L., Thornton, J. M. (1986) *Nature* **316**, 170-174.
- Siedler, F., Rudolph-Böhner, S., Masamitsu, D., Musiol, H. J., Moroder, L. (1993) *Biochemistry* **32**, 7488-7495.
- Siedler, F., Quarzago, D., Rudolph-Böhner, S., Moroder, L. (1994) *Biopolymers* **34**, 1563-1572.

- Spörlein, S., Carstens, H., Satzger, H., Renner, C., Behrendt, R., Moroder, L., Tavan, P., Zinth, W., Wachtveitl, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7998-8002.
- Springer, T. A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 65–72.
- Takagi J., Erickson, H. P., Springer, T. A. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 412–416.
- Thompson, P. A., Eaton, W. A., Hofrichter J. (1997) *Biochemistry* **36**, 9200-9210.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., Rapoport, T. A. (2001) *Cell* **104**, 937-948.
- Tu, B. P., Ho-Schleyer, S., K.J. Travers, K. J., Weissman, J. S. (2000) *Science*. **290**, 1571–1574]
- Tu, B. P., Weissmann, J. S. (2004) *J. Cell Biol.* **164**, 341-346.
- Ulysse, L., Cubillos, J., Chmielewski, J. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8466-8467.
- Ulysse, L., Chmielewski, J. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2145-2146.
- Vouri, K., Myllylä, R., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7211-7214.
- Wang, T., Xu, Y., Du, D., Gai, F. (2004) *Biopolymers* **75**, 163-172.
- Wunderlich, M., Glockshuber, R. (1993) *Protein Sci.* **2**, 717-726.
- Wunderlich, M., Otto, A., Maskos, K., Mücke, M., Seckler, R., Glockshuber, R. (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 28-33.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R. Scott D. L., Joachimiak A., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. (2001) *Science* **294**, 339-345.
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. (2002) *Science* **296**, 151-155.

## Literaturverzeichnis

---

Zapun, A., Creighton, T. E., Rowling, P. W., Freedman, R. B. (1992) *Proteins* **14**, 10-15.

Zapun, A., Cooper, L., Creighton, T. E. (1994) *Biochemistry* **33**, 1907-1914.

Zapun, A., Missiakis, D., Raina, S., Creighton, T. E. (1995) *Biochemistry* **34**, 5075-5089.