

**Konformationsanalyse von C(4)-substituierten
Prolinderivaten und ihre strukturdirigierenden
Eigenschaften auf die Polyprolin II Helix - Entwicklung
funktionalisierbarer molekularer Gerüste**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Michael Kümin

aus Wollerau (SZ)

Basel 2009

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf
Antrag von:

Prof. Dr. Helma Wennemers

Prof. Dr. Bernd Giese

Basel, den 26. Mai 2009

Prof. Dr. Eberhard Parlow

Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Helma Wennemers in der Zeit von April 2005 bis Mai 2009 am Departement Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

M. Kumin, L.-S. Sonntag, H. Wennemers, "Azidoproline Containing Helices – Stabilization of the Polyproline II Structure by a Functionalizable Group", *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *127*, 466-467.

X. Y. Gong, D. Dobrunz, M. Kumin, M. Wiesner, J. D. Revell, H. Wennemers, P. Hauser, "Distinguishing stereoisomers of di-, tri-, and tetrapeptides using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection", *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 565-573.

R. S. Erdmann, M. Kumin, H. Wennemers, "(4*R*)- and (4*S*)-Azidoprolines – Conformation Directing Amino Acids and Sites for Functionalization", *Chimia* **2009**, *63*, 197-200.

M. Kuemin, Y. A. Nagel, F. W. Monnard, J. Kleimark, P.-O. Norrby, H. Wennemers, „Hydrogen Bond Donating Substituents in the γ -Position of Proline Influence the *cis:trans* Conformer Ratio of Xaa-Pro Amide Bonds”, *Manuskript in Vorbereitung*

M. Kuemin, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, H. Wennemers, „Effects of Terminal Functional Groups on the Stability of the Polyproline II Structure – A Combined Experimental and Theoretical Study“, *Manuskript in Vorbereitung*.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Poster: "Azidoproline as a Structure-Directing Element in Polyproline"
SCS Fall Meeting 2005, Lausanne, October 13th, **2005**.

Poster: “Functionalized Polyprolines – Switchable and Conformationally Well-defined Molecular Scaffolds”

10th Swiss Receptor Workshop, Basel, March 12-15, **2006**.

Oral presentation: “4-Azidoproline containing Polyprolines: Stabilisation of the PPII Helix by (4*R*)Azp and Development of Molecular Scaffolds“

Séminaire hors-ville du 3^{ème} cycle en Chimie I 2006, Villars, September 3-7, **2006**.

Oral presentation: “Functionalized Polyprolines – Switchable and Conformationally Well-defined Molecular Scaffolds”

SCS Fall Meeting 2006, Zürich, October 13th, **2006**.

Poster: “4-Azidoproline containing Polyprolines: Stabilisation of the PPII Helix by (4*R*)Azp and Development of Molecular Scaffold”

Regio Symposium, Rheinfelden (D), September 20-22, **2006**; und

1st “Annual Novartis Graduate Fellowship Day” in Basel, October 19-20, **2006**.

Poster: “Azidoproline Containing Helices – Stabilization of the Polyproline II Structure by a Functionalizable Group”

1st Japanese-Swiss Symposium on Chemical Biology, Lausanne, June 24-26, **2007**.

Poster: “Investigating the transition between the two helical conformations of Polyproline”

SCS Fall Meeting 2007, Lausanne, September 12th, **2007**.

Poster: “Azidoproline Containing Helices – Stabilization of the Polyproline II Structure by a Functionalizable Group”

20th international symposium on Chirality, Geneva, July 6-9, **2008**.

Poster: “Effects of Terminal Functional Groups on the Stability of the Polyproline II Structure”

SCS Fall Meeting 2008, Zürich, September 11th, **2008**; und

9th German Peptid Symposium, Göttingen, March 11-14, **2009**.

Für meine Eltern

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Helma Wennemers für die interessante Themenstellung und ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ihre begeisternde Art Fragen anzugehen und die anregenden Diskussionen haben mich über die gesamte Dissertation begleitet.

Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für die Übernahme des Co-Referates.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wennemers bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit, die wir miteinander verbringen durften. Yvonne Nagel und Roman Erdmann danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Bei Roman Erdmann, Fabien Monnard, Sandro Gabutti und Jan Philip Kraack bedanke ich mich für ihre Hilfe im Rahmen von Masterarbeiten bzw. Praktika. Dr. Louis-Sebastian Sonntag, Dr. Jefferson Revell, Dr. Jana Lubkoll und Dr. Kirsten Belser danke ich für das Einarbeiten in analytische Instrumente und allgemeine Arbeitstechniken.

Ein besonderer Dank geht an alle, mit denen ich in einer Kooperation zusammenarbeiten durfte: Eva Schillinger und Prof. Dr. Peter Bäumler (Universität Ulm), Dr. Sabine Schweizer und Prof. Dr. Christian Ochsenfeld (Universität Tübingen), Prof. Jürgen Engel (Universität Basel, Biozentrum), Dr. Annett Bachmann und Prof. Dr. Thomas Kiefhaber (Technische Universität München), Prof. Per-Ola Norrby (University of Gothenburg) sowie Dr. Sonia Nieto und Prof. Dr. Eric Anslyn (University of Texas at Austin).

Allen Mitarbeitern der Werkstatt, der Materialausgabe und des Sekretariats danke ich für ihre Hilfe; insbesondere Francis Cabrera, der mehrmals bei technischen Problemen unsere Instrumente rasch wieder in Stand gesetzt hat. Dr. Daniel Häussinger und Dr. Klaus Kulicke danke ich für NMR Messungen, Markus Neuburger und Dr. Silvia Schaffner für die Kristallstrukturanalysen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Novartis AG (Stipendium) sowie dem Schweizerischen Nationalfonds, der Universität Basel und der Bachem AG.

