

„Man kann einen Abgrund nicht
mit zwei Sprüngen überqueren“

Sir Winston L. S. Churchill
(1874 – 1965)

Synthese und Konformationsanalyse
cyclischer Peptide als potentielle
Liganden von Integrinen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(*Doctor rerum naturalium*)

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Ulf Strijowski

aus Bielefeld

Bielefeld

März 2004

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. Norbert Sewald
in der Zeit von Februar 2001 bis März 2004 an der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Norbert Sewald für die interessante Aufgabenstellung, das ständige Interesse, mit dem er den Fortgang der Arbeit betrachtet hat, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Weiterhin gebührt ihm mein Dank für die moralische und ernährungsphysiologische Unterstützung durch Überlassung zahlloser Nachspeisen.

Herrn Professor Dr. Jochen Mattay danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe OCIII danke ich für die gute Zusammenarbeit, die vielfältigen Unterstützungen und die gute Atmosphäre. Kai Jenssen und Thomas Huber danke ich für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit. Sylwia Urman danke ich für die Durchführung der biologischen Tests und für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Für die Unterstützung im Bereich der NMR-spektroskopischen Messungen gebührt mein Dank Karl-Peter Mester und Dr. Andreas Mix.

Berit Abel, Patrik Plattner, Stephanie Reis, Frank Reilmann und Vanessa Werner danke ich für die Arbeit, die sie im Rahmen ihrer sechswöchigen Blockpraktika geleistet haben. Yi Yang danke ich für die Unterstützung bei der Peptidsynthese im Rahmen seines Forschungsaufenthaltes im Herbst 2003. Auch den zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten aus dem OC-II-Praktikum danke ich für die Synthese von Vorstufen.

Gerd Lipinski und Peter Mester danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren. Dem Team um Dr. Matthias Letzel danke ich für die Aufnahme der Massenspektren sowie die Unterstützung bei der MALDI-ToF MS-Analytik.

Dr. Ulrich Neuert danke ich für die Hilfe bei Computer- und Netzwerkproblemen.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, ohne deren fortwährende Unterstützung weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
AMINOSÄURENNOMENKLATUR	VII
1 EINLEITUNG	1
2 ALLGEMEINER TEIL	3
2.1 AMINOSÄUREN, PEPTIDE, PROTEINE	3
2.1.1 <i>Aminosäuren</i>	3
2.1.2 <i>Peptide und Proteine</i>	17
2.1.3 <i>Peptidsynthese</i>	23
2.1.4 <i>Peptide mit b-Aminosäuren</i>	36
2.1.5 <i>Naturstoffe mit b-Aminosäuren</i>	39
2.1.6 <i>b-Aminosäuren in cyclischen Peptiden</i>	43
2.1.7 <i>Biologische Stabilität</i>	49
2.2 INTEGRINE.....	51
2.2.1 <i>Aufbau und Struktur</i>	51
2.2.2 <i>Zellerkennungssequenzen</i>	54
2.3 ADAMs.....	57
2.3.1 <i>Aufbau</i>	57
2.3.2 <i>Funktionen</i>	58
2.4 MOLECULAR MODELING	61
2.4.1 <i>Kraftfelder</i>	62
2.4.2 <i>Verfahren zur Durchsuchung des Konformationsraums</i>	64
2.5 NMR-SPEKTROSKOPIE.....	67
2.5.1 <i>Theoretischer Hintergrund</i>	67
2.5.2 <i>Konformationsrelevante Parameter</i>	74
2.6 KONFORMATIONSANALYSE	80
3 AUFGABENSTELLUNG.....	81
4 SPEZIELLER TEIL	83
4.1 SYNTHESE DER β -AMINOSÄUREN.....	83
4.1.1 <i>Konformationelle Einschränkungen in b-Aminosäuren</i>	83

4.1.2	<i>Synthesekonzept für 2-Aminocycloalkancarbonsäuren</i>	84
4.2	DESIGN SELEKTIVER ANTAGONISTEN.....	91
4.2.1	<i>Methode des spatial screening</i>	91
4.2.2	<i>Bevorzugte Position von Aminosäuren in Sekundärstrukturen</i>	92
4.3	VCAM-1 UND DAS INTEGRIN $\alpha_4\beta_1$	94
4.3.1	<i>Liganden und Bindungsstellen</i>	94
4.3.2	<i>Peptidische Liganden auf Basis der Bindungsregion des VCAM-1</i>	97
4.3.3	<i>Synthese der Peptide</i>	99
4.4	ADAM 8.....	109
4.4.1	<i>Auftreten und Funktion</i>	109
4.4.2	<i>Syntheseziele und Strategie</i>	109
4.4.3	<i>Ergebnisse erster biologischer Tests</i>	114
4.5	NMR-SPEKTREN.....	115
4.5.1	<i>Zuordnung der Signale</i>	115
4.5.2	<i>Bestimmung konformationsrelevanter Parameter</i>	117
4.6	KONFORMATIONSANALYSE VON ANALOGA DER ERKENNUNGSREGION DES VCAM-1 120	
4.6.1	<i>Pentapeptide</i>	120
4.6.2	<i>Hexapeptide</i>	133
4.7	KONFORMATIONSANALYSE VON PEPTIDEN AUS MADAM 8.....	143
4.7.1	<i>Konformationelle Daten aus den NMR-Untersuchungen</i>	143
4.7.2	<i>c-(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK2</i>	145
4.7.3	<i>c-(-Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK3</i>	147
4.7.4	<i>c-(-Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK4</i>	148
5	ZUSAMMENFASSUNG	151
6	EXPERIMENTELLER TEIL	155
6.1	GERÄTE.....	155
6.2	LÖSUNGSMITTEL UND CHEMIKALIEN.....	157
6.3	AMINOSÄURESYNTHESE.....	158
6.3.1	<i>(1R,2S)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²</i>	158
6.3.2	<i>(1S,2S)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²</i>	164
6.3.3	<i>(1R,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²</i>	167
6.3.4	<i>(1S,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²</i>	173

6.4	PEPTIDSYNTHESE –ALLGEMEINE ARBEITSBESCHREIBUNG	176
6.4.1	<i>Beladung des 2-Chlortritylharzes</i>	<i>176</i>
6.4.2	<i>Spektralphotometrische Beladungsbestimmung.....</i>	<i>176</i>
6.4.3	<i>Manuelle Abspaltung der Fmoc-Gruppe.....</i>	<i>176</i>
6.4.4	<i>Synthese des linearen Peptids</i>	<i>176</i>
6.4.5	<i>Abspalten vom Harz</i>	<i>178</i>
6.4.6	<i>Cyclisierung</i>	<i>178</i>
6.4.7	<i>Abspalten der permanenten Schutzgruppen.....</i>	<i>178</i>
6.5	PEPTIDSYNTHESE –MALDI-ToF MS, HPLC, AUSBEUTEN	179
6.5.1	<i>C-terminale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1 - Hexapeptide</i>	<i>179</i>
6.5.2	<i>C-terminale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1 - Pentapeptide</i>	<i>179</i>
6.5.3	<i>Zentrale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1</i>	<i>179</i>
6.5.4	<i>N-terminale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1.....</i>	<i>180</i>
6.5.5	<i>Peptide mit dem Bindungsepitop von mADAM 8.....</i>	<i>181</i>
7	ANHANG	183
7.1	NMR-SPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN	183
7.2	NMR-ZUORDNUNG	184
7.2.1	<i>Tabellen der ¹H-NMR-Daten</i>	<i>184</i>
7.2.2	<i>Tabellen der ¹³C-NMR-Daten</i>	<i>190</i>
7.3	ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR DIE KONFORMATIONSANALYSE	192
7.4	ATOMABSTÄNDE (AUS NOES BZW. DURCH MD).....	193
7.5	VERZEICHNIS DER TORSIONSWINKEL	197
7.6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	199
7.7	VERZEICHNIS DER REAKTIONSSCHEMATA.....	202
7.8	TABELLENVERZEICHNIS	203
8	LITERATURVERZEICHNIS	205

Abkürzungsverzeichnis

ACAC	Aminocycloalkancarbonsäure
AMBER	<i>Assisted model building with energy refinement</i>
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotrizolol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat
br	breit (IR, NMR)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CHARMm	<i>Chemistry of Harvard macromolecular mechanics</i>
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
δ	Chemische Verschiebung
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DG	Distanzgeometrie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DQF	Doppelquantenfilter
FID	<i>Free Induction Decay</i>
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FT	Fourier Transformation
GC	Gaschromatographie
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)(1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl)methylen]- <i>N</i> - methylmethanaminium <i>N</i> -oxid hexafluorophosphat
HBTU	<i>N</i> -[(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium <i>N</i> -oxid hexafluorophosphat
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOAt	7-Aza-1-hydroxy-1,2,3-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1,2,3-benzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IR	Infrarot
J	Skalare Kopplungskonstante
m	mittel (IR)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation</i>
MALDI-ToF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of flight MS</i>
MD	Moleküldynamik
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute

MM	Molekülmechanik
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and Exchange spectroscopy</i>
ns	<i>Number of scans</i>
p	primär
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
ppb	<i>Parts per billion</i>
ppm	<i>Parts per million</i>
PyAOP	7-Aza-1,2,3-benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	1,2,3-Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP	Brom-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
q	quartär, Quartett
RMD	<i>Restrained Molecular Dynamics</i>
ROE	<i>Rotation frame Overhauser effect</i>
ROESY	<i>Rotation frame Overhauser effect spectroscopy</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography</i>
s	sekundär, Singulett (NMR); stark (strong, IR)
SA	<i>Simulated annealing</i>
SAMP	(S)-(-)-2-Methoxymethylaminopyrrolidin (Enders-Reagenz)
sw	Spektrale Breite (<i>Spectral wide</i>)
t	tertiär, Triplett
TBTU	<i>N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium tetrafluoroborat N-oxid</i>
td	Time domain (Anzahl Datenpunkte FID)
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TOCSY	<i>Total correlated spectroscopy</i>
ToF	<i>Time of flight</i>
Trt	Trityl; Triphenylmethyl
UV	Ultraviolett
vs	sehr stark (<i>very strong</i> , IR)
w	schwach (<i>weak</i> , IR)

Aminosäurennomenklatur

Tabelle 1: Verzeichnis der Aminosäuren und ihrer Abkürzungen

IUPAC-Nomenklatur	Einbuchstabencode	
Abu		2-Aminobuttersäure
ACHC		2-Aminocyclohexancarbonsäure
ACPC		2-Aminocyclopentancarbonsäure
Aib		Aminoisobuttersäure
Ala	A	Alanin
AMBS		2-Aminomethylbutansäure
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
HyLeu		Hydroxyleucin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Orn		Ornithin
Phe	F	Phenylalanin
Pip		Pipecolinsäure
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin
Xaa	X	unspezifische α -Aminosäure
MeXaa		Unspezifische N-Methyl-Aminosäure
β -HXaa	β HX	unspezifische β -Homoaminosäure
β -Xaa	β X	unspezifische β -Aminosäure

1 Einleitung

In der Chemie kommt dem Bereich der Naturstoffe ein großes Interesse zu. Proteine, Zucker und Nucleotide sind Bestandteile der Organismen, die durch die Verknüpfung einfacher Bauelemente zu komplexen Strukturen entstehen. Sie stellen die Basis für den Aufbau, die Proliferation und die Degeneration von Zellen dar.

Die Grundlage vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ist die molekulare Erkennung auf der Basis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Neben der Isolierung der beteiligten Partner ist die genaue Kenntnis über die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand von essentieller Wichtigkeit für das Verständnis dieser Prozesse. Die biologische Wirkung ist oftmals auf einen sehr kleinen räumlichen Bereich, die Erkennungsregion, begrenzt. Neben der Konstitution hat sich die Konfiguration als entscheidender Parameter herausgestellt.

Die Aufklärung der Struktur biologisch aktiver Konformationen ist im Rahmen der Auffindung neuer potentieller Medikamente von entscheidender Bedeutung. Die Methode der Röntgenstrukturanalyse liefert hier zwar wichtige Beiträge, jedoch spielen im Kristall Packungseffekte eine mitentscheidende Rolle für die Konformation, so dass die gewonnenen Erkenntnisse nicht direkt auf die Verhältnisse in biologischen Systemen (also in Lösung) übertragen werden können. Die notwendige Aufklärung von Lösungsstrukturen ist daher ein wichtiges Ziel in der heutigen Zeit.

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins in Lösung gelingt durch die kernmagnetische Resonanz (NMR). R. Ernst (Nobelpreis 1991) und K. Wüthrich (Nobelpreis 2002) lieferten entscheidende Pionierarbeiten, so dass in der heutigen Zeit routinemäßig die Struktur von Proteinen bis zu einem Molekulargewicht von 30 kDa aufgeklärt werden kann. Die erhaltenen Daten werden in der Regel als Randbedingungen für Molekulardynamik-Simulationen verwendet.

Auf der Basis des Schlüssel-Schloss-Prinzips von Emil Fischer und der Weiterentwicklung dieses Modells durch Koshland, der 1958 den Begriff des *induced fit* einführte, wird deutlich, dass die Struktur des Rezeptors von entscheidender Bedeutung für die Interaktion ist, andererseits die Lösungsstruktur jedoch nicht zwangsläufig mit der biologisch aktiven Konformation übereinstimmen muss.

Die Verwendung cyclischer Peptide, die die Erkennungsregion präsentieren, hat sich als weiteres geeignetes Mittel zur Aufklärung der biologisch aktivsten Konformation herauskristallisiert, da hier ein verhältnismäßig einfacher Zugang möglich ist, ohne die Struktur großer Proteine aufzuklären. Einbau geeigneter *turn*-induzierender Reste ermöglicht die

gezielte Darstellung unterschiedlicher Geometrien der Erkennungsregion. Durch die Bestimmung der biologischen Aktivität dieser unterschiedlich präsentierter Erkennungssequenzen gelingt so der Aufschluss über die aktivste biologische Konformation. Diese kann dann als Leitstruktur für die Herstellung von Medikamenten dienen, die beispielsweise bezüglich der Bioverfügbarkeit andere Anforderungen haben, als dies bei cyclische Peptiden der Fall ist.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Synthese und Konformationsanalyse cyclischer Peptide. Dabei sollen anhand der Erkennungssequenzen unterschiedlicher Liganden der *turn*-induzierende Einfluss konformationell eingeschränkter β -Aminosäuren ermittelt werden und zusammen mit parallel dazu stattfindenden biologischen Tests Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Aminosäuren, Peptide, Proteine

2.1.1 Aminosäuren

2.1.1.1 α -Aminosäuren

Proteine sind die häufigsten und vielfältigsten Makromoleküle in lebenden Zellen. Ihr Name leitet sich vom griechischen „protos“ ab, was so viel wie „erstes“, „an erster Stelle“ bedeutet. Sie treten in allen Zellen und Zellteilen auf und erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben und Funktionen wie Katalyse (als Enzyme), Transport von Molekülen, Nahrungsaufnahme, Bewegungsfähigkeit von Zellen, Strukturbildung (z. B. Keratin, das Strukturprotein in Haaren, Nägeln, Wolle oder Federn), Abwehr (z. B. als Antikörper) oder Regulation (als Hormone). Sie sind das Endprodukt des Informationsflusses, die Instrumente, durch die genetische Information umgesetzt wird.¹ Trotz ihrer Vielfalt lassen sich alle Proteine auf die gleichen, relativ einfach gebauten monomeren Untereinheiten zurückführen, die Aminosäuren. Alle Proteine, seien sie aus den ältesten bekannten Bakterien oder den menschlichen Zellen, lassen sich auf den gleichen Satz von 22 proteinogenen Aminosäuren zurückführen, die kovalent zu charakteristischen linearen Sequenzen verknüpft sind. Als proteinogen werden solche Aminosäuren bezeichnet, die durch den genetischen Code festgelegt sind und ohne Modifikationen direkt ribosomal in Proteine eingebaut werden. Die erste in Proteinen entdeckte Aminosäure war das Asparagin (1806). Aminosäuren werden mit Trivialnamen bezeichnet, die sich oft aus dem ersten Fundort herleiten lassen (Asparagin in Spargel, (*asparagus*, lat.), Tyrosin in Käse (*tyros*, gr.)). Der menschliche Organismus kann biosynthetisch eine Reihe von Aminosäuren aus verschiedenen Vorstufen synthetisieren, andere Aminosäuren sind essentiell, d. h. müssen mit der Nahrung aufgenommen werden.

Alle proteinogenen Aminosäuren besitzen eine Carboxy- und eine Aminogruppe, die an das selbe Kohlenstoffatom (das α -Kohlenstoffatom) gebunden sind. Sie unterscheiden sich durch ihre Seitenkette R, die in Struktur, Größe, Polarität und Ladung variiert. Unterschieden werden Aminosäuren mit unpolaren, aliphatischen Seitenketten (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro), mit aromatischen Seitenketten (Phe, Tyr, Trp), mit polaren, ungeladenen Seitenketten (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Met), mit negativ geladenen Seitenketten (Asp, Glu) sowie solche mit positiv geladenen Seitenketten (Lys, Arg, His). Ausgehend vom α -Kohlenstoffatom bezeichnet man die weiteren Kohlenstoffe der Seitenkette mit β , γ , δ , ϵ etc.² Alle α -Aminosäuren mit Ausnahme des Glycins besitzen ein asymmetrisches α -Kohlenstoffatom, das heißt, es besitzt

vier unterschiedliche Substituenten. Dies führt dazu, dass die Aminosäuren in zwei Enantiomeren vorliegen können. In der Natur kommt im allgemeinen nur die L-Form (für linksdrehend, von *levo*) der Aminosäure vor. Lediglich in den Zellwänden einiger Bakterien sowie in Peptidantibiotika finden sich D-Aminosäuren (von rechtsdrehend, *dextro*). D und L stehen hierbei für die absolute Konfiguration der vier Substituenten am asymmetrischen Kohlenstoffatom und beziehen sich auf die Referenzverbindung Glycerinaldehyd, den kleinsten Zucker mit einem asymmetrischen Zentrum. In der Cahn-Ingold-Prelog-Nomenklatur entspricht die L-Aminosäure der (*S*)-Konfiguration (einzige Ausnahme: Cystein; hier hat die L-Form (*R*)-Konfiguration).

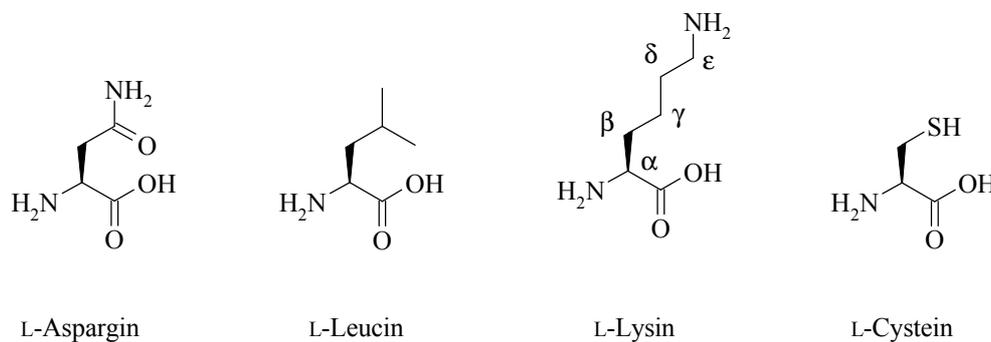


Abbildung 1: Struktur und Konformation einiger L-Aminosäuren

Erst in jüngerer Zeit gelang es mittels chemischer Peptidsynthese, aus D-Aminosäuren die enantiomerenreinen D-Peptide und D-Proteine zu synthetisieren. Neben dem akademischen Interesse an diesen Verbindungen haben sie auch therapeutisches Potential, da sie sich nicht durch zelleigene Peptidasen und Proteasen spalten lassen.¹ Neben den codierten Aminosäuren findet sich noch eine ganze Reihe anderer Aminosäuren in Proteinen. Sie entstehen durch chemische Modifikation, die nach dem Einbau in Proteine erfolgt. Als Beispiel sind hier das 4-Hydroxyprolin (in der Pflanzenzellwand und in Kollagen), das 5-Hydroxylysin (im Kollagen), das *N*-Methyllysin (im Myosin) oder das γ -Carboxyglutamat (im Prothrombin) zu nennen.

2.1.1.2 β -Aminosäuren

Neben den α -Aminosäuren finden sich in einigen wenigen Naturstoffen auch β -Aminosäuren.³ Sie können als Derivate des β -Alanins betrachtet werden. Während bei diesen Verbindungen die Aminogruppe formal zum β -Kohlenstoff verschoben wird, findet man auch Homoaminosäuren, bei denen eine zusätzliche Methylengruppe eingeführt ist und auch die Kombination dieser beiden Verfahren, die sogenannten β -Homoaminosäuren sind bekannt. Man unter-

scheidet zwischen β^2 -, β^3 - und $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren, abhängig von der Stellung der Substituenten.

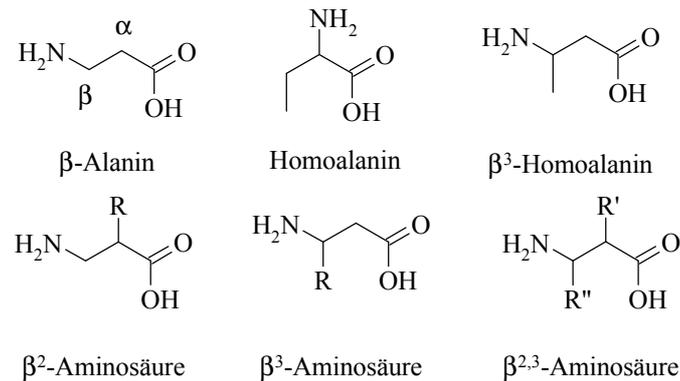


Abbildung 2: Unterschiedliche Typen von β -Aminosäuren

Die Aminogruppe der β -Aminosäuren ist stärker basisch als die ihrer α -Homologen, die Carboxygruppe dagegen schwächer sauer.⁴ In freier Form zeigen β -Aminosäuren interessante pharmakologische Effekte. So führt die orale Gabe von Emeriamin bei Ratten zu Hypoglykämie.^{5,6} Steglich et al.^{7,8} zeigten, dass (*R*)- β -Dopa (3,4-Dihydroxy- β -phenylalanin) im Pilz *Cortinarius violaceus* am Eisen^{III}-Catechol-Komplex beteiligt ist, der dem Pilz die charakteristische blau-violette Farbe gibt.

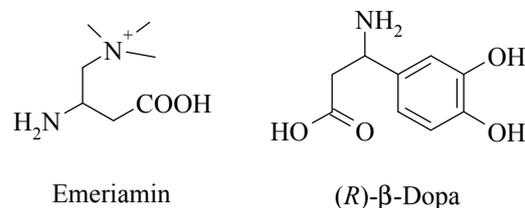


Abbildung 3: Natürlich vorkommende β -Aminosäuren mit pharmakologischen Effekten

Darüber hinaus sind β -Aminosäuren wichtige Synthesestufen für β -Lactame, die wegen ihrer potentiellen biologischen Aktivität vielversprechend sind. Als Beispiel seien hier die β -Lactam-Antibiotika genannt, zu denen das Penicillin gehört.

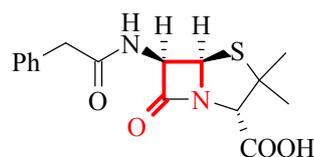


Abbildung 4: Penicillin G

In den letzten Jahrzehnten ist die stereoselektive Synthese der β -Aminosäuren zu einem

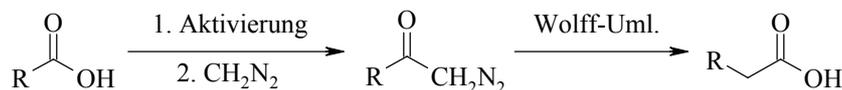
umfangreichen Forschungsgebiet herangewachsen. Zahlreiche Übersichtsartikel^{4,9-11} und Monographien³ zu diesem Thema sind erschienen und geben einen Überblick über die unterschiedlichen Synthesewege. Liu und Sibi¹⁰ unterscheiden acht Syntheseansätze:

1. Der *chiral pool* Ansatz: Nutzung enantiomerenreiner α -Aminosäuren

Hierbei sind zwei wichtige Verfahren zu nennen:

a) Die Arndt-Eistert Homologisierung¹²

Diese Methode wird zur Verlängerung von Carbonsäuren um einen Kohlenstoff benutzt. Als große Vorteile dieser Methode sind die geringen Kosten und das Vorhandensein enantiomerenreiner Ausgangsmaterialien (α -Aminosäuren) zu nennen. Bei dieser Methode werden Carboxygruppen aktiviert, anschließend mit Diazomethan homologisiert und das entstandene Diazoketon in einer Wolff-Umlagerung mit Ketenhydrolyse zur Homocarbonsäure umgesetzt.

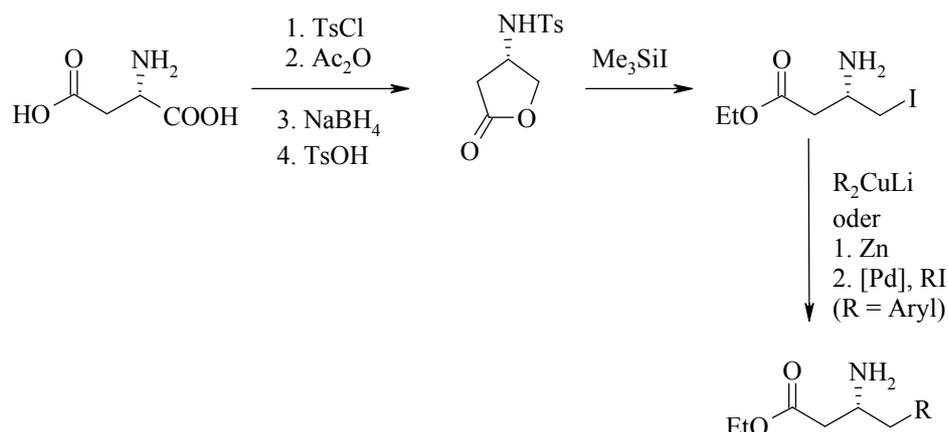


Schema 1: Arndt-Eistert-Homologisierung

Seebach et al.¹³ nutzten diese Methode zur Homologisierung von *N*-geschützten Aminosäuren unter Verwendung von Chlorkohlensäureethylester als Aktivierungsreagenz (Bildung des gemischten Anhydrids). Die Wolff-Umlagerung wird hierbei mit UV-Licht oder Silberbenzoat initiiert. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass basenlabile Schutzgruppen wie Fmoc unter den gewählten Bedingungen nicht stabil sind. Um auch Fmoc-geschützte Derivate homologisieren zu können, entwickelten Sewald et al.¹⁴ eine basenfreie Methode der Kettenverlängerung. Hierbei wird die Aktivierung analog zur Vorschrift von Seebach durchgeführt, die Wolff-Umlagerung erfolgt jedoch ohne Base in Gegenwart von Silber(I)salzen im Ultraschallbad innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur in moderaten bis guten Ausbeuten.

b) Asparaginsäure oder Asparagin als Edukt

Asparaginsäure und Asparagin als natürlich vorkommende α -Aminosäuren besitzen ein β -Aminocarbonsäure-Fragment, das sie zu einem vielversprechenden Edukt für die Synthese unterschiedlicher β -Aminosäuren macht. So gelingt es nach Jefford et al.¹⁵ und Dexter et al.¹⁶ ausgehend von Aspartat eine ganze Serie von unterschiedlichen β^2 -Aminosäuren über das 3-(*N*-Tosylamino)butyrolacton darzustellen.



Schema 2: β^2 -Aminosäuren aus Aspartat als Edukt

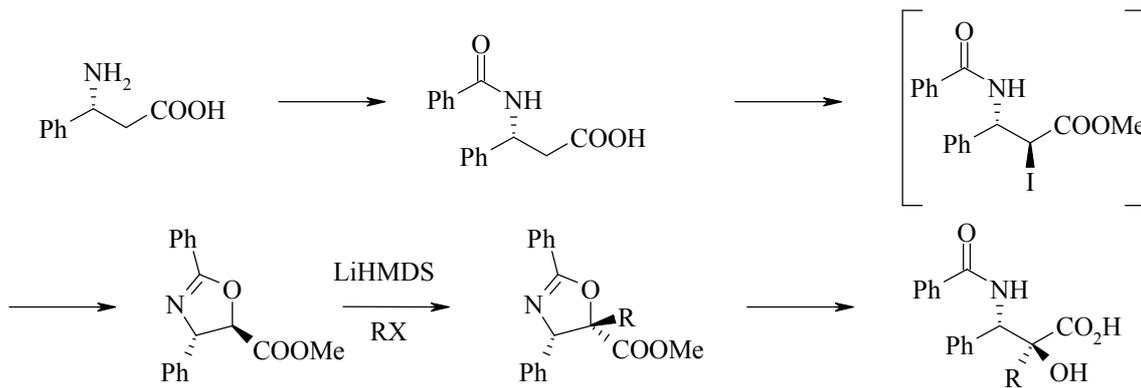
2. Die Enantiomerentrennung von β -Aminosäuren

Bei Nutzung der diversen Verfahren der racemischen Synthese werden Gemische der beiden Isomeren erhalten. Dies ist jedoch nicht von Nachteil, da beide Enantiomere potentielle Einsatzbereiche haben. Zur Trennung sind unterschiedliche Verfahren zur Anwendung gekommen. Am längsten bekannt ist das Verfahren der fraktionierten Kristallisation, das in seinen Ursprüngen auf die Trennung der Weinsäure-Enantiomere durch Emil Fischer zurückzuführen ist. Hierbei werden die Racemate mit chiralen Auxiliaren zu Diastereomerenpaaren umgesetzt, von denen dann eines durch Kristallisation in geeigneten Lösungsmitteln angereichert werden kann. Als Auxiliar fungieren z. B. Ephedrin¹⁷, Wein-, Mandel- oder Camphersulfonsäure.¹⁸ Modernere Verfahren nutzen die enzymatische Spaltung, wie sie schon von den α -Aminosäuren bekannt ist. Bedeutung haben vor allem Hydrolasen, die selektiv ein Enantiomer spalten. Oft tolerieren diese Enzyme auch β -Aminosäuren als Substrate.¹⁹ Kanerva und Fülöp et al.²⁰ nutzen *Pseudomonas cepacia* Lipase PS und *Candida antarctica* Lipase A zur selektiven Amidbildung von 10 verschiedenen cyclischen β -Aminosäuren mit Trifluoressigsäure, wobei die (*R*)-Substrate selektiv *N*-acetyliert werden, während die (*S*)-Substrate als freie Aminosäuren abgetrennt werden können.

3. Funktionalisierte β -Aminosäure-Derivate

Aus einfach substituierten β -Aminosäure lassen sich durch geeignete Methoden stereoselektiv anspruchsvollere Derivate gewinnen. So gelingt nach Cardillo et al.^{21,22} durch Umsetzen von enantiomerenreinem β -Phenylalanin zum *trans*-Oxazolin mit nachfolgender stereoselektiver Alkylierung die Synthese von substituierten α -Hydroxy- β -aminosäuren, an denen hohes

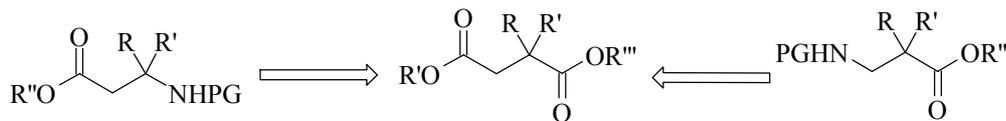
pharmazeutisches und medizinisches Interesse besteht.²³



Schema 3: Synthese substituierter α -Hydroxy- β -aminosäuren

4. Die Curtius-Umlagerung

Funktionalisierte Succinate lassen sich durch Curtius-Umlagerungen selektiv in β -Aminosäuren verwandeln. Um stereoselektiv arbeiten zu können, ist es jedoch notwendig, nur eine der beiden Carboxygruppen in eine Aminogruppe umzuwandeln.



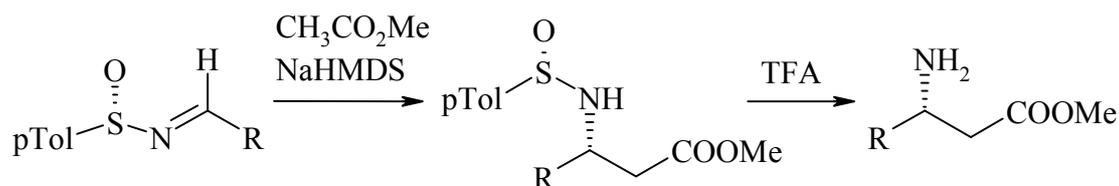
Schema 4: Unterschiedlich substituierte β -Aminosäuren durch Curtius-Umlagerung

Sibi und Deshpande²⁴ nutzten diese Methode zur Synthese von 2-Methyl-3-aminopropansäure, einem Fragment des Cryptophycins, indem sie mono-*tert*-Butylgeschütztes 2-Methylsuccinat einer Curtius-Umlagerung unterwarfen. Unterschiedliche Alkylierungsmittel und Schutzgruppenstrategien eröffnen den Weg zu einer Vielzahl von β^2 - und β^3 -Aminosäuren.

5. Addition an Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindungen

Liu und Sibi unterscheiden bei dieser Methode die Addition von Enolaten, Silylenolaten oder Reformatzky-Edukten an Imine sowie die Addition von Kohlenstoffnucleophilen an Nitrone oder Oxime.

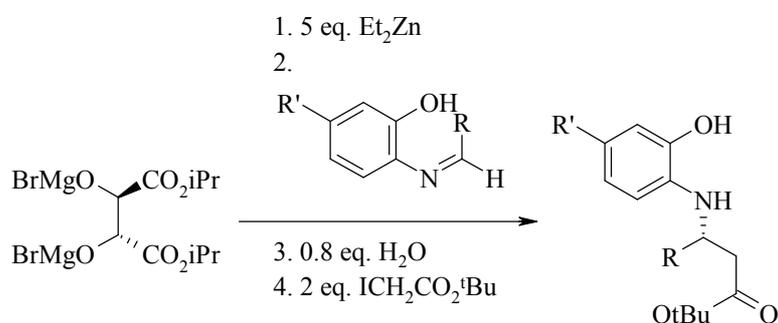
Bei der Addition von Enolaten an Imine finden oft Sulfoxide als chirale Auxiliare Anwendung. Davis et al.^{25,26} gelang in guten bis sehr guten enantiomeren Überschüssen die Synthese 2-Aryl-substituierter β -Alanine.



Schema 5: Addition von Enolaten an Imine

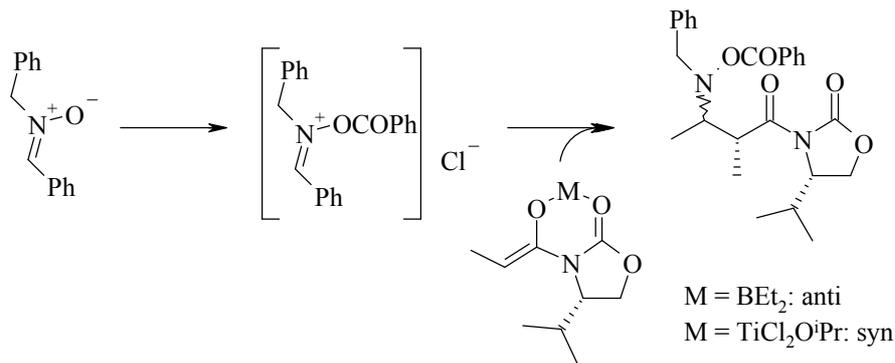
Die Addition von Silylenolaten an Imine gelingt oft besser, da die Iminofunktionalität nur geringe Electrophilie aufweist und α -Deprotonierung zur Ausbildung von Enaminen führen kann. Um diese Nachteile zu umgehen, empfiehlt sich der Einsatz vorgeformter Enolate in Form von Silyl-Enolethern. Waldmann et al.²⁷ zeigten, dass mit Aminosäurechloriden aktivierte Imine von Silylenolethern nucleophil angegriffen werden können, wobei in guten diastereomeren Überschüssen unterschiedlichste mehrfachsubstituierte β -Aminosäuren darstellbar sind.

Eine andere Strategie ist die Addition von Reformatzky-Reagenzien an Imine und Schiff-Basen. Ukaji et al.²⁸ nutzen bei dieser Reaktion Diisopropyltartrat als chirales Auxiliar. Das Reformatzky-Reagenz wird *in situ* aus Diethylzink und *tert*-Butyliodoacetat hergestellt und liefert das Produkt in bis zu 98 % ee.



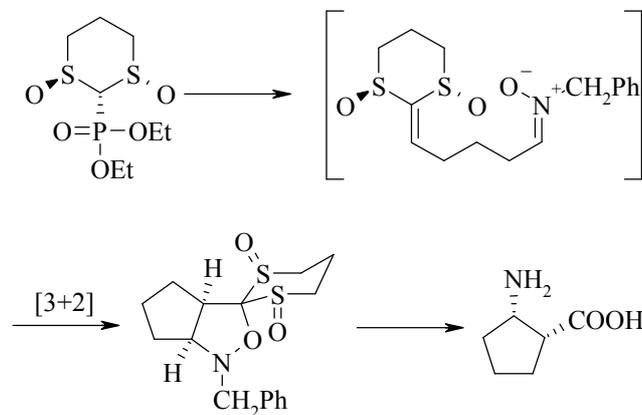
Schema 6: Reformatzky-Reaktion mit chiralem Auxiliar

Im Gegensatz zu den bislang behandelten Doppelbindungen sind Nitrone oder Oxime 1,3-Dipole und dementsprechend einem nucleophilen Angriff leicht zugänglich. Murahashi et al.^{29,30} verwendeten *N*-Acyloxyiminium-Verbindungen als aktivierte Nitron-Äquivalente und unterwarfen sie einer Reaktion mit chiralen Enolaten. Die Verwendung von Bor- bzw. Titanenolaten führt wie erwartet zu unterschiedlichen Stereoisomeren.



Schema 7: Addition von C-Nucleophilen an Nitronäquivalente

Enantiomerenreines Cispentacin wurde von Aggarwal et al.³¹ in einer [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Nitron und einem chiralen Keten-Äquivalent dargestellt.



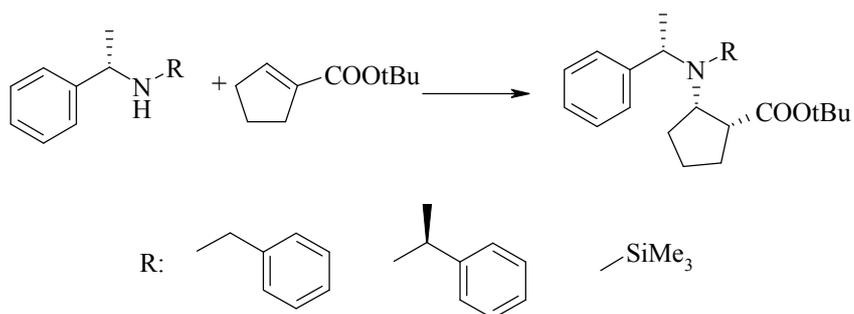
Schema 8: Synthese von Cispentacin durch [3 + 2]-Addition

6. Konjugierte Addition

Drei Wege bieten sich an, um chirale Information bei der konjugierten Addition in das Produkt einzubringen:

a) Addition chirale Nucleophile

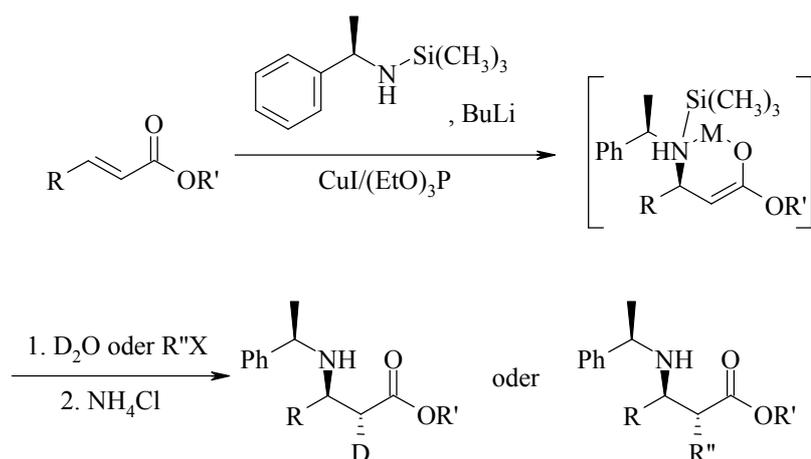
Wichtig sind für diesen Zugang die Lithiumsalze chiraler Amine, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden. Davies et al.³² entwickelten die diastereoselektive 1,4-Addition von unterschiedlich substituierten chiralen Aminen an α,β -ungesättigte Ester.



Schema 9: 1,4-Addition eines chiralen Lithiumamids an einen α,β -ungesättigten Ester

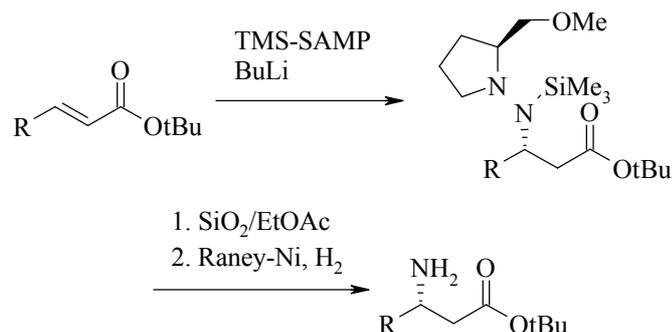
Die Freisetzung der Aminosäure geschieht durch Hydrogenolyse der Schutzgruppen am Stickstoff, so dass diese Methode nicht alle funktionellen Gruppen toleriert.

Mit dem gleichen chiralen Reagenz gelang Sewald et al.^{33,34} in einer Cuprat-Addition ebenfalls der Zugang zu enantiomerenreinen β -Aminosäuren. Abfangen der intermediären Enoate mit D_2O oder Alkylhalogeniden liefert α -deuterierte β -Aminosäuren oder *anti*- α -Alkyl- β -aminosäuren in exzellenter Diastereoselektivität.



Schema 10: Cuprat-Addition chiraler Amine

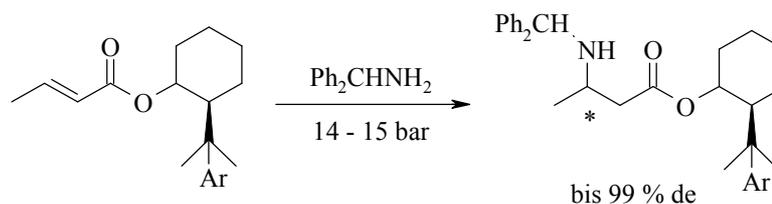
Enders et al.³⁵ beschreiben den Gebrauch des TMS-SAMP-Auxiliars in einer azanalogen Michael-Addition mit hoher Stereoselektivität.



Schema 11: Addition unter Verwendung von TMS-SAMP als chiraalem Reagenz

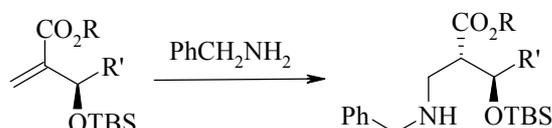
b) Addition achiraler Amine an ein chirales System

Die diastereoselektive Addition von achiralen Nucleophilen an chirale Michael-Akzeptoren ist ein oft verwendetes Prinzip.³⁶ In exzellenter Diastereoselektivität gelang d'Angelo und Mitarbeitern³⁷ die Addition von Diphenylmethanamin an chirale Crotonate, wobei vermutlich die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen für die Selektivität verantwortlich ist.



Schema 12: Addition achiraler Nucleophilen an chirale α,β -ungesättigte Ester

Perlmutter und Tabone³⁸ berichten über die Addition von Benzylamin zur Synthese *anti*- α -substituierter β -Aminoester durch diastereoselektive konjugierte Addition mittels 1,3-asymmetrischer Induktion.

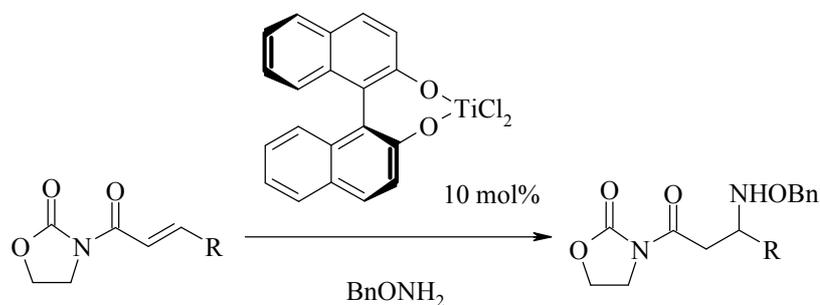


Schema 13: Addition von Benzylamin durch diastereoselektive konjugierte Addition

c) Enantioselective Addition von Aminen

Das erste Beispiel für die enantioselective Addition von Aminen wurde erst 1996 von Falborg und Jørgensen³⁹ gezeigt. Im allgemeinen wird für die Reaktion ein geeigneter Katalysator zugesetzt, der die entsprechende Stereoselektivität im Zielmolekül zu

erzeugen vermag. In Abbildung 5 sind einige gebräuchliche Katalysatoren zu sehen, die in Reaktionen eingesetzt werden. Als Metalle fungieren Zink, Magnesium, Lithium, Kupfer oder Titan-Verbindungen.¹⁰ Im allgemeinen werden die Katalysatoren in 5 bis 30 mol-% in die Reaktion eingebracht. In ausgewählten Beispielen sind so bis zu 97 % ee möglich.



Schema 14: Enantioselektive Addition von Aminen

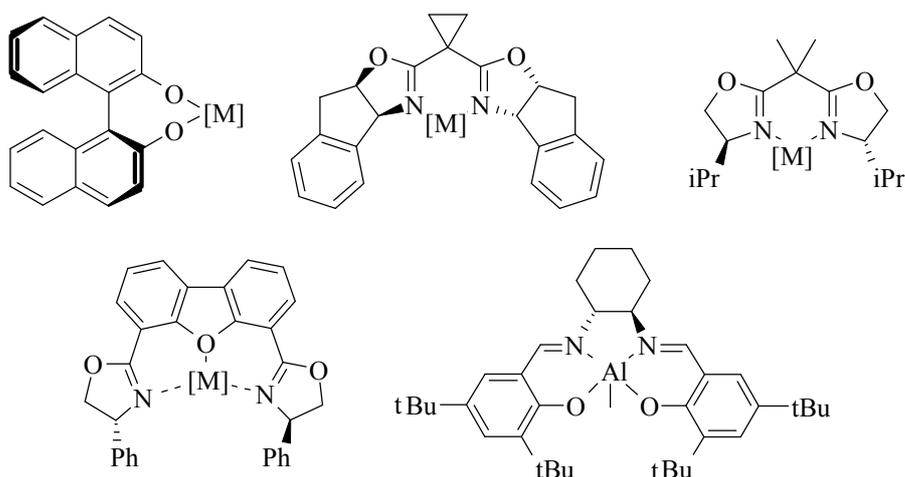
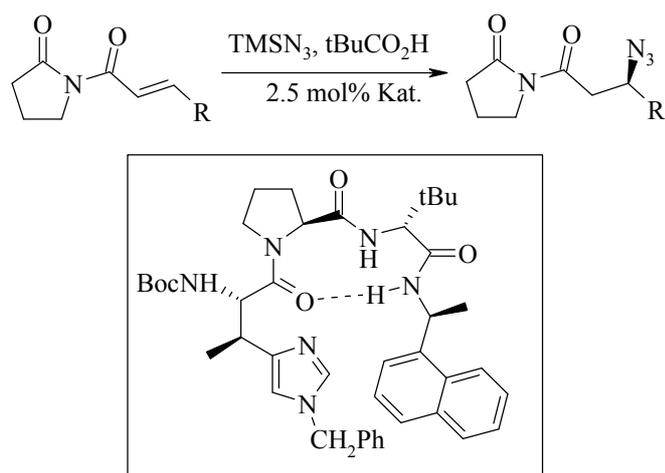


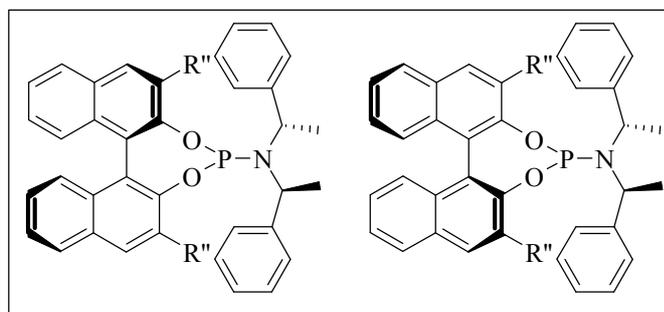
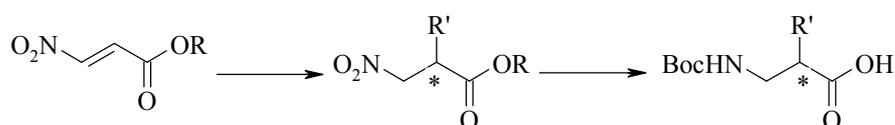
Abbildung 5: Katalysatoren für die enantioselektive Addition

Gebräuchlich ist neben der Einführung von arylgeschützten Aminen auch die Nutzung der Azidgruppe als Syntheseäquivalent für das Amin.⁴⁰ Einen anderen Katalysatoransatz wählten Miller et al.⁴¹⁻⁴³ Sie nutzen ein modifiziertes Tripeptid, das durch einen β -turn stabilisiert wird, zur Azid-Einführung und erhalten in bis zu 92 % ee die geschützten β -Azidocarbonsäuren.



Schema 15: Peptidkatalysierte Azidierung

Rimkus und Sewald⁴⁴ zeigten, dass auch Nitroalkene für die stereoselektive β -Aminosäuresynthese Verwendung finden können. In einer enantioselektiven Cu^{I} -katalysierten Addition von Diethylzinkverbindungen erhält man in guten Ausbeuten und guten bis sehr guten *ee*-Werten β -Nitroester, die durch geeignete Reduktion zu den gewünschten Aminosäuren umgesetzt werden können.

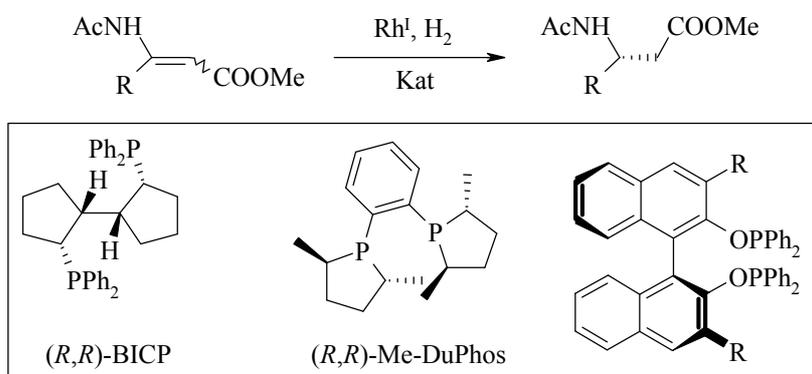


Schema 16: Enantioselektive Addition an Nitroalkene

7. Reduktion von α,β -ungesättigten Estern und Nitrilen

Ein weiterer Weg zur Darstellung von β -Aminosäuren eröffnet sich durch die asymmetrische Hydrierung von Acrylsäuren und Derivaten. Zhang et al.⁴⁵ nutzten für die Rhodium-katalysierte Hydrierung unter hohem Wasserstoffdruck verschiedene Katalysatoren und erhielten akzeptable bis sehr gute Enantiomerenverhältnisse, abhängig von den Substituenten des Acryl-esters. Für β -arylsubstituierte Acrylate fanden Zhang et al.⁴⁶ neue Katalysatoren, die auf Basis

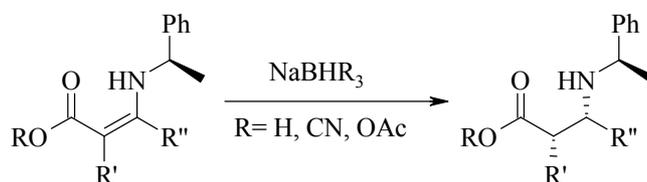
des Binaphthols enantiomerenreine β -Aminosäuren mit bis zu 99 % ee liefern. Ein weiterer Vorteil dieser Klasse von Liganden ist, dass im Gegensatz zu den o. a. Bedingungen auch *E/Z*-Mischungen als Startmaterial toleriert werden und so die Synthese der Edukte vereinfacht wird.



Schema 17: Asymmetrische Hydrierung von Acrylestern

Neben Acrylaten bieten sich auch α,β -ungesättigte Nitrile als Edukte für die Hydrierung an. Allerdings tolerieren diese Verbindungen Substitutionen in β -Position deutlich schlechter, es werden nur geringe ee-Werte erhalten.

Zur Reduktion bietet sich neben der Hydrierung von Doppelbindungen auch die reduktive Aminierung an, die im Stoffwechsel ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Cimarelli und Palmieri⁴⁷ nutzten Natriumtriacetoxyborhydrid zur Synthese von biologisch aktiven β -Aminosäurederivaten wie Cispentacin oder β -Prolinderivaten. Es bildet sich dabei intermediär durch Ligandenaustausch ein optisch aktiver Übergangszustand, der für die hohe Stereoselektivität dieser Umsetzung verantwortlich gemacht wird. Xu et al.⁴⁸ nutzen in einer ähnlichen Methode Natriumborhydrid zur Synthese von *cis*-2-Aminocyclohexancarbonsäuren, Gellman et al.^{49,50} setzten Natriumcyanoborhydrid bei der Synthese pyrimidinkondensierter β -Alaninderivate ein. Sowohl Xu als auch Gellman nutzen allerdings zur Anreicherung der Diastereomere auch Kristallisationsmethoden.

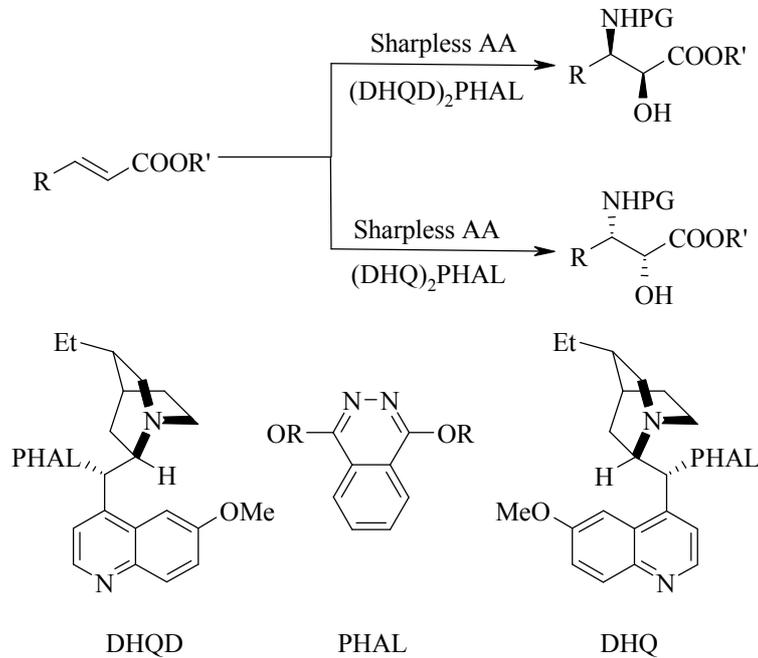


Schema 18: Reduktive Aminierung mit Borhydridkomplexen

8. Die Aminohydroxylierung

Die letzte wichtige Methode zur stereoselektiven Darstellung von β -Aminosäuren ist die

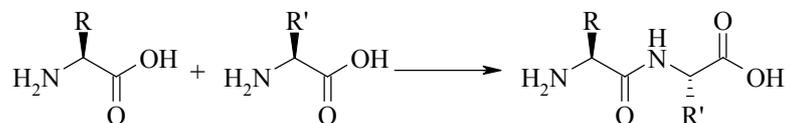
asymmetrische Aminohydroxylierung von Olefinen zu *N*-geschützten Aminoalkoholen nach Sharpless.^{51,52} Nutzt man α,β -ungesättigte Ester für die Aminohydroxylierung, so erhält man die biologisch interessanten *syn*- α -Hydroxy- β -aminosäuren. Verwendung von Dihydrochinidin (DHQD) bzw. Dihydrochinin (DHQ) führt zu entgegengesetzten Stereoisomeren im Produkt.



Schema 19: Sharpless-Aminohydroxylierung

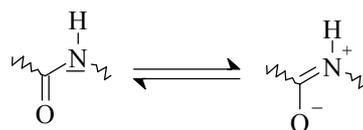
2.1.2 Peptide und Proteine

Aminosäuremoleküle können durch Kondensation verknüpft werden. Dabei wird unter Wasserabspaltung eine Bindung zwischen dem Carboxyl-Kohlenstoff der einen und dem Stickstoff der anderen Aminosäure geknüpft.



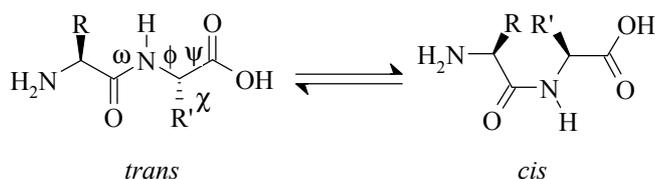
Schema 20: Ausbildung einer Peptidbindung

Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass die Länge dieser Peptidbindung mit durchschnittlich 132 pm deutlich kürzer ist als eine C-N-Einfachbindung (146 pm). Außerdem ist die Einheit (CO)-NH coplanar, d. h. die Atome liegen in einer Ebene. Das weist darauf hin, dass das freie Elektronenpaar nicht vollständig am Stickstoff lokalisiert ist, sondern dass die Amidbindung einen gewissen Doppelbindungscharakter hat, der zu einer eingeschränkten Drehbarkeit führt.



Schema 21: Mesomerie der Peptidbindung

Bedingt durch diese eingeschränkte Drehbarkeit gibt es zwei Orientierungsmöglichkeiten der Peptidbindung, die mit *cis* und *trans* bezeichnet werden. Als Folge gibt es nur zwei mögliche Torsionswinkel ω . Die weiteren Torsionswinkel des Peptidrückgrats werden mit ϕ und ψ bezeichnet, Torsionswinkel in der Seitenkette werden mit χ bezeichnet.



Schema 22: Unterschiedliche Orientierungsmöglichkeiten der Peptidbindung

2.1.2.1 Strukturen in Peptiden und Proteinen

Proteine sind oft aus Hunderten von Aminosäuren und damit aus vielen hundert Bindungen zusammengesetzt. Besäße nur ein Bruchteil dieser Bindungen die volle Rotationsfreiheit, könnten Proteine eine beinahe unendliche Anzahl von dreidimensionalen Strukturen einnehmen. Proteine haben jedoch spezifische chemische oder strukturgebende Funktionen, so dass davon auszugehen ist, dass jedes Protein eine einzigartige räumliche Struktur aufweist. Für die Proteinfaltung gibt es eine Reihe von Grundsätzen:

1. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch seine Aminosäuresequenz bestimmt. Allerdings werden sogenannte Proteinfamilien unterschieden, d. h. Proteine mit ähnlicher Struktur (und oft auch Funktion) haben keine komplett gleiche Sequenz. So sind schätzungsweise 20 bis 30 % aller menschlichen Proteine polymorph, d. h. die Aminosäuresequenz variiert in der menschlichen Bevölkerung. Viele dieser Variationen haben aber wenig oder keinen Einfluss auf Struktur und Funktion des Proteins.
2. Die Funktion des Proteins hängt von seiner dreidimensionalen Struktur und damit auch von der Aminosäuresequenz ab. Proteine enthalten Substrukturen, die für ihre biologische Funktion unerlässlich sind. Hier tauchen oft invariante Reste auf, die zum Beispiel für das aktive Zentrum eines Enzyms von entscheidender Bedeutung sind.
3. Die Stabilisierung der Struktur erfolgt in erster Linie durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, London-Kräfte, Dipol-Dipol- oder elektrostatische Wechselwirkungen.

Vier Strukturebenen beschreiben den Aufbau von Proteinen. Die Primärstruktur ist durch die Sequenz der Aminosäuren gegeben, sie beschreibt jedoch nicht die relative räumliche Anordnung der miteinander verknüpften Aminosäuren. Polypeptidketten können nicht jede beliebige Struktur annehmen. Sterische Zwänge und eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen bedingen, dass einige Anordnungen stabiler sind als andere. Unter der Sekundärstruktur wird die regelmäßige, periodisch auftretende räumliche Anordnung benachbarter Aminosäureketten verstanden. Als Tertiärstruktur wird die räumliche Beziehung aller Aminosäuren einer Polypeptidkette bezeichnet, also die komplette dreidimensionale Struktur. Besitzen Proteine mehrere Untereinheiten, so wird die räumliche Anordnung der einzelnen Polypeptidketten als Quartärstruktur bezeichnet.

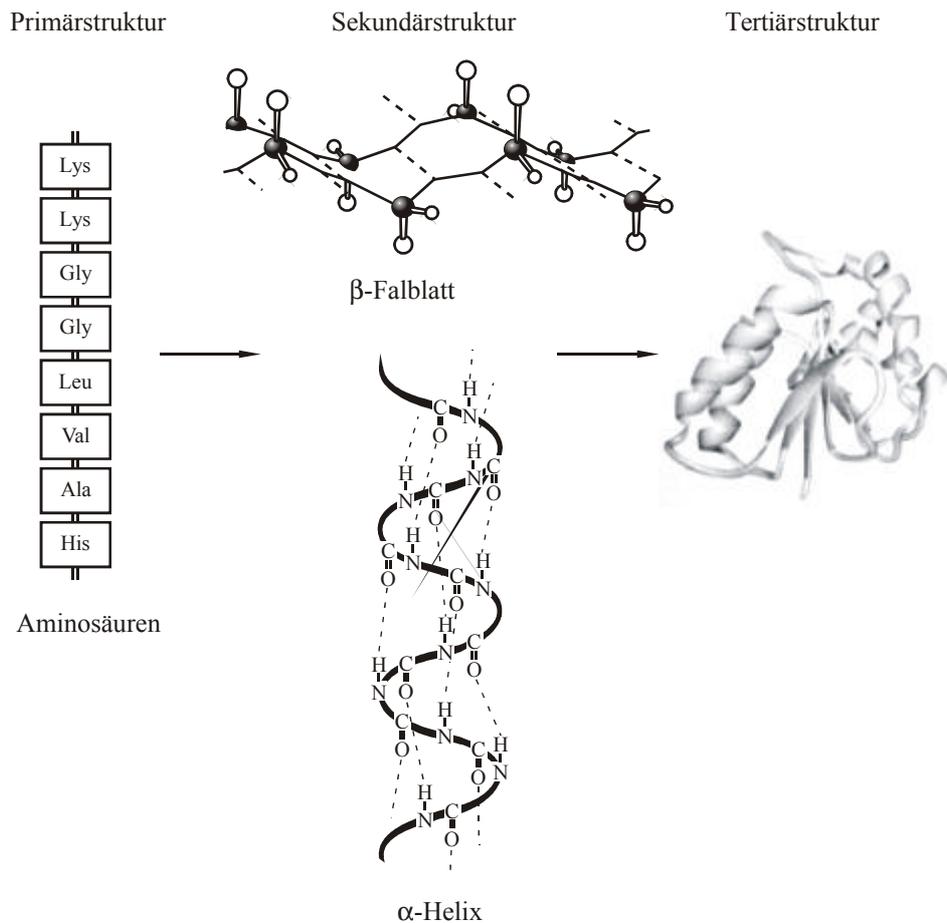


Abbildung 6: Die einzelnen Strukturebenen eines Proteins

Für die Struktur von Proteinen gibt es zwei einfache Regeln, die für die meisten Vertreter gelten. Lediglich für einige unlösliche Proteine und Membranproteine gibt es modifizierte Regeln, dennoch sind auch hier die schwachen Wechselwirkungen für die Struktur entscheidend.

1. Hydrophobe Reste müssen im Protein-Inneren, möglichst abseits vom umgebenden Wasser verborgen sein.
2. Es wird die maximal mögliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet.

Einige Sekundärstrukturen sind besonders stabil und finden sich häufig in Peptiden und Proteinen. Die α -Helix als bekannteste Sekundärstruktur wurde bereits von L. Pauling und R. Corey zu Beginn der 1950er Jahre vorhergesagt. Die Ausbildung von Helices wird in Peptiden erst ab einer gewissen Mindestgröße (ca. 15 Aminosäuren) beobachtet. Eine Helix ist dadurch gekennzeichnet, dass die charakteristischen Torsionswinkel ϕ und ψ aufeinanderfolgender Aminosäuren des Peptidrückgrats jeweils gleiche Werte annehmen. Im Falle der α -Helix sind dies $\phi = -57^\circ$ und $\psi = -47^\circ$. Dadurch wird eine schraubenförmige Windung der Peptidkette entlang einer Achse erzeugt. Die häufigste Form der Helix ist rechtsgängig, allerdings finden

sich auch einige wenige linksgängige Helices in Proteinen. Eine Helix lässt sich durch zwei Parameter beschreiben, die Anzahl der Aminosäuren je Helixwindung n und die Zahl der Atome r , die einen Ring über eine Wasserstoffbrücke bilden. Die α -Helix wird entsprechend dieser Parameter als 3.6_{13} -Helix bezeichnet, d. h. 3.6 Aminosäuren bilden über eine Wasserstoffbrücke einen 13-gliedrigen Ring. Weitere Helices sind die β -Helix, auch 3_{10} -Helix genannt, die π -Helix (4.4_{16}) und die Kollagen-Tripelhelix. Die Helices unterscheiden sich vor allem in Ganghöhe und Umfang.

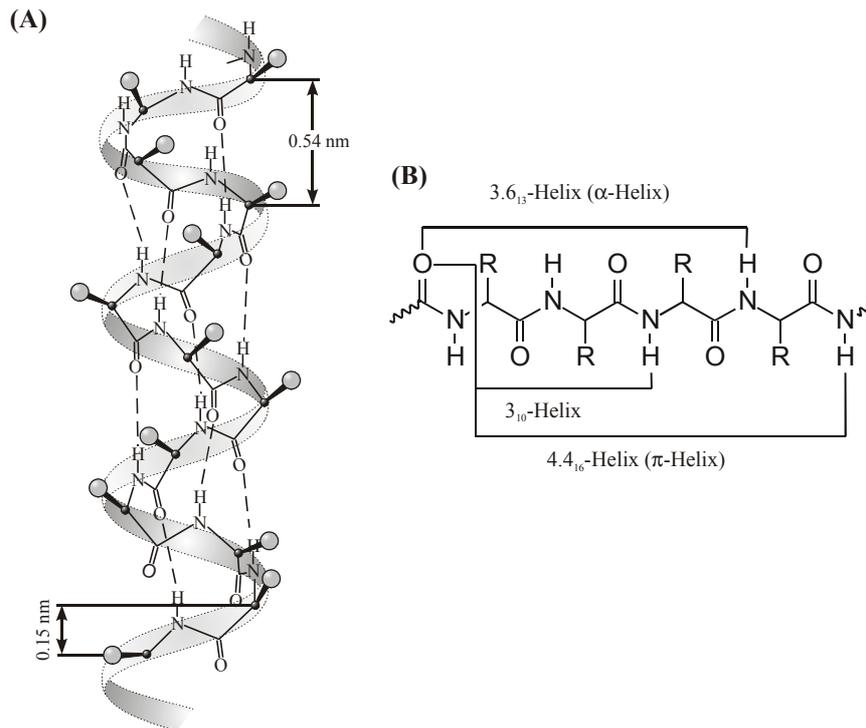


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer α -Helix (A) und der Wasserstoffbrücken in unterschiedlichen Helices (B)

Eine ähnliche strukturelle Bedeutung wie den Helices kommt den Faltblättern (*sheets*) zu. In dieser Struktur sind die Polypeptidketten stärker gestreckt. Das Rückgrat der Polypeptidkette liegt in einer gestreckten Zick-Zack-Struktur vor. Bei dieser Struktur können Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Ketten ausgebildet werden. Diese können sowohl parallel als auch antiparallel verlaufen. Die antiparallele Anordnung ist aufgrund der besseren Orientierung der Wasserstoffbrücken etwas stabiler. Die Seitenketten sind innerhalb eines Strangs alternierend orientiert, die Interaktion mit benachbarten Ketten führt zur häufig beobachteten Verdrehung des Faltblatts.

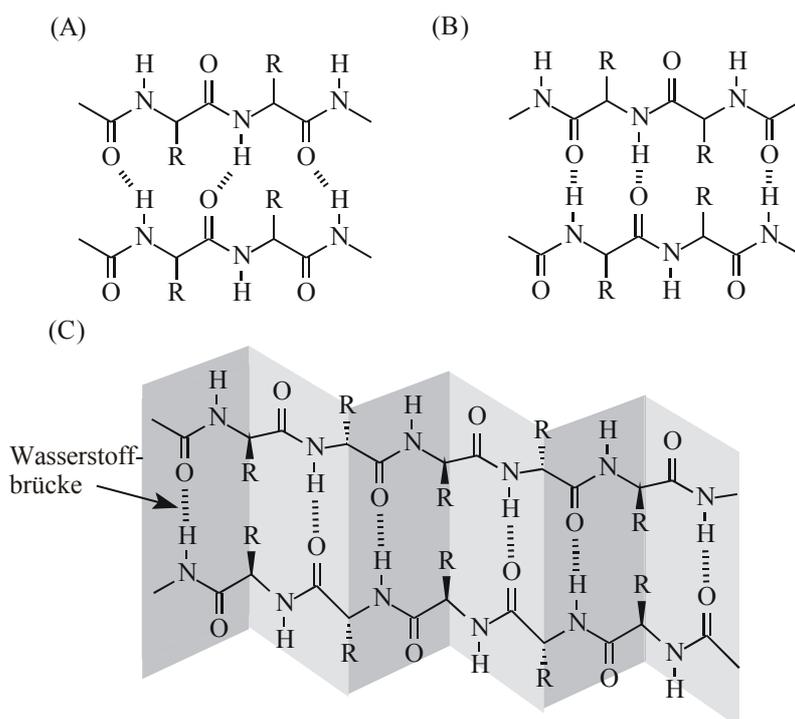


Abbildung 8: Paralleles (A) und antiparalleles (B,C) Faltblatt

In kleinen Peptiden aus weniger als fünfzehn Aminosäuren sind Schleifen (*turns*) das vorherrschende Sekundärstrukturmerkmal. Auch auf der Oberfläche von Proteinen finden sich oft *turns*, so dass diese eine zentrale Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Proteinen spielen. Je nach Anzahl der beteiligten Aminosäuren wird zwischen π - (sechs), α - (fünf), β - (vier) und γ -*turns* (drei Aminosäuren) unterschieden. Auch die Stabilisierung der *turns* erfolgt oft über Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Carboxyl-Sauerstoff der ersten und dem Amid-Wasserstoff der letzten beteiligten Aminosäure ausgebildet werden. Die weitere Klassifizierung der *turns* erfolgt über die Torsionswinkel (Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakteristische Torsionswinkel der wichtigsten Sekundärstrukturen

Konformation	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	ϕ_{i+3}	ψ_{i+3}
I- α_{RS} -Schleife	-60°	-29°	-72°	-29°	-96°	-20°
II- α_{RS} -Schleife	-59°	129°	88°	-16°	-91°	-32°
I- α_{RU} -Schleife	59°	-157°	-67°	-29°	-68°	-39°
I- α_{LU} -Schleife	-61°	158°	64°	37°	62°	39°
β I - Schleife	-60°	-30°	-90°	0°	-	-
β I' - Schleife	60°	30°	90°	0°	-	-
β II- Schleife	-60°	120°	80°	0°	-	-

Konformation	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	ϕ_{i+3}	ψ_{i+3}
β_{II}' - Schleife	60°	-120°	-80°	0°	-	-
β_{III} - Schleife*	-60°	-30°	-60°	-30°	-	-
β_{III}' - Schleife	60°	30°	60°	30°	-	-
β_{VIa} - Schleife	-60°	120°	-90°	0°	-	-
β_{VIb} - Schleife	-120°	120°	-60°	150°	-	-
γ -Schleife	85°	-65°				
γ' -Schleife	-85°	65°				
α -Helix	-57°	-47°	-57°	-47°	-	-
3_{10} -Helix	-60°	-30°	-60°	-30°	-	-

* Strukturelement der 3_{10} -Helix

Abbildung 9 zeigt einige charakteristische β - und γ -turns am Beispiel einer poly(Ala)-Peptidkette.

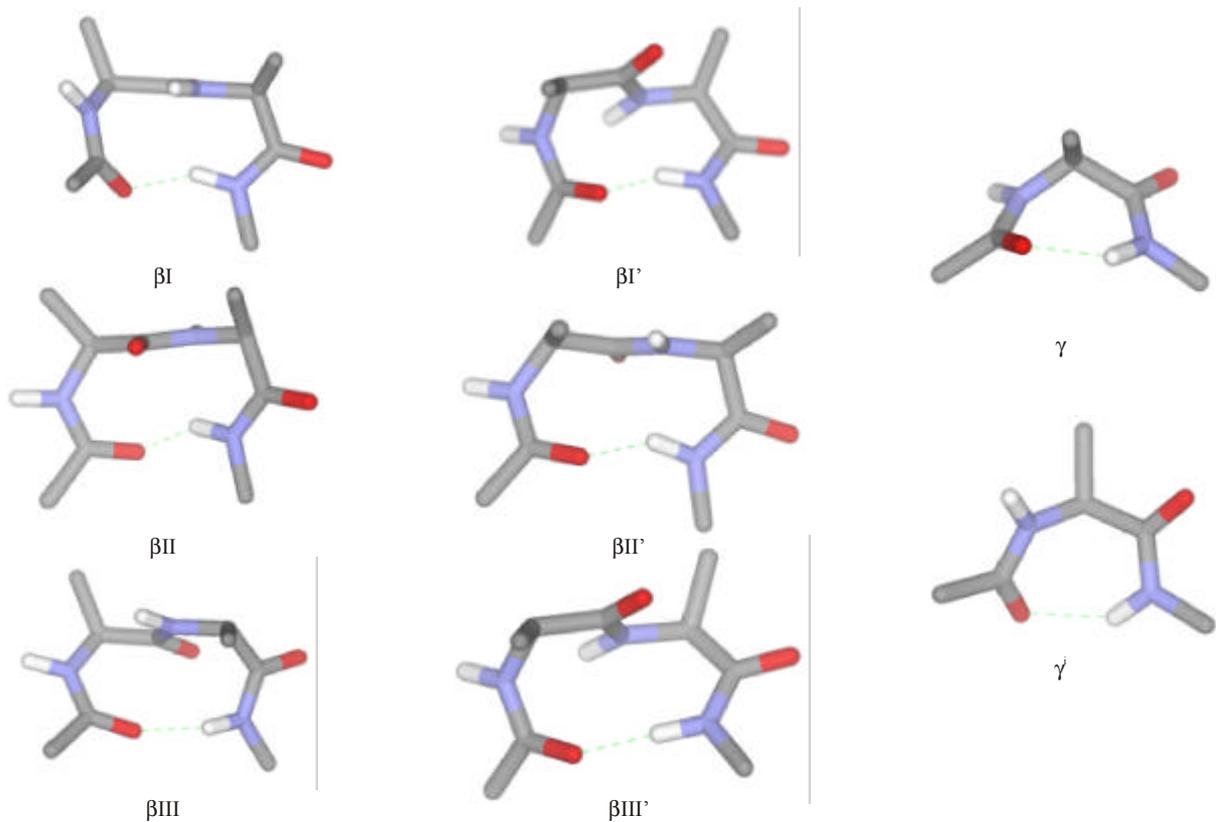
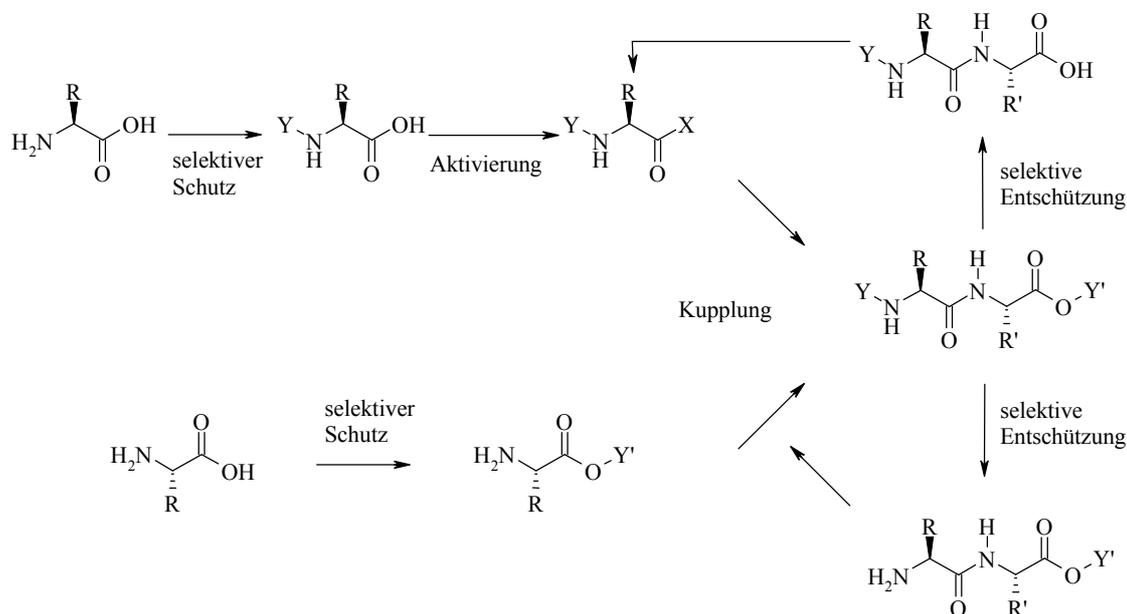


Abbildung 9: Unterschiedliche *turn*-Strukturen

2.1.3 Peptidsynthese

Bei der Ausbildung der Peptidbindung (vergl. Schema 20) gibt es eine Reihe von Schwierigkeiten, die auf den ersten Blick nicht ersichtlich sind. So ist für die formale Wasserabspaltung eine Aktivierung der Carboxygruppe notwendig, da die Umsetzung einer Aminogruppe mit einer Carbonsäure lediglich zur Ausbildung eines Ammoniumcarboxylates führen würde. Die zweite Aminosäure greift dann die aktivierte Carboxylgruppe nucleophil unter Ausbildung der Peptidbindung an. Wenn bei dieser Reaktion jedoch die Aminokomponente der aktivierten Aminosäure ungeschützt vorliegt, wird natürlich auch diese Aminosäure nucleophil angreifen. Lineare und cyclische Peptide werden als Nebenprodukte neben dem gewünschten Dipeptid gebildet werden. Daher müssen während der Synthese alle nicht beteiligten funktionellen Gruppen sowohl temporär als auch reversibel geschützt sein. Es ist also ein Vierstufen-Prozess für die Ausbildung der Peptidbindung notwendig:

1. Die Synthese von geeignet geschützten Aminosäurederivaten
2. Die Aktivierung der freien Carboxyfunktion
3. Die Ausbildung der Peptidbindung (kann gemeinsam mit Schritt 2 erfolgen)
4. Die teilweise oder vollständige Entschützung des ausgebildeten Peptids



Schema 23: Mehrstufenprozess bei der Ausbildung einer Peptidbindung

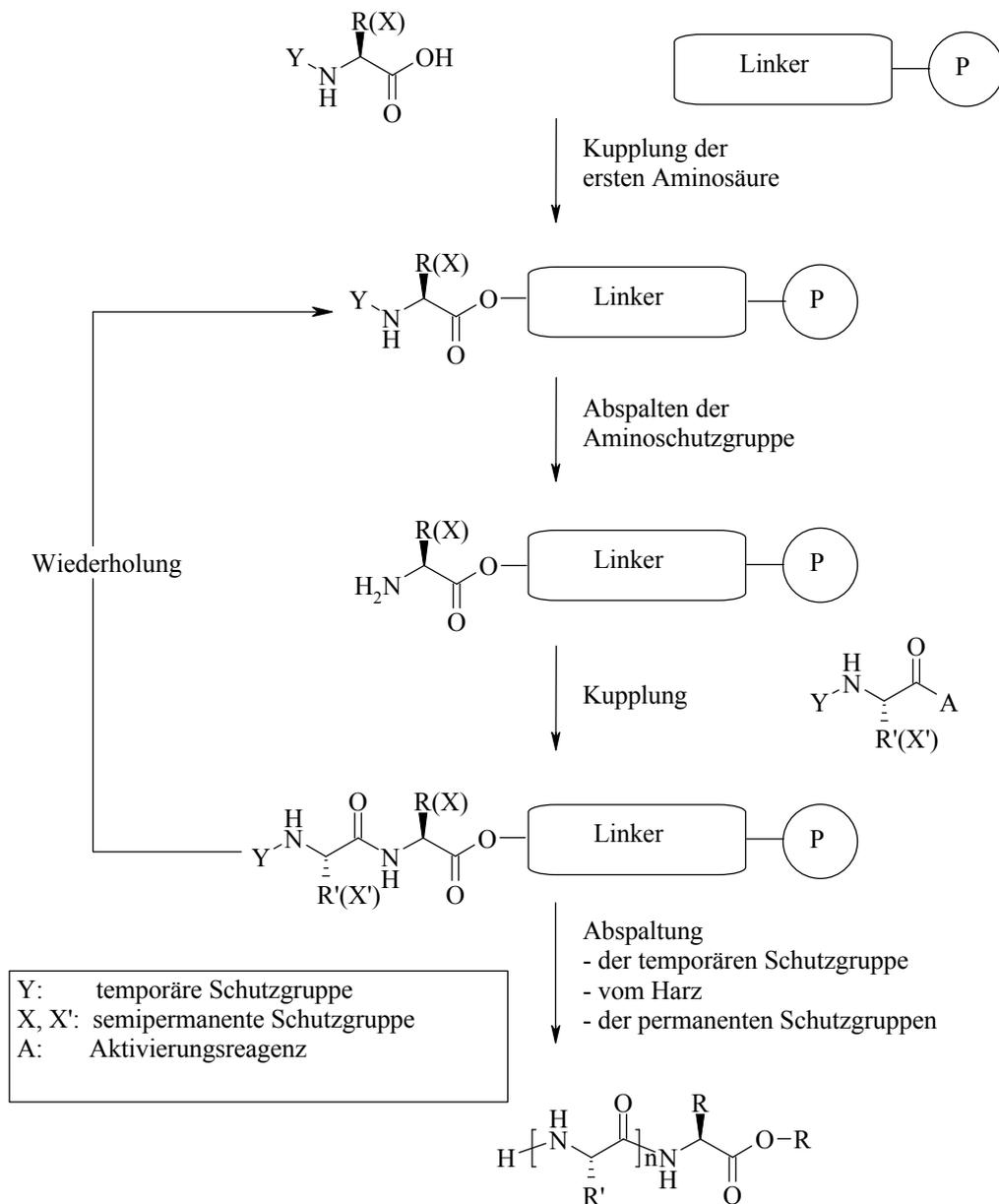
2.1.3.1 Chemische Peptidsynthese

Für die chemische Peptidsynthese sind zwei grundsätzliche Methoden bekannt: die Synthese in Lösung und die Festphasenpeptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis*; SPPS). Die

Lösungssynthese gehört zu den klassischen Darstellungsmethoden von Peptiden. Der schrittweise Aufbau der Aminosäurekette erfolgt in homogener Lösung. Alle Zwischenprodukte müssen auf jeder Stufe chromatographisch gereinigt werden, außerdem ist dieses Verfahren durch die abnehmende Löslichkeit der wachsenden Peptidkette nur auf gut lösliche Peptide wie z. B. das Insulin⁵³ oder das Oxytocin⁵⁴ beschränkt.