Ein grosses Dankeschön auch an meine Eltern für ihre wertvolle Unterstützung, euch ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Die Aminosäure Prolin	4
1.2. Das <i>s-cis:s-trans</i> Gleichgewicht von Prolylamidbindungen	5
1.2.1. Einfluss eines stereoelektronischen Effekts: $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung	5
1.2.2. Einfluss der Sterik	7
1.2.3. 4-Azidoprolin: Einfluss des azido gauche Effekts auf das <i>s-cis:s-trans</i> Gleichgewicht	8
1.2.4. 4-substituierte Prolinderivate: allgemeiner Zusammenhang von Pyrrolidin Ring Konformation und <i>s-cis:s-trans</i> Gleichgewicht	12
1.3. Polyprolin: Struktur und Bedeutung für biologische Prozesse	14
1.4. Derivatisierung von Azidoprolin Einheiten und die Bedeutung molekularer Gerüste	17
1.5. Dissertationsprojekt	18
2. 4-Azidoprolin in Polyprolin Helices	20
2.1. Arbeitshypothese	20
2.2. Synthese der 4-Azidoprolin-haltigen Oligomere	20
2.3. Einfluss auf die Stabilität der helicalen Strukturen	23
2.3.1. Methode zum Vergleich der Stabilität unterschiedlicher Peptide	23
2.3.2. CD Lösungsmittelstudien zum Vergleich der konformationellen Eigenschaften der Peptide 9-12	26
2.3.3. Betrachtungen der helicalen Peptide mittels NMR Spektroskopie	28
3. Analyse des <i>s-cis:s-trans</i> Gleichgewichts von Prolylamidbindungen in acetylierten Aminosäurederivaten und kurzen Peptiden	30
3.1. Untersuchung von Prolinderivaten mit einem N-haltigen Substituenten an der γ -Position	31
3.1.1. Synthese der γ -substituierten Prolinderivate 13-24	31
3.1.2. Konformationsanalyse von Prolinderivaten mit einem Triazolylsubstituenten an C^γ	32
3.1.3. Konformationsanalyse der acylierten 4-Aminoprolinderivate 21-23	36
3.1.4. Konformationsanalyse der 4-Aminoprolinderivate 24	40
3.2. Einfluss einer Wasserstoffbrücke in Ac-Hyp-OMe?	41
3.3. Einfluss des Methylesters im Vergleich zu weniger elektrophilen Carbonsäurederivaten auf die Konformation	44
3.3.1. Synthese der Carbonsäurederivate 28 und 29	45
3.3.2. Konformationsanalyse der Carbonsäurederivate 28 und 29	45
3.4. <i>s-cis:s-trans</i> Isomerie einer Prolylamidbindung in einem kurzen Peptid	49
3.4.1. Theoretischer Teil zum Chymotrypsin Experiment	49
3.4.2. Synthese der Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA Peptide 32-35	51
3.4.3. Resultate und Diskussion der Chymotrypsin Experimente	52
3.5. Zusammenfassung Kapitel 3	56
4. Funktionalisierung der helicalen Struktur	58
4.1. Die Polyprolin Helix als molekulares Gerüst	58
4.2. 4-Aminoprolin in Polyprolin Helices	60
4.2.1. Synthese von Oligoprolinen mit 4-Aminoprolin Einheiten	60
4.2.2. Konformationsanalyse der 4-Aminoprolin-haltigen Oligoproline 24S und 24R ..	61
4.3. 4-Acetamidoprolin in Polyprolin Helices	62

4.3.1. Synthese von Oligoprolinen mit 4-Acetamidoprolin Einheiten	62
4.3.2. Konformationsanalyse der Oligoacetamidoprolin 43S und 43R	63
4.4. Funktionalisierung über „Click“ Chemie	64
4.4.1. „Click“ Reaktion in Lösung	64
4.4.2. „Click“ Reaktion an der Festen Phase.....	65
5. Untersuchungen zum Einfluss von Ladungen, Temperatur, Kettenlänge sowie der Position der 4-Azidoprolin Einheiten auf das Gleichgewicht zwischen der PPI und der PPII Helix	71
5.1. Einfluss von Ladungen an den Endgruppen.....	72
5.1.1. Aufbau und Synthese der Modellverbindungen	72
5.1.2. Lösungsmittel Studien bei neutralem pH	73
5.1.3. Wechselwirkung der Ladungen mit dem helicalen Dipol Moment.....	75
5.1.4. Einfluss des pH-Werts auf die Konformation	76
5.1.5. Zusammenfassung der Endgruppen Effekte auf das Gleichgewicht zwischen der PPI und der PPII Helix	78
5.2. Temperaturabhängigkeit der PPII und PPI helicalen Konformationen.....	80
5.2.1. Einfluss der Temperatur auf die PPII Helix	80
5.2.2. Einfluss der Temperatur auf die PPI Helix.....	81
5.2.3. Hysterese Effekt bei der Umwandlung PPI/PPII.....	82
5.3. Wo startet die Umwandlung zwischen den beiden helicalen Konformationen?.....	86
5.3.1. Synthese der Modellpeptide	87
5.3.2. Betrachtung der Gleichgewichtslage	88
5.3.3. Kinetische Beschreibung der Umwandlung PPI → PPII	90
5.3.4. Vergleichende Resultate der kinetischen Analyse.....	92
5.3.5. Zusammenfassung: Startpunkt der Isomerisierung	94
5.4. Einfluss der Kettenlänge	95
6. Kontrolle der Superstruktur eines chiralen organischen Halbleiters mit einer einzelnen Aminosäure	97
6.1. Synthese der Hybridmoleküle	97
6.2. Analyse der Aggregation.....	99
7. Zusammenfassung und Ausblick	101
8. Experimenteller Teil.....	103
8.1. Allgemeine Bemerkungen.....	103
8.1.1. Geräte und Materialien	103
8.1.2. Abkürzungsverzeichnis	104
8.2. Synthese in Lösung	107
8.2.1. Synthese von Fmoc-Azp-OH (2).....	107
8.2.2. Analytik von Fmoc-Pro-Azp-Pro-OH (7S) und (7R).....	115
8.2.3. Synthese von Ac-(4 <i>S</i>)Azp-OMe (1S) und Ac-(4 <i>R</i>)Azp-OMe (1R)	118
8.2.4. Synthese der Triazole 13-20	120
8.2.5. Synthese der Aminoprolinderivate 21-24	137
8.2.6. Synthese der Hydroxyprolinderivate 25R, 25S und 27S	145
8.2.7. Synthese der Carbonsäurederivate 28 und 29	148
8.2.8. Synthese der Chymotrypsin-Substrate Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA 31-35	152
8.2.9. Synthese der Aminoprolin-haltigen Peptide 42S und 42R	158

8.2.10. Synthese der Acetamidoprolin-haltigen Peptide 43S und 43R	159
8.2.11. Synthese der Triazolylpeptide 44S und 44R	161
8.2.12. Synthese der Prolinderivate mit einer Quaterthiophen Einheit.....	162
8.3. Festphasensynthese	166
8.3.1. allgemeine Protokolle für die Festphasensynthese, HPLC Reinigung und CD Analyse der Peptide	166
8.3.2. Synthese der Oligoprolin Peptide Ac-Pro _n -OH, n=6, 9, 12, 15, 18.....	169
8.3.3. Synthese der Peptide mit einer Azp Einheit in jeder 3. Position.....	171
8.3.4. Synthese der Azidoprolin 9-mer 11S und 11R	174
8.3.5. Synthese der Oligoprolin Peptide 71, 49, 50, 72 auf Rink-Amid Harz.....	175
8.3.6. Synthese der Peptide 63, 52 und 62 mit freiem N- und freiem C-Terminus.....	177
8.3.7. Synthese der Peptide 56-60 und 53-54 zur Untersuchung des Startpunktes der Umwandlung PPI/PPII	178
8.3.8. Synthese der Peptide 41S und 41R als Vorstufen der Aminoprolin-haltigen Peptide 42S und 42R	181
8.3.9. Synthese der Triazolylpeptide 45-48	182
8.4. Kristallstrukturdaten.....	187
9. Anhang	189
9.1. Literaturverzeichnis und Anmerkungen.....	189
9.2. ¹ H-NMR Daten der Verbindungen 13-25, 28 und 29	197
9.3. Übersicht von Kristallstrukturen der Form Ac-Xaa-OMe	212

1. Einleitung

1.1. Die Aminosäure Prolin

Für die Funktion eines Moleküls ist die Konformation äusserst wichtig. Insbesondere die vielfältigen biologischen Prozesse, die von Proteinen bestimmt werden, hängen stark von der dreidimensionalen Struktur dieser Polypeptide ab. Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei der Amidbindung zu, welche die Aminosäure Bausteine miteinander verbindet. Aufgrund des partiellen C—N Doppelbindungscharakters ist die Amidbindung planar und kann entweder in einer *s-trans* oder *s-cis* Konformation vorliegen (Abbildungen 1 und 2).