Die Festphasensynthese wurde 1963 von Bruce M. Merrifield (Nobelpreis 1984) eingeführt.⁵⁵ Hierbei wird die am Aminoterminus temporär geschützte C-terminale Aminosäure über eine reversibel spaltbare Ankergruppe (Linker) an einen unlöslichen Träger (Harz) gebunden. Nach dem Abspalten der temporären Schutzgruppe können dann die nächsten N-terminal geschützten Aminosäuren in das Molekül eingeführt werden, bis das komplette Peptid aufgebaut ist. Nach jedem Syntheseschritt kann das Harz gewaschen werden, um eventuell entstandene Nebenprodukte und überschüssige Reagenzien zu entfernen. Nach Abschluss der Synthese wird das Peptid vom Harz abgespalten und die semipermanenten Schutzgruppen werden entfernt.

Neben dem beseitigten Löslichkeitsproblem hat diese Methode vor allem den Vorteil, dass die Nebenprodukte nicht durch Chromatographie, sondern durch einfache Waschvorgänge entfernt werden können. Außerdem ist diese Methode bedingt durch die immer gleiche Abfolge der Reaktionen (Entfernen der temporären Schutzgruppe, Waschen, Kupplung der nächsten Aminosäure, Waschen) automatisierbar. Allerdings muss sichergestellt sein, dass alle Reaktionen eindeutig, quantitativ und ohne Nebenreaktionen wie z. B. die verfrühte Abspaltung weiterer Schutzgruppen erfolgen. Ist die Umsetzung nicht quantitativ, treten Rumpf- und Fehlsequenzen auf, die oft nur schwer vom gewünschten Produkt abtrennbar sind. Vorbeugend kann eine irreversible Blockierung nicht umgesetzter Aminogruppen durch geeignete Cappingreagenzien wie z. B. Acylierung mit Essigsäureanhydrid durchgeführt werden, um Deletionssequenzen zu vermeiden



Schema 24: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese

2.1.3.2 Schutzgruppenstrategien

Um Nebenprodukte zu vermeiden, ist es notwendig, auch die in den Seitenketten befindlichen funktionellen Gruppe selektiv zu schützen. Da diese Schutzgruppen bis zum Ende der Synthese vorhanden bleiben müssen, werden sie als semipermanente Schutzgruppen bezeichnet, während die Amino- bzw. Carboxylschutzgruppen, die nach jeder Kupplung entfernt werden müssen, um eine freie Reaktionsstelle für die nächste Kupplung zu erhalten, als temporäre Schutzgruppen bezeichnet werden. Es ist notwendig, dass die gewählten Schutzgruppen mehrere Bedingungen erfüllen:

1. Sie müssen leicht in das Molekül einführbar sein.
2. Sie müssen unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil sein.
3. Sie müssen sich leicht und selektiv abspalten lassen.

Es ist ferner notwendig, dass semipermanente Schutzgruppen unter den Bedingungen, die für die Abspaltung der temporären Schutzgruppen notwendig sind, stabil bleiben. Dies wird als Orthogonalität von Schutzgruppen bezeichnet, d. h. Schutzgruppen sind dann orthogonal zueinander, wenn die Methoden der Abspaltung komplett unterschiedlich sind. Eine andere Möglichkeit ist das Prinzip der abgestuften Säurelabilität, d. h. die temporären Schutzgruppen werden bei Säurestärken und -konzentrationen abgespalten, die die semipermanenten Schutzgruppen noch intakt lassen.

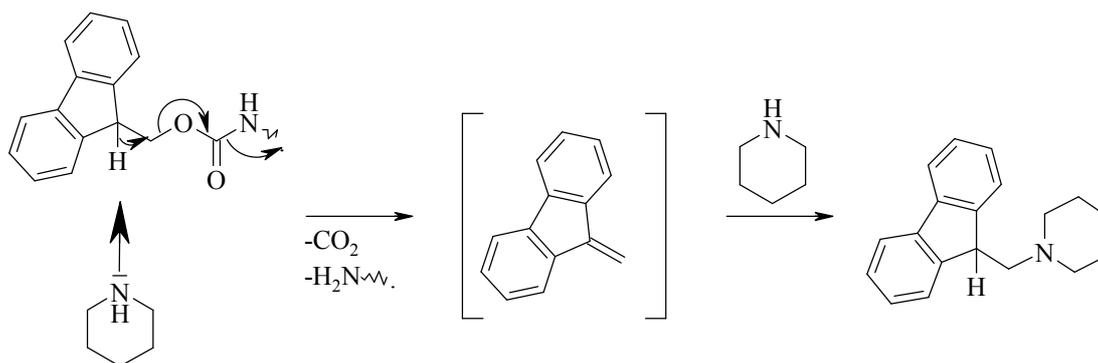
In der Praxis haben sich zwei Schutzgruppenstrategien bewährt:

1. Die *tert*-Butyloxycarbonyl/Benzyl-Strategie (Boc/Bzl)

Diese Strategie geht auf Bruce Merrifield zurück. Sie basiert auf dem Konzept der abgestuften Säurelabilität, der *N*-Terminus wird dabei reversibel mit der Boc-Schutzgruppe geschützt, die mit 20 bis 50 % Trifluoressigsäure spaltbar ist. Die semipermanenten Schutzgruppen vom Benzyltyp werden dagegen erst am Ende der Synthese mit Fluorwasserstoff abgespalten. Nachteilig bei dieser Schutzgruppenstrategie ist, dass der Aufbau von Peptidketten mit labilen Peptidbindungen wie Aib-Gly, Aib-Pro oder Aib-Ala schlecht zu realisieren ist.⁵⁶

2. Die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-Butyl-Strategie (Fmoc/^tBu)

In den letzten Jahren hat die Fmoc/^tBu-Strategie in der Festphasenpeptidsynthese eine sehr große Bedeutung erlangt.^{57,58} Sie basiert auf dem Konzept der Orthogonalität, beruht also auf der Basenlabilität der Fmoc- und der Säurelabilität der *tert*-Butylschutzgruppen. Die Fmoc-Schutzgruppe erlaubt die Quantifizierung der Kupplungsausbeute. Beim Abspalten mit Piperidin entsteht Dibenzofulven, das von Piperidin abgefangen wird. Das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt kann UV-spektrometrisch bei 254 nm detektiert werden. Funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren werden mit basenstabilen Schutzgruppen geschützt. Verwendung finden hier säurelabile Gruppen wie *tert*-Butyl (für Säure- und Hydroxyfunktionalitäten, z. B. bei Ser, Asp), Trityl (bei Amidinen wie Gln oder Asn) oder Boc (für Amine wie Lys, Orn).



Schema 25: Basenkatalysierte Abspaltung der Fmoc-Gruppe
und Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes

2.1.3.3 Linkersysteme und Harze

Als feste Phase finden in der SPPS unlösliche Harze auf Polystyrolbasis Anwendung, an die die wachsende Peptidkette über eine Linkereinheit kovalent gebunden ist. Alle Trägermaterialien müssen während der Synthese chemisch inert und leicht filtrierbar sein. Außerdem müssen sie für die automatisierte Synthese druckstabil sein, da technische Gründe die Verwendung von Überdruck notwendig machen. In den genutzten Lösungsmitteln soll das Quellverhalten der Harze gut sein, um den Reagenzien einen guten Zugang zur gesamten Oberfläche des Harzes zu ermöglichen. Merrifield setzte für seine Synthesen ein Copolymer aus Styrol und 1 bis 2 % Divinylbenzol ein, das durch Chlormethylierung in ein Chlormethylderivat umgesetzt wurde.⁵⁵ Dieses Harz findet in der Boc/Bzl-Strategie Verwendung. Die Abspaltung des synthetisierten Peptides erfolgt mit HF oder Trifluormethansulfonsäure TFMSA.

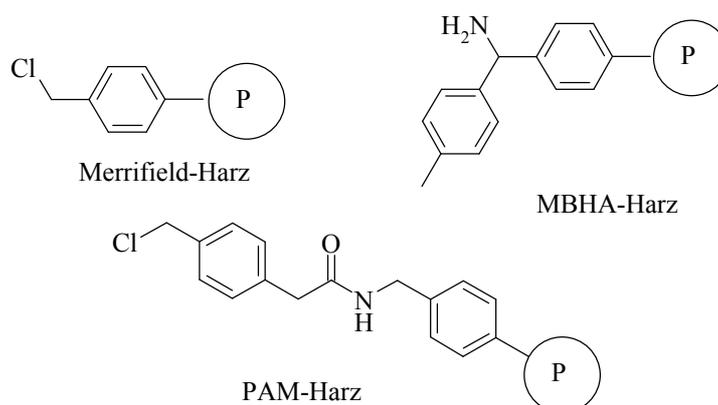


Abbildung 10: Ausgewählte Linker der Boc-Chemie

In der Boc-Chemie findet außerdem der PAM-Linker⁵⁹ Anwendung, der beständig gegen Acidolyse ist. Zur Synthese von C-terminale Peptidamiden wird der Benzhydrylaminlinker

(MBHA)⁶⁰ genutzt, von dem das Peptid ebenfalls mit HF oder TFMSA abgespalten wird.

In der Fmoc-Chemie werden ebenfalls säurelabile Linkersysteme verwendet. Je nach weiteren Synthesezielen werden Linker, von denen das Peptid mit 95 %iger TFA abgespalten wird und das dann vollständig entschützt vorliegt oder sehr säurelabile Linker genutzt, die die semi-permanenten Schutzgruppen bei der Abspaltung intakt lassen.

Beispiele für diese sehr säurelabilen Linker sind das SASRIN[®]-Harz⁶¹ und der 2-Chlortrityl-linker,⁶² die beide mit 0.5 bis 1 %iger TFA gespalten werden. Weniger säurelabil ist das Wang-Harz⁶³. Peptidamide werden in der Fmoc-Chemie an Rink-Amidharzen synthetisiert, auch hier wird mit 95 %iger TFA gespalten.

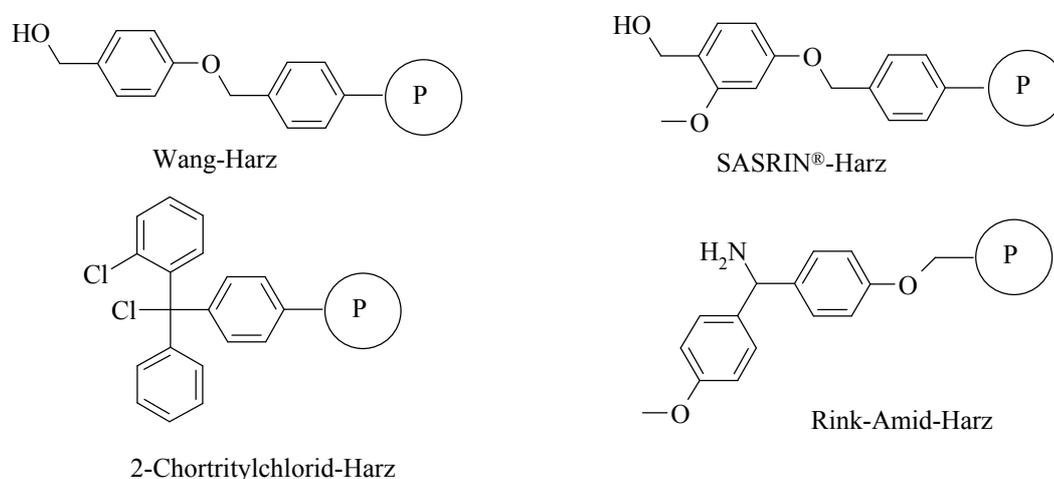
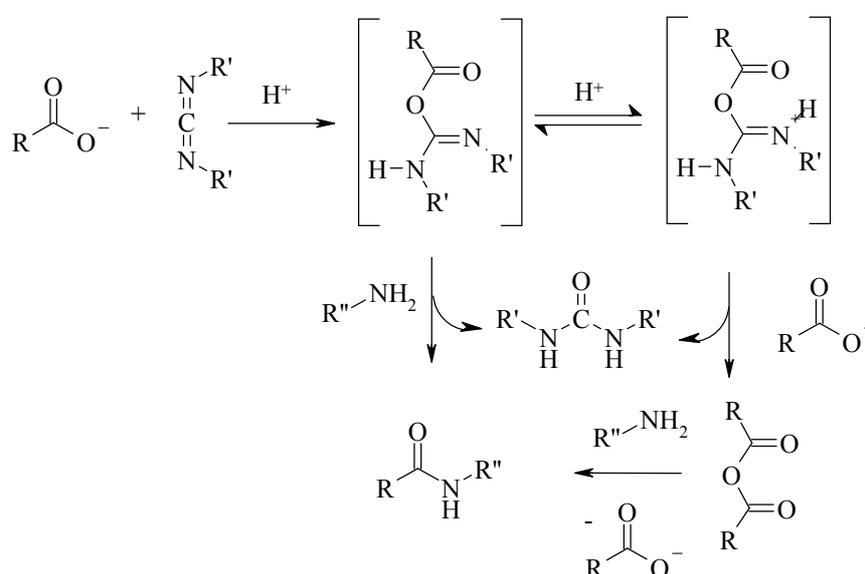


Abbildung 11: Ausgewählte Linker der Fmoc-Chemie

2.1.3.4 Aktivierung der Carboxylgruppe

Wie bereits in Schema 23 beschrieben, bedarf es zur Ausbildung der Peptidbindung der Aktivierung der Carboxylgruppe. Dies geschieht in der Regel durch elektronenziehende Substituenten, die die Electrophilie des Carboxylkohlenstoffs erhöhen und so dem nucleophilen Angriff der Aminogruppe zugänglicher machen. T. Curtius führte bereits 1902 zur Aktivierung der Carboxylgruppe die Acylazide⁶⁴ ein. Die Azidmethode galt lange Zeit als einzige racemisierungsfreie Aktivierungsmethode. Eine weitere Methode ist die der gemischten Anhydride,⁶⁵ bei denen in den meisten Fällen Alkylchlorocarbonate als Aktivierungsreagenzien Verwendung finden. Umsetzung der gemischten Anhydride führt in der Regel zur Reaktion der gewünschten Carboxylgruppe, jedoch sind auch Reaktionen der Aminokomponente mit dem Carbonat bekannt. Die Verwendung symmetrischer Anhydride hat den Nachteil, dass nur maximal 50 % der eingesetzten Aminosäure umgesetzt werden.

Zu den am häufigsten eingesetzten Kupplungsreagenzien gehören die Carbodiimide.^{66,67} Als erstes wurde das *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid DCCI verwendet. Bei der Umsetzung wird das Carbodiimid zum korrespondierenden Harnstoffderivat umgesetzt, das dann aus der Reaktionsmischung entfernt werden muss. Bei der Reaktion addiert sich das Carboxylat an das protonierte Carbodiimid unter Ausbildung des hochreaktiven *O*-Acylisoharnstoffderivates, das mit der Aminokomponente unter Ausbildung der gewünschten Peptidbindung weiterreagiert. Alternativ wird das *O*-Acylisoharnstoffderivat von einem weiteren Carboxylat unter Ausbildung des symmetrischen Anhydrids angegriffen, wobei sich direkt das *N,N'*-disubstituierte Harnstoffderivat bildet. Das Anhydrid reagiert dann mit der Aminokomponente und liefert neben dem gewünschten Peptid noch die freie Aminosäure, die dann in einer weiteren Reaktion mit DCCI erneut zum *O*-Acylisoharnstoffderivat umgesetzt werden kann.



Schema 26: Ausbildung einer Peptidbindung durch Carbodiimide

Die Aktivierung mit DCCI hat den Nachteil, dass bedingt durch Oxazolombildung bei der Aktivierung Racemisierung eintreten kann und sie deshalb nur bedingt geeignet für die Segmentkondensation ist. Die Zugabe von geeigneten Additiven vermindert die Nebenreaktionen, indem sie das *O*-Acylisoharnstoffderivat abfangen und zu einem weniger reaktiven Zwischenprodukt umsetzen, das immer noch mit einer Aminokomponente reagieren kann. Als Additiv hat sich besonders das *N*-Hydroxysuccinimid HOSu⁶⁸ und das 1-Hydroxybenzotriazol HOBt⁶⁹ bewährt.

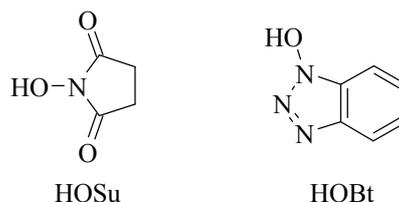
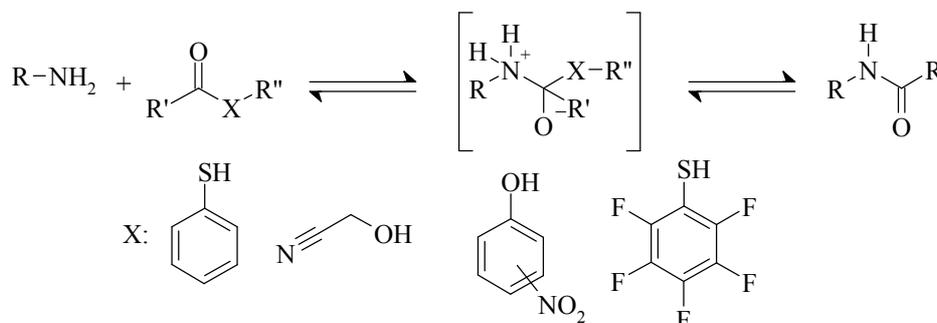


Abbildung 12: Additive für die Carbodiimidmethode

Peptidbindungen können auch über die Spaltung so genannter Aktivester geknüpft werden. Hierbei greift die Aminokomponente die Carboxygruppe, oft unter Ausbildung eines tetraedrischen Übergangszustandes, an, der unter Abspaltung des Alkohols zum Peptid abreagieren kann. Die Geschwindigkeitskonstanten sind dabei von der Qualität der Abgangsgruppe abhängig. Als geeignete Estergruppen haben sich Thiophenole, Hydroxyacetonitril, Nitrophenole und Pentafluorphenol erwiesen.⁷⁰



Schema 27: Aktivestermethode zur Knüpfung von Peptidbindungen

Nutzung von HOSu und HOBT (Abbildung 12) sowie von HOAt für die Veresterung unterdrückt die für die oben aufgeführten Aktivester mögliche Racemisierung.

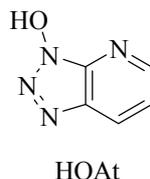


Abbildung 13: HOAt

Eine weitere wichtige Gruppe der Kupplungsreagenzien stellen die Phosphoniumreagenzien dar, die gute Ergebnisse bei der *in-situ* Generierung von Aktivestern zeigen. Das Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat BOP⁷¹ zeigt hervorragende Kupplungseigenschaften. Allerdings entsteht das hochkarzinogene HMPA als Produkt bei der Reaktion und auch die Racemisierungstendenz ist relativ hoch⁷², so dass nach geeigneten Alternativen gesucht wurde. Ersetzen der Dimethylaminogruppen durch Pyrrolidin führt zum

PyBOP und seinem HOAt-Analogen PyAOP.⁷³ Sterisch anspruchsvolle Aminosäuren lassen sich oft gut unter Verwendung von Brom-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat PyBroP kuppeln. Da alle diese Reagenzien nicht mit der α -Aminogruppe reagieren, können sie direkt zu der Reaktionsmischung gegeben werden. Zur Deprotonierung der Carboxylkomponente wird in der Regel noch ein tertiäres Amin hinzugefügt.

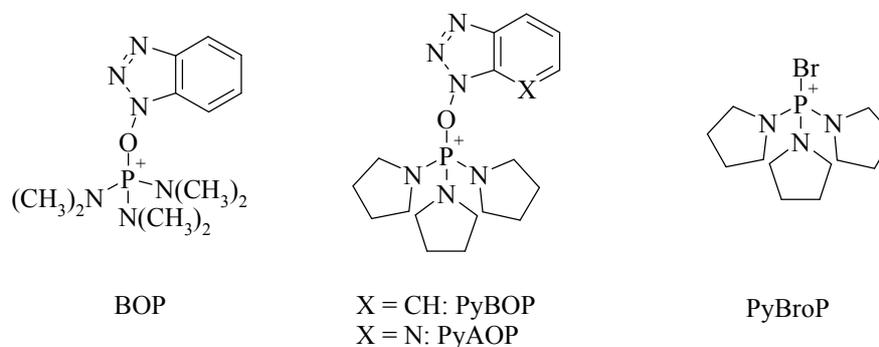


Abbildung 14: Phosphoniumtyp-Kupplungsreagenzien

Die in der letzten Zeit am bedeutendsten gewordene Klasse der Kupplungsreagenzien ist sicherlich die Gruppe der Uronium/Guanidiniumreagenzien. Ausgehend vom HOBt und HOAt wurden eine Reihe von Reagenzien mit Dialkylaminosubstituenten am Ring entwickelt.

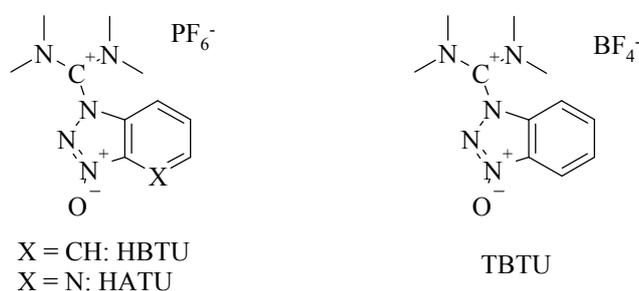
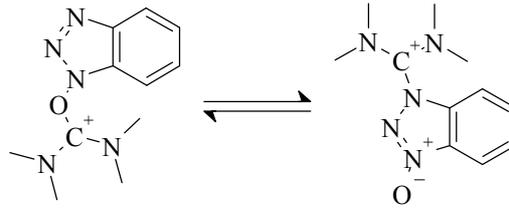


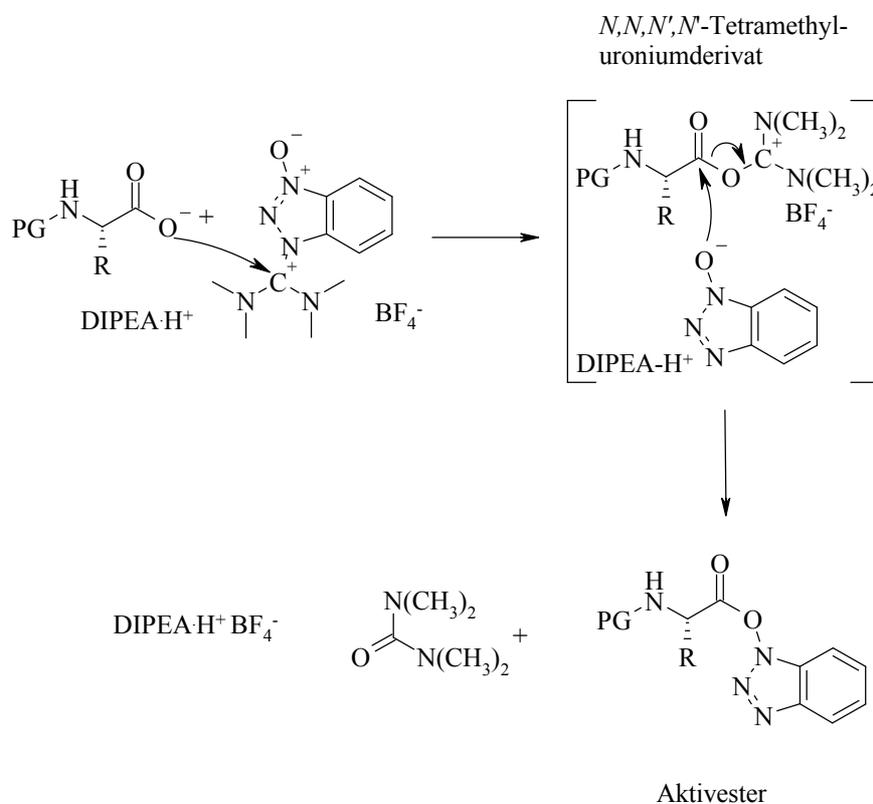
Abbildung 15: Kupplungsreagenzien vom Uronium/Guanidiniumtyp

Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass es sich bei diesen Reagenzien nicht, wie man in Analogie zum HOBt ausgehen könnte, um Uronium-Strukturen, sondern um Guanidinium-*N*-oxidstrukturen handelt, die allenfalls in Lösung im Gleichgewicht vorliegen. Nur durch geeignete Aufarbeitung werden die Uroniumsalze erhalten.⁷⁴



Schema 28: Uronium- und Guanidiniumstruktur von HATU

Mechanistisch betrachtet agieren die Guanidiniumreagenzien nach einem ähnlichen Mechanismus wie die Phosphoniumreagenzien.



Schema 29: Mechanismus der Aktivierung einer Aminosäure mit TBTU

Nucleophiler Angriff des Carboxylats führt zum *N,N,N',N'*-Tetramethyluroniumderivat, das unter Ausbildung eines HOBt- (oder HOAt-) Aktivesters abreagiert. Bei Beteiligung der Guanidiniumform ist von einer Acylwanderung auszugehen, die für die Ausbildung des Aktivesters notwendig ist.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe wird gewöhnlich mit einem Überschuss an Kupplungsreagenz durchgeführt. In Gegenwart einer freien Aminosäure können Derivate wie HATU oder HBTU mit der Aminogruppe zu unerwünschten Guanidino-Derivaten reagieren, die eine weitere Umsetzung blockieren. Für Phosphoniumreagenzien sind derartige Reaktionen nicht

bekannt. Daher empfiehlt sich bei langsamen Aktivierungsprozessen, z. B. bei sterisch stark gehinderten Aminokomponenten der Einsatz von Phosphoniumderivaten.

2.1.3.5 Nebenreaktionen

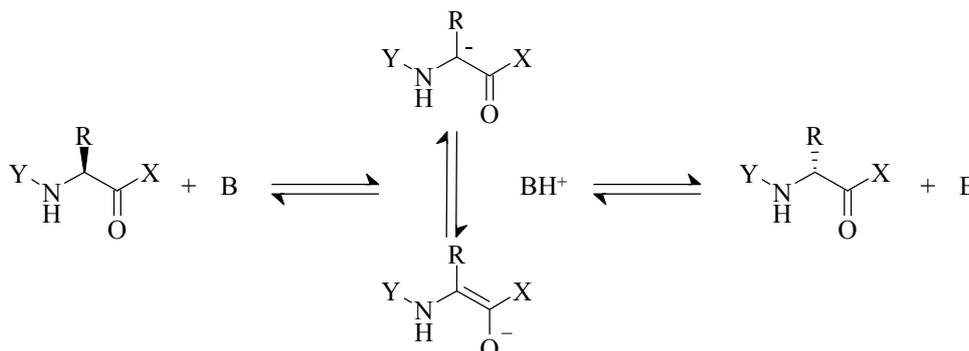
Bei der Peptidsynthese gibt es eine ganze Reihe von Nebenreaktionen, die abhängig von Sequenz und verwendeten Reagenzien auftreten können.

1. Racemisierung (Epimerisierung)

Peptide sind Substanzen mit chiralen Zentren. Daher besteht die Gefahr des Verlustes der chiralen Integrität bei der Aktivierung oder Kupplung. Die Epimerisierung tritt meistens in basenkatalysierten Nebenreaktionen auf, es werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert:

a) Enolisierung

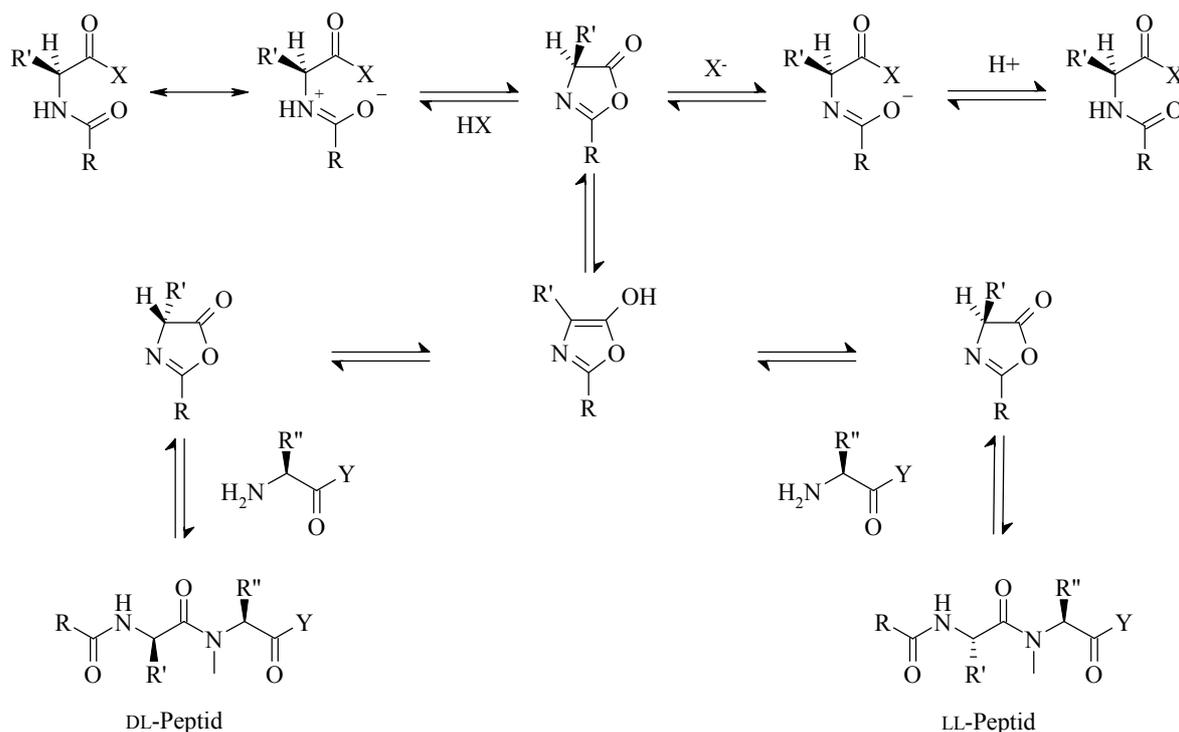
Bei Carboxy-aktivierten Derivaten kann im Gleichgewicht reversibel ein Carbanion ausgebildet werden, das zu einem partiellen Verlust der Stereochemie führen kann, da die Reprotonierung ohne Stereoselektivität abläuft.



Schema 30: Mechanismus der basenkatalysierten Epimerisierung

b) 5(4H)-Oxazolombildung

Racemisierung während der Kupplung wird meistens bei der Aminosäureaktivierung durch Ausbildung der stereochemisch labilen 5(4H)-Oxazolone (2-Oxazolin-5-one oder Azlactone) hervorgerufen. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung des Oxazolons hängt mit dem Potential des Aktivierungsreagenzes und mit den elektronischen Eigenschaften des *N*-Acylrestes zusammen. Acetyl-, Benzoyl- oder Trifluoracetylreste favorisieren die Ausbildung von Oxazolonen.



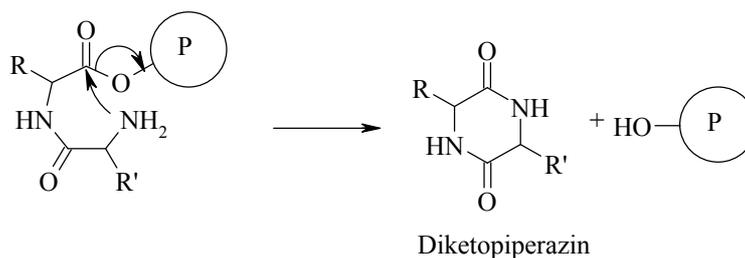
Schema 31: Racemisierung durch 5(4*H*)-Oxazolombildung

Je nach Kupplungsreagenz variiert der Grad der Racemisierung. Griehl et al.⁷⁵ untersuchten mit HPLC-Methoden die Racemisierung von unterschiedlichen Kupplungsreagenzien für die Kupplung von *Z*-Ala-Trp-OH mit *H*-Val-OMe. Besonders racemisierungsanfällig ist die Kupplung mit gemischten Anhydriden (Alkylchlorocarbonate; > 35 %, alle Werte für DMF als Lösungsmittel), mit Phosphonaten (BOP, > 20 %) und Carbodiimiden (DIC 18 %, DCCI 14 %). Deutliche Unterdrückung der Racemisierung wird durch Zugabe von HOBT erreicht, so zeigt TBTU mit HOBT nur eine Racemisierung im Bereich von 7 %, während ohne diese Zugabe über 15 % beobachtet wurden. Auch für DCCI unter Zugabe von HOSu oder HOBT ist nahezu keine Racemisierung zu beobachten. Weiterhin ist festzustellen, dass die Racemisierungstendenz vom verwendeten Lösungsmittel abhängig ist. Für alle getesteten Kupplungsreagenzien ist die Umsetzung in Dichlormethan der in DMF vorzuziehen.

2. Diketopiperazinbildung

Ist die Aminosäure als Ester am polymeren Träger immobilisiert, wird Diketopiperazinbildung beobachtet, besonders wenn es sich bei den ersten beiden *C*-terminale Aminosäuren um Glycin, Prolin, *N*-Methylaminosäuren oder *D*-Aminosäuren handelt.⁷⁶ Die freie α -Aminogruppe eines bereits am Linker verankerten Dipeptids kann intramolekular an der *C*-terminale Carboxygruppe nucleophil angreifen. Das entstandene Diketopiperazin

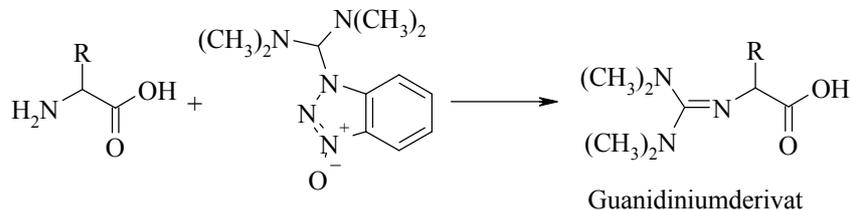
wird dabei vom Harz abgespalten. Die Reaktion wird durch Piperidin katalysiert, daher ist sie besonders in der Fmoc-Chemie zu beobachten.



Schema 32: Diketopiperazinbildung

3. *N*-Guanylierung

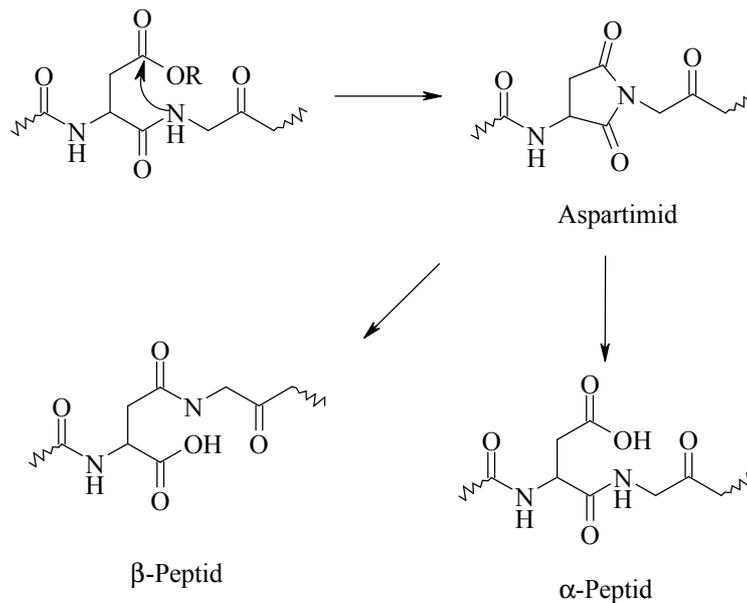
Die zur Aktivierung eingesetzten Uronium/Guanidiniumreagenzien können mit *N*-terminalen Aminogruppen unter Bildung von Guanidinium-Derivaten reagieren.⁷⁶ Diese irreversible Blockierung findet statt, wenn die Aktivierungsgeschwindigkeit der Carboxylgruppe geringer ist als die Addition an die Aminokomponente,⁷⁷ also bei sterischer Abschirmung des Aktivierungszentrums. Dies ist beispielsweise bei der Cyclisierung linearer Peptidsequenzen der Fall.



Schema 33: Guanylierung des Aminoterminus

4. Aspartimidbildung

Eine für Aspartat und Asparaginsäurederivate oft zu beobachtende Nebenreaktion ist die Ausbildung cyclischer Aspartimide. Diese Reaktion wird meistens bei Peptiden mit den Sequenzen Asp-Gly, Asp-Ala oder Asp-Ser beobachtet.⁷⁸ Sie kann säurekatalysiert bei der Abspaltung der Peptidkette vom Harz oder basenkatalysiert bei der Entschützung des Aminoterminus durch Piperidin auftreten.⁷⁹

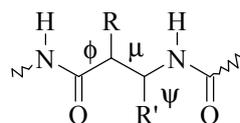


Schema 34: Aspartimidbildung

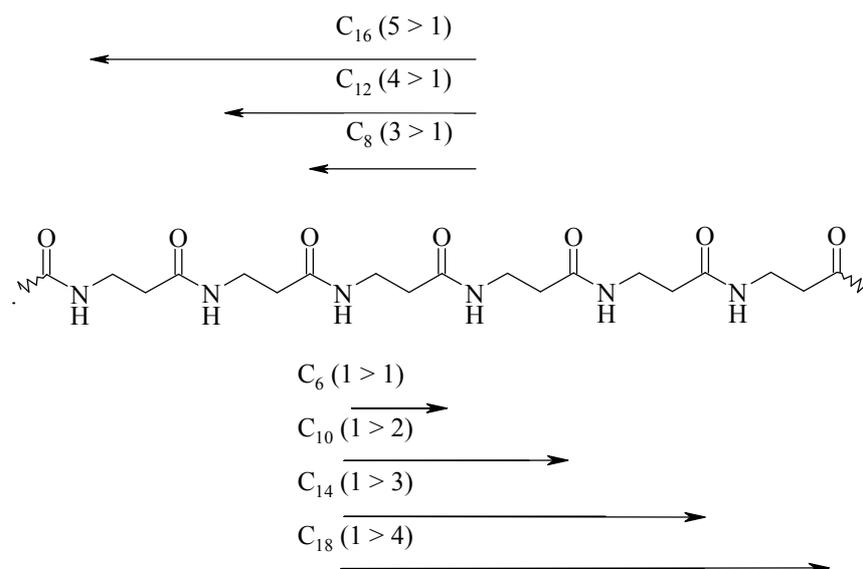
Die Hydrolyse des Aspartimids ergibt eine Mischung aus α - und β -Peptiden. Zur Vermeidung der basenkatalysierten Aspartimidbildung wird die Verwendung einer 6 %igen Lösung von Piperazin in DMF vorgeschlagen.⁸⁰

2.1.4 Peptide mit β -Aminosäuren

β -Aminosäuren enthalten ein zusätzliches Kohlenstoffatom zwischen der Amino- und der Carboxygruppe. Dadurch wird beim Einbau in Peptide das *backbone* um ein Skelettatom verlängert. Auch ist ein weiterer Torsionswinkel μ vorhanden.

Abbildung 16: β -Aminosäure mit Torsionswinkeln

Der Aufbau von Peptiden allein aus unterschiedlichen β -Aminosäuren führt zu einer neuen Klasse, den sogenannten β -Peptiden. Diese β -Peptide verfügen über eine große Anzahl an stabilen Sekundärstrukturen, die sich von denen der α -Peptide unterscheiden. In β -Peptiden ist eine Reihe von Stabilisierungen durch Wasserstoffbrücken denkbar:

Abbildung 17: Schema der möglichen Wasserstoffbrücken in β -Peptiden⁸¹

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigen sich intensiv mit unterschiedlichen Sekundärstrukturtypen, zu nennen sind hier besonders die Arbeiten von Dieter Seebach (ETH Zürich), Samuel Gellman (Wisconsin) und William DeGrado (Pennsylvania). Auch für die β -Peptide gibt es drei wichtige Sekundärstrukturgruppen: Helices, faltblattartige Konformationen und *turn*- bzw. *hairpin*-Strukturen.

2.1.4.1 Helices

Ein wichtiger Vertreter ist die 14-Helix, die von Gellman et al.^{82,83} durch NMR-Untersuchungen an Peptiden mit *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure als konformationell eingeschränkter β -Aminosäure gezeigt wurde. Auch Seebach et al.⁸⁴⁻⁸⁷ zeigten an diversen β -Peptiden mit unterschiedlichen acyclischen β -Aminosäuren diese Struktur. Sie wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Amidproton der Aminosäure i und der Carboxylgruppe der Aminosäure $i+2$ stabilisiert. Sie hat gegenüber der α -Helix einen leicht erweiterten Radius.

Eine weitere Helix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Amidproton der Aminosäure i und der Carboxylgruppe der Aminosäure $i-3$ stabilisiert. Ein zwölfgliedriger Wasserstoffbrückenring wird ausgebildet, so dass sie als 12-Helix bezeichnet wird. Sie wurde von Gellman et al.⁸⁸⁻⁹⁰ bei Untersuchungen von Peptiden mit *trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure gefunden, die durch den kleineren Ring einen veränderten Torsionswinkel zeigt, der zu anderen Sekundärstrukturen führt.

β -Peptide mit alternierenden β^2 - und β^3 -monosubstituierten Resten bilden eine 10/12-Helix aus.^{84,91} Sie wurde durch NMR- und CD-Untersuchungen verifiziert und wird durch Wasser-

stoffbrücken zwischen dem Amid-Wasserstoff der Aminosäure i und der Carboxygruppe der Aminosäure $i-3$ (C_{12} -Konformer) und dem Amidproton der Aminosäure $i+1$ und der Carboxygruppe der Aminosäure $i+3$ (C_{10} -Konformer) stabilisiert.

Fleet et al.⁹² veröffentlichten Untersuchungen über eine 10-Helix, die durch mehrdimensionale NMR-Messungen verifiziert wurde. Auch eine 8-Helix konnte in Röntgenstrukturanalysen kurzer Peptidfragmente gefunden werden,⁹³ bislang gelang es jedoch nicht, diese auch für längere β -Peptide zu verifizieren.

2.1.4.2 Faltblätter und *hairpins*

Für die Ausbildung von β -faltblattartigen Konformationen gibt es zwei Möglichkeiten, eine, für die alle C^2-C^3 -Torsionswinkel *anti*-ständig sind und eine mit *gauche*-ständigen C^2-C^3 -Torsionswinkeln für alle Reste.⁹⁴ Der *anti*-Typ weist im Gegensatz zum für α -Peptide üblichen β -Faltblatt ein Dipolmoment auf, das durch die gleiche Orientierung aller Carbonylgruppen in der Kette erreicht wird. Für den *gauche*-Typ ist analog zu α -Peptiden kein Dipolmoment zu erwarten.

Frühe Arbeiten zeigten, dass poly(β -Alanin) zwar in einer faltblattartigen Struktur kristallisiert,^{95,96} NMR-Untersuchungen bewiesen jedoch, dass es in Lösung ungeordnet vorliegt.⁹⁷ Die Verwendung von Molekülen, die in einer β -*hairpin*-Konformation vorliegen, führte zum Aufbau von faltblattartigen Strukturen. Seebach et al. nutzten diese Strategie zur Synthese kurzer Faltblattstrukturen, die über eine β -Dipeptideinheit verknüpft wurden.⁹⁸

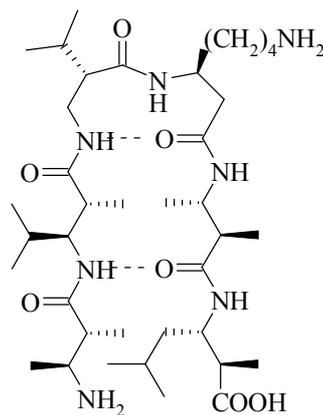


Abbildung 18: Durch β -*hairpin* stabilisierte Faltblattstruktur

NMR- und *Molecular modeling*-Untersuchungen zeigten die Struktur des Hexapeptids für Raumtemperatur, Simulationen bei höherer Temperatur bewiesen die strukturelle Variabilität der Kette. Bei 340 K wurde nur mehr bei 30 % der Konformationen die β -*hairpin*-Struktur

nachgewiesen.

Peptide, die eine alternierende Sequenz von α - und β -Aminosäuren enthalten, zeigen ebenfalls sehr stabile Sekundärstrukturen schon bei wenigen Resten. So erhielten Reiser et al.⁹⁹ für alternierende Sequenzen von L-Alanin und *cis*-Aminocyclopropan-carbonsäuren definierte Strukturen bei nur fünf Resten selbst in polaren Lösungsmitteln wie Methanol. Bei Erweiterung auf sieben oder neun Einheiten bilden sich daraus helicale Strukturen. Gellman et al.¹⁰⁰ erhielten analoge Ergebnisse für ein Hexapeptid der Sequenz Ac-^cACPC-Lys-^cACPC-Tyr-^cACPC-Lys-NH₂. Modellstudien an einem Dodecamer aus alternierenden L-Alanin- und ^cACPC-Resten lassen vermuten, dass sich drei unterschiedliche Helices in derartigen α,β -Peptiden ausbilden werden: Die 11-Helix, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Resten *i* (CO) und *i*+3 (NH) ausgebildet wird, die 14/15-Helix, bei der die Wechselwirkungen zwischen *i* (CO) und *i*+4 (NH) ausgebildet werden sowie die 18-Helix (*i* (CO) und *i*+5 (NH)). Bislang gelang es jedoch noch nicht, durch geeignete Wahl der Reste die unterschiedlichen Helices selektiv darzustellen.

2.1.5 Naturstoffe mit β -Aminosäuren

β -Aminosäuren spielen in der Natur eine weniger wichtige Rolle als ihre α -Analoge. Die einfachste β -Aminosäure β -Alanin ist weit verbreitet in Algen und Schwämmen mariner und terrestrischer Herkunft sowie in höheren Pflanzen. In höheren Organismen tritt es in Form der Dipeptide Carnosin (β -Alanylhistidin)¹⁰¹ und Anserin (β -Alanyl-3-methylhistidin) im Muskelgewebe auf. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Naturstoffen, die verschiedene β -Aminosäuren enthalten.

Eine große β -Alanin enthaltende Substanzgruppe sind die Destruixine, cyclische Hexadepsipeptide,^a die aus Kulturfiltraten der Pilze *Oospora destructor* und *Metarrhizium anisopiliae* isoliert werden. Sie wirken insektizid und immunsuppressiv. Destruixin B, das ursprünglich als Pflanzengift Verwendung fand, zeigt keine cytotoxischen Effekte¹⁰² und unterdrückt die Expression des viralen Hepatitis B Oberflächenantigens (HbsAg) in menschlichen Leberzellen.¹⁰³ Der Schimmelpilz *Trichothecium roseum*, der u. a. auf überlagerten Erdnüssen zu finden ist, produziert das den Destruixinen verwandte Roseotoxin B.¹⁰⁴

Die Efrapeptide sind Peptidantibiotika, die vom Pilz *Tolypocladium niveum* und weiteren Vertretern dieser Species als mikroheterogenes Gemisch eng verwandter Sequenzanaloge produziert werden.¹⁰⁵ Sie enthalten gleichfalls β -Alanin, genauso wie das Antibiotikum Leucino-

^a Als Depsipeptide werden solche Peptide bezeichnet, die neben Aminosäuren auch Hydroxysäuren enthalten, die über Esterbindungen in das Peptid eingebaut werden.

statin A,¹⁰⁶ das von *Paecilomyces lilacinus* produziert wird.

Häufig sind auch α -alkylierte β -Aminosäuren zu finden. Aus dem im indischen Ozean beheimateten Seehasen *Dolabella auricularia* können die Dolastatine isoliert werden, eine heterogene Gruppe antineoplastischer und cytostatischer Peptide. Dolastatin D¹⁰⁷ enthält (2*R*,3*R*)-3-Amino-2-methylbutansäure und besitzt Bedeutung bei der Behandlung von Prostatakrebs.¹⁰⁸

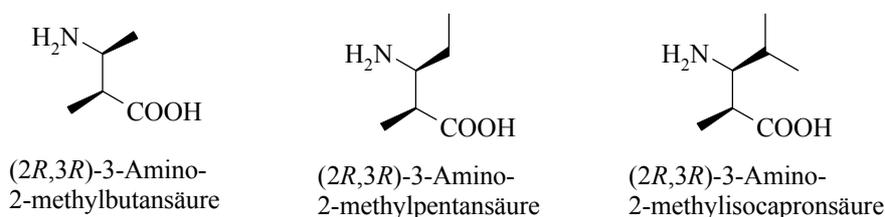


Abbildung 19: In Dolastatinen gefundene β -Aminosäuren

In Dolastatin 11 und 12¹⁰⁹ tritt ebenso wie in Majuskulamid C¹¹⁰ und 57-Normajuskulamid¹¹¹ sowie den Antitumorsubstanzen Aldostatin 11 und 12¹⁰⁹ die 3-Amino-2-methylpentansäure auf. In Dolastatin 16,¹¹² einem starken Wachstumshemmer verschiedener humaner Karzinomlinien wurde 2-Methyl-3-aminoisocaprönsäure gefunden.

Die β -D-Aminooctansäure findet sich im Hormothamin A,¹¹³ einem cytotoxischen und antimikrobiellen Undecapeptid aus dem tropischen marinen Cyanobakterium *Hormothamnium enteromorphoides*.

Cryptophycine, eine Klasse von makrocyclischen Depsipeptiden, werden aus verschiedenen Blaugrünalgen isoliert. Sie haben sich als cytotoxisch erwiesen, auch gegen in Mäuse implantierte medikamentenresistente Tumorzelllinien.¹¹⁴ Cryptophycine enthalten unterschiedliche β -Aminosäuren wie z. B. (*R*)- oder (*S*)-2-Aminomethylpropansäure und 2-Aminomethyl-2-methylpropansäure. Sie unterscheiden sich darüber hinaus in der Struktur und den funktionellen Gruppen der Seitenketten.

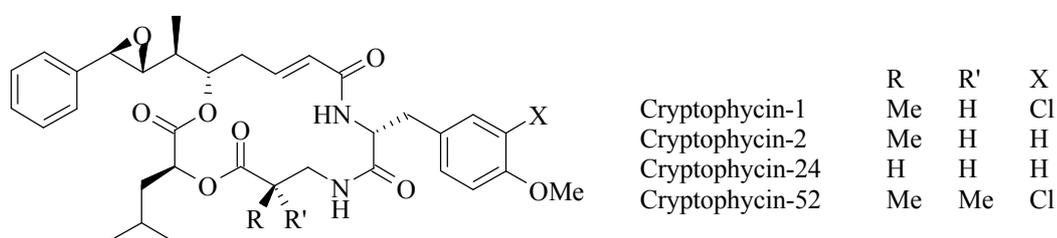


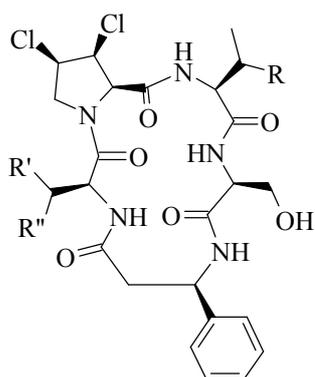
Abbildung 20: Ausgewählte Cryptophycine

Die Antibiotika der Iturinklasse, die Iturine,^{115,116} Bacillomycine^{117,118} und Mycosubtiline¹¹⁹ aus *Bacillus subtilis* enthalten β -Aminofettsäuren.

Neben den aliphatischen β -Aminosäuren finden sich auch aromatische Vertreter. Jaspilkinolid,

das aus dem marinen Schwamm *Jaspis johnstonii* gewonnen werden kann, enthält β -Tyrosin.¹²⁰ Jaspilakinolid wirkt fungizid auf *Candida albicans*¹²¹ und inhibiert das Wachstum von Brust- und Prostatakrebszellen durch Beeinflussung des Actincytoskeletts.^{122,123} Auch die strukturell eng verwandten Chondramide aus dem Myxobakterium *Chondromyces crocatus* enthalten β -Tyrosin.

Der alkoholische Wurzelextrakt der Heilpflanze *Aster tataricus* zeigt einen deutlichen Antitumoreffekt auf Sarkom 180 A in Mäusen.¹²⁴ Drei chlorhaltige cyclische Pentapeptide, die Astine konnten als aktive Komponenten isoliert werden.¹²⁵ Sie sind Analoga des Cyclochlorotins¹²⁶ und enthalten β -Phenylalanin (vergl. Abbildung 21). Rossi et al.¹²⁷ synthetisierten verschiedene Astin-Analoga, dabei ersetzten sie u. a. die Peptidbindung zwischen dem β -Phenylalanin und der α -Aminobuttersäure durch eine SO_2NH -Einheit und erreichten so eine größere Flexibilität des Peptid-*backbone* und eine den Naturstoffen vergleichbare biologische Aktivität..



	R	R'	R''
Astin A	H	OH	CH ₃
Astin B	OH	H	CH ₃
Astin C	H	H	CH ₃
Cyclochlorotin	H	H	OH

Abbildung 21: Astine und Cyclochlorotin

Ein weiterer Naturstoff, der das β -Phenylalanin enthält, ist das Andrimid, ein antibiotisch wirkendes Peptid aus einem bakteriellen Symbionten des braunen Grashüpfers.¹²⁸ Auch die Metabolite des Andrimids, die Moiramide A bis C, die auch im Kulturfiltrat des marinen Bakteriums *pseudomonas fluoreszens* gefunden werden, enthalten β -Phenylalanin.¹²⁹

Auch hydroxylierte β -Aminosäuren sind in einigen Naturstoffen zu finden. Als Beispiel ist hier das (2*R*,3*S*)-*N*-Benzoyl-3-phenylisoserin zu nennen, ein Bestandteil des Paclitaxel (TAXOL®).¹³⁰ Paclitaxel ist eines der potentesten Antitumormittel und wird aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia* gewonnen. (2*R*,3*S*)-*N*-Benzoyl-3-phenylisoserin ist für die biologische Aktivität von entscheidender Bedeutung, Vorläufersubstanzen ohne die β -Aminosäure, die sich z. B. aus anderen Eibenarten gewinnen lassen, sind nahezu wirkungslos.^{131,132}

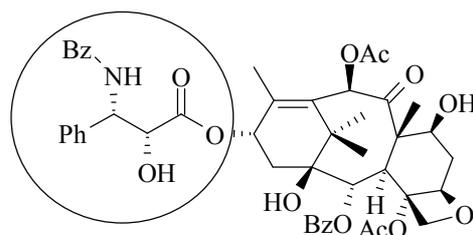
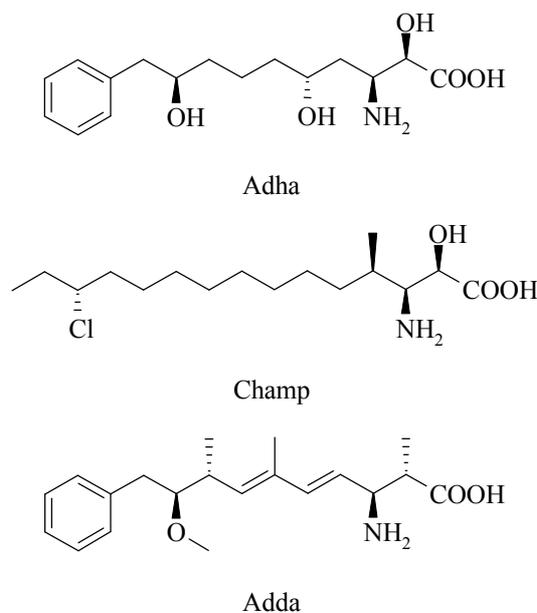


Abbildung 22: Paclitaxel

α -Hydroxy- β -alanin ist Bestandteil des Keramamid F, das im *Theonella*-Schwamm gefunden wird.¹³³ δ -Hydroxy- β -Lysin wird im Negamycin gefunden, einem starken Inhibitor gram-negativer Bakterien.¹³⁴ Die vom Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* produzierten Microginine enthalten 3-Amino-2-hydroxydecansäure. Die linearen Pentapeptide stellen Inhibitoren des ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) dar. Eine in mehreren Naturstoffen zu findende Hydroxy- β -aminosäure ist die (2*S*,3*R*,5*S*)-3-Amino-2,5,9-trihydroxy-10-phenyldecansäure Adha. Sie taucht unter anderem im Scytonemin A auf, einem cyclischen Peptid aus der Blaugrünalge *Scytonema sp.*¹³⁵

Eine weitere Hydroxyaminosäure, die 3-Amino-14-chloro-2-hydroxy-4-methylpalmitinsäure (Champ) ist Bestandteil der Puwainaphycine, cardioaktiver Substanzen aus der Blaugrünalge *Anabaena sp.*¹³⁶ Weitere in Naturstoffen gefundene β -Aminosäuren sind Adda (3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure) oder die schwefelhaltige 3-Amino-5-mercaptopentansäure.

Abbildung 23: Ausgewählte, natürlich vorkommende β -Aminosäuren

2.1.6 β -Aminosäuren in cyclischen Peptiden

Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, induzieren β -Aminosäuren in linearen Peptiden Sekundärstrukturen. In Naturstoffen tauchen nur einzelne β -Aminosäuren auf (Kapitel 2.1.5). Dies lässt vermuten, dass strukturelle Konsequenzen auch durch den Einbau einzelner β -Aminosäuren in Peptide zu erwarten sind.

Das Leualacin ist ein cyclisches Pentadepsipeptid mit der Sequenz c-(- β -Ala-HyLeu-Leu-Val-MePhe-) (HyLeu: Hydroxyleucin; MePhe: *N*-Methylphenylalanin), das aus *Hapsidospora irregularis* isoliert wurde. Es agiert als spezifischer L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker.¹³⁷ Im Falle einer *cis*-Peptidbindung zwischen Val und MePhe wird ein charakteristisches β/γ -turn-Motiv erhalten, bei dem das HyLeu in der Position $i+1$ eines γ -turns auftaucht, obwohl sie im untersuchten Beispiel als (*R*)-Enantiomer und damit als Äquivalent einer D-Aminosäure eingesetzt wurde. Die β -Aminosäure wird hier in der Position $i+3$ eines β VI-turns eingebaut. Weitere strukturelle Untersuchungen zeigen, dass die für die Aktivität der Verbindung essentiellen Gruppen, die Seitenketten des Valins und des Phenylalanins sowie die Carboxygruppe der Val-Phe-Bindung in ähnlicher Weise lokalisiert sind wie im Diazepam,^a das im klinischen Bereich Anwendung findet.¹³⁸

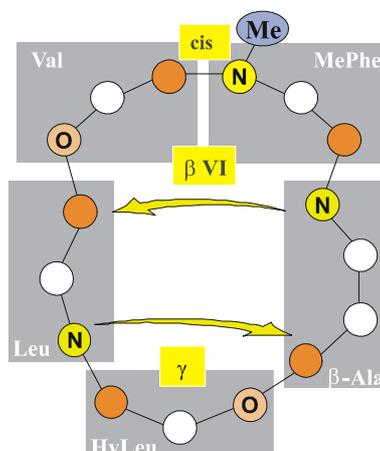


Abbildung 24: Schematische Struktur¹³⁹ des Leualacins

Astin B (c-(-Pro(Cl₂)-alloThr^b-Ser- β -Phe-Abu-), Abbildung 21) nimmt eine definierte Sekundärstruktur ein, die durch Untersuchungen mittels NMR und *Molecular modeling* sowie

^a Diazepam (Markenname Valium[®]) gehört zur Stoffgruppe der Benzodiazepine. Sie wirken sedativ (beruhigend und schlaffördernd), anxiolytisch (angstlösend), muskelrelaxierend (entspannend), antikonvulsiv (krampflösend) und oft auch leicht stimmungsaufhellend. Bei regelmäßiger Einnahme besteht die Gefahr der Gewöhnung und der Abhängigkeit.

^b alloThr bezeichnet das nichtproteinogene (2*S*,3*R*)-Thr, im Gegensatz zum proteinogenen (2*S*,3*S*)-Thr.

Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde.¹⁴⁰ Charakteristisch ist der β Vla-*turn* mit β -Phe in der Position $i+1$. Es wird auch hier, ähnlich wie im Leualacin eine *cis*-Bindung im Zentrum des β -*turns* zwischen Abu und Pro(Cl₂) ausgebildet.

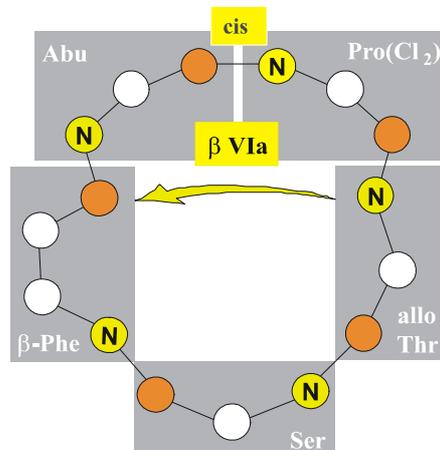


Abbildung 25: Schematische Struktur¹³⁹ von Astin B

In Cyclochlorotin, das sich vom Astin B nur wenig unterscheidet, findet sich die β -Aminosäure in der zentralen Position eines γ -*turns*, der nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert ist. Der komplementäre β I-*turn* wird durch eine Wasserstoffbrücke vom Ser H^N zum Ser' CO stabilisiert, im Gegensatz zum Astin B wird hier keine *cis*-Peptidbindung ausgebildet.¹²⁶

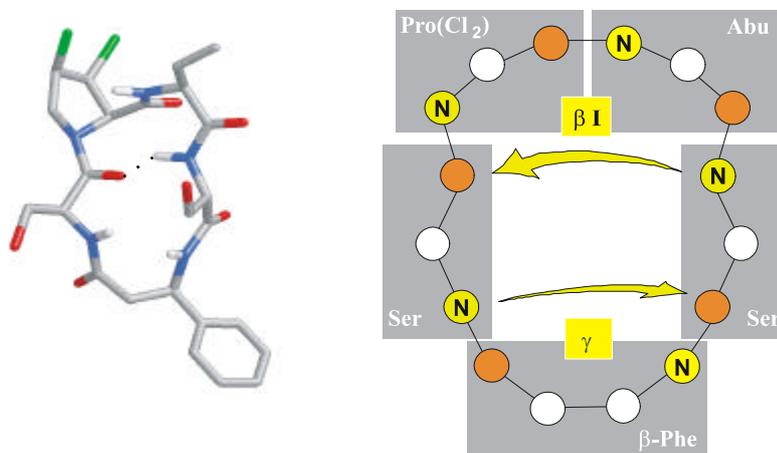


Abbildung 26: Struktur und schematische Struktur¹³⁹ von Cyclochlorotin

Kessler et al. setzten Zuckeraminosäuren¹⁴¹ als Sekundärstrukturmimetika¹⁴² ein. Je nach Stellung der Amino- und Carboxygruppe im Glucopyranosering lassen sich unterschiedliche Sekundärstrukturen nachbilden. So führt die Verwendung von 1-Methoxy-2-glucosamin in Enkephalinen zur Ausbildung linearer Strukturen.^{143,144} Die Verwendung von Aminoglucuronsäuren führt zur Ausbildung von β -*turns*, während die Verwendung von 1-Carboxy-2-amino-

substituierten Zuckern zur Ausbildung von γ -turn-Strukturen führt.

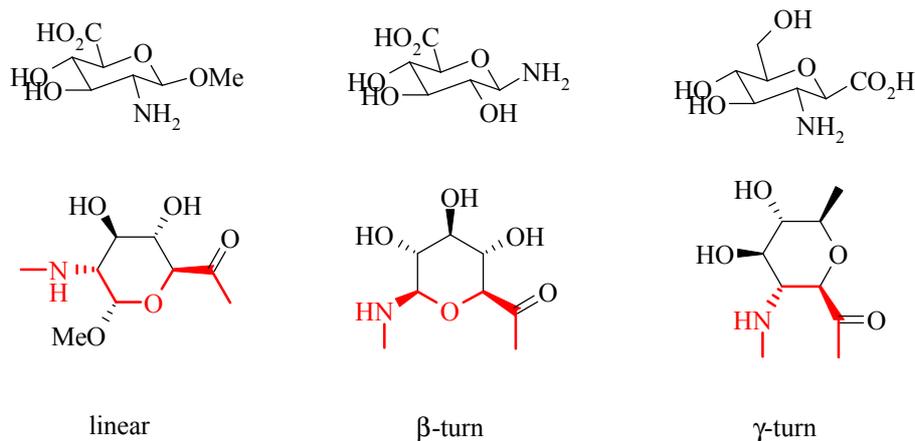


Abbildung 27: Zuckeraminoacide und induzierte Sekundärstrukturen

Der Einbau der 1-Glucosamine in ein cyclisches Pentapeptid mit der Sequenz c-(-Ala-D-Pro-Ala-Ala-SAA-) (SAA: Zuckeraminoacide) führt zur Ausbildung eines β -turns mit D-Pro in der Position $i+1$ sowie eines komplementären pseudo- β -turns mit der SAA in der zentralen Position.

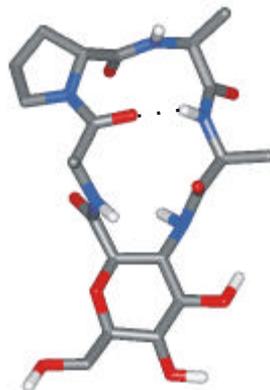


Abbildung 28: Struktur¹³⁹ von c-(-Ala-D-Pro-Ala-Ala-SAA-)

Pavone et al. untersuchten in den 1990iger Jahren intensiv das konformationelle Verhalten von β -Alanin-enthaltender cyclischer Tetra-, Penta- und Hexapeptide.

Die Röntgenkristallstruktur des Tetrapeptids c-(-Pro-Phe- β -Ala- β -Ala-) zeigt einen β -turn, in dem Prolin in Position $i+1$ auftaucht. Die Stabilisierung erfolgt durch eine Wasserstoffbrücke, die zwischen dem Amidproton des ersten und der Carboxylgruppe des zweiten β -Ala ausgebildet wird.¹⁴⁵

Auch das analoge Pentapeptid c-(-Pro-Pro-Phe- β -Ala- β -Ala-) zeigt in der Röntgenkristall-

struktur einen β -turn mit Pro in der Position $i+1$, der durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird.¹⁴⁶

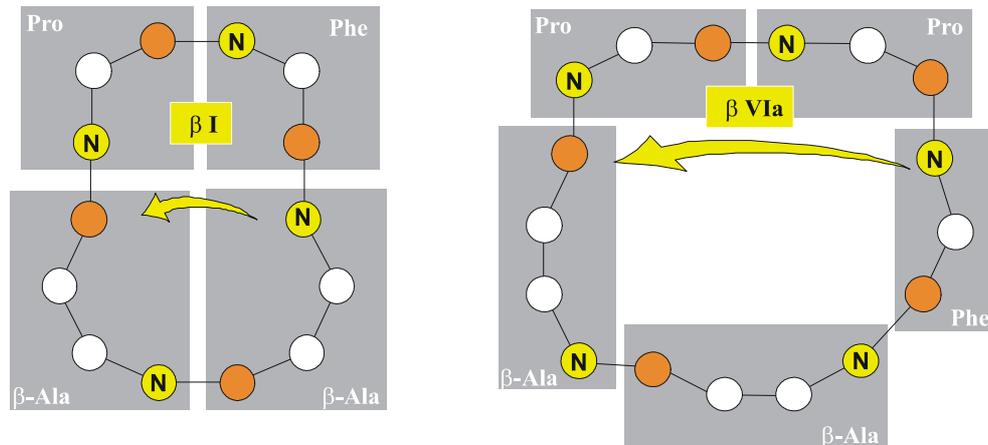


Abbildung 29: Schematische Struktur¹³⁹ der Peptide c-(PF β A β A) und c-(PPF β A β A)

Sowohl im Festkörper wie auch in Lösung zeigt das Tetrapeptid c-(-Pro- β -Ala-Pro- β -Ala-) zwei gegenüberliegende γ^i -turns, bei denen sich die Proline in der jeweiligen $i+1$ -Position befinden.¹⁴⁷

Im Gegensatz dazu zeigt die Kristallstruktur des Tetrapeptids c-(- β -Ala-Pro- β -Ala-Val-) keine Stabilisierung durch intramolekulare Wasserstoffbrücken, sondern es werden intermolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet. Im Kristall sind zwei Konformere, die Unterschiede im Val- β -Ala-Bereich aufweisen, alternierend in Reihen entlang einer Vorzugsrichtung angeordnet. MD-Vakuumsimulationen zeigen jedoch eine dem c-(-Pro- β -Ala-Pro- β -Ala-) analoge Struktur mit zwei γ^i -turns.¹⁴⁸

Bei allen diesen Strukturen tauchen die β -Ala-Reste nie in den Positionen $i+1$ und $i+2$ von turn-Strukturen auf.

Diese Vermutung wird auch durch Untersuchungen am cyclischen Hexapeptid c-(-Pro-Phe- β -Ala-Phe-Phe- β -Ala-) gestützt. Hier liegen die β -Alanine jeweils in der Position i der komplementär ausgebildeten β - bzw. Pseudo- β -turns. Wie schon in den anderen Peptiden nimmt das Prolin wieder die Position $i+1$ ein. NMR-Untersuchungen in DMSO-D₆ zeigen eine langsame *cis/trans*-Isomerisierung der β -Ala-Pro-Peptidbindung. Der Einbau von zwei flexiblen β -Alaninresten erhöht die Flexibilität des Hexapeptids, ohne dass das erwartete *turn*-Muster gestört wird.¹⁴⁹

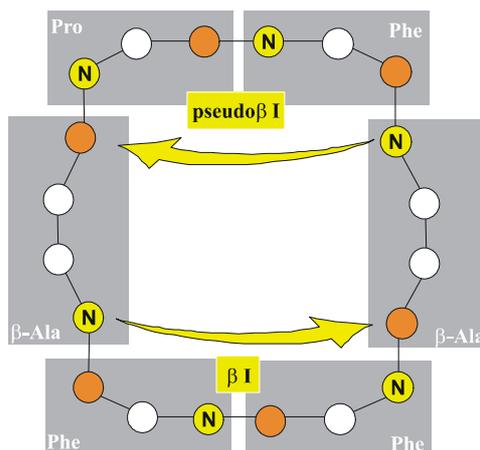


Abbildung 30: Schematische Struktur¹³⁹ von c-(-Pro-Phe-β-Ala-Phe-Phe-β-Ala)

Austausch eines Phe zum Pro führt zum symmetrischen Hexapeptid c-(-Pro-Phe-β-Ala-Pro-Phe-β-Ala-). Röntgenkristalluntersuchungen ergeben auch hier einen βII- und einen komplementären pseudo-βII-*turn*. In Lösung (DMSO-D₆) und während der Moleküldynamiksimulation im Vakuum wird neben der *cis-trans*-Isomerie der β-Ala-Pro-Bindung ein zusätzliches Gleichgewicht des μ -Winkels in einem der β-Ala-Reste gefunden. Dies führt zu zwei Konformationsfamilien, einer C₂-symmetrischen mit *anti*-Einstellung beider μ -Winkel und einer asymmetrischen mit *syn*-Orientierung des μ -Winkels.¹⁵⁰

Untersuchungen an c-(-Pro-Phe-Phe-β-Ala-β-Ala-) zeigen, dass β-Ala zwar sehr wohl in den zentralen Positionen von *turns* auftreten kann, dies ist jedoch mit der Sequenz dieses Peptides zu erklären, bei der die Ausbildung von *turn*-Strukturen zwangsläufig dazu führen muss, dass, wenn sich ein β-Ala in der Position *i* eines *turns* befindet, sich das andere nur in der Position *i*+1 dieses oder der letzten zentralen Position des komplementären *turns* befinden muss. Im Festkörper wird eine C₁₁- und eine C₁₂-Ringanordnung beobachtet, bei der sich das eine β-Ala in der *i*+2-Position eines erweiterten βII-*turns* befindet. In Lösung (CD₃CN; DMSO-D₆) wird dann der erwartete C₁₃-Ring (Ausbildung eines α-*turn*) mit Pro-Pro-Phe in den zentralen Positionen gefunden. In CD₃CN wird hierbei ein α_{RS}-II-*turn* und dagegen in DMSO-D₆ ein α_{RS}-I-*turn* ausgebildet.^{151,152}

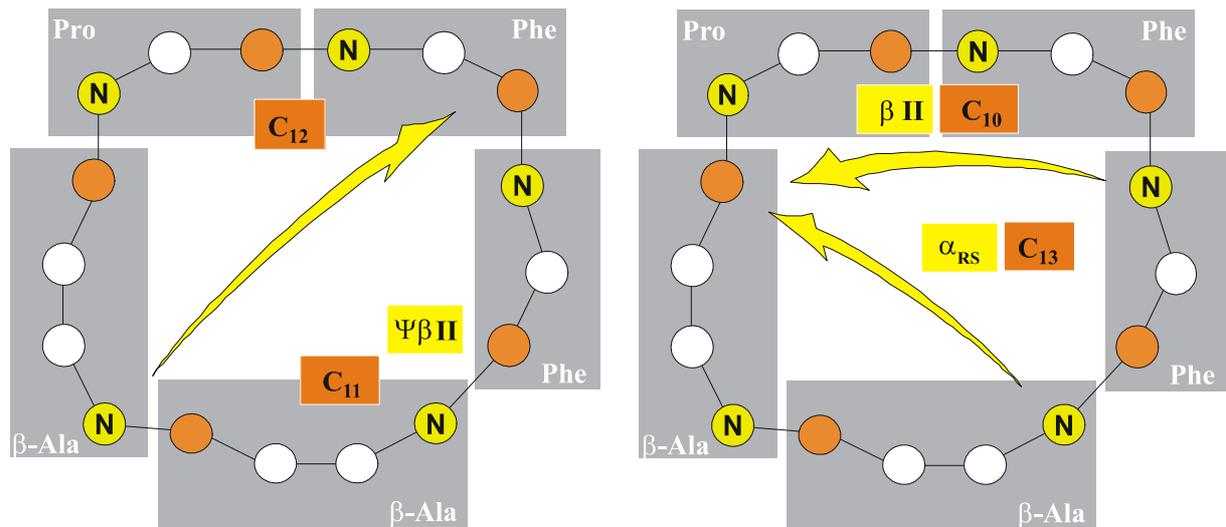


Abbildung 31: Schematische Struktur von c-(PFF^βA^βA) im Festkörper und in Lösung

Insgesamt ist festzustellen, dass das β -Alanin offenbar wenig dominierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur von cyclischen Peptiden besitzt.