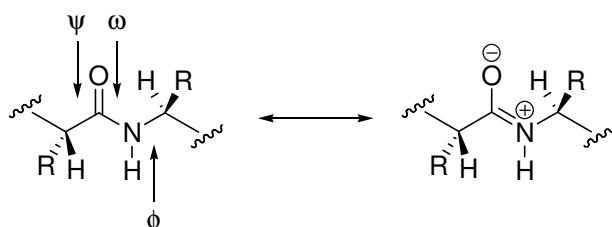


Abbildung 1: Mesomere Strukturen einer Amidbindung in einem Peptid Rückgrat. Eingezeichnet sind zudem die Diederwinkel ϕ , ψ und ω .

Für die meisten Peptidbindungen ist von den beiden ebenen Isomeren die *s-trans* Konformation (gleichbedeutend mit einem Diederwinkel $\omega = 180^\circ$, Abbildung 1) aus sterischen Gründen sehr viel günstiger als die *s-cis* Konformation ($\omega = 0^\circ$).¹

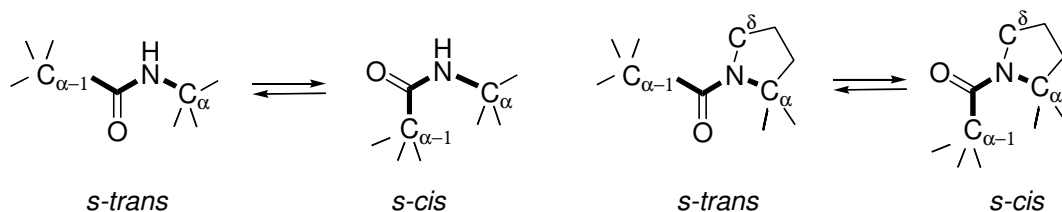


Abbildung 2: *s-cis*:*s-trans* Isomerie mit einem sekundären Amid (links) und dem tertiären Amid einer Prolylpeptidbindung (rechts).

Eine Ausnahme bilden Amidbindungen N-terminal zur Aminosäure Prolin. Diese einzigartige Stellung unter den proteinogenen Aminosäuren verdankt Prolin der kovalenten Verbindung der Alkylseitenkette mit der α -Aminofunktion.²⁻⁴ Das C^α -Atom der Aminosäure N-terminal ($C^{\alpha-1}$) von Prolin steht damit in beiden isomeren Formen *s-cis* zu einem Kohlenstoff-Atom des Pyrrolidin Rings von Prolin, entweder zu C^α oder zu C^δ (Abbildung 2), wodurch sich der Energieunterschied abschwächt und sowohl die *s-cis* wie auch die *s-trans* Konformation energetisch realisierbar sind.⁵

In kurzen Peptiden treten beide Formen auf, wobei der Anteil der *s-cis* Konformation im Gleichgewicht bei etwa 10 bis 30% liegt.^{6,7} In gefalteten Proteinen ist der Konformationszustand der Prolylpeptidbindung (Xaa-Pro Amidbindung) normalerweise eindeutig festgelegt. Analysen von Protein Datenbanken zeigen, dass ca. 6-7% aller Prolylpeptidbindungen in einer *s-cis* Konformation vorliegen.⁸⁻¹⁰ Dabei enthalten von 1435 untersuchten nicht redundanten Proteinstrukturen der Brookhaven Protein Datenbank 43% mindestens eine *s-cis* Prolylamidbindung.¹¹ Da die Aktivierungsenergie für die *s-cis:s-trans* Isomerisierung hoch ist (ca. 80 kJ/mol), sind diese Konformationsänderungen langsam (Halbwertszeiten zwischen 10-1000 s bei 25°C) und dadurch geschwindigkeitslimitierend bei der Proteinfaltung.^{1,5,12} Fischer und Mitarbeiter konnten 1984 erstmals Enzyme nachweisen und isolieren, die Prolyl *s-cis:s-trans* Isomerisierungen katalysieren.¹³ Heute sind 3 Familien dieser ubiquitären Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) bekannt.¹⁴ Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Prolylamidbindung auch als molekularer Schalter fungieren kann.^{3,15,16} Lummis *et al.*¹⁷ postulierten zum Beispiel, dass eine Prolyl *s-cis:s-trans* Isomerisierung die Porenöffnung eines Ionenkanals induziert. Eine Prolin Einheit in einer Krümmung zwischen zwei transmembranen Helices des 5-Hydroxytryptamin Typ 3 Rezeptors reagiert auf die Bindung eines Neurotransmitters mit einer Konformationsänderung von *s-trans* zu *s-cis*. Dies bewirkt die entscheidende Veränderung für die Öffnung des Ionenkanals. In einem anderen gut erforschten Beispiel wurde eine Prolyl *s-cis:s-trans* Isomerisierung als molekularer Zeitschalter bei der Infektion von *Echerichia coli* durch einen Bakteriophagen ausgemacht.¹⁸ Die *s-trans*→*s-cis* Isomerisierung einer Gln-Pro Amidbindung eines Proteins wechselt zwischen infektiöser und inaktiver Form des untersuchten Viruses.

1.2. Das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht von Prolylamidbindungen

1.2.1. Einfluss eines stereoelektronischen Effekts: $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung

Sterische Wechselwirkungen sind aber nicht alleine für die Lage der *s-cis:s-trans* Gleichgewichte von Xaa-Pro Amidbindungen verantwortlich. Raines und Mitarbeiter¹⁹ haben dazu die Verbindung *N*-Formyl-prolin-methylester (Fm-Pro-OMe, Abbildung 3) untersucht. Weil der Van-der-Waals Radius des Sauerstoffatoms grösser ist als der vom Wasserstoff und auch die C=O Bindung länger ist als die C—H Bindung sollten sterische Effekte für diese Verbindung die *s-cis* Konformation gegenüber einer *s-trans* Anordnung deutlich begünstigen.

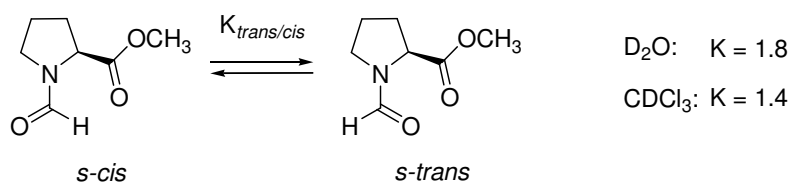


Abbildung 3: *s-cis:s-trans* Gleichgewicht um die Amidbindung in Fm-Pro-OMe.

Das NMR-Experiment zeigt jedoch, dass das *s-trans* Konformer leicht dominiert. In D_2O ist das *s-cis:s-trans* Verhältnis 1:1.8 ($K_{trans/cis} = 1.8$, Abbildung 3). Die Erklärung liegt in einer Wechselwirkung zwischen dem partiell negativ geladenen Sauerstoffatom des Amids mit dem partiell positiv geladenen Carbonyl-Kohlenstoffatom des Methylesters. Während Müller/Diederich²⁰ und Milner-White²¹ dies als eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Dipolen beschreiben, argumentiert Raines^{22,23} aufgrund von DFT Rechnungen mit einer hyperkonjugativen Delokalisation der nichtbindenden Elektronenpaare vom Amid Sauerstoff und dem π^* -Orbital des Methylesters. Diese nachfolgend mit $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion bezeichnete Wechselwirkung tritt nur im *s-trans* Konformer auf und stabilisiert diese Konformation damit relativ zum *s-cis* Konformer. Raines gelang es, das *s-cis:s-trans* Verhältnis der Amidbindung in *N*-Formyl-prolin-phenylestern mit der elektronenziehenden Wirkung von *para*-Substituenten zu korrelieren (Abbildung 4).²⁴ Dies unterstützt den Einfluss einer $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion auf die Konformation.

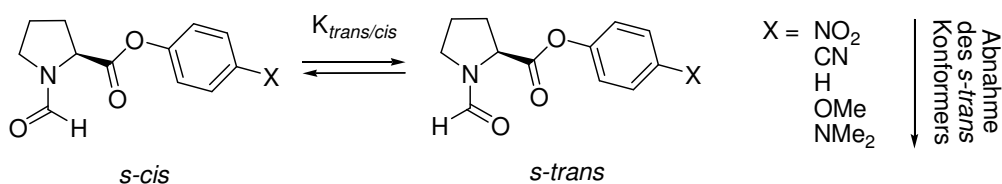


Abbildung 4: Abhängigkeit des *s-cis:s-trans* Gleichgewichts von der elektronenziehenden Wirkung von X in Fm-Pro-OC₆H₄-*p*-X.

Die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion in Peptidbindungen ist abhängig von der Distanz O—C(O) und vom Winkel O—C=O, wobei der ideale Winkel dem Bürgi-Dunitz Winkel entspricht, der beschreibt, wie bei einer Acyl-Transfer Reaktion ein Angriff eines Nucleophils auf eine Carbonylgruppe erfolgt.²⁵⁻²⁸ Raines und Mitarbeiter schätzen den Beitrag dieser Wechselwirkung für die Stabilität des *s-trans* Konformers in Fm-Pro-OMe auf etwa 3 kJ/mol bei 25°C.¹⁹

1.2.2. Einfluss der Sterik

Der Einfluss der Sterik auf die *s-cis:s-trans* Prolylamidbindung wird deutlich, wenn *N*-Acetyl-prolin-methylester (Ac-Pro-OMe) und *N*-Formyl-5,5-dimethylprolin-methylester (Fm-dmP-OMe) betrachtet werden (Abbildung 5), also Verbindungen bei denen das Formyl- bzw. die beiden δ -Protonen durch sterisch anspruchsvollere Methylgruppen ersetzt wurden, die das *s-trans* Konformer bevorzugen im Vergleich zur Situation bei Fm-Pro-OMe. Der Wert für $K_{trans/cis}$ steigt auf 4.9 für ersteres²⁹ und auf 25 für letzteres in D₂O.¹⁹

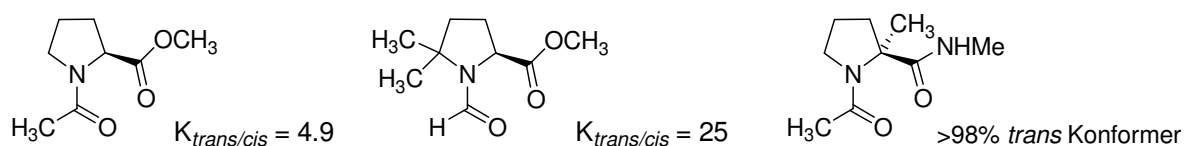


Abbildung 5: *N*-Acetyl-prolin-methylester (links), *N*-Formyl-5,5-dimethylprolin-methylester (mitte) und *N*-Acetyl-2-methylprolin-methylamid (rechts) mit Angabe zur *s-cis:s-trans* Gleichgewichtslage bestimmt in D₂O.

5,5-Dimethylprolin (dmP) ist ein Beispiel für ein synthetisches Prolinderivat mit dem das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht gezielt verändert wurde.^{12,30} Eingebaut in Peptide begünstigen Verbindungen mit Substituenten an C^δ das *s-cis* Konformer. In einer NMR-Untersuchung der Tripeptide Ac-Tyr-dmP-Asn und Ac-Asn-dmP-Tyr konnten Scheraga und Mitarbeiter zeigen, dass das *s-cis* Konformer für diese beiden Sequenzen zu 99% bzw. 90% vorliegt.³¹ Diese Sequenzen bilden in der Endonuclease RNase A mit einer natürlichen Prolin Einheit eine *s-cis* Prolylamidbindung aus. Lubell und Mitarbeiter haben die Eigenschaften von (5*S*)-*tert*-Butylprolin (tBuPro) in einem Dipeptid Ac-Pro-tBuPro-NH₂ analysiert. Das *s-cis:s-trans* Verhältnis der zentralen Amidbindung liegt bei ca. 1.7:1.³² Ac-Pro-Pro-NH₂ hingegen liegt vorwiegend in der *s-trans* Konformation vor. Um dagegen den sterischen Anspruch an der C^α Position zu erhöhen, um damit das *s-trans* Konformer zu begünstigen, wurden zum Beispiel 2-Methylprolin- (2MePro) derivate untersucht. Für Ac-2MePro-NHMe wird nur das *s-trans* Konformer beobachtet (Abbildung 5).³³

Pseudoproline (Ψpro), eingeführt von Mutter und Mitarbeitern, erlauben in ähnlicher Weise das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht zu beeinflussen. Diese Oxa- bzw. Thioproline leiten sich von Serin, Threonin und Cystein ab. Die Aminosäuren bilden mit Aldehyden oder Ketonen das zyklische *O,N*- bzw. *S,N*- Acetalderivat (Abbildung 6a). Für die Aminosäure, gebildet aus Serin und Aceton (Abbildung 6b), kann beispielsweise im Peptid Ac-Ala-Ser(Ψ^{Me,Me}pro)-NHMe nur das *s-cis* Konformer nachgewiesen werden.³⁴ Diese Pseudoproline, kommerziell erhältlich als Dipeptid-Bausteine für die Festphasensynthese, werden dabei meist als

geschützte Form der zugrunde liegenden Aminosäuren eingesetzt. Der Oxazolidin- bzw. Thiazolidin-Ring kann nach der Synthese mit TFA wieder geöffnet werden. Während der Peptidsynthese helfen die Pseudoprolin (ähnlich wie Prolin Einheiten) die Löslichkeit zu erhöhen, indem Aggregation oder das Ausbilden von stabilen Sekundärstrukturen verhindert wird.^{35,36}

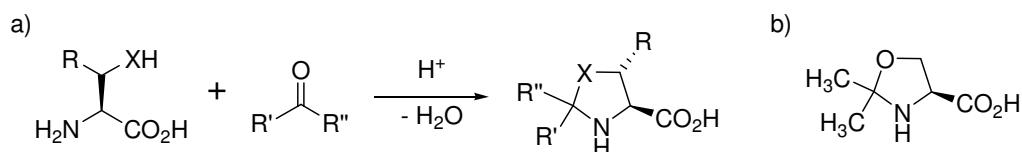
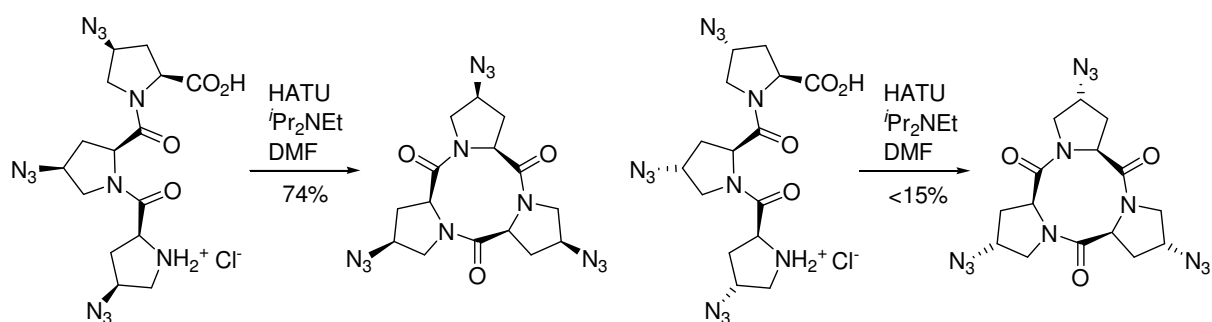