Schumann et al.^{139,153} untersuchten den Einfluss von β -Aminosäuren auf die Konformation cyclischer RGD-Peptide, um das sekundärstrukturinduzierende Potential der β -Aminosäuren zu untersuchen. Ausgehend von einer Reihe literaturbekannter cyclischer RGD-Peptide wurden verschiedene β -Aminosäuren eingebaut und ihre Strukturen mittels NMR- und *Molecular modeling*-Studien untersucht. Es zeigt sich, dass der Einbau in der Regel zu Konformationen führt, in denen die β -Aminosäure die zentrale Position eines um ein Kohlenstoffatom erweiterten γ -turns einnimmt.

In cyclischen Hexapeptiden führt der Einbau von β -Homoaminosäuren zu einer höheren Flexibilität der Konformation, so dass die in Lösung gefundene Struktur, die sich von der Struktur bekannter Inhibitoren unterscheidet, vermutlich durch einen *induced fit* an unterschiedliche Rezeptorgeometrien anzupassen vermag.

In Pentapeptiden ist die pharmakophore Region der RGD-Peptide bei Verwendung von β -Leucin anstelle des Valins beim literaturbekannten¹⁵⁴ $\alpha_V\beta_3$ -Antagonisten c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) nicht betroffen, so dass davon auszugehen ist, dass β -Leucin die Sekundärstruktur entweder nicht beeinflusst oder die bestehende Struktur stabilisiert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei den Strukturen der Peptide c-(-Arg-Gly-Asp- β -D-Phe-Val-), c-(-Arg-Gly-Asp- β -D-HPhe-Val-) und c-(-Arg-Gly-Asp- β -D-Phe-Val-) gemacht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den untersuchten Tetra- und Pentapeptiden die β -Aminosäure den Einfluss der in der Regel strukturinduzierenden D-Aminosäure vermindert, dass die β -Aminosäure bevorzugt in der Position $i+1$ eines γ -turns auftaucht und dass Verände-

rungen der Konformation der β -Aminosäure (D, L) wenig Einfluss auf die induzierte Sekundärstruktur haben.

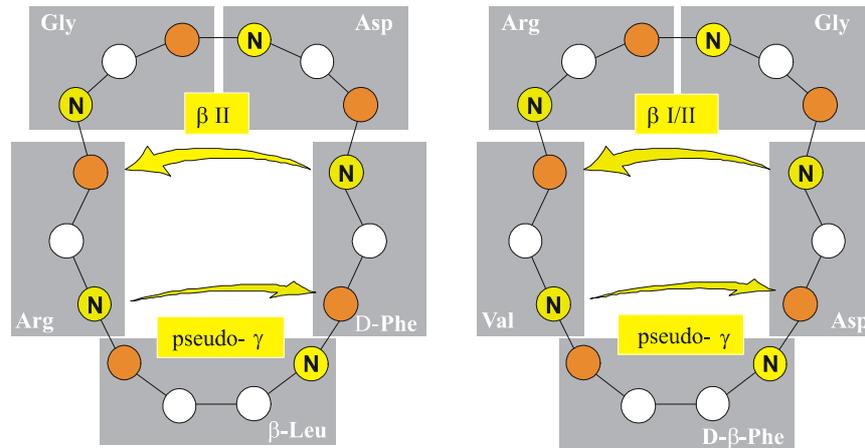


Abbildung 32: Schematische Struktur¹³⁹ von $c\text{-(RGDf}^{\beta}\text{L)}$ und $c\text{-(RGDf}^{\beta}\text{V)}$ in Lösung

Untersuchungen an Modellpeptiden^{155,156} mit β -Homoprolin als mögliches strukturgebendes Element im Peptid $c\text{-(-Ala-Val-}\beta\text{-HPro-Phe-Gly-)}$ zeigen, dass auch hier die β -Aminosäure die zentrale Position eines γ -turns einnimmt. In DMSO existiert daneben noch eine Konformation, in der sich das β -HPro in der Position $i+1$ eines Pseudo- β -turns befindetet.

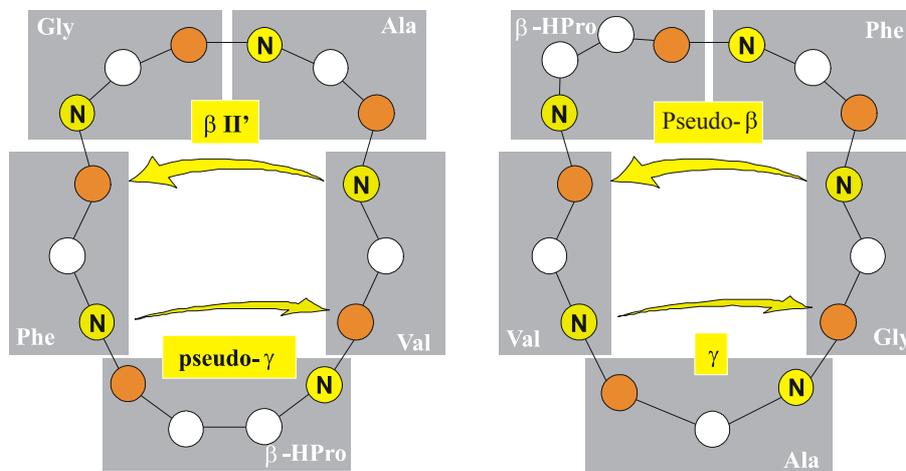


Abbildung 33: Schematische Struktur beider Konformere von $c\text{-(AV}^{\beta\text{H}}\text{PFG)}$ in DMSO

2.1.7 Biologische Stabilität

Eines der größten Probleme bei der Verwendung von Peptiden als Medikamente ist die mangelnde Stabilität gegenüber den in allen Geweben vorhandenen Proteasen. Die Einführung von einzelnen nicht proteinogenen Aminosäuren wie etwa D-Aminosäuren ist ein möglicher Ausweg, da diese von Proteasen nicht erkannt werden. Bereits 1928 schlossen Abderhalden et al.^{157,158} aus der Struktur der β -Aminosäuren auf ihre Stabilität gegenüber enzymatischer Spal-

tung. Untersuchungen von Seebach et al.^{159,160} zeigen, dass Peptide, die allein aus β - oder γ -Aminosäuren aufgebaut sind (sog. β - bzw. γ -Peptide) sowohl gegenüber unterschiedlichen Proteasen als auch gegenüber Mikroorganismen eine erhöhte biologische Stabilität zeigen.

Auch die Cyclisierung von Peptiden ist eine Strategie zur Erhöhung der metabolischen Stabilität. Cyclische Peptide, die eine β -Homoaminosäure enthalten, unterliegen einem verminderten Metabolismus.^{161,162}

Besonders *turns* sind potentielle Angriffspunkte für die Hydrolyse von Proteinen, da sie oft auf der Oberfläche gefunden werden.^{163,164} Daher verspricht gerade die Verwendung von β -Aminosäuren als *turn*-Mimetika Erfolge bei der Stabilisierung von Proteinen gegenüber proteolytischen Enzymen.¹⁶⁵ Die Umwandlung eines Asn-Pro-Motivs in ein β -Pip- β -Pip-Motiv in der Ribonuclease A führt zu einer gesteigerten konformationellen Stabilität ($\Delta T_m = 1.2 \pm 0.3$ K) ohne Veränderung der Ribonucleaseaktivität.

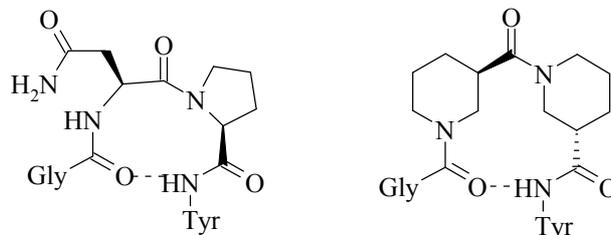


Abbildung 34: *turn*-Mimetikum für die Ribonuclease A

2.2 Integrine

Zellen bilden Verbindungen aus, die die Kommunikation zwischen ihnen ermöglichen. Eine wichtige Funktion ist dabei die Adhäsion der Zellen. Sie wird durch unterschiedliche Zelladhäsionsmoleküle (CAM für *Cell Adhesion Molecule*) vermittelt. Die CAMs umfassen die Selektine, die Integrine, die Cadherine sowie die Immunglobuline.¹⁶⁶ Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder Proteinen und Kohlenhydraten (bei Selektinen und einigen Immunglobulinen) bilden die molekulare Basis der Zelladhäsion. Kooperation mit den Zelloberflächen führt zu vielfältigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Letztere spielen nicht nur für die Stabilität, sondern auch bei der Wanderung und bei der Aktivierung von Signalwegen eine Rolle. Sie wird besonders von der Familie der Integrine vermittelt.

2.2.1 Aufbau und Struktur

Integrine sind die vielfältigste und zahlenmäßig größte Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen. Sie interagieren sowohl mit Proteinen der extrazellulären Matrix, als auch mit Proteinen auf der Oberfläche anderer Zellen. Sie sind transmembrane Glycoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Die Untereinheiten sind nichtkovalent in einem heterodimeren Komplex miteinander verbunden.

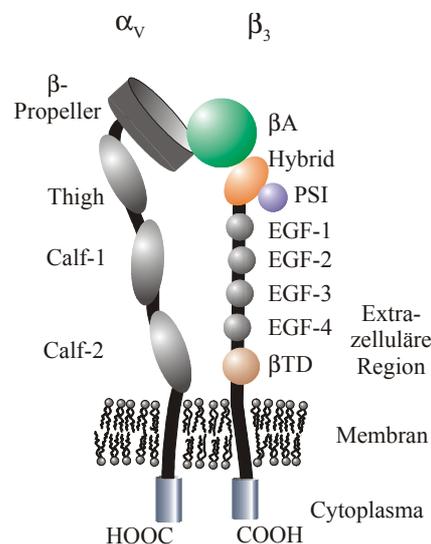


Abbildung 35: Schematische Darstellung eines Integrins¹⁶⁷

Die α -Untereinheit enthält zwischen 1000 und 1150 Aminosäuren, die β -Untereinheit besteht aus 730 bis 800 Aminosäuren. Beide Untereinheiten verfügen über eine lange extrazelluläre Domäne, eine kurze Transmembrandomäne (ca. 20 – 30 AS) und eine cytoplasmatische Domäne (20 – 50 AS). Der C-Terminus der β -Untereinheit verbindet den Rezeptor über intrazelluläre Proteine mit dem Cytoskelett. Integrine verbinden damit die extrazelluläre Matrix mit

dem Cytoplasma und übertragen Signale in zwei Richtungen.¹⁶⁸

- Beim *Outside-In-Signalling* induziert die Ligandenbindung ein *Clustering* der Integrine in der Zellmembran. Die sich bildenden dynamischen Strukturen werden als *Adhesive Focal Contacts* bezeichnet. Damit greifen Integrine in die Regulation intrazelluläre Prozesse wie die Reorganisation des Cytoskeletts oder die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen ein. Auch beim Ionentransport, dem Lipidstoffwechsel und der Genexpression spielt dieser Signalweg eine Rolle.
- Das *Inside-Out-Signalling* induziert die Fähigkeit, extrazelluläre Liganden zu binden. Mit diesem Signalweg wird sowohl die Affinität, als auch die Bindung über multivalente Wechselwirkung der Integrine zu Liganden gesteuert.

Die β -Untereinheit ist für die Signalübertragung zuständig, während die α -Untereinheit die Spezifität der Wechselwirkung mit den Liganden steuert.¹⁶⁹ Mindestens 18 unterschiedliche α - und 8 unterschiedliche β -Untereinheiten sind in Säugetieren bislang bekannt, die mehr als 25 verschiedene Kombinationen ergeben. Besonders die α -Untereinheiten assoziieren mit verschiedenen β -Untereinheiten. Man unterscheidet drei Hauptfamilien.

- β_1 -Integrine, auch als *Very Late Antigens* (VLA) bezeichnet. Sie steuern vorwiegend die Wechselwirkungen von Zellen mit der extrazellulären Matrix.
- β_2 -Integrine finden sich auf Leukozyten und regulieren Immunreaktionen.
- β_3 -Integrine werden auch als Cytoadhäsine bezeichnet und spielen eine Rolle bei Tumorzell-Adhäsion, Angiogenese und Blutplättchenaggregation.

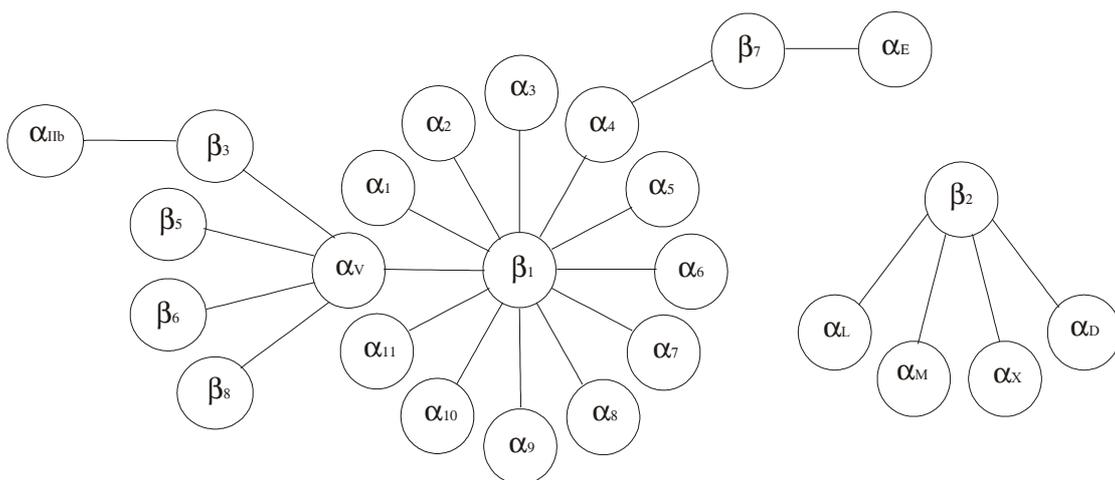


Abbildung 36: Integrin-Superfamilie

An jedes Integrin binden ein oder mehrere spezifische Liganden. Eine Übersicht über die wichtigsten ist in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Integrine und ihre Liganden^{166,168}

Integrin	Liganden
$\alpha_1\beta_1$	Kollagene, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	Kollagene, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	Kollagene, Laminin, Fibronectin
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin, L1
$\alpha_6\beta_1$	Laminin
$\alpha_7\beta_1$	Laminin
$\alpha_8\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin, Tenascin
$\alpha_V\beta_1$	Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin
$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha_M\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, Fibrinogen, Faktor X, iC3b, Vitronectin, Thrombospondin
$\alpha_X\beta_2$	Fibrinogen, iC3b
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, vWF
$\alpha_V\beta_3$	Vitronectin, Fibronectin, vWF, Fibulin, Thrombospondin, Tenascin, Osteopontin, Fibrillin, Gelatin
$\alpha_6\beta_4$	Laminin
$\alpha_V\beta_5$	Vitronectin, Osteopontin
$\alpha_V\beta_6$	Fibronectin, Vitronectin
$\alpha_4\beta_7$	VCAM-1, MAdCAM-1, Fibronectin

ICAM: *InterCellular Adhesion Molecule*; VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule*; MAdCAM: *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*; iC3b: *Inactiv Complement Faktor 3*; vWF: von Willebrand Faktor

Für die Aufklärung der Interaktion zwischen Integrinen und ihren Liganden sind genaue Kenntnisse der Wechselwirkung auf molekularer Ebene notwendig. Allerdings ist erst vor kurzem die erste Röntgenkristallstruktur des Integrins $\alpha_V\beta_3$ von Xiong et al.¹⁷⁰ in einer Auflösung von 3.1 Å veröffentlicht worden, die die gesamte extrazelluläre Domäne zeigt. 90 % aller Aminosäuren konnten lokalisiert werden, die Bindung von sechs Ca^{2+} -Ionen sowie elf Glykosylierungsstellen wurden aufgefunden.

Oft wird die α -Untereinheit von zwei Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind, ausgebildet. Am *N*-terminalen Ende findet sich ein charakteristisches Domänenmuster, das aus sieben Wiederholungen (*repeats*) von je ca. 60 Aminosäuren besteht, wobei die letzten Domänen als Ca^{2+} -Bindungsstellen fungieren. Springer¹⁷¹ sagte deshalb voraus, dass die *N*-terminale Domäne einen siebenblättrigen β -Propeller ausbildet. Ein β -Propeller bezeichnet eine Supersekundärstruktur, in der zwischen vier und acht Faltblätter rotationssymmetrisch um eine Achse angeordnet sind. In einigen Integrinen (α_1 , α_2 , α_L , α_M) ist eine ca. 200 Amino-

säuren umfassende α A-Domäne zwischen den *repeats* 2 und 3 inseriert. Die Röntgenstrukturanalyse verifiziert die Vermutung Springers, es bildet sich ein „Kopf“, der mit einer Größe von 9 nm * 6 nm * 4.5 nm beeindruckende Dimensionen aufweist. Auf der Unterseite des Propellers sind die Ca^{2+} -Bindungsstellen lokalisiert. Der „Schwanz“ der α -Untereinheit besteht aus drei β -Sandwich-Domänen (*Thigh*, *Calf-1*, *Calf-2*), die durch eine flexible Einheit miteinander verknüpft sind. Die β -Untereinheiten zeigen eine relativ höhere Sequenzanalogie. Sie enthalten nahe der Transmembranregion cysteinreiche Domänen (Cysteinanteil nahe 20 %) in Form von vier hochkonservierten *repeats* (EGF-Motiv, EGF: *Epidermal Growth Factor*) die aus jeweils 30 bis 40 Aminosäuren bestehen. Weitere Domänen sind die Hybriddomäne, die PSI-Domäne und eine Cystatin-ähnliche β -*tail*-Domäne.

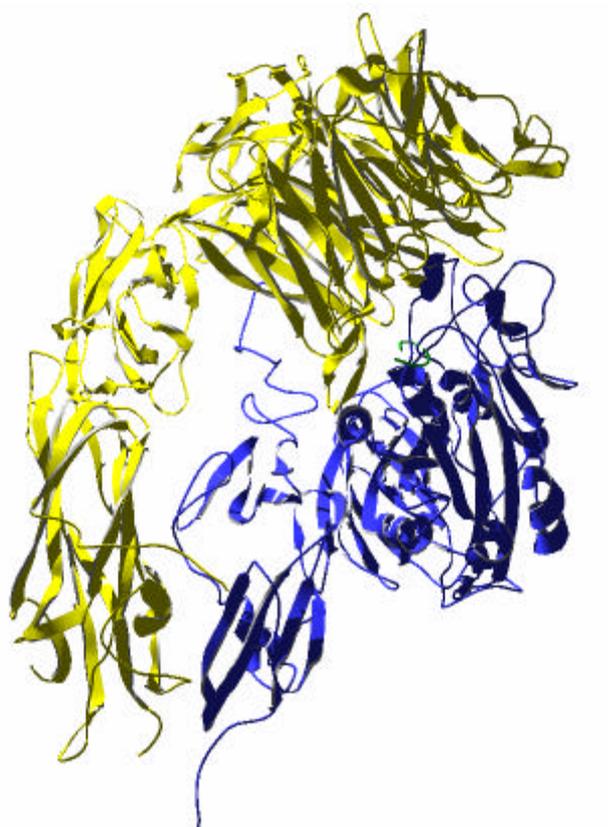


Abbildung 37: Sekundärstruktur des Integrins $\alpha_v\beta_3$, α -Kette: gelb, β -Kette: blau¹⁷⁰

2.2.2 Zellerkennungssequenzen

Adhäsionsspezifische Erkennungssequenzen bilden die molekulare Grundlage für viele Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. In der Regel sind kurze Peptidsequenzen für die Bindung der Zelladhäsionsmoleküle an die Integrine verantwortlich. Wichtig ist besonders die Tripeptidsequenz –Arg–Gly–Asp– (RGD), die u. a. von den Integrinen mit den Untereinheiten α_v , α_{IIb} , α_5 und α_8 erkannt wird. Sie wird von vielen Proteinen der extrazellulären Matrix präsentiert

und fungiert als zentrales Erkennungsmotiv. So ist allein dieses Tripeptid für die Bindung des Fibronectins verantwortlich, das aus über 2500 Aminosäuren aufgebaut ist.¹⁷² Auf der Oberseite der β_3 -Einheit befindet sich eine Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (*Metal Ion-dependent adhesion site*, MIDAS). Verantwortlich für die Bindung des Ca^{2+} -Ions ist vermutlich die Carboxylgruppe des Aspartats.¹⁶⁶ Weitere Erkennungssequenzen¹⁶⁸ sind die Triade –Leu–Asp–Val–, die für die Adhäsion des Fibronectins an das Integrin $\alpha_4\beta_1$ verantwortlich ist, –Leu–Asp–Thr–, das die Bindung an das Integrin $\alpha_4\beta_7$ verursacht oder auch längere Sequenzen wie –Tyr–Tyr–Gly–Asp–Leu–Arg– ($\alpha_2\beta_1$) oder –Lys–Gln–Ala–Gly–Asp–Val– ($\alpha_{IIb}\beta_3$).

Zahlreiche Gruppen haben Peptide synthetisiert, die Zellerkennungssequenzen mimikrieren. So können immobilisierte Peptide den Kontakt von Implantaten mit dem umgebenden Gewebe verbessern,¹⁷³ während lösliche Peptide die Bindung von Adhäsionsmolekülen hemmen können. Entscheidende Arbeiten bei der Entwicklung niedermolekularer Integrin-Antagonisten leisteten besonders Kessler et al. Basierend auf Kenntnissen über Aktivität, Selektivität und dreidimensionaler Struktur des Pentapeptids c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) wurden umfangreiche Struktur-Aktivitätsbeziehungen ermittelt und so gezielt selektive Antagonisten des Integrins $\alpha_v\beta_3$ entwickelt.¹⁷⁴

Zur Vermeidung der Aggregation von Blutplättchen und damit von Thrombosen spielten vor allem Untersuchungen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine entscheidende Rolle. Dieser Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei der primären und sekundären Hämostase. Er vermittelt bei vaskulären Defekten die Anlagerung von Blutplättchen an kollagene Bindegewebsfasern der Wundränder und die Aggregation von Blutplättchen über das Fibrinogen, was zur Pfropfbildung und letztlich zum Wundverschluß führt. Abweichungen von diesem empfindlichen Gleichgewicht können Embolie, Schlaganfall oder Herzinfarkt zur Folge haben.¹⁷⁵ Das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin wird darüber hinaus auch auf verschiedenen Tumorzellen (z.B. Colon-Adenokarzinom, Prostata-Adenokarzinom, Melanom) exprimiert.^{176,177}

Die α_{IIb} -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von etwa 145 kDa und ist aus insgesamt 1008 Aminosäuren aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne weist vier repeat-Segmente aus etwa 65 Aminosäuren auf, ähnlich den charakteristischen Ca^{2+} -Bindungsstellen des Calmodulins.^{178,179} Anhand von Homologieuntersuchungen wird auch für diese Region ein β -Propeller postuliert.¹⁷¹ Für die α_{IIb} -Untereinheit wurden drei stabilisierende Disulfidbrücken identifiziert.¹⁸⁰ Die kleinere β_3 -Untereinheit mit etwa 90 kDa Molekulargewicht besteht aus 788 Aminosäuren einschließlich einem 26 Reste langen N-terminalen Signalpeptid. Sie besitzt einen großen cysteinreichen Bereich (56 Cysteine), der eine Reihe von Disulfidbrücken enthält.¹⁸¹ Durch physiologische Agonisten (ADP, Thrombin) wird der Rezeptor stimuliert und bildet die für die

Ligandenbindung erforderliche Konformation aus.^{182,183} Das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin bindet selektiv RGD (-Arg-Gly-Asp-). Der Bindungsbereich für RGD scheint auf der β_3 -Einheit zwischen der Aminosäure 109 und 171 und auf α_{IIb} zwischen Aminosäure 294 und 314 lokalisiert zu sein.^{184,185} Zur Behandlung von Thrombosen sind erste niedermolekulare Wirkstoffe auf der Basis der RGD-Sequenz bereits auf dem Markt, auch Peptidomimetika, in denen die pharmakophoren Gruppen in nicht bioabbaubarer Form präsentiert werden, sind erhältlich.

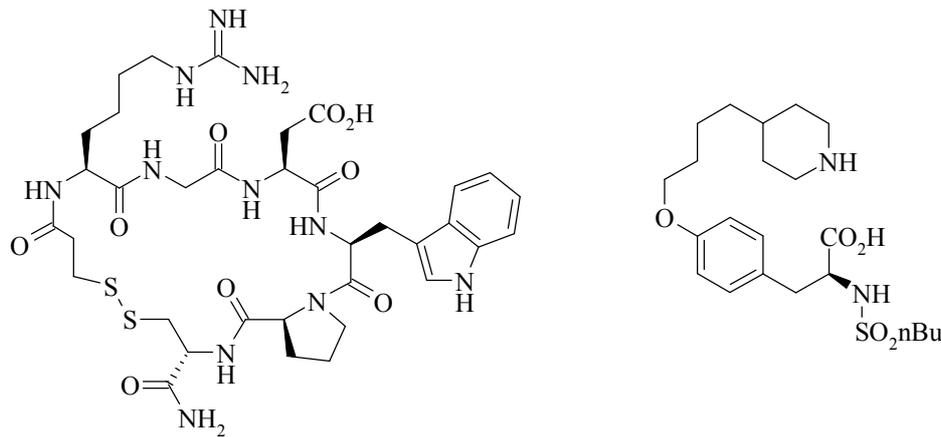


Abbildung 38: Eptifibatid und Tirofiban, zwei $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten

Die Regulation von Angiogenese,¹⁸⁶ Tumormetastasierung und Phagozytose, die vom Integrin $\alpha_V\beta_3$ vermittelt wird, steht im Mittelpunkt neuerer Forschungen. $\alpha_V\beta_3$ ist aus einer ca. 120 – 180 kDa großen α -Untereinheit mit 3 oder 4 Ca^{2+} -Bindungsmotiven und einer kürzeren β -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 90 – 110 kDa aufgebaut. Natürliche Liganden sind neben den für $\alpha_{IIb}\beta_3$ charakteristischen Matrixproteinen u. a. auch Tenascin,^{187,188} denaturiertes Kollagen Typ I, Vitronectin und Osteopontin.¹⁸⁹ Ziel ist es, die Angiogenese durch RGD-Peptide oder Peptidomimetika zu beeinflussen.^{190,191} Alternative Ansätze zielen auf die Hemmung der Wechselwirkungen zwischen dem Integrin $\alpha_V\beta_3$ und der Matrixmetalloprotease MMP-2.¹⁹² Ein weiteres RGD-bindendes Integrin ist $\alpha_5\beta_1$. Die Interaktion zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und seinem natürlichen Liganden Fibronectin ist für die Anordnung der extrazellulären Matrix und für die Zelladhäsion von essenzieller Bedeutung.^{193,194} So führt das Fehlen von Fibronectin oder dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin zum frühzeitigen Tod von Embryonen, was die Wichtigkeit dieser Interaktion für die Säugarentwicklung unterstreicht.^{195,196} Darüber hinaus ist das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in Zellmigration,¹⁹⁷ Regulierung des Zellwachstums,¹⁹⁸ sowie Aktivierung und Proliferation von T-Zellen involviert.¹⁹⁹

2.3 ADAMs

ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*), auch als MDC-Proteine (*Metalloprotease-Disintegrin-Cysteine-rich*) bezeichnet, gehören zur Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Derzeit sind 34 Mitglieder bekannt, die in unterschiedlichen Organismen gefunden wurden.²⁰⁰

2.3.1 Aufbau

Sie besitzen eine Multidomänenstruktur und sind Typ-I-Transmembranproteine.^{201,202} Die Ectodomäne besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu Typ-III *Snake Venom MetalloProteases* (SVMPs) mit einer Metalloprotease-, einer Disintegrin- und einer cysteinreichen Domäne. Darüber hinaus verfügen ADAMs über zusätzliche EGF-*repeats* und einen variablen cytoplasmatischen Teil. Die ADAMs 11, 12, 17 und 28 existieren darüber hinaus auch in löslicher Form und enthalten dann Thrombospondin-artige *repeats*.²⁰³

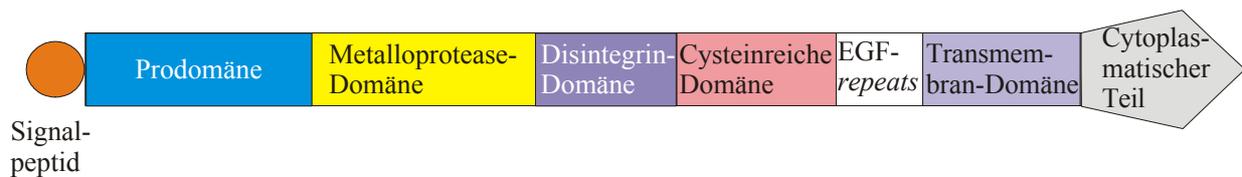


Abbildung 39: Domänenstruktur von ADAMs

ADAMs gehören zur Superfamilie der Zink-Proteasen. Nahezu die Hälfte aller ADAMs enthält ein konserviertes Sequenzmotiv, das im katalytischen Zentrum der Metalloproteinase-Domäne auftaucht. Es hat die Sequenz HEXXHXXGXXH. Auch in membranständigen MMPs (MT-MMPs) tritt dieses Motiv auf. Beide Klassen werden zur Superfamilie der Metzincine gezählt.²⁰⁴ Weitere verbreitete Strukturmerkmale sind die Ausbildung eines β -turns in der *active site*, des sogenannten Met-turns, sowie das Vorhandensein eines Cysteins in der Prodomäne, das mit dem Zink in der *active site* wechselwirkt, was zur Inaktivierung der Proteinase-Aktivität führt.²⁰⁵ Im Allgemeinen werden die Prodomänen durch Furin-artige Pro-Proteinkonvertasen zur Aktivierung abgespalten.²⁰⁶ Ausnahmen bilden die ADAMs 8 und 28, in denen die Prodomäne autokatalytisch entfernt wird. Eine Punktmutation im Bereich der *active site* (E? G,Q) zerstört nicht nur die katalytische Aktivität der ADAMs, sondern verhindert auch die Prozessierung des Pro-Proteins. Im Falle des ADAM 8 spielt auch die Disintegrindomäne eine wichtige Rolle, Proteinvarianten ohne Disintegrindomäne zeigen gleichfalls keine Prozessierung.²⁰⁷

Physiologische Inhibitoren der ADAMs sind bis heute nicht bekannt, jedoch konnte gezeigt

werden, dass die TIMPs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*) gegenüber einigen ADAMs als Inhibitoren wirken.²⁰⁷

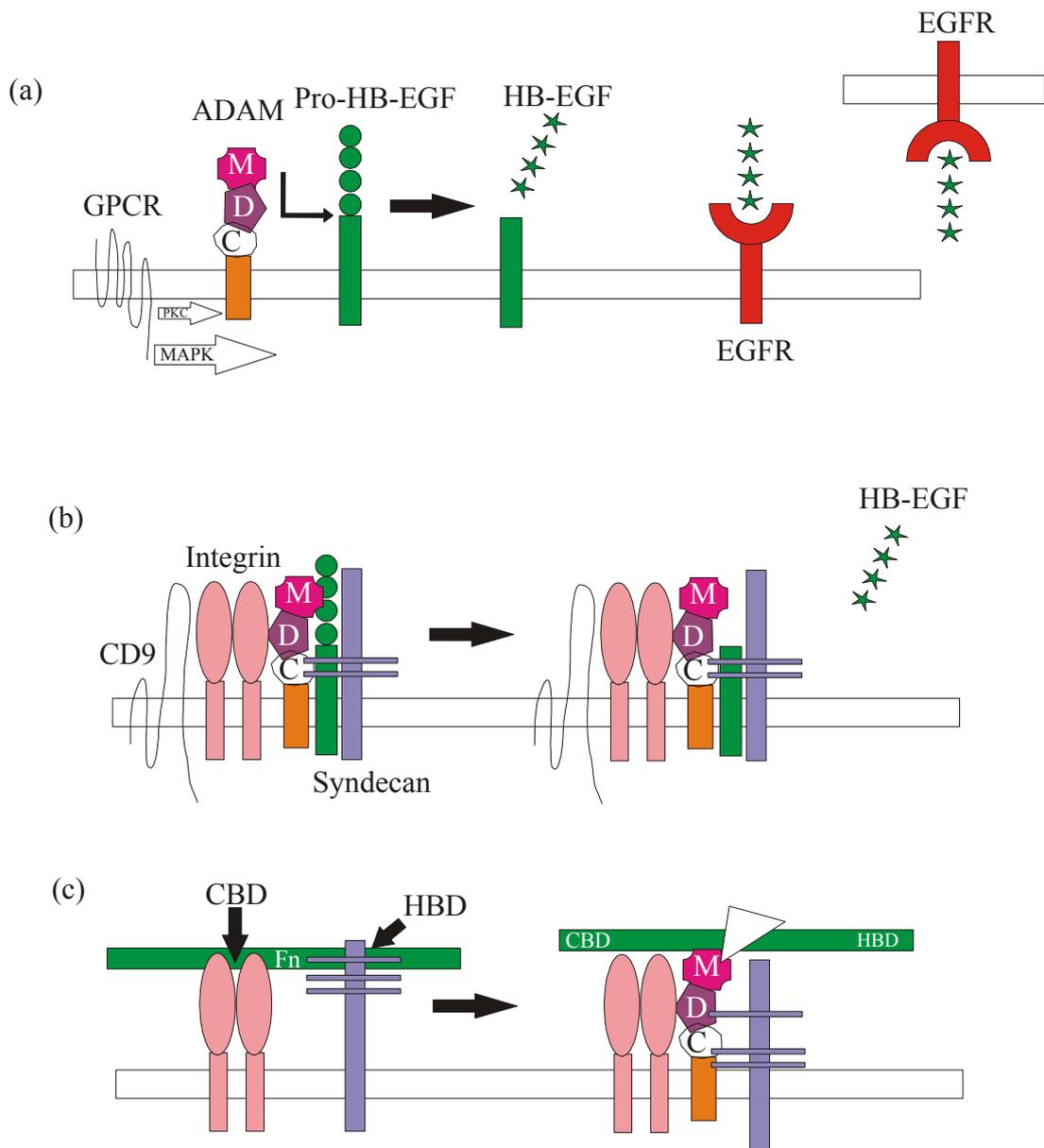
2.3.2 Funktionen

Erstmals beschrieben Black et al.²⁰⁸ 1997 die Spaltung der Prodomäne des TNF- α (*Tumor Necrose Factor α*) durch ADAM 17. Weitere Untersuchungen zeigten die Aktivität von ADAMs gegenüber Zelloberflächenproteinen wie Cytokinen, Rezeptoren oder Zelladhäsionsmolekülen.²⁰⁷ Auch Moleküle der extrazellulären Matrix sind Substrate besonders von löslichen ADAMs. Weiterhin die Aktivierung anderer Proteinase ist bekannt. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass ADAMs an wichtigen physiologischen Prozessen bei der Umwandlung und Signalweiterleitung in der extrazellulären Matrix und besonders im Zentralen Nervensystem (ZNS) teilhaben. Dabei spielen sie sowohl bei der Entwicklung als auch bei Erkrankungen des ZNS eine Rolle.²⁰⁷

Abbildung 40 gibt einen Überblick über unterschiedliche Proteinase-Aktivitäten der ADAMs. Bei (a) ist die Aktivierung des EGF-Rezeptors (*Epidermal Growth Factor*) durch ADAMs gezeigt, die durch Kinasen (z. B. Proteinkinase C, PKC; Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MAPK) aktiviert wurden. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors geschieht dabei sowohl auf der eigenen, als auch auf umgebenden Zellen.

Im Cartoon (b) ist gezeigt, wie durch Unterstützung weiterer Transmembranproteine (Integrine, Syndecane) Komplexe mit dem EGF-Protein gebildet werden. Dabei sorgen die Disintegrin- und die cysteinreiche Domäne für die Bindung der Partner.

Im letzten Cartoon ist ein Modell für die Spaltung der Bindung zwischen Integrinen (Bindung über die Zellbindungsdomäne CBD) bzw. Syndecanen (binden über die Heparin-Bindungsdomäne HBD) und ihren Liganden (im Beispiel Fibronectin, FN) gezeigt. Dabei wirkt das ADAM als Destabilisator der Bindung, indem es durch Aggregation der Rezeptormoleküle (Integrine, Syndecane) Strukturänderungen induziert, die dann zu einer Schwächung und schließlich Spaltung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung führen können.



M: Metalloproteinasedomäne, D: Disintegrindomäne, C: Cys-reiche Domäne

Abbildung 40: Modell für die Proteinasefunktion der ADAMs (vergl. Text)

Die Disintegrindomäne und die cysteinreiche Domäne der ADAMs sind potentielle Bindungsregionen. Die *Snake Venom Disintegrins* tragen in ihrem Disintegrin-loop eine konservierte RGD-Sequenz und binden an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Sie fungieren als kompetitive Inhibitoren der Blutplättchenaggregation und verhindern die Bindung der Blutplättchen an Fibrin.²⁰⁹ Das menschliche ADAM 15 trägt ebenfalls die RGD-Sequenz und ist in der Lage, an die Integrine $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ zu binden.^{210,211} Veränderung in der Nachbarschaft der RGD-Sequenz zeigen, dass nicht nur diese für die Affinität der Bindung verantwortlich ist.²¹²

Eine ganze Anzahl von ADAMs vermag an Integrine zu binden, obwohl sie nicht über die RGD-Sequenz verfügen (Tabelle 4).

Tabelle 4: ADAMs und Integrine als potentielle Bindungspartner²⁰⁷

ADAM	Gebundenes Integrin
ADAM 2	$\alpha_6\beta_1$
ADAM 3	$\alpha_6\beta_1$
ADAM 8	$\alpha_4\beta_1, \alpha_6\beta_1, \alpha_9\beta_1$
ADAM 9	$\alpha_V\beta_5, \alpha_6\beta_1$
ADAM 12	$\alpha_9\beta_1$
ADAM 15	$\alpha_V\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_9\beta_1$
ADAM 23	$\alpha_V\beta_3$

Auch die cytoplasmatische Domäne kann an Proteine binden. So bindet das MAD2-Protein (*Mitotic Arrest Deficient 2*) an ADAM 17 und das verwandte MAD2beta bindet an ADAM 9.²¹³ Über solche Wechselwirkungen vermögen ADAMs somit auch in multiple Signaltransduktionswege einzugreifen.

2.4 *Molecular modeling*

Computersimulationen sind in den letzten Jahren zu einem unverzichtbaren Bestandteil der Aufklärung räumlicher Molekülstrukturen geworden. Sie spielen vor allem beim Design neuer Leitstrukturen und Wirkstoffe eine bedeutende Rolle und ermöglichen das Verständnis der Beziehungen zwischen mikroskopischen Eigenschaften und makroskopischem Verhalten von Molekülen.²¹⁴ Neben Hilfen beim Verständnis der Vorgänge auf mikroskopischen Niveau helfen Simulationen besonders bei der Interpretation experimenteller Ergebnisse, bei der halbquantitativen Abschätzung experimenteller Resultate und bei der Extrapolation von Daten für im Labor nicht oder nur schwer zugängliche Bereiche.

Chemische Fragestellungen mit rechnerischen Methoden zu bearbeiten, setzt voraus, ein Modell der realen Welt zu schaffen und messbare wie auch nicht messbare Systemeigenschaften zu berechnen. Der Vergleich mit dem Experiment bestätigt oder widerlegt dann das gemachte Modell.

Die Behandlung chemischer Systeme ist für die Gasphase und für das kristalline System unproblematisch. In der Gasphase kann das vorhandene Vielteilchenproblem wegen der geringen Dichte auf eines mit wenigen Teilchen reduziert werden; kristalline Festkörper ermöglichen die Reduktion aufgrund ihrer Symmetrie.

Eine einfache Reduktion auf wenige Freiheitsgrade ist für Flüssigkeiten, Makromoleküle, Lösungen oder amorphe Feststoffe nicht möglich. Hier ist die vollständige Behandlung einer Vielzahl von Freiheitsgraden nötig, so dass man auf die numerische Simulation des Systems zurückgreifen muss, die ein statistisches Ensemble der Konfiguration hervorbringt, das den Systemzustand beschreibt.

Zwei wesentliche Probleme treten bei der Computersimulation fluider Systeme auf: Die Größe des Konformationsraumes, der dem Molekülsystem zur Verfügung steht und die Genauigkeit des Kraftfelds, das Verwendung findet. Tabelle 5 gibt eine Modellhierarchie wieder, für die bestimmte Typen von Freiheitsgraden schrittweise entfernt wurden.

Bei Interesse an chemischen Reaktionen ist eine quantenmechanische Behandlung der elektronischen Freiheitsgrade unbedingt erforderlich. Sie ermöglicht die korrekte Berechnung der Energie von Molekülen durch Lösung der Schrödinger-Gleichung. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Born-Oppenheimer-Näherung, die eine separate Betrachtung der Elektronen- von der Kernbewegung erlaubt.²¹⁵ Die Bewegung der Elektronen ergibt sich dabei aus der Wellenfunktion der Atomkernbewegung. Bei dieser Methode steigt die für die Berechnung notwendige Zeit allerdings mindestens mit der dritten Potenz der Zahl der berücksichtigten Atome N_a .

Auf der nächsten Stufe werden die elektronischen Freiheitsgrade aus der Betrachtung ausgeschlossen. Dieses Modell eignet sich z. B. für die Berechnung von Bindungseigenschaften polarer oder geladener Liganden, die den Rezeptor polarisieren. Der Rechenaufwand steigt hier mit N_a . Bei Berücksichtigung lediglich der atomaren Ortsfreiheitsgrade bleibt die Polarisierbarkeit von Atomen unberücksichtigt. Dieses Modell kann zur Betrachtung der Solvatationseigenschaften eines Moleküls verwendet werden. Eine weitere Vereinfachung besteht darin, die Solvensfreiheitsgrade wegzulassen und durch einen Wechselwirkungsterm des gelösten Stoffes mit dem Solvens zu ersetzen. Für die Untersuchung von Proteinfaltungen ist jedoch auch diese Vereinfachung noch nicht groß genug, hier werden ganze Aminosäuren durch ein oder zwei „Kugeln“ dargestellt, so dass die Anzahl der Freiheitsgrade auf 3 bzw. 6 sinkt.

Tabelle 5: Modelle auf verschiedenen Näherungsstufen

Modell	Freiheitsgrade		Beispiele für	
	belassen	entfernt	Vorhersagbare Eigenschaften	Kraftfelder
Quantenmechanisch	Atomkerne, Elektronen	Nucleonen	Reaktionen	Coulomb
Alle Atome polarisierbar	Atome, Dipole	Elektronen	Bindung geladener Liganden	Ionenmodelle
Alle Atome	Atome von Solvens und gelöstem Stoff	Dipole	Hydratation	OPLS, GROMOS, GROMACS
Alle Atome des gelösten Stoffs	Atome des gelösten Stoffs	Solvans	Gasphasenkonformation	MM
Atomgruppen als Kugeln	Atomgruppen	Individuelle Atome	Faltungstopologie von Makromolekülen	LW

Es wird deutlich, dass die Näherungsstufe des verwendeten Modells von den zu untersuchenden Systemeigenschaften abhängt. Die unterschiedlichen, zur Verfügung stehenden Kraftfelder entsprechen dabei unterschiedlichen Näherungsstufen.

2.4.1 Kraftfelder

Für die Simulation des dynamischen Verhaltens kleiner Moleküle werden Simulationstechniken der Molekülmechanik (MM) verwendet, die die potentielle Energie als Funktion der molekularen Geometrie errechnen. Im Gegensatz zur Quantenmechanik wird die Energiehyperfläche hier als analytische Funktion (Kraftfeld) beschrieben, die eine Summation einzelner Wechselwirkungen vornimmt. Die Berechnung der einzelnen Potentiale erfolgt auf der Basis

der klassischen Newton'schen Bewegungsgleichungen. Für ein Kraftfeld aus N Atomen mit der Masse m_i und den kartesischen Ortsvektoren \mathbf{r}_i hat das Kraftfeld folgende Form:

$$\begin{aligned}
 V(r^1, r^2, \dots, r^N) = & \sum_{\text{Bind.}} \frac{1}{2} K_b [b - b_0]^2 + \sum_{\text{Winkel}} \frac{1}{2} K_q [\mathbf{q} - \mathbf{q}_0]^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{ingeschr.} \\ \text{Diederw}}} \frac{1}{2} K_x [\mathbf{x} - \mathbf{x}_0]^2 + \sum_{\text{Diederw}} K_j [1 + \cos(n\mathbf{q} - \mathbf{d})] \\
 & + \sum_{\text{Paare}(i,j)} \left[\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \right] \quad (1)
 \end{aligned}$$

\mathbf{q} : Bindungswinkel; \mathbf{x} : Diederwinkel (*improper dihedrals*); \mathbf{d} : Phasenverschiebung; $C_{12}(i,j)$ und $C_6(i,j)$: Lennard-Jones-Parameter; $q_{i,j}$: Atomladungen; ϵ_0 : elektrische Feldkonstante; ϵ_r : Dielektrizitätszahl

Der erste Term beschreibt die kovalente Bindungsdehnung entlang der Bindung b um die Gleichgewichtslage b_0 als harmonisches Potential (K : Kraftkonstante). Im zweiten Term werden die Dreikörperwechselwirkungen beschrieben, die zur Deformation der Bindungswinkel \mathbf{q} führen. Die beiden nächsten Terme beschreiben die Vierkörperwechselwirkungen, die die Diederwinkel im Molekül beeinflussen: einerseits die eingeschränkten Diederwinkel (z. B. der Winkel \mathbf{w} der Peptidbindung), andererseits die frei rotierbaren Winkel, die durch einen *cosinus*-Term beschrieben werden. Der letzte Term gibt schließlich die Summe der nicht-bindenden Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte oder Coulomb-Wechselwirkungen an (vergl. Abbildung 41).

Für kleine Moleküle wurden von Allinger die Kraftfelder MM2, MM3, MM3PRO usw. eingeführt.²¹⁶ Sie gelten heute als Standard für organische Systeme und berücksichtigen auch p-Orbitale und Wasserstoffbrücken. Zahlreiche Varianten sind in kommerziellen Programmpaketen implementiert. Für Proteine und Nucleinsäuren eignen sich besonders die Kraftfelder AMBER²¹⁷ oder CHARMM,²¹⁸ die darüber hinaus noch spezielle Terme für Wasserstoffbrückenbindungen verwenden.

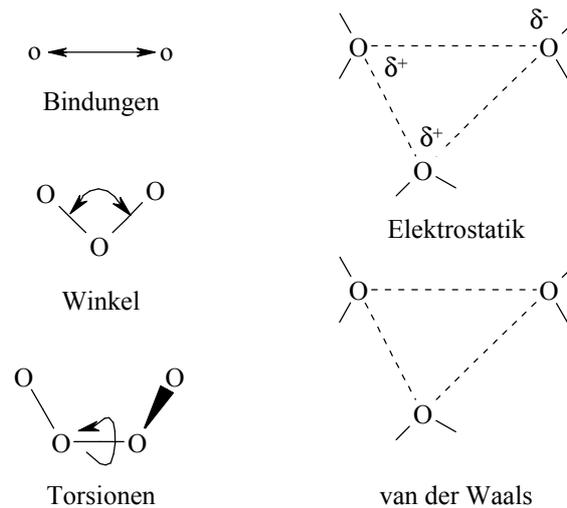


Abbildung 41: Wechselwirkungen, die in Kraftfeldern Berücksichtigung finden

Unterschiede zwischen den einzelnen Kraftfeldern liegen in der Gewichtung und der Verwendung der Wechselwirkungsterme. Zur korrekten Beschreibung eines Systems müssen sie auf die Eigenschaften z. B. einer Substanzklasse kalibriert werden und sollten auch nur für diese benutzt werden. So ist es auch wenig sinnvoll, mit einem Kraftfeld gewonnene Erkenntnisse mit denen eines ähnlichen Moleküls mittels eines anderen Kraftfelds ermittelten zu vergleichen.

2.4.2 Verfahren zur Durchsuchung des Konformationsraums

2.4.2.1 Distanzgeometrie

Die Distanzgeometrie ist eine stochastische, nicht schrittweise ablaufende Methode, die eine unkorrelierte Folge zufälliger Strukturen erzeugt. Sie kreierte aus einem Satz von festgelegten intramolekularen Distanzen, z. B. aus Röntgenstruktur- oder NMR-Daten, eine symmetrische Abstandsmatrix.^{219,220} Diese Matrix beschreibt den vollständigen Konformationsraum, der dem Molekül innerhalb der definierten Grenzen zu Verfügung steht.

Die Distanzgeometrie wird in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden dabei zufällige Strukturen auf der Grundlage der Distanzmatrix generiert und im anschließenden zweiten Schritt mit einem Einbettungsalgorithmus (*embedding*) unter Berücksichtigung der experimentellen Distanzvorgaben in eine Struktur im dreidimensionalen kartesischen Raum umgewandelt.²²¹⁻²²³ Abschließend folgt eine Geometrieoptimierung.

Die Distanzgeometrie ist eine gut geeignete Methode zur Generierung von Startstrukturen u.a. für moleküldynamische Simulationen.

2.4.2.2 *Simulated annealing*

Simulated annealing (SA) ist eine numerische Optimierungstechnik auf der Grundlage thermodynamischer Prinzipien. Es stellt eine Erweiterung des Metropolis Monte Carlo Verfahrens dar, indem Aufheiz- und nachfolgend Abkühlungsschritte eingeführt werden.²²⁴⁻²²⁶ Der Schlüsselschritt dieses Verfahrens ist eine definierte sukzessive Abkühlungsprozedur, die u. U. zum "Einfrieren" der Minimumskonformation und damit zum Erhalt der Konformation des globalen Minimums führt.

2.4.2.3 Moleküldynamik

Bei einer MD-Simulation wird die Evolution des Molekülsystems als Funktion der Zeit (Trajektorie) durch Integration der klassischen Newton'schen Bewegungsgleichungen für alle Atome des Systems verfolgt.

$$\frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (2)$$

$$F_i = \frac{\partial V(r_1 \dots r_N)}{\partial r_i} \quad (3)$$

F_i : auf ein Atom i wirkende Kraft; t : Zeit; $V(r)$: potentielle Energie

Die Kraft F_i ergibt sich aus der Berechnung des Gradienten der potentiellen Energie V als Funktion der Atomkoordinaten r_i . Die Integration wird über kleine Zeitintervalle Δt von ungefähr 1 – 10 fs durchgeführt.

Statistische Gleichgewichtsgrößen sind durch Mittelung über die Trajektorie zugänglich. Um ein repräsentatives Ensemble darzustellen, sollte der Simulationszeitraum hinreichend lang gewählt werden. Eine MD-Simulation ermöglicht durch die im System vorhandene kinetische Energie das Überwinden von Rotationsbarrieren und bei Erhöhung der Temperatur das vollständige Absuchen des Konformationsraumes.²²⁷

Eine spezielle, vor allem in der Konformationsanalyse angewendete Methode ist die *restrained molecular dynamics*-Simulation (RMD). Dieses Verfahren verwendet die aus experimentellen Techniken (NMR) erhaltenen Parameter, wie z. B. Protonenabstände oder Torsionswinkel als Randbedingungen (*restraints*). Die Distanzen bzw. Winkel werden durch Einführung eines zusätzlichen Strafterms im Kraftfeld berücksichtigt.

$$V_{restr.} = \frac{1}{2}k(x - x^0)^2 \quad (4)$$

RMD-Simulationen können zur Analyse der Dynamik von DG-Startstrukturen unter Berücksichtigung der experimentellen Daten dienen.

Eines der Hauptprobleme bei der Simulation molekularer Systeme ist die rechnerische Behandlung der Umgebung. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen die Verwendung expliziter Lösungsmittelmoleküle mit atomarer Auflösung und zum anderen die Beschreibung des Solvens als elektrostatisches Kontinuum. In letzterem Fall wirkt auf das untersuchte Molekül ein gemittelttes Potential über alle möglichen Lösungsmittelkonformationen. Bei Simulationen im Vakuum fehlt der Abschirmeffekt auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ladungen oder Dipolen eines Moleküls völlig. Die realistischste, wenn auch aufwendigste Art, molekulare Dynamik zu simulieren, erfolgt unter Berücksichtigung von diskreten Solvensmolekülen. So konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Wassermolekülen einen im Kontinuum berechneten extremen Potentialabfall ausbalancieren kann.²²⁸ Implizite Lösungsmittelpotentiale, wie sie z.B. im Kraftfeld CHARMM verwendet werden, sind allerdings auch in der Lage, experimentell ermittelte Sekundärstrukturbildungstendenzen von Peptiden zu verifizieren.²²⁹

Für die Erstellung einer Lösungsmittelbox ist es wichtig, die Randeffekte an den Systemgrenzen durch Verwendung periodischer Randbedingungen (*periodic boundary conditions*) zu minimieren. Dies simuliert strenggenommen Kristallbedingungen, da von der zentralen Berechnungsbox periodische Abbilder existieren, die miteinander interagieren könnten. Wird der Abbruchradius (*cut-off*) für nichtbindende Wechselwirkungen jedoch nur halb so groß gewählt wie die Kantenlänge der Box, kann dieser Effekt minimiert werden.²¹⁴ Dabei darf zwischen den einzelnen Boxen keine Wechselwirkung zwischen den Lösungsmittelmolekülen stattfinden, d. h. die Distanz zwischen dem Rand der Box und jedem Atom des Lösungsmittels muss mindestens so groß sein, wie der *cut-off* der nichtbindenden Wechselwirkungen (i. A. 1.4 Å).

2.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie nimmt unter den Methoden zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eine einzigartige Stellung ein, da mit ihr atomar aufgelöste Strukturen in Lösung ermittelt werden können. Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentrationen können in NMR-Experimenten so eingestellt werden, dass sie physiologische Bedingungen nachahmen, zugleich können aber auch extrem unphysiologische Bedingungen z. B. zum Studium von Proteindenaturierungen gewählt werden. Neben der Strukturbestimmung besteht auch die Möglichkeit des Studiums dynamischer Prozesse wie auch struktureller, thermodynamischer oder kinetischer Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Komponenten in der Lösung. Im Jahr 2002 wurde der Nobelpreis für Chemie u. a. für die Arbeiten auf dem Gebiet der NMR-Untersuchungen von Struktur und Funktion in biologischen Makromolekülen an Kurt Wüthrich vergeben.²³⁰

2.5.1 Theoretischer Hintergrund

2.5.1.1 Kerne im Magnetfeld

Atomkerne besitzen eine Substruktur, die näherungsweise als eine Ansammlung von Nukleonen dargestellt werden kann. Sie besitzen Eigendrehimpulse, die sich zum Gesamtdrehimpuls des Kernes aufaddieren. Den Kern kann man sich als einen kleinen "Elementarmagneten" vorstellen.²³¹

Der Kern-Drehimpuls ist eine gequantelte Größe. Der Kern kann daher in einem Magnetfeld nur ganz bestimmte (also nicht beliebige!) Orientierungen einnehmen. Diese Orientierungen werden durch das magnetische Kernmoment m_I charakterisiert. Ein Kern mit der Kernspinzahlnzahl I kann $2I + 1$ Orientierungen einnehmen. m_I geht dann von I bis $-I$ ($I, I-1, I-2, \dots, -I$). Die wichtigsten Kerne in der organischen Chemie sind Spin- $1/2$ Isotope (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P), die allerdings in unterschiedlicher natürlicher Häufigkeit auftreten. Sie können zwei Zustände im Magnetfeld einnehmen. Man bezeichnet den $-1/2$ Zustand als α und den $+1/2$ Zustand als β (s. Abbildung 42).

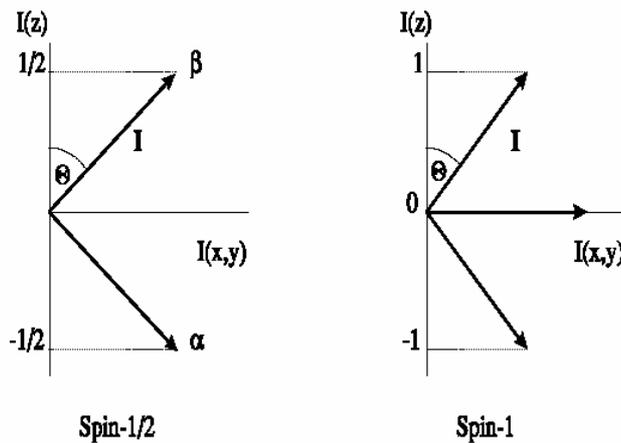


Abbildung 42: Mögliche Orientierungen für Spin-1/2 und Spin-1-Kerne im B-Feld.²³¹

Für das Laborkoordinatensystem wählt man die Richtung des statischen Magnetfeldes (B_0) als die z -Richtung. Für die z -Komponente des Drehimpulses p gilt:

$$p_z = \frac{m_z h}{2p} \quad (5)$$

wobei m_z die Magnetquantenzahl darstellt und h das Planck'sche Wirkungsquantum. Das magnetische Moment μ ist dann:

$$\vec{m} = g \vec{p} \quad (6)$$

$$m = \frac{m_z g h}{2p} \quad (7)$$

g ist eine kernspezifische, gyromagnetische Konstante.

Durch das Einbringen in das statische Magnetfeld B_0 nehmen die Spins die Energie

$$E = -\vec{m} \vec{B}_0 = m B_0 \cos \Theta \quad (8)$$

an. Durch Einsetzen von (7) in (8) erhält man

$$E = \frac{m_z g h B_0}{2p} \quad (9)$$

Für die beiden möglichen Spineinstellungen α und β bekommt man die Energien

$$E_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \frac{\mathbf{g} h B_0}{2 \mathbf{p}} \quad (10a)$$

und

$$E_{-\frac{1}{2}} = -\frac{1}{2} \frac{\mathbf{g} h B_0}{2 \mathbf{p}} \quad (10b)$$

Ihre Energiedifferenz entspricht der sog. Larmorfrequenz. Die Larmorbewegung ist eine Präzession der Spins um das statische Hauptfeld B_0 . Sie kann analog der Bewegung eines Kreisels im Schwerfeld der Erde verstanden werden. Die Energiedifferenz $\Delta E = E_{\frac{1}{2}} - E_{-\frac{1}{2}} = h \nu$ kann als eine Kreisfrequenz $2 \pi \nu$ ausgedrückt werden:

$$\Delta E = \frac{\mathbf{g} h B_0}{2 \mathbf{p}} \quad (11)$$

$$\omega_0 = \mathbf{g} B_0 \quad (12)$$

Dieses ω_0 entspricht der Larmorfrequenz eines Kernes. Es hängt außer vom B_0 -Feld auch vom \mathbf{g} des Kernes ab. Die Resonanzfrequenzen verschiedener wichtiger Kernsorten (Isotopen) bei einer Feldstärke von 14 T sind in Tabelle 6 als Beispiel aufgeführt.

Tabelle 6: Häufigkeiten und Empfindlichkeiten verschiedener Kerne

Kern	γ (relativ)	Resonanzfrequenz (14 T)	Nat. Häufigkeit	Relative Empfindlichkeit
^1H	100	600 MHz	99.98 %	1
^{13}C	25	150 MHz	1.1 %	10^{-5}
^{15}N	-10	60 MHz	0.37 %	10^{-7}
^{19}F	94	546 MHz	100 %	0.8
^{29}Si	-20	119 MHz	4.7 %	10^{-3}
^{31}P	40	243 MHz	100 %	0.07

Wie in Gleichung (11) und (12) zu sehen ist, ist die Energiedifferenz direkt proportional zur Feldstärke B_0 .

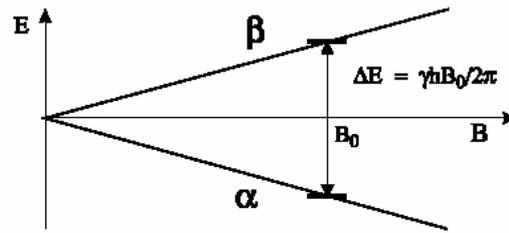


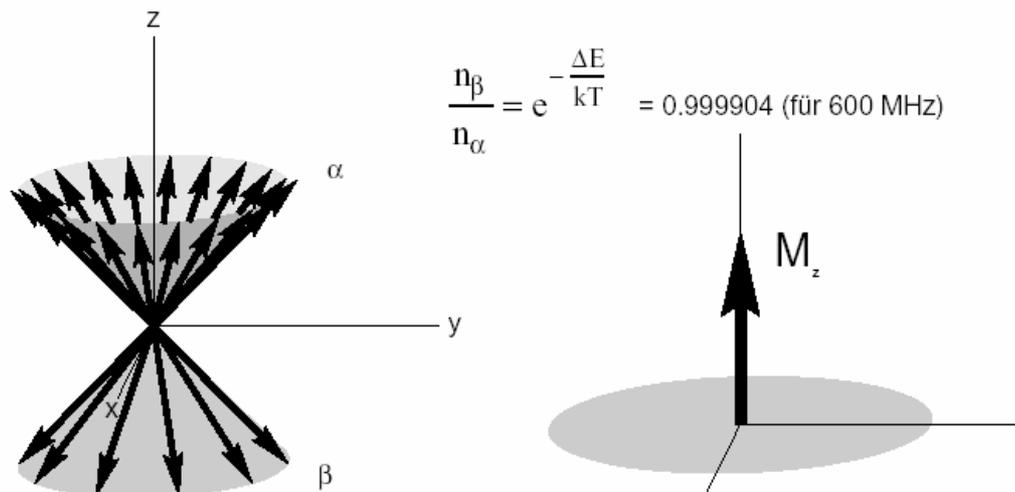
Abbildung 43: Abhängigkeit der Energiedifferenz von der Stärke des B_0 -Felds²³¹

Wie viel Energie absorbiert werden kann (und damit die Stärke des detektierbaren Signals) hängt vom Besetzungsunterschied $\Delta n = n_\alpha - n_\beta$ der beiden Niveaus α und β ab. Er lässt sich aus der Boltzmann-Verteilung berechnen:

$$\frac{n_a}{n_b} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{\frac{g h B_0}{2 p k T}} \quad (13)$$

Die unterschiedliche Besetzung der beiden Niveaus (Polarisation) führt zu einer resultierenden Gesamtmagnetisierung M_z , die nach Anregung durch ein äußeres Wechselfeld beobachtet werden kann (bei 2.35 T entsprechend 100 MHz für ^1H und 300 K gilt $\Delta n_0/N \approx 8 \cdot 10^{-6}$).

Die Spins präzedieren um das Hauptfeld B_0 . Die x - und y -Komponenten sind statistisch verteilt, d.h. sie heben sich auf und sind nicht observabel. Die z -Komponenten der Spins sind dagegen alle entlang dem Hauptfeld orientiert. Aus dem Besetzungsunterschied ($n_\alpha - n_\beta$) resultiert eine (geringe) Überschussmagnetisierung in z -Richtung.



$$\frac{n_\beta}{n_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = 0.999904 \quad (\text{für } 600 \text{ MHz})$$

Abbildung 44: Präzedierende Spins und resultierende Magnetisierung²³¹

2.5.1.2 Einstrahlen eines Wechselfeldes

Strahlt man ein elektromagnetisches Wechselfeld ein, das der Larmorfrequenz entspricht, wird aus diesem Feld Energie absorbiert und Übergänge zwischen den Niveaus finden statt. Es werden Übergänge zwischen den α - und β -Zuständen von Spins erzeugt. Ein (linear polarisiertes) elektromagnetisches Wechselfeld kann in der Form $B_1 \cos(\omega t)$ aufgefasst werden. Es kann als eine Summe zweier zirkular polarisierter Felder geschrieben werden:

$$\begin{aligned} B(t) &= B_1 \cos(\omega t) \\ &= 0.5 B_1 \{e_x \cos(\omega t) + e_y \sin(\omega t)\} + 0.5 B_1 \{e_x \cos(\omega t) - e_y \sin(\omega t)\} \end{aligned} \quad (14)$$

Das entspricht einer einfachen Vektorzerlegung des B_1 -Vektors mit e_x und e_y als Einheitsvektoren. Der eine Vektor rotiert *mit* den Spins und der Frequenz ω um die z -Achse, der andere *gegen* die Spins mit der Frequenz $-\omega$ um die z -Achse (vergl. Abbildung 45).

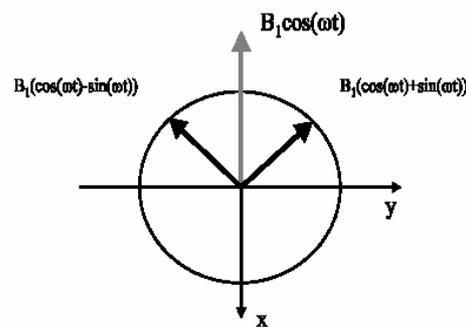


Abbildung 45: Vektorzerlegung des B_1 -Feld²³¹

Um nun die Vorgänge während eines Pulses einfach beschreiben zu können, macht man eine Koordinatentransformation. Das Laborkoordinatensystem (x, y, z) wird dabei durch ein Koordinatensystem (x', y', z') ersetzt, welches mit der Frequenz des B_1 -Feldes (das entspricht der Larmorfrequenz der betrachteten Spins) um die z -Achse rotiert. Diese Transformation in das rotierende Koordinatensystem ist von generellem Nutzen, wenn man NMR-Experimente beschreiben will. Es wird im folgenden nur noch von diesem "rotierenden" Koordinatensystem Gebrauch gemacht werden.

Nun wird das oszillierende B_1 -Feld ins rotierende Koordinatensystem transformiert. Nach Einsetzen erhält man:

$$B_1(t) = 0.5 B_1 \{e_x \cos(2\omega t) + e_y \sin(2\omega t)\} + 0.5 B_1 e_x \quad (15)$$

Ein mit der Larmorfrequenz oszillierender Feldvektor wird damit im rotierenden Koordinatensystem statisch, d.h. er kommt entlang einer Richtung in der x,y -Ebene zu liegen. Der erste Term

in (15) stellt einen mit doppelter Larmorfrequenz rotierenden Feldvektor dar. Er erfüllt nicht die Resonanzbedingung und ist daher für die weiteren Betrachtungen bedeutungslos. Der Feldvektor $B_1 e_x$ ist damit als einziger in der Lage, mit den im rotierenden Koordinatensystem ebenfalls statischen Spins in Wechselwirkung zu treten.

Der Magnetisierungsvektor M präzediert um das B_0 - und gleichzeitig um das B_1 -Feld. Damit hat man im Laborkoordinatensystem zwei sich überlagernde Bewegungen, die sich schwer anschaulich beschreiben lassen. Im rotierenden Koordinatensystem ist die Wirkung des B_1 -Feldes klar zu sehen: Die Magnetisierung wird durch ein in x -Richtung wirkendes Feld in die ($-y$)-Richtung ausgelenkt:

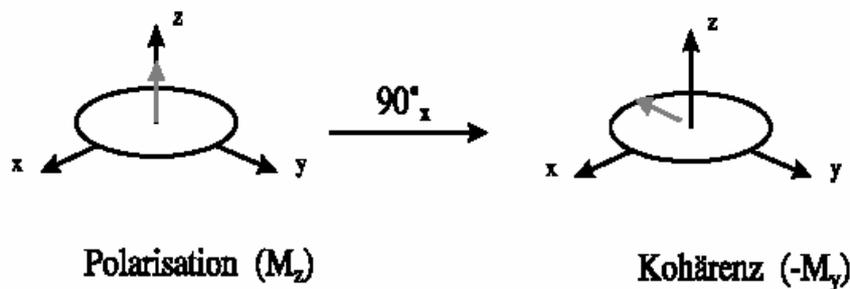


Abbildung 46: Wirkung eines 90° -Pulses²³¹

Der Flipwinkel β ist die Auslenkung der Magnetisierung durch den Puls relativ zur z -Achse. Er ergibt sich aus der Stärke des B_1 -Feldes und der Pulsdauer t_p :

$$\mathbf{b} = g B_1 t_p \quad (16)$$

Die im rotierenden Koordinatensystem fixe transversale Magnetisierung M_y (Kohärenz) präzediert im Laborkoordinatensystem nach dem Puls unter dem Einfluss des B_0 -Feldes um die z -Achse. Sie induziert daher in der (z.B. in x -Richtung feststehenden) Empfängerspule einen mit $\sin(\omega t)$ modulierten Strom, den FID (*Free Induction Decay*), der gemessen werden kann (s. Abbildung 47). Zu beachten ist, dass das Spektrometer zunächst die Larmorfrequenz ω (im MHz-Bereich) aufzeichnet. In Abbildung 47 ist jedoch nur die Differenz $\omega - \omega_0 = \Omega$ aufgezeichnet. Ω ist die „chemische Verschiebung“, also der Abstand der Eigenfrequenz des Kernes von der sog. Trägerfrequenz ω_0 . Ω liegt im Bereich zwischen 0 und einigen Tausend Hz und ist damit auch für das menschliche Ohr wahrnehmbar. Das aufgefangene Signal lässt sich also durch eine harmonische Funktion (Sinus oder Cosinus) beschreiben.

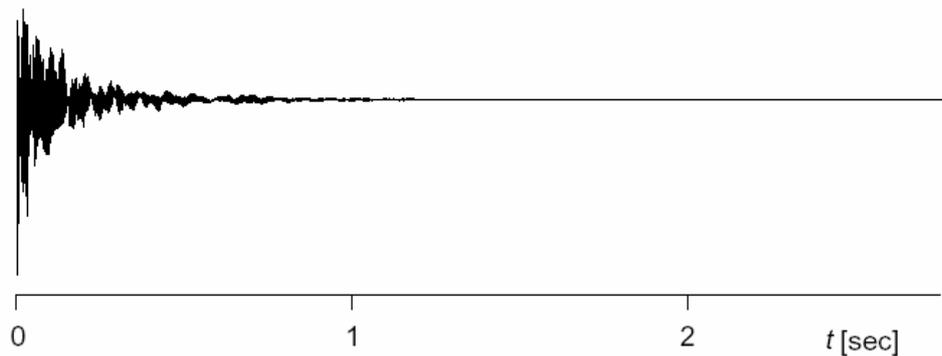


Abbildung 47: FID der Kohärenz eines cyclischen Hexapeptids²³¹

2.5.1.3 Relaxation

Während der Präzession nimmt die Länge des Magnetisierungsvektors in der transversalen Ebene ständig ab (der FID wird kleiner, s. o). Man bekommt daher einen Dämpfungsfaktor, der in das aufgenommene Zeitsignal mit eingeht. Der Grund für die Abnahme des Signals liegt in der *Relaxation* der Magnetisierung. Man unterscheidet generell zwischen der Spin-Spin- (*transversalen*) und der Spin-Gitter- (*longitudinalen*) Relaxation.

Die *transversale* Relaxation führt zum Verschwinden der *transversalen* Magnetisierung und damit zum Abklingen des FIDs. Die *longitudinale* Relaxation bringt das System wieder in seinen Ausgangszustand (Boltzmann-Gleichgewicht) zurück.

2.5.1.4 Zweidimensionale Verfahren

Ein zweidimensionales Experiment enthält folgende Elemente:

Präparation - Evolution - Mischung - Detektion

t_1	t_2
Kern 1	Kern 2

Je nach Experiment werden noch unterschiedliche konstante und variable *Delays* eingeführt. Die Mischung überträgt die Magnetisierung von Kern 1 auf den Kern 2. Unterschiedliche Mischprozesse sind möglich (vergl. Tabelle 7). Je nachdem ob die Magnetisierung zwischen gleichen oder unterschiedlichen Kernen übertragen wird, unterscheidet man homonukleare und heteronukleare Experimente. Man kann auch mehrere Mischprozesse hintereinander durchführen und dadurch die Dimensionen beliebig erweitern. Es entstehen dann zusätzlich Kreuzsignale.

Tabelle 7: Mögliche Mischprozesse im 2D-Experiment

Mischung	Laborkoordinatensystem	Rot. Koordinatensystem
Skalare Kopplung	COSY	TOCSY
Dipolare Kopplung	NOESY	ROESY
Chem. Austausch	EXSY	ROESY

2.5.2 Konformationsrelevante Parameter

Bei Verwendung der NMR-Spektroskopie für die Aufklärung der Konformation von Peptiden und Proteinen benutzt man unterschiedliche Verfahren zur Gewinnung konformationsrelevanter Parameter. Die wichtigsten sind die chemische Verschiebung δ , die Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen $\Delta\delta/\Delta T$, die skalare Kopplung, die Intensität der Signale, eventuell vorhandene Austauschverbreiterungen sowie Relaxationsphänomene wie die Spin-Gitter-Relaxation und der *Nuclear Overhauser Effect* (NOE).

2.5.2.1 Temperaturabhängigkeit

Einen ersten Hinweis auf die Konformation eines Peptides kann die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen liefern. Je nach Orientierung des Amidprotons nimmt sie charakteristische Werte an. Zum Lösungsmittel exponierte Amidprotonen erzeugen Gradienten, deren Werte kleiner als -4 ppb/K sind. Werden Werte größer als -3 ppb/K gemessen, wird eine interne Orientierung und ggf. Involvierung in eine intramolekulare Wasserstoffbrücke (Abschirmung vom Solvens) beobachtet. Die genannten Erwartungsbereiche gelten für DMSO als Solvens.²³²

Aus der charakteristischen Temperaturabhängigkeit von Amidprotonen können Hinweise auf die Sekundärstruktur gewonnen werden.²³³

Analoge Ergebnisse liefern Messungen der Austauschgeschwindigkeit für die Amidprotonen. Die Zugabe von Deuteriumoxid zur Lösung des Peptides führt zum Verschwinden der Amidprotonen-Signale. Die Austauschgeschwindigkeit ist dabei von der Exposition des Amidprotons zum Lösungsmittel abhängig.

2.5.2.2 Skalare Kopplungen

Eine der beiden Möglichkeiten der Spin-Spin-Wechselwirkung ist die über Bindungen wirkende skalare Spin-Spin-Kopplung (J -Kopplung). Sie ist besonders zur Aufklärung der Verknüpfung der Atome geeignet, da sie nur über wenige Bindungen wirkt. Ausnahmen werden

für sehr rigide Konformationen beobachtet, wie sie z. B. in ausgedehnten aromatischen Systemen oder in bicyclischen Verbindungen vorliegen. Die Größe der skalaren Kopplung hängt vom Torsionswinkel ab, so dass sich relevante Informationen über die Konformation erhalten lassen.²³⁴ Vicinale Kopplungskonstanten sind über die *Karplus*-Beziehung allgemein mit Dihedralwinkeln im Molekül verknüpft.^{235,236}

$${}^3J = A \cos^2 \mathbf{q} + B \cos \mathbf{q} + C \quad (17)$$

Die Koeffizienten der Karplus-Gleichungen werden empirisch für jede Kopplungskonstante bestimmt. Besonders wichtig ist die homonucleare vicinale ${}^3J_{H^N H^a}$ -Kopplung, deren Wert mit dem Torsionswinkel ϕ korreliert. Für L-Aminosäuren gilt:

$${}^3J_{H^N H^a} = 9.4 \cos^2(\mathbf{f} - 60) - 1.1 \cos(\mathbf{f} - 60) + 0.4 \quad (18)$$

Für D-Aminosäuren ändert sich das Vorzeichen in den Klammern. Ein Problem der Karplus-Beziehungen ist die nicht eindeutige Zuordnung bei kleinen Kopplungen durch das Auftreten von vier möglichen Dihedralwinkeln. Die ermittelten Werte für \mathbf{f} stellen eine Einschränkung der Konformation dar und können als Strafterme in die MD-Rechnungen eingeführt werden.

2.5.2.3 *Nuclear Overhauser Effect*

Kern-Overhauser-Effekte (NOEs) sind Intensitätsänderungen von Signalen, die durch dipolare Relaxation von benachbarten Kernen im Nichtgleichgewicht entstehen.

Die dipolare Relaxation ist einer der möglichen Relaxationsmechanismen, die dafür sorgen, dass die Kerne nach einer Anregung (Inversion) wieder in den Gleichgewichtszustand zurückkehren. Im NOE-Experiment stört man durch Einstrahlung auf einen Kern dessen Populationsdifferenz, die durch das Boltzmann-Gleichgewicht gegeben ist. Der Kern kehrt unter Energieabgabe in seinen Gleichgewichtszustand zurück.

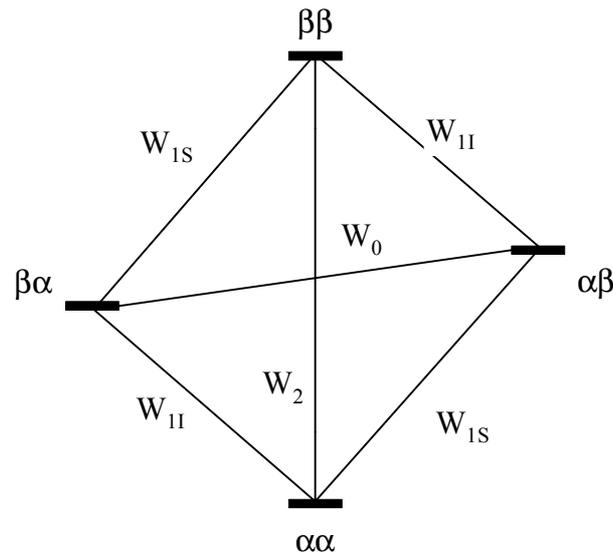


Abbildung 48: Energieniveauschema im Zweispinsystem (Solomon-Schema)

Einen Teil der dabei abgegebenen Energie wird transferiert. Dies geschieht auf räumlich benachbarte Kerne, die maximal 500 pm entfernt sind und verändert deren Populationsdifferenzen. Diese sind observabel. Für ein Zweispinsystem ergeben sich drei Relaxationswege.²³⁷ Es werden Null-, Ein- und Zweiquantenübergänge (W_0 , W_1 , W_2) unterschieden (vergl. Abbildung 48).

Bei einem NOE-Experiment wird mit der Frequenz S eingestrahlt.

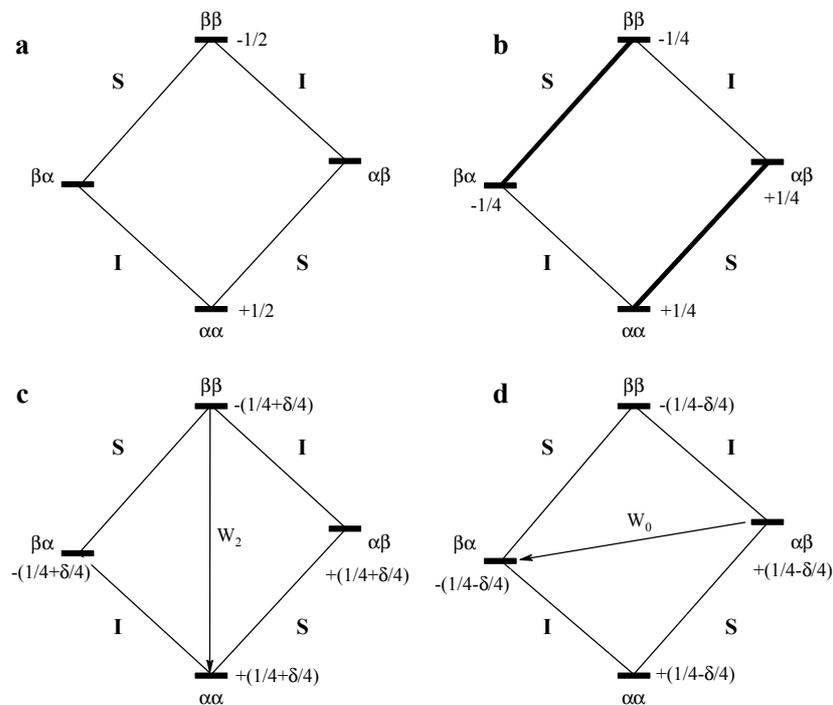


Abbildung 49: Relaxation im Zweispinsystem

Die Populationsdifferenzen, die zu diesem Übergang gehören, verschwinden (Gleichbesetzung

der Niveaus, b). Die Intensität des I-Übergangs, wäre bei b dem von a identisch. Durch die Relaxation über W_2 oder W_0 werden die Populationen verändert (c, d).

Durch W_2 wird die Population von $\beta\beta$ zugunsten von $\alpha\alpha$ verringert. Die Populationsdifferenzen für die I-Übergänge werden jeweils um $\delta/2$ größer. Die Intensität der I-Linie nimmt zu:

$$I = I_0 + \delta$$

Durch W_0 wird die Population von $\alpha\beta$ zugunsten von $\beta\alpha$ verringert. Die Populationsdifferenzen für die I-Übergänge werden jeweils um $\delta/2$ kleiner. Die Intensität der I-Linie nimmt ab:

$$I = I_0 - \delta.$$

Die Änderung der Intensität lässt sich aus dem Energieniveauschema ablesen und in Eigenrelaxationsraten \mathbf{r} und Kreuzrelaxationsraten \mathbf{s} zusammenfassen:

Die Eigenrelaxationsraten sind:

$$\mathbf{r}_1 = -(W_0 + 2W_{1(I)} + W_2) \quad (19)$$

$$\mathbf{r}_2 = -(W_0 + 2W_{1(S)} + W_2) \quad (20)$$

Die Kreuzkorrelationsrate ist:

$$\mathbf{s} = (W_2 - W_0) \quad (21)$$

Für die Kreuzkorrelation im Zweispinsystem gilt dann:

$$\mathbf{s}_{ii} = \frac{k}{10} \{6J(2\mathbf{w}_0) - J(0)\} \quad (22)$$

Die Kreuzrelaxationsrate \mathbf{s} bestimmt die maximale Intensität eines Kreuzsignals. Es gilt:

$$J(\mathbf{w}) = \frac{2\mathbf{t}_c}{(1 + \mathbf{w}2\mathbf{t}_c)^2} \quad (23)$$

\mathbf{t}_c ist die Korrelationszeit, die die Umorientierungszeit des Interprotonenvektors i-j angibt. In k ist der Abstand r zwischen beiden wechselwirkenden Protonen (neben mehreren Konstanten) enthalten:

$$k = \frac{\mathbf{m}_0^2 h^2 \mathbf{g}^4}{16\mathbf{p}^2 r^{-6}} \quad (24)$$

Die Kreuzrelaxationsrate kann Null sein, wenn $6J(2\mathbf{w})$ und $J(0)$ gleichgroß sind. Dann beobachtet man keinen NOE. In diesem Fall kann die dipolare Relaxation im rotierenden Koordina-

tensystem im Spinlockfeld (*Rotating Frame Overhauser Enhancement*, ROE) gemessen werden, um NOE-Kreuzsignale zu erhalten.^{238,239}

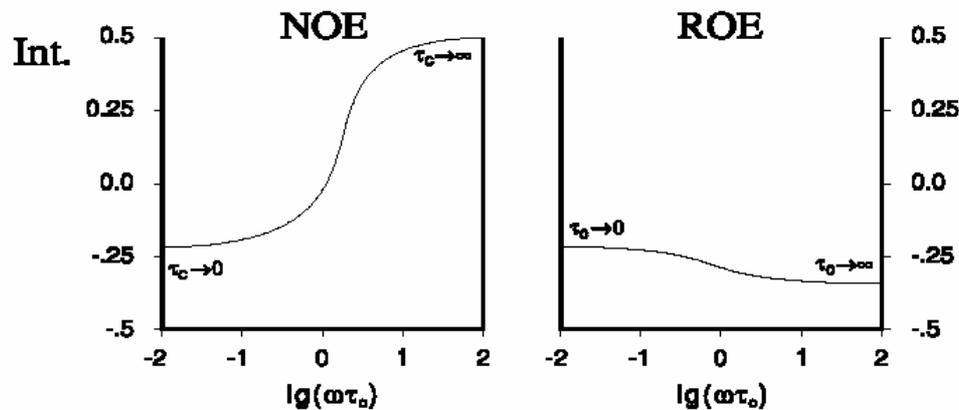


Abbildung 50: Maximale Intensitäten für NOE und ROE²³¹

Die unterschiedlichen Vorzeichen von $J(2\omega)$ und $J(0)$ führen zu unterschiedlichen Vorzeichen des NOE, je nachdem welches Kreuzsignal für die dipolare Relaxation relevant ist. Hat man z. B. einen Kern invertiert, so wird ein benachbarter Kern „negative Intensität“ gewinnen, wenn $J(0)$ wirksam ist (große Moleküle), und „positive Intensität“, wenn $J(2\omega)$ wirksam ist (kleine Moleküle). Im 2D-NOESY hat man bei großen Molekülen, die sich langsam umorientieren (*slow tumbling*), daher Kreuzsignale, die das gleiche Vorzeichen haben wie die Diagonale. Für kleine Moleküle erhält man entgegengesetzte Vorzeichen von Kreuzsignal zu Diagonale.²⁴⁰

Beim ROE-Experiment wird die Magnetisierung nach der Evolutionsperiode entlang einer Achse des Koordinatensystems gelockt. Dies geschieht durch Einstrahlen eines schwachen B_1 -Feldes (2-4 kHz) entlang dieser Achse. Vereinfacht können die Vorgänge während der Mischperiode wie folgt wiedergegeben werden: Durch das Zusammenwirken von B_0 - und B_1 -Feld resultiert ein effektives Feld B_{eff} :

$$|B_{\text{eff}}| = \sqrt{4p^2(\omega - \omega_0) + B_1^2} \quad (25)$$

Die Spins, die entlang des effektiven Feldes orientiert sind, zeigen, genau wie im B_0 -Feld, eine für die effektive Feldstärke charakteristische Boltzmann-Verteilung (s. o). Die Felder, die ein Relaxieren der Spins bewirken können, haben nun Frequenzen im Bereich der Frequenz des Spinlockfeldes (2-4 kHz), d.h. es sind $J(2\omega)$ und $J(0)$ gleich bedeutend, denn die für die Relaxation relevante "Larmorfrequenz" im Spinlockfeld ist die Rate, mit der die Spins um die Lockachse präzedieren werden. Man bekommt also immer Kreuzsignale, da sich W_0 und W_2 nicht mehr aufheben können. Dieses Experiment ist für kleine Moleküle dem NOE-Experiment

vorzuziehen.

Die meistverbreitete Methode, Abstände zu bestimmen, beruht darauf, ein NOESY- oder ROESY Spektrum aufzunehmen und die Kreuzsignale zu integrieren. Man nimmt hier vereinfachend an, dass der Magnetisierungsaufbau bei kurzen Mischzeiten annähernd linear verläuft.²⁴¹ Damit ist die Kreuzsignalintensität der Kreuzrelaxationsrate direkt proportional. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass man mit *einem* 2D-Spektrum auskommt und dieses dann mit einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis aufnehmen kann. Um aus diesen Daten Abstände zu berechnen, müsste man Gleichung (22) anwenden. Da aber die, in dieser Gleichung enthaltenen Parameter (spektrale Dichten) i. d. R. nicht bekannt sind, werden die Abstände durch Kalibrieren zu einem bekannten Abstand ermittelt. In Peptiden nutzt man oft die Abstände eines geminalen Protonenpaares wie z. B. die β -Protonen geeigneter Aminosäuren wie Asp, Phe oder Ser oder die α -Protonen von Gly.¹³⁹

2.6 Konformationsanalyse

Weder die NMR-Spektroskopie, noch die Molekülmechanik allein vermögen Molekülstrukturen eindeutig zu beschreiben. Der Vorteil der NMR-Spektroskopie ist, dass sie auch dynamische Vorgänge darstellen kann. Erst durch eine Kopplung der beiden Methoden gelingt eine Annäherung an die dreidimensionale Struktur des Moleküls. Die Konformationsanalyse von Peptiden läuft nach einem Plan ab, mittels dessen spektroskopische Informationen zu einer dreidimensionalen Struktur umgewandelt werden können.

Dazu werden im ersten Schritt die Resonanzen im eindimensionalen Spektrum durch Zuhilfenahme geeigneter zweidimensionaler Methoden (wie die *Correlated Spectroscopy* COSY²⁴² oder die *Total Correlated Spectroscopy* TOCSY^{243,244}) den einzelnen Atomen zugeordnet. Die Primärstruktur des Peptids kann durch charakteristische NOE- oder ROE-Effekte zwischen benachbarten Aminosäuren verifiziert werden.

Im dritten Schritt werden konformationsrelevante Parameter aus den Spektren extrahiert, die dann entweder direkt in *restrained* Molekulardynamik-Simulationen einfließen (NOEs) oder die im Nachhinein zum Vergleich einbezogen werden (Temperaturgradienten, Torsionen)

3 Aufgabenstellung

Bislang sind vor allem konformationelle Untersuchungen an Peptiden mit sterisch wenig eingeschränkten β -Aminosäuren durchgeführt worden. Cyclische Analoga des β -Alanins fanden dagegen noch keine Berücksichtigung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen geeignete β -Aminosäuren dargestellt und in Peptide eingebaut werden.

Als Zielsequenz wird das vermutete Bindungsepitop des VCAM-1 für die Bindung an das Integrin $\alpha_4\beta_1$ gewählt. Das zentrale Prolin in der Sequenz von acht Aminosäuren soll dabei durch unterschiedliche 2-Aminocycloalkancarbonsäuren ersetzt werden.

Dazu soll eine Reihe cyclischer Penta- und Hexapeptide dargestellt werden, die mittels NMR und *Molecular modeling*-Techniken auf ihre Konformation untersucht werden. Dabei soll vor allem der Einfluss der β -Aminosäuren auf die Vorzugskonformation geklärt werden.

Hierbei ergibt sich durch Kombination mit biologischen Tests die Möglichkeit, die Geometrie der Wechselwirkung zwischen dem Integrin $\alpha_4\beta_1$ und seinem natürlichen Liganden VCAM-1 aufzuklären und diese als potentielle Grundlage für nichtpeptidische Inhibitoren zu nutzen.

Weiterhin sollen Peptide als mögliche Antagonisten des murinen ADAM 8 synthetisiert werden. Hierbei sollen unterschiedliche Konformationen der postulierten Erkennungssequenz durch einen D-Aminosäure-Scan in cyclischen Peptiden dargestellt und durch NMR und *Molecular modeling* die Konformation dieser Peptide aufgeklärt werden. Außerdem soll die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der Erkennungssequenz durch einen Ala-Scan geklärt werden.

4 Spezieller Teil

4.1 Synthese der β -Aminosäuren

4.1.1 Konformationelle Einschränkungen in β -Aminosäuren

Der Einbau von β -Aminosäuren in Peptide führt durch das zusätzliche Kohlenstoffatom zu einer Erweiterung des Peptidrückgrats. Ein zusätzlicher Torsionswinkel weitet die konformationelle Flexibilität auf. Daher haben Peptide mit β -Alanin eine erhöhte konformationelle Freiheit gegenüber solchen mit L-Alanin. Einschränkungen der Torsionswinkel sollten zu einer Verminderung der Freiheitsgrade und damit zu einem größeren Einfluss auf die Sekundärstruktur führen. Im β -Alanin sind die Torsionswinkel ϕ , ψ und μ frei drehbar. Einführung von sterisch anspruchsvolleren Resten in unterschiedlichen Positionen wird diese freie Drehbarkeit reduzieren, je mehr Reste eingeführt werden, desto größer wird die Einschränkung der konformationellen Freiheit sein.

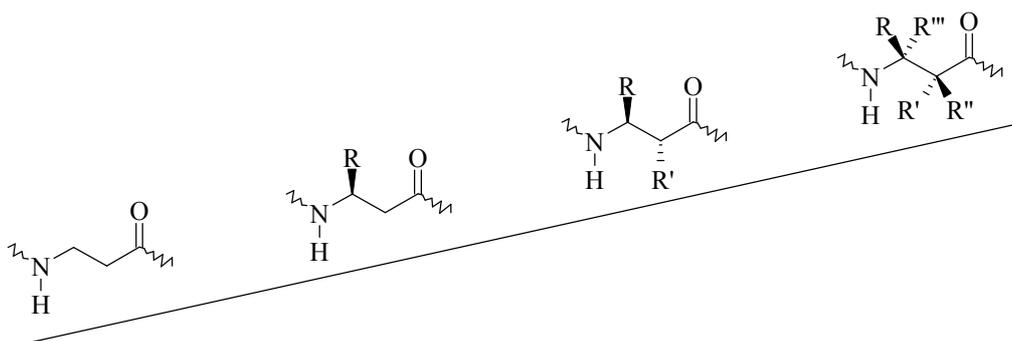
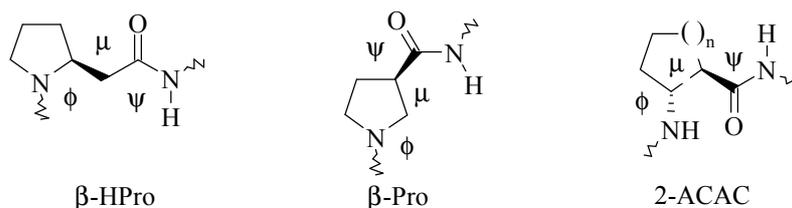


Abbildung 51: Zunahme der konformationellen Einschränkungen

Die größte Einschränkung wird durch die Einführung von Ringen möglich, so lassen sich durch unterschiedliche β -Analoga des Prolins verschiedene Torsionswinkel festlegen. Während im Prolin selber und im β -Homoprolin der Torsionswinkel ϕ fixiert ist, sind im β -Prolin die Winkel ϕ und μ fixiert. Cyclische Vertreter wie die unterschiedlich konfigurierten 2-Aminocycloalkancarbonsäuren (ACACs) haben einen fixierten Torsionswinkel μ (vergl. Abbildung 52).

Abbildung 52: Potentielle β -Analoga des Prolins

Goodman et al. setzten die *cis*- und *trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure als Prolinmimetika in Morphiceptin-Analoga ein.^{245,246} Sie fanden bei ihren Untersuchungen, dass die β -Aminosäure die Struktur des Morphiceptins und damit die Selektivität verändern kann.

4.1.2 Synthesekonzept für 2-Aminocycloalkancarbonsäuren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss verschiedener 2-Aminocycloalkancarbonsäuren (ACACs) auf die strukturellen Präferenzen cyclischer Peptide untersucht werden. In der Literatur sind verschiedene Synthesen für Derivate mit unterschiedlicher Stereochemie und Ringgröße bekannt.²⁴⁷ Besonders die (1*R*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure (Cispentacin) ist von Interesse. Cispentacin wurde Ende der 1980er Jahre von zwei unterschiedlichen Gruppen aus *Bacillus cereus*^{248,249} und *Streptomyces setonii*^{250,251} isoliert und hat fungizide Eigenschaften. Es ist, im Gegensatz zum (1*S*,2*R*)-Enantiomer therapeutisch wirksam gegen *Candida albicans*. Auch im antibiotisch wirksamen Glykopeptid Amipurimycin ist Cispentacin enthalten. Es wird aus *Streptomyces novoguineensis* gewonnen und wirkt gegen *Pyricularia oryzae*, den Erreger einer Reiserkrankung.

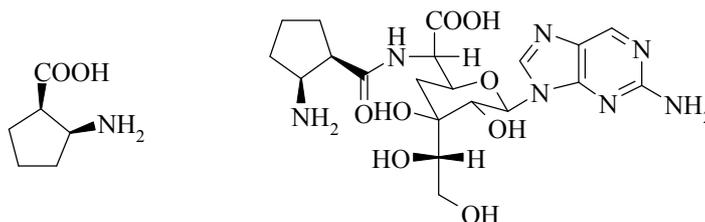


Abbildung 53: Cispentacin und Amipurimycin

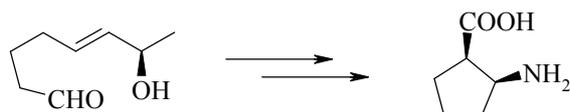
Weiteres Interesse an 2-Aminocycloalkancarbonsäuren wurde durch die Arbeiten von Gellman et al.^{82,83,88,89} geweckt, in denen strukturelle Untersuchungen über ACAC-Oligomere gemacht wurden. Auch Diederichsen et al.²⁵² verwenden die *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure zur Ausbildung helixförmiger Strukturen. Dazu sind ACACs potentielle Vorstufen für die unterschiedlichsten Heterocyclen, β -Lactame, Pharmaprodukte und dienen als chirale Auxiliare und Synthesevorstufen.²⁴⁷

Neben zahlreichen Synthesewegen zu racemischen ACACs²⁴⁷ durch Reduktion, Umlagerung,

Michael-Addition oder Diels-Alder-Reaktion spielen die Diastereomerentrennung und die enzymatischen Reaktionen eine wichtige Rolle.²⁴⁷ Enantioselektive Wege werden von unterschiedlichen Gruppe beschriften:

Enders et al.³⁵ nutzen das TMS-SAMP für die Synthese von ACACs mit fünf- bis sieben-gliedrigen Ringen unter Nutzung der Ionenaustauschchromatographie (vergl. Seite 12).

Ausgehend von (*R*)-7-Hydroxyoct-5-enal stellten Konoshi und Oida²⁵³ in einer vielstufigen Synthese Cispentacin dar.



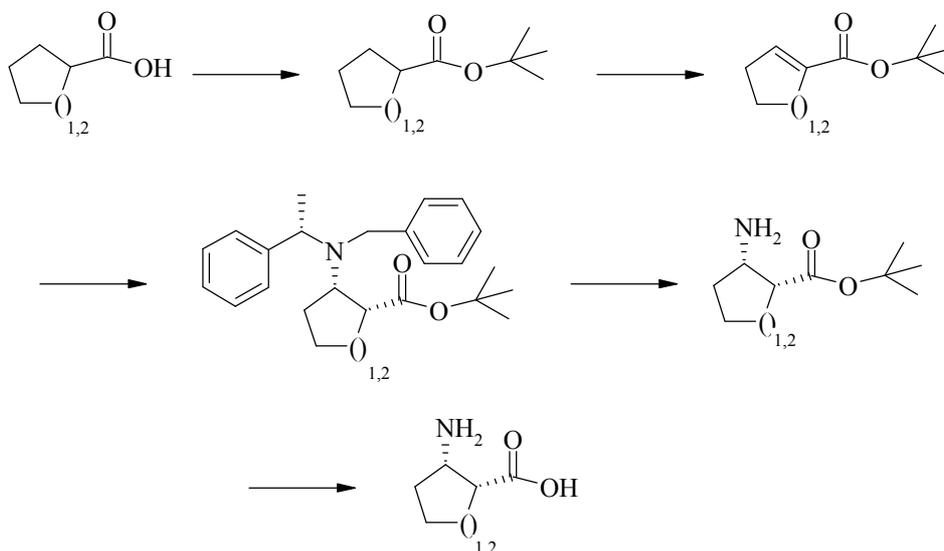
Schema 35: Synthese von Cispentacin aus Hydroxyoctenal

Auch Aggarwal et al.³¹ synthetisierten Cispentacin. Sie nutzten hierzu eine [3+2]-Cycloaddition (vergl. Seite 10).

Ein weiterer Syntheseweg wurde von Davies et al.³² beschrieben (vergl. Seite 11). Er hat den Vorteil, dass sowohl die *cis*- wie auch die *trans*-Stereochemie zugänglich sind, auch unterschiedliche Ringgrößen sind möglich.

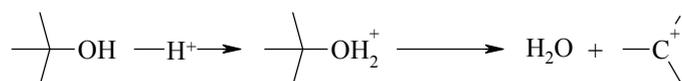
4.1.2.1 Synthese der *cis*-2-Aminocycloalkancarbonsäuren

Für die Synthese wurde der in Schema 36 beschriebene Weg beschrrieben, der sich in weiten Teilen an die Synthesevorschrift von Davies et al.³² anlehnt.



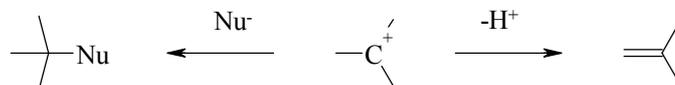
Schema 36: Syntheseweg zur ^cACAC

Bei der ersten Reaktion handelt es sich um die Einführung einer Esterschutzgruppe. Die direkte Veresterung der Carbonsäure unter Säurekatalyse ist für den *tert*-Butylalkohol nicht möglich, da er unter Säurekatalyse Wasser abspaltet und ein stabiles *tert*-Butylkation bildet.



Schema 37: Ausbildung eines *tert*-Butylkations

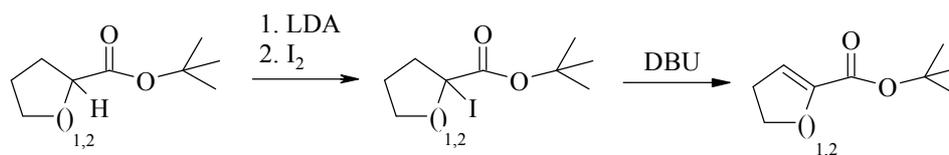
Aliphatische Kationen können sich, wie in Schema 38 zu erkennen ist, durch Anlagerung von Nucleophilen oder durch Abspaltung von Protonen stabilisieren:



Schema 38: Stabilisierung aliphatischer Kationen

Daher wurde, in Abwandlung der Literaturvorschrift der Weg über das Säurechlorid²⁵⁴ und die nachfolgende Umsetzung mit *tert*-Butanol gewählt.²⁵⁵ Die Reaktion gelang in befriedigender Ausbeute bei vollständiger Umsetzung des Edukts.

Die Einführung der Doppelbindung wurde durch Iodierung unter nachfolgender Dehydrohalogenierung durchgeführt:



Schema 39: Einführen der Doppelbindung

Für die Iodierung wird zunächst mit einer starken Base (Lithiumdiisopropylamid [LDA]) ein acides Proton abgespalten. Die entstandene negative Ladung wird durch die stark elektronenziehende Estergruppe gut stabilisiert und greift nucleophil am Iod an. Das entstandene Iodid wird mit der Base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, Abbildung 54) dehydrohalogeniert. Bei der Produktbildung wird ein Gemisch mit dem gesättigten Ester (Edukt) beobachtet, das Verhältnis variiert zwischen 75/25 und 92/8 (GC-Analytik).

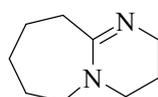
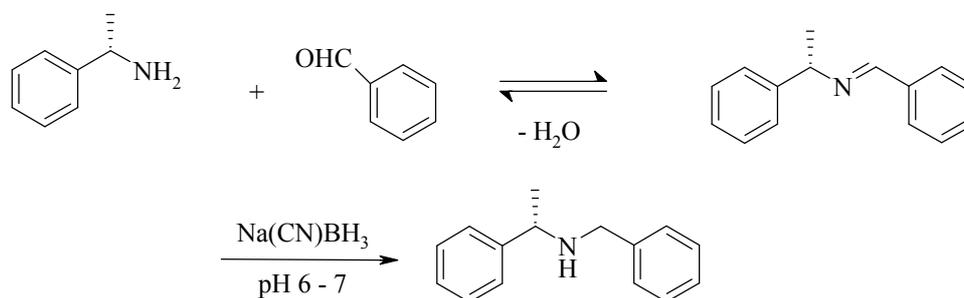


Abbildung 54: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

Die Reaktion verläuft bis zu diesem Zwischenprodukt in befriedigenden (37 % für die Cyclopent-1-encarbonsäure) bis guten Ausbeuten von 70 % für die Cyclohex-1-encarbonsäure.

Die Einführung der Aminofunktion gelingt durch nucleophile Aminierung mit einem chiralen sekundären Amin im Rahmen einer 1,4-Addition. Dies wird aus (*S*)-1-Phenylethylamin durch reduktive Aminierung nach einer Vorschrift von Simpkins et al.²⁵⁶ erhalten. Dabei wird zunächst in einer Kondensation aus dem Amin mit Benzaldehyd ein Imin dargestellt, das durch Natriumcyanoborhydrid zum Amin reduziert wird.



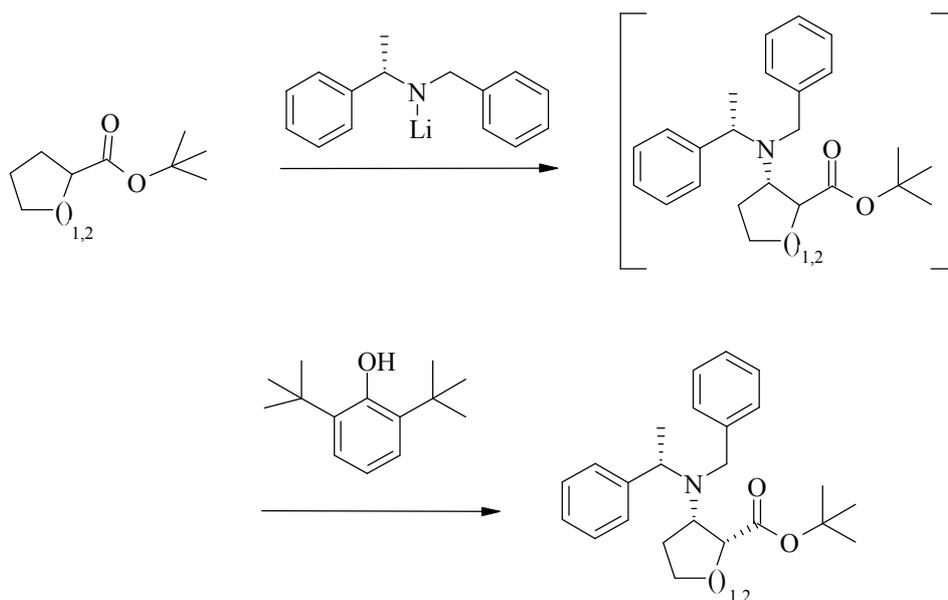
Schema 40: Reduktive Aminierung

Die Ausbildung des Imins ist eine Gleichgewichtsreaktion, so dass für die Reaktion ein Reduktionsmittel gesucht werden muss, das einerseits in der Lage ist, das Imin zu reduzieren, andererseits den Aldehyd nicht angreift. Dies gelingt durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen, eine geringfügige Veränderung des pH-Wertes von 6 – 7 auf 5 führt bereits zu

einer Reduktion des Aldehyds zum Benzylalkohol.

Die in der Literatur angegebene Ausbeute von 64 % konnte für diese Reaktion erheblich gesteigert werden (84 %).

Der nächste Reaktionsschritt dient zur Einführung der chiralen Information in das Molekül. Dazu wird das (*S*)-*N*-Benzyl-1-phenylethylamin nach *N*-Lithiierung in einer 1,4-Addition an den α,β -ungesättigten Ester addiert.



Schema 41: Nucleophile Aminierung

Im ersten Teilschritt dieser Reaktion greift das Lithiumamid die positiv polarisierte Doppelbindung an. Die bevorzugte Angriffsrichtung ist aus sterischen Gründen dabei von unten, da ein Angriff von oben zu einer Wechselwirkung zwischen dem *tert*-Butylrest und der Methylgruppe des Amins führen würde. Das ausgebildete Enolat wird dann im zweiten Teilschritt durch die sterisch sehr anspruchsvolle Säure 2,6-Di-*tert*-butylphenol protoniert. Bedingt durch die Geometrie des Enolates ist die Protonierung nur von der Oberseite möglich, da die Unterseite durch die sterisch anspruchsvollen Reste am Stickstoff abgeschirmt ist (vergl. Abbildung 55). Ein weniger sperriger Protonendonator würde auch den Angriff von der Unterseite ermöglichen und so zu mehreren Stereoisomeren führen.

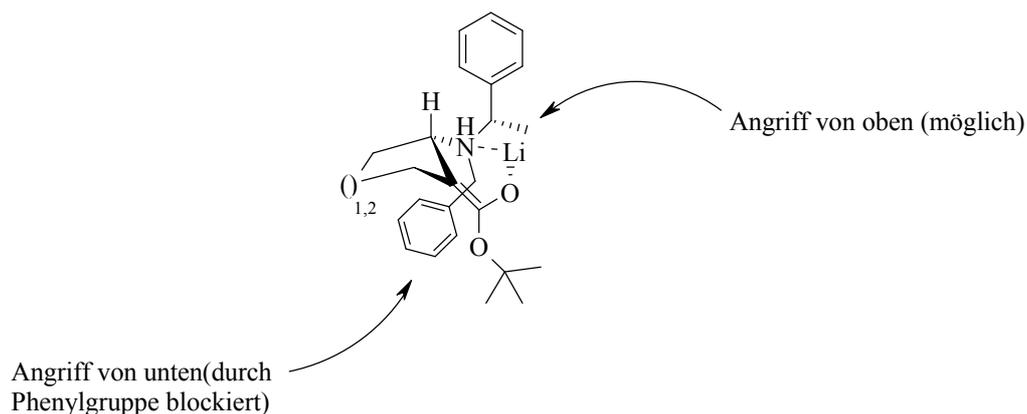
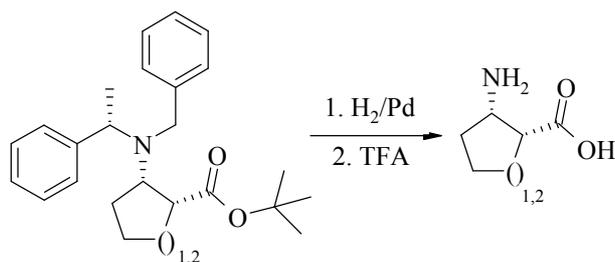


Abbildung 55: Möglicher Übergangszustand der Protonierung

Die Ausbeute für diese Reaktion ist im Rahmen der Literaturausbeute. Hier ist wieder festzustellen, dass die Umsetzung für den Fünfring mit 58 % besser gelingt als in der Literatur (50 %) für den Sechsring mit 50 % signifikant schlechtere Ergebnisse als in der Literatur (70 %) erzielt wurden. Allerdings wird in der Literaturvorschrift die Umsetzung in Toluol mit nachfolgender Zugabe von THF durchgeführt, während die Umsetzung im vorliegenden Fall in reinem THF durchgeführt wurde. Spätere Zugabe von THF führt nicht zu dem gewünschten Produkt.²⁵⁷

Die weiteren Schritte sind zur Abspaltung der Schutzgruppen notwendig. Zunächst werden die Aminoschutzgruppen hydrogenolytisch mit Wasserstoff an Palladium (10 % auf Aktivkohle) entfernt. Die *tert*-Butylgruppe wird durch Trifluoressigsäure säurekatalytisch gespalten (Schema 42).



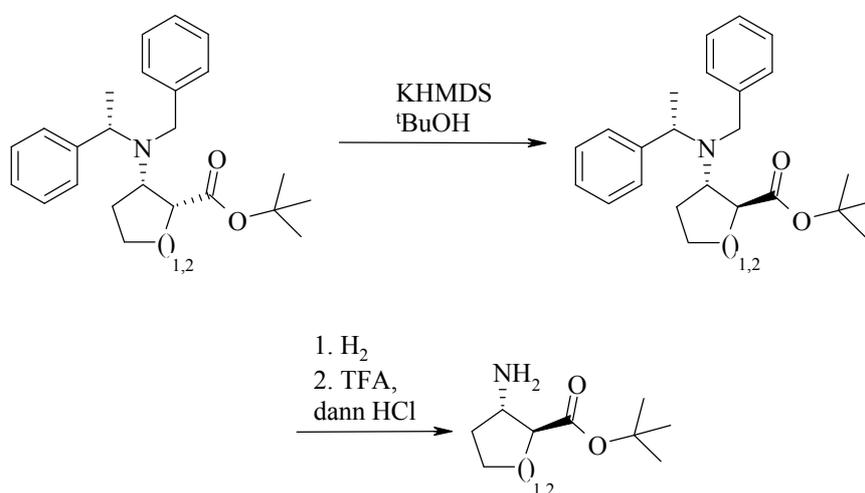
Schema 42: Abspaltung der Schutzgruppen

In einer Gesamtausbeute von 16 % für die *cis*-2-Aminocyclopentancarbonsäure bzw. 25 % für die *cis*-2-Aminocyclohexancarbonsäure konnten die gewünschten β-Aminosäuren gewonnen werden. Dies liegt im Rahmen der Literaturausbeute. Die Produkte fallen als enantiomerenreine farblose Hydrochloride an, die nach Schutz der Aminofunktion durch die Fmoc-Gruppe für die Peptidsynthese eingesetzt werden können.

4.1.2.2 Synthese der *trans*-2-Aminocycloalkancarbonsäuren

Die Umsetzung der *cis*- in die *trans*-Form gelingt auf der Stufe des voll geschützten Derivates durch einfaches Rühren bei Raumtemperatur mit einer starken Base unter thermodynamischer Kontrolle (Schema 43). Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog den o. a. Vorschriften und liefert in Ausbeuten von 53 % d. Th. (ausgehend vom geschützten *cis*-Derivat) (1*S*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure und in 38 % d. Th. die (1*S*,2*S*)-2-Aminocyclohexancarbonsäure als Hydrochloride.

Analog zu den o. a. Verbindungen lassen sich auch die (1*S*,2*R*)- sowie die (1*R*,2*R*)- β -Aminosäuren darstellen, indem statt des (*S*)-1-Phenylethylamins das (*R*)-Phenylethylamin bei der nucleophilen Aminierung Verwendung findet. Entsprechend erfolgt dann der Angriff des Amins an der Oberseite des Esters und die Protonierung wird dann von unten erfolgen.



Schema 43: Darstellung der ^tACACs

4.2 Design selektiver Antagonisten

4.2.1 Methode des *spatial screening*

Das Problem bei der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen peptidischer Proteinliganden liegt vor allem darin, die räumliche Struktur des Liganden zu fixieren.²⁵⁸ Ziel ist meist, eine hohe Aktivität und Rezeptorselektivität zu erreichen und Aufschluss über die Natur der Wechselwirkungen zu erhalten. Da die Konformation im rezeptorgebundenen Zustand, die bioaktive Konformation, oft nicht bekannt ist, wird i. A. eine Bibliothek von Peptiden synthetisiert, mit denen die optimale Struktur eingegrenzt werden kann. Diese Methode ist als *spatial screening* bekannt geworden.²⁵⁹ Besonders die Cyclisierung von Peptiden ist dazu geeignet, hohe Selektivität und Aktivität zu erreichen, wenn die optimale Konformation im Cyclus angenähert wurde (*matched-Fall*).²⁵⁸ Der Einsatz von Aminosäuren, die bevorzugt bestimmte Positionen in Sekundärstrukturen einnehmen, führt bei Cyclopeptiden zur notwendigen konformationellen Homogenität. Dieser Ansatz hat sich auch im Falle der Wechselwirkung zwischen Integrinen und Peptiden als wirksam erwiesen.²⁶⁰ Ein Aktivitätsvergleich zwischen einem cyclischen Peptid mit der offenbar optimalen Konformation und der entsprechenden linearen Sequenz zeigt deutlich bessere Aktivität für die Bindung von cyclischen RGD-Peptiden an die Integrine $\alpha_{11b}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$. Auch die Selektivität des cyclischen RGD-Peptids ist deutlich besser. Dies ist damit zu erklären, dass die Konformation nur für eines der beiden Integrine passend ist, während sie beim anderen nur unzureichend den *matched-Fall* darstellt. Die Cyclisierung fixiert also die aktive Sequenz oft in einer räumlichen Struktur, die es ihm nicht ermöglicht, die bioaktive Konformation einzunehmen.

Ziel bei der Synthese von Peptidbibliotheken zur Untersuchung der bioaktiven Konformation ist es, eine möglichst rigide Basiskonformation zu erhalten. Um die Beweglichkeit einzuschränken, sollten die cyclischen Peptide möglichst klein sein. Sie müssen allerdings groß genug sein, damit alle nötigen pharmakophoren Gruppen berücksichtigt werden können. Daher erscheint meist eine Beschränkung auf Cyclopenta- und Cyclohexapeptide sinnvoll. Die Verwendung größerer Cyclopeptide lässt eine höhere Dynamik erwarten, so sind beispielsweise für das Cyclosporin, ein cyclisches Undecapeptid, unterschiedliche Konformationen in unterschiedlichen Lösungsmitteln, im Kristall und in der biologisch aktiven Form, gebunden an den Rezeptor Cyclophilin, bekannt.²⁵⁹

4.2.2 Bevorzugte Position von Aminosäuren in Sekundärstrukturen

Die Konfiguration homodeter Cyclopeptide hängt vor allem von der Konfiguration der Aminosäuren ab, aus denen sie aufgebaut sind. Cyclische Hexapeptide bevorzugen oftmals eine Struktur mit zwei β -turns.²⁶¹ In einem cyclischen Hexapeptid mit der biologisch aktiven Sequenz A-B-C, das nur aus L-Aminosäuren aufgebaut ist, stehen demnach drei Konformationen miteinander im Gleichgewicht, in denen die bioaktive Sequenz jeweils eine andere Position im Ring einnimmt (vergl. Abbildung 56).

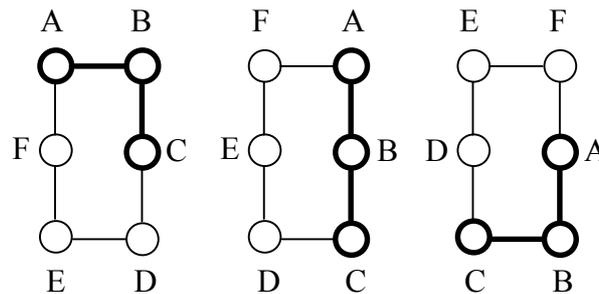


Abbildung 56: Anordnung einer bioaktiven Konformation in cyclischen Hexapeptiden

Es ist bekannt, dass D-Aminosäuren bevorzugt die Position $i+1$ eines β II'-turns einnehmen.²⁵⁹ Damit lässt sich die bioaktive Konformation gleichsam fixieren, je nachdem welche Aminosäure der Sequenz in der D-Konfiguration vorliegt. Ist die bioaktive Konformation unbekannt, so lässt sich durch die Synthese der sechs Cyclopeptide ABCDEF, in denen jeweils eine der Aminosäuren in der D-Konfiguration vorliegt, die gewünschte räumliche Position für die bioaktive Sequenz fixieren (vergl. Abbildung 57). Dabei bleibt die Konstitution und auch die Abfolge der funktionellen Gruppen in der Sequenz erhalten. Korrelation mit der biologischen Aktivität führt somit zur Identifikation der optimalen räumlichen Anordnung. Oft reicht die Darstellung von drei Peptiden mit der D-Aminosäure in den Positionen a, b oder c, um die bioaktive Sequenz in den drei möglichen unterschiedlichen Konformationen zu präsentieren. Analoge Untersuchungen an cyclischen Pentapeptiden zeigen eine ähnliche Tendenz. Weitere Untersuchungen zeigen, dass auch die Aminosäure Prolin bevorzugt in der Position $i+1$ eines β -turns zu finden ist. Dies wird auch in der Struktur des Cyclochlorotins deutlich (vergl. Seite 44). Auch die Peptide von Pavone et al. zeigen deutlich den Einfluss des Prolins auf die Sekundärstruktur von cyclischen Penta- und Hexapeptiden (vergl. Seite 46 bis 48).

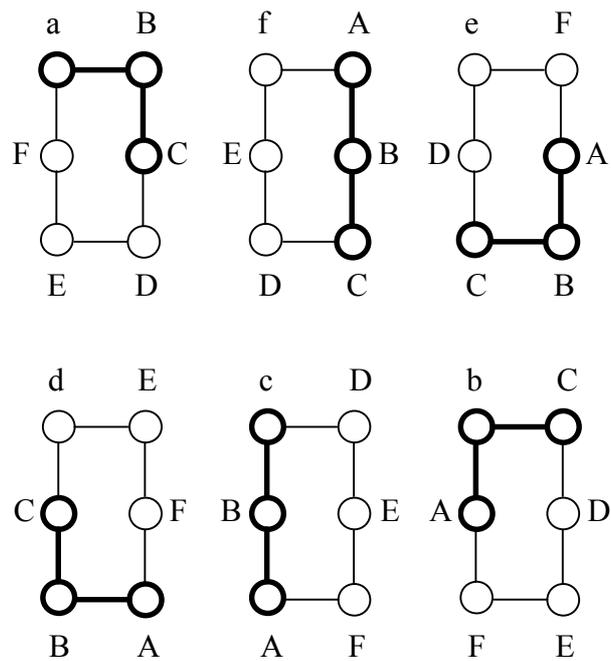


Abbildung 57: Bevorzugte Konformation durch Einführung einer D-Aminosäure

Untersuchungen an β -Homoaminosäuren in cyclischen Tetra- und Pentapeptiden zeigen, dass diese eine Tendenz zur Ausbildung von Pseudo- γ -turns haben.¹⁵³ Allerdings ist davon auszugehen, dass es sich hierbei keinesfalls um ein generelles Phänomen von β -Aminosäuren handelt, wie bereits in Abschnitt 2.1.6 beschrieben.

4.3 VCAM-1 und das Integrin $\alpha_4\beta_1$

4.3.1 Liganden und Bindungsstellen

Das Integrin $\alpha_4\beta_1$, auch als *Very Late Antigen 4* (VLA-4) bezeichnet, wird auf der Oberfläche der meisten Leukozyten und verwandten Zellen, wie Lymphozyten, Eosinophile, Monocyten, Basophilen und Mastzellen exprimiert.²⁶² Das Integrin wurde besonders auf Neutrophilen bei diversen entzündlichen Prozessen gefunden.²⁶³ Zwei natürliche Liganden binden an VLA-4, das extrazelluläre Molekül Fibronectin über sein *Connecting Segment-1* (CS-1)²⁶⁴ sowie das *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1).²⁶⁵ Die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 und/oder Fibronectin wird als Schlüssel für die Leukozytenadhäsion, Migration und Aktivierung gesehen.²⁶⁶ Diese Prozesse sind der Schlüssel sowohl für die normale Immunantwort als auch für diverse entzündliche Erkrankungen wie z. B. Autoimmunkrankheiten.

T-Lymphozyten nutzen zwei unabhängige Prozesse bei der Bindung von Fibrinogen.²⁶⁴ Einerseits binden sie über das Integrin $\alpha_5\beta_1$ an die RGD-Sequenz, die sich in einer *loop*-Struktur der zehnten Typ III-Domäne des Fibrinogens befindet. Andererseits binden T-Zellen über das Integrin $\alpha_4\beta_1$ an die carboxyterminale Zelladhäsionsregion, die die Heparin-II- und die IIICS-Domäne enthalten.

Die Bindungsstelle des Integrins befindet sich auf dem alternativ gespleißten V-Segment des Fibrinogens und hat vermutlich die Sequenz EILDV. Sie ist Ausgangspunkt einer ganzen Reihe potentieller Inhibitoren der Integrin-Ligand-Wechselwirkungen.²⁶⁶ Dazu zählen sowohl cyclische Peptide, die die aktiven Konformationen der Bindungssequenz mimikrieren, wie auch lineare LDV-Analoga. Einige Antagonisten befinden sich bereits in der klinischen Testung. Die meisten Untersuchungen zeigen auch einen deutlichen Selektivitätsunterschied zwischen den Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$.

Die Aufklärung von Teilen der Struktur des Fibrinogens (vergl. Abbildung 58)²⁶⁷ lässt vermuten, dass darüber hinaus noch eine weitere Integrin-Bindungsstelle innerhalb des 14. *repeats* liegt, die die Sequenz IDAPS hat.²⁶⁶

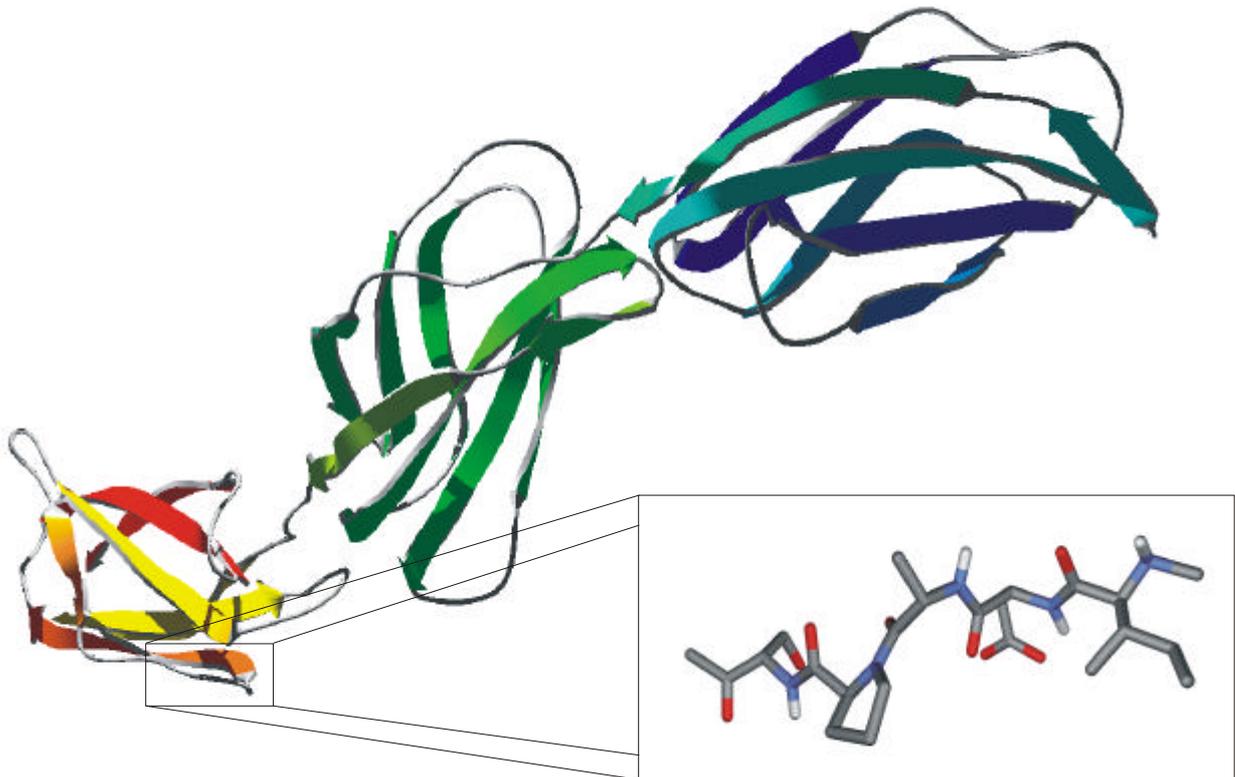


Abbildung 58: Struktur der *repeats* 12 bis 14 des Fibronectins und der postulierten zusätzlichen Erkennungssequenz IDAPS für $\alpha_4\beta_1$ ²⁶⁷

Kessler et al.²⁶⁸ zeigten ausgehend vom aktiven cyclischen Hexapeptid c(-Leu-Asp-Thr-Ala-Pro-Ala-), dass ein auf β -D-Mannose basierendes Peptidomimetikum die VCAM-1-VLA-4-Interaktion zu inhibieren vermag, während es gegenüber dem Integrin $\alpha_4\beta_7$ keinerlei Aktivität zeigt. Vermutlich sind diese Verbindungen aufgrund ihrer räumlichen Analogie zur Bindungsregion des VCAM-1 aktiv.

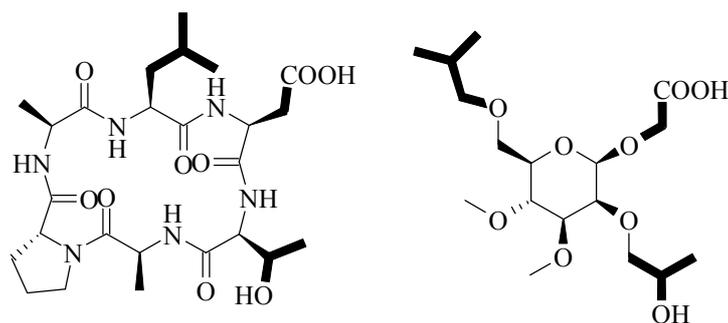


Abbildung 59: Cyclopeptid und Peptidomimetikum als $\alpha_4\beta_1$ -Antagonist

VCAM-1 wird auf vaskulären Endothelzellen als Antwort auf entzündliche Stimulation durch Cytokine wie Interleukin-1, TNF- α oder IFN- γ exprimiert.²⁶⁹ Das gesamte Molekül besteht aus sieben immunglobulinartigen Domänen, auch kürzere Fragmente (bis zu zwei Domänen)

sind bekannt. Sie zeigen eine verminderte Aktivität.²⁷⁰ In der ersten Domäne von VCAM-1 befindet sich die mutmaßliche Bindungssequenz –Thr³⁷–Gln³⁸–Ile³⁹–Asp⁴⁰–Ser⁴¹–Pro⁴²–Leu⁴³–Asn⁴⁴–.

Lineare Peptide, die auf dieser Bindungssequenz basieren, zeigen geringe oder keinerlei Aktivität.²⁷¹ Als besonders wichtig haben sich bei Mutageneseexperimenten die Reste Asp⁴⁰ und Pro⁴² herausgestellt.²⁷² Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen der ersten Domäne des VCAM-1²⁷³ zeigen, dass das Bindungsmotiv auf einem *loop* zwischen den Faltblättern C und D lokalisiert ist. Die Aminosäuren 37 bis 40 bilden einen β I-turn aus, die Torsionswinkel von Pro⁴² und Leu⁴³ entsprechen denen eines β VIIa-turns um die Reste 41 bis 44, jedoch liegt zwischen dem Prolin und dem Leucin eine *cis*-Peptidbindung vor, so dass eine S-förmige Geometrie beobachtet wird.

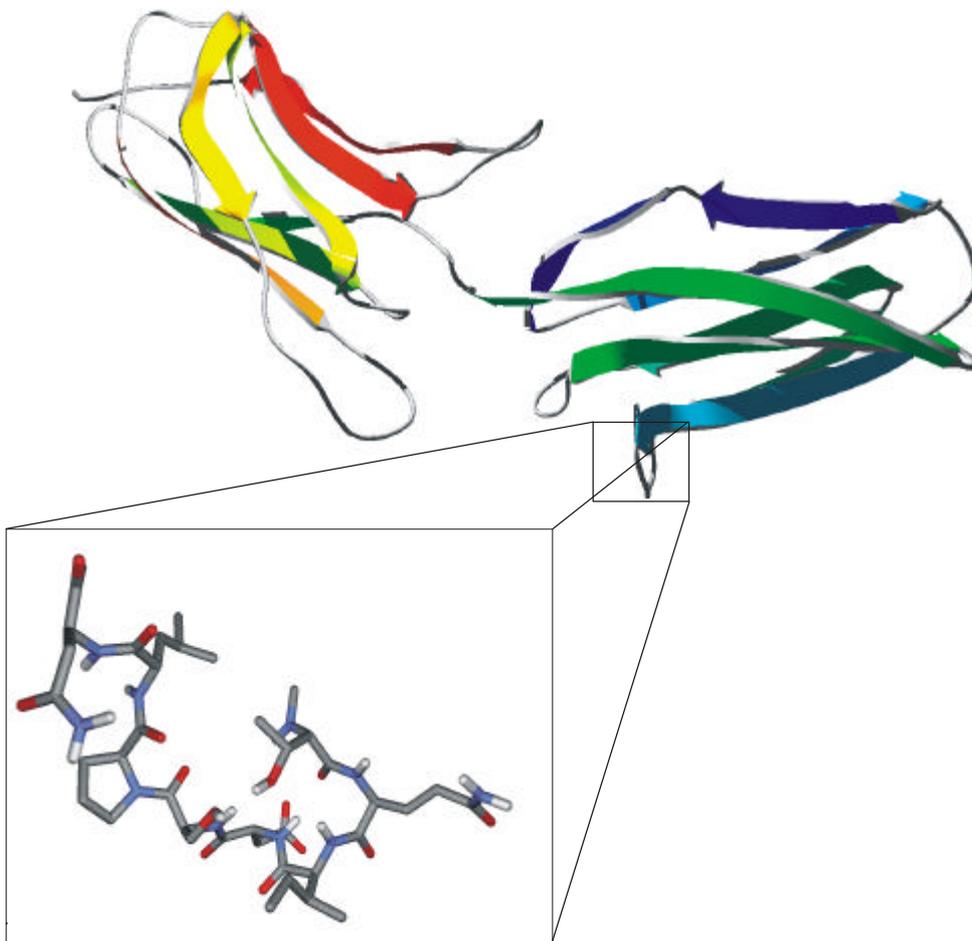


Abbildung 60: VCAM-1 und postulierte Erkennungssequenz²⁷³

4.3.2 Peptidische Liganden auf Basis der Bindungsregion des VCAM-1

Cardarelli et al. untersuchten den Einfluss cyclischer Pentapeptide. Das über eine Disulfidbindung cyclisierte Peptid Arg-Cys*-Asp-Thiopropyl-Cys* inhibiert neben der Fibronectin-Bindung auch die Adhäsion an Leukozyten.²⁷⁴ Auch das cyclische Peptid 1-Adamantanacetyl-Cys*-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys*, das die RGD-Sequenz präsentiert, vermag diese Interaktion zu inhibieren.²⁷⁵

Das Cyclopeptid c(-Ser-D-Leu-Asp-Val-Pro-) hemmt die Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4.²⁷⁶ Trotz der im Peptid vorhandenen D-Aminosäure wurden fünf langsam ineinander übergehende Konformere beobachtet. Das Hauptkonformer zeigt die auch im VCAM-1 im β Vla-turn gefundene *cis*-Peptidbindung des Prolins, welche für die Bindungseigenschaften wichtig zu sein scheint.

Artis et al. untersuchten an einer Reihe cyclischer Oktapeptide die Interaktion der Bindungsregion des VCAM-1 mit VLA-4.²⁷⁷ Dazu ermittelten sie die IC₅₀-Werte dieser Peptide durch ELISA-Untersuchungen. Ausgehend vom über eine Disulfidbrücke cyclisierten Peptid Cys*-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys*-COOH veränderten sie das C-terminale Ende des Peptides (Amid, Verlängerung um eine Aminosäure) und stellten dramatische Verschlechterungen der IC₅₀-Werte (bis zum Faktor 100) fest. Konformationsanalysen zeigten, dass zwar das gesamte Peptid wenig Ähnlichkeit mit der Struktur des VCAM-1 aufwies, jedoch Analogien zu einer Reihe anderer aktiver Peptide bestehen, so dass von einer veränderten Inhibierung des Integrins durch dieses Peptid auszugehen ist.

Dagegen führt die *backbone*-Cyclisierung von Oktapeptiden, die die Sequenz TQIDSP enthalten, zu VCAM-1 analogen Konformationen. Ein Alanin-Scan zeigte, dass besonders Gln, Asp und Pro für die Bindung wichtig sind, während die Substitution des Ser sogar zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts führte.²⁷⁷

Wie zu erwarten, ist die konformationelle Homogenität der Oktapeptide gering. Selbst für niedrige Temperaturen ($\vartheta = -30^\circ\text{C}$) werden sehr große Linienbreiten erhalten. Lediglich für Peptide ohne Prolin sowie für Peptide mit zwei Prolin-Resten lassen sich definierte Konformationen auffinden. Dies lässt darauf schließen, dass die konformationelle Freiheit mit der *cis-trans*-Isomerie der Prolin-Bindung zusammenhängt.²⁷⁷

Um nun diese Variabilität zu minimieren, setzte Maleševic im Rahmen seiner Doktorarbeit¹⁵⁶ cyclische Penta- und Hexapeptide ein, die Teile der Bindungsregion des VCAM-1 enthielten. Dabei sollte der Einfluss unterschiedlicher unnatürlicher Bausteine wie D-Aminosäuren oder β -Homoaminosäuren untersucht werden. Dargestellt wurden unterschiedliche Peptide, die den C-terminalen Teil (IDSPLN), den N-terminalen Teil (TQIDSP) sowie den zentralen Teil

(QIDSP, IDSPN) repräsentieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll dieser Ansatz fortgesetzt werden und insbesondere der Einfluss unterschiedlicher Prolinmimetika auf die Konformation der Peptide untersucht werden.

Dazu wurden zunächst die möglichen Penta- und Hexapeptide aus der Bindungsregion ausgewählt, die einerseits eine komplette Abdeckung ermöglichen, andererseits allerdings das Prolin enthalten müssen. Als Syntheseziele wurden gewählt:

Sequenz: - Thr - Gln - Ile - Asp - Ser - Pro - Leu - Asn -
 c-(- Thr - Gln - Ile - Asp - Ser - Pro -)
 c-(- Gln - Ile - Asp - Ser - Pro -)
 c-(- Ile - Asp - Ser - Pro - Leu - Asn -)
 c-(- Asp - Ser - Pro - Leu - Asn -)

Innerhalb dieser Sequenzen wurden die vier unterschiedlichen Aminosäuren *cis*- und *trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure und -cyclohexancarbonsäure an der Stelle des Prolins eingebaut.

Weiterhin wurden (*R*)- und (*S*)-2-Aminomethylbutansäuren (AMBS) als Isoleucinmimetika verwendet.

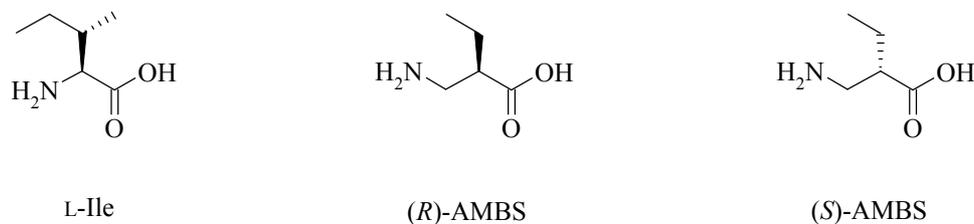


Abbildung 61: Isoleucin und verwendete Mimetika

4.3.3 Synthese der Peptide

4.3.3.1 Synthese der linearen Vorstufen

Für die Synthese wurde die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) verwendet. Als Synthesestrategie wurde die Fmoc/^tBu-Strategie gewählt, da sie einerseits gut etabliert ist und viele Aminosäuren entsprechend geschützt erhältlich sind, andererseits sind die Peptide weniger anfällig gegenüber der Amidspaltung, wie sie besonders für labile Peptidbindungen bei der Abspaltung der semipermanenten Schutzgruppen bei der ^tBu/Bzl-Strategie beobachtet wird.

Tabelle 8: Cyclische Analoga mit Ausschnitten des VCAM-1-Bindungseptops

C-terminale Sequenzen	Zentrale Sequenz	N-terminale Sequenz
P1 c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)	P11 c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-)	P17 c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-)
P2 c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)	P12 c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-)	P18 c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-)
P3 c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)	P13 c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-)	P19 c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-)
P4 c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACHC-Leu-Asn-)	P14 c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACHC-)	P20 c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACHC-)
P5 c-(- <i>(R)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-Leu-Asn-)	P15 c-(-Gln- <i>(R)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-)	P21 c-(-Thr-Gln- <i>(R)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-)
P6 c-(- <i>(S)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-Leu-Asn-)	P16 c-(-Gln- <i>(S)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-)	P22 c-(-Thr-Gln- <i>(S)</i> -AMBS-Asp-Ser-Pro-)
P7 c-(-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)		
P8 c-(-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)		
P9 c-(-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)		
P10 c-(-Asp-Ser- ^t ACHC-Leu-Asn-)		

Alle linearen Peptide wurden an 2-Chlor-Tritylharz synthetisiert. Dies hat den Vorteil, dass die semipermanent geschützten Peptide vom Harz abgespalten werden können und für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Für die C-terminale Aminosäure wurden je nach Peptidfamilie unterschiedliche Ansätze gewählt. Vorteilhaft ist die Verwendung von Prolin oder Glycin, da diese bei der nachfolgenden Cyclisierung nicht racemisieren können. Dies ist bei

den vorliegenden Sequenzen jedoch nur für die Peptide möglich, in denen das Isoleucin durch AMBS ersetzt werden soll (**P5**, **P6**, **P15**, **P16**, **P21**, **P22**). Für die Peptide, die den C-terminalen Teil präsentieren, wurde Leucin als harzgebundene Aminosäure gewählt. Für die zentrale und die N-terminale Sequenz wurde Serin als erste Aminosäure gewählt, für die Peptide **P15** und **P16** wurde zunächst Serin verwendet, in einem zweiten Versuch wurde Prolin als harzgebundene Aminosäure verwandt.. Untersuchungen durch M. Maleševic zeigten, dass diese Aminosäuren besonders vorteilhaft hinsichtlich der Stabilität der Stereochemie bei der Cyclisierung sind.¹⁵⁶

Als semipermanente Schutzgruppen wurden für Serin und Threonin *tert*-Butylether gewählt, die Carboxygruppe in der Seitenkette des Aspartats wurde als *tert*-Butylester geschützt und die endständigen Amidfunktionen des Glutamins und Asparagins wurden mit der Tritylgruppe geschützt. Alle diese Schutzgruppen sind unter den Bedingungen der Abspaltung vom Harz stabil, lassen sich jedoch mit konzentrierter TFA problemlos entfernen.

Die Synthese der linearen Peptide erfolgte mittels eines Syntheseautomaten. Trotz der im Vergleich zu Dichlormethan stärkeren Racemisierungstendenz (vergl. Seite 33f.) wurde DMF als Lösungsmittel gewählt, da die Exothermie der Kupplungsreaktion eine Verwendung von CH₂Cl₂ im Syntheseroboter problematisch macht. Auch die Kühlung mittels flüssigem Stickstoff führte hierbei zu keiner deutlichen Senkung der Temperatur bei akzeptablen Wartezeiten. Als Kupplungsreagenz fand TBTU Verwendung (vergl. Schema 29), die Fmoc-Gruppe wurde mit einer Lösung aus 2 % DBU und 2 % Piperidin in DMF abgespalten (vergl. Schema 25).

Als lineare Peptidvorstufen wurden die folgenden Sequenzen in einer Ansatzgröße von 0.2 mmol synthetisiert:

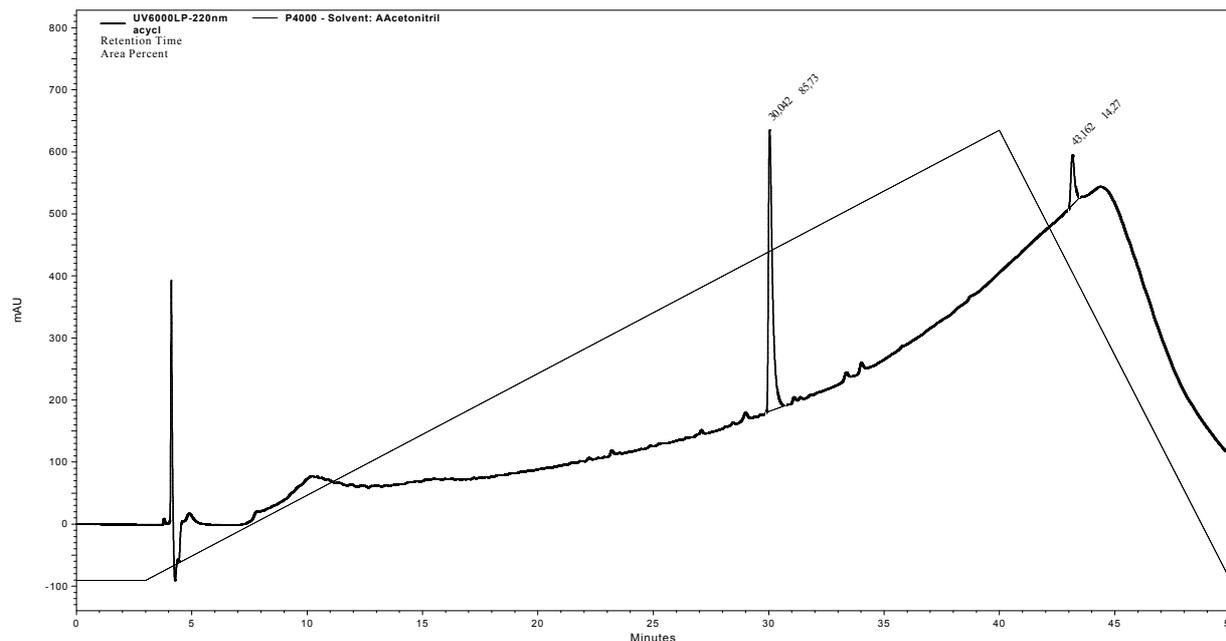
Tabelle 9: Lineare Peptidvorläufer der VCAM-1-Bindungsepitop-Peptide

Peptid	Sequenz
P1 L	H-Asn(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^c ACPC-Leu-OH
P2 L	H-Asn(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^t ACPC-Leu-OH
P3 L	H-Asn(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^c ACHC-Leu-OH
P4 L	H-Asn(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^t ACHC-Leu-OH
P5 L	H-Asn(Trt)-(R)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-Leu-OH
P6 L	H-Asn(Trt)-(S)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-Leu-OH

Peptid	Sequenz
P7 L	H-Asn(Trt)-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^c ACPC-Leu-OH
P8 L	H-Asn(Trt)-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^t ACPC-Leu-OH
P9 L	H-Asn(Trt)-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^c ACHC-Leu-OH
P10 L	H-Asn(Trt)-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)- ^t ACHC-Leu-OH
P11 L	H- ^c ACPC-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P12 L	H- ^t ACPC-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P13 L	H- ^c ACHC-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P14 L	H- ^t ACHC-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P15 La	H-Pro-Gln(Trt)-(R)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P15 Lb	H-Gln(Trt)-(R)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-OH
P16 La	H-Pro-Gln(Trt)-(S)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P16 Lb	H-Gln(Trt)-(R)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-OH
P17 L	H- ^c ACPC-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P18 L	H- ^t ACPC-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P19 L	H- ^c ACHC-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P20 L	H- ^t ACHC-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-Ile-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-OH
P21 L	H-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-(R)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-OH
P22 L	H-Thr(^t Bu)-Gln(Trt)-(S)-AMBS-Asp(^t Bu)-Ser(^t Bu)-Pro-OH

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte entweder durch RP-HPLC oder durch die Abtrennung wasserlöslicher Bestandteile an einer Stummelsäule mit RP-Kieselgel. Diese Technik ermöglicht die schnelle Abtrennung von nichtpeptidischen Bestandteilen, ohne eine zeit- und kostenaufwändige HPLC durchführen zu müssen. Es wird dabei genutzt, dass das voll geschützte Peptid nicht wasserlöslich ist. Der Erfolg dieser Methode ist in Abbildung 62 zu erkennen. Das Chromatogramm zeigt die Acetonitrilphase für das Peptids **P6 L**. Zu erkennen ist, dass nahezu keine UV-aktiven Verunreinigungen vorhanden sind. Die Methode hat jedoch den Nachteil, dass eventuell vorhandene nicht-UV-aktive Verunreinigungen nicht detektiert werden können. Daher erscheint es wenig sinnvoll, Angaben über die Ausbeute der Kupplungen zu machen.

Für die nachfolgende Cyclisierung wird daher für die Berechnung der notwendigen Äquivalente an Kupplungsreagenz und Base von einer „perfekten“ Umsetzung ausgegangen, d. h. von einer Ausbeute von 100 %.

Abbildung 62: Chromatogramm von **P6 L**

4.3.3.2 Cyclisierung

Für die *backbone*-Cyclisierung von Peptiden ist eine ganze Reihe von Methoden bekannt.²⁷⁸⁻
²⁸⁰ Im Prinzip sind alle Methoden, die für die Ausbildung einer Peptidbindung in der linearen Synthese eingesetzt werden, auch für die Cyclisierung möglich. Für die Cyclisierungen der Peptide wurde HATU als Kupplungsreagenz eingesetzt (vergl. Abbildung 15). Da intramolekulare Makrocyclisierungen generell langsamer ablaufen als intermolekulare Bindungsbildungen, spielen Nebenreaktionen wie die Dimerisierung und die Cyclodimerisierung eine wichtige Rolle. Besonders für mittlere Ringe mit 8 bis 14 Ringatomen (z. B. für Cyclotetrapeptide) ist die Cyclisierung schwierig. Die Oligomerisierung wird durch das Prinzip der Hochverdünnung unterdrückt. Dazu wird das zu cyclisierende Peptid in einer Konzentration von 10^{-3} bis 10^{-4} M vorgelegt und dann das Kupplungsreagenz zugegeben. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass große Mengen an Lösungsmittel erforderlich sind, beispielsweise werden für einen typischen Ansatz von 0.2 mmol Peptid, wie er im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zwischen 500 und 2000 mL Lösungsmittel benötigt.

Alternativ findet das sogenannte Pseudo-Hochverdünnungsprinzip Anwendung. Dabei wird das Peptid cyclisiert, während es noch an das Harz gebunden ist (Methode der *on-resin*-Cyclisierung). Diese Methode sorgt dafür, dass die intramolekulare Reaktion gegenüber der intermolekularen bevorzugt ist. Sie ermöglicht einen großen Überschuss an Kupplungsreagenz und einfache Abtrennung der möglichen Nebenprodukte durch einfaches Waschen. Allerdings ist

es notwendig, die harzgebundene Aminosäure über eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette an das Harz anzubringen und den C-Terminus orthogonal sowohl zu den temporären wie auch zu den semipermanenten Schutzgruppen zu schützen (vergl. Abbildung 63).²⁸¹

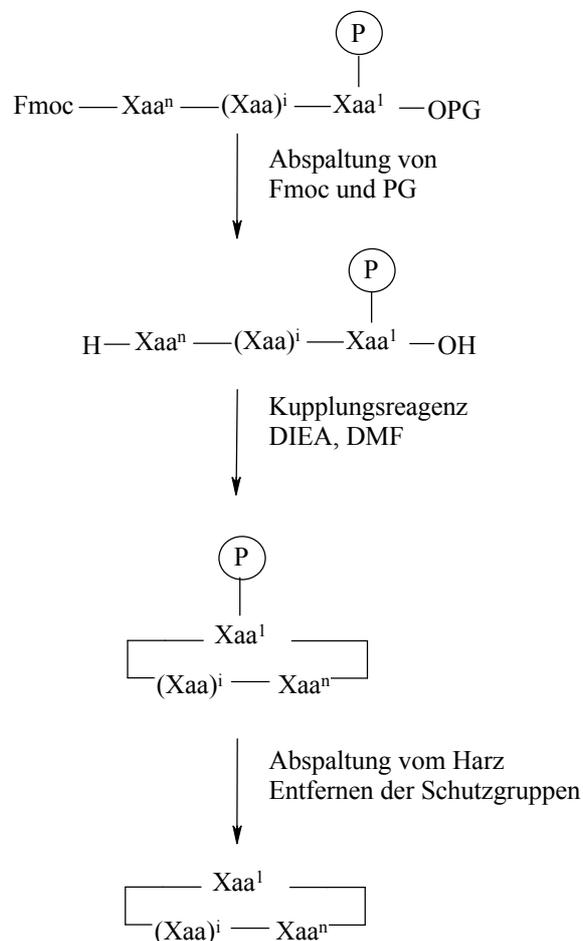


Abbildung 63: *on-resin* Cyclisierung

Die Nutzung einer Zweikanalspritzenpumpe für die getrennte Zugabe von Kupplungsreagenz und linearem Peptid ermöglicht es, die lokale Konzentration an Peptid in der Lösung klein zu halten. Die Zugabe des Kupplungsreagenz HATU über eine Spritzenpumpe ist notwendig, da die Halbwertszeit des HATU unter basischen Bedingungen im Minutenbereich liegt. Diese Methode ermöglicht gleichfalls einen Pseudo-Hochverdünnungseffekt, in einem typischen Experiment nimmt die Konzentration des Peptides um lediglich $10^{-7} \text{ M min}^{-1}$ zu.

Das lineare Peptid wird in einer Konzentration von etwa 10 mM mit einer Geschwindigkeit von ca. 0.01 mL min^{-1} zu einer 60 mM Lösung von 6.0 Eq. Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF gegeben. Parallel werden 3.0 Eq. Kupplungsreagenz in einer 30 mM Lösung zugegeben.

Für die Cyclisierung von 0.2 mmol linearem Peptid werden also nur 30 mL DMF benötigt, eine deutliche Reduzierung gegenüber der für diese Menge in einer klassischen Cyclisierung

in Lösung benötigten Menge (500 bis 2000 mL).

Überdies zeigt die Methode der Spritzenpumpen-Cyclisierung deutlich bessere Ausbeuten für eine Reihe von Peptiden als die *on-resin*-Cyclisierung.²⁸²

Modellhaft wurden für das Pentapeptid **P23** [c(-Asp-Ser-Pro-Leu-Asn-)] die Grenzen dieser Methode getestet. So zeigt die Cyclisierung von 0.05 mmol des linearen Peptidvorläufers H-Leu-Asn(Trt)-Asp(^tBu)-Ser(^tBu)-Pro-OH in einer klassischen Lösungscyclisierung in 15 mL DMF mit 1.1 Eq. HATU und 3.0 Eq. DIPEA lediglich die Ausbildung von Cyclodimer (ber. 1783.94; [2M - 2H₂O + Na]⁺), -trimer (ber. 2664.41; [3M - 3H₂O + Na]⁺) und -tetramer (ber. 3544.88; [4M - 4H₂O + Na]⁺). Die Konzentration an Peptid beträgt hierbei 3.3 mM.

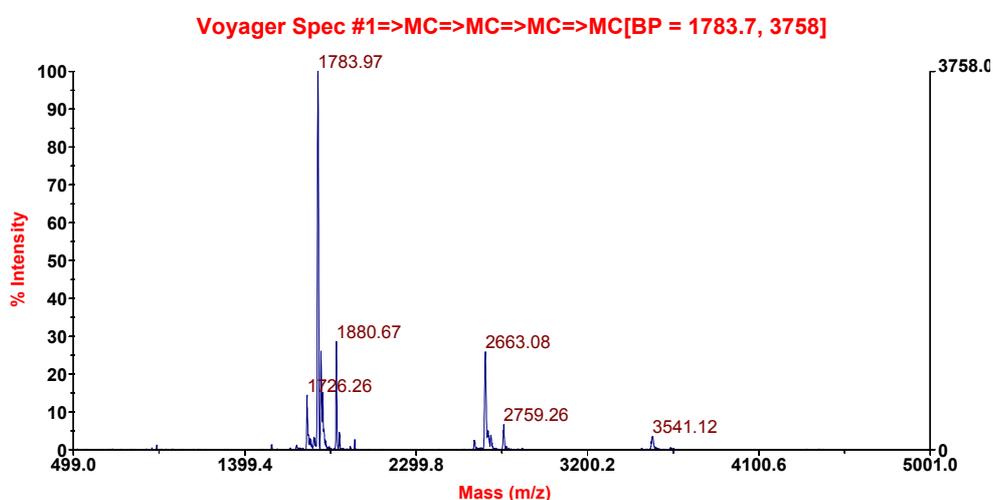


Abbildung 64: MALDI-ToF MS der Cyclisierung von **P23**

Im analogen Fall wurde bei der Cyclisierung des selben Peptidvorläufers mit der Spritzenpumpenmethode (0.05 mmol Peptid resp. 3 Eq. HATU gelöst in 5 mL DMF; Vorlage: 6 Eq. DIPEA in 5 mL DMF) nur das gewünschte Produkt isoliert.

Selbst die weitere Reduzierung des Lösungsmittelvolumens (Endkonzentration an Peptid 10 mM) führt zur Ausbildung des gewünschten Cyclomonomer (38 %, analyt. HPLC, t_R = 31.6 min) neben der Bildung des Cyclodimers (55 %, analyt. HPLC, t_R = 44.0 min). Bedingt durch den deutlichen Unterschied in den Retentionszeiten entstehen bei der Abtrennung keinerlei Probleme (vergl. Abbildung 65).