Abbildung 6: a) Synthese von Ψ Pro; X = O oder S, R = H oder CH₃; R', R'' = Alkyl, Aryl. b) Beispiel für ein Ψ Pro das die *s-cis* Konformation stark bevorzugt (Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ Pro)).

1.2.3. 4-Azidoprolin: Einfluss des azido gauche Effekts auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht

Von grosser Bedeutung für diese Arbeit ist die Beobachtung, dass auch ein Azidsubstituent am C γ -Atom von Prolin und insbesondere die absolute Konfiguration an diesem C γ -Atom einen Einfluss auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht hat. Dies wurde in der Forschungsgruppe Wennemers aufgrund von Zyklisierungstendenzen von Di- und Tri-Azidoprolinen entdeckt.³⁷ Die zyklischen Di- und Tripeptide wurden als Grundgerüst für zwei bzw. dreiarmlige Rezeptoren synthetisiert.³⁸⁻⁴⁰ Schema 1 zeigt am Beispiel des Trimers, wie die Ausbeute unter identischen Reaktionsbedingungen deutlich höher ist, wenn der lineare Vorläufer aus (4*S*)-Azidoprolin (Azp) Einheiten besteht:



Schema 1: Unterschiedliche Zyklisierungstendenzen von H-[(4*S*)Azp]₃-OH (links) und H-[(4*R*)Azp]₃-OH (rechts).

¹H-NMR-Spektren der beiden einfacheren diastereomeren Modellverbindungen Ac-(4*S*)Azp-OMe **1S** und Ac-(4*R*)Azp-OMe **1R** zeigten in D₂O *s-cis:s-trans* Verhältnisse von 1:2.6 bzw. 1:6.1 (Abbildung 7). Der Wert für das Prolin Analogon Ac-Pro-OMe liegt mit 1:4.9 dazwischen.²⁹ Auch in DMF-d₇, dem Lösungsmittel für die Zyklisierungsreaktion, zeigt **1S**

eine weniger starke Bevorzugung des *s-trans* Konformers ($K_{trans/cis} = 1:1.8$) als das (4*R*)-Epimer **1R** ($K_{trans/cis} = 3.8$). Die Ausbildung der Amidbindung zu den Di- und Trizyklen erfordert zwischen den terminalen Gruppen im linearen Vorläufer *s-cis* Konformationen. Es macht daher Sinn, dass mit (4*S*)Azp Einheiten die Ausbeuten höher sind, da diese die *s-cis* Konformation begünstigen.

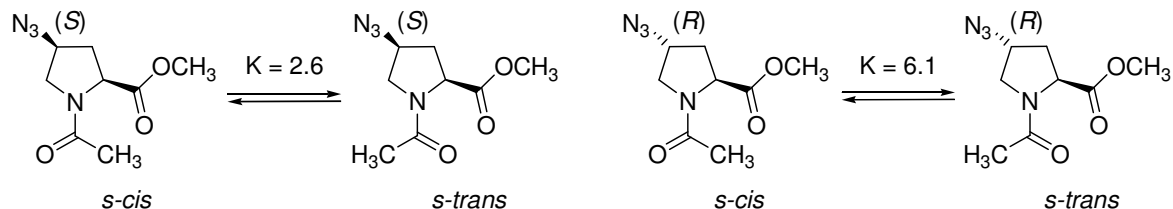


Abbildung 7: *s-cis:s-trans* Gleichgewicht um die Amidbindung von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**, links) und Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**, rechts). Die Gleichgewichtskonstanten (K) wurden in D_2O mittels 1H -NMR Spektroskopie bestimmt.

Aber wie verändert sich durch den Azidsubstituenten das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht? Eine Analyse der vicinalen Kopplungskonstanten im 1H -NMR zeigte, dass die Pyrrolidin Ringe der beiden Epimere **1S** und **1R** unterschiedliche Konformation bevorzugen. Wie in Abbildung 8 dargestellt, nimmt die (4*R*)-konfigurierte Verbindung eine C^γ -exo Konformation ein, während der Ring für Ac-(4*S*)Azp-OMe **1S** eine C^γ -endo Konformation einnimmt. C^γ -exo beschreibt eine Briefumschlag Konformation, bei der das C^γ -Atom auf der entgegengesetzten Seite zum Rest an C^α steht, wenn man die Ebene betrachtet, die von den verbleibenden Ring Atomen N, C^α , C^β und C^δ aufgespannt wird. In der C^γ -endo Konformation ist das C^γ -Atom so aus der Ebene versetzt, dass es auf derselben Seite wie die Carbonylgruppe an C^α zu liegen kommen.

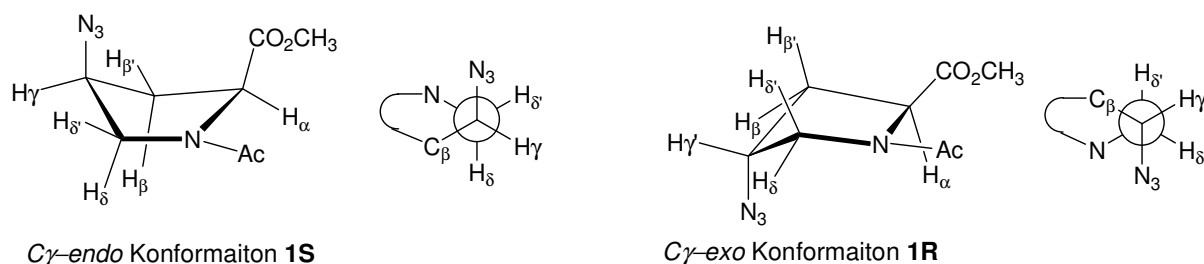


Abbildung 8: Pyrrolidin Ring Konformation von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**, links) und Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**, rechts) je mit einer Newman Projektion entlang der C^γ — C^δ Bindung.