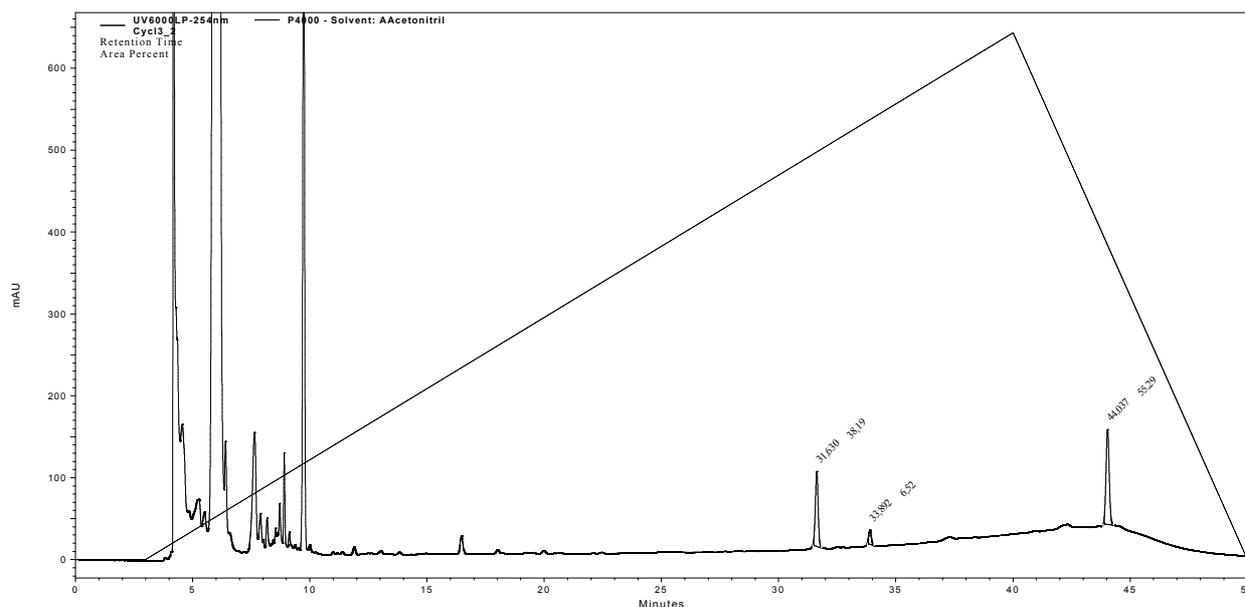


Abbildung 65: Chromatogramm der Spritzenpumpen-Cyclisierung von **P23** (Rohprodukt)

Die Cyclisierung für die Peptide **P1 L** bis **P22 L** gelang problemlos ohne Ausbildung von Dimeren oder Cyclodimeren. Auch die Epimerisierung scheint kein Problem darzustellen, die HPLC zeigt für alle Fälle ein eindeutiges Produkt ohne Peakdeformation.

4.3.3.3 Darstellung der voll entschützten Peptide

Die Abspaltung der semipermanenten Schutzgruppen erfolgte mit einer Lösung aus 95 % Trifluoressigsäure, 2.5 % Wasser und 2.5 % Triisopropylsilan. Im Allgemeinen wurde das Entschützen über Nacht durchgeführt. Die entschützten Peptide wurden zunächst durch Fällung mit kaltem Diethylether und anschließend mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Es ergeben sich für die unterschiedlichen Peptide die folgenden Ausbeuten:

Tabelle 10: Ausbeuten der synthetisierten VCAM-1 analogen Peptide

Peptid	Sequenz	Ausbeute
P1	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)	4 %
P2	c-(-Ile-Asp-Ser- ^l ACPC-Leu-Asn-)	25 %
P3	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)	10 %
P4	c-(-Ile-Asp-Ser- ^l ACHC-Leu-Asn-)	6 %
P5	c-(-(R)-AMBS-Asp-Ser-Pro-Leu-Asn-)	34 %
P6	c-(-(S)-AMBS-Asp-Ser-Pro-Leu-Asn-)	9 %

Peptid	Sequenz	Ausbeute
P7	c-(-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)	4 %
P8	c-(-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)	5 %
P9	c-(-Asp-Ser- ^c AHC-Leu-Asn-)	7 %
P10	c-(-Asp-Ser- ^t AHC-Leu-Asn-)	5 %
P11	c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-)	14 %
P12	c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-)	<1 %
P13	c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c AHC-)	28 %
P14	c-(-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t AHC-)	9 %
P15	c-(-Gln-(<i>R</i>)-AMBS-Asp-Ser-Pro-)	-
P16	c-(-Gln-(<i>S</i>)-AMBS-Asp-Ser-Pro-)	-
P17	c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-)	<1 %
P18	c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-)	<1 %
P19	c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^c AHC-)	13 %
P20	c-(-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser- ^t AHC-)	<1 %
P21	c-(-Thr-Gln-(<i>R</i>)-AMBS-Asp-Ser-Pro-)	<1 %
P22	c-(-Thr-Gln-(<i>S</i>)-AMBS-Asp-Ser-Pro-)	17 %

Zu erkennen ist, dass die Ausbeuten in einem weiten Bereich (knapp 1% – 28 %) variieren, selbst für strukturell sehr ähnliche Peptide. Dies ist unter anderem damit zu erklären, dass bei manchen Peptiden für jede Zwischenstufe präparative HPLC zur Reinigung durchgeführt werden musste, während bei anderen Peptiden die Reinheit der Rohprodukte so gut war, dass lediglich auf der Stufe des geschützten cyclisierten Endproduktes HPLC notwendig war und bei den Zwischenprodukten die Nebenprodukte durch Filtration über RP-Kieselgel abgetrennt werden konnten.

Die Peptide **P15** und **P16** wurden in einem ersten Versuch mit Serin als harzgebundener Aminosäure synthetisiert. Die Cyclisierung führte dabei zur *N*-Guanylierung des Prolins (vergl. Schema 33). In einem zweiten Versuch wurde Prolin als harzgebundene Aminosäure gewählt, dies hat den Vorteil, dass keine Epimerisierung bei der Cyclisierung auftreten kann. Probleme traten bei der Reinigung der geschützten Cyclopeptide auf, die Abtrennung des Peptides von einem Nebenprodukt, welches NMR-spektroskopisch als *N*-Hydroxy-azabenzotriazol (entsteht bei der Aktivierung durch HATU als Nebenprodukt) identifiziert wurde, ist nicht möglich. Eine Abtrennung auf der Stufe des geschützten Peptides sollte aufgrund der beobachteten Polaritätsunterschiede kein Problem darstellen. Auf einen erneuten Darstel-

lungsversuch musste allerdings verzichtet werden, da die Vorräte an Fmoc-geschützten β -Aminosäuren, die von der Firma ChiroBlock zur Verfügung gestellt wurden, erschöpft waren.

4.3.3.4 Resultate der biologischen Tests

Die biologische Aktivität der synthetisierten Peptide wurde von Sylwia Urman getestet. Dazu wurden Zelladhäsionstests mit RAMOS Lymphoblastzellen, die das Integrin $\alpha_4\beta_1$ exprimieren, und löslichem VCAM-1 durchgeführt, um die Inhibierung der Interaktion zwischen VCAM-1 und $\alpha_4\beta_1$ zu beobachten. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Als vollständige Zelladhäsion (100 %) wird der Zustand definiert, der ohne Zugabe von Peptid erreicht wird. Der monoclonale Antikörper BU49 inhibierte die Zelladhäsion zu 96 %. Tabelle 11 gibt die Werte für die Zelladhäsion wieder.

Tabelle 11: Ergebnisse des Zelladhäsionstests für die VCAM-1 analogen Peptide

Peptid	Sequenz	Konzentration [mM]	Durchschnittswert der Zelladhäsion mit Standardabweichung
P3	c-(-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-)	0.150	114 \pm 9
P4	c-(-Ser- ^l ACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-)	0.150	98 \pm 10
P5	c-(-Ser-Pro-Leu-Asn-(<i>R</i>)-AMBS-Asp-)	0.160	103 \pm 14
P6	c-(-Ser-Pro-Leu-Asn-(<i>S</i>)-AMBS-Asp-)	0.160	104 \pm 3
P7	c-(-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-Asp-)	0.185	98 \pm 5
P9	c-(-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-Asp-)	0.180	104 \pm 9
P10	c-(-Ser- ^l ACHC-Leu-Asn-Asp-)	0.180	94 \pm 13
P11	c-(-Ser- ^c ACPC-Gln-Ile-Asp-)	0.180	93 \pm 3
P13	c-(-Ser- ^c ACHC-Gln-Ile-Asp-)	0.176	90 \pm 12
P19	c-(-Ser- ^c ACHC-Thr-Gln-Ile-Asp-)	0.179	96 \pm 10

Es wird deutlich, dass keines der synthetisierten Peptide eine signifikante Hemmung der Zelladhäsion bewirkt. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen kann die bioaktive Konformation des VCAM-1 nur unzureichend durch die dargestellten Peptide mimikriert sein. Auf diesen Punkt wird später noch im Bereich der Konformationsanalyse (Kapitel 4.6) einzu-

gehen sein.

Weiterhin zeigten Fong et al.,²⁷² dass besonders das Prolin für die Bindung von potentiellen Inhibitoren notwendig ist. Möglicherweise ist die Struktur der ACACs nicht dazu in der Lage, die räumliche Ausdehnung des Prolins in genügendem Maße zu imitieren. Außerdem wird beschrieben, dass die *cis*-Konfiguration der Peptidbindung des Prolins wichtig für die Wechselwirkung mit dem Integrin ist.

4.4 ADAM 8

4.4.1 Auftreten und Funktion

ADAM 8 wurde ursprünglich als CD 156 aus murinen Makrophagen geklont.²⁸³ Es wird auf Makrophagen, Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert und tritt im zentralen Nervensystem (ZNS) bei Neurodegeneration verstärkt auf. Weiterhin taucht es bei der Aktivierung von Glia-Zellen, Astrocyten und Mikroglia auf, so dass angenommen werden kann, dass ADAM 8 eine wichtige Rolle in der Neuron-Glia-Interaktion spielt.²⁸⁴ Zwar vermag ADAM 8 nach der Verletzung von Neuronen eine Schadensbegrenzung zu erreichen, jedoch führt diese auch zu einer verringerten Regenerationsfähigkeit der Neuronen.

Weiterhin spielt ADAM 8 eine Rolle in der Zellfusion sowie bei der Zelladhäsion.²⁸⁴

Die Disintegrindomäne von ADAM 12 enthält die Tripeptidsequenz –Ser–Asn–Ser– (SDS). Diese ist für die Adhäsion von Myoblasten verantwortlich.²⁸⁵ Wird nun eine weitgehende Sequenz- und Strukturanalogie zwischen ADAM 12 und ADAM 8 angenommen, so sollte humanes ADAM 8 (hADAM 8) die Erkennungssequenz –Lys–Asp–Met– (KDM) und murines ADAM 8 (mADAM 8) –Lys–Asp–Lys– (KDK) in einer *loop*-Struktur präsentieren. Es ist noch nicht bekannt, welches Integrin in diese Interaktion involviert ist, es scheinen jedoch mehrere Integrine an ADAM 8 zu binden (vergl. Seite 60). Auch ist unbekannt, welche Rolle die Proteasedomäne bei der ADAM-Integrin-Interaktion spielt. Darüber hinaus ist auch eine homophile Interaktion der Disintegrindomänen von ADAM 8 bekannt, die zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit der Erkennungssequenz und ADAM herangezogen werden soll.

4.4.2 Synthesziele und Strategie

Ein Peptidligand, der die entsprechende Erkennungssequenz präsentiert, könnte die Regenerationsfähigkeit verletzter Nerven möglicherweise verbessern. Daher soll ein *spatial screening* durchgeführt werden, um die aktive Konformation der Erkennungssequenz der Disintegrindomäne von mADAM 8 zu bestimmen. Die entsprechende Aminosäuresequenz lautet:



Auf dieser Basis wurden Hexapeptide synthetisiert, die neben der Erkennungssequenz –Lys–Asp–Lys– die drei *N*-terminalen Aminosäuren Arg–Leu–Ser enthalten. Aus synthetischen Gründen wurde auf die Einbeziehung von *C*-terminalen Aminosäuren verzichtet, da Cys-haltige Peptide wenig stabil gegenüber Oxidation sind.²⁷⁹ Es wurde ein D-Aminosäure-*Scan*

für die Aminosäuren Arg, Leu und Ser durchgeführt (**KDK2** bis **KDK4**), weiterhin ein *Ala-Scan* zur genaueren Aufklärung der Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der Erkennungssequenz (**KDK5** bis **KDK7**). Um genaueren Aufschluss über die Funktion der Lysinreste zu erhalten, wurde darüber hinaus noch ein Peptid synthetisiert, in dem beide Lysine durch Alaninreste ersetzt wurden (**KDK8**). Tabelle 12 zeigt die synthetisierten Peptide.

Tabelle 12: Synthetisierte Peptide mit mADAM-8-Erkennungssequenz

Peptid	Sequenz
KDK1	H-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-OH
KDK2	c-(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-)
KDK3	c-(-Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-)
KDK4	c-(-Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-)
KDK5	c-(-D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Lys-)
KDK6	c-(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Ala-Lys-)
KDK7	c-(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Ala-)
KDK8	c-(-D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Ala-)

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit²⁸⁶ stellte Gollasch bereits das Peptid **KDK3** dar. Dazu verwendete sie die *on-resin*-Cyclisierung mit an der α -Carboxygruppe Dmb-geschütztem Aspartat als harzgebundener Aminosäure. Trotz Einsatzes unterschiedlicher Kupplungsreagenzien (HATU, HATU/HOAt, DIC/HOAt) gelang keine befriedigende Cyclisierung, neben der Guanylierung wurde vor allem die Epimerisierung bei bis zu 50 % der Peptide beobachtet.

Daher wurde für die Darstellung der Peptide eine alternative Strategie gewählt. Da für die Synthese der VCAM-1 analogen Peptide gute Erfahrungen mit der Cyclisierung unter Pseudo-Hochverdünnung gemacht wurden, erschien es sinnvoll, diese Methode auch für die hier darzustellenden Peptide einzusetzen. Daher wurden die linearen Peptide mit der Fmoc/^tBu-Strategie an 2-Chlortritylharz synthetisiert und im voll geschützten Zustand vom Harz abgespalten. Entsprechend den guten Erfahrungen mit den Peptiden **P1** bis **P10** wurde Leucin als harzgebundene Aminosäure gewählt. Für das Peptid **KDK3** wurde analog D-Leucin verwendet.

Als semipermanente Schutzgruppen fanden die Boc-Gruppe für das Lysin, der *tert*-Butylether für das Serin sowie der *tert*-Butylester im Falle des Aspartats Verwendung. Das Arginin wurde mit der Pbf-Gruppe (2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) geschützt, einer ebenfalls mit konzentrierter TFA abspaltbare Schutzgruppe.

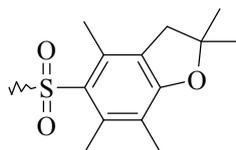


Abbildung 66: Die Pbf-Gruppe

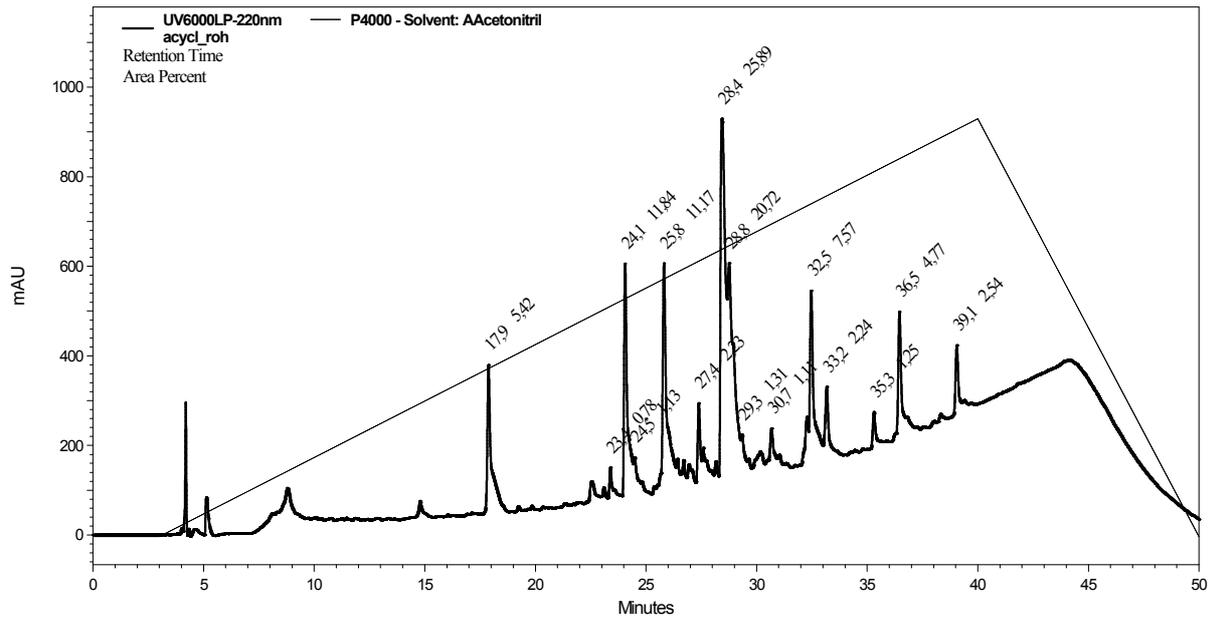
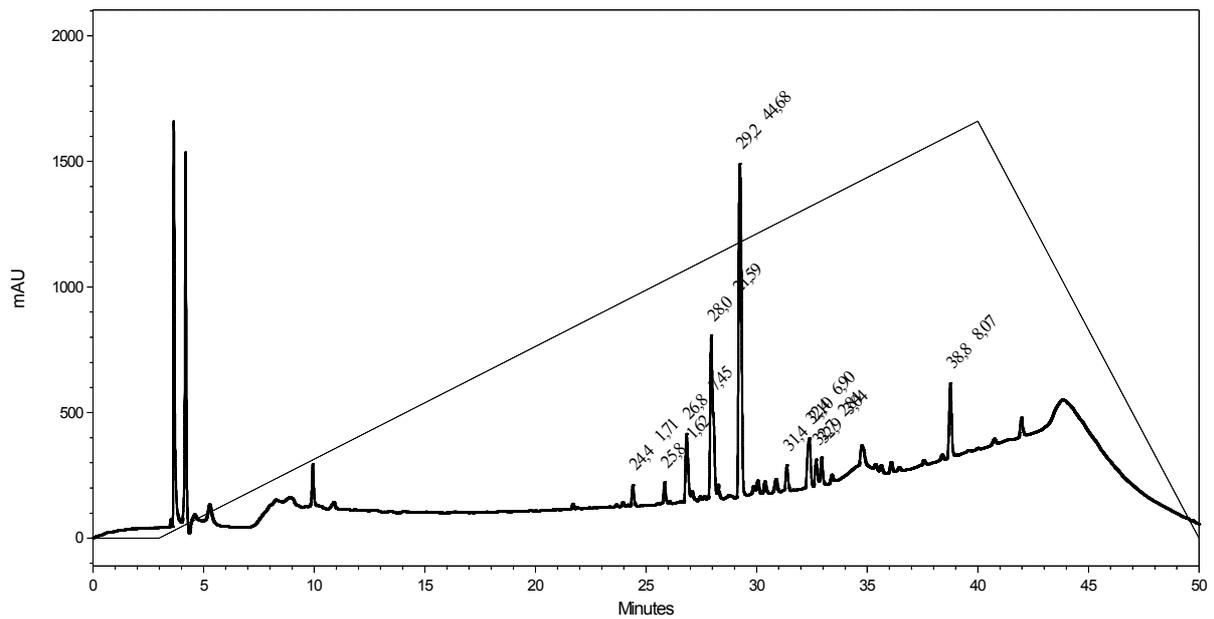
Die in Tabelle 13 gezeigten linearen Peptide wurden mittels SPPS am Synthesautomaten dargestellt:

Tabelle 13: Lineare Peptidvorstufen der mADAM 8-Bindungseptope

Peptid	Sequenz
KDK1	H-Arg(Pbf)-Leu-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Asp(^t Bu)-Lys(Boc)-OH
KDK2 L	H-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Asp(^t Bu)-Lys(Boc)-D-Arg(Pbf)-Leu-OH
KDK3 L	H-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Asp(^t Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-D-Leu-OH
KDK4 L	H-D-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Asp(^t Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Leu-OH
KDK5 L	H-Ser(^t Bu)-Ala-Asp(^t Bu)-Lys(Boc)-D-Arg(Pbf)-Leu-OH
KDK6 L	H-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-D-Arg(Pbf)-Leu-OH
KDK7 L	H-Ser(^t Bu)-Lys(Boc)-Asp(^t Bu)-Ala-D-Arg(Pbf)-Leu-OH
KDK8 L	H-Ser(^t Bu)-Ala-Asp(^t Bu)-Ala-D-Arg(Pbf)-Leu-OH

Die Synthese gelang nicht in befriedigender Weise. Das Chromatogramm von **KDK3 L** zeigt eine Vielzahl von Peaks (vergl. Abbildung 67). Die manuelle Synthese nach analogen Vorschriften für Kupplungszeiten und -reagenzien zeigt hier eine deutlich bessere Reinheit des linearen Peptids (vergl. Abbildung 68).

Darüber hinaus gelingt durch die Verwendung von Piperazin (6 % in DMF) als Abspaltreagenz für die temporäre Schutzgruppe Fmoc für die Peptide der KDK-Gruppe eine weitere Verbesserung der Reinheit der linearen Peptide (vergl. Abbildung 69).

Abbildung 67: Chromatogramm von **KDK4 L**, Synthese am SyntheseautomatenAbbildung 68: Chromatogramm von **KDK4 L**, manuelle Synthese

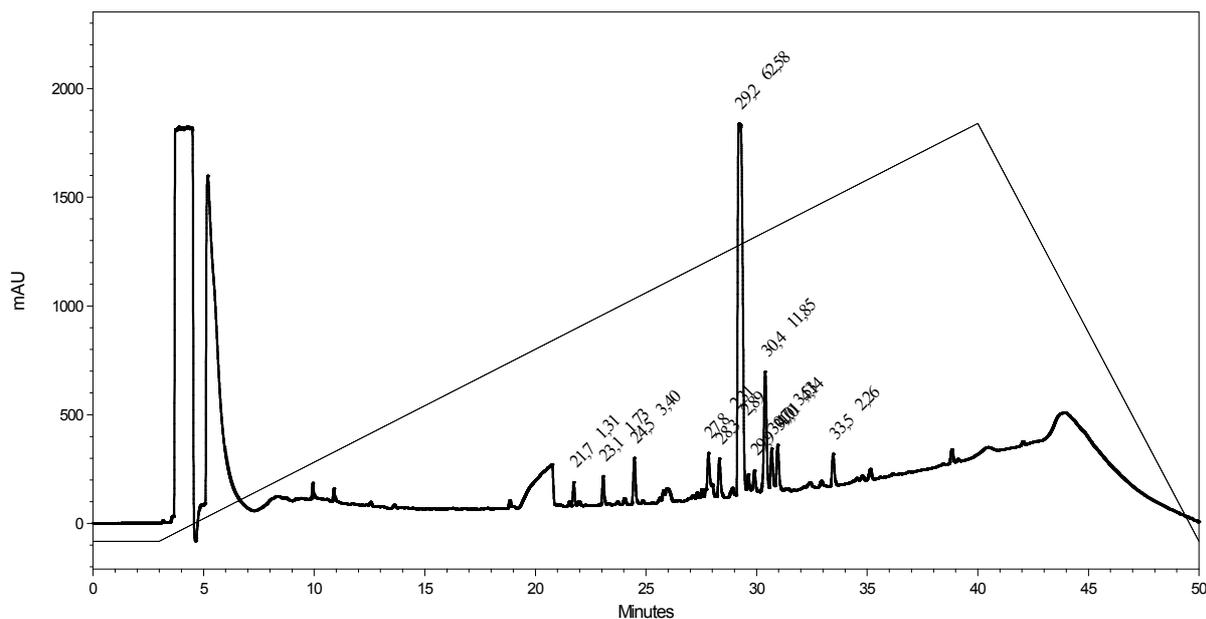


Abbildung 69: Chromatogramm von **KDK4 L**, Fmoc-Abspaltung mit Piperazin

Die Cyclisierung der Peptide gelang wie oben beschrieben durch langsame Zugabe der linearen Peptidvorstufe sowie des Kupplungsreagenzes zu einer Lösung von DIPEA in DMF (Spritzenpumpen-Cyclisierung, vergl. Abschnitt 4.3.3.2).

Sie gelingt ohne erkennbare Epimerisierung, weder die analytische RP-HPLC noch die NMR-Spektren der entschützten Produkte liefern Hinweise auf Nebenprodukte.

Die Abspaltung der semipermanenten Schutzgruppen erfolgt mit einem Cocktail aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser und liefert die entschützten Peptide in unterschiedlich guten Ausbeuten (vergl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Ausbeuten der synthetisierten KDK-Peptide

Peptid	Sequenz	Ausbeute
KDK1	H-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-OH	19 %
KDK2	c(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-)	11 %
KDK3	c(-Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-)	4 %
KDK4	c(-Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-)	3 %
KDK5	c(-D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Lys-)	5 %
KDK6	c(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Ala-Lys-)	7 %
KDK7	c(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Ala-)	3 %

Peptid	Sequenz	Ausbeute
KDK8	c-(D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Ala-)	15 %

Abhängig von der Darstellung der linearen Vorläufer variiert die Ausbeute. Besonders die Peptide **KDK3** bis **KDK7** zeigten bei der Synthese am Syntheseautomaten starke Verunreinigungen, die durch präparative RP-HPLC abgetrennt werden mussten. Nutzung der manuellen Synthese unter Verwendung von Piperazin als Abspaltreagenz sollte hier die Ausbeute verbessern. Die Endprodukte weisen eine hohe Reinheit auf, weder analytische RP-HPLC noch die NMR-Spektren zeigen Hinweise auf Verunreinigungen oder Epimerisierung.

4.4.3 Ergebnisse erster biologischer Tests

Die biologische Aktivität von einigen der synthetisierten Peptide wurde von Sylwia Urman untersucht. Dazu wurde der Einfluss der Peptide auf die homophile Interaktion der Disintegrindomänen von mADAM8 in einem Zelladhäsionstest getestet. Die erhaltene Zelladhäsion ist in Abbildung 70 dargestellt. Es wird deutlich, dass sowohl das Peptid **KDK2** wie auch das Peptid **KDK3** eine deutliche Aktivität zeigen.

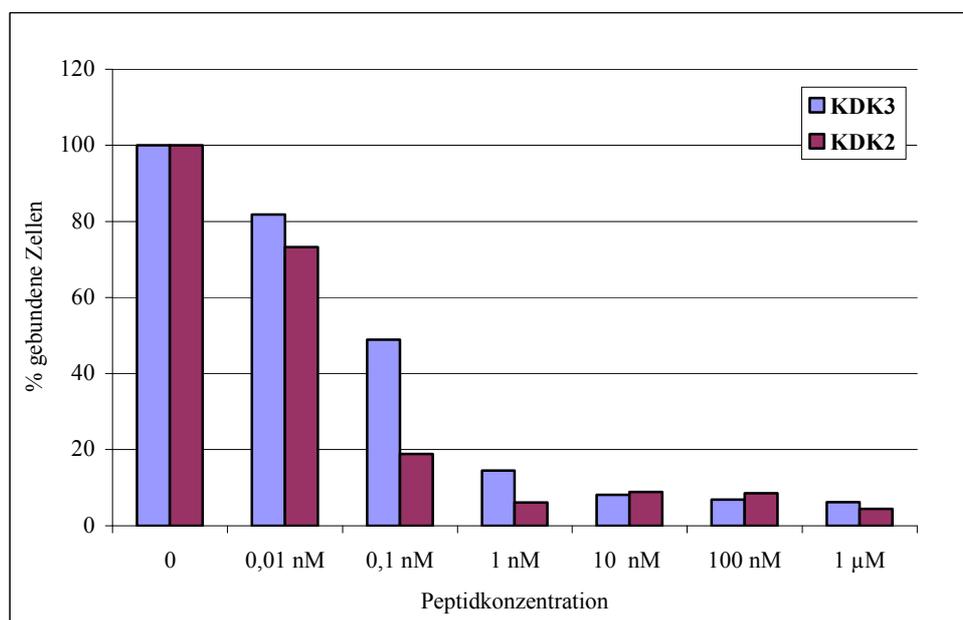


Abbildung 70: Konzentrationsabhängige Hemmung der Zelladhäsion

4.5 NMR-Spektren

4.5.1 Zuordnung der Signale

Die Protonenspektren von Peptiden lassen sich in drei charakteristische Bereiche aufteilen. Im Bereich zwischen 7 und 9 ppm sind die Amidprotonen der Peptidbindung und der terminalen Amidgruppen von Glutamin und Asparagin zu finden, ferner die protonierten Amine und Guanidinprotonen von Lysin bzw. Arginin. Zwischen 3 und 5 ppm liegen die Signale für die α -Protonen, ferner die Hydroxyprotonen des Serins. Stärker hochfeldverschoben als die Signale der α -Protonen finden sich die Signale der β -Protonen und – je nach Substitution – auch die weiteren Signale. Am weitesten hochfeldverschoben finden sich i. A. die Methylgruppen des Leucins im Bereich zwischen 0.8 und 1.0 ppm (alle Werte für DMSO).

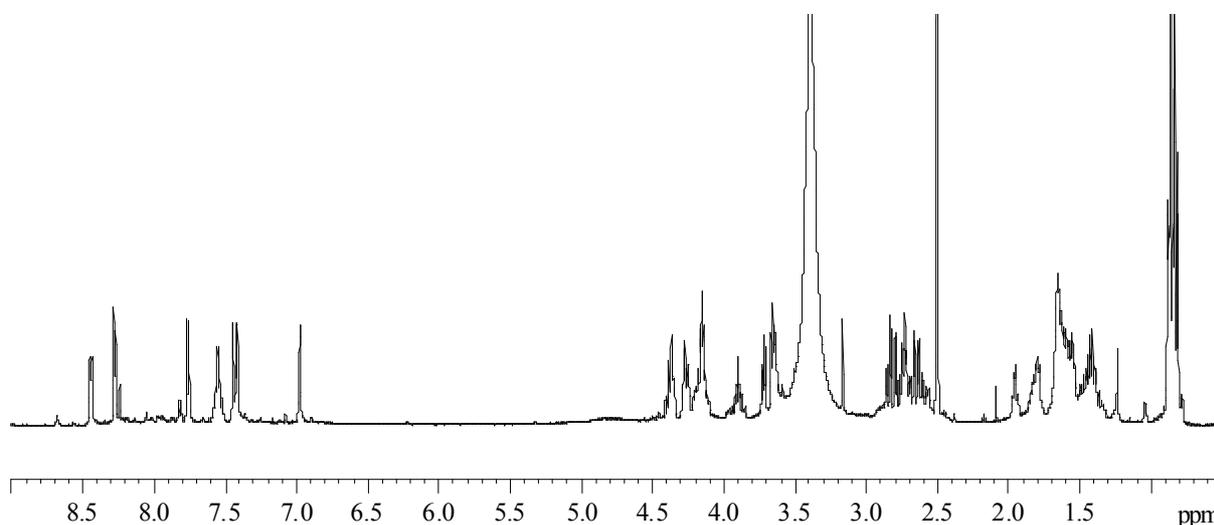
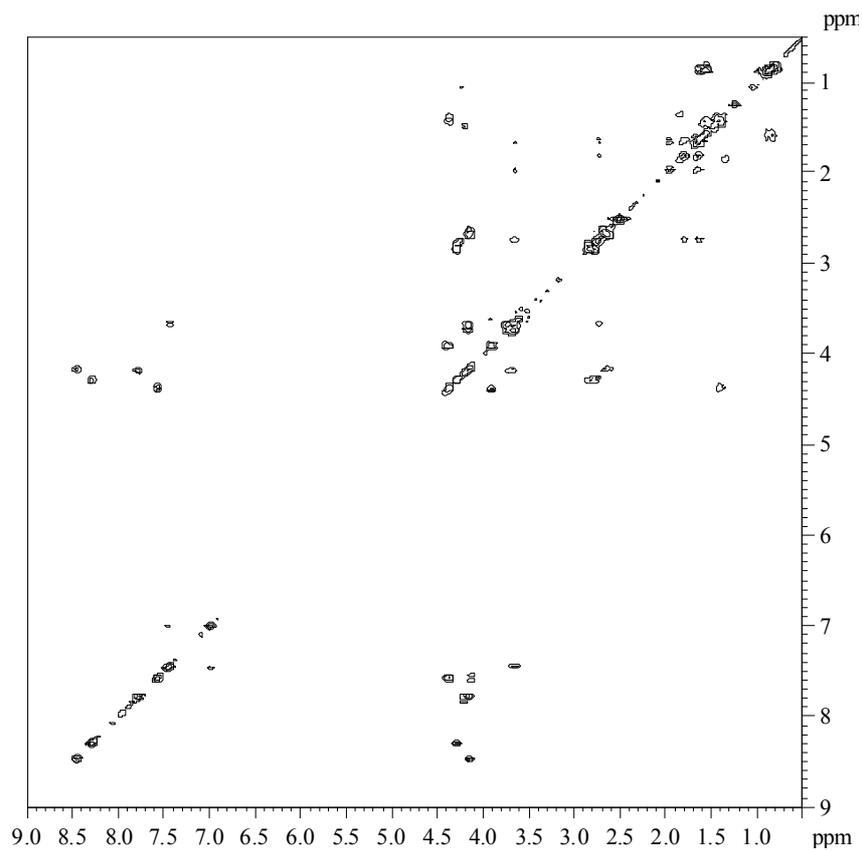
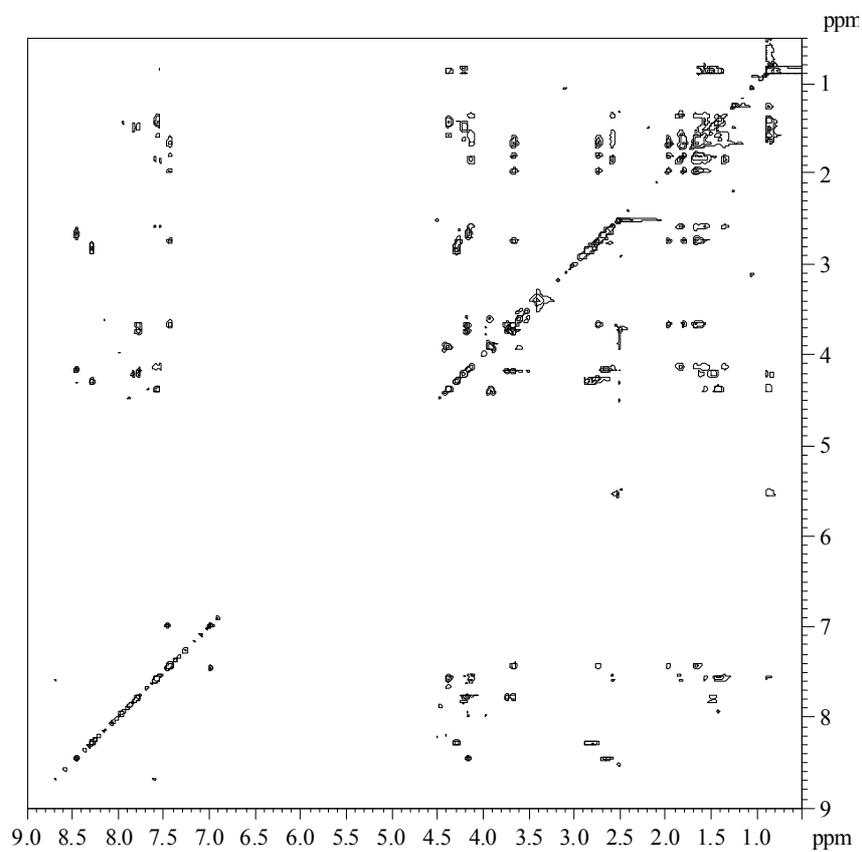


Abbildung 71: ^1H -Spektrum von **P8** (600 MHz, DMSO)

Die Zuordnung der Signale erfolgt durch Zuhilfenahme zweidimensionaler Methoden (COSY, TOCSY, vergl. Abbildung 72 und Abbildung 73). Aminosäuren mit gleichen Koppungsschemata werden durch die Nutzung von ROESY-Spektren zugeordnet.

Die Zuordnung der ^{13}C -Signale erfolgt über heteronukleare Invers-Experimente (HMQC, HMBC, vergl. Abbildung 74).

Abbildung 72: COSY-Spektrum von **P8** (600 MHz, DMSO)Abbildung 73: TOCSY-Spektrum von **P8** (600 MHz, DMSO)

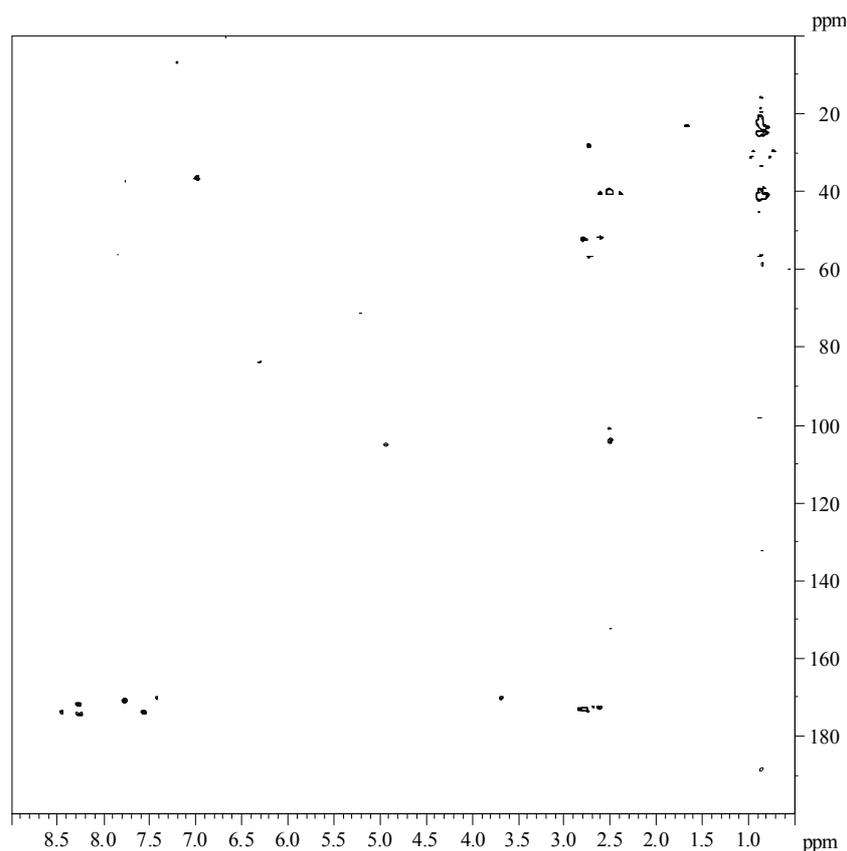
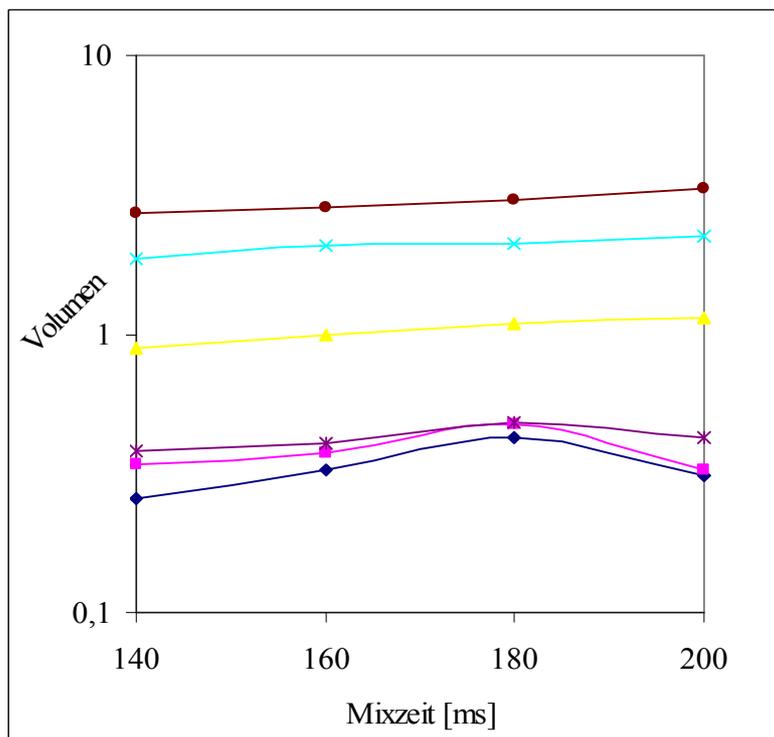


Abbildung 74: HMBC-Spektrum von **P8** (600 MHz, DMSO)

4.5.2 Bestimmung konformationsrelevanter Parameter

Wichtig für die Aufklärung der Konformation von Peptiden ist die Ermittlung von Parametern, die Rückschlüsse auf die Struktur ermöglichen. Dazu werden vor allem Protonenabstände bestimmt, die durch den *Nuclear Overhauser Effekt* entstehen. Die Gleichung zur Berechnung der Abstände basiert auf der Annahme einer linearen Abhängigkeit des NOE von den Mixzeiten. Dies ist jedoch nur für kurze Mixzeiten gegeben. Vor der Berechnung der Protonenabstände aus den Integralen der Kreuzsignale der ROE-Spektren ist es daher wichtig, die Aufbauraten des ROE zu bestimmen. Für eine exakte Abstandsberechnung ist demnach eine solche Mixzeit auszuwählen, für die die Aufbauraten für alle herangezogenen ROEs im linearen Bereich liegt. Die Aufbauraten sind dabei von der Beweglichkeit im Molekül abhängig, das heißt sie sind nicht für alle ROEs gleich (vergl. Abbildung 75). Bei größeren Unterschieden in der Beweglichkeit kann es sogar vorkommen, dass ein ROE bereits abklingt, während ein anderer erst entsteht und detektierbar ist.



◆ Asp H^N Ser H^N * 'ACPC H^α 'ACPC H^β ♀ Asp H^N Asp H^α
 ♀ Ser H^N 'ACPC H^N ◆ Ser H^{βproR} Ser H^{βproS} ✱ Leu H^N 'ACPC H^α

Abbildung 75: Volumina ausgewählter Kreuzsignale des ROESY von **P8**

Da bei 600 MHz für die vermessenen Peptide lediglich sehr kleine NOEs gefunden wurden, fanden zur Abstandsbestimmung ROE-Spektren Verwendung.

Es werden ROESY-Spektren mit unterschiedlichen Mixzeiten im Bereich zwischen 140 und 200 ms aufgenommen und die Volumina der Kreuzsignale ermittelt. Durch Referenzierung zu einem bekannten Abstand lassen sich aus diesen Volumina unter Einbeziehung der Offset-Korrektur des Spinlock-Felds Protonenabstände ermitteln. Als Referenzsignal bieten sich in den verwendeten Peptiden die β -Protonen des Serins bzw. des Aspartats an. In Abbildung 76 sind die charakteristischen Bereiche eines ROESY-Spektrums für ein cyclisches Pentapeptid dargestellt.

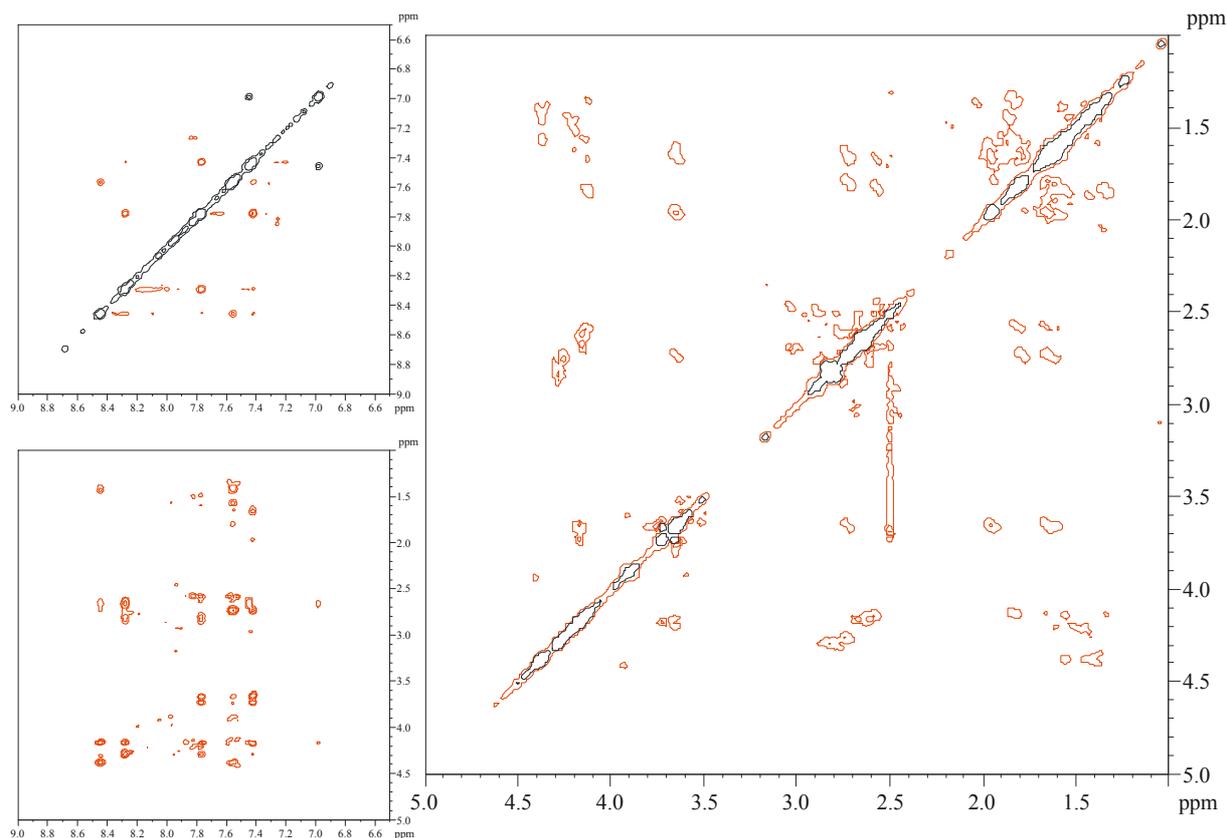


Abbildung 76: ROESY-Spektrum von **P8** (600 MHz, DMSO, Mixzeit 180 ms)

Im Bereich der Amidprotonen (oben rechts) sind in der Regel nur wenige Kreuzsignale zu erkennen, die durch NOE hervorgerufen werden. Darüber hinaus sind auch TOCSY-Signale zu erkennen, die jedoch ein positives Vorzeichen besitzen, im vorliegenden Fall werden sie durch die Kopplung zwischen den Amidprotonen des Glutamats hervorgerufen. Besonders viele NOEs lassen sich i. A. zwischen den Amidprotonen und den α - und β -Protonen identifizieren (unten links). Auch zwischen den Protonen der Seitenkette treten NOEs auf. Allerdings besteht hier vor allem für die Methylgruppen der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Aminomethylbutansäure das Problem, dass keinerlei Zuordnung für ein bestimmtes Wasserstoffatom gemacht werden kann, so dass diese NOEs keine Berücksichtigung als *restraints* in der Strukturaufklärung finden können.

4.6 Konformationsanalyse von Analoga der Erkennungsregion des VCAM-1

Konformationsanalysen wurden für die C-terminalen Sequenzen der Erkennungsregion des VCAM-1 angefertigt. Dabei wurde der Einfluss der β -Aminosäuren *cis*- und *trans*-2-Aminocyclopentan- bzw. -hexancarbonsäure auf die Konformation von cyclischen Penta- und Hexapeptiden aufgeklärt.

4.6.1 Pentapeptide

4.6.1.1 Konformationelle Daten aus NMR-Untersuchungen

Tabelle 15: Pentapeptide mit dem C-terminalen Teil der Erkennungsregion des VCAM-1

Peptid	Sequenz
P7	c-(-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)
P8	c-(-Asp-Ser- ^l ACPC-Leu-Asn-)
P9	c-(-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)
P10	c-(-Asp-Ser- ^l ACHC-Leu-Asn-)

Beim Vergleich der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen der Pentapeptide **P7** bis **P10** zeigen sich z. T. deutliche Unterschiede (Abbildung 77). So tritt das Amidproton des Asparagin am stärksten (**P7**, **P8**), am zweitstärksten (**P10**) oder am drittstärksten tieffeldverschoben auf. (**P9**) auf. Auch das Leucin nimmt unterschiedliche relative Verschiebungen ein. Konstant findet sich das Amidproton der β -Aminosäure am weitesten hochfeldverschoben. Dies ist sicherlich durch die besonderen elektronischen Verhältnisse zu erklären, die elektronenziehende Carboxylgruppe ist weiter entfernt als dies in den α -Aminosäuren der Fall ist, so dass das Amidproton eine geringere Entschirmung und damit eine weniger starke Tieffeldverschiebung erfährt.

Auffällig ist darüber hinaus, dass die Amidprotonen des Peptids **P10** einen deutlich breiteren Bereich umschließen (1.36 ppm), als dies für die Peptide **P7** bis **P9** der Fall ist (0.96 bis 1.08 ppm).

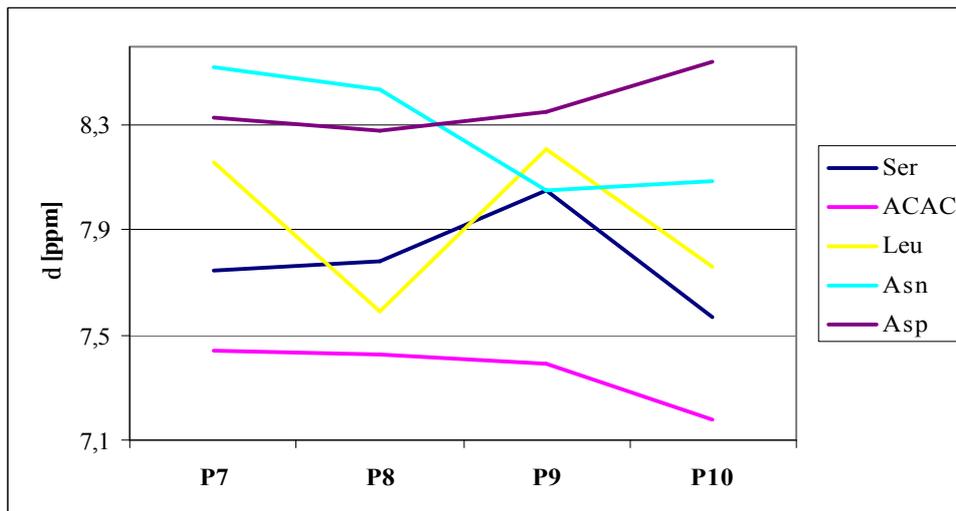


Abbildung 77: Vergleich der chemischen Verschiebung der H^N -Protonen von **P7** bis **P10**

Analoge Werte werden für die den Amidprotonen benachbarten Protonen erhalten (bei der β -Aminosäure handelt es sich um die β -Protonen, für alle anderen Reste um die α -Protonen). Besonders das α -Proton des Leucins zeichnet sich durch ein weites Intervall der chemischen Verschiebung aus, in **P8** ist es am weitesten tieffeldverschoben, während es in **P9** am weitesten hochfeldverschoben ist. Auch findet man die Resonanz des H^α (Leu) in einem Bereich von mehr als 0.5 ppm, während die Resonanz H^α (Asp) nur innerhalb eines Bereiches von 0.2 ppm liegt. Analog zu den Werten für die Amidprotonen hat auch hier das Peptid **P10** den größten Verschiebungsbereich (0.93 ppm), während die Peptide **P7** bis **P9** in einem Intervall von 0.5 bis 0.7 ppm Breite liegen.

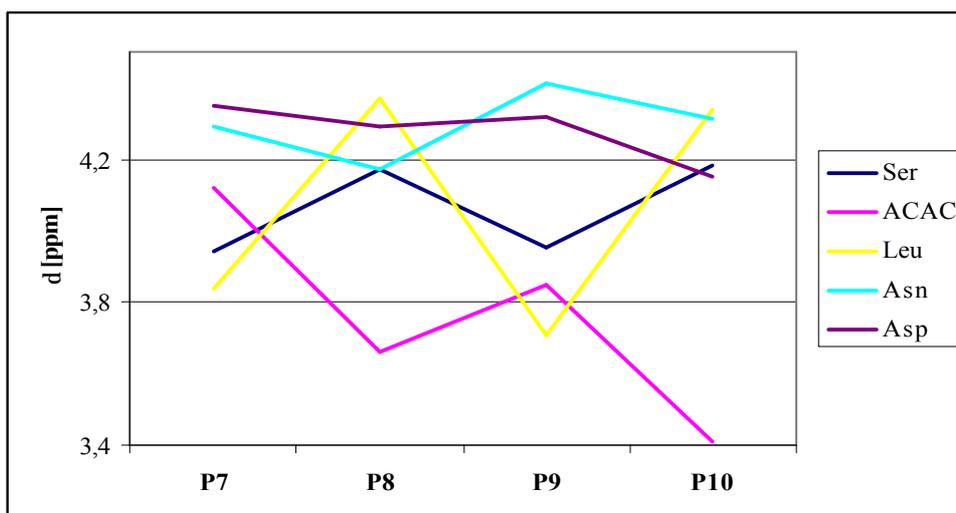


Abbildung 78: Vergleich der chemischen Verschiebung der α -Protonen von **P7** bis **P10**

Ein weiterer charakteristischer NMR-Parameter sind die vicinalen Kopplungskonstanten

$^3J_{H^N H^a}$ zwischen den Amidprotonen H^N und den benachbarten Protonen H^α bzw. H^β (vergl. Abbildung 79). Erkennbar ist, dass die Kopplungskonstanten der β -Aminosäuren relativ kleine Werte in allen Peptiden aufweisen, während insbesondere die Werte für das Serin in allen Peptiden zu den größten gehören.

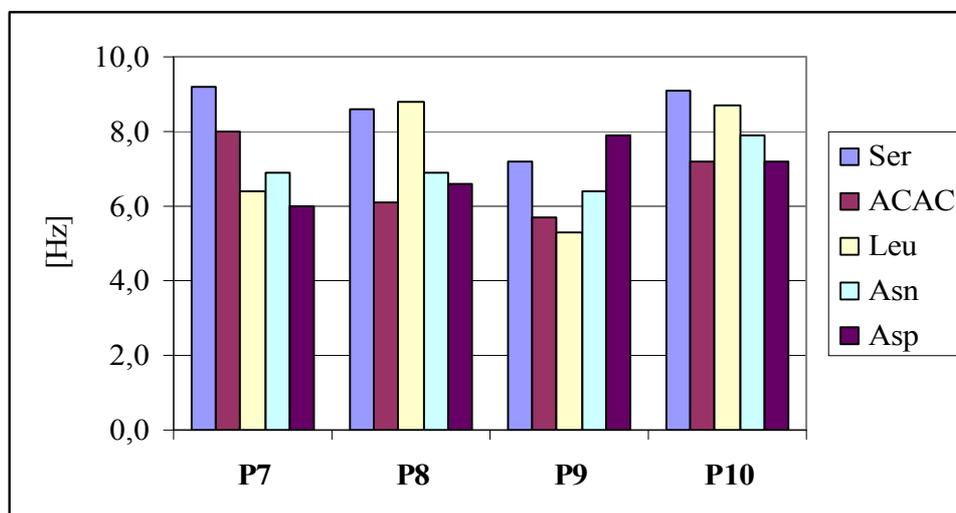


Abbildung 79: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von **P7** bis **P10**

Die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen ist in Abbildung 80 dargestellt.

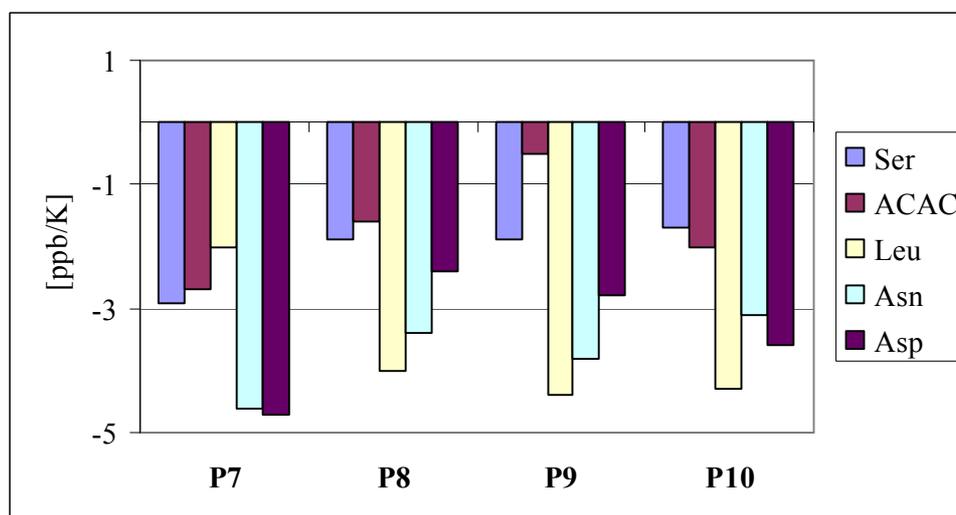


Abbildung 80: Temperaturgradienten der chemischen Verschiebung der H^N -Protonen

Im Peptid **P7** zeigen die Amidprotonen von Ser, c ACPC und Leu relativ kleine absolute Beträge, die auf eine Abschirmung vom Lösungsmittel schließen lassen. Ähnliche Werte finden sich bei den Amidprotonen von Ser und t ACPC in **P8** und **P10**. Da es sich hierbei jeweils um die Amidprotonen benachbarter Aminosäuren handelt, ist nicht von einer durch

Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten *turn*-Struktur auszugehen, in denen die Abschirmungen für die H^N der Aminosäure i und die Aminosäure $i+2$ oder $i+3$ beobachtet werden sollten. Im Falle des Peptids **P9** zeigt das $^c\text{ACHC}$ einen sehr flachen Temperaturgradienten ($\Delta\delta/\Delta T = -0.5 \text{ ppb K}^{-1}$), so dass davon auszugehen ist, dass dieses Amidproton gegenüber dem Lösungsmittel gut abgeschirmt ist. Allerdings kann anhand dieser Daten nicht postuliert werden, welche Sekundärstruktur dieses Peptid tatsächlich haben wird, da aus dem Temperaturgradienten nicht hervorgeht, ob das $^c\text{ACHC}$ in einen α -, einen β - oder einen γ -*turn* involviert ist.

4.6.1.2 c(-Asp-Ser- $^c\text{ACPC}$ -Leu-Asn-) P7

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen erfolgt unter Zuhilfenahme der Protonenabstände sowie der Kopplungskonstanten. Allerdings ist dies nicht in jedem Fall möglich, so überlagern die Signale der β -Protonen des Serins im Bereich zwischen 3.60 und 3.72 ppm und die des Asparagins im Bereich zwischen 2.58 und 2.66 ppm, eine eindeutige Zuordnung ist somit nicht möglich. Auch die Signale der β -Protonen des Leucins im Bereich von 1.5 bzw. 1.8 ppm werden durch andere Signale, vor allem durch Protonen des Cyclopentanrings überlagert, so dass keine Zuordnung gelingt. Das β -Proton des Aspartats bei 2.89 ppm zeigt eine Kopplungskonstante von $^3J_{H^aH^b} = 6.5 \text{ Hz}$ sowie einen starken ROE zum α -Proton des Aspartats, das β -Proton bei 2.55 ppm zeigt eine Kopplungskonstante von $^3J_{H^aH^b} = 9.7 \text{ Hz}$ sowie einen starken ROE zum Amidproton des Aspartats. Unter Berücksichtigung der ROE-Abstandsdaten wird deutlich, dass es sich bei dem tieffeldverschobenen β -Proton um das $H^{\beta\text{proR}}$ handelt, während das hochfeldverschobene das $H^{\beta\text{proS}}$ -Proton ist.

Die Seitenketten liegen aufgrund ihrer Flexibilität häufig in einem Konformerengleichgewicht vor, das bei Raumtemperatur durch NMR-Spektroskopie nicht aufgelöst werden kann. Mithilfe der $^3J_{H^aH^b}$ -Kopplungskonstante und charakteristischer Protonenabstände ist die Berechnung der Population für die unterschiedlichen Rotamere durch die Pachler-Gleichungen (26) – (28) möglich:

$$P[\mathbf{c}(-60^\circ)] = \frac{(J_{\mathbf{ab}^{proR}} - J_G)}{(J_T - J_G)} \quad (26)$$

$$P[\mathbf{c}(180^\circ)] = \frac{(J_{\mathbf{ab}^{proS}} - J_G)}{(J_T - J_G)} \quad (27)$$

$$P[\mathbf{c}(60^\circ)] = 1 - \{P[\mathbf{c}(-60^\circ)] + P[\mathbf{c}(180^\circ)]\} \quad (28)$$

Es zeigt sich im vorliegenden Fall eine Bevorzugung der Konformation für $\chi = 180^\circ$, die Konformation mit $\chi = 60^\circ$ ist nicht besetzt.

Tabelle 16: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P7**

		Asp	
		H ^{βproR}	H ^{βproS}
Kopplungskonstante		6.5 Hz	9.7 Hz
d(H ^α H ^β)		237 pm	252 pm
d(H ^N H ^β)		426 pm	351 pm
<u>Population</u>	χ ₁ (-60 °)	36 %	
	χ ₂ (180 °)	64 %	
	χ ₃ (60 °)	-	

Aus dem ROESY-Spektrum (Mixzeit 180 ms) wurden 30 Atomabstände extrahiert, die als Randbedingungen in die Bestimmung der Startstruktur sowie in die Moleküldynamik einfließen. Entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise (Kapitel 7.3) wird aus der *restrained* MD-Rechnung eine Konformation erhalten, die in einer freien MD-Rechnung simuliert wird. Die *Cluster*-Analyse der freien Simulation liefert einen sehr stark besetzten *Cluster* (>95 % der verglichenen Strukturen), dessen Konformation sowie eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur in Abbildung 81 dargestellt sind.

Die β-Aminosäure befindet sich an der Position $i+1$ eines β-*turns*, der jedoch nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird. Auch die Torsionswinkel entsprechen keinem klassischen *turn*-Muster (vergl. Tabelle 79). Strukturegebendes Element ist ein γ-*turn* um Asn-Asp-Ser, der durch eine Wasserstoffbrücke von Ser H^N zu Asn CO stabilisiert wird. Diese Brücke weist keine optimale Geometrie auf, der Winkel zwischen der NH- und der CO-Bindung beträgt ca. 100°, so dass das Amidproton des Serins auch zum Lösungsmittel hin ausgerichtet ist. Dies

steht im Einklang zu den erhaltenen Temperaturgradienten, für das Serin wird einen Wert von -2.9 ppb K^{-1} erhalten.

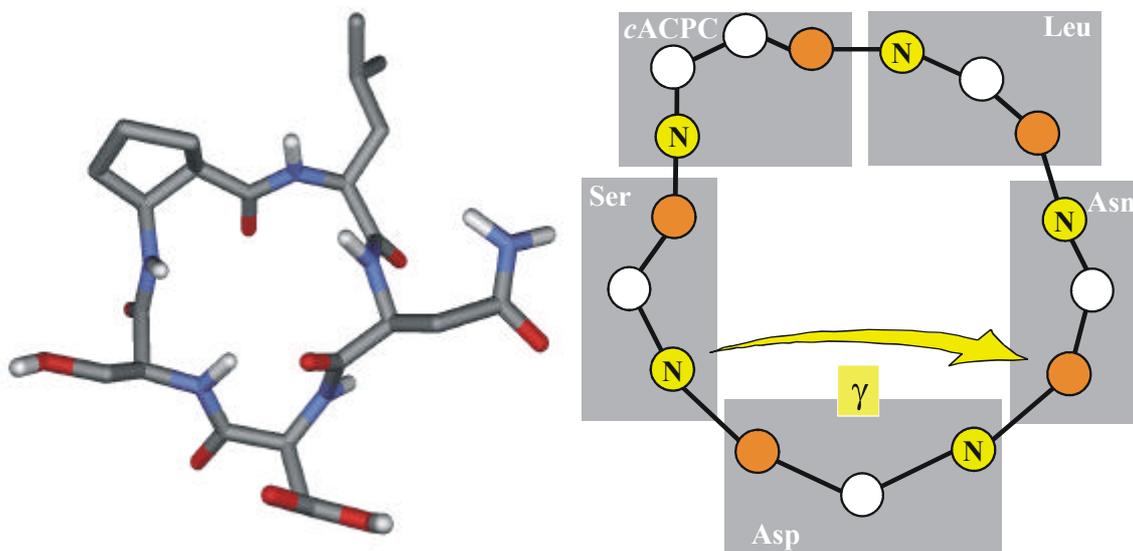


Abbildung 81: Konformation und schematische Struktur von **P7**

4.6.1.3 c(-Asp-Ser-^tACPC-Leu-Asn-) P8

Die Zuordnung einiger diastereotopen Protonen gelingt unter Zuhilfenahme der Abstände der ROE-Messungen. Kopplungskonstanten lassen sich für die β -Protonen von Ser, Asn und Asp ermitteln. Für das Leucin ist eine derartige Beschreibung nicht möglich, da die Signale der β -Protonen durch Signale der Methylenprotonen des ^tACPC überlagert sind.

Das tieffeldverschobene β -Proton des Serins zeigt eine Kopplungskonstante ${}^3J_{H^aH^b} = 5.7 \text{ Hz}$ sowie einen schwächeren ROE zum Amidproton, als das hochfeldverschobene β -Proton (${}^3J_{H^aH^b} = 6.3 \text{ Hz}$). Aus den Pachler-Gleichungen ergibt sich, dass alle drei Seitenkettenrotamere χ_1 , χ_2 und χ_3 in etwa gleich verteilt sein sollten. Für das Aspartat werden Werte von ${}^3J_{H^aH^b} = 4.4 \text{ Hz}$ bzw. ${}^3J_{H^aH^b} = 9.3 \text{ Hz}$ erhalten. Die Zuordnung der β -Protonen über ROE-Abstände gelingt nicht, so dass keine Zuordnung gelingt. Die Pachler-Gleichungen ergeben in diesem Falle eine Bevorzugung eines Seitenkettenrotamers χ_1 (-60°) bzw. χ_2 (180°) gegenüber den jeweils anderen beiden Rotameren.

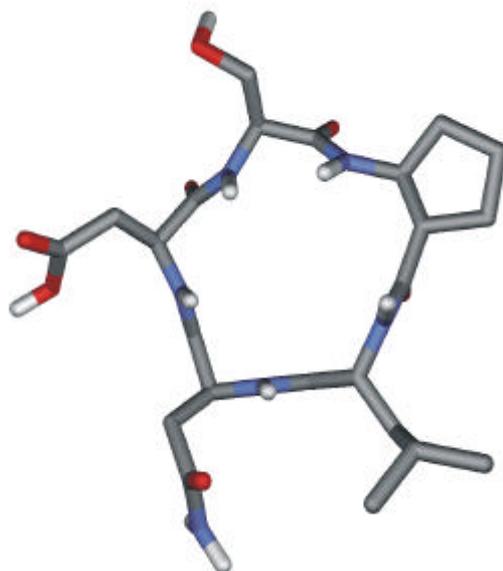
Im Asparagin liegt die Kopplungskonstante für das tieffeldverschobene β -Proton bei ${}^3J_{H^aH^b} = 5.1 \text{ Hz}$, die für das hochfeldverschobene β -Proton bei ${}^3J_{H^aH^b} = 7.8 \text{ Hz}$, darüber hinaus wird ein ROE zum Amidproton beobachtet, so dass dieses Proton als $H^{\beta\text{proS}}$ -Proton zugeordnet

werden kann. Daraus lässt sich eine schwache Bevorzugung des Seitenkettenrotamers χ_1 (-60°) berechnen. Die Übersicht über die einzelnen Werte ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P8**

		Asp		Asn		Ser	
		H ^{βproR} /	H ^{βproS} /	H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
		H ^{βproS}	H ^{βproR}				
Kopplungskonstante		4.4 Hz/ 9.3 Hz	9.3 Hz/ 4.4 Hz	5.1 Hz	7.8 Hz	5.7 Hz	6.3 Hz
	d(H ^{α} H ^{β})	-	-	-	-	222 pm	221 pm
	d(H ^N H ^{β})	-	-	-	321 pm	281 pm	266 pm
<u>Population</u>	χ_1 (-60°)	62 %/16 %		47 %		34 %	
	χ_2 (180°)	16 %/62 %		23 %		28 %	
	χ_3 (60°)	22 %		30 %		38 %	

Aus den ROESY-Spektren wurden 20 Protonenabstände extrahiert, die als *restraints* Verwendung für die Generierung der Startstrukturen und die *restrained* MD-Rechnungen finden. Analoges Vorgehen zum in Kapitel 7.3 beschriebenen Verfahren liefert nach *Cluster*-Analyse eine Konformation, die in Abbildung 82 dargestellt ist. Es wird deutlich, dass keinerlei Sekundärstrukturelemente in der Konformation auffindbar sind. Die Amidprotonen zeigen in die eine Richtung des Moleküls, während die Carboxygruppen in die andere Richtung zeigen. Dies ist mit der besonderen Geometrie der ^lACPC zu erklären. Durch den fixierten Torsionswinkel μ im Ring sind die benachbarten Amidgruppen in ihrer Ausrichtung fixiert. In einer *all-trans*-Konfiguration der Amidgruppen werden die Amidprotonen daher in die selbe Richtung zeigen. Die Größe des cyclischen Pentapeptids (Ringgröße 16) scheint nicht dazu in der Lage zu sein, diese Einschränkung bei den weiteren Amidprotonen aufzubrechen. Unterstützt wird die Beobachtung durch die Temperaturgradienten der Amidprotonen, die alle in einem Bereich liegen, der für eine Zugänglichkeit zum Lösungsmittel spricht.

Abbildung 82: Konformation von **P8**

4.6.1.4 c(-Asp-Ser-^cACHC-Leu-Asn-) **P9**

Die Zuordnung von einigen diastereotopen Protonen erfolgt über ROE-Abstände. Für die β -Protonen von Serin, Asparagin und Aspartat lassen sich die Kopplungskonstanten ${}^3J_{H^aH^b}$ ermitteln und aus den Pachler-Gleichungen die Konformeren-Gleichgewichte ermitteln. Die Werte sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P9**

		Asp		Asn		Ser	
		H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
Kopplungskonstante		6.8 Hz	4.2 Hz	6.8 Hz	7.2 Hz	6.4 Hz	6.8 Hz
d(H ^{α} H ^{β})		195 pm	200 pm	202 pm	-	-	-
d(H ^N H ^{β})		-	-	-	242 pm	-	256 pm
<u>Population</u>	χ_1 (-60 °)	15 %		42 %		38 %	
	χ_2 (180 °)	38 %		38 %		35 %	
	χ_3 (60 °)	47 %		20 %		27 %	

Es wird deutlich, dass für alle drei Aminosäuren die unterschiedlichen Rotamere in unterschiedlichen Anteilen populiert sind. Während im Serin alle drei Konformere nahezu

gleich besetzt sind, überwiegen im Asparagin die Konformere χ_1 (-60°) und χ_2 (180°), während beim Aspartat χ_2 (180°) und χ_3 (60°) überwiegen.

Aus den ROE-Spektren konnten 20 Atomabstände extrahiert werden. Diese wurden als Randbedingungen für die Torsionswinkel-Variation sowie für die *restrained* MD-Simulation verwendet, die wie in Kapitel 7.3 beschrieben durchgeführt wurde. *Cluster*-Analyse der freien MD-Simulation ergibt zwei Konformere, die im Verhältnis 3 zu 2 vorliegen. Die Konformere sind in Abbildung 83 (stärker populierte Konformer, „A“) und Abbildung 84 (schwächer populierte Konformer, „B“) dargestellt.

Das Konformer A präsentiert die β -Aminosäure an der $i+2$ Position eines γ -turns bzw. an der i Position des korrespondierenden β -turns. Stabilisiert wird die Konformation durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen ${}^c\text{ACHC H}^{\text{N}}$ und Asp CO. Dies steht in gutem Einklang zum ermittelten Temperaturgradienten des Amidprotons von ${}^c\text{ACHC}$ ($\Delta\delta/\Delta T = -0.5 \text{ ppb K}^{-1}$). Der korrespondierende β -turn wird nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, auch entsprechen die Torsionswinkel (vergl. Tabelle 81) nicht den Winkeln von klassischen β -turns.

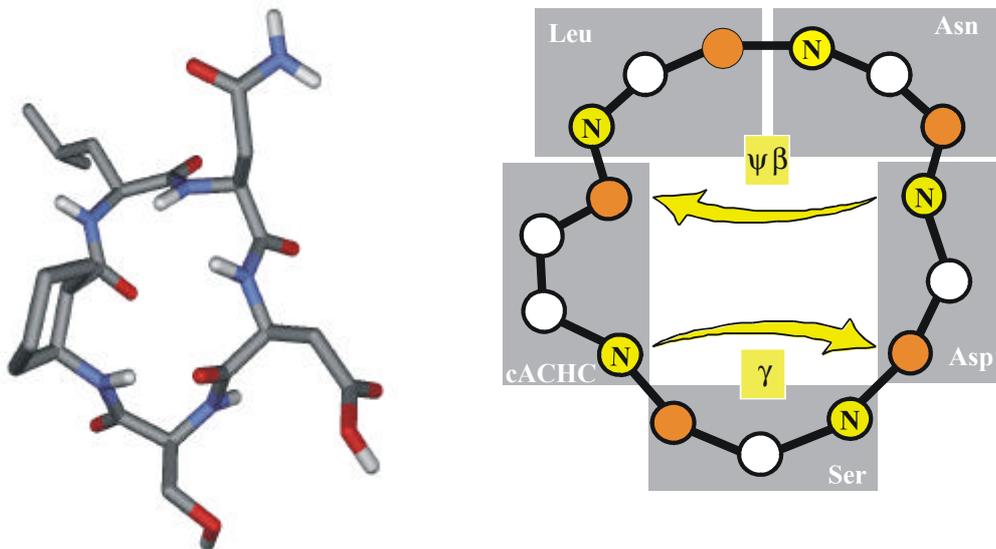
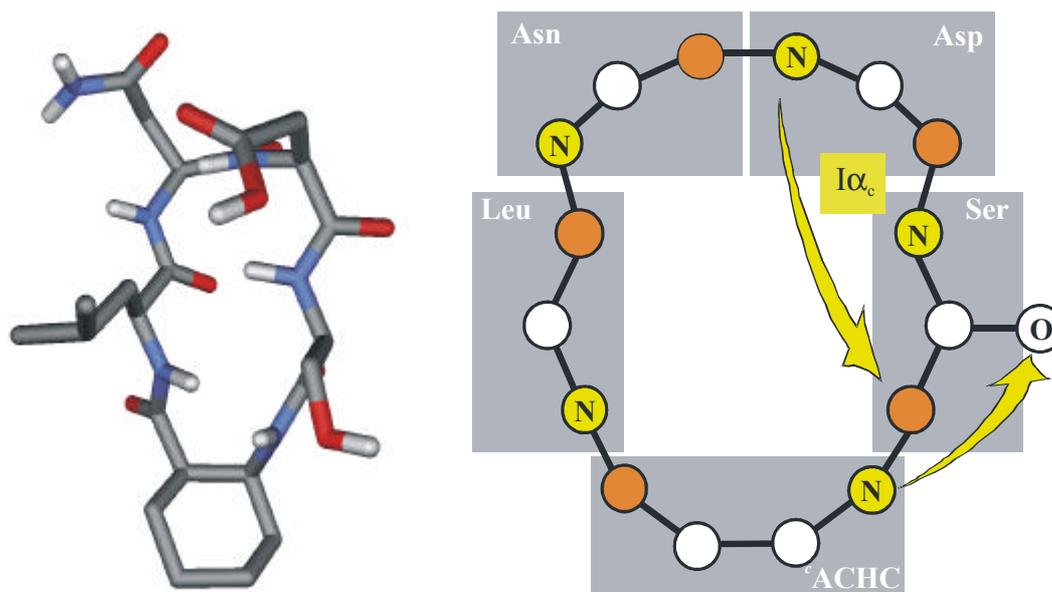


Abbildung 83: Konformer A und schematische Struktur von **P9**

Konformer B präsentiert die β -Aminosäure in der zentralen Position eines Pseudo- γ -turns. Diese Konformation wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen ${}^c\text{ACHC H}^{\text{N}}$ und dem Sauerstoff in der Seitenkette des Ser stabilisiert. Die Torsionswinkel der Aminosäuren ${}^c\text{ACHC}$, Leu und Asn entsprechen denen eines $\text{I}\alpha_{\text{c}}$ -turns, der jedoch nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird.

Abbildung 84: Konformer B und schematische Struktur von **P9**

Auffällig ist, dass für Pentapeptide mit *cis*-2-Aminocycloalkancarbonsäuren insgesamt drei unterschiedliche Konformationen beobachtet werden. Während sich $^c\text{ACPC}$ in der Position $i+1$ eines β -turns befindet, liegt das $^c\text{ACHC}$ in den Positionen $i+1$ resp. $i+2$ eines γ -turns (bzw. i eines β -turns) vor.

4.6.1.5 c -(-Asp-Ser- $^c\text{ACHC}$ -Leu-Asn-) **P10**

Unter Verwendung der ROE-Abstände gelingt die Zuordnung der diastereotopen β -Protonen von Asp, Asn und Ser, ferner die Ermittlung der Kopplungskonstanten $^3J_{H^aH^b}$. Über die Pachler-Gleichungen kann daraus die Population der Seitenkettenrotamere berechnet werden. Während im Asparagin und im Serin das Rotamer χ_2 am stärksten populierte ist und die anderen beiden weniger stark, ist im Aspartat das Rotamer χ_1 (-60°) am stärksten populierte (vergl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P10**

	Asp		Asn		Ser	
	$\text{H}^{\beta\text{proR}}$	$\text{H}^{\beta\text{proS}}$	$\text{H}^{\beta\text{proR}}$	$\text{H}^{\beta\text{proS}}$	$\text{H}^{\beta\text{proR}}$	$\text{H}^{\beta\text{proS}}$
Kopplungskonstante	5.3 Hz	8.3 Hz	7.6 Hz	5.3 Hz	7.4 Hz	5.9 Hz
$d(\text{H}^\alpha \text{H}^\beta)$	239 pm	-	220 pm	232 pm	220 pm	235 pm
$d(\text{H}^N \text{H}^\beta)$	-	347 pm	291 pm	278 pm	299 pm	280 pm

		Asp	Asn	Ser
<u>Population</u>	χ_1 (-60 °)	52 %	25 %	30 %
	χ_2 (180 °)	25 %	46 %	44 %
	χ_3 (60 °)	23 %	29 %	26 %

Für die Generierung der Startstruktur sowie die *restraint* MD-Rechnungen wurden aus den ROE-Spektren 27 Protonenabstände extrahiert. Die *Cluster*-Analyse der freien MD-Simulation ergibt eine Konformation, die in Abbildung 85 gezeigt ist.

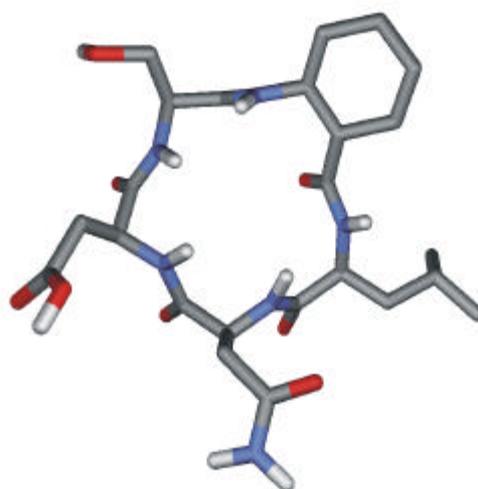


Abbildung 85: Konformation von **P10**

Genau wie für das Peptid **P8** ist kein Sekundärstrukturelement erkennbar. Auch hier zeigen alle Amidprotonen in die eine Richtung des Moleküls, während die Carboxygruppen zur anderen Seite ausgerichtet sind. Die Temperaturgradienten stützen den Konformationsvorschlag, alle Amidprotonen sind dem Lösungsmittel zugänglich.

Eine Überlagerung der Strukturen von **P8** und **P10** ist in Abbildung 86 gezeigt. Die Struktur von **P10** ist in grün dargestellt, die von **P8** in grau. Es wird deutlich, dass beide Strukturen eine große Ähnlichkeit aufweisen, insbesondere im Bereich des Peptid-*backbone*.

Eine Kalkulation für die *backbone*-Atome der beiden Strukturen ergibt einen RMS-Wert von 0.510 Å, berücksichtigt man die α - und β -Kohlenstoffe der ^tACHC, deren Position naturgemäß durch den Einfluss der unterschiedlichen Ringgrößen variieren wird, nicht, so reduziert sich dieser Wert auf 0.487 Å.

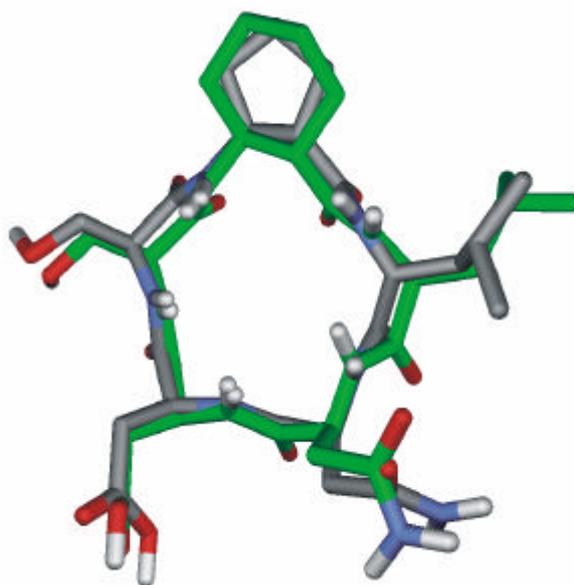


Abbildung 86: *Overlay* der Konformationen von **P8** (grau) und **P10** (grün)

4.6.1.6 Vergleich mit der Erkennungsregion des VCAM-1

Vergleich der RMS-Werte der erhaltenen Strukturen der Peptide **P7** bis **P10** mit der Erkennungsregion des VCAM zeigt, dass insgesamt eine schlechte Übereinstimmung der Strukturen mit der Referenz gefunden wird. Tabelle 20 zeigt die RMS-Werte für die Abweichung zwischen den Aminosäuren Aspartat und Serin sowie das Amidproton des Prolins bzw. der ACAC.

Tabelle 20: RMS-Werte für die Peptide **P7** bis **P10** mit der Erkennungsregion von VCAM-1

Peptid	RMSD Wert (N, C ^α , C(O), O) [Å]	RMSD Wert(N, C ^α , C ^β , C(O), O) [Å]
P7	0.843	1.025
P8	0.987	1.229
P9 Konformer A	1.266	1.546
P9 Konformer B	0.586	0.936
P10	0.943	1.231

Die deutlichen Abweichungen erklären die nicht vorhandene Aktivität der Peptide in den biologischen Tests (vergl. Kapitel 4.3.3.4). Selbst im Falle der besten Übereinstimmung (**P9**, Konformer B) tritt eine deutliche Abweichung auf. Abbildung 87 zeigt den *Overlay*, in grün

ist die Erkennungsregion des VCAM-1 dargestellt. Deutlich wird, dass zwar die Amidbindung zwischen Aspartat und Serin durch **P9** gut wiedergegeben werden kann, jedoch schon die Seitenketten dieser Aminosäuren deutlich abweichen und darüber hinaus die weitere Struktur nur sehr unzureichend wiedergegeben wird.

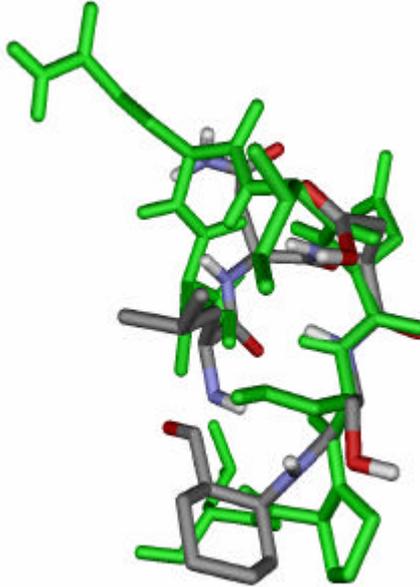


Abbildung 87: *Overlay* von **P9** Konf. B mit der Erkennungsregion des VCAM-1 (grün)

4.6.2 Hexapeptide

4.6.2.1 Konformationelle Daten aus NMR-Untersuchungen

Tabelle 21: Hexapeptide mit dem C-terminalen Teil der Erkennungsregion des VCAM-1

Peptid	Sequenz
P1	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)
P2	c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)
P3	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)
P4	c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACHC-Leu-Asn-)

Der Vergleich der chemischen Verschiebung der Amidprotonen der Hexapeptide **P1** bis **P4** ist in Abbildung 88 dargestellt. Es treten deutliche Unterschiede in der relativen Lage der Amidprotonen auf, so ist das Asp H^N in **P2** am zweitweitesten hochfeldverschoben, während es in **P4** am weitesten tieffeldverschoben auftritt. Umgekehrt ist das Asn H^N in **P1** und **P2** am zweitweitesten tieffeldverschoben, während es in **P4** am zweitweitesten hochfeldverschoben ist. Weniger stark als bei den Pentapeptiden variiert die Intervallbreite der Amidprotonen, in **P2** und **P3** liegen alle H^N innerhalb eines Intervalls von 0,9 ppm, in **P1** und **P4** ist dieses Intervall auf 1,15 ppm aufgeweitet.

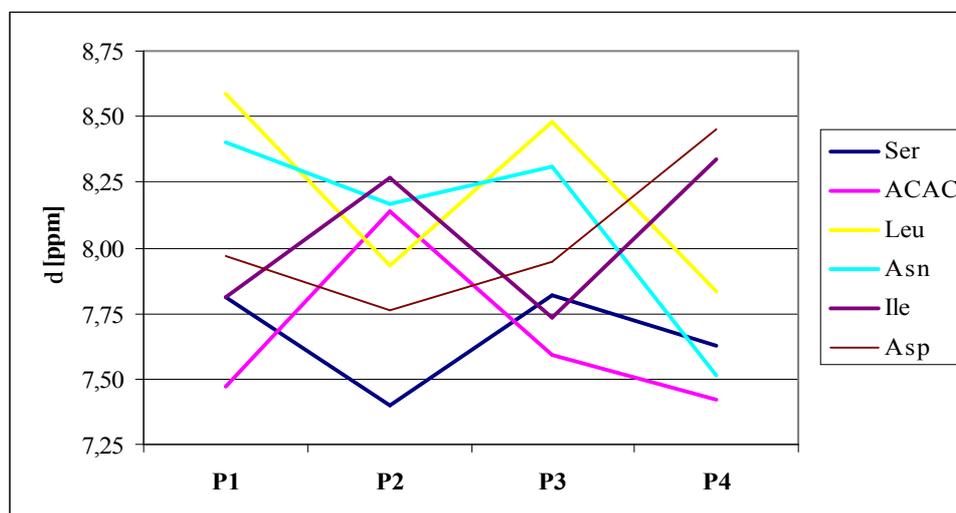


Abbildung 88: Vergleich der chemischen Verschiebung der H^N-Protonen von **P1** bis **P4**

Auch die den Amidprotonen benachbarten α - bzw. β -Protonen zeigen eine deutliche Variationsbreite (vergl. Abbildung 89).

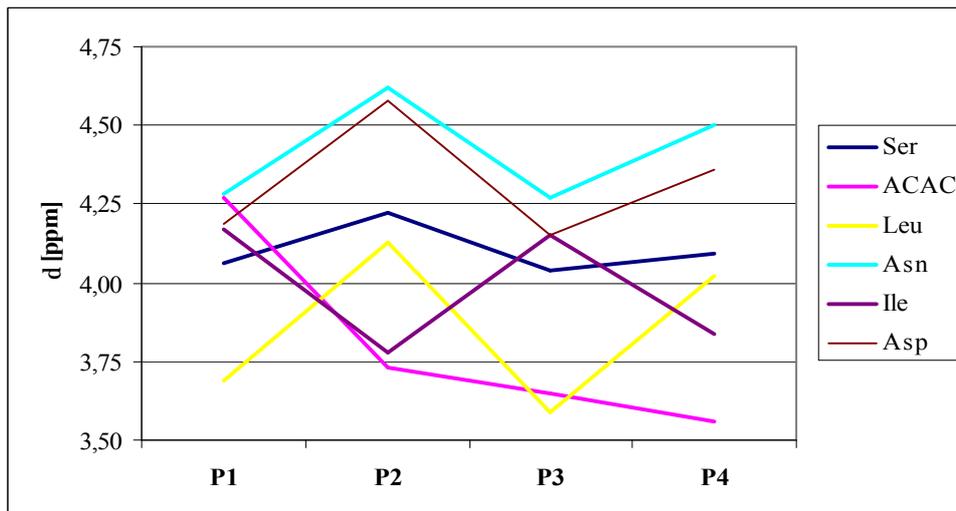


Abbildung 89: Vergleich der chemischen Verschiebung der α -Protonen von **P1** bis **P4**

Hier variiert besonders die relative Lage des β -Protons der ACACs, das in **P1** am weitesten tieffeldverschoben ist, während es in **P2** und **P4** am stärksten hochfeldverschoben ist. Am wenigsten variiert der Wert für das α -Proton des Serin, der um lediglich 0,18 ppm schwankt, während der Wert für die β -Aminosäure um 0,71 ppm schwankt. Die Intervallbreite für alle Amidprotonen reicht von 0,58 ppm (**P1**) bis zu 0,94 ppm (**P4**).

Die vicinalen Kopplungskonstanten 3J sind in Abbildung 90 dargestellt. Die Kopplung für das Leucin ist in den Spektren für **P1**, **P3** und **P4** nicht aufgelöst, genauso die Kopplung des Isoleucins für **P2** und **P4** und die des Asparagins für **P4**. Auffällig ist die kleine Kopplungskonstante $^3J_{H^N H^a}$ für das t ACPC in **P2**, die lediglich 4,2 Hz beträgt.

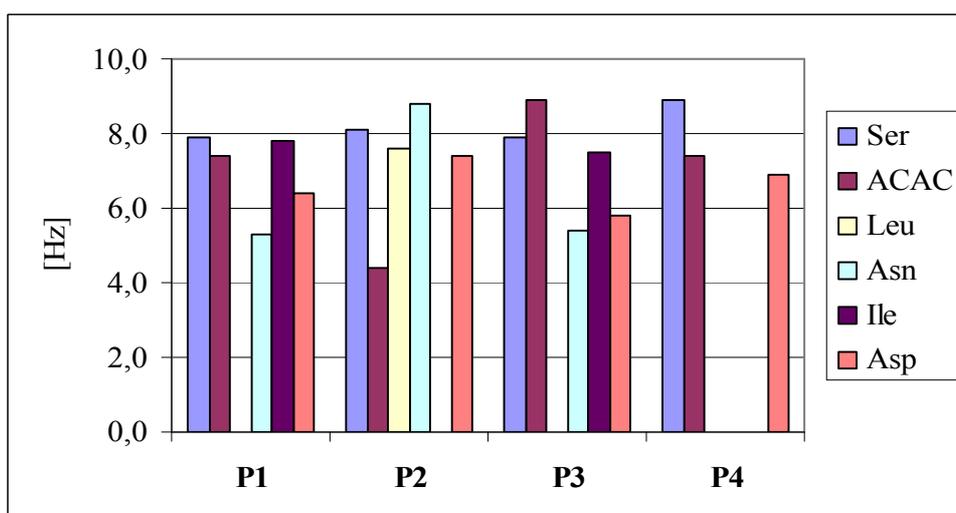


Abbildung 90: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von **P1** bis **P4**

Die letzte wichtige Information aus den NMR-Spektren ist die Temperaturabhängigkeit der

chemischen Verschiebung der Amidprotonen, die Rückschlüsse auf etwaige Sekundärstrukturelemente zulässt.

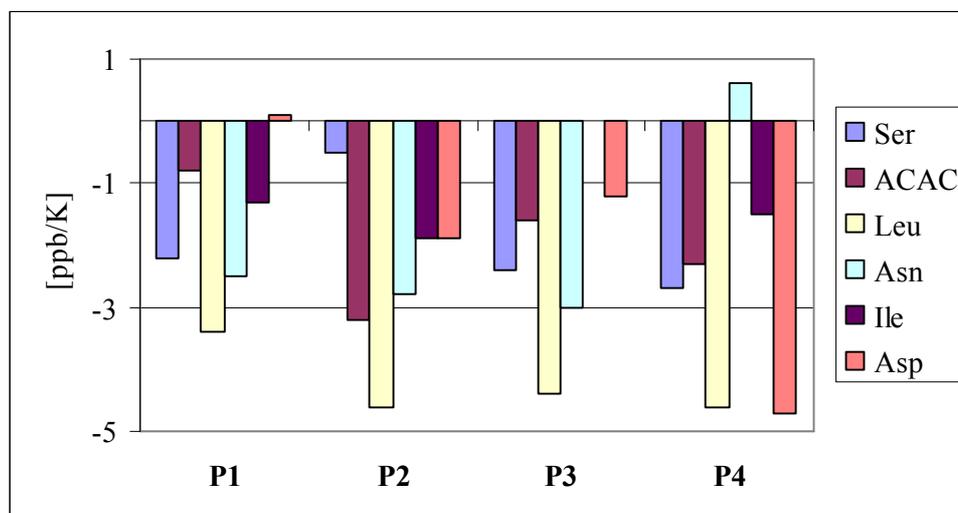


Abbildung 91: Temperaturgradient der chemischen Verschiebung der H^N -Protonen

Anders als bei den Pentapeptiden treten für alle Hexapeptide charakteristische Werte auf. **P1** zeigt sehr kleine Temperaturgradienten für ${}^cACPC H^N$ und $Asp H^N$, so dass eine Einbeziehung dieser Protonen in eine intramolekulare Wasserstoffbrücke vermutet werden kann. Auch die Temperaturgradienten des $Ser H^N$ in **P2**, des $Ile H^N$ in **P3** sowie des $Asn H^N$ in **P4** lassen eine Abschirmung gegenüber dem Lösungsmittel vermuten. Auffällig ist, dass in jedem Peptid ein anderes Amidproton abgeschirmt ist, so dass wenig strukturelle Ähnlichkeiten zu vermuten sind.

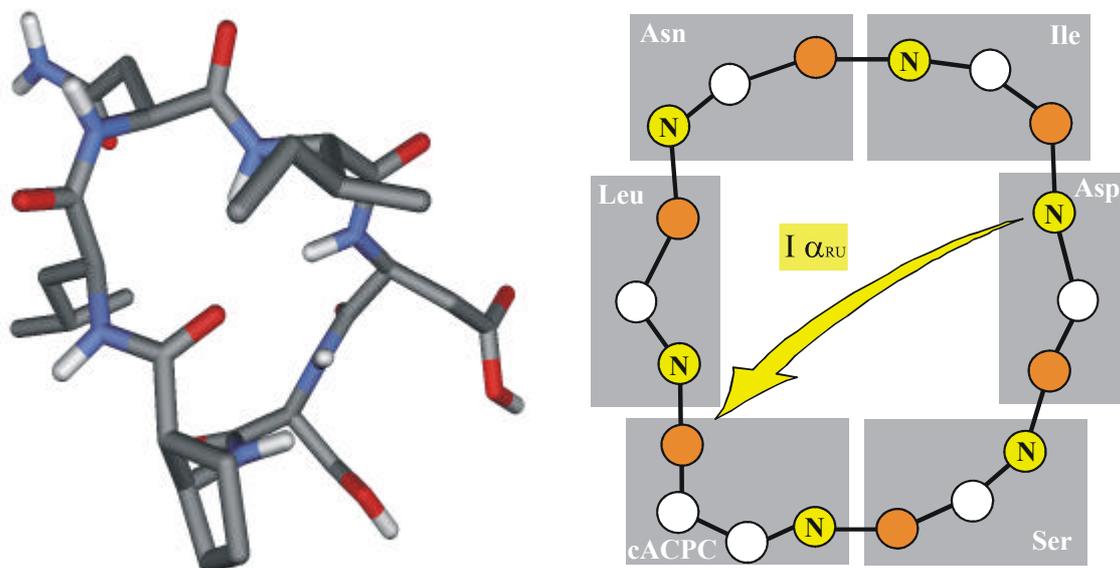
4.6.2.2 c-(Ile-Asp-Ser- cACPC -Leu-Asn-) P1

Anhand der ROE-Daten gelingt die Zuordnung der diastereotopen β -Protonen von Asp, Asn und Ser. Für das Aspartat zeigt das hochfeldverschobene β -Proton eine Kopplungskonstante von ${}^3J_{H^a H^b} = 7.0$ Hz und einen schwächeren ROE zum H^α , so dass dieses Proton als proS zugeordnet werden kann. Die Berechnung der Seitenkettenrotamere ergibt eine Population von 4 zu 6 für die Rotamere χ_1 (-60°) und χ_2 (180°). Das Rotamer χ_3 (60°) ist unbesetzt. Im Aspartat kann dem hochfeldverschobenen Proton die proR-Stereochemie zugeordnet werden, hier ist das Rotamer χ_3 (60°) am stärksten besetzt, genau wie im Serin, bei dem aus den Abständen der β -Protonen zu H^α und H^N das tieffeldverschobene Proton als $H^{\beta proS}$ identifiziert werden kann.

Tabelle 22: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P1**

		Asp		Asn		Ser	
		H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
Kopplungskonstante		9.3 Hz	7.0 Hz	4.7 Hz	5.4 Hz	4.9 Hz	4.5 Hz
d(H ^α H ^β)		242 pm	258 pm	225 pm	242 pm	223 pm	230 pm
d(H ^N H ^β)		-	-	-	-	372 pm	351 pm
<u>Population</u>	χ ₁ (-60 °)	40 %		26 %		17 %	
	χ ₂ (180 °)	60 %		19 %		21 %	
	χ ₃ (60 °)	0 %		55 %		62 %	

Auf der Basis von 25 Distanzen, die aus dem ROE-Spektrum (Mixzeit 160 ms) extrahiert wurden, wurde zunächst eine Startstruktur generiert und diese dann nach Minimierung einer *restrained* MD-Simulation unterworfen. Die *Cluster*-Analyse der Trajektorie ergab eine Konformation, die einer freien MD-Simulation unterworfen wurde. Auswertung der Trajektorie ergab eine Konformation, die in Abbildung 92 dargestellt ist.

Abbildung 92: Konformation und schematische Struktur von **P1**

Die Struktur ist durch einen I α_{RU} -turn mit ^cACPC in der Position *i* stabilisiert. Es wird eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp H^N und ^cACPC CO ausgebildet, hier zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den Daten der Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen. Weiterhin sind Wechselwirkungen zwischen ^cACPC H^N und dem Sauerstoff in der Seitenkette des Ser möglich, mit denen der kleine Temperaturgradient des Amidprotons der β -Aminosäure

($\Delta\delta/\Delta T(^{\circ}\text{ACPC}) = -0.8 \text{ ppb K}^{-1}$) erklärbar ist.

4.6.2.3 c-(Ile-Asp-Ser-^tACPC-Leu-Asn-) P2

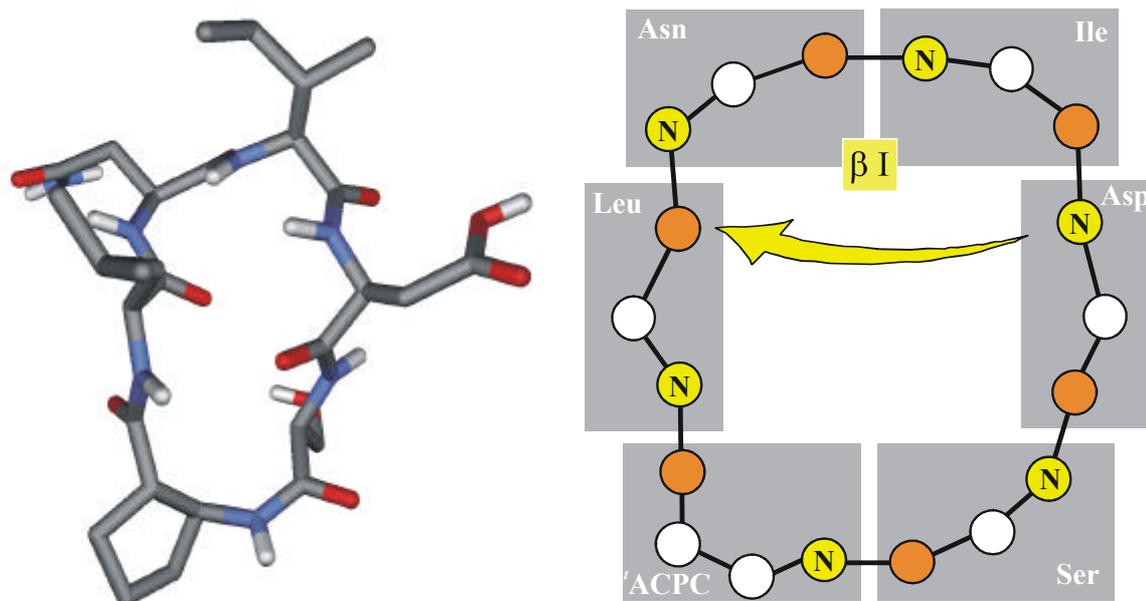
Die Zuordnung der diastereotopen Protonen gelingt über die aus ROE-Spektren gewonnenen Atomabstände für die β -Protonen des Serins und des Asparagins. Für die Protonen des Aspartats werden keine Kreuzsignale beobachtet, so dass keine Zuordnung vorgenommen werden kann. Die Population der Seitenkettenrotamere lässt sich über die Kopplungskonstanten ${}^3J_{H^a H^b}$ aus den Pachler-Gleichungen ermitteln. Alle Werte sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P2

	Asp		Asn		Ser	
	H ^{βproR} / H ^{βproS}	H ^{βproS} / H ^{βproR}	H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
Kopplungskonstante	3.7 Hz	10.8 Hz	4.8 Hz	8.1 Hz	4.6 Hz	5.5 Hz
d(H ^{α} H ^{β})	-	-	233 pm	238 pm	238 pm	244 pm
d(H ^N H ^{β})	-	-	-	361 pm	342 pm	331 pm
<u>Population</u>						
χ_1 (-60 °)	75 %/10 %		50 %		26 %	
χ_2 (180 °)	10 %/75 %		20 %		17 %	
χ_3 (60 °)	15 %		30 %		55 %	

Auf der Basis von 28 Atomabständen, die aus den ROE-Spektren ermittelt werden konnten, wurde entsprechend dem in Kapitel 7.3 beschriebenen Vorgehen eine Konformation aus der freien MD-Rechnung erhalten, die in Abbildung 93 dargestellt ist.

Die β -Aminosäure wird in der Position $i+2$ eines nicht-klassischen β -turns präsentiert. Der korrespondierende β I-turn ist nur unzureichend durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp H^N und Leu CO stabilisiert, der Winkel zwischen den Bindungen beträgt lediglich 13 °, für eine optimale Geometrie sollte er in der Nähe von 180 ° sein. Die aus den Temperaturgradienten ermittelte Abschirmung des Ser H^N vom Lösungsmittel findet sich in der Konformation nicht durch die Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke wieder, jedoch schirmen die Seitenketten von Asp und Ser das Amidproton ab.

Abbildung 93: Konformation und schematische Struktur von **P2**

4.6.2.4 c-(-Ile-Asp-Ser-^cACHC-Leu-Asn-) P3

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen erfolgt unter Zuhilfenahme der durch ROE-Spektroskopie ermittelten Atomabstände. Aus den Kopplungskonstanten ${}^3J_{H^aH^b}$ lassen sich über die Pachler-Gleichungen die Populationen der Seitenkettenrotamere berechnen. Die Signale für die β -Protonen des Leucins sind durch andere Signale überlagert, auch die γ -Protonen des Isoleucins zeigen keine genügende diastereotope Aufspaltung.

Tabelle 24: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **P3**

		Asp		Asn		Ser	
		H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
Kopplungskonstante		8.1 Hz	4.9 Hz	6.5 Hz	7.0 Hz	5.0 Hz	3.9 Hz
d(H ^{α} H ^{β})		265 pm	281 pm	244 pm	262 pm	240 pm	230 pm
d(H ^N H ^{β})		-	-	-	-	380 pm	350 pm
<u>Population</u>	χ_1 (-60 °)	21 %		40 %		12 %	
	χ_2 (180 °)	50 %		36 %		22 %	
	χ_3 (60 °)	29 %		24 %		66 %	

Im Aspartat zeigt das tieffeldverschobene β -Proton eine Kopplungskonstante ${}^3J_{H^aH^b} = 8.1$ Hz

und einen stärkeren ROE zum H^α , als das hochfeldverschobene, das damit als $H^{\beta\text{proS}}$ zugeordnet werden kann. Das Seitenkettenrotamer χ_2 (180°) ist am stärksten besetzt. Für das Asparagin zeigt das tieffeldverschobene β -Proton einen weniger starken ROE zum H^α , also kann es als $H^{\beta\text{proS}}$ identifiziert werden. Die Seitenkettenrotamere χ_1 und χ_2 sind etwa gleichbesetzt. Für das Serin ergibt sich eine starke Bevorzugung des Rotamers χ_3 (60°).

Die Extraktion der ROE-Spektren liefert 32 Atomabstände, die als *restraints* in die Generierung der Startstruktur und in die *restrained* MD-Simulation einfließen. Die resultierende Konformation wird einer freien MD-Simulation unterworfen, *Cluster-Analyse* liefert eine Konformation, die in Abbildung 94 dargestellt ist.

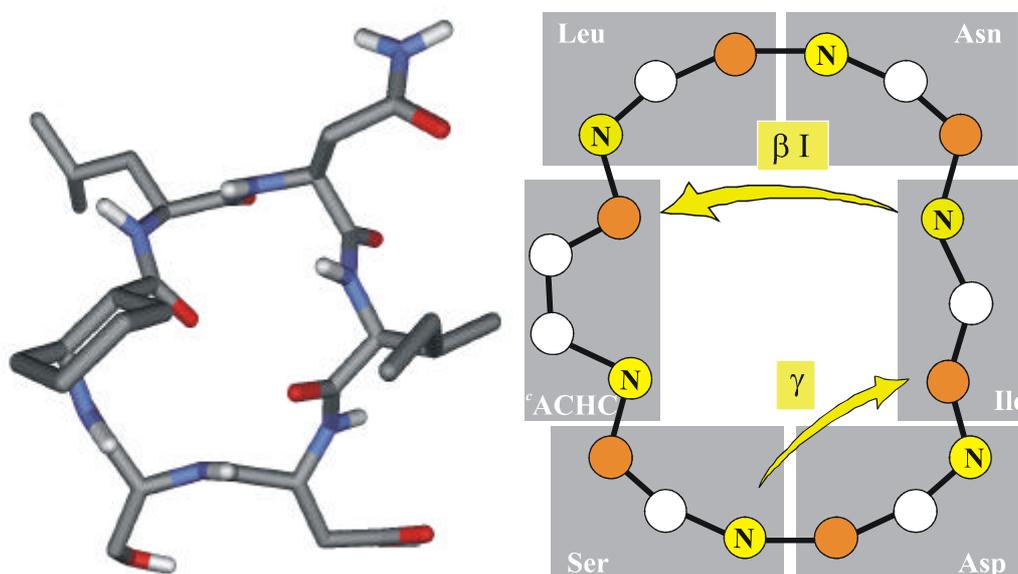


Abbildung 94: Konformation und schematische Struktur von **P3**

Die β -Aminosäure befindet sich in der Position i eines β I-turns, der durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Ile H^N und c ACHC CO stabilisiert ist. Weiterhin tritt ein γ -turn mit Asp in der zentralen Position auf, der durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Ser H^N und Ile CO stabilisiert wird. Diese Wasserstoffbrücke besitzt nicht die perfekte Geometrie, der Torsionswinkel zwischen NH und CO beträgt ca. 132° . Belege für diese Struktur liefern die Temperaturgradienten, die im Falle des Ile einen Wert von $\Delta\delta/\Delta T = 0.0 \text{ ppb K}^{-1}$ und für das Ser H^N einen Wert von $\Delta\delta/\Delta T -2.4 \text{ ppb K}^{-1}$ zeigen. Ähnlich wie bei **P1** wird das Amidproton der β -Aminosäure sterisch durch den Cycloalkyrling abgeschirmt und ist dementsprechend dem Lösungsmittel weniger zugänglich als andere. Auch dies spiegelt sich in der Temperaturabhängigkeit wieder ($\Delta\delta/\Delta T({}^c\text{ACHC } H^N) = -1.2 \text{ ppb K}^{-1}$).

4.6.2.5 c-(-Ile-Asp-Ser-^tACHC-Leu-Asn-) P4

Die Zuordnung der diastereotopen β -Protonen von Asp und Asn gelingt unter Zuhilfenahme der aus ROE-Spektren gewonnenen Protonenabstände zwischen den β -Protonen und H^α bzw. H^N . Die β -Protonen des Serins fallen zusammen, so dass keine Zuordnung möglich ist. Im Aspartat wird für das tieffeldverschobene Proton ein stärkerer ROE zum H^α beobachtet, es kann damit als $H^{\beta\text{proR}}$ zugeordnet werden. Im Asparagin tritt ein starker ROE zwischen dem hochfeldverschobenen β -Proton und dem Amidproton auf, es handelt sich also um das $H^{\beta\text{proS}}$. Die β -Protonen des Leucins und die γ -Protonen des Isoleucins spalten nicht auf bzw. werden durch andere Signale überlagert. Die Berechnung der Population der Seitenkettenrotamere mithilfe der Pachler-Gleichungen zeigt, dass im Aspartat das Rotamer χ_1 (-60°) am stärksten populiert ist, während das Rotamer χ_2 (180°) nahezu nicht populiert ist, im Asparagin wird eine deutliche Bevorzugung des Rotamers χ_3 (60°) ermittelt.

Tabelle 25: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P4

		Asp		Asn	
		$H^{\beta\text{proR}}$	$H^{\beta\text{proS}}$	$H^{\beta\text{proR}}$	$H^{\beta\text{proS}}$
Kopplungskonstante		3.2 Hz	9.2 Hz	4.7 Hz	5.5 Hz
	$d(H^\alpha H^\beta)$	246 pm	276 pm	-	-
	$d(H^N H^\beta)$	-	-	312 pm	279 pm
<u>Population</u>	χ_1 (-60°)	61 %		26 %	
	χ_2 (180°)	5 %		19 %	
	χ_3 (60°)	34 %		55 %	

Auf der Basis von 27 aus ROE-Spektren erhaltenen Atomabständen wurde eine Startstruktur ermittelt und diese einer *restrained* MD-Simulation unterworfen. Die daraus erhaltene Konformation wurde in einer freien MD-Rechnung simuliert und mit der resultierenden Trajektorie wurde eine *Cluster*-Analyse durchgeführt. Die erhaltene Konformation ist in Abbildung 95 gezeigt.

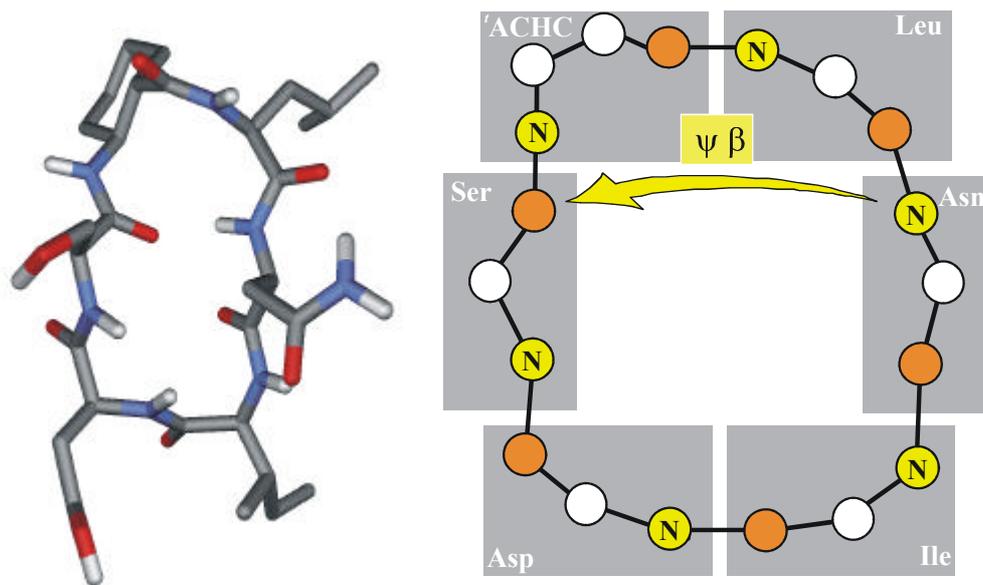


Abbildung 95: Konformation und schematische Struktur von **P4**

Die β -Aminosäure wird in der Position $i+1$ eines Pseudo- β -turns präsentiert. Stabilisiert wird dieser *turn* durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asn H^N und Ser CO. Die erhaltene Struktur steht in guter Übereinstimmung mit den ermittelten Temperaturgradienten der Amidprotonen, die für das Asn H^N einen positiven Wert zeigen ($\Delta\delta/\Delta T = +0.5 \text{ ppb K}^{-1}$). Auffällig ist die *cis*-Peptidbindung zwischen 'ACHC und Leu. Der korrespondierende β -turn um Asn-Ile-Asp-Ser wird nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, auch die Torsionswinkel entsprechen nicht denen klassischer *turns*.

In guter Übereinstimmung mit der großen Variationsbreite der chemischen Verschiebung und der Kopplungskonstanten zeigt sich, dass die Hexapeptide in völlig unterschiedlichen Strukturen vorliegen, es ist keine Bevorzugung einer bestimmten Position zu erkennen. Die β -Aminosäure wird in den Positionen i (**P3**), $i+1$ (**P4**) und $i+2$ (**P2**) von β -turns bzw. in der Position i eines α -turns (**P1**) präsentiert. Auffällig ist, dass in keinem Fall die β -Aminosäure die zentrale Position eines γ -turns einnimmt, wie dies für β^3 -Aminosäure beobachtet wurde.¹³⁹ Offenbar ist das Sekundärstruktur-induzierende Potential der unterschiedlichen ACACs nicht homogen oder nicht so ausgeprägt wie bei anderen β -Aminosäuren.

4.6.2.6 Vergleich mit der Erkennungsregion des VCAM-1

Ähnlich wie die cyclischen Pentapeptide zeigen die Hexapeptide keine gute strukturelle Übereinstimmung mit der Erkennungsregion des VCAM-1. In Tabelle 26 sind die RMS-Werte für

den *Overlay* der Peptide **P1** bis **P4** mit der TQIDSPLN-Sequenz auf der Basis der Aminosäuren Ile, Asp und Ser sowie des Amidprotons des Pro bzw. der β -Aminosäure gezeigt. Abbildung 96 zeigt den *Overlay* von **P4** mit der Erkennungsregion des VCAM-1, es wird deutlich, dass sowohl die Atome des Peptid-*backbone* wie auch die Seitenketten (gezeigt durch Einbeziehung der C^β -Atome) wenig Übereinstimmung zeigen. Somit ist die nicht vorhandene Aktivität dieser Peptide in biologischen Tests gut erklärbar.

Tabelle 26: RMS-Werte für die Peptide **P1** bis **P4** mit der Erkennungsregion von VCAM-1

Peptid	RMS Wert (N, C^α , C(O), O) [Å]	RMS Wert(N, C^α , C^β , C(O), O) [Å]
P1	1.591	1.751
P2	1.509	1.721
P3	1.112	1.493
P4	1.352	1.565

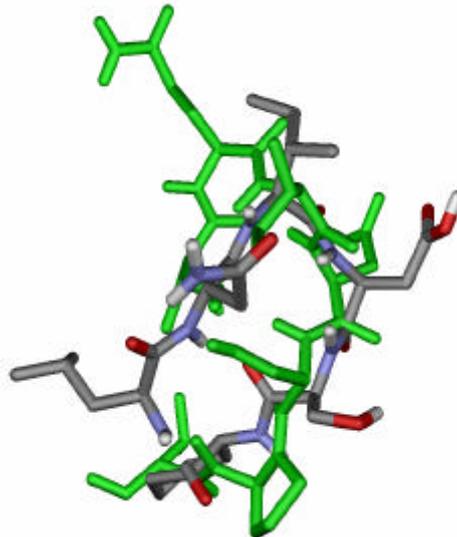


Abbildung 96: *Overlay* von **P4** mit der Erkennungsregion von VCAM-1 (grün)

4.7 Konformationsanalyse von Peptiden aus mADAM 8

Die Ergebnisse biologischer Tests sollten mit konformationellen Untersuchungen verknüpft werden, um Auskünfte über die biologisch aktivste Konformation zu erhalten. Daher ist es sinnvoll, zu überprüfen, inwieweit die Verwendung unterschiedlicher D-Aminosäuren Einfluss auf die Konformation des cyclischen Peptides und damit auf die Ausrichtung der Erkennungssequenz besitzt. Zwar ist bekannt, dass D-Aminosäuren ein starkes sekundärstruktur-induzierendes Potential besitzen (vergl. Kapitel 4.2), jedoch haben auch andere Aminosäuren Einfluss, so dass die Konformationsermittlung genaueren Aufschluss liefern sollte.

4.7.1 Konformationelle Daten aus den NMR-Untersuchungen

Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen ist in Abbildung 97 gezeigt. Die Amidprotonen zeigen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer relativen Lage und ihrer chemischen Verschiebung. Während sie beim Peptid **KDK2** in einem Intervall von 1.4 ppm liegen, ist dieser Bereich im Peptid **KDK4** nur rund 0.6 ppm breit. Weiterhin ist eine Überlagerung vieler Signale im Bereich von 8.00 bis 8.10 ppm zu beobachten, neben den drei H^N -Signalen finden sich hier außerdem noch die Signale der Guanidiniumgruppe des Arginins und der Aminogruppen des Lysins.

Weiterhin ist zu erkennen, dass auch die relative Lage der Amidprotonen variiert, so findet sich das Serin im Peptid **KDK4** am weitesten hochfeldverschoben, Während es im Peptid **KDK3** eher tieffeldverschoben auftritt, ähnliches gilt für die beiden Lysinreste.

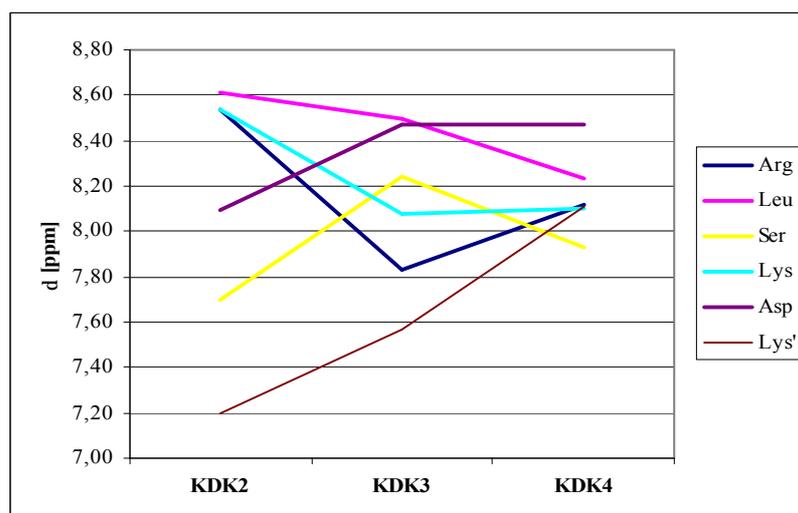


Abbildung 97: Vergleich der chemischen Verschiebung der H^N -Protonen von **KDK2-4**

Im Falle der H^α -Protonen zeigen sich deutlich geringere Unterschiede. So liegen besonderes die chemischen Verschiebungen des Aspartats, des Leucins und des ersten Lysins relativ nah

beieinander (vergl. Abbildung 98). Auffällig ist auch hier wieder die Überlagerung der Signale der H^α -Protonen von Leucin, Arginin sowie der beiden Lysinreste im Peptid **KDK4**.

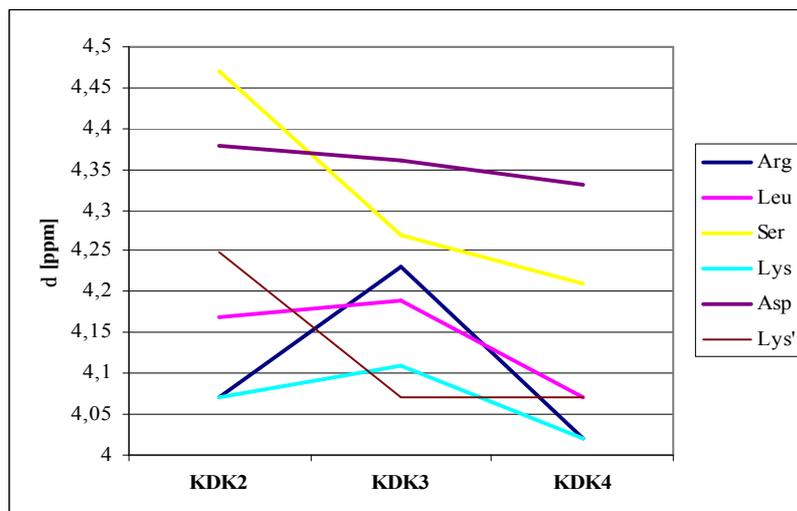


Abbildung 98: Vergleich der chemischen Verschiebung der H^α -Protonen von **KDK2-4**

Bedingt durch die Überlagerung vieler Signale gelingt es für das Peptid **KDK4** nicht, Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ zu identifizieren. Auffällig ist, dass für das Peptid **KDK3** die Kopplungskonstanten der Aminosäuren Arg, Leu, Ser und Asp alle im Bereich von 7.0 bis 7.8 Hz liegen, während im Peptid **KDK2** für diese Aminosäuren ein Bereich von nahezu 4.0 Hz überstrichen wird (Abbildung 99).

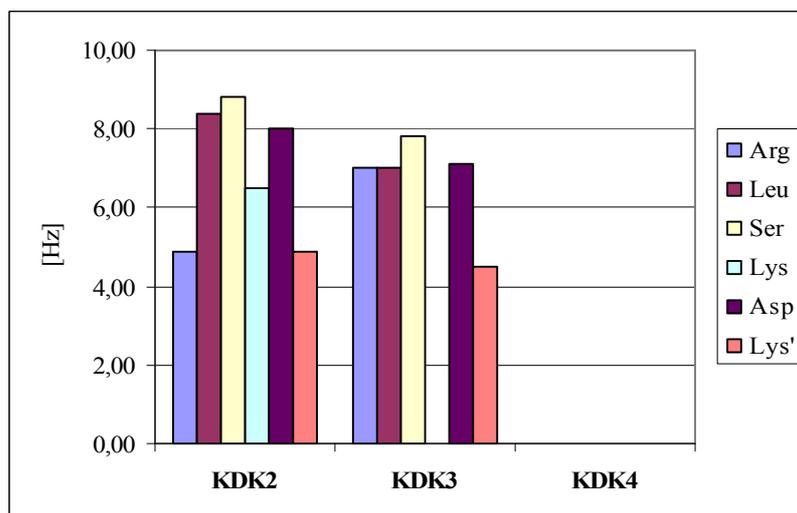


Abbildung 99: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von **KDK2-4**

Aus den Temperaturgradienten der Amidprotonen $\Delta\delta/\Delta T$ lassen sich Aufschlüsse über die Zugänglichkeit gegenüber dem Lösungsmittel und damit über etwaige Stabilisierungen des Moleküls durch Wasserstoffbrückenbindungen gewinnen. Leider lassen sich im Falle des

Peptids **KDK4** nur für das Leu H^N und für das Asp H^N die Gradienten ermitteln. Aus den Werten für das Peptid **KDK3** ist zu vermuten, dass die D-Aminosäure in der Position $i+1$ eines β -turns zu finden ist, der durch eine Wasserstoffbrücke von der Aminosäure $i+3$ H^N zur Aminosäure i CO stabilisiert wird. Für das Peptid **KDK2** kann keine derartige Aussage getroffen werden, hier zeigt das Lysin^{II} einen kleinen Temperaturgradienten.

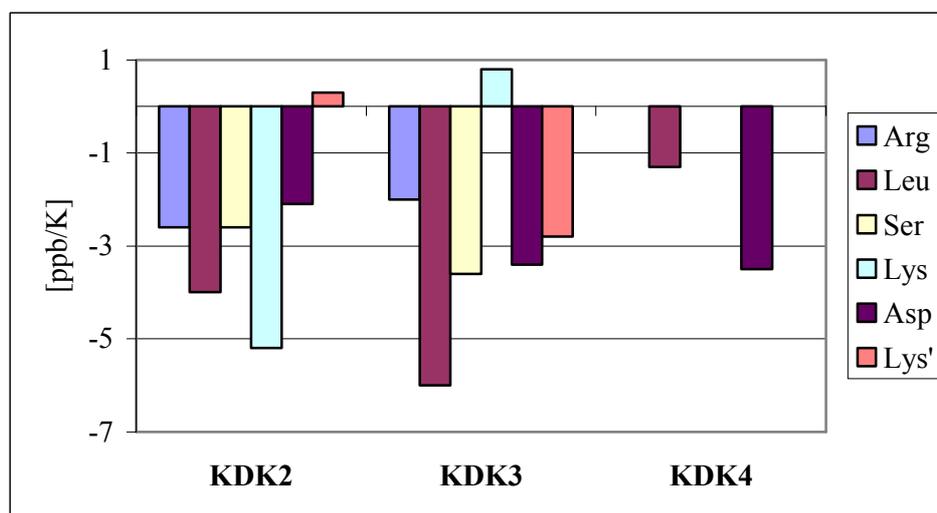


Abbildung 100: Temperaturgradient der chemischen Verschiebung der H^N -Protonen

4.7.2 c-(D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK2

Bedingt durch Signalüberlagerungen können die diastereotopen Protonen nur im Falle der β -Protonen des Aspartats zugeordnet werden, die Signale für das Serin fallen in ein Multiplett zusammen, für alle weiteren Aminosäuren tritt eine Überlagerung im Bereich zwischen 1.0 und 2.0 ppm auf, so dass keine Zuordnung möglich ist. Die Berechnung der Population der Seitenkettenrotamere über die Pachler-Gleichungen ergibt, dass das Rotamer χ_1 (-60°) deutlich bevorzugt ist.

Tabelle 27: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **KDK2**

	Asp	
	$H^{\beta\text{proR}}$	$H^{\beta\text{proS}}$
Kopplungskonstante	4.5 Hz	9.4 Hz
$d(H^\alpha H^\beta)$	222 pm	247 pm
$d(H^N H^\beta)$	-	287 pm

		Asp
<u>Population</u>	χ_1 (-60 °)	62 %
	χ_2 (180 °)	17 %
	χ_3 (60 °)	21 %

Auf der Basis von 16 ROEs wurde eine Startstruktur generiert und diese zunächst mit und anschließend ohne Randbedingungen in mehreren MD-Simulationen gerechnet. Die *Cluster*-Analyse der Trajektorie der freien MD-Rechnung liefert eine Konformation, die in Abbildung 101 gezeigt ist.

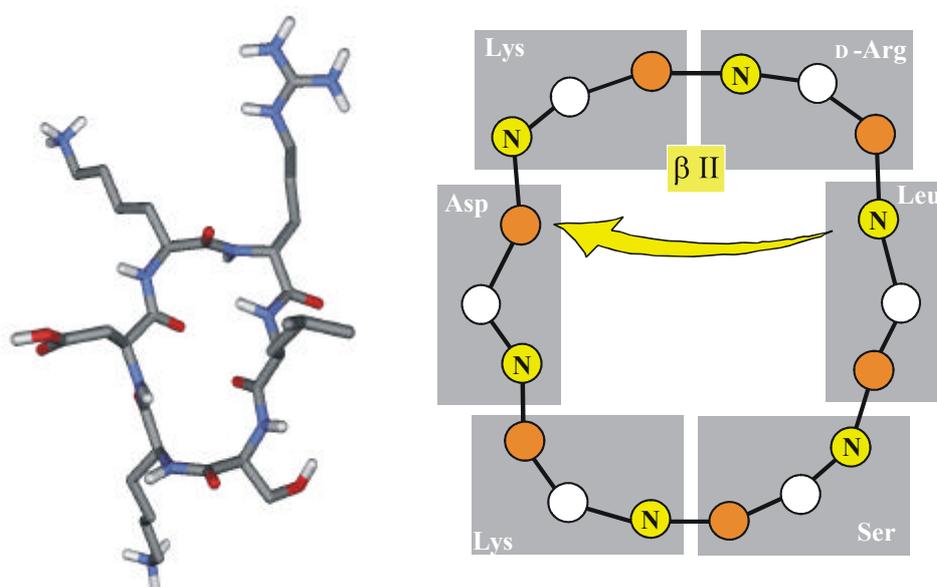


Abbildung 101: Konformation und schematische Struktur von **KDK2**

Das D-Arginin ist in der gefundenen Konformation in der Position $i+2$ eines β II-*turns* lokalisiert. Dies ist insofern überraschend, da D-Aminosäuren in der Regel die Position $i+1$ eines β II'-*turns* besetzen. Eine derartige Konformation wird jedoch auch durch die Temperaturgradienten der H^N -Protonen nicht gestützt, in einem solchen Fall müsste das Serin einen sehr kleinen Gradienten haben, das ist jedoch nicht der Fall, er liegt bei $\Delta\delta/\Delta T = -2.6$ ppb K^{-1} . Der schwach positive Wert für das Lys^{II} H^N kann mit der möglichen Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff in der Seitenkette des benachbarten Aspartats erklärt werden. Zwischen dem Serin und dem Lys^I wird eine *cis*-Peptidbindung ausgebildet, das betreffende Amidproton ist zum Lösungsmittel ausgerichtet, diese Beobachtung wird auch durch den Temperaturgradienten von Lys^I H^N ($\Delta\delta/\Delta T = -5.2$ ppb K^{-1}) gestützt. Für das Leu H^N wird mit $\Delta\delta/\Delta T = 4.0$ ppb K^{-1} ein recht hoher Temperaturgradient beobachtet, dies steht in

guter Übereinstimmung mit der Struktur, aus geometrischen Gründen wird keine Wasserstoffbrücke zum Asp CO ausgebildet.

Die Erkennungssequenz -Lys-Asp-Lys- wird in der erhaltenen Konformation in einer linearen Anordnung präsentiert.

4.7.3 c-(-Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK3

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen gelingt unter Einbeziehung der ROE-Spektren für die β -Protonen von Ser und Asp. Aus den Kopplungskonstanten $^3J_{H^aH^b}$ können über die Pachler-Gleichungen die Besetzung der Seitenkettenrotamere berechnet werden. Die Überlagerung von Signalen ermöglicht die Zuordnung lediglich für die β -Protonen des Serins und des Aspartats. Die Werte sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass im Falle des Serins alle Seitenkettenrotamere ähnlich stark besetzt sind, während beim Aspartat das Rotamer χ_2 (180 °) deutlich bevorzugt ist.

Tabelle 28: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **KDK3**

		Asp		Ser	
		H ^{βproR}	H ^{βproS}	H ^{βproR}	H ^{βproS}
	Kopplungskonstante	8.9 Hz	4.1 Hz	7.4 Hz	4.9 Hz
	d(H ^{α} H ^{β})	241 pm	283 pm	227 pm	252 pm
	d(H ^N H ^{β})	-	332 pm	352 pm	326 pm
<u>Population</u>	χ_1 (-60 °)	14 %		21 %	
	χ_2 (180 °)	57 %		44 %	
	χ_3 (60 °)	29 %		35 %	

Bedingt durch die Überlagerung vieler Signale im Bereich zwischen 1 und 2 ppm und die Überlagerung vieler diastereotoper Protonen gelingt aus den ROE-Spektren lediglich die Extraktion von 15 Atomabständen. Diese werden als Randbedingungen für die Generierung der Startstruktur sowie für die *restrained* MD-Simulation verwendet. Aus der freien MD-Rechnung wird durch *Cluster*-Analyse eine Konformation erhalten, die in Abbildung 102 dargestellt ist.

Wie erwartet nimmt die D-Aminosäure die Position $i+1$ eines β II'-turns ein. Die Konformation zeigt eine Wasserstoffbrückenbindung von Lys^I H^N zu Arg CO, dies steht in guter

Übereinstimmung mit dem ermittelten Temperaturgradienten ($\Delta\delta/\Delta T = +0.8$ ppb K^{-1}). Auch der Temperaturgradient des Ser H^N , der mit -6.0 ppb K^{-1} sehr groß ist, steht in guter Übereinstimmung mit der Konformation, das Amidproton ist nicht vom Lösungsmittel abgeschirmt. Der korrespondierende β -turn um Lys-Asp-Lys-Arg wird nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, auch entsprechen die Torsionswinkel nicht den Werten, die in klassischen *turns* gefunden werden (vergl.

Tabelle 84)

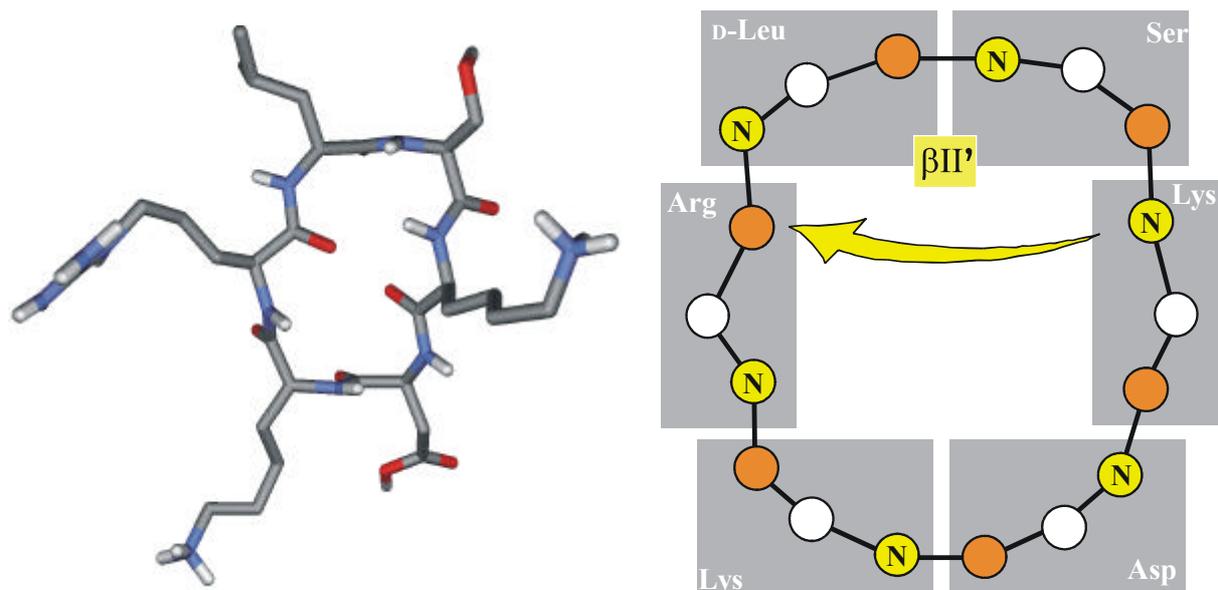


Abbildung 102: Konformation und schematische Struktur von **KDK3**

Die Erkennungssequenz wird in einer gewinkelten Anordnung in den Positionen i bis $i+2$ eines nichtklassischen β -turns präsentiert und zeigt damit eine deutlich andere Konformation als im Peptid **KDK2**.

4.7.4 c(-Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK4

Auf der Basis der ROE-Spektren gelingt die Zuordnung der diastereotopen β -Protonen in der Seitenkette des Serins und des Aspartats. Die Signale der Seitenkettenprotonen der weiteren Aminosäuren lassen sich nicht zuordnen, da durch Signalüberlagerungen keine klare Zuordnung getroffen werden kann. Nur im Falle des Serins lässt sich aus den Kopplungskonstanten über die Pachler-Gleichungen die Besetzung der Seitenkettenrotamere berechnen, die Signale für das Aspartat werden durch die δ -Protonen des Arginins überlagert, so dass keine Kopplungskonstanten extrahiert werden können. Im Serin ist das Rotamer χ_3 (60°) am stärksten populiert, die anderen beiden Rotamere zeigen eine Population im Bereich zwischen 20 und 30 %. Alle Werte sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Aus den ROE-Spektren lässt sich lediglich ein nicht-trivialer ROE extrahieren ($d(\text{Asp } H^N\text{-Lys}^I H^\alpha)$, vergl. Tabelle 74). Daher erscheint es nicht sinnvoll, mit den erhaltenen ROEs als Randbedingungen eine MD-Rechnung durchzuführen, da diese nur die Ausrichtung der Seitenketten betreffen könnten. Da auch aus den Temperaturgradienten kein Aufschluss über die mögliche Vorzugskonformation gewonnen werden kann, ist eine Bestimmung nicht möglich.

Tabelle 29: Zuordnung der diastereotopen Protonen für **KDK4**

		Asp		Ser	
		$H^{\beta\text{proR}}$	$H^{\beta\text{proS}}$	$H^{\beta\text{proR}}$	$H^{\beta\text{proS}}$
Kopplungskonstante		-	-	4.5 Hz	5.6 Hz
$d(H^\alpha H^\beta)$		229 pm	237 pm	216 pm	222 pm
$d(H^N H^\beta)$		-	325 pm	335 pm	305 pm
<u>Population</u>	$\chi_1 (-60^\circ)$		-		27 %
	$\chi_2 (180^\circ)$		-		17 %
	$\chi_3 (60^\circ)$		-		56 %

5 Zusammenfassung

Cyclische Peptide zeigen oft eine sehr homogene Sekundärstruktur und sind daher als Modelle für die bioaktive Konformation von Rezeptorliganden von Interesse. Die Sekundärstruktur wird durch verschiedene Parameter wie die Anzahl der im Ring vorhandenen Reste oder durch *turn*-induzierende Aminosäuren beeinflusst. Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren erhöht dazu die Stabilität gegenüber Proteasen und verbessert dadurch die Möglichkeit zum medikamentösen Einsatz.

Neben den schon bekannten und gut studierten *turn*-induzierenden Eigenschaften von D-Aminosäuren spielen in den letzten Jahren β -Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Sekundärstrukturen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Synthese, dem Einbau und der Aufklärung der konformationellen Präferenzen von cyclischen Analoga des β -Alanins in ansonsten aus α -Aminosäuren aufgebauten cyclischen Peptiden.

Ausgangspunkt sind 2-Aminocycloalkancarbonsäuren mit unterschiedlicher Stereochemie (*cis*, *trans*) und Ringgröße (fünf, sechs), die nach einer Vorschrift von Davies et al.³² stereoselektiv synthetisiert und für den Einbau in cyclische Peptide mit einer entsprechenden Schutzgruppe versehen wurden. Als weiterer Synthesebaustein fanden 2-Aminomethylbutansäuren Verwendung. Diese β -Aminosäuren wurden als Mimetika für Prolin bzw. Isoleucin verwendet.

Als Syntheseziel wurde das vermutete Bindungsepitop des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 ausgewählt, dessen Wechselwirkung mit dem Integrin $\alpha_4\beta_1$ bei unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen von Bedeutung ist.

Das Bindungsepitop besteht aus acht Aminosäuren. Da entsprechende cyclische Peptide oft relativ große Flexibilität besitzen, wurden Teile der Sequenz gewählt, die aus fünf bis sechs Aminosäure bestehen und die Prolin als Aminosäure enthalten.

Insgesamt 20 Penta- und Hexapeptide mit den entsprechenden β -Aminosäuren wurden durch Festphasenpeptidsynthese dargestellt, unter Pseudo-Hochverdünnungsbedingungen in Lösung cyclisiert und nach Abspaltung der Schutzgruppen durch RP-HPLC gereinigt.

Mittels Zelladhäsionstest durchgeführt Untersuchungen der biologischen Aktivität der synthetisierten Peptide zeigen, dass keinerlei Interaktion mit dem Integrin beobachtet werden kann.

Von einer Reihe von Peptiden des C-terminalen Bereichs des Bindungsepitops wurde die

Konformation in Lösung mit NMR-Methoden aufgeklärt, einerseits um einen Vergleich mit der Konformation des bioaktiven Bereiches des VCAM-1 durchzuführen, andererseits um Aufschluss über eventuelle strukturelle Präferenzen der verwendeten β -Aminosäuren zu ermitteln.

Die nicht vorhandene biologische Aktivität kann durch die großen Abweichungen sowohl des Peptidrückgrat wie auch in der Ausrichtung der Seitenketten erklärt werden. Auch scheint die im VCAM-1 vorhandene *cis*-Peptidbindung zwischen Prolin und Asparagin von Bedeutung für die Aktivität zu sein, die in den ermittelten Konformationen nicht auftritt.

Die Position der β -Aminosäure in den Peptiden ist sowohl von der Ringgröße wie auch von der Stereochemie abhängig. Anders als in den von Schumann¹³⁹ untersuchten Tetra-, Penta- und Hexapeptiden, in denen β^3 -Homoaminosäuren die zentralen Position von Pseudo- γ -turns einnehmen, wird für die untersuchten Peptide keine derartige Präferenz beobachtet.

Für *trans*-ACACs ist in beiden untersuchten Pentapeptiden **P8** (c(-Ser-^lACPC-Leu-Asn-Asp-)) und **P10** (c(-Ser-^lACHC-Leu-Asn-Asp-)) kein Sekundärstrukturelement aufzufinden, vermutlich aufgrund der Geometrie des Rings, die Amino- und die Carboxygruppe zeigen in entgegengesetzte Richtungen des Moleküls, die weiteren Reste schaffen es nicht, die dadurch aufgebaute Präferenz der entgegengesetzten Ausrichtung der Amidprotonen und Carboxygruppen aufzubrechen.

In den weiteren Peptiden ist die β -Aminosäure in den meisten Fällen in unterschiedlichen Positionen von β -turns, die oft ungewöhnliche Torsionswinkel aufweisen, lokalisiert. Ausnahmen bilden das Hexapeptid mit ^cACPC (**P1**, c(-Ser-^cACPC-Leu-Asn-Ile-Asp-)), in dem die β -Aminosäure die Position *i* eines α -turns einnimmt sowie die weniger stark populierte Konformation des Pentapeptids mit ^cACHC (**P9 B**, (c(-Ser-^cACHC-Leu-Asn-Asp-)), zentrale Position eines Pseudo- γ -turns). Das stärker populierte Konformer **P9 A** präsentiert das ^cACHC in Position *i* eines β -turns, ebenso wie das Hexapeptid mit der selben Aminosäure (**P3**, c(-Ser-^cACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-)). Die Hexapeptide mit *trans*-ACACs haben durch ihre um 3 Atome erweiterte Ringgröße im Gegensatz zu den Pentapeptiden die Möglichkeit, die konformationellen Restriktionen der β -Aminosäure auszugleichen. Während das ^lACPC in **P2** (c(-Ser-^lACPC-Leu-Asn-Ile-Asp-)) in der Position *i*+2 gefunden wird, tritt das ^lACHC in der Position *i*+1 eines β -turns auf (**P4**, c(-Ser-^lACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-)). In dieser Position wird auch das ^cACPC im Pentapeptid **P7** (c(-Ser-^cACPC-Leu-Asn-Asp-)) gefunden. Eine Übersicht über die Position der β -Aminosäuren in allen untersuchten Peptide ist in Tabelle 30 dargestellt.

Deutlich wird, dass cyclische β -Aminosäuren andere Präferenzen bei der Ausbildung von

Sekundärstrukturen zeigen, als dies für β^3 -Aminosäuren der Fall ist. Inwiefern dies sequenzspezifisch ist, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen in diesem Feld sein.

Tabelle 30: Position der β -Aminosäure in den untersuchten Peptiden

Peptid	Sequenz	Sekundärstrukturelement	Position
P1	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)	I α_{RU}	<i>i</i>
P2	c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)	„ β “	<i>i+2</i>
P3	c-(-Ile-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)	β I	<i>i</i>
P4	c-(-Ile-Asp-Ser- ^t ACHC-Leu-Asn-)	„ β “	<i>i+1</i>
P7	c-(-Asp-Ser- ^c ACPC-Leu-Asn-)	„ β “	<i>i+1</i>
P8	c-(-Asp-Ser- ^t ACPC-Leu-Asn-)	-	-
P9 A	c-(-Asp-Ser- ^c ACHC-Leu-Asn-)	„ β “	<i>i+1</i>
P9 B		$\Psi\gamma$	<i>i+1</i>
P10	c-(-Asp-Ser- ^t ACHC-Leu-Asn-)	-	-

In einem weiteren Teilprojekt sollen die Wechselwirkungen zwischen ADAMs und Integrinen am Beispiel des ADAM 8 untersucht werden. Dazu wurden cyclische Hexapeptide mit dem Bindungsepitop der Disintegrindomäne von murinem ADAM 8 (-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) dargestellt, die das Epitop in unterschiedlichen Konformationen präsentieren sollen. Dies soll über einen D-Aminosäure-*Scan* erreicht werden. Weiterhin soll durch einen Alanin-*Scan* die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Wechselwirkungen untersucht werden. Die Darstellung der Peptide gelingt durch Synthese der linearen Peptide mittels Festphasen-Peptidsynthese, Cyclisierung unter Pseudohochverdünnung in Lösung sowie Abspaltung der semi-permanenten Schutzgruppen.

Erste biologische Untersuchungen durch Zelladhäsionstests zeigen positive Ergebnisse für die homophilen Interaktion der Peptide mit der Disintegrindomäne. Daher besteht natürlich Interesse an der Strukturaufklärung der Peptide, um Erkenntnisse über die biologisch aktivste Form zu gewinnen.

Der Einbau von D-Leucin in die Sequenz zeigt die erwarteten Konsequenzen für die Konformation des Cyclopeptids, es wird ein β II'-*turn* mit D-Leu in der Position *i+1* beobachtet. Die Verwendung von D-Arg führt zur Ausbildung einer ungewöhnlichen Konformation, es wird ein β II-*turn* mit D-Arg in der Position *i+2* ausgebildet. Bedingt durch Signalüberlagerung gelingt es nicht, für das Peptid mit D-Ser eine Vorzugskonformation zu

ermitteln.

Als weiteres Ziel sollte hier neben der Durchführung weiterer biologischer Tests sowohl zur homophilen Interaktion als auch bezüglich der Wechselwirkungen zu unterschiedlichen Integrinen die Herstellung von entsprechenden Struktur-Wirkungsbeziehungen versucht werden, um die genaue Funktion der beteiligten Aminosäuren zu untersuchen. Außerdem erscheint es sinnvoll, die gewonnen Erkenntnisse auf humane Zellen zu übertragen, die ein leicht verändertes Bindungsepitop aufweisen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

Schmelzpunkte:	Büchi 510 Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli
Flashchromatographie:	Kieselgel 60 (0.040 – 0.063 mm, Merck).
Dünnschichtchromatographie:	DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, F ₂₅₄ , Merck).
Gaschromatographie:	Shimadzu GC 17A Gaschromatograph, Säule HP 5 MS, Länge 25 m, Innendurchmesser 0.20 mm, Schichtdicke 0.33 µ, Flammenionisationsdetektor.
GC-Methode:	Injektortemperatur 270 °C; Starttemperatur 60 °C; Heizrate 15 °C/min, Endtemperatur 270 °C; Endzeit 18 min.
NMR-Spektren:	Bruker AC 250 P (¹ H: 250.1 MHz; ¹³ C: 62.9 MHz); Bruker DRX500 (¹ H: 500.1 MHz; ¹³ C: 125.8 MHz; ³¹ P: 202.5 MHz); Bruker Avance 600 (¹ H: 600.1 MHz; ¹³ C: 150.9 MHz); Interner Standard: Tetramethylsilan; Chemische Verschiebung δ in ppm.
IR-Spektren:	ATI Mattson Genesis Series FTIR; Jasco FT/IR-410 Filme (Öle) oder KBr-Presslinge (Feststoffe).
Massenspektrometrie:	EI: VG Autospec; Elektronenstoßionisation 70 eV, relative Intensität zum Basispeak. ESI: Esquire 3000 Electrospray-Ionisation.
Peptidsynthesizer:	ACT 496 Multiple Organic Synthesizer Fa. Advanced ChemTech Reaktionsgefäß: 16er Teflon-Reaktionsblock
MALDI-ToF MS:	Voyager-DE, Fa. PerSeptive Biosystems Laser: Stickstofflaser, λ = 337 nm Matrix: α-Cyano-4-hydroxymethylpantothensäure, Dihydroxybenzoesäure Delay-Time: 100 ns Accelerating Voltage: 20 000 V Grid Voltage: 94 %

Guide Wire Voltage: 94 %

Scans: 50 – 150

Analytische RP-HPLC:

Pumpe: Thermo Separation Products (TSP) P 4000

Detektor: TSP UV 6000 LP, Detektion bei $\lambda = 254$ nm (geschützte Peptide), 220 nm (entschützte Peptide)

Säule: Vydac 300 C18. 5 μ m, 250 x 4.6 mm

Controller: TSP SN 4000

Software: ChromQuest[®]

Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0.1 % TFA

Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0.1 % TFA

Programm „Afterprep“: Entschützte Peptide

Flow: 1.0 ml/min

Zeit	% Eluent A	% Eluent B
0	100	0
5	100	0
25	50	50
30	100	0

Präparative RP-HPLC:

Anlage Thermo Separation Products:

Pumpe: TSP P 4000

Detektor: TSP UV 1000, Detektion bei $\lambda = 254$ nm (geschützte Peptide), 220 nm (entschützte Peptide)

Vorsäule: Vydac[™] High Performance Guard

Column, Protein u. Peptide C18, Fa. Phenomenex

Säule: Vydac[™] 218 TP 1022 Efficiency, Protein u.

Peptide C18, 2.2 x 25 cm, Fa. Phenomenex

Controller: TSP SN 4000

Software: ChromQuest[®]

Anlage Merck Hitachi:

Pumpe: Merck Hitachi L7150

Detektor: Merck Hitachi L7420, Detektion bei $\lambda = 254$ nm (geschützte Peptide), 220 nm (entschützte Peptide)

Vorsäule: Vydac[™] High Performance Guard

Column, Protein u. Peptide C18, Fa. Phenomenex

Säule: Jupiter 10 μ C18 300 A, 2.12 x 25 cm, Fa.

Phenomenex

Controller: Merck Hitachi D 7000

Software: Chromatographie Data Station Software
HPLC System Manager[®]

Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0.1 % TFA

Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0.1 % TFA

Programm 1 „Praep254“: Geschützte acyclische und cyclische Peptide

Flow: 10.0 ml/min

Detektion: 254 nm

Zeit	% Eluent A	% Eluent B
0	92	8
55	0	100
60	0	100
65	92	8

Programm 2 „Praep25ml“: Entschützte Peptide

Flow: 25.0 ml/min

Detektion: 220 nm

Zeit	% Eluent A	% Eluent B
0	92	8
20	35	65
23	92	8

Programm 3 „Praep5ml“: Entschützte Peptide

Flow: 5.0 ml/min

Detektion: 220 nm

Zeit	% Eluent A	% Eluent B
0	90	10
25	60	40
30	0	100
55	0	100
60	90	10

UV-Spektrometer:

Model 34 Spectralphotometer, Fa. Beckmann

Zentrifuge:

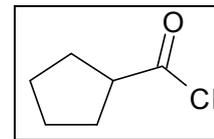
Centrifuge 5810 R, Fa. Eppendorf

6.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und falls nötig getrocknet. Dichlormethan wurde zuerst über Calciumchlorid destilliert und dann über Calciumhydrid getrocknet. Diethylether wurde zuerst über Calciumchlorid destilliert und dann über Calciumhydrid und Natrium getrocknet. Petrolether wurde über Calciumchlorid destilliert. Tetrahydrofuran (THF) wurde zuerst über Calciumchlorid destilliert und dann über Calciumhydrid und Natrium getrocknet. Toluol wurde zuerst über Calciumchlorid destilliert und dann über Calciumhydrid und Natrium getrocknet. *N,N*-Dimethylformamid wurde über Ninhydrin (100 mg/l) im Vakuum destilliert. Wasser wurde über eine Entsalzungsanlage der Fa. Millipore aufbereitet. Acetonitril (gradient grade) wurde von der Firma Riedel-de-Haën bezogen. Aminosäurederivate, Harze und Kupplungsreagenzien stammen von den Firmen Advanced ChemTech, Aldrich, Bachem, Fluka und NovaBiochem. (*R*)- und (*S*)-Aminomethylbutansäure wurden von der Firma ChiroBlock GmbH, Wolfen zur Verfügung gestellt.

6.3 Aminosäuresynthese

6.3.1 (1*R*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²



Cyclopentancarbonsäurechlorid²⁵⁴

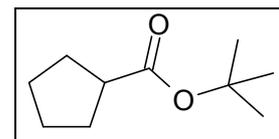
Zu 52.5 g (460 mmol) Cyclopentancarbonsäure werden 75.0 g (630 mmol) Thionylchlorid getropft. Es wird drei Stunden auf 75 °C erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Wasserstrahlvakuum entfernt. Fraktionierte Destillation unter vermindertem Druck ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 60.2 g (450 mmol, 98 % d. Th.).

Summenformel: C₇H₉OCl.

Molmasse: 132.59 g/mol.

Siedepunkt: 72 °C (50 mbar) (Lit.²⁵⁴: 47 °C (15 mm)).



Cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester²⁵⁵

124 g (1.67 mol) *tert*-Butanol werden in 200 ml Pyridin gelöst. Unter Eiskühlung werden 60.2 g (450 mmol) Cyclopentancarbonsäurechlorid zugetropft. Es wird eine Stunde bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt. Die Lösung wird in 400 ml Eiswasser gegossen und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 5 gebracht. Der abgeschiedene ölige Film wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Destillation ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 57.3 g (340 mmol, 75 % d. Th.).

Summenformel: C₁₀H₁₈O₂.

Molmasse: 170.25 g/mol.

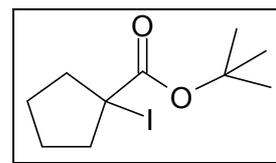
Siedepunkt: 75 – 76 °C (30 mbar) (Lit.²⁸⁷: 189 – 192 °C).

IR (Film): 2969 s, 2871 m, 1727 vs, 1457 w, 1367 s, 1149 vs, 1041 w, 850 w.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.46 – 1.87 (m, 8 H, (-CH₂-)₄), 2.61 (m, 1H, CH-COO).

¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃): 25.8 (s), 28.1 (p, C(CH₃)₃), 30.0 (s), 45.0 (t, CHCOO), 79.6 (q, C(CH₃)₃), 176.2 (q, COO).

MS: 171 (M⁺ + H), 155 (M⁺ – CH₃, 1%), 115 (M⁺ – ^tBu, 16%), 115 (M⁺ – O^tBu, 31%), 69 (C₅H₉⁺, 43%), 57 (C₄H₉⁺, 100%)



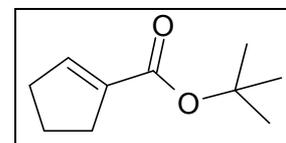
1-Iod-cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester³²

Zu einer Lösung von 212 mmol Lithiumdiisopropylamid in 200 ml THF werden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25.8 g (140 mmol) Cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester in 20 ml THF durch eine Kanüle zugetropft. Nach 60 min Rühren wird die Reaktionsmischung in eine Lösung von 61.0 g (240 mmol) Iod in 200 ml THF, gekühlt auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, gegeben. Nach 30 min Rühren werden 40.0 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und die Lösung innerhalb von 60 min auf Raumtemperatur aufgewärmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird in Natriumthiosulfatlösung aufgenommen und mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird ein gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (roh): 38.0 g (128 mmol, 92 % d. Th.; Lit.³²: 67 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{I}$.

Molmasse: 296.15 g/mol.



1-Cyclopentencarbonsäure-*tert*-butylester³²

29.7 g (190 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 30 ml THF werden unter Eiskühlung zu einer Lösung von 38.0 g (128 mmol) 1-Iod-cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester in 200 ml THF innerhalb von 30 min zugetropft. Es wird eine Stunde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 48 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt, zur Trockne eingengt, in Wasser aufgenommen und mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert. Säulenchromatographische Reinigung (Petrolether/Diethylether, 100 : 1; $R_f = 0.86$) ergibt ein farbloses Öl, Gemisch mit Edukt etwa 10 : 1.

Ausbeute: 11.7 g (70 mmol, 54 % d. Th.; Lit.³²: 46 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$.