Die Umwandlung der Ring Konformationen ineinander ist ein schneller Prozess auf der NMR Zeitskala, womit jeweils nur das Mittel aller Ring Konformationen beobachtet wird (für das *s-cis* wie auch für das *s-trans* Konformer).⁴¹⁻⁴³ Neben diesen beiden Hauptkonformeren können auch Konformationen beitragen, die eher eine Twist-Anordnung aufweisen oder aber ein

anderes Ring-Atom kann deutlicher ausserhalb der Eben liegen. So sind etwa die C^γ -endo und C^β -exo sowie C^γ -exo und C^β -endo Konformation sehr ähnlich. Mit den vicinalen $^1H, ^1H$ NMR Kopplungskonstanten kann über die Karplus Gleichung bestimmt werden, welches der beiden Hauptkonformere C^γ -endo oder C^γ -exo überwiegt. Zum Beispiel sind in einer C^γ -exo Konformation beide Kopplungskonstanten von H^α zu den β -Protonen ähnlich und gross (ca. 8 Hz), während in einer C^γ -endo Konformation die Kopplung von H^α zum β -Proton auf derselben Seite des Rings gross (ca. 9 Hz) und jene zum β -Proton auf der gegenüberliegenden Seite klein ist (ca. 3 Hz). Neben entsprechenden Analysen der anderen 3J Kopplungskonstanten liefert das Auftreten einer 4J W-Kopplung zwischen einem β - und einem δ -Proton einen Hinweis auf die Ring Konformation, da die entsprechenden Protonen in pseudo-äquatorialer Position liegen müssen um miteinander zu koppeln.

In den beiden acetylierten Methylestern **1S** und **1R** steht der Azidsubstituent damit in beiden Strukturen pseudo-axial (Abbildung 8), was rein sterisch betrachtet ungünstig ist. Die beobachteten Konformationen lassen sich über einen azido gauche Effekt⁴⁴ erklären. In beiden Strukturen steht der Azidsubstituent *gauche* zum Stickstoffatom des Amids. Der gauche Effekt, hauptsächlich bekannt für Fluorverbindungen, ist wie die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion ein stereoelektronischer Effekt und wird ebenfalls mit Hyperkonjugation erklärt.⁴⁵⁻⁴⁸ Betrachtet werden die Wechselwirkungen von bindenden und antibindenden σ -Orbitalen von vicinalen Bindungen. Diese 2-Elektronen/2-Orbital Interaktion hängt ab von der Donor/Akzeptor Eigenschaft der besetzten/freien Orbitale, ihrer Energiedifferenz und der Stärke der Überlappung. Wichtig sind Konformationen, bei denen besagte Orbitale *anti* zueinander stehen und damit die grösste Überlappung haben. Entscheidend ist nun, dass die Hyperkonjugation eines σ -Orbitals einer C—H Bindung mit dem σ^* -Orbital einer polarisierten Bindung (hier C—N_{Azid} und C—N_{Amid}) stärker ist, als von den beiden polarisierten Bindungen bzw. von zwei C—H Bindungen zueinander.

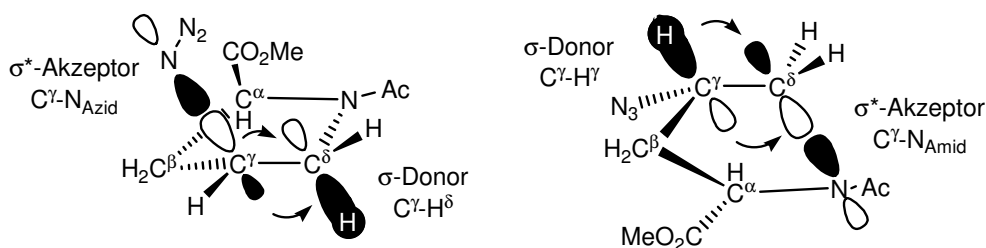


Abbildung 9: Gewichtige $\sigma \rightarrow \sigma^*$ Hyperkonjugationen entlang der C^γ — C^δ Bindung in Ac-(4S)Azp-OMe (**1S**) die zu einer *gauche* Orientierung von Azidsubstituent (C^γ — N_3) und Amidbindung (C^δ —N) führen und damit zu einer C^γ -endo Vorzugskonformation. In der linken Abbildung ist die Bindung zum Azid als σ^* -Akzeptor eingezeichnet, rechts ist es die Amidbindung (siehe auch Newman Projektion Abbildung 8).

Der gauche Effekt ist also die Stabilisierung des *gauche* Konformers gegenüber dem *anti* Konformer, weil so mehr energetisch günstige Hyperkonjugation stattfinden kann.

Das Betrachten der gesamten Molekülstrukturen zeigt, dass sich die durch den gauche Effekt bestimmte Ring Konformation auf die $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung und damit das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht auswirkt. Ab initio Rechnungen und eine Kristallstruktur von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) haben gezeigt, dass in der C^γ -exo Konformation die *s-trans* stabilisierende $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung vorhanden ist. Die *s-trans* Konformation, die von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) eingenommen wird (mit C^γ -endo Konformation), erlaubt diese Interaktion nicht. Die Distanz und der Winkel sind zu gross für eine effiziente Überlappung (siehe Abbildung 10).³⁷

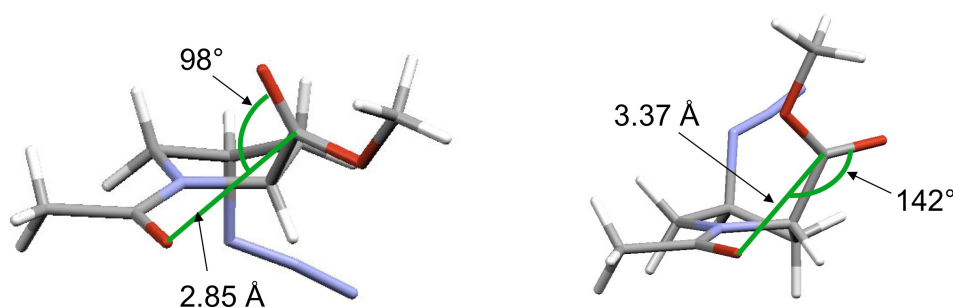


Abbildung 10: Strukturen von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**, links) und Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**, rechts). Für **1S** ist die energieärmste berechnete Konformation (RI-MP2/TZVP/B3LYP/6-31G** level) abgebildet, für **1R** die Kristallstruktur.

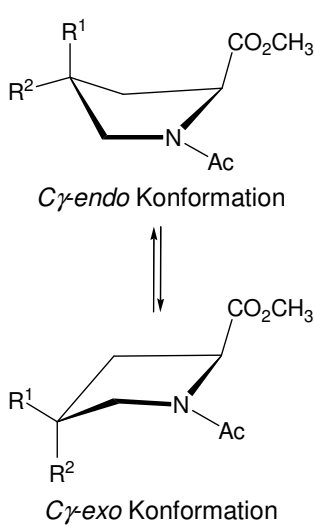
Ein Azidsubstituent am C^γ -Atom von Prolin beeinflusst das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der Prolylamidbindung über zwei stereoelektronische Effekte: Den gauche Effekt und eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion. Eine (4*R*)-Konfiguration am C^γ -Atom erhöht den *s-trans* Anteil um eine N-terminale Amidbindung im Vergleich zum unsubstituierten Prolin und eine (4*S*)-Konfiguration erhöht den *s-cis* Anteil des Isomeren Gleichgewichts.