Molmasse: 168.24 g/mol

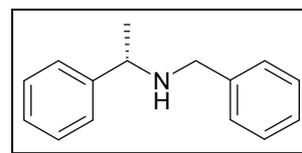
IR (Film): 3068 w, 2975 s, 2869 s, 1710 s, 1631 m, 1479 m, 1455 m, 1390 m, 1367 s, 1299 s, 1166 s, 1087 s.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 1.49 (s, 9H, ^tBu), 1.93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.45 – 2.54 (m, 4H, $=\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=}$), 6.66 (t, 1H, $^3J = 2.2\text{ Hz}$, $=\text{CH-}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 23.3 (s, $-\text{CH}_2-$), 27.4 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.4, 33.2 (s, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 79.9 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 138.9 (t, $-\text{CH}=\text{C}$), 142.5 (q, $=\text{C}-$), 165.0 (q, $\text{C}=\text{O}$).

MS: 168 (M^+ , 28 %), 113 ($\text{M}^+ - \text{tBu}$, 47 %), 95 ($\text{M}^+ - \text{O}^t\text{Bu}$, 41 %), 67 ($\text{M}^+ - \text{COO}^t\text{Bu}$, 46 %), 57 (tBu^+ , 100 %).

GC: t_R 8.98 min.



(S)-N-Benzyl-1-phenylethylamin²⁵⁶

12.1 g (100 mmol) (*S*)-1-Phenylethylamin in 50 ml Methanol werden mit methanolischem Chlorwasserstoff auf einen pH-Wert von 6 bis 7 gebracht. 13.8 g (130 mmol) Benzaldehyd und 4.16 g (66.2 mmol) Natriumcyanoborhydrid werden zugegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, das Öl wird in 50 ml Wasser aufgenommen und mit Kaliumhydroxid auf einen pH-Wert größer 10 eingestellt. Nach dem Sättigen der Lösung mit Natriumchlorid wird mit *tert*-Butylmethylether extrahiert, die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird entfernt. Destillation ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 17.8 g (84 mmol, 84 % d. Th.; Lit.²⁵⁶: 64 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}$.

Molmasse: 211.31 g/mol.

Siedepunkt: 96 °C (0.06 mbar) (Lit.²⁵⁶: 128 – 130 °C (0.2 mm)).

IR (Film): 3309 w (NH), 3027 m ($=\text{CH}$), 2967 m (CH), 1492 m, 1452 s, 1114 m, 1027 m, 761 m, 698 vs.

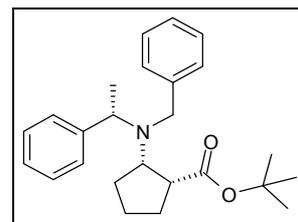
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 1.35 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.65 (s, 1H, NH), 3.57 (d, $^2J = 13.2$ Hz, 1H, $\text{NH}-\text{CH}^{\text{H}^{\text{c}}}-\text{C}_{\text{arom}}$), 3.66 (d, $^2J = 13.2$ Hz, 1H, $\text{NH}-\text{CH}^{\text{H}^{\text{c}}}-\text{C}_{\text{arom}}$), 3.79 (q, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 7.17 – 7.44 (m, 10H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 24.4 (p, $-\text{CH}_3$), 51.7 (s, $\text{NH}-\text{CH}_2-$), 57.5 (t, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 126.6, 126.8, 128.1, 128.4, 128.5 (t, CH_{arom}), 140.7, 145.6 (q, C_{arom}).

MS: 211 (M^+ , 4%), 196 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100%), 105 ($\text{M}^+ - \text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, 41%), 91 (C_7H_7^+ , 97%), 77 (C_6H_5^+ , 28%).

GC: t_R 14.57 min.

Drehwert ($c = 3.60$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): $[\alpha]_D^{25} = -51.0$ (Lit.²⁵⁶: ($c = 3.80$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) $[\alpha]_D^{21} = -53.6$).



**(aS,1R,2S)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-
cyclopentancarbonsäure-tert-butylester³²**

0.68 g (3.2 mmol) (*S*)-*N*-Benzyl-1-phenylethylamin werden in 8 ml THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 3.0 mmol einer 1.6 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan werden zugegeben. Es wird 15 min bei 0 °C gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Zu der tiefroten Lösung werden 0.36 g (2.0 mmol) 1-Cyclopentencarbonsäure-*tert*-butylester in 2 ml THF durch eine Kanüle zugetropft. Die Lösung verfärbt sich nach orange. Es wird eine Stunde bei -78 °C, zweieinhalb Stunden bei -30 °C und erneut eine Stunde bei -78 °C gerührt. Zugabe von 1.24 g (6.0 mmol) 2,6-Di-*tert*-butylphenol in 2 ml THF führt zur Gelb-Färbung der Lösung. Innerhalb von einer Stunde wird die Lösung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das Lösungsmittel wird entfernt, das entstandene Öl wird in 50 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das entstandene Öl wird säulenchromatographisch (Petrolether/Diethylether 20 : 1; $R_f = 0.25$) gereinigt. Nach Umkristallisation aus Methanol werden lange Nadeln eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 0.44 g (1.2 mmol, 58 % d. Th.; Lit.³²: 50 % d. Th.)

Summenformel: C₂₅H₃₃O₂N.

Molmasse: 379.55

Schmelzpunkt: 62 °C

IR (KBr): 3060 m, 2975 s, 2871 m, 2815 m, 1718 s, 1600 m, 1494 m, 1448 m, 1365 s, 1145 s, 746 s, 700 s.

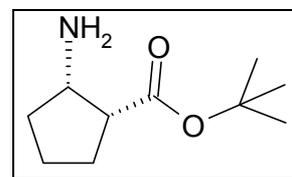
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.37 (d, ³*J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 1.50 (s, 9H, ^tBu), 1.57 – 1.79 (m, 6H, (CH₂)₃), 2.87 (m, 1H, CH-NR₂), 3.12 (m, 1H, CH-COO), 3.52, 3.55 (AB-System, *J*_{AB} = 15.5 Hz, N-CH₂), 4.31 (q, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, N-CH(CH₃)), 7.17 – 7.42 (m, 10H, arom.).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 17.4 (p, CH₃), 22.1, 27.4, 29.0 (s, CH₂), 28.2 (p, C(CH₃)₃), 48.4 (t, CH-COO), 51.7 (s, N-CH₂-C_{arom}), 58.0 (t, CH-N), 66.0 (t, N-CH(CH₃)-C_{arom}), 79.9 (q, C(CH₃)₃), 126.2, 126.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1 (t, CH_{arom}), 142.6, 143.0 (q, C_{arom}), 175.1 (q, COO).

MS (EI): 379 (M⁺, 15 %), 364 (M⁺ – CH₃, 25 %), 322 (M⁺ – ^tBu, 7 %), 308 (M⁺ – CH₃ – ^tBu, 29 %), 288 (M⁺ – C₇H₇, 20 %), 274 (M⁺ – C₈H₉, 47 %), 218 (M⁺ – C₈H₉ – ^tBu, 83 %), 105 (C₈H₉⁺, 100 %), 91 (C₇H₇⁺, 92 %).

GC: t_R 23.54 min.

Drehwert ($c = 1.10$, CHCl_3): $[\alpha]_D^{25} = -68.0$.



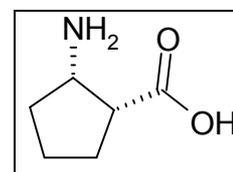
(1R,2S)-2-Amino-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester³²

1.00 g (2.6 mmol) (*aS,1R,2S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester werden mit 30 Gewichtsprozent (300 mg) Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 15 ml Essigsäure 15 Stunden bei einem Wasserstoffdruck von 4.0 bar und 50 °C hydriert. Die Reaktionsmischung wird durch eine D4-Filterfritte über Kieselgel abgesaugt. Der Katalysator wird mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der entstandene Feststoff wird in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, mit etherischer HCl versetzt und das Lösungsmittel wird entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 350 mg (1.9 mmol, 73 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}$.

Molmasse: 185.27 g/mol.



(1R,2S)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²

350 mg (1.9 mmol) (*1R,2S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und bis zum Ende der Gasentwicklung gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das entstandene Öl wird drei Mal mit methanolischer HCl (50 ml) versetzt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 148 mg (1.14 mmol, 60 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$.

Molmasse: 129.16 g/mol.

Schmelzpunkt: 192 °C (Zers.).

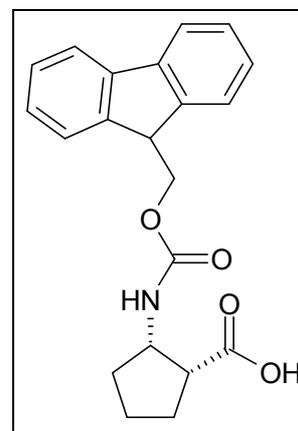
IR (KBr): 3359 s, 3228 s, 2942 s, 1714 s, 1209 s, 850 s, 667 s.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): 2.12 – 2.03 und 1.88 – 1.68 (m, 6H, CH_2), 2.86 (m, 1H, CHCO), 3.71 (m, 1H, CHNH_2).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO): 29.0, 27.0, 20.4 (s, CH_2), 47.0 (t, CHCO), 53.0 (t, CHN),

180.5 (q, COO).

MS (MALDI-ToF MS): 130 [M+H⁺].



(1R,2S)-Fmoc-2-Aminocyclopentanecarbonsäure²⁸⁸

1.29 g (10 mmol) (1R,2S)-2-Aminocyclopentanecarbonsäure werden in 10.0 ml Wasser aufgenommen. Die Lösung wird mit Triethylamin auf einen pH-Wert von etwa 8 bis 9 gebracht. Eine Lösung von 3.26 g (9.5 mmol) 9-Fluorenylmethyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonat in 5.0 ml Acetonitril wird zugegeben. Der pH-Wert wird mit Triethylamin erneut auf 8 bis 9 gebracht und ggf. durch weitere Zugabe von Triethylamin dort gehalten. Die Reaktion ist beendet, wenn der pH-Wert 15 min bei einem Wert von 8 bis 9 konstant bleibt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der entstandene Rückstand wird in 1.5 M Salzsäure aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der entstandene Feststoff wird aus kaltem Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1.53 g (4.4 mmol, 46 % d. Th.).

Summenformel: C₂₁H₂₁NO₄.

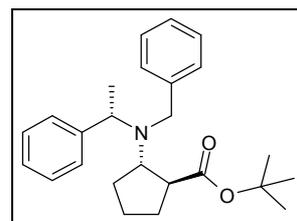
Molmasse: 351.41 g/mol.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): 1.42 – 1.70, 1.85 – 1.92 (m, 6H, (CH₂)₃). 2.57 (m, 1H, CH-COO), 4.00 (m, 1H, CH-NH), 4.20 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, FluorenCH), 4.26 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, Fluoren-CH₂), 7.62 – 7.25 (m, 8H, CH_{arom}).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO): 21.6, 26.4, 31.3 (s, CH₂), 46.7 (t, CH-COO), 47.4 (t, Fluoren-CH), 54.0 (t, CH-N), 65.5 (s, Fluoren-CH₂), 120.1, 125.3, 127.1, 127.6, (t, CH_{arom}), 140.7, 143.7 (q, C_{arom}), 155.6 (q, CON), 174.3 (q, COO).

IR (KBr): 3413 m, 3270 m, 3066 m, 2964 s, 2875 m, 1712 s, 1660 s, 1519 m, 1450 s, 1415 s, 1340 s, 1213 m, 740 s.

6.3.2 (1*S*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²



(aS,1*S*,2*S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclopentancarbonsäure-tert-butylester³²

Eine Lösung aus 2.44 g (33 mmol) *tert*-Butanol in 60 ml THF wird auf 0 °C gekühlt. 30 ml einer 0.5 M Lösung (15 mmol) von KHMDS in Toluol werden zugetropft. Nach 15 min Rühren wird eine Lösung aus 1.44 g (3.9 mmol) 2-((*aS*,1*R*,2*S*)-N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester in 15 ml THF zugegeben. Die Reaktion wird 6 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in gesättigter Natriumchloridlösung aufgenommen, mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das entstandene Öl säulenchromatographisch (Petrolether : Diethylether 30 : 1; $R_f = 0.30$) gereinigt. Es wird ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1.08 g (2.85 mmol, 73 % d. Th.; Lit.³²: 75 % d. Th.)

Summenformel: C₂₅H₃₃O₂N.

Molmasse: 379.55

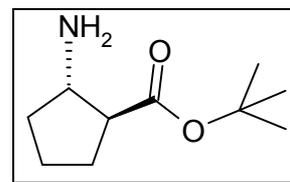
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.30 (d, ³*J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.36 (s, 9H, ^tBu), 1.58 – 1.76 (m, 6H, (CH₂)₃), 3.66, 3.75 (AB-System, *J*_{AB} = 14.4 Hz, 2H, N-CH₂), 2.61 (m, 1H, CH-NR₂), 3.55 (m, 1H, CH-COO), 3.87 (q, ³*J* = 6.7 Hz, 1H, N-CH(CH₃)), 7.14 – 7.44 (m, 10H, arom.).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 16.1 (p, CH₃), 24.5, 28.6, 29.6 (s, CH₂), 28.1 (p, C(CH₃)₃), 49.1 (t, CH-COO), 50.1 (s, N-CH₂), 58.0 (t, CH-N), 63.9 (t, N-CH(CH₃)), 79.6 (q, C(CH₃)₃), 126.4, 126.5, 127.8, 127.9, 128.0, 128.3 (t, CH_{arom}), 142.0, 144.5 (q, C_{arom}), 175.5 (q, COO).

MS: 379 (M⁺, 10%), 364 (M⁺ – CH₃, 14%), 322 (M⁺ – C₄H₉, 5%), 288 (M⁺ – PhCH₂, 13%), 274 (M⁺ – PhC₂H₅, 31%), 105 (PhC₂H₄⁺, 100%), 91 (PhCH₂⁺, 94%).

GC: *t*_R 23.0 min.

Drehwert (c = 2.42, CHCl₃): [α]_D²⁸ = 75.4 (Lit.³²: (c = 2.45, CHCl₃): [α]_D²⁸ = 72.8).



(1*S*,2*S*)-2-Amino-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester³²

9.72 g (25.5 mmol) (*aS*,1*S*,2*S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclopentancarbonsäure-

tert-butylester werden mit 30 Gewichtsprozent (2.92 g) Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 75 ml Essigsäure 15 Stunden bei einem Wasserstoffdruck von 4.0 bar und 50 °C hydriert. Die Reaktionsmischung wird durch eine D4-Filterfritte über Kieselgel abgesaugt. Der Katalysator wird mit Essigsäure gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der entstandene Feststoff wird in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, mit etherischer HCl versetzt und das Lösungsmittel wird entfernt. Der entstandene Feststoff wird mit Diethylether farblos gewaschen.

Ausbeute: 4.15 g (18.7 mmol, 73 % d. Th.)

Summenformel: C₁₀H₁₉O₂N.

Molmasse: 185.27 g/mol

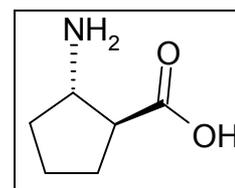
Schmelzpunkt: 172 °C.

IR (KBr): 3420 m, 2975 ss, 1728 ss, 1368 s, 1223 s, 1150 ss 845 m.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.40 (s, 9H, ^tBu), 1.52 – 1.78 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.94 – 2.08 (m, 2H, COO-CH-CH₂), 2.49 (m, 1H, CH-NH₂), 2.82 (m, 1H, CH-COO), 8,34 (s, br, 3H, NH₃⁺Cl⁻).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO): 23.3, 27.7, 30.9 (s, CH₂), 29.6 (p, C(CH₃)₃), 48.7 (t, CH-COO), 52.9 (t, CH-N), 80.5 (q, C(CH₃)₃), 172.3 (q, COO).

MS (ESI): 185.9 ([M + H]⁺), 130,0 ([M + H – ^tBu]⁺).



(1S,2S)-2-Aminocyclopentancarbonsäure³²

4.15 g (18.7 mmol) (*1S,2S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure-*tert*-butylester werden in 20 ml Trifluoressigsäure gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das entstandene Öl wird in Methanol (50 ml) aufgenommen und mit methanolischer HCl (50 ml) versetzt. Das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 3.05 g (18.5 mmol, 99 % d. Th.; Lit.³²: 71 % ausgehend vom voll geschützten Edukt)

Summenformel: C₆H₁₁O₂N · HCl.

Molmasse: 129.16 g/mol bzw. 165.61 g/mol.

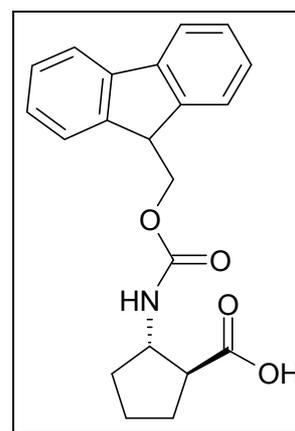
Schmelzpunkt: 148 °C.

IR (KBr): 3448 s, 2954 s, 1731 s, 1438 m, 1220 m, 1168 m.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 1.59 – 1.76 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.94 – 2.08 (m, 2H, COO-CH-CH_2), 2.49 (m, 1H, CH-NH_2), 2.93 (m, 1H, CH-COO), 8,41 (s, br, 3H, NH_3^+Cl^-).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 23.2, 29.2, 30.7 (s, CH_2), 47.7 (t, CH-COO), 52.6 (t, CH-N), 173.6 (q, COO).

Drehwert ($c = 0.90$, H_2O): $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = 52.2$ (Lit.³² $c = 0.75$, H_2O): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 50.7$).



(1S,2S)-Fmoc-2-Aminocyclopentanecarbonsäure²⁸⁸

3.00 g (18.5 mmol) (*1R,2S*)-2-Aminocyclopentanecarbonsäure werden in 20.0 ml Wasser aufgenommen und mit Triethylamin auf einen pH-Wert von etwa 8 bis 9 gebracht. Eine Lösung von 6.24 g (18.5 mmol) 9-Fluorenylmethyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonat in 20.0 ml Acetonitril wird zugegeben. Der pH-Wert wird mit Triethylamin auf 8 bis 9 gebracht und ggf. durch weitere Zugabe von Triethylamin dort gehalten. Die Reaktion ist beendet, wenn der pH-Wert 15 min bei einem Wert von 8 bis 9 konstant bleibt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der entstandene Rückstand wird in 1.5 M Salzsäure aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird ein farbloser Feststoff erhalten, der säulenchromatographisch (Petrolether : Essigester 2:1, $R_f = 0.58$) gereinigt wird.

Ausbeute: 2.40 g (6.8 mmol, 37 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$.

Molmasse: 351.41 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 1.42 – 1.69 (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$), 1.84 - 1.91 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH-COO}$), 2.59 (m, 1H, CH-NH), 4.02 (m, 1H, CH-COO), 4.20 (m, 1H, FluorenylCH), 4.25 – 4.28 (m, 2H, Fluorenyl- CH_2), 7.30 – 7.88 (m, 8H, CH_{arom}).

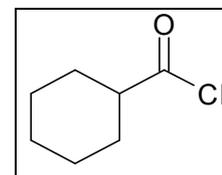
$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 22.9, 28.5, 32.6 (s, CH_2), 46.7 (t, CH-COO), 49.5 (t, FluorenylCH), 55.4 (t, CH-N), 65.2 (s, Fluorenyl- CH_2), 120.0, 120.1, 121.4, 125.2, 127.0, 127.3, 127.6, 128.9 (t, CH_{arom}), 137.4, 139.4, 140.7, 143.9 (q, C_{arom}), 155.5 (q, N-COO), 176.2

(q, COOH).

MS (ESI): 374.2 ($M^+ + Na$).

IR (KBr): 3324 s, 2960 s, 1693 s, 1540 s, 1450 m, 1261 m, 736 s.

6.3.3 (1R,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²



Cyclohexancarbonsäurechlorid²⁵⁴

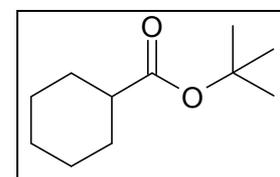
Zu 58.9 g (460 mmol) Cyclohexancarbonsäure werden 75.0 g (630 mmol) Thionylchlorid getropft. Es wird drei Stunden auf 75 °C erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Wasserstrahlvakuum entfernt. Fraktionierte Destillation unter vermindertem Druck ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 61.4 g (420 mmol, 91 % d. Th.; Lit.²⁵⁴: 88.5 % d. Th.).

Summenformel: C₇H₁₁OCl.

Molmasse: 146.62 g/mol.

Siedepunkt: 90 °C (50 mbar) (Lit.²⁵⁴: 99 – 101 °C (65 mbar)).



Cyclohexancarbonsäure-tert-butylester²⁵⁵

124 g (1.67 mol) *tert*-Butanol werden in 200 ml Pyridin gelöst. Unter Eiskühlung werden 61.4 g (420 mmol) Cyclohexancarbonsäurechlorid zugetropft. Es wird eine Stunde bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt. Die Lösung wird in 400 ml Eiswasser gegossen und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 5 gebracht. Der abgeschiedene ölige Film wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Destillation ergibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 70.4 g (383 mmol, 91 % d. Th.).

Summenformel: C₁₁H₂₀O₂.

Molmasse: 184.28 g/mol.

Siedepunkt: 75 °C (4.4 mbar) (Lit.²⁸⁹: 82.5 – 85.5 °C (15 mbar)).

IR (Film): 2975 m (CH), 2993 s (CH), 2856 m, 1727 vs (CO), 1452 m, 1367 m, 1249 m, 1155 s, 1027 w, 852 w.

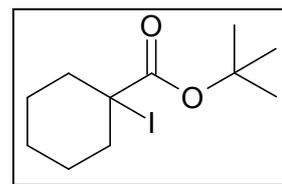
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.21 – 1.28 (m, 3H), 1.37 – 1.44 (m, 2H), 1.43 (s, 9H),

$\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 1.59 – 1.64 (m, 1H), 1.71 – 1.76 (m, 2H), 1.84 – 1.88 (m, 2H), 2.17 (m, 1H, CH-COO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 25.5 (s), 25.9 (s), 28.1 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.1 (s), 44.2 (t), 79.5 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 175.6 (q, COO).

MS: 185 (M^+ , 0.5%), 169 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 1%), 129 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, 22%), 111 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, 23%), 83 ($\text{C}_6\text{H}_{11}^+$, 41%), 57 (C_4H_9^+ , 100%).

GC: t_R 9.56 min.



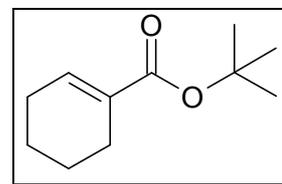
1-Iod-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester³²

Zu einer Lösung von 22.7 g (212 mmol) Lithiumdiisopropylamid in 200 ml THF werden bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 25.8 g (140 mmol) Cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester in 20 ml THF durch eine Kanüle zugetropft. Nach 60 min Rühren wird die Reaktionsmischung in eine Lösung von 61.0 g (240 mmol) Iod in 200 ml THF, gekühlt auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$, gegeben. Nach 30 min Rühren werden 40.0 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und die Lösung innerhalb von 60 min auf Raumtemperatur aufgewärmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird in Natriumthiosulfatlösung aufgenommen und mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird ein gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (roh): 40.3 g (130 mmol, 93 % d. Th.).

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{I}$.

Molmasse: 310.18 g/mol.



1-Cyclohexencarbonsäure-*tert*-butylester³²

22.5 g (150 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 30 ml THF werden unter Eiskühlung zu einer Lösung von 29.1 g (94 mmol) 1-Iod-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester in 200 ml THF innerhalb von 30 min zugetropft. Es wird eine Stunde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ und 48 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt, zur Trockne eingengt, in Wasser aufgenommen und mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Säulenchromatographische Reinigung (Petrolether/Diethylether, 100 : 1; $R_f = 0.53$) ergibt ein farbloses Öl, Gemisch mit

Edukt etwa 4 : 1.

Ausbeute: 21.4 g (118 mmol, davon etwa 80 % ungesättigter Ester (GC), entsprechend 96 mmol, 64 % d. Th.; Lit.³²: 30 % d. Th. ausgehend vom gesättigten Ester).

Summenformel: C₁₁H₁₈O₂.

Molmasse: 182.26 g/mol.

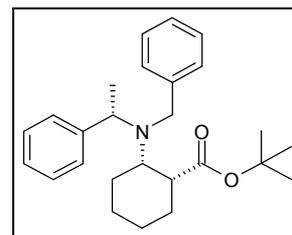
IR (Film): 3021 w (=CH), 2975 m (CH), 2933 s (CH), 2858 m, 1725 s, 1706 vs (CO), 1654 m, 1450 m, 1367 m 1280 s, 1251 s, 1168 vs, 1085 m, 1043 m.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 1H), 1.22 – 1.37 (m, 2H), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.56 – 1.74 (m, 4H), 7.26 (m, 1H, =CH).

¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃): 22.3 (s), 24.2 (s), 25.5 (s), 28.2 (p, C(CH₃)₃), 29.1 (s), 79.7 (q, C(CH₃)₃), 131.9 (q, =C-COO), 138.3 (t, -CH=), 167.0 (q, COO).

MS: 181 (M⁺, 1%), 127 (M⁺ – C₄H₈, 91%), 109 (M⁺ – C₄H₈O, 40%), 81 (C₆H₉⁺, 100%).

GC: t_R 10.43 min.



**(aS,1R,2S)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-
cyclohexancarbonsäure-tert-butylester**³²

0.68 g (3.2 mmol) (*S*)-*N*-Benzyl-1-phenylethylamin werden in 8 ml THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 3.0 mmol einer 1.6 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan werden zugegeben. Es wird 15 min bei 0 °C gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Zu der tiefroten Lösung werden 0.36 g (2.0 mmol) 1-Cyclohexencarbonsäure-*tert*-butylester in 2 ml THF durch eine Kanüle zutropft. Die Lösung färbt sich orange. Es wird eine Stunde bei -78 °C, zweieinhalb Stunden bei -30 °C und erneut eine Stunde bei -78 °C gerührt. Zugabe von 1.24 g (6.0 mmol) 2,6-Di-*tert*-butylphenol in 2 ml THF führt zur Gelb-Färbung der Lösung. Innerhalb von einer Stunde wird die Lösung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das Lösungsmittel wird entfernt, das entstandene Öl wird in 50 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das entstandene Öl wird säulenchromatographisch (Petrolether/Diethylether 30 : 1; R_f = 0.07) gereinigt. Nach Umkristallisation aus Methanol werden lange Nadeln eines farbloser Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 400 mg (1.01 mmol, 50 % d. Th.; Lit.³²: 70 % d. Th.).

Summenformel: C₂₆H₃₅O₂N.

Molmasse: 393.57 g/mol.

Schmelzpunkt: 60 – 61 °C (Lit.³²: 59 – 60 °C).

IR (KBr): 3085 w, 3058 m, 3023 m, 2969 vs, 2935 vs, 2850 vs, 1716 vs, 1600 w, 1492 s, 1450 s, 1369 s, 1257 m, 1238 m, 1153 vs, 1126 vs, 198 m, 748 m, 698 s.

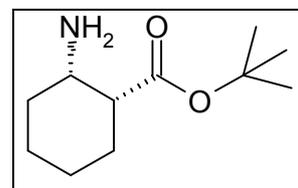
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.30 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.14 – 1.38, 1.47 – 1.83 (m, 8H, (CH₂)₄), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.45 (m, 1H, CH-COO), 2.63 (m, CHN), 3.84, 4.03 (AB-System, J_{AB} = 17.7 Hz, 2H, N-CH₂-C_{arom}), 4.03 (q, J = 6.8 Hz, 1H, -CH(CH₃-), 7.61 – 7.46 (m, 10H, arom.).

¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃): 14.4 (p, CH₃), 25.5, 26.5, 29.1, 29.5 (s, (CH₂)₃), 28.1 (p, C(CH₃)₃), 46.0 (t, CHCOO), 51.2 (s, CH₂N), 56.5 (t, CHN), 58.6 (t, CHN), 79.8 (q, C(CH₃)₃), 126.3, 126.4, 127.9, 128.0, 128.3, 129.0 (t, CH_{arom}), 142.7, 144.7 (q, C_{arom}), 175.1 (q, -COO-).

MS: 393 (M⁺, 43%), 378 (M⁺ – CH₃, 6%), 322 (M⁺ – CH₃ – ^tBu, 7%), 302 (M⁺ – C₇H₇, 9%), 288 (M⁺ – C₈H₉, 10%), 250 (PhCH(CH₃)N(CH₂Ph)(C₃H₅)⁺, 59%), 246 (322 – ^tBu, 27%), 232 (288 – ^tBu, 40%), 216 (288 – O^tBu, 13%), 146 (C₇H₇NC₃H₅⁺, 58%), 105 (C₈H₉⁺ und C₇H₇N⁺, 100%), 91 (C₇H₇⁺, 84%).

GC: t_R 24.61 min.

Drehwert (c = 1.0, CHCl₃): [α]_D²⁵ = -90.6.



(1R,2S)-2-Amino-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester³²

280 mg (0.70 mmol) (*aS,1R,2S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester werden mit 30 Gewichtsprozent (90 mg) Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 15 ml Essigsäure 18 Stunden bei einem Wasserstoffdruck von 4.0 bar und 50 °C hydriert. Die Reaktionsmischung wird durch eine D4-Filterfritte über Kieselgel abgesaugt. Der Katalysator wird mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der entstandene Feststoff wird in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, mit etherischer HCl versetzt und das Lösungsmittel wird entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 100 mg (0.50 mmol, 71 % d. Th. Lit.³²: 71 % d. Th (als Hydrochlorid)).

Summenformel: C₁₁H₂₁O₂N.

Molmasse: 199.30 g/mol.

Schmelzpunkt: 75 – 76 °C (nicht literaturbekannt).

IR (KBr): 3486 br, s, 2958 s, 2935 s, 2861 s, 1720 vs, 1558 s, 196 s, 1369 s, 1153 vs, 1045 vs, 856 s, 651 vs, 620 s, 439 s.

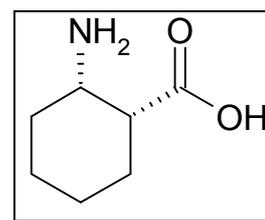
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.39 – 1.98 (m, 8H, -(CH₂)₄-), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.63 – 2.65 (m, 1H, CH-COO), 3.27 – 3.30 (m, 1H, CHN), 5.52- 5.58 (m, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 21.9, 23.5, 25.2, 30.8 (s, CH₂), 27.9 (p, C(CH₃)₃), 45.9 (t, CHN), 49.1 (t, CHCO), 81.0 (q, C(CH₃)₃), 173.8 (q, COO).

MS: 199 (M⁺, 3%), 142 (M⁺ - ^tBu, 62%), 126 (M⁺ - O^tBu, 26%), 98 (M⁺ - COO^tBu, 8%), 56 (^tBu⁺, 100%).

GC: t_R 11.35 min.

GC-MS (Zwischenprodukte): t_R 16.47 min (EI: m/z 304 (M⁺ + H, 2-((S)-N-1-Phenylethylamino)-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester); t_R 16.68 min (EI: m/z 290 (M⁺ + H, 2-((S)-N-Benzylamino)-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester)



(1R,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²

500 mg (2.5 mmol) (1R,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester werden in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst und bis zum Ende der Gasentwicklung gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das entstandene Öl wird drei Mal mit methanolischer HCl (50 ml) versetzt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 480 mg (179 mmol; 71 % d. Th.)

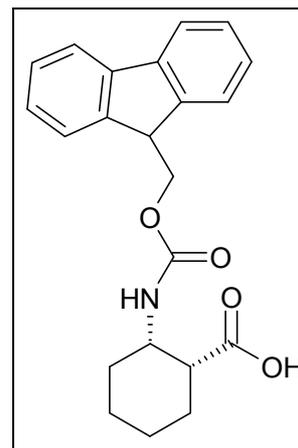
Summenformel: C₇H₁₃O₂N.

Molmasse: 257.21 g/mol.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): 0.80 – 0.92 (m, 2H, -CH₂-), 1.10 – 1.90 (m, 7H, (CH₂)₃, CH(COO)), 2.09 (m, 1H, CH-NH₂).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO): 22.1, 24.2, 25.5, 29.5 (s, CH₂), 47.3 (t, CH-COOH), 49.9 (t, CH-NH₂), 179.0 (q, COOH).

Drehwert (c = 0.6, CH₃OH): [α]_D²⁵ = -1.20.



(1R,2S)-Fmoc-2-Aminocyclohexancarbonsäure²⁸⁸

6.60 g (26.0 mmol) (1R,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure werden in 30.0 ml Wasser aufgenommen und mit Triethylamin auf einen pH-Wert von etwa 8 bis 9 gebracht. Eine Lösung von 8.10 g (24.0 mmol) 9-Fluorenylmethyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonat in 25.0 ml Acetonitril wird zugegeben. Der pH-Wert wird mit Triethylamin auf 8 bis 9 gebracht und ggf. durch weitere Zugabe von Triethylamin dort gehalten. Die Reaktion ist beendet, wenn der pH-Wert 15 min bei einem Wert von 8 bis 9 konstant bleibt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der entstandene Rückstand wird in 1.5 M Salzsäure aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der entstandene Feststoff wird aus kaltem Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3.80 g (10.4 mmol, 43 % d. Th.).

Summenformel: C₂₂H₂₃O₄N.

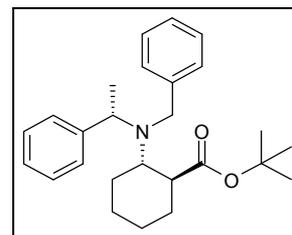
Molmasse: 365.43 g/mol.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.80 – 0.92 (m, 2H, -CH₂-), 1.10 – 1.90 (m, 7H, (CH₂)₃, CH(COO)), 2.09 (m, 1H, CH-NH), 4.21 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, FluorenCH), 4.36 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, Fluoren-CH₂), 5.61 (m, 1H, NH), 7.30 – 7.74 (m, 8H, arom).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 22.3, 24.0, 25.4, 29.6 (s, CH₂), 44.4 (t, FluorenCH), 47.2 (t, CH-COOH), 49.7 (t, CH-NH), 66.8 (s, Fluorenyl-CH₂), 119.9, 125.1, 127.0, 127.4 (t, CH_{arom}), 142.4, 144.0 (q, C_{arom}), 155.8 (q, NH-CO-O), 179.0 (q, COOH).

IR (KBr): 3417 br, 3332 br, 3070 m, 2931 s, 2858 m, 1708 vs, 1511 s, 1450 s, 1338 m, 1249 s, 1222 s, 1103 s, 1045 s, 740 s.

6.3.4 (1*S*,2*S*)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²



(aS,1*S*,2*S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester³²

Eine Lösung aus 2.44 g (33 mmol) *tert*-Butanol in 60 ml THF wird auf 0 °C gekühlt. 30 ml einer 0.5 M Lösung (15 mmol) von KHMDS in Toluol werden zugetropft. Nach 15 min Rühren wird eine Lösung aus 1.48 g (3.9 mmol) 2-((*aS*,1*R*,2*S*)-N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester in 15 ml THF zugegeben. Die Reaktion wird 6 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in gesättigter Natriumchloridlösung aufgenommen, mit *tert*-Butyl-methylether extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das entstandene Öl säulenchromatographisch (Petrolether : Diethylether 30 : 1; $R_f = 0.30$) gereinigt. Es wird ein farbloses Öl erhalten.

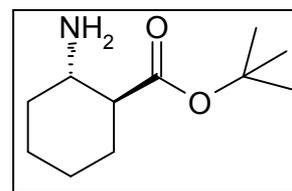
Ausbeute: 1.14 g (2.9 mmol, 74 % d. Th.; Lit.³²: 78 % d. Th.).

Summenformel: C₂₆H₃₅O₂N.

Molmasse: 393.57 g/mol.

IR (KBr): 3065 m, 3019 m, 2972 vs, 2942 vs, 1718 vs, 1486 s, 1450 s, 1369 s.

Drehwert (c 1.05 in CHCl₃): $[\alpha]_D^{25} +29.4$ (Lit.³²: (c 1.00 in CHCl₃) +30.4).



(1*S*,2*S*)-2-Amino-cyclohexancarbonsäure-tert-butylester³²

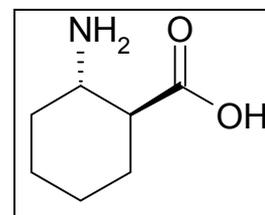
600 mg (1.5 mmol) (*aS*,1*S*,2*S*)-2-(N-Benzyl-N-1-phenylethylamino)-cyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester werden mit 30 Gewichtsprozent (200 mg) Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 20 ml Essigsäure 18 Stunden bei einem Wasserstoffdruck von 4.0 bar und 50 °C hydriert. Die Reaktionsmischung wird durch eine D4-Filterfritte über Kieselgel abgesaugt. Der Katalysator wird mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der entstandene Feststoff wird in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, mit etherischer HCl versetzt und das Lösungsmittel wird entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 295 mg (1.5 mmol, 100 % d. Th.).

Summenformel: C₁₁H₂₁O₂N.

Molmasse: 199.30 g/mol.

Schmelzpunkt: 72 – 74 °C (nicht literaturbekannt).



(1S,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure³²

295 mg (1.5 mmol) (1S,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure-*tert*-butylester werden in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst und bis zum Ende der Gasentwicklung gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das entstandene Öl wird drei Mal mit methanolischer HCl (50 ml) versetzt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute: 180 mg (0.70 mmol; 47 % d. Th.; Lit.³² 52 % d. Th.)

Summenformel: C₇H₁₃O₂N.

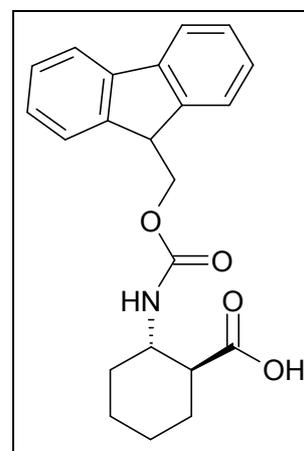
Molmasse: 257.21 g/mol.

Schmelzpunkt: 180 °C (Zers.).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO): 0.80 – 0.92 (m, 2H, -CH₂-), 1.10 – 1.87 (m, 7H, (CH₂)₃, CH(COO)), 2.24 (m, 1H, CH-NH₂)

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO): 24.9, 25.2, 28.9, 32.1 (s, CH₂), 48.4 (t, CH-COOH), 50.8 (t, CH-NH), 175.4 (q, COOH).

Drehwert (c = 1.20, H₂O): [α]_D²⁵ = +47.0.



(1S,2S)-Fmoc-2-Aminocyclohexancarbonsäure²⁸⁸

0.50 g (3.5 mmol) (1S,2S)-2-Aminocyclohexancarbonsäure werden in 5 ml Wasser aufgenommen und mit Triethylamin auf einen pH-Wert von etwa 8 bis 9 gebracht. Eine

Lösung von 1.18 g (3.5 mmol) 9-Fluorenylmethyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonat in 6 ml Acetonitril wird zugegeben. Der pH-Wert wird mit Triethylamin auf 8 bis 9 gebracht und ggf. durch weitere Zugabe von Triethylamin dort gehalten. Die Reaktion ist beendet, wenn der pH-Wert 15 min bei einem Wert von 8 bis 9 konstant bleibt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der entstandene Rückstand wird in 1.5 M Salzsäure aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der entstandene Feststoff wird aus kaltem Ethanol umkristallisiert. Der ausgefallene Feststoff wird abgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.10 g (3.01 mmol, 86 % d. Th.)

Summenformel: C₂₂H₂₃O₄N.

Molmasse: 365.43 g/mol.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.80 – 0.92 (m, 2H, -CH₂-), 1.10 – 1.87 (m, 7H, (CH₂)₃, CH(COO)), 2.24 (m, 1H, CH-NH), 4.21 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, FluorenCH), 4.23 (d, ³J = 5.3 Hz, 2H, Fluoren-CH₂), 7.31 – 7.87 (m, 8H, arom).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 24.8, 25.2, 28.8, 32.2 (s, CH₂), 46.7 (t, FluorenCH), 48.4 (t, CH-COOH), 50.8 (t, CH-NH), 65.2 (s, Fluoren-CH₂), 120.1, 125.3, 127.1, 127.6 (t, CH_{arom}), 143.8, 144.0 (q, C_{arom}), 155.2 (q, NH-CO-O), 175.4 (q, COOH).

IR (KBr): 3307 s, 3043 m, 2935 m, 2856 m, 1705 s, 1693 s, 1533 s, 1236 m, 740 m.

6.4 Peptidsynthese –Allgemeine Arbeitsbeschreibung

6.4.1 Beladung des 2-Chlortritylharzes

Zu einer bestimmten Menge 2-Chlortritylharz werden 2 Äquivalente (bezogen auf die theoretische Beladung) Fmoc-geschützte Aminosäure in 10 ml trockenem Dichlormethan / g Fmoc-AS gegeben. 1 Äquivalent DIPEA (bezogen auf die Aminosäure) wird zugegeben und die Mischung 5 min geschüttelt. Nach Zugabe weiterer 1.5 Äquivalente DIPEA wird 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Cappen freier Bindungsstellen am Harz wird Methanol (0.8 ml / g Harz) zugegeben und es wird erneut 15 min geschüttelt. Das Harz wird in eine Spritze mit Fritte überführt und filtriert. Das Harz wird je drei Mal mit CH₂Cl₂, DMF und Methanol (je 10 ml / g Harz) gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

6.4.2 Spektralphotometrische Beladungsbestimmung

Grundlage für die Beladungsbestimmung ist der Absorptionswert bei 290 nm, an dem das Piperidin-Dibenzofulven-Addukt sein Absorptionsmaximum hat. Dieses Addukt wird gebildet, wenn Fmoc vom N-Terminus der Aminosäure mit Piperidin abgespalten wird und dabei Dibenzofulven entsteht. Die Beladung wird anhand einer Korrelationstabelle ermittelt. Zwei Küvetten werden zunächst mit Abspalllösung (20 % Piperidin in DMF) gefüllt. Eine der Küvetten dient als Blindprobe zur Einstellung der Basislinie des UV-Spektrometers. In die andere Küvette werden 1.0 mg des beladenen Harzes eingewogen, die Suspension wird gründlich durchmischt und vollständiges Absetzen des Harzes wird abgewartet. Der aufgenommene Messwert wird entsprechend Gleichung (26) umgerechnet:

$$\frac{\text{Absorption}}{\text{Einwaage[mg]} * 1.65} = \text{Beladung[mmol / g]} \quad (29)$$

6.4.3 Manuelle Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Das Harz wird in einer Spritze mit Fritte mit 2 % Piperidin, 2 % DBU in DMF 5 min gerührt; es wird neue Lösung zugegeben und erneut 15 min rühren. Das Harz wird je drei Mal mit CH₂Cl₂, DMF und Methanol (je 10 ml / g Harz) gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

6.4.4 Synthese des linearen Peptids

Die Synthese der Peptide erfolgt mit Hilfe eines Syntheseautomaten durch cyclische Wiederholung des folgenden Standardsyntheseprotokolls.

- Abspalten der temporären Schutzgruppe

- Waschen nach Schutzgruppenabspaltung
- Kupplung der neuen Fmoc-geschützten Aminosäure
- Waschen nach der Kupplung

Vor Beginn der Synthese wird ein Quellschritt des mit der ersten Aminosäure beladenen Harzes durchgeführt.

Dieser Cyclus wird wiederholt, bis die N-terminale, Fmoc-geschützte Aminosäure angekuppelt wurde. Anschließend wird die temporäre Schutzgruppe entfernt, das Harz wird in eine Spritze mit Fritte überführt und mit Dichlormethan gewaschen.

Die einzelnen Schritte der Synthese werden im folgenden beschrieben:

6.4.4.1 Quellen des Harzes

Es werden 4 ml DMF in die Reaktionskammer pipettiert und insgesamt 30 min stehen gelassen, wobei alle 10 min leicht gemischt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt.

6.4.4.2 Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe

4 ml einer Lösung aus 2 % Piperidin und 2 % DBU in DMF werden in die Reaktionskammer pipettiert, 3 min gemischt und nach 5 min abfiltriert. Diese Prozedur wird drei Mal wiederholt.

6.4.4.3 Waschen nach Schutzgruppenabspaltung

4 ml DMF werden in die Reaktionskammern gegeben, 3 min gemischt und nach 5 min abfiltriert. Diese Prozedur wird sechs Mal wiederholt.

6.4.4.4 Kupplung der neuen Fmoc-geschützten Aminosäure

Es wird die Methode der Doppelkupplung angewandt, d. h. es werden zwei Mal je 1.5 Äquivalente Aminosäure zugegeben.

Zunächst werden 0.5 ml DMF in die Reaktionskammer pipettiert und 3 min gemischt. Dies dient dazu, den Siphon des Abflusses der Kammer zu füllen. Dann werden 1.5 Äquivalente Aminosäure ($c = 0.3 \text{ M}$ in DMF), 1.5 Äquivalente TBTU ($c = 0.3 \text{ M}$ in DMF) und 3 Äquivalente DIPEA ($c = 0.6 \text{ M}$ in DMF) in die Reaktionskammern pipettiert. Es wird insgesamt sieben Mal abwechselnd je 3 min gerührt und 3 min gewartet. Die Lösung wird abfiltriert, anschließend wird die gesamte Kupplungsprozedur wiederholt.

6.4.4.5 Waschen nach der Kupplung

Es werden insgesamt vier Mal je 4 ml DMF in das Reaktionsgefäß pipettiert, 3 min gemischt und nach 5 min abfiltriert.

6.4.5 Abspalten vom Harz

In einen Kolben werden ca. 2 ml Pyridin vorgelegt. Das Harz wird in eine Spritze mit Fritte überführt und darüber befestigt. Das Harz wird zehn Mal mit ca. 10 ml TFA (1 % in CH₂Cl₂) je 5 min behandelt, dann wird abfiltriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, das entstandene Produkt durch RP-Säulenchromatographie oder HPLC gereinigt. Der erfolgreiche Versuchsablauf wird durch MALDI-ToF Massenspektrometrie dokumentiert.

6.4.6 Cyclisierung

In einen 100-ml-Dreihalkolben werden ca. 20 ml DMF, 0.1 Äquivalent HATU und drei Äquivalente DIPEA vorgelegt. In einer Zweikanalspritzenpumpe werden jeweils 3 Äquivalente HATU und die Aminosäure in denselben Volumina DMF (ca. 10 mL/100 µmol Peptid) vorgelegt. Die Lösungen werden mit einer Tropfgeschwindigkeit von 0.01 – 0.02 ml / Minute zugegeben.

Nach beendeter Zugabe wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in kaltem Diethylether aufgenommen, dekantiert und das Lösungsmittel bei 0 °C und 4000 min⁻¹ zentrifugiert und erneut dekantiert. Die vereinigten Rückstände werden in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das entstandene Produkt wird durch RP-Säulenchromatographie oder HPLC gereinigt. Der erfolgreiche Versuchsablauf wird durch MALDI-ToF Massenspektrometrie dokumentiert.

6.4.7 Abspalten der permanenten Schutzgruppen

Zum Peptid werden ca. 10 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser gegeben. Nach 3 - 15 Stunden (MALDI-ToF MS-Kontrolle) wird die Abspaltlösung i. Vak. entfernt. Das entstandene Produkt wird durch HPLC gereinigt. Der erfolgreiche Versuchsablauf wird durch MALDI-ToF Massenspektrometrie dokumentiert.

6.5 Peptidsynthese – MALDI-ToF MS, HPLC, Ausbeuten

6.5.1 C-terminale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1 - Hexapeptide

6.5.1.1 c-(–Ser–^cACPC–Leu–Asn–Ile–Asp–) P1

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	654.34	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	654.48
	[M + Na] ⁺ :	676.33		[M + Na] ⁺ :	676.54
	[M + K] ⁺ :	692.30		[M + K] ⁺ :	692.48

HPLC: t_R = 19.6 min. Ausbeute: 4 %.

6.5.1.2 c-(–Ser–^tACPC–Leu–Asn–Ile–Asp–) P2

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	654.34	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	654.05
	[M + Na] ⁺ :	676.33		[M + Na] ⁺ :	676.03
	[M + K] ⁺ :	692.30		[M + K] ⁺ :	692.02

HPLC: t_R = 19.3 min Ausbeute: 25 %.

6.5.1.3 c-(–Ser–^cAHC–Leu–Asn–Ile–Asp–) P3

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	668.35	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	672.06
	[M + Na] ⁺ :	690.34		[M + Na] ⁺ :	690.13
	[M + K] ⁺ :	706.31		[M + K] ⁺ :	706.26

HPLC: t_R = 19.8 min. Ausbeute: 10 %.

6.5.1.4 c-(–Ser–^tAHC–Leu–Asn–Ile–Asp–) P4

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	668.35	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	668.76
	[M + Na] ⁺ :	690.34		[M + Na] ⁺ :	690.70
	[M + K] ⁺ :	706.31		[M + K] ⁺ :	706.77

HPLC: t_R = 18.5 min. Ausbeute: 6 %.

6.5.1.5 c-(–Ser–Pro–Leu–Asn–(R)–AMBS–Asp–) P5

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	626.31	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	626.30
	[M + Na] ⁺ :	648.30		[M + Na] ⁺ :	648.36
	[M + K] ⁺ :	664.27		[M + K] ⁺ :	664.25

HPLC: t_R = 15.3 min. Ausbeute: 34 %.

6.5.1.6 c-(–Ser–Pro–Leu–Asn–(S)–AMBS–Asp–) P6

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	626.31	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	626.24
	[M + Na] ⁺ :	648.30		[M + Na] ⁺ :	648.25
	[M + K] ⁺ :	664.27		[M + K] ⁺ :	664.30

HPLC: t_R = 16.4 min. Ausbeute: 9 %.

6.5.2 C-terminale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1 - Pentapeptide

6.5.2.1 c-(–Ser–^cACPC–Leu–Asn–Asp–) P7

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	541.26	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	541.20
	[M + Na] ⁺ :	563.25		[M + Na] ⁺ :	563.38
	[M + K] ⁺ :	579.22		[M + K] ⁺ :	579.28

HPLC: t_R = 16.4 min. Ausbeute: 4 %.

6.5.2.2 c-(–Ser–^tACPC–Leu–Asn–Asp–) P8

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	541.26	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	541.24
	[M + Na] ⁺ :	563.25		[M + Na] ⁺ :	563.24
	[M + K] ⁺ :	579.22		[M + K] ⁺ :	579.21

HPLC: t_R = 16.3 min Ausbeute: 5 %.

6.5.2.3 c-(–Ser–^cAHC–Leu–Asn–Asp–) P9

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	555.27	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	555.13
	[M + Na] ⁺ :	577.26		[M + Na] ⁺ :	577.28
	[M + K] ⁺ :	593.23		[M + K] ⁺ :	593.20

HPLC: t_R = 16.4 min. Ausbeute: 7 %.

6.5.2.4 c-(–Ser–^tAHC–Leu–Asn–Asp–) P10

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	555.27	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	555.13
	[M + Na] ⁺ :	577.26		[M + Na] ⁺ :	577.22
	[M + K] ⁺ :	593.23		[M + K] ⁺ :	593.23

HPLC: t_R = 16.5 min. Ausbeute: 5 %.

6.5.3 Zentrale Sequenzen des Bindungsepitops von VCAM-1

6.5.3.1 c-(–Ser–^cACPC–Gln–Ile–Asp–) P11

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	555.28	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	555.22
------------	------------------------	--------	-----------	------------------------	--------

	[M + Na] ⁺ :	577.26		[M + Na] ⁺ :	577.20
	[M + K] ⁺ :	593.23		[M + K] ⁺ :	593.23
HPLC:	t _R = 14.0 min.		Ausbeute:	14 %.	
6.5.3.2	c-(–Ser-^fACPC–Gln–Ile–Asp–) P12				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	555.28	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	555.21
	[M + Na] ⁺ :	577.26		[M + Na] ⁺ :	577.18
	[M + K] ⁺ :	593.23		[M + K] ⁺ :	593.14
HPLC:	t _R = 14.1 min		Ausbeute:	<1 %.	
6.5.3.3	c-(–Ser-^cACHC–Gln–Ile–Asp–) P13				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	569.29	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	569.03
	[M + Na] ⁺ :	591.28		[M + Na] ⁺ :	590.78
	[M + K] ⁺ :	607.25		[M + K] ⁺ :	607.08
HPLC:	t _R = 15.3 min.		Ausbeute:	28 %.	
6.5.3.4	c-(–Ser-^fACHC–Gln–Ile–Asp–) P14				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	569.29	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	-
	[M + Na] ⁺ :	591.28		[M + Na] ⁺ :	591.46
	[M + K] ⁺ :	607.25		[M + K] ⁺ :	607.43
HPLC:	t _R = 15.5 min.		Ausbeute:	9 %.	
6.5.3.5	c-(–Ser–Pro–Gln–(R)–AMBS–Asp–) P15				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	527.25	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	527.43
	[M + Na] ⁺ :	549.23		[M + Na] ⁺ :	549.33
	[M + K] ⁺ :	565.20		[M + K] ⁺ :	565.27
HPLC:	t _R = -		Ausbeute:	-.	
6.5.3.6	c-(–Ser–Pro–Gln–(S)–AMBS–Asp–) P16				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	527.25	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	527.31
	[M + Na] ⁺ :	549.23		[M + Na] ⁺ :	549.30
	[M + K] ⁺ :	565.20		[M + K] ⁺ :	565.28
HPLC:	t _R = -		Ausbeute:	-.	
6.5.4	N-terminale Sequenzen des Bindungs epitops von VCAM-1				
6.5.4.1	c-(–Ser-^cACPC–Thr–Gln–Ile–Asp–) P17				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	656.33	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	-
	[M + Na] ⁺ :	678.31		[M + Na] ⁺ :	678.81
	[M + K] ⁺ :	694.28		[M + K] ⁺ :	694.81
HPLC:	t _R = 12.1 min.		Ausbeute:	<1 %.	
6.5.4.2	c-(–Ser-^fACPC–Thr–Gln–Ile–Asp–) P18				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	656.33	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	656.45
	[M + Na] ⁺ :	678.31		[M + Na] ⁺ :	678.41
	[M + K] ⁺ :	694.28		[M + K] ⁺ :	694.56
HPLC:	t _R = 12.2 min		Ausbeute:	<1 %.	
6.5.4.3	c-(–Ser-^cACHC–Thr–Gln–Ile–Asp–) P19				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	670.33	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	669.99
	[M + Na] ⁺ :	692.32		[M + Na] ⁺ :	692.15
	[M + K] ⁺ :	708.29		[M + K] ⁺ :	708.24
HPLC:	t _R = 16.8 min.		Ausbeute:	13 %.	
6.5.4.4	c-(–Ser-^fACHC–Thr–Gln–Ile–Asp–) P20				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	670.33	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	670.24
	[M + Na] ⁺ :	692.32		[M + Na] ⁺ :	692.13
	[M + K] ⁺ :	708.29		[M + K] ⁺ :	708.18
HPLC:	t _R = 12.8 min.		Ausbeute:	<1 %.	
6.5.4.5	c-(–Ser–Pro–Thr–Gln–(R)–AMBS–Asp–) P21				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	628.29	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	-
	[M + Na] ⁺ :	650.28		[M + Na] ⁺ :	650.71
	[M + K] ⁺ :	666.25		[M + K] ⁺ :	666.61
HPLC:	t _R = 13.3 min.		Ausbeute:	<1 %.	
6.5.4.6	c-(–Ser–Pro–Thr–Gln–(S)–AMBS–Asp–) P22				
Berechnet:	[M + H] ⁺ :	628.29	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	628.29
	[M + Na] ⁺ :	650.28		[M + Na] ⁺ :	650.28
	[M + K] ⁺ :	666.25		[M + K] ⁺ :	666.28
HPLC:	t _R = 12.1 min.		Ausbeute:	17 %.	

6.5.5 Peptide mit dem Bindungsepitop von mADAM 8**6.5.5.1 H-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-OH KDK1**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	746.45	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	746.27
	[M + Na] ⁺ :	768.44		[M + Na] ⁺ :	768.24
	[M + K] ⁺ :	784.41		[M + K] ⁺ :	784.20

HPLC: t_R = 7.7 min. Ausbeute: 19 %.**6.5.5.2 c-(D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK2**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	728.44	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	728.11
	[M + Na] ⁺ :	750.43		[M + Na] ⁺ :	750.07
	[M + K] ⁺ :	766.40		[M + K] ⁺ :	766.01

HPLC: t_R = 11.4 min. Ausbeute: 11 %.**6.5.5.3 c-(Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK3**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	728.44	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	728.23
	[M + Na] ⁺ :	750.43		[M + Na] ⁺ :	750.19
	[M + K] ⁺ :	766.40		[M + K] ⁺ :	766.16

HPLC: t_R = 11.9 min. Ausbeute: 3 %.**6.5.5.4 c-(Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-) KDK4**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	728.44	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	728.20
	[M + Na] ⁺ :	750.43		[M + Na] ⁺ :	750.22
	[M + K] ⁺ :	766.40		[M + K] ⁺ :	766.14

HPLC: t_R = 12.6 min. Ausbeute: 3 %.**6.5.5.5 c-(D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Lys-) KDK5**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	671.39	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	671.09
	[M + Na] ⁺ :	693.38		[M + Na] ⁺ :	693.06
	[M + K] ⁺ :	700.35		[M + K] ⁺ :	-

HPLC: t_R = 12.2 min. Ausbeute: 5 %.**6.5.5.6 c-(D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Ala-) KDK6**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	671.39	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	671.27
	[M + Na] ⁺ :	693.38		[M + Na] ⁺ :	693.22
	[M + K] ⁺ :	700.35		[M + K] ⁺ :	-

HPLC: t_R = 12.1 min. Ausbeute: 7 %.**6.5.5.7 c-(D-Arg-Leu-Ser-Ala-Asp-Ala-) KDK7**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	614.33	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	614.39
	[M + Na] ⁺ :	636.32		[M + Na] ⁺ :	636.39
	[M + K] ⁺ :	652.29		[M + K] ⁺ :	652.35

HPLC: t_R = 11.8 min. Ausbeute: 2.5 %.**6.5.5.8 c-(D-Arg-Leu-Ser-Lys-Ala-Lys-) KDK8**

Berechnet:	[M + H] ⁺ :	684.44	Gefunden:	[M + H] ⁺ :	684.47
	[M + Na] ⁺ :	706.43		[M + Na] ⁺ :	706.56
	[M + K] ⁺ :	722.40		[M + K] ⁺ :	722.64

HPLC: t_R = 12.4 min. Ausbeute: 15 %.

7 Anhang

7.1 NMR-spektroskopische Messungen

Die NMR-Messungen der Peptide wurden an einem Gerät der Firma Bruker (Avance 600) bei 300 K in DMSO-D₆ durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der gelösten Peptide lag zwischen 4 bis 8 mmol/l.

Alle Proben wurden in mehreren Zyklen im Hochvakuum wechselweise eingefroren und entgast sowie abschließend abgeschmolzen. Die Aufnahme der temperaturabhängigen Protonenspektren erfolgte in einem Temperaturbereich von 300 K bis 330 K in Schritten von 5 K. Zur Referenzierung diente das Lösungsmittelsignal des DMSO (¹H: 2.50 ppm; ¹³C: 40.8 ppm).

Die Prozessierung der Daten wurde mit den Programmen XWIN-NMR und WIN-NMR der Fa. Bruker vorgenommen. Zur Ermittlung der Protonenabstände aus den Volumina der Kreuzsignale der ROESY-Spektren diente das Programm XWIN-NMR (Fa. Bruker).

Zur Konformationsanalyse der Peptide wurden die in Tabelle 31 und Tabelle 32 aufgeführten NMR-Experimente verwendet:

Tabelle 31: Parameter der verwendeten homonuklearen Experimente

Experiment	Pulsprogramm	td in F2	ns	Mischzeit [ms]	Prozessierung
¹ H	zg30		64		Exponentialfunktionen
COSY	cosydfph	2048	24		Sinus-Funktion in F1 und F2
	cosygpqf	2048	24		Sinus-Funktion in F1 und F2
TOCSY	mlevph	2048	24	40 - 80	sin ² + π /2 in F1 und F2
ROESY	roesyph	1024	16	140 - 200	sin ² + π /2 in F1 und F2

Bruker Avance 600 (sf [¹H]: 600.1 MHz; sw 9 – 11 ppm; td in F1: 256; p1 [90°]: 10.5 μ s, pL1: 4 dB; d1: 1.5 – 2 s)

Tabelle 32: Parameter der verwendeten heteronuklearen Experimente

Experiment	Pulsprogramm	td in F2	ns	d2 [ms] J _{CH} = 145 Hz	d6 [ms]	Prozessierung
HMQC	inv4qf	2048	32	3.45		sin ² + π /2 in F1 und F2
HMBC	inv4lplrndqf	2048	32	3.45	70	sin ² + π /2 in F1 und F2
	inv4gplplrndqf	2048	32	3.45	70	sin ² + π /2 in F1 und F2

Bruker Avance 600 (sf [¹H]: 600.1 MHz, sf [¹³C]: 150.9 MHz; sw 160 – 200 ppm in F1, sw 9 – 11 ppm in F2; td in F1: 256; p1 [90°]: 10.5 μ s, pL1: 4 dB; pL2: -3 dB; d1: 1.5 – 2 s)

7.2 NMR-Zuordnung

7.2.1 Tabellen der ¹H-NMR-Daten

Die Peptide **P12**, **P17**, **P18**, **P20** und **P21** fielen in so geringen Ausbeuten an, dass keinerlei NMR-spektroskopische Auswertung möglich ist.

Tabelle 33: ¹H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^cACPC–Leu–Asn–Ile–Asp–) **P1**

δ [ppm]	NH	CH ^{α}	CH ^{β}	CH ^{γ}	CH ^{δ}	H ^{ω}	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^5J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.81	4.06	3.65; 3.54			4.89	-2.2	7.9 [#]
^c ACPC	7.47	2.93	4.27	1.57; 1.89	1.61	1.78	-0.8	7.4 [#]
Leu	8.59	3.69	1.59; 1.47	1.73	0.87; 0.89		-3.4	n.d.
Asn	8.40	4.28	2.74; 2.51			7.12; 7.58	-2.5	5.3 [#]
Ile	7.81	4.17	1.88	1.45 (CH ₃); 0.97 (CH ₂)	0.80		-1.3	7.8 [#]
Asp	7.97	4.19	2.96; 2.83				0.1	6.4 [#]

[#] bei 320 K

Tabelle 34: ¹H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^lACPC–Leu–Asn–Ile–Asp–) **P2**

δ [ppm]	NH	CH ^{α}	CH ^{β}	CH ^{γ}	CH ^{δ}	H ^{ω}	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^5J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.40	4.22	3.51; 3.67				-0.5	8.1
^l ACPC	8.14	3.00	3.73	1.84; 1.92	1.61 - 1.67	1.78; 1.71	-3.2	4.4 [#]
Leu	7.93	4.13	1.46; 1.57	1.64	0.84; 0.90		-4.6	7.6
Asn	8.17	4.62	2.68; 2.97			7.32; 7.84	-2.8	8.8 [#]
Ile	8.27	3.78	1.79	1.24; 1.44 (CH ₂); 0.89 (CH ₃)	0.85		-1.9	n. d.
Asp	7.76	4.58	2.57; 2.64				-1.9	7.4

[#] bei 330 K

Tabelle 35: ¹H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^cACHC–Leu–Asn–Ile–Asp–) **P3**

δ [ppm]	NH	CH ^{α}	CH ^{β}	CH ^{γ}	CH ^{δ}	H ^{ω}	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^5J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.82	4.04	3.64; 3.53			4.20	-2.4	7.9
^c ACHC	7.59	2.65	3.65	1.65	1.35; 1.25	1.50; 1.76	-1.6	8.9
Leu	8.48	3.59	1.58	1.71	0.90; 0.86		-4.4	n.d.
Asn	8.31	4.27	2.69; 2.52			7.58; 7.13	-3.0	5.4 [#]
Ile	7.73	4.15	1.86	1.48 (CH ₂); 0.81 (CH ₃)	0.80		0	7.5 [#]
Asp	7.95	4.15	2.99; 2.75				-1.2	5.8 [#]

*Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich; [#] bei 330 K

Tabelle 36: ¹H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^lACHC–Leu–Asn–Ile–Asp–) **P4**

δ [ppm]	NH	CH ^{α}	CH ^{β}	CH ^{γ}	CH ^{δ}	H ^{ω}	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^5J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.63	4.09	3.56*			4.71	-2.7	8.9 [#]
^l ACHC	7.42	2.65	3.56*	1.77*	1.65*	1.37*; 2.62*	-2.3	7.4 [#]
Leu	7.83	4.02	1.48	1.18	0.88; 0.80		-4.6	n. d.
Asn	7.51	4.50	2.73; 2.61			7.66; 7.21	0.6	n. d.
Ile	8.34	3.84	1.75	1.21 (CH ₂); 0.86 (CH ₃)	0.85		-1.5	n. d.

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Asp	8.45	4.36	2.87; 2.65				-4.7	6.9#

*Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich; # bei 330 K

Tabelle 37: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–Pro–Leu–Asn–(R)-AMBS–Asp–) P5

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	8.50	4.81	3.62; 3.66				4.7
Pro	-	3.95	2.25 – 2.35	1.35 – 1.46	1.80 – 1.90		-
Leu	8.04	4.03	1.58 – 1.62	1.43	0.79; 0.90		8.8
Asn	8.26	4.19	2.27; 2.90			6.76; 7.28	7.1
(R)-AMBS	7.10	2.12	3.17; 3.43	1.52; 1.35	0.83		6.2
Asp	7.77	4.59	2.58; 2.60				7.2

Tabelle 38: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–Pro–Leu–Asn–(S)-AMBS–Asp–) P6

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.56	4.83	3.73; 4.15			6.03	7.6
Pro	-	3.90	1.86; 2.00	1.55; 1.68	2.69; 2.00		-
Leu	7.31	4.13	1.40 – 1.46	1.55	0.79; 0.87		7.3
Asn	8.60	4.45	2.58; 2.80			7.15; 7.51	7.1
(R)-AMBS	8.00	2.48	2.90; 2.34	1.38 – 1.42	0.78		8.0
Asp	7.12	4.57	2.44; 2.51				8.6

Tabelle 39: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser- c ACPC–Leu–Asn–Asp–) P7

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.75	3.94	3.71; 3.66			4.63	-2.9	9.2
c ACPC	7.44	2.78	4.12	1.82; 1.65	1.47; 1.49	1.85; 1.83	-2.7	8.0
Leu	8.16	3.84	1.89; 1.48	1.58	0.89; 0.86		-2.0	6.4
Asn	8.52	4.29	2.65; 2.63			7.45; 6.96	-4.6	6.9
Asp	8.33	4.35	2.89; 2.55				-4.7	6.0

Tabelle 40: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser- t ACPC–Leu–Asn–Asp–) P8

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.78	4.17	2.64; 2.68				-1.9	8.6
t ACPC	7.43	2.74	3.66	1.92 - 2.04	1.61 - 1.69	1.77 - 1.87	-1.6	6.1
Leu	7.59	4.37	1.40 - 1.46	1.59	0.84; 0.87		-4.0	8.8
Asn	8.44	4.17	2.64; 2.68			6.98; 7.45	-3.4	6.9
Asp	8.28	4.29	2.81; 2.86				-2.4	6.6

Tabelle 41: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^cACHC–Leu–Asn–Asp–) **P9**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	8.05	3.95	3.72; 3.69				-1.9	7.2
^c ACHC	7.39	3.85	2.52	1.90	1.55 - 1.24*	1.55 - 1.24*	-0.5	5.7
Leu	8.21	3.71	1.86	1.56	0.89; 0.86		-4.4	5.3
Asn	8.05	4.41	2.81; 2.57			7.51; 7.04	-3.8	6.4
Asp	8.35	4.32	2.79; 2.64			12.3	-2.8	7.9

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 42: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^tACHC–Leu–Asn–Asp–) **P10**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.57	4.18	3.68; 3.54				-1.7	9.1
^t ACHC	7.18	3.41	2.47*	1.89*	1.57 - 1.08*	1.57 - 1.08*	-2.0	7.2
Leu	7.76	4.34	1.27*	1.65	0.87; 0.83		-4.3	8.7
Asn	8.09	4.31	2.84; 2.72			7.41; 6.95	-3.1	7.9
Asp	8.54	4.15	2.64; 2.47*				-3.6	7.2

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 43: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^cACPC–Gln–Ile–Asp–) **P11**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.71	3.90	3.81; 3.59				7.2
^c ACPC	6.97	2.78	4.22	1.96; 1.87	1.45; 1.09	1.80; 1.70	8.0
Gln	7.96	3.84	2.13; 2.09	1.99; 1.93		7.32; 6.83	7.2
Ile	7.80	4.01	1.69	1.48; 1.69 (CH ₂); 0.85 (CH ₃)	0.84		7.6
Asp	9.22	4.10	2.96; 2.63				6.0

Tabelle 44: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^cACHC–Gln–Ile–Asp–) **P13**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.93	3.84	3.83; 3.70				6.4
^c ACHC	7.04	2.44	4.02	2.08 – 2.12	1.35 – 1.39	1.25 – 1.31; 2.08 – 2.12	7.2
Gln	8.09	3.74	2.05; 1.97	2.16; 2.12		7.31; 6.82	5.7
Ile	7.79	4.03	1.72	1.42; 1.05 (CH ₂); 0.84 (CH ₃)	0.83		n. d.
Asp	8.80	4.14	2.90; 2.76				6.8

Tabelle 45: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–^tACHC–Gln–Ile–Asp–) **P14**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.55	3.99	3.56; 3.68			4.89 (OH)	7.9
^t ACHC	7.19	2.49	3.59	1.94 – 2.00	1.10 – 1.19	1.29 – 1.33; 1.91 – 1.97	8.7
Gln	8.09	4.11	1.69; 1.65	2.06 – 2.14		7.29; 6.77	7.2
Ile	7.85	4.00	1.77	1.38 – 1.46 (CH ₂); 0.83 (CH ₃)	0.83		8.3

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Asp	8.34	4.35	2.71 – 2.79				8.3

Tabelle 46: $^1\text{H-NMR}$ -Datenvon c-(–Ser- c ACHC–Thr–Gln–Ile–Asp–) **P19**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$
Ser	7.80	4.00	3.62; 3.54			
c ACHC	7.45	2.73	4.00	1.81 – 1.87	1.48 – 1.55	1.32 – 1.38 ; 1.50 – 1.57
Thr	7.48	3.80	5.25	1.20		
Gln	8.45	4.09	1.96; 1.86	2.18 – 2.24		7.33; 6.86
Ile	7.56	3.98	1.84	1.45; 1.12 (CH $_2$); 0.85 (CH $_3$)	0.84	
Asp	8.47	4.22	2.84; 2.69			

Tabelle 47: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Ser–Pro–Thr–Gln–(*S*)-AMBS–Asp–) **P22**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Ser	7.43	4.80	3.59; 3.64				6.0
Pro	-	3.93	1.82 – 1.92	1.68; 1.79	2.32; 2.45		-
Thr	7.25	4.10	1.79	1.38			8.7
Gln	6.98	4.17	2.03 – 2.12	2.26 – 2.33		7.00; 7.37	9.4
(<i>S</i>)-AMBS	7.82	3.33	2.90; 3.35	1.26 – 1.40	0.79		5.8
Asp	8.64	4.51	2.54; 2.83				6.4

Tabelle 48: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von H–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–OH **KDK1**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Arg	8.17	3.83	1.73 ; 1.69	1.29 – 1.35	3.10 – 3.16	7.74 (NH); 6.90 – 7.50 (br. =NH. NH $_2$)	n. d.
Leu	8.53	4.43	1.44 – 1.52	1.66	0.91; 0.87		7.6
Ser	8.19	4.32	3.62; 3.56			5.15	7.6
Lys	7.95	4.10	1.63 ; 1.57	1.77 ; 1.75	1.53 – 1.61	2.72 – 2.80 (H $^{\epsilon}$); 7.18 (NH $_2$)	n. d.
Asp	8.16	4.56	2.69; 2.49				7.6
Lys	7.96	4.23	1.56; 1.52	1.69; 1.73	1.50 – 1.54	2.72 – 2.80 (H $^{\epsilon}$); 7.18 (NH $_2$)	n. d.

Tabelle 49: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–D-Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK2**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
D-Arg	8.36	3.67	1.59 - 1.65	1.48; 1.39	3.10 – 3.16	7.68 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH $_2$)	-2.6	4.9
Leu	8.61	4.17	1.47 – 1.54	1.58	0.90; 0.80		-4.0	8.4
Ser	7.70	4.47	3.80 – 3.90			5.30	-2.6	8.8
Lys	7.20	4.25	1.66; 1.59	1.62; 1.64	1.52; 1.50	2.71 – 2.79 (H $^{\epsilon}$); 7.71 (NH $_2$)	-5.2	6.5
Asp	8.09	4.38	2.78; 2.65				-2.1	8.0
Lys	8.54	4.07	1.65; 1.55	1.62; 1.64	1.51; 1.49	2.71 – 2.79 (H $^{\epsilon}$); 7.71 (NH $_2$)	+0.3	4.9

Tabelle 50: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Arg–D–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK3**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Arg	7.83	4.23	1.59; 1.69	1.45 – 1.53	3.08 – 3.16	7.67 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH ₂)	-2.0	7.0
D-Leu	8.50	4.19	1.51; 1.48	1.58	0.89; 0.80		-6.0	7.0
Ser	8.24	4.27	3.62; 3.52			5.43	-3.6	7.8
Lys	8.08	4.11	1.69; 1.66	1.57 – 1.65	1.49 – 1.55	2.71 – 2.79 (H $^\epsilon$); 7.72 (NH ₂)	+0.8	n. d.
Asp	8.47	4.36	2.80; 2.60				-3.4	7.1
Lys	7.57	4.07	1.65; 1.61	1.47 – 1.55	1.49 – 1.55	2.71 – 2.79 (H $^\epsilon$); 7.72 (NH ₂)	-2.8	4.5

Tabelle 51: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–Arg–Leu–D–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK4**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K]	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Arg	8.12	4.02	1.57 – 1.67	1.48 – 1.56	3.09 – 3.17	7.84 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH ₂)	-*	n. d.*
Leu	8.23	4.07	1.27 – 1.33	1.55	0.85; 0.89		-1.3	n. d.*
D-Ser	7.93	4.21	3.61; 3.70				-*	n. d.*
Lys	8.10	4.02	1.67 – 1.73	1.50 – 1.59	1.54 – 1.62	2.71 – 2.79 (H $^\epsilon$); 7.73 (NH ₂)	-*	n. d.*
Asp	8.47	4.33	2.72; 2.84				-3.5	n. d.*
Lys	8.11	4.07	1.62 – 1.66	1.50 – 1.59	1.54 – 1.62	2.71 – 2.79 (H $^\epsilon$); 7.73 (NH ₂)	-*	n. d.*

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 52: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Ala–Asp–Lys–) **KDK5**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
D-Arg	8.35	4.11	1.63 – 1.70	1.41 – 1.48	3.07 – 3.11	7.64 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH ₂)	5.7
Leu	8.51	3.74	1.32 – 1.38	1.49	0.87; 0.89		4.7
Ser	7.59	4.41	3.74 – 3.82			5.17	8.2
Ala	7.27	4.23	1.22				7.2
Asp	8.06	4.31	2.80; 2.77				8.16
Lys	8.66	4.16	1.54; 1.62	1.43 – 1.51	1.46 – 1.52	2.68 – 2.76 (H $^\epsilon$); 7.72 (NH ₂)	8.5

Tabelle 53: $^1\text{H-NMR}$ -Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Ala–Lys–) **KDK6**

δ [ppm]	NH	CH $^\alpha$	CH $^\beta$	CH $^\gamma$	CH $^\delta$	H $^\omega$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
D-Arg	8.75	4.01	1.56; 1.70	1.40 – 1.46	3.08 – 3.16	7.73 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH ₂)	4.9
Leu	8.59	4.21	1.48 – 1.54	1.59	0.81; 0.89		8.7
Ser	7.85	4.50	3.84; 3.97			5.49	9.1
Lys	8.26	3.77	1.55; 1.67	1.47 – 1.53	1.52 – 1.58	2.75 – 2.81 (H $^\epsilon$); (NH ₂)	4.5
Ala	7.78	4.12	1.26				n. d.

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
Lys	7.04	4.21	1.63; 1.66	1.48 – 1.56	1.48 – 1.56	2.69 – 2.75 (H $^{\epsilon}$); (NH $_2$)	7.75 5.7

Tabelle 54: ^1H -NMR-Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–D-Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Ala–) **KDK7**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
D-Arg	8.34	3.57	1.58 – 1.64	1.31 – 1.39	3.08 – 3.12	7.67 (NH); 6.70 – 7.50 (br. =NH. NH $_2$)	4.1
Leu	8.64	4.00	1.49 – 1.55	1.48	0.85; 0.76		8.5
Ser	7.71	4.49	3.62 – 3.76			5.32	9.1
Lys	8.58	3.84	1.65 – 1.61	1.49 – 1.56	1.52 – 1.55	2.68 – 2.77 (H $^{\epsilon}$); (NH $_2$)	7.72 5.1
Asp	7.99	4.38	2.56; 2.50				8.5
Ala	6.98	4.38	1.18				8.4

Tabelle 55: ^1H -NMR-Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(–D-Arg–Leu–Ser–Ala–Asp–Ala–) **KDK8**

δ [ppm]	NH	CH $^{\alpha}$	CH $^{\beta}$	CH $^{\gamma}$	CH $^{\delta}$	H $^{\omega}$	$^3J_{H^N H^a}$ [Hz]
D-Arg	8.51	4.04	1.60 – 1.68	1.32 – 1.38	3.07 – 3.15	7.50 (t. $^3J=5.4$ Hz; NH); – 6.50 (br)	7.48 5.3
Leu	8.65	4.15	1.49 – 1.53	1.52			8.4
Ser	7.74	4.45	3.84; 3.76			5.19 (t. $^3J=5.3$ Hz)	8.8
Ala	8.43	4.23	1.22 (t. $^3J=7.2$ Hz)				3.9
Asp	7.92	4.36	2.71; 2.56				8.1
Ala	7.15	3.80	1.19 (t. $^3J=6.5$ Hz)				5.9

7.2.2 Tabellen der ^{13}C -NMR-DatenTabelle 56: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- c ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P1

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser		56.3	60.9			
c ACPC		48.4	52.1	32.8	24.6	32.7
Leu		54.9	39.6	23.2	21.7; 23.6	
Asn		51.9	35.3			
Ile		58.7	36.5	18.9 (CH ₃); 24.6 (CH ₂)	11.9	
Asp		52.6	35.2			

Tabelle 57: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- t ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P2

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser	170.7	56.3	62.3			
t ACPC	175.6	49.7	58.3	31.2	25.5	29.9
Leu	171.8	52.6	41.0	30.2	21.6; 23.8	
Asn	172.6	49.0	39.0			172.1
Ile	170.4	61.0	36.1	15.9 (CH ₃); 17.4 (CH ₂)	13.6	
Asp	171.4	51.6	37.3			172.3

Tabelle 58: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- c ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P3

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser	171.9	56.3	60.8			
c ACHC	178.9	46.6	45.8	24.4	30.3	*
Leu	173.3	55.3	39.7	24.2	21.6; 23.6	
Asn	172.9	52.5	35.5			169.3
Ile	173.0	58.8	36.3	12.0 (CH ₃); 30.3 (CH ₂)	16.0	
Asp	169.4	51.9	35.9			169.1

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 59: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- t ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P4

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser	172.5	56.3	61.7			
t ACHC	178.3	50.1	50.9	29.9	30.9	*
Leu	172.5	51.0	40.7	25.2	23.7; 21.6	
Asn	170.4	49.7	38.3			170.5
Ile	172.8	59.9	36.3	40.7 (CH ₂); 11.9 (CH ₃)	15.7	
Asp	169.4	51.4	36.3			170.3

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 60: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- c ACPC–Leu–Asp–Asn–) P7

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser	171.5	58.7	61.2			
c ACPC	170.3	47.1	52.8	32.5	22.8	28.6
Leu	169.3	54.1	38.5	25.2	23.8; 21.7	
Asn	174.2	51.4	36.1			172.4
Asp	173.3	51.3	35.8			172.7

Tabelle 61: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- t ACPC–Leu–Asp–Asn–) P8

δ [ppm]	CO	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ω
Ser	170.0	56.4	61.3			
t ACPC	170.7	35.8	61.5	30.7	22.7	27.9
Leu	173.5	51.2	41.2	24.9	22.1; 23.4	
Asn	171.5	51.6	36.4			172.1

δ [ppm]	CO	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	C $^{\delta}$	C $^{\omega}$
Asp	170	52.1	35.4			172.7

Tabelle 62: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- c ACHC–Leu–Asp–Asn–) **P9**

δ [ppm]	CO	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	C $^{\delta}$	C $^{\omega}$
Ser	169.9	59.3	62.0			
c ACHC	175.5	48.9	45.0	39.3	*	
Leu	172.0	61.8	29.7	25.5	22.3; 24.2	
Asn	173.4	52.1	36.2			173.2
Asp	171.3	51.5	36.7			171.2

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

Tabelle 63: ^{13}C -NMR-Daten von c-(–Ser- t ACHC–Leu–Asp–Asn–) **P10**

δ [ppm]	CO	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	C $^{\delta}$	C $^{\omega}$
Ser	169.1	57.2	62.0			
t ACHC	173.3	*	48.7	30.5	*	
Leu	170.7	51.6	32.4	25.7	22.2; 24.2	
Asn	173.8	52.2	36.2			172.9
Asp	170.2	52.4	37.0			172.0

* Signalüberlappung bzw. keine eindeutige Zuordnung möglich

7.3 Allgemeine Vorschrift für die Konformationsanalyse

Die Ermittlung der Startstruktur wird mit dem Programmpaket InsightII (MSI) auf einer Silicon Graphics O₂-Workstation (Betriebssystem IRIX 6.5) durchgeführt. Zur Ermittlung einer Startstruktur werden die aus ROE-Spektren extrahierten Atomabstände als Randbedingungen eingeführt und die Torsionswinkel ϕ der α -Aminosäuren in Intervallen von 60 ° variiert. Die entstandenen Konformationen werden einer kurzen *in continuo*-Simulation (500 Schritte, 300 K, Kraftfeld „cvff“) unterworfen, welche ein Ensemble von Konformationen unterschiedlicher Energie liefert. Die energieniedrigsten Konformationen werden bezüglich der Verletzung der ROE-Abstände betrachtet und die Beste von ihnen als Startstruktur für die Molekulardynamik-Rechnungen verwendet.

Zur Molekulardynamiksimulation wird das Programmpaket GROMACS (Version 3.1.4, Kraftfeld GROMOS96)^{290,291} auf einem Dual Prozessor System mit zwei Athlon 1900+ Prozessoren (*Palomine Care* 1600; Betriebssystem Debian) verwendet. Die erhaltene Startstruktur wird in eine kubische Lösungsmittelbox [(3.5 Å)³, ca. 300 DMSO-Moleküle] transferiert und mit einem *steepest descent*-Algorithmus (100 Schritte, *periodic boundary conditions*) minimiert. Es schließt sich eine kurze (100 ps, *stepsize* 1*10⁻³ ps) *restrained*-MD-Simulation an, über die eine *Cluster*-Analyse (*cut-off* 0.08 nm) vorgenommen wird. Die erhaltenen Konformationen werden in einer freien MD-Rechnung (12 ns, *stepsize* 2*10⁻³ ps) bei 300 K simuliert. Die *Cluster*-Analyse (*cut-off* 0.08 nm) dieser Simulation liefert ein oder mehrere Konformationen, die kurz (100 Schritte) mit einem *Steepest Descent*-Algorithmus (InsightII, Kraftfeld „cvff“) minimiert werden. Die erhaltenen Konformationen werden auf die Verletzung der ROE-Atomabstände überprüft und mit den aus NMR-Messungen erhaltenen strukturellen Parametern verglichen.

7.4 Atomabstände (aus NOEs bzw. durch MD)

Tabelle 64: Distanzen für c-(–Ser–^cACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P1:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}			r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}
Asn H ^α	Asn H ^{βproR}	2.09	2.69	3.03	^c ACPC H ^N	Ser H ^{βproS}	2.79	3.41	3.92
Asn H ^α	Asn H ^{βproS}	2.00	2.60	2.60	^c ACPC H ^N	Leu H ^γ	3.24	3.96	4.90
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2.12	2.75	2.58	Ile H ^α	Ile H ^β	2.19	2.77	3.06
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.27	2.85	3.11	Ile H ^N	Ile H ^α	2.87	3.50	3.08
Asp H ^N	Ile H ^N	3.07	3.70	1.98	Ile H ^N	Asp H ^{βproS}	3.20	3.91	5.28
Asp H ^N	Asp H ^α	2.56	3.13	2.94	Ile H ^N	Ile H ^β	3.33	4.07	2.59
Asp H ^N	Ile H ^β	3.03	3.70	2.57	Leu H ^α	Leu H ^γ	2.67	3.29	3.05
^c ACPC H ^β	^c ACPC H ^α	1.82	2.25	2.39	Leu H ^α	Leu H ^{βproR}	2.52	3.20	3.05
^c ACPC H ^β	^c ACPC H ^γ	2.01	2.55	2.81	Leu H ^α	Leu H ^{βproS}	2.24	2.78	2.57
^c ACPC H ^β	Leu H ^{βproR}	2.42	3.00	4.82	Leu H ^N	^c ACPC H ^β	3.69	4.50	2.97
^c ACPC H ^N	^c ACPC H ^β	2.77	3.39	3.07	Leu H ^N	Leu H ^α	2.67	3.27	2.97
^c ACPC H ^N	Ser H ^α	2.99	3.65	3.55	Leu H ^N	^c ACPC H ^α	2.33	2.85	2.19
^c ACPC H ^N	Ser H ^{βproR}	2.95	3.61	3.66					

Tabelle 65: Distanzen für c-(–Ser–^tACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P2:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}			r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}
Asn H ^α	Asn H ^{βpro}	2.08	2.62	3.10	Leu H ^α	Leu H ^{βpro}	2.41	2.96	2.74
Asn H ^α	Asn H ^{βpro'}	2.13	2.62	2.62	Leu H ^α	Leu H ^{βpro'}	2.69	3.40	3.07
Asn H ^N	Asn H ^α	2.74	3.34	2.91	Leu H ^N	Leu H ^α	2.91	3.56	2.86
Asn H ^N	Leu H ^α	3.14	3.84	2.13	Leu H ^N	^t ACPC H ^α	2.19	2.67	2.05
Asn H ^N	Asn H ^{βpro}	3.26	3.99	2.46	Leu H ^N	Leu H ^γ	3.02	3.69	2.74
Asp H ^N	Asp H ^α	2.79	3.41	3.08	Leu H ^N	Leu H ^{βpro'}	2.80	3.42	3.55
Asp H ^N	Ile H ^α	2.82	3.45	3.60	Ser H ^α	Ser H ^{βpro}	2.10	2.66	3.09
Ile H ^α	Ile H ^β	2.18	2.69	3.04	Ser H ^α	Ser H ^{βpro'}	2.21	2.66	2.52
Ile H ^N	Asn H ^α	2.49	3.05	3.45	Ser H ^N	Ser H ^α	2.74	3.35	2.84
Ile H ^N	Ile H ^α	2.83	3.46	3.05	Ser H ^N	Ser H ^{βpro}	3.07	3.75	3.72
Ile H ^N	Ile H ^β	2.79	3.42	2.84	Ser H ^N	Ser H ^{βpro'}	2.91	3.55	2.72
Ile H ^N	Ile H ^{γpro}	3.87	4.73	4.27	^t ACPC H ^N	Ser H ^α	3.02	3.70	3.74
Ile H ^N	Ile H ^{γpro'}	3.07	3.75	3.03	^t ACPC H ^N	^t ACPC H ^α	2.53	3.09	2.58
Leu H ^α	Leu H ^γ	2.79	3.43	2.49	^t ACPC H ^N	^t ACPC H ^β	2.28	2.78	3.08

Tabelle 66: Distanzen für c-(–Ser–^cACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P3:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}			r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}
Asn H ^α	Asn H ^{βproS}	2.31	2.92	3.10	Leu H ^N	^c ACHC H ^β	2.41	2.94	2.23
Asn H ^α	Asn H ^{βproR}	2.15	2.74	2.59	Leu H ^N	Leu H ^α	2.72	3.33	2.91
Asn H ^ω	Asn H ^{βproS}	2.57	3.14	2.43	Leu H ^N	Leu H ^{βproR}	3.14	3.83	3.59
Asn H ^ω	Asn H ^{βproR}	3.14	3.83	3.53	Leu H ^N	Leu H ^γ	2.93	3.59	2.37
Asp H ^N	Asp H ^α	2.94	3.60	2.91	Leu H ^α	Leu H ^{βproR}	2.57	3.14	3.09
Asp H ^N	Ile H ^β	3.57	4.36	3.38	Leu H ^α	Leu H ^{βproS}	2.29	2.87	2.66
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2.37	3.01	2.27	Leu H ^α	Leu H ^γ	2.74	3.42	2.89
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.45	3.13	2.80	Ser H ^N	Asp H ^α	3.17	3.88	2.04
Asp H ^α	Ile H ^β	2.49	3.11	3.72	Ser H ^N	Asp H ^{βproS}	2.67	3.26	3.44
^c ACHC H ^N	^c ACHC H ^α	2.90	3.55	3.04	Ser H ^N	^c ACHC H ^N	3.13	3.82	2.98
^c ACHC H ^N	^c ACHC H ^{δproR}	2.71	3.31	2.70	Ser H ^N	Leu H ^α	3.34	4.09	5.22
^c ACHC H ^N	Ser H ^α	3.00	3.67	2.03	Ser H ^N	Ser H ^α	2.58	3.16	2.17
^c ACHC H ^N	Ser H ^{βproR}	2.86	3.50	3.62	Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	3.24	3.96	3.38
^c ACHC H ^N	Ser H ^{βproS}	2.81	3.43	3.40	Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	3.21	3.92	4.16
^c ACHC H ^α	^c ACHC H ^β	1.97	2.43	2.47	Ser H ^α	Ser H ^{βproR}	2.00	2.60	2.04
Leu H ^N	^c ACHC H ^α	3.30	4.04	3.13	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	2.04	2.64	2.45

Tabelle 67: Distanzen für c-(–Ser-^tACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) **P4**:

		r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}			r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}
Asn H ^N	Ile H ^α	3.21	3.92	5.04	Leu H ^N	Leu H ^{βproS}	2.80	3.43	2.82
Asn H ^N	Ile H ^α	3.21	3.92	5.04	Leu H ^N	Leu H ^γ	2.60	3.17	4.53
Asn H ^ω	Asn H ^{βproR}	2.80	3.43	3.54	Leu H ^N	^t ACHC H ^{γproS}	2.32	2.84	3.44
Asn H ^ω	Asn H ^{βproS}	2.44	2.98	2.45	Leu H ^α	Leu H ^{βproR}	2.10	2.62	2.52
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.16	2.76	2.48	Leu H ^α	^t ACHC H ^{γproS}	2.62	3.26	2.64
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2.44	3.06	3.08	Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	2.94	3.59	2.94
Ile H ^N	Asn H ^α	3.02	3.69	2.52	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	2.35	3.04	2.61
Ile H ^N	Asn H ^α	3.02	3.69	2.52	^t ACHC H ^N	^t ACHC H ^β	2.31	2.82	3.07
Ile H ^N	Ile H ^β	3.37	4.12	2.33	^t ACHC H ^N	^t ACHC H ^{γproR}	3.43	4.20	2.98
Ile H ^N	Ile H ^{γpro}	3.68	4.50	4.64	^t ACHC H ^α	^t ACHC H ^β	1.84	2.34	3.05
Ile H ^α	Ile H ^β	2.28	2.79	2.62	^t ACHC H ^β	^t ACHC H ^{δproR}	2.27	2.82	2.69
Ile H ^α	Ile H ^{γproS}	2.83	3.67	3.72	^t ACHC H ^β	^t ACHC H ^{γproR}	2.09	2.60	2.48
Leu H ^N	Leu H ^α	2.94	3.60	3.02	^t ACHC H ^{γproR}	^t ACHC H ^{δproR}	2.30	2.91	2.44
Leu H ^N	Leu H ^{βproR}	3.38	4.14	3.44					

Tabelle 68: Distanzen für c-(–Ser-^cACPC–Leu–Asp–Asn–) **P7**:

		r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}			r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}
Asn H ^N	Asn H ^α	2.53	3.09	3.08	Leu H ^α	Leu H ^{βproR}	2.45	3.05	3.07
Asn H ^N	Leu H ^α	2.79	3.41	3.50	Leu H ^α	Leu H ^{βproS}	2.32	2.84	2.53
Asn H ^N	Leu H ^{βproR}	3.14	3.83	3.86	Leu H ^α	Leu H ^γ	2.74	3.39	2.63
Asn H ^N	Leu H ^{βproS}	2.92	3.57	2.93	Leu H ^N	^c ACPC H ^α	2.48	3.04	2.84
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.07	2.68	2.48	Leu H ^N	Leu H ^α	2.42	2.96	2.99
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2.21	2.77	2.27	Leu H ^N	Leu H ^{βproR}	2.70	3.30	2.48
Asp H ^N	Asp H ^{βproR}	3.84	4.69	4.17	Leu H ^N	Leu H ^{βproS}	3.34	4.08	3.63
Asp H ^N	Asp H ^{βproS}	3.16	3.86	3.26	Ser H ^N	Asp H ^α	2.79	3.41	3.46
Asp H ^N	Ser H ^N	3.64	4.57	3.49	Ser H ^N	Asp H ^{βproR}	3.02	3.69	4.10
^c ACPC H ^β	^c ACPC H ^α	1.89	2.34	2.41	Ser H ^{OH}	Ser H ^α	2.53	3.20	3.48
^c ACPC H ^β	^c ACPC H ^{γproR}	2.00	2.50	2.36	Asn H ^N	Asn H ^α	2.53	3.09	3.08
^c ACPC H ^β	^c ACPC H ^{γproS}	2.53	3.15	2.83	Asn H ^N	Leu H ^α	2.79	3.41	3.50
^c ACPC H ^N	^c ACPC H ^β	2.75	3.37	3.09	Asn H ^N	Leu H ^{βproR}	3.14	3.83	3.86
^c ACPC H ^N	^c ACPC H ^{γproR}	3.17	3.88	3.82	Asn H ^N	Leu H ^{βproS}	2.92	3.57	2.93
^c ACPC H ^N	^c ACPC H ^{γproS}	3.03	3.71	2.71	Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.07	2.68	2.48

Tabelle 69: Distanzen für c-(–Ser-^tACPC–Leu–Asp–Asn–) **P8**:

		r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}			r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}
Asn H ^N	Asn H ^α	2.11	2.58	2.93	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	1.91	2.50	3.07
Asn H ^N	Asn H ^{βproS}	2.89	3.53	3.61	Ser H ^N	Asp H ^α	2.55	3.12	3.58
Asn H ^N	Leu H ^N	3.11	3.86	3.46	Ser H ^N	Ser H ^α	2.22	2.72	2.88
Asp H ^N	Asp H ^α	2.09	2.56	3.01	Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	2.53	3.09	3.69
Asp H ^N	Ser H ^N	2.75	3.55	2.78	Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	2.40	2.93	2.45
Leu H ^α	Leu H ^γ	1.93	2.41	2.06	Ser H ^N	^t ACPC H ^N	2.59	3.36	2.56
Leu H ^N	Leu H ^α	2.33	2.85	2.32	^t ACPC H ^α	^t ACPC H ^β	2.23	2.79	3.06
Leu H ^N	Leu H ^γ	2.73	3.34	2.73	^t ACPC H ^N	Ser H ^α	2.35	2.87	3.59
Leu H ^N	^t ACPC H ^α	1.86	2.27	1.90	^t ACPC H ^N	Ser H ^{βpro}	2.47	3.02	2.68
Ser H ^α	Ser H ^{βproR}	1.92	2.52	2.67	^t ACPC H ^N	^t ACPC H ^α	2.20	2.68	3.04

Tabelle 70: Distanzen für c-(–Ser–^cACHC–Leu–Asp–Asn–) **P9**:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD} _{KONF1}	r ^{MD} _{KONF2}
Asn H ^α	Asp H ^N	2.18	2.67	3.61	3.52
Asn H ^α	Asn H ^{βproS}	1.72	2.10	2.64	2.41
Asn H ^N	Leu H ^{βproS}	2.70	3.30	3.09	3.25
Asn H ^N	Leu H ^γ	2.56	3.12	5.01	4.76
Asn H ^N	Asn H ^{βproS}	2.18	2.66	2.49	2.72
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	1.74	2.21	2.30	2.34
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	1.80	2.20	2.62	2.52
Asp H ^{βproR}	Ser H ^{βproS}	2.09	2.55	3.10	4.16
^c ACHC H ^α	^c ACHC H ^N	2.46	3.00	3.84	3.86
^c ACHC H ^α	^c ACHC H ^β	1.81	2.21	2.43	2.42
^c ACHC H ^{γproS}	Leu H ^N	2.36	2.88	2.54	2.34
^c ACHC H ^N	Ser H ^N	2.66	3.26	3.63	3.58
^c ACHC H ^N	^c ACHC H ^β	2.75	3.37	3.07	3.06
^c ACHC H ^N	^c ACHC H ^{εproS}	2.27	2.77	2.50	2.33
^c ACHC H ^N	^c ACHC H ^{εproR}	2.90	3.54	3.07	3.06
Leu H ^α	Leu H ^N	2.78	3.40	2.97	3.00
Leu H ^N	Leu H ^{βproS}	2.63	3.21	2.22	2.42
Leu H ^N	Leu H ^γ	2.97	3.63	2.93	2.41
Ser H ^N	Ser H ^α	2.19	2.67	2.32	3.08
Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	2.30	2.81	3.11	2.64

Tabelle 71: Distanzen für c-(–Ser–^lACHC–Leu–Asp–Asn–) **P10**:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}			r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}
Asn H ^N	Ser H ^N	2.84	3.56	4.15	Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	2.69	3.29	3.02
Ser H ^N	^l ACHC H ^N	2.70	3.57	2.70	Asn H ^ω	Asn H ^{βproR}	2.87	3.51	3.44
Asp H ^N	Asn H ^α	2.27	2.78	3.58	Asn H ^ω	Asn H ^{βproS}	2.67	3.26	3.02
Asp H ^N	Asp H ^α	2.25	2.75	3.06	^l ACHC H ^N	Ser H ^α	2.80	3.42	3.56
Asp H ^N	Asp H ^{βproS}	3.13	3.82	3.75	^l ACHC H ^N	Ser H ^{βproR}	2.23	2.73	2.29
Asn H ^N	Asn H ^α	2.19	2.68	3.03	^l ACHC H ^N	Ser H ^{βproS}	2.86	3.49	3.31
Asn H ^N	Asn H ^{βproR}	2.53	3.09	2.45	^l ACHC H ^N	^l ACHC H ^α	2.22	2.71	2.59
Asn H ^N	Asn H ^{βproS}	2.62	3.20	3.68	^l ACHC H ^N	^l ACHC H ^β	2.33	2.85	3.02
Leu H ^N	Leu H ^α	2.47	3.02	3.01	Asn H ^α	Asn H ^{βproR}	1.97	2.50	2.59
Leu H ^N	^l ACHC H ^β	2.04	2.50	2.27	Asn H ^α	Asn H ^{βproS}	2.02	2.57	3.02
Leu H ^N	Leu H ^γ	2.86	3.50	2.75	Ser H ^α	Ser H ^{βproR}	1.90	2.69	2.68
Ser H ^N	Asp H ^α	2.61	3.19	3.56	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	2.00	2.45	2.54
Ser H ^N	Ser H ^α	2.37	2.89	3.02	Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2.10	2.67	2.59
Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	2.66	3.26	2.64					

Tabelle 72: Distanzen für c-(–D-Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK2**:

		r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}			r _{unten}	r _{oben}	r ^{MD}
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	1,93	2,52	2,81	Lys ^I H ^N	Ser H ^{OH}	3,46	4,23	4,30
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2,18	2,76	3,07	Lys ^I H ^N	Lys ^I H ^α	2,29	2,80	2,96
Asp H ^N	Asp H ^α	2,22	2,71	2,97	Lys ^{II} H ^N	Lys ^{II} H ^α	2,52	3,09	3,07
Asp H ^N	Asp H ^{βproS}	2,57	3,17	2,95	Lys ^{II} H ^N	Asp H ^α	2,61	3,18	2,75
d-Arg H ^N	d-Arg H ^α	2,28	2,79	2,77	Lys ^{II} H ^N	Asp H ^{βproS}	3,18	3,88	2,95
Leu H ^N	Ser H ^N	2,69	3,41	4,37	Ser H ^N	Leu H ^α	2,52	3,08	2,58
Leu H ^N	Leu H ^α	2,61	3,19	3,06	Ser H ^N	Lys ^I H ^α	3,05	3,72	4,60
Lys ^I H ^N	Asp H ^N	2,61	3,21	2,65	Ser H ^{OH}	Ser H ^α	2,40	2,97	2,85

Tabelle 73: Distanzen für c-(–Arg–D–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK3**:

		r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}			r_{unten}	r_{oben}	r^{MD}
Arg H ^N	Arg H ^α	2,66	3,25	3,07	Lys ^{II} H ^N	Asp H ^N	3,34	4,09	3,49
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2,12	2,70	2,68	Lys ^{II} H ^N	Lys ^I H ^α	2,71	3,31	4,73
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2,45	3,20	3,10	Ser H ^α	Ser H ^{βproR}	2,21	2,78	3,12
Asp H ^N	Asp H ^α	2,62	3,21	2,88	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	1,97	2,57	2,57
Asp H ^N	Asp H ^{βproR}	2,98	3,65	2,17	Ser H ^N	Ser H ^α	2,68	3,28	3,03
Lys ^I H ^N	Lys ^I H ^α	2,62	3,21	3,06	Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	3,04	3,71	3,59
Lys ^I H ^N	Lys ^{II} H ^α	3,19	3,90	5,78	Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	3,19	3,89	2,35
Lys ^{II} H ^N	Asp H ^α	3,18	3,89	3,49					

Tabelle 74: Distanzen für c-(–Arg–Leu–D–Ser–Lys–Asp–Lys–) **KDK4**:

		r_{unten}	r_{oben}			r_{unten}	r_{oben}
Arg H ^N	Arg H ^α	2,08	2,54	Leu H ^N	Leu H ^α	2,18	2,66
Asp H ^α	Asp H ^{βproR}	2,04	2,56	Ser H ^α	Ser H ^{βproR}	1,89	2,45
Asp H ^α	Asp H ^{βproS}	2,10	2,64	Ser H ^α	Ser H ^{βproS}	1,95	2,47
Asp H ^N	Asp H ^α	2,29	2,80	Ser H ^N	Ser H ^α	2,11	2,58
Asp H ^N	Asp H ^{βproS}	2,93	3,58	Ser H ^N	Ser H ^{βproR}	3,02	3,70
Asp H ^N	Lys ^I H ^α	2,40	2,94	Ser H ^N	Ser H ^{βproS}	2,75	3,36

7.5 Verzeichnis der Torsionswinkel

Tabelle 75: Torsionswinkel für
c-(–Ser^cACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) **P1**:

	ϕ	ψ
Ser	150°	-49°
^c ACPC	-124°	89°
Leu	-93°	142°
Asn	-107°	94°
Ile	-124°	-50°
Asp	-162°	-56°

Tabelle 79: Torsionswinkel für
c-(–Ser^cACPC–Leu–Asp–Asn–) **P7**:

	ϕ	ψ
Ser	-115°	-75°
^c ACPC	-132°	-157°
Leu	-85°	-30°
Asn	-112°	104°
Asp	75°	-34°

Tabelle 76: Torsionswinkel für
c-(–Ser^tACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) **P2**:

	ϕ	ψ
Ser	-58°	-135°
^t ACPC	-110°	-121°
Leu	-51°	154°
Asn	-54°	-20°
Ile	-97°	-57°
Asp	-116°	115°

Tabelle 80: Torsionswinkel für
c-(–Ser^tACPC–Leu–Asp–Asn–) **P8**:

	ϕ	ψ
Ser	-112°	-55°
^t ACPC	-152°	-132°
Leu	-55°	-101°
Asn	-80°	-66°
Asp	-69°	-63°

Tabelle 77: Torsionswinkel für
c-(–Ser^cACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) **P3**:

	ϕ	ψ
Ser	-95°	-88°
^c ACHC	-87°	105°
Leu	-63°	-20°
Asn	-74°	-64°
Ile	-126°	132°
Asp	81°	-103°

Tabelle 81: Torsionswinkel für
c-(–Ser^cACHC–Leu–Asp–Asn–) **P9**:

	Konformation A		Konformation B	
	ϕ	ψ	ϕ	ψ
Ser	73°	-59°	-121°	-120°
^c ACHC	-120°	152°	-119°	-64°
Leu	-62°	-9°	-83°	-176°
Asn	-100°	-64°	-53°	-39°
Asp	-146°	114°	-84°	-39°

Tabelle 78: Torsionswinkel für
c-(–Ser^tACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) **P4**:

	ϕ	ψ
Ser	-73°	155°
^t ACHC	-104°	73°
Leu	-140°	95°
Asn	-158°	179°
Ile	-55°	-32°
Asp	-113°	-52°

Tabelle 82: Torsionswinkel für
c-(–Ser^tACHC–Leu–Asp–Asn–) **P10**:

	ϕ	ψ
Ser	-116°	-64°
^t ACHC	-119°	-162°
Leu	-91°	-27°
Asn	167°	-74°
Asp	-100°	-59°

Tabelle 83: Torsionswinkel für
c-(–D-Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–)

KDK2:

	ϕ	ψ
D-Arg	101°	-56°
Leu	-109°	-175°
Ser	-97°	116°
Lys	-100°	-4°
Asp	-73°	-167°
Lys	-68°	120°

Tabelle 84: Torsionswinkel für
c-(–Arg–D-Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–)

KDK3:

	ϕ	ψ
Arg	-114°	174°
D-Leu	80°	-137°
Ser	-81°	-19°
Lys	-104°	-179°
Asp	-52°	-46°
Lys	-63°	-88°

7.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Konformation einiger L-Aminosäuren	4
Abbildung 2: Unterschiedliche Typen von β -Aminosäuren	5
Abbildung 3: Natürlich vorkommende β -Aminosäuren mit pharmakologischen Effekten	5
Abbildung 4: Penicillin G	5
Abbildung 5: Katalysatoren für die enantioselektive Addition	13
Abbildung 6: Die einzelnen Strukturebenen eines Proteins	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer α -Helix (A)	20
Abbildung 8: Paralleles (A) und antiparalleles (B,C) Faltblatt	21
Abbildung 9: Unterschiedliche <i>turn</i> -Strukturen	22
Abbildung 10: Ausgewählte Linker der Boc-Chemie	27
Abbildung 11: Ausgewählte Linker der Fmoc-Chemie	28
Abbildung 12: Additive für die Carbodiimidmethode	30
Abbildung 13: HOAt	30
Abbildung 14: Phosphoniumtyp-Kupplungsreagenzien	31
Abbildung 15: Kupplungsreagenzien vom Uronium/Guanidiniumtyp	31
Abbildung 16: β -Aminosäure mit Torsionswinkeln	36
Abbildung 17: Schema der möglichen Wasserstoffbrücken in β -Peptiden	37
Abbildung 18: Durch β - <i>hairpin</i> stabilisierte Faltblattstruktur	38
Abbildung 19: In Dolastatinen gefundene β -Aminosäuren	40
Abbildung 20: Ausgewählte Cryptophycine	40
Abbildung 21: Astine und Cyclochlorotin	41
Abbildung 22: Paclitaxel	42
Abbildung 23: Ausgewählte, natürlich vorkommende β -Aminosäuren	42
Abbildung 24: Schematische Struktur des Leualacins	43
Abbildung 25: Schematische Struktur ¹³⁹ von Astin B	44
Abbildung 26: Struktur und schematische Struktur ¹³⁹ von Cyclochlorotin	44
Abbildung 27: Zuckeraminoinsäuren und induzierte Sekundärstrukturen	45
Abbildung 28: Struktur ¹³⁹ von c-(-Ala-D-Pro-Ala-Ala-SAA-)	45
Abbildung 29: Schematische Struktur ¹³⁹ der Peptide c-(PF ^{β} A ^{β} A) und c-(PPF ^{β} A ^{β} A)	46
Abbildung 30: Schematische Struktur ¹³⁹ von c-(-Pro-Phe- β -Ala-Phe-Phe- β -Ala)	47
Abbildung 31: Schematische Struktur von c-(PFF ^{β} A ^{β} A) im Festkörper und in Lösung	48
Abbildung 32: Schematische Struktur ¹³⁹ von c-(RGD ^{β} L) und c-(RGD ^{β} fV) in Lösung	49
Abbildung 33: Schematische Struktur beider Konformere von c-(AV ^{βH} PFG) in DMSO	49
Abbildung 34: <i>turn</i> -Mimetikum für die Ribonuclease A	50
Abbildung 35: Schematische Darstellung eines Integrins	51
Abbildung 36: Integrin-Superfamilie	52
Abbildung 37: Sekundärstruktur des Integrins $\alpha_v\beta_3$, α -Kette: gelb, β -Kette: blau ¹⁷⁰	54
Abbildung 38: Eptifibatid und Tirofiban, zwei $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten	56
Abbildung 39: Domänenstruktur von ADAMs	57
Abbildung 40: Modell für die Proteinasefunktion der ADAMs (vergl. Text)	59
Abbildung 41: Wechselwirkungen, die in Kraftfeldern Berücksichtigung finden	64
Abbildung 42: Mögliche Orientierungen für Spin-1/2 und Spin-1-Kerne im B-Feld. ²³¹	68
Abbildung 43: Abhängigkeit der Energiedifferenz von der Stärke des B ₀ -Felds ²³¹	70
Abbildung 44: Präzedierende Spins und resultierende Magnetisierung ²³¹	70
Abbildung 45: Vektorzerlegung des B ₁ -Felds ²³¹	71
Abbildung 46: Wirkung eines 90°-Pulses ²³¹	72
Abbildung 47: FID der Kohärenz eines cyclischen Hexapeptids ²³¹	73

Abbildung 48: Energieniveauschema im Zweispinsystem (Solomon-Schema)	76
Abbildung 49: Relaxation im Zweispinsystem	76
Abbildung 50: Maximale Intensitäten für NOE und ROE ²³¹	78
Abbildung 51: Zunahme der konformationellen Einschränkungen	83
Abbildung 52: Potentielle β -Analoge des Prolins	84
Abbildung 53: Cispentacin und Amipurimycin	84
Abbildung 54: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	87
Abbildung 55: Möglicher Übergangszustand der Protonierung	89
Abbildung 56: Anordnung einer bioaktiven Konformation in cyclischen Hexapeptiden	92
Abbildung 57: Bevorzugte Konformation durch Einführung einer D-Aminosäure	93
Abbildung 58: Struktur der <i>repeats</i> 12 bis 14 des Fibronectins	95
Abbildung 59: Cyclopeptid und Peptidomimetikum als $\alpha_4\beta_1$ -Antagonist	95
Abbildung 60: VCAM-1 und postulierte Erkennungssequenz ²⁷³	96
Abbildung 61: Isoleucin und verwendete Mimetika	98
Abbildung 62: Chromatogramm von P6 L	102
Abbildung 63: <i>on-resin</i> Cyclisierung	103
Abbildung 64: MALDI-ToF MS der Cyclisierung von P23	104
Abbildung 65: Chromatogramm der Spritzenpumpen-Cyclisierung von P23 (Rohprodukt)	105
Abbildung 66: Die Pbf-Gruppe	111
Abbildung 67: Chromatogramm von KDK4 L , Synthese am Syntheseautomaten	112
Abbildung 68: Chromatogramm von KDK4 L , manuelle Synthese	112
Abbildung 69: Chromatogramm von KDK4 L , Fmoc-Abspaltung mit Piperazin	113
Abbildung 70: Konzentrationsabhängige Hemmung der Zelladhäsion	114
Abbildung 71: ¹ H-Spektrum von P8 (600 MHz, DMSO)	115
Abbildung 72: COSY-Spektrum von P8 (600 MHz, DMSO)	116
Abbildung 73: TOCSY-Spektrum von P8 (600 MHz, DMSO)	116
Abbildung 74: HMBC-Spektrum von P8 (600 MHz, DMSO)	117
Abbildung 75: Volumina ausgewählter Kreuzsignale des ROESY von P8	118
Abbildung 76: ROESY-Spektrum von P8 (600 MHz, DMSO, Mixzeit 180 ms)	119
Abbildung 77: Vergleich der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen von P7 bis P10	121
Abbildung 78: Vergleich der chemischen Verschiebung der α -Protonen von P7 bis P10	121
Abbildung 79: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von P7 bis P10	122
Abbildung 80: Temperaturgradienten der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen	122
Abbildung 81: Konformation und schematische Struktur von P7	125
Abbildung 82: Konformation von P8	127
Abbildung 83: Konformer A und schematische Struktur von P9	128
Abbildung 84: Konformer B und schematische Struktur von P9	129
Abbildung 85: Konformation von P10	130
Abbildung 86: <i>Overlay</i> der Konformationen von P8 (grau) und P10 (grün)	131
Abbildung 87: <i>Overlay</i> von P9 Konf. B mit der Erkennungsregion des VCAM-1 (grün)	132
Abbildung 88: Vergleich der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen von P1 bis P4	133
Abbildung 89: Vergleich der chemischen Verschiebung der α -Protonen von P1 bis P4	134
Abbildung 90: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von P1 bis P4	134
Abbildung 91: Temperaturgradient der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen	135
Abbildung 92: Konformation und schematische Struktur von P1	136
Abbildung 93: Konformation und schematische Struktur von P2	138
Abbildung 94: Konformation und schematische Struktur von P3	139
Abbildung 95: Konformation und schematische Struktur von P4	141
Abbildung 96: <i>Overlay</i> von P4 mit der Erkennungsregion von VCAM-1 (grün)	142
Abbildung 97: Vergleich der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen von KDK2-4	143

Abbildung 98: Vergleich der chemischen Verschiebung der H ^α -Protonen von KDK2-4	144
Abbildung 99: Vicinale Kopplungskonstanten $^3J_{H^N H^a}$ von KDK2-4	144
Abbildung 100: Temperaturgradient der chemischen Verschiebung der H ^N -Protonen	145
Abbildung 101: Konformation und schematische Struktur von KDK2	146
Abbildung 102: Konformation und schematische Struktur von KDK3	148

7.7 Verzeichnis der Reaktionsschemata

Schema 1: Arndt-Eistert-Homologisierung	6
Schema 2: β^2 -Aminosäuren aus Aspartat als Edukt	7
Schema 3: Synthese substituierter α -Hydroxy- β -aminosäuren	8
Schema 4: Unterschiedlich substituierte β -Aminosäuren durch Curtius-Umlagerung	8
Schema 5: Addition von Enolaten an Imine	9
Schema 6: Reformatzky-Reaktion mit chiralem Auxiliar	9
Schema 7: Addition von C-Nucleophilen an Nitronäquivalente	10
Schema 8: Synthese von Cispentacin durch [3 + 2]-Addition	10
Schema 9: 1,4-Addition eines chiralen Lithiumamids an einen α,β -ungesättigten Ester	11
Schema 10: Cuprat-Addition chiraler Amine	11
Schema 11: Addition unter Verwendung von TMS-SAMP als chiralem Reagenz	12
Schema 12: Addition achiraler Nucleophilen an chirale α,β -ungesättigte Ester	12
Schema 13: Addition von Benzylamin durch diastereoselektive konjugierte Addition	12
Schema 14: Enantioselektive Addition von Aminen	13
Schema 15: Peptidkatalysierte Azidierung	14
Schema 16: Enantioselektive Addition an Nitroalkene	14
Schema 17: Asymmetrische Hydrierung von Acrylestern	15
Schema 18: Reduktive Aminierung mit Borhydridkomplexen	15
Schema 19: Sharpless-Aminohydroxylierung	16
Schema 20: Ausbildung einer Peptidbindung	17
Schema 21: Mesomerie der Peptidbindung	17
Schema 22: Unterschiedliche Orientierungsmöglichkeiten der Peptidbindung	17
Schema 23: Mehrstufenprozess bei der Ausbildung einer Peptidbindung	23
Schema 24: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese	25
Schema 25: Basenkatalysierte Abspaltung der Fmoc-Gruppe	27
Schema 26: Ausbildung einer Peptidbindung durch Carbodiimide	29
Schema 27: Aktivestermethode zur Knüpfung von Peptidbindungen	30
Schema 28: Uronium- und Guanidiumstruktur von HATU	32
Schema 29: Mechanismus der Aktivierung einer Aminosäure mit TBTU	32
Schema 30: Mechanismus der basenkatalysierten Epimerisierung	33
Schema 31: Racemisierung durch 5(4 <i>H</i>)-Oxazolombildung	34
Schema 32: Diketopiperazinbildung	35
Schema 33: Guanylierung des Aminoterminus	35
Schema 34: Aspartimidbildung	36
Schema 35: Synthese von Cispentacin aus Hydroxyoctenal	85
Schema 36: Syntheseweg zur ^c ACAC	86
Schema 37: Ausbildung eines <i>tert</i> -Butylkations	86
Schema 38: Stabilisierung aliphatischer Kationen	86
Schema 39: Einführen der Doppelbindung	87
Schema 40: Reduktive Aminierung	87
Schema 41: Nucleophile Aminierung	88
Schema 42: Abspaltung der Schutzgruppen	89
Schema 43: Darstellung der ^t ACACs	90

7.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis der Aminosäuren und ihrer Abkürzungen	VII
Tabelle 2: Charakteristische Torsionswinkel der wichtigsten Sekundärstrukturen	21
Tabelle 3: Integrine und ihre Liganden ^{166,168}	53
Tabelle 4: ADAMs und Integrine als potentielle Bindungspartner ²⁰⁷	60
Tabelle 5: Modelle auf verschiedenen Näherungsstufen	62
Tabelle 6: Häufigkeiten und Empfindlichkeiten verschiedener Kerne	69
Tabelle 7: Mögliche Mischprozesse im 2D-Experiment	74
Tabelle 8: Cyclische Analoga mit Ausschnitten des VCAM-1-Bindungsepitops	99
Tabelle 9: Lineare Peptidvorläufer der VCAM-1-Bindungsepitop-Peptide	100
Tabelle 10: Ausbeuten der synthetisierten VCAM-1 analogen Peptide	105
Tabelle 11: Ergebnisse des Zelladhäsionstests für die VCAM-1 analogen Peptide	107
Tabelle 12: Synthetisierte Peptide mit mADAM-8-Erkennungssequenz	110
Tabelle 13: Lineare Peptidvorstufen der mADAM 8-Bindungsepitope	111
Tabelle 14: Ausbeuten der synthetisierten KDK-Peptide	113
Tabelle 15: Pentapeptide mit dem C-terminalen Teil der Erkennungsregion des VCAM-1	120
Tabelle 16: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P7	124
Tabelle 17: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P8	126
Tabelle 18: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P9	127
Tabelle 19: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P10	129
Tabelle 20: RMS-Werte für die Peptide P7 bis P10 mit der Erkennungsregion von VCAM-1	131
Tabelle 21: Hexapeptide mit dem C-terminalen Teil der Erkennungsregion des VCAM-1	133
Tabelle 22: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P1	136
Tabelle 23: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P2	137
Tabelle 24: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P3	138
Tabelle 25: Zuordnung der diastereotopen Protonen für P4	140
Tabelle 26: RMS-Werte für die Peptide P1 bis P4 mit der Erkennungsregion von VCAM-1	142
Tabelle 27: Zuordnung der diastereotopen Protonen für KDK2	145
Tabelle 28: Zuordnung der diastereotopen Protonen für KDK3	147
Tabelle 29: Zuordnung der diastereotopen Protonen für KDK4	149
Tabelle 30: Position der β -Aminosäure in den untersuchten Peptiden	153
Tabelle 31: Parameter der verwendeten homonuklearen Experimente	183
Tabelle 32: Parameter der verwendeten heteronuklearen Experimente	183
Tabelle 33: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^c -ACPC-Leu-Asn-Ile-Asp-) P1	184
Tabelle 34: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^l -ACPC-Leu-Asn-Ile-Asp-) P2	184
Tabelle 35: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^c -ACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-) P3	184
Tabelle 36: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^l -ACHC-Leu-Asn-Ile-Asp-) P4	184
Tabelle 37: ¹ H-NMR-Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser-Pro-Leu-Asn-(R)-AMBS-Asp-) P5	185
Tabelle 38: ¹ H-NMR-Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser-Pro-Leu-Asn-(S)-AMBS-Asp-) P6	185
Tabelle 39: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^c -ACPC-Leu-Asn-Asp-) P7	185
Tabelle 40: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^l -ACPC-Leu-Asn-Asp-) P8	185
Tabelle 41: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^c -ACHC-Leu-Asn-Asp-) P9	186
Tabelle 42: ¹ H-NMR-Daten, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^l -ACHC-Leu-Asn-Asp-) P10	186
Tabelle 43: ¹ H-NMR-Daten, $^3J_{H^N H^a}$ von c-(Ser ^c -ACPC-Gln-Ile-Asp-) P11	186

Tabelle 44: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–Ser- ^c ACHC–Gln–Ile–Asp–) P13	186
Tabelle 45: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–Ser- ^t ACHC–Gln–Ile–Asp–) P14	186
Tabelle 46: $^1\text{H-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^c ACHC–Thr–Gln–Ile–Asp–) P19	187
Tabelle 47: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–Ser–Pro–Thr–Gln–(S)-AMBS–Asp–) P22	187
Tabelle 48: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von H–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–OH KDK1	187
Tabelle 49: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK2 ..	187
Tabelle 50: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–Arg–D–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK3 ..	188
Tabelle 51: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $\Delta\delta/\Delta T$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–Arg–Leu–D–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK4 ..	188
Tabelle 52: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Ala–Asp–Lys–) KDK5	188
Tabelle 53: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Ala–Lys–) KDK6	188
Tabelle 54: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Ala–) KDK7	189
Tabelle 55: $^1\text{H-NMR-Daten}$, $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{a}}}$ von c-(–D–Arg–Leu–Ser–Ala–Asp–Ala–) KDK8	189
Tabelle 56: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P1	190
Tabelle 57: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P2	190
Tabelle 58: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P3	190
Tabelle 59: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P4	190
Tabelle 60: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Asn–) P7	190
Tabelle 61: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Asn–) P8	190
Tabelle 62: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Asn–) P9	191
Tabelle 63: $^{13}\text{C-NMR-Daten}$ von c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Asn–) P10	191
Tabelle 64: Distanzen für c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P1	193
Tabelle 65: Distanzen für c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P2	193
Tabelle 66: Distanzen für c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P3	193
Tabelle 67: Distanzen für c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P4	194
Tabelle 68: Distanzen für c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Asn–) P7	194
Tabelle 69: Distanzen für c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Asn–) P8	194
Tabelle 70: Distanzen für c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Asn–) P9	195
Tabelle 71: Distanzen für c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Asn–) P10	195
Tabelle 72: Distanzen für c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK2	195
Tabelle 73: Distanzen für c-(–Arg–D–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK3	196
Tabelle 74: Distanzen für c-(–Arg–Leu–D–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK4	196
Tabelle 75: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P1	197
Tabelle 76: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P2	197
Tabelle 77: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P3	197
Tabelle 78: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Ile–Asn–) P4	197
Tabelle 79: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^c ACPC–Leu–Asp–Asn–) P7	197
Tabelle 80: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^t ACPC–Leu–Asp–Asn–) P8	197
Tabelle 81: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^c ACHC–Leu–Asp–Asn–) P9	197
Tabelle 82: Torsionswinkel für c-(–Ser- ^t ACHC–Leu–Asp–Asn–) P10	197
Tabelle 83: Torsionswinkel für c-(–D–Arg–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK2	198
Tabelle 84: Torsionswinkel für c-(–Arg–D–Leu–Ser–Lys–Asp–Lys–) KDK3	198

8 Literaturverzeichnis

- ¹ A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2. Auflage **1994**.
- ² M. Hein, L. R. Best, S. Pattison, S. Arena, *Introduction to general, organic and biochemistry*, Brooks/Cole Pacific Grove, 7th Edition **2001**.
- ³ E. Juaristi (Ed.), *Enantioselective Synthesis of **b**-Amino Acids*, Wiley VCh New York **1997**.
- ⁴ N. Sewald, *Amino Acids* **1996**, *11*, 397 – 408.
- ⁵ S. Shinagawa, T. Kanamaru, S. Harada, M. Asai, H. Okazaki, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1458 – 1463.
- ⁶ T. Kanamaru, S. Shinagawa, M. Asai, H. Okazaki, Y. Sugiyama, T. Fujita, H. Iwatsuka, M. Yoneda, *Life Sci.* **1985**, *37*, 217 – 223.
- ⁷ F. von Nussbaum, P. Spiteller, M. R uth, W. Steglich, G. Wanner, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3483 – 3485; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 3292 – 3295.
- ⁸ P. Spiteller, M. R uth, F. von Nussbaum, W. Steglich, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2864 – 2866; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 2754 – 2756.
- ⁹ S. Abele, D. Seebach, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1 – 15.
- ¹⁰ M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991 – 8035.
- ¹¹ N. Sewald, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 5972 – 5973; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 5794 – 5795.
- ¹² T. Laue, A. Plagens (Eds.), *Named Organic Reactions*, Wiley Chichester **2000**.
- ¹³ D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. K uhnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 913 – 941.
- ¹⁴ A. M uller, C. Vogt, N. Sewald, *Synthesis* **1998**, 837 – 841.
- ¹⁵ C. W. Jefford, J. McNulty, Z.-H. Lu, J. B. Wang, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1203 – 1216.
- ¹⁶ C. S. Dexter, R. F. Jackson, *Chem. Comm.* **1998**, 75 – 76.
- ¹⁷ D. N oteberg, J. Br analt, I. Kvarnstr om, B. Classon, B. Samuelsson, U. Nillroth, H. Danielson, A. Karl en, A. Hallerg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7975 – 7984.
- ¹⁸ A. F. Abdel-Magid, J. H. Cohen, C. A. Maryanoff, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 955 – 970.
- ¹⁹ V. A. Soloshonok, *Biocatalytic Entry to Enantiomerically Pure **b**-Amino Acids*, in: E. Juaristi (Ed.), *Enantioselective Synthesis of **b**-Amino Acids*, Wiley VCh New York **1997**.
- ²⁰ L. T. Canerva, P. Csom os, O. Sundholm, G. Bern ath, F. F ul op, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1705 – 1716.
- ²¹ G. Cardillo, L. Gentilucci, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2351 – 2353.
- ²² G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 155 – 161.
- ²³ M. A. Pericas, A. Riera, A. Moyano, *Asymmetric Synthesis of **b**-Amino Acids from Catalytical Sharpless Oxidation*, in: E. Juaristi (Ed.), *Enantioselective Synthesis of **b**-Amino Acids*, Wiley VCh New York **1997**.
- ²⁴ M. P. Sibi, P. K. Deshpande, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1461 – 1466.
- ²⁵ F. A. Davis, J. M. Szewczyk, R. E. Reddy, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2222 – 2225.
- ²⁶ F. A. Davis, G. V. Reddy, C.-H. Liang, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5139 – 5142.
- ²⁷ R. M uller, H. Goesmann, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 166 – 169; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 184 – 187.
- ²⁸ Y. Ukaji, S. Takenaka, Y. Horita, K. Inomata, *Chem. Lett.* **2001**, 254 – 255.
- ²⁹ T. Kawakami, H. Ohtake, H. Arakawa, T. Okachi, Y. Imada, S.-I. Murahashi, *Chem.*

- Lett.* **1999**, 795 – 796.
- 30 T. Kawakami, H. Ohtake, H. Arakawa, T. Okachi, Y. Imada, S.-I. Murahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, 73, 2423 – 2444.
- 31 V. K. Aggarwal, S. J. Roseblade, J. K. Barrell, R. Alexander, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1227 – 1229.
- 32 S. G. Davies, O. Ichihara, I. Lenoir, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1994**, 1411 – 1415.
- 33 N. Sewald, K. D. Hiller, B. Helmreich, *Liebigs Ann.* **1995**, 925 – 928.
- 34 N. Sewald, K. D. Hiller, M. Körner, M. Findeisen, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7263 – 7274.
- 35 D. Enders, H. Wahl, W. Bettray, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 527 – 529; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34, 455 – 457.
- 36 G. Gardillo, C. Tomasini, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 117 – 128.
- 37 F. Dumas, B. Mezzahab, J. d'Angelo, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2293 – 2304.
- 38 P. Perlmutter, M. Tabone, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6515 – 6522.
- 39 L. Falborg, K. A. Jørgensen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1996**, 2823 – 2826.
- 40 J. K. Myers, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8959 – 8960.
- 41 D. J. Guerin, T. E. Horstmann, S. J. Miller, *J. Org. Lett.* **1999**, 1, 1107 – 1109.
- 42 T. E. Horstmann, D. J. Guerin, S. J. Miller, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3781 – 3784; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3635 – 3638.
- 43 D. J. Guerin, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2134 – 2136.
- 44 A. Rimkus, N. Sewald, *Org. Lett.* **2003**, 5, 79 – 80.
- 45 G. Zhu, Z. Chen, X. Zhang, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6907 – 6910.
- 46 Y.-G. Zhou, W. Tang, W.-B. Wang, W. Li, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4952 – 4953.
- 47 C. Cimarrelli, G. Palmieri, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5557 – 5563.
- 48 D. Xu, K. Prasad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 1445 – 1451.
- 49 H. S. Lee, P. R. LePlae, E. A. Porter, S. H. Gellman, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3597 – 3599.
- 50 P. R. LePlae, N. Umezawa, H. S. Lee, S. H. Gellman, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5629 – 5632.
- 51 G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 449 – 452; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, 35, 451 – 454.
- 52 P. O'Brien, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 339 – 342; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 326 – 329.
- 53 J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, *Z. Naturforsch* **1963**, 186, 1120 – 1121.
- 54 V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4879 – 4880.
- 55 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149 – 2154.
- 56 H. Brückner, W. A. König, M. Greiner, G. Jung, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 508 – 509; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1979**, 18, 310 – 311.
- 57 L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404 – 3409.
- 58 G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161 – 214.
- 59 A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7357 – 7362.
- 60 G. R. Matsueda, J. M. Stewart, *Peptides* **1981**, 2, 45 – 47.
- 61 M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4009

- 4012.
- 62 K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphoitu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943 – 3946.
- 63 S. S. Wang, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1235 – 1239.
- 64 J. Meienhofer in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Volume 1, E. Gross, J. Meienhofer (ed.), Academic Press, New York **1979**, 197.
- 65 J. Meienhofer in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Volume 1, E. Gross, J. Meienhofer (ed.), Academic Press, New York **1979**, 263.
- 66 D. H. Rich, J. Singh in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Volume 1, E. Gross, J. Meienhofer (ed.), Academic Press, New York **1979**, 241.
- 67 J. Izdebski, D. Kunce, *J. Peptide Sci.* **1997**, *3*, 141 – 144.
- 68 H. Gross, L. Bilk, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 6935 – 6939.
- 69 N. L. Benoiton, *Biopolymers* **1996**, *40*, 245 – 254.
- 70 M. Bodanzky in: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Volume 1, E. Gross, J. Meienhofer (ed.), Academic Press, New York **1979**, 105
- 71 B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219 – 1222.
- 72 R. Steinhauer, F. M. F. Chen, N. L. Benoiton, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 295 – 299.
- 73 F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853 – 4856.
- 74 L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457 – 461; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 441 – 445.
- 75 C. Griehl, J. Weight, H. Jeschkeit, *J. High Res. Chrom.* **1994**, *17*, 700 – 704.
- 76 H. Gausepohl, M. Kraft, R. Frank, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 287 – 294.
- 77 F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678 – 9683.
- 78 J. P. Tam, M. W. Riemen, R. B. Merrifield, *Pept. Res.* **1989**, *1*, 6 – 18.
- 79 P. D. White, W. C. Chan in: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, P. D. White, W. C. Chan (ed.), Oxford University Press, Oxford **2000**, 36 – 38.
- 80 C. Guarnaccia, <http://www.abrf.org/archives/hmail/97016/0124.html>.
- 81 K. Möhle, R. Günther, M. Thormann, N. Sewald, H.-J. Hofmann, *Biopolymers* **1999**, *50*, 167 – 184.
- 82 D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071 – 13072.
- 83 D. H. Appella, J. J. Barchi, S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309 – 2310.
- 84 D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J. L. Matthews, J. V. Schreiber, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932 – 982.
- 85 D. Seebach, J. V. Schreiber, S. Abele, X. Daura, W. F. van Gunsteren, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 34 – 57.
- 86 D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913 – 941.
- 87 D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Anstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043 – 2066.
- 88 L. A. Christianson, M. J. Lucero, D. H. Appella, D. A. Klein, S. H. Gellman, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 763 – 773.
- 89 D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, M. R. Richards, D. R. Powell, S. H.

- Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574 – 7581.
- 90 J. J. Barchi, X. L. Huang, D. H. Appella, L. A. Christianson, A. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711 – 2718.
- 91 D. Seebach, K. Gademann, J. V. Schreiber, J. L. Matthews, T. Hintermann, B. Jaun, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033 – 2038.
- 92 T. D. W. Claridge, J. M. Goodman, A. Moreno, D. Angus, S. F. Barker, C. Taillefumier, M. P. Watterson, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251 – 4255.
- 93 S. Abele, P. Seiler, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559 – 1571.
- 94 S. Krauthäuser, L. A. Christianson, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719 – 11720.
- 95 H. Bestian, *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 304 – 312; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1968**, *7*, 278 – 286.
- 96 J. Masamoto, K. Sasaguri, C. Ohizumi, H. Kobayashi, *J. Polym. Sci. A2* **1970**, *8*, 1703 – 1710.
- 97 J. D. Glickson, J. Applequist, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3276 – 3281.
- 98 D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1700 – 1703; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 1595 – 1597.
- 99 S. De Pol, C. Zorn, C. D. Klein, O. Zerbe, O. Reiser, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 517 – 520; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 511 – 514.
- 100 A. Hayen, M. A. Schmitt, F. N. Ngassa, K. A. Thomasson, S. H. Gellman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 511 – 516; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505 – 510.
- 101 W. Gulewitsch, S. Amiradzibi, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1902 – 1903.
- 102 J. R. Steiner, C. L. Barnes, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *31*, 212 – 219.
- 103 H. C. Chen, C. K. Chou, C. M. Sun, S. F. Yeh, *Antiviral Res.* **1997**, *34*, 137 – 144.
- 104 J. P. Springer, R. . Cole, J. W. Dorner, R. H. Cox, J. L. Richard, C. L. Barnes, D. van der Helm, *J. Am Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2388 – 2392.
- 105 S. B. Krasnoff, S. Gupta, *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 1953 – 1962.
- 106 J. G. Stroh, K. L. Rinehart Jr., J. C. Cook, T. Kihara, M. Suzuki, T. Arai, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 858 – 859.
- 107 H. Sone, T. Nemoto, H. Ishiwata, M. Ojika, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8449 – 8452.
- 108 T. Turner, W. H. Jackson, G. R. Pettit, A. Wells, A. S. Kraft, *Prostate* **1998**, *34*, 175 – 181.
- 109 G. R. Pettit, Y. Kamano, H. Kizu, C. Dufrene, C. L. Herald, R. J. Bontems, J. M. Schmidt, F. E. Boettner, R. A. Nieman, *Heterocycles* **1989**, *28*, 553 – 558.
- 110 D. C. Carter, R. E. Moore, J. S. Mynderse, W. P. Niemczura, J. S. Todd, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 236 – 241.
- 111 J. S. Mynderse, A. H. Hunt, R. E. Moore, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1299 – 1301.
- 112 G. R. Pettit, J. P. Xu, F. Hogan, M. D. Williams, D. L. Doubek, J. M. Schmidt, R. L. Cerny, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 752 – 754.
- 113 W. H. Gerwick, Z. D. Jiang, S. K. Agarwal, B. T. Farmer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2313 – 2324.
- 114 C. A. Mast, *Beiträge zu einer Totalsynthese von Cryptophycin*, Dissertation Universität Bielefeld **2003**.
- 115 F. Besson, G. Michel, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 437 – 442.
- 116 M. Hourdou, F. Besson, G. Michel, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 207 – 211.
- 117 M. Hourdou, F. Besson, I. Tenoux, G. Michel, *Lipids* **1989**, *24*, 940 – 944.
- 118 I. Tenoux, F. Besson, G. Michel, *Microbios* **1993**, *74*, 29 – 37.

- ¹¹⁹ F. Besson, G. Michel, *Microbios* **1990**, *62*, 93 – 99.
- ¹²⁰ P. Crews, L. V. Manes, M. Boehler, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2797 – 2800.
- ¹²¹ V. R. Scott, R. Böhme, T. R. Matthews, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1154 – 1157.
- ¹²² A. M. Senderowicz, G. Kaur, E. Sainz, C. Laing, W. D. Inman, J. Rodriguenz, P. Crews, L. Malspeis, M. R. Grever, E. A. Sausville, *J. Nat. Cancer. Inst.* **1995**, *87*, 46 – 51.
- ¹²³ A. Holzinger, U. Meindl, *Cell. Motil. Cytoskeleton* **1997**, *38*, 365 – 372.
- ¹²⁴ A. Hoshi, K. Kuretani, *Farmacis* **1973**, *9*, 464 – 470.
- ¹²⁵ H. Morita, S. Nagashima, K. Takeya, H. Itokawa, Y. Iitaka, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1121 – 1132.
- ¹²⁶ H. Yoshioka, K. Nakatsu, M. Sato, T. Tatsuno, *Chem. Lett.* **1972**, *1*, 1319 – 1322.
- ¹²⁷ F. Rossi, G. Zanotti, M. Saviano, R. Iacovino, P. Palladino, G. Saviano, P. Amodeo, T. Tancredi, P. Laccetti, C. Corbier, E. Benedetti, *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 92 – 102.
- ¹²⁸ A. Fredenhagen, S. Y. Tumara, P. T. M. Kenny, H. Komura, Y. Naya, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4409 – 4411.
- ¹²⁹ J. Needham, M. T. Kelly, M. Ishige, R. J. Andersen, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2058 – 2063.
- ¹³⁰ M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325 – 2327.
- ¹³¹ H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 97 – 99.
- ¹³² J. N. Denis, A. E. Greene, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, L. Mangatal, P. Potier, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5917 – 5919.
- ¹³³ S. Kondo, S. Shibahara, S. Takahashi, K. Maeda, H. Umezawa, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6305 – 6306.
- ¹³⁴ S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1919 – 1922.
- ¹³⁵ G. L. Helms, R. E. Moore, W. P. Niemczura, G. M. L. Patterson, K. B. Tomer, M. L. Gross, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1298 – 1307.
- ¹³⁶ R. E. Moore, V. Bornemann, W. P. Niemczura, J. M. Gregson, J. Chen, T. R. Norton, G. M. L. Patterson, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6128 – 6132.
- ¹³⁷ K. Hamano, M. Kinoshita, M. Furuya, M. Miyamoto, Y. Takamatsu, A. Hemmi, K. Tanzawa, *J. Antibiotics* **1992**, *45*, 899 – 905.
- ¹³⁸ K. Yoda, H. Haruyama, H. Kuwano, K. Hamano, K. Tanzawa, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6537 – 6548.
- ¹³⁹ F. Schumann, *Modifizierung cyclischer RGD-Peptide durch b-Aminosäuren: Konformationsanalyse mittels NMR-Spektroskopie und Molecular Modelling*, Dissertation Universität Leipzig **1999**.
- ¹⁴⁰ H. Morita, S. Nagashima, K. Takeya, H. Itokawa, Y. Iitaka, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11613 – 11622.
- ¹⁴¹ S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491 – 514.
- ¹⁴² E. Graf von Roedern, E. Lohof, G. Hessler, M. Hoffmann, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10156 – 10167.
- ¹⁴³ E. Graf von Roedern, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 684 – 685; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33*, 670 – 671.
- ¹⁴⁴ H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Goodman, G. Hölzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Müller, E. Graf von Roedern, J. Wermut, *J. Lett. Pept.* **1995**, *2*, 155 – 160.
- ¹⁴⁵ V. Pavone, A. Lombardi, X. Yang, C. Pedone, B. di Blasio, *Biopolymers* **1990**, *30*, 189 –

- 196.
- ¹⁴⁶ B. di Blasio, A. Lombardi, X. Yang, C. Pedone, V. Pavone, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1181 – 1188.
- ¹⁴⁷ V. Pavone, A. Lombardi, G. D'Auria, M. Saviano, F. Natri, L. Paolillo, B. di Blasio, C. Pedone, *Biopolymers* **1992**, *32*, 173 – 183.
- ¹⁴⁸ B. di Blasio, A. Lombardi, G. D'Auria, M. Saviano, C. Isernia, O. Maglio, L. Paolillo, C. Pedone, V. Pavone, *Biopolymers* **1993**, *33*, 621 – 631.
- ¹⁴⁹ V. Pavone, A. Lombardi, M. Saviano, B. di Blasio, F. Natri, R. Fattorusso, O. Maglio, C. Isernia, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1505 – 1515.
- ¹⁵⁰ V. Pavone, A. Lombardi, M. Saviano, B. di Blasio, F. Natri, R. Fattorusso, O. Maglio, C. Isernia, L. Paolillo, C. Pedone, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1517 – 1526.
- ¹⁵¹ A. Lombardi, M. Saviano, F. Natri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Pedone, C. Isernia, V. Pavone, *Biopolymers* **1996**, *38*, 683 – 691.
- ¹⁵² A. Lombardi, M. Saviano, F. Natri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Isernia, L. Paolillo, V. Pavone, *Biopolymers* **1996**, *38*, 693 – 703.
- ¹⁵³ F. Schumann, A. Müller, M. Kokschi, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009 – 12010.
- ¹⁵⁴ R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440 – 1456; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 1374 – 1389.
- ¹⁵⁵ M. Malešević, Z. Majer, E. Vass, U. Strijowski, F. Schumann, M. Hollosi, N. Sewald, in *Vorbereitung*.
- ¹⁵⁶ M. Malešević, *b-Amino Acids as Secondary Structure Inducers in Peptides*, Dissertation Universität Bielefeld **2003**.
- ¹⁵⁷ E. Abderhalden, F. Reich, *Fermentforschung* **1928**, *10*, 173.
- ¹⁵⁸ E. Abderhalden, R. Fleischermann, *Fermentforschung* **1928**, *10*, 195.
- ¹⁵⁹ J. Frackenpohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber, D. Seebach, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 445 – 455.
- ¹⁶⁰ J. V. Schreiber, J. Frackenpohl, F. Moser, T. Fleischmann, H.-P. E. Kohler, D. Seebach, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 424 – 432.
- ¹⁶¹ M. Ondetti, S. L. Engel, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 761 – 772.
- ¹⁶² K. Stachowiak, M. C. Kosla, K. Plucinska, P. A. Khairallah, F. M. Bumpus, *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1128 – 1130.
- ¹⁶³ U. Arnold, K. P. Rücknagel, A. Schierhorn, R. Ulbrich-Hofmann, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 862 – 869.
- ¹⁶⁴ Y. Markert, J. Köditz, J. Mansfeld, U. Arnold, R. Ulbrich-Hofmann, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 791 – 796.
- ¹⁶⁵ U. Arnold, M. P. Hinderaker, B. L. Nilsson, B. R. Huck, S. H. Gellman, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8522 – 8523.
- ¹⁶⁶ N. Sewald, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **2002**, *50*, 449 – 453.
- ¹⁶⁷ E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* **1995**, *373*, 539 – 544.
- ¹⁶⁸ R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11 – 25.
- ¹⁶⁹ P. D. Kassner, S. Kawaguchi, M. E. Hemler, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19859 – 19867.
- ¹⁷⁰ J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachmiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339 – 345.
- ¹⁷¹ T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 65 – 72.
- ¹⁷² M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30 – 33.
- ¹⁷³ M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies,

- G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107 – 114.
- 174 M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033 – 3040.
- 175 J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906 – 908.
- 176 M. Trikha, J. Timar, S. K. Lundy, K. Szekeres, K. Tang, D. Grignon, A. T. Porter, K. V. Honn, *Canc. Res.* **1996**, *56*, 5071 – 5078.
- 177 M. Trikha, J. Timar, S. K. Lundy, K. Szekeres, Y. Cai, K.V. Honn, *Canc. Res.* **1997**, *56*, 2522 – 2528.
- 178 M. Poncz, R. Eisman, R. Heidenreich, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8476 – 8482.
- 179 J. S. Bennett, *Seminars in Hematology* **1990**, *27*, 186 – 204.
- 180 J. J. Calvete, A. Henschen, J. Gonzales-Rodriguez, *Biochem. J.* **1989**, *261*, 561 – 568.
- 181 J. J. Calvete, A. Henschen, J. Gonzales-Rodriguez, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 63 – 71.
- 182 E. I. B. Perschke, *Seminars in Haematology* **1985**, *23*, 241 – 259.
- 183 E. F. Plow, M. D. H. Ginsberg, G. A. Marguerie, *Biochemistry of Platelets* Academic Press **1986**, 225 – 256.
- 184 S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, T. A. Burke, *Science* **1988**, *242*, 91 – 93.
- 185 S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, T. A. Burke, E. F. Plow, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 3440 – 3446.
- 186 B. P. Eliceiri, D. A. Cheresch, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227 – 1230.
- 187 H. P. Erickson, M. A. Bourdon, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1989**, *5*, 71 – 92.
- 188 D. J. Leahy, W. A. Hendrickson, I. Aukjil, H. P. Erickson, *Science* **1992**, *258*, 987 – 991.
- 189 D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195 – 228.
- 190 C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 169 – 173; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 165 – 169.
- 191 W. M. Miller, R. M. Keenan, R. N. Willette, M. W. Lark, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 397 – 408.
- 192 S. Silletti, T. Kessler, J. Goldberg, D. L. Boger, D. A. Cheresch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 119 – 124.
- 193 S. K. Akiyama, S. S. Yamada, W.-T. Chen, K. M. Yamada, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 863 – 875
- 194 Z. Zhang, A. O. Morla, K. Vuori, J. S. Bauer, R. L. Juliano, E. Ruoslahti, *E. J. Cell Biol.* **1993**, *122*, 235 – 242.
- 195 E. L. George, E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, *119*, 1079 – 1091.
- 196 J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, *119*, 1093 – 1105.
- 197 J. Bauer, M. Margolis, C. Schreiner, C. J. Edgell, J. Azizkhan, E. Lazarowski, R. L. Juliano, *J. Cell. Physiol.* **1992**, *153*, 437 – 449.
- 198 M. A. Schwartz, C. Lechene, D. E. Ingber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7849 – 7853.
- 199 Y. Shimizu, G. A. van Seventer, K. J. Horgan, S. Shaw, *Nature* **1990**, *345*, 250 – 253.
- 200 http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html.
- 201 T. G. Wolfsberg, P. D. Straight, R. L. Gerena, A. P. Huovila, P. Primakoff, D. G. Myles, J. M. White, *Dev. Biol.* **1995**, *169*, 378 – 383.
- 202 J. Schlöndorff, C. P. Blobel, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 3603 – 3617.
- 203 B. L. Tang, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 33 – 44.
- 204 W. Stöcker, F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Ruth, D. B. McKay, W. Bode, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 823 – 840.
- 205 W. Stöcker, W. Bode, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 383 – 390.

- 206 H. Nagase, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 151 – 160.
- 207 U. Schlomann, *The Role of Matrix- and Disintegrin-Metalloproteinases in Neurodegenerative Diseases*, Dissertation Universität Bielefeld **2002**.
- 208 R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, D. P. Cerretti, *Nature* **1997**, *385*, 729 – 733.
- 209 M. A. McLane, C. Marcinkiewicz, S. Vijay-Kumar, I. Wierzbicka-Patynowski, S. Niewiarowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1998**, *219*, 109 – 119.
- 210 X. P. Xhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7345 – 7350.
- 211 D. Nath, P. M. Slocombe, P. E. Stephens, A. Warn, G. R. Hutchinson, K. M. Yamada, A. F. Docherty, G. Murphy, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 579 – 587.
- 212 P. Primakoff, D. G. Myles, *TIG* **2000**, *16*, 83 – 87.
- 213 K. K. Nelson, J. Schlondorff, C. P. Blobel, *Biochem. J.* **1999**, *343*, 673 – 680.
- 214 W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1020 – 1055; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1990**, *29*, 992 – 1023.
- 215 M. Born, R. Oppenheimer, *Ann. Phys.* **1927**, *84*, 457 – 484.
- 216 <http://europa.chem.uga.edu/ccmsd/mm2mm3.html>.
- 217 S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230 – 252; <http://www.amber.ucsf.edu/amber/amber.html>.
- 218 B. R. Brooks, R. E. Bruccelori, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1987**, *7*, 187 – 217; <http://www.pharmacy.umaryland.edu/~alex/research.html>.
- 219 G. M. Crippen, *J. Comp. Phys.* **1977**, *24*, 96 – 107.
- 220 T. F. Havel, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, *56*, 43 – 78.
- 221 G. M. Crippen in: D. Bawden (Hrsg.): *Chemometric Research Studies Series*, Wiley, New York **1983**.
- 222 T. Havel, I. D. Kuntz, G. M. Crippen, *Bull. Math. Biol.* **1983**, *45*, 665 – 720.
- 223 T. Havel, K. Wüthrich, *Bull. Math. Biol.* **1984**, *46*, 673 – 698.
- 224 S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, Jr., M. P. Vecchi, *Science* **1983** *220*, 671 – 680.
- 225 D. Vanderbilt, S. G. Louie, *J. Comp. Phys.* **1984**, *56*, 259 – 271.
- 226 V. Cerny, *J. Opt. Theory Appl.* **1985**, *45*, 41 – 51.
- 227 A. DiNola, H. J. C. Berendsen, O. Edholm, *Macromolecules* **1984**, *17*, 2044 - 2050.
- 228 G. Löffler, *Theor. Chem. Acc.* **1999**, *101*, 163 – 169.
- 229 M. Schäfer, C. Bartels, M. Karplus, *Theor. Chem. Acc.* **1999**, *101*, 194 – 204.
- 230 K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3462 – 3486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3340 – 3363.
- 231 H. Kessler, G. Gemmecker, *Organische Chemie IV – NMR-Spektroskopie*, Skriptum zur Vorlesung, Universität München **2000**.
- 232 J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio **1995**.
- 233 H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509 – 520; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512 – 523.
- 234 M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1813 – 1838; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1671 – 1695.
- 235 M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11 – 15.
- 236 M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870 – 2871.

- 237 I. Solomon, *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559 – 565.
- 238 A. A. Bother-By, R. L. Stevens, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811 – 813.
- 239 A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Res.* **1985**, *63*, 207 – 213.
- 240 D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers Inc., New York **1989**.
- 241 H. Kessler, J. W. Bats, C. Griesinger, S. Koll, M. Will, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1033 – 1049.
- 242 W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1975**, *64*, 2229 – 2246.
- 243 L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Res.* **1983**, *53*, 521 – 528.
- 244 A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Res.* **1985**, *65*, 355 – 360.
- 245 D. F. Mierke, G. Nöbner, P. W. Schiller, M. Goodman, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 35 – 45.
- 246 T. Yamazaki, A. Pröbstl, P. W. Schiller, M. Goodman, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 364 – 381.
- 247 F. Fülöp, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181 – 2204.
- 248 M. Konishi, M. Nishio, K. Saitoh, T. Miyaki, T. Oki, H. Kawaguchi, *J. Antibiotics* **1989**, *42*, 1749 - 1755.
- 249 T. Oki, M. Hirano, K. Tomatsu, K. Numata, H. Kamei, *J. Antibiotics* **1989**, *42*, 1756 – 1762.
- 250 T. Iwamoto, E. Tsujii, M. Ezaki, A. Fujie, S. Hashimoto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Imanaka, K. Kawabata, Y. Inamoto, K. Sakane, *J. Antibiotics* **1990**, *43*, 1 – 7.
- 251 K. Kawabata, Y. Inamoto, K. Sakane, T. Iwamoto, S. Hashimoto, *J. Antibiotics* **1990**, *43*, 513 – 518.
- 252 A. M. Brückner, H. W. Schmitt, U. Diederichsen, *Helv. Chim. Acta*, 2002, **85**, 3855 – 3866.
- 253 T. Konosu, S. Oida, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1012 – 1018.
- 254 P. Tromm, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 2071 – 2084.
- 255 Autorenkollektiv, *Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 18. Auflage **1990**.
- 256 C. M. Cain, R. P. C. Cousins, G. Coumbarides, N. S. Simpkins, *Tetrahedron* **1990**, *46/2*, 523 – 544.
- 257 U. Strijowski, *2-Aminocycloalkancarbonsäuren als Prolinmimetika für cyclische Peptide*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2001**.
- 258 H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509 – 520; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512 – 523.
- 259 R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440 – 1456; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374 – 1389.
- 260 G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709 – 730.
- 261 R. Schwyzer, P. Sieber, B. Gorup, *Chimia* **1958**, *12*, 90 – 91.
- 262 M. E. Hemler, C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, J. L. Strominger, M. L. Clabby, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11478 – 11485.
- 263 T. B. Issekutz, M. Miyasaka, A. C. Issekutz, *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 2175 – 2184.
- 264 E. A. Wayner, A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald, W. G. Carter, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 1321 – 1330.
- 265 M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, R. Lobb, *Cell* **1990**, *60*, 577 – 584.
- 266 G. W. Holland, R. J. Biediger, P. Vanderslice, *Ann. Rep. Med. Chem.* **2002**, *37*, 65 – 74.

- 267 A. Sharma, J. A. Askari, M. J. Humphries, E. Y. Jones, D. I. Stuart, *EMBO J* **1999**, *18*, 1468 – 1479; 1FNH, Brookhaven Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- 268 J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3988 – 3991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *20*, 3870 – 3873.
- 269 R. O. Hynes, *Cell*, **1992**, *69*, 11 – 25.
- 270 R. R. Lobb, G. Antognetti, R. B. Pepinsky, L. C. Burkly, D. R Leone, A. Whitty, *Cell Adhesion Commun.* **1995**, *3*, 385 – 397.
- 271 J. M. Clements, P. Newham, M. Shepherd, R. Gilbert, T. Dudgeon, L. A. Needham, R. M. Edwards, L. Berry, A. Brass, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 2127 – 2135.
- 272 H. H. Chiu, D. T. Crowe, M. E. Renz, L. G. Presta, S. Jones, I. L. Weismann, S. Fong, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 5257 – 5267.
- 273 E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* **1995**, *373*, 539; 1VCA, Brookhaven Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- 274 D. M. Nowlin, F. Gorcsan, M. Moscinski, S.-L. Chiang, T. J. Lobl, P. M. Cardarelli, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20352 – 20359.
- 275 P. M. Cardarelli, R. R. Cobb, D. M. Nowlin, W. Scholz, F. Gorcsan, M. Moscinski, M. Jasuhara, S.-L. Chiang, T. J. Lobl, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18668 – 18673.
- 276 J. H. Viles, J. B. O Mitchell, S. L. Gough, P. M. Doyle, C. J. Harris, P. J. Sadler, J. M. Thornton, *Eur. J. Biochem* **1996**, *242*, 352 – 362.
- 277 C. Quan, N. J. Skelton, K. Clark, D. Y. Jackson, M. E. Renz, H. H. Chiu, S. M. Keating, M. H. Beresini, S. Fong, D. R. Artis, *Biopolymers* **1998**, *47*, 265 – 275.
- 278 J. N. Lambert, J. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 471 – 484.
- 279 N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley VCH, Weinheim **2002**.
- 280 J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471 – 501.
- 281 A. Müller, F. Schumann, M. Kokschi, N. Sewald, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 275 – 281.
- 282 M. Malešević, U. Strijowski, D. Bächle, N. Sewald, *J. Biotechnol.*, im Druck.
- 283 S. Yoshida, M. Setoguchi, Y. Higushi, S. Akizuki, S. Yamamoto, *Int. Immunol.* **1990**, *2*, 585 – 591.
- 284 U. Schlomann, D. Wildeboer, A. Webster, O. Antropova, D. Zeuschner, C. G. Knight, A. J. P. Docherty, M. Lambert, L. Skelton, H. Jockusch, J. W. Bartsch, *J. Biol. Chem.* **2002** *277*, 48210 – 48219.
- 285 A. Zolkiewska, *Exp. Cell. Res.* **1990**, *252*, 423 – 431.
- 286 G. Gollasch, *Synthese linearer und cyclischer Peptide zur biochemischen Charakterisierung von ADAM 8*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2001**.
- 287 K. W. F. Kohlrausch, R. Skrabal, *Monatsh. Chemie* **1937**, *70*, 44 – 53.
- 288 R. C. de L. Milton, E. Becker, S. C. F. Milton, J. E. J. Baxter, J. F. Elsworth, *Int. J. Peptide Proteine Res.* **1987**, *30*, 431 – 432.
- 289 S. M. McElvain R. E. Starn Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4571 – 4578.
- 290 H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comp. Phys. Comm.* **1995**, *91*, 43 - 56.
- 291 E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Mod.*, **2001**, *7*, 306 – 317.