Hyperkonjugation beeinflusst auch die Konformation von anderen Naturstoffen. Bekannt ist der anomere Effekt, der in Pyranose Zuckern das α -Anomer gegenüber dem β -Anomer bevorzugt. Dies kann mit der Überlappung von einem Atomorbital eines Ring Sauerstoffatoms, das ein nichtbindendes Elektronenpaar beherbergt mit einem σ^* -Orbital einer angrenzenden C-O Bindung ($n \rightarrow \sigma^*$ Wechselwirkung) erklärt werden.⁴⁹

1.2.4. 4-substituierte Prolinderivate: allgemeiner Zusammenhang von Pyrrolidin Ring Konformation und *s-cis:s-trans* Gleichgewicht

4-Azidoprolin ist nicht das einzige Prolinderivat mit einem Substituenten am C^γ-Atom dessen Einfluss auf die Prolylamidbindung untersucht wurde.^{23,37,41,50-55} Das grosse Interesse an diesen Verbindungen hängt mit ihrem Einfluss auf die Stabilität der Collagen Tripelhelix zusammen. Es zeigte sich, dass (4*R*)-konfigurierte elektronenziehende Substituenten zu einer C^γ-exo Ring Konformation und einer Bevorzugung der *s-trans* Amidbindung führen, während bei einer (4*S*)-Konfiguration die C^γ-endo Ring Konformation dominiert und die *s-cis* Amidbindung im Vergleich zu Prolin bevorzugt wird (Tabelle 1). Dies wird mit einem gauche Effekt erklärt, wie das für die Azidsubstituenten dargestellt wurde. Sehr deutlich sind die Präferenzen der Ringkonformation und des *s-cis:s-trans* Gleichgewichts für 4-Hydroxyprolin (Hyp)²³, 4-Fluoroprolin (Flp)²³ und wie bereits beschrieben für 4-Azidoprolin.³⁷

Tabelle 1: Ring Konformationen und *s-cis:s-trans* Gleichgewichtskonstanten von 4-substituierten Prolinderivaten, die auch in Collagen Modellpeptide eingebaut wurden. Die C^γ-endo Konformation wird durch stereoelektronische Effekte bevorzugt, wenn R₁ = OH, F, Cl und R₂ = H und durch einen sterischen Effekt, wenn R₁ = H und R₂ = Me. Die C^γ-exo Konformation ist durch einen stereoelektronischen Effekt bevorzugt, wenn R₁ = H und R₂ = OH, F, Cl, OMe bzw. durch einen sterischen Effekt, wenn R₁ = Me und R₂ = H.

	R ¹	R ²	Konfiguration an C ^γ	Vorzugs-konformation	K _{trans/cis} in D ₂ O	Referenz
 <p><i>C^γ-endo</i> Konformation</p> <p><i>C^γ-exo</i> Konformation</p>	H	H	-	C ^γ -endo	4.9	29
	OH	H	S	C ^γ -endo	2.4	23
	H	OH	R	C ^γ -exo	6.1	23
	F	H	S	C ^γ -endo	2.6	23
	H	F	R	C ^γ -exo	6.7	23
	Cl	H	S	C ^γ -endo	2.2	52
	H	Cl	R	C ^γ -exo	5.4	52
	H	OMe	R	C ^γ -exo	6.7	50
	CH ₃	H	S	C ^γ -exo	7.4	51
	H	CH ₃	R	C ^γ -endo	3.6	51
SH	H	S	C ^γ -exo	4.7	41	
H	SH	R	C ^γ -endo	5.4	41	

(4*R*)-Hydroxyprolin ist das häufigste natürliche Prolin Derivat, da es ein Hauptbestandteil von Collagen ist, dem in Säugetieren am häufigsten vorkommenden Protein.⁵⁶⁻⁵⁸ Damit übertrifft die Häufigkeit dieser Aminosäure jene der sieben proteinogenen Aminosäuren Cystein, Glutamin, Histidin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin.⁵⁷ Die Hydroxygruppe von (4*R*)-Hydroxyprolin wird in der Biosynthese durch eine posttranslationale Modifikation von Prolin Einheiten eingeführt.⁵⁹ Der Einbau von Hydroxyprolinen in Collagen erhöht die Stabilität der tripelhelicalen Konformation deutlich.⁶⁰ Da keine direkte Interaktion zwischen den einzelnen Peptidsträngen über die Hydroxygruppen möglich ist, glaubte man lange Zeit diese Stabilisierung liesse sich auf Wassermoleküle zurückführen, die Wasserstoffbrückenbindungen von den Hydroxygruppen zum Peptid-Rückgrat ausbilden.^{61,62} Erst Arbeiten von R. Raines und Mitarbeitern an Collagen Modellpeptiden in die 4-Fluorprolin Einheiten eingebaut wurden, haben gezeigt, dass stereoelektronische Effekte ein wichtiger Grund für die Stabilisierung sind.^{23,50,63,64} Auch 4-Hydroxysubstituenten bestimmen über einen *gauche* Effekt die Pyrrolidin Ring Konformation und beeinflusst auf diese Weise das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht um die Prolylamidbindung. Diese Vororganisation der Konformation einer einzelnen Aminosäure Einheit wird für die Stabilität der Collagen Tertiär-Struktur verantwortlich gemacht.^{19,22,23,64-67} Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass andere elektronenziehende Substituenten am C^γ-Atom von Prolin ähnlich wie Hyp den Schmelzpunkt für die Tripel Helix erhöhen.

Untersuchungen mit 4-Methylprolin wiederum haben gezeigt, dass sterische Effekte auch zu einem reziproken Verhalten führen können.⁵¹ Wenn der Substituent nicht elektronenziehend ist, wird die *pseudo*-äquatoriale Position energetisch günstiger, weil so die sterisch anspruchsvollen *gauche* Interaktionen vermieden werden können. Der Methylrest führt damit zu einer C^γ-endo Ring Konformation, bei einer (4*R*)-Konfiguration während eine (4*S*)-Konfiguration den Ring in eine C^γ-exo Konformation dirigiert. Weiterhin bedeutet eine C^γ-exo Konformation eine Bevorzugung von *s-trans* und C^γ-endo von *s-cis* im Vergleich zum Prolin Derivat ohne Substituent am C^γ-Atom.

Bei weiteren Substituenten stellt sich demnach die Frage, ob ein *gauche* Effekt oder sterische Faktoren den grösseren Einfluss haben. Anschaulich wird dies am Beispiel der 4-Chlorprolin- (Clp) derivate. Im Vergleich zu Fluor ist Chlor grösser und weniger elektronegativer. Das heisst, man erwartet einen schwächeren *gauche* Effekt und einen grösseren sterischen Effekt. Raines und Mitarbeiter haben gezeigt, dass der stereoelektronische Effekt überwiegt.⁵² Ac-(4*S*)Clp-OMe nimmt eine C^γ-endo Konformation an und der *s-cis* Anteil ist erhöht im Vergleich zu unsubstituiertem Prolin. Ac-(4*R*)Clp-OMe

liegt in einer C^{γ} -exo Konformation vor und *s-trans* wird bevorzugt, wobei sich die Unterschiede von *R* und *S* verringern und die Gleichgewichtslagen weniger deutlich ausgeprägt sind als für Hyp, Flp und Azp.

Aufgrund der bekannten Verbindungen wurde folgende allgemeine Regeln für Ac-Xaa-OMe Derivate formuliert: 4-substituierte Prolinderivate mit $K_{trans/cis} > 4.6$ nehmen eine C^{γ} -exo Konformation ein, und Derivate mit $K_{trans/cis} < 4.6$ eine C^{γ} -endo Konformation.^{41,52}

1.3. Polyprolin: Struktur und Bedeutung für biologische Prozesse

Der Pyrrolidin Ring von Prolin beeinflusst nicht nur die Konformation um die Amidbindung, er führt generell zu einer relativ starren Konformation im Peptidrückgrat. Insbesondere die Flexibilität um die N—C $^{\alpha}$ Bindung (Diederwinkel $-50^{\circ} < \phi < -80^{\circ}$) ist eingeschränkt, womit Prolin Einheiten die Protein Sekundärstrukturen α -Helix und β -Faltblatt unterbrechen. Zudem ist kein NH-Proton vorhanden, um in diesen regelmässigen Strukturen als Wasserstoffbrückendonator zu wirken. Dafür wurde schon in den 50-er Jahren erkannt, dass Homopolymere von Prolin charakteristische helicale Konformationen einnehmen.⁶⁸⁻⁷⁰ Interessanterweise existieren zwei helicale Formen und der Hauptunterschied besteht wiederum in der Konformation der Amidbindung.

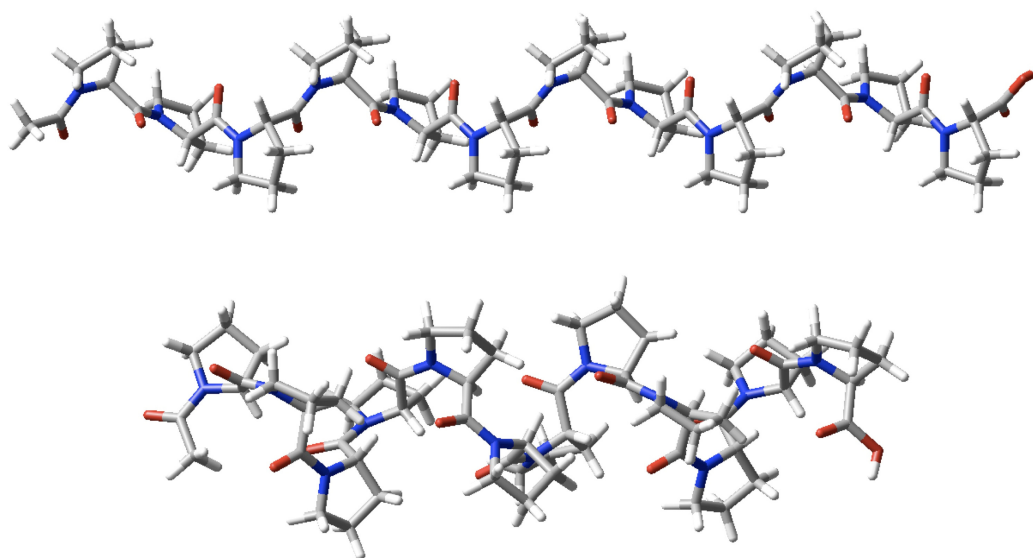


Abbildung 11: Modelle der PPII Helix (oben) und der PPI Helix (unten). Die Strukturen zeigen ein 12-mer Oligoprolin mit idealisierten Winkeln.

Die Polyprolin I (PPI) Helix ist eine rechtsgängige Helix, wobei alle Amidbindungen in der *s-cis* Konformation vorliegen (Abbildung 11). Die weiteren Diederwinkel $(\phi, \psi) = (-75^{\circ}, +160^{\circ})$ führen zu einer helicalen Ganghöhe von 5.6 Å, wobei 10 Prolin Einheiten 3

Helixwindungen ergeben. In der linksgängigen Polyproline II (PPII) Helix sind die Amidbindungen in der *s-trans* Konformation angeordnet (Abbildung 11). In einer idealen Struktur mit den Diederwinkeln $(\phi, \psi) = (-75^\circ, +145^\circ)$ führt das zu einer ausgedehnten Struktur mit einer Ganghöhe von 9.4 Å. Exakt drei Prolin Einheiten machen eine Drehung der Helix aus und führen daher zu einer hochsymmetrischen Struktur, die auch gelegentlich mit einem Prisma mit gleichseitigem Dreieck als Grundfläche verglichen wird. Wässrige Lösungen begünstigen die PPII Helix, während weniger polare Lösungsmittel wie n-PrOH zur PPI Struktur führen.⁷¹ Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der Polyprolin Struktur in der Natur deutlich.^{72,73} PPII helicale Sequenzen sind nicht nur wichtig für strukturegebende Proteine wie Collagen,⁷⁴⁻⁷⁶ Elastin^{77,78} oder Proteine der pflanzlichen Zellwand,⁷⁹ sondern sind auch essentiell für grundlegende biologische Prozesse wie Signalübertragungen, Transkriptionsvorgänge, Bewegung von Zellen oder die Immunantwort.^{77,80-83} Dabei spielen Bindungsmotive für Protein-Protein Wechselwirkungen eine grosse Rolle. Es sind vier wichtige Protein Domänen bekannt, die Regionen mit einer PPII helicalen Sequenz erkennen können: SH3, WW, EVH1 und jene von Profilin.⁸¹ Diese Protein Domänen kommen in zahlreichen Proteinen aus den verschiedensten Protein Familien vor. Dazu passt, dass Proteinsequenzen, die eine PPII Helix einnehmen, häufig an der Oberfläche von Proteinen oder an deren Enden aufzufinden sind.⁸⁴ Aufgrund der ausgedehnten Struktur und der fehlenden intramolekularen Wasserstoffbrücken sind oft auch die Amidbindungen direkt an der Bindung beteiligt. Es sind zudem Beispiele für die Bindung zu DNA bekannt für Proteinsequenzen in einer PPII Helix.^{85,86} Analysen von Struktur Datenbanken deuten darauf hin, dass ca. 2% aller Aminosäuren Teil eines PPII helicalen Abschnitts mit mindesten 4 Einheiten sind.^{82,84,87} Die Aminosäure Prolin kommt dabei oft vor, ist aber nicht zwingend notwendig.⁸⁸ Eine biologische Relevanz der PPI Konformation ist nicht bekannt.

Aufgrund der Ähnlichkeit von CD-Spektren einer PPII Helix und von ungefalteten Peptiden haben Tiffany und Krimm vorgeschlagen, dass ungefaltete Peptide Abschnitte mit PPII Konformation enthalten.⁸⁹ In den letzten Jahren wurden weitere experimentelle Hinweise gefunden, die vermuten lassen, dass ungefaltete Peptide grosse Anteile an PPII Helices enthalten.⁹⁰⁻⁹³ Dazu passt auch, dass Protein Denaturierungsreagenzien wie Harnstoff und Guanidinium-hydrochlorid eine PPII Konformation begünstigen.⁹⁴ Andere Studien haben die PPII Helix als eine Vorläufer Konformation bei der Ausbildung von amyloiden Filamenten identifiziert, die für neurodegenerative Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer verantwortlich gemacht wird.⁹⁵ Die neuen Erkenntnisse zeigen, dass der PPII Helix eine ähnliche Beachtung für die Faltung und die Funktion von Peptiden entgegengebracht werden

sollte, wie den klassischen Sekundärstrukturen α -Helix und β -Faltblatt. Dabei ist aber erstaunlich, wie wenig darüber bekannt ist, was die physikalische Stabilität der PPII Helix ausmacht (siehe auch Kapitel 5). Aufgrund der Struktur (Abstand O—C(O): 3.2 Å, Winkel O—C=O 103° (und O—C=N⁺ 103°)) haben Raines und Mitarbeiter erkannt, dass in der PPII Konformation die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion einen Einfluss haben sollte (Abbildung 12).¹⁹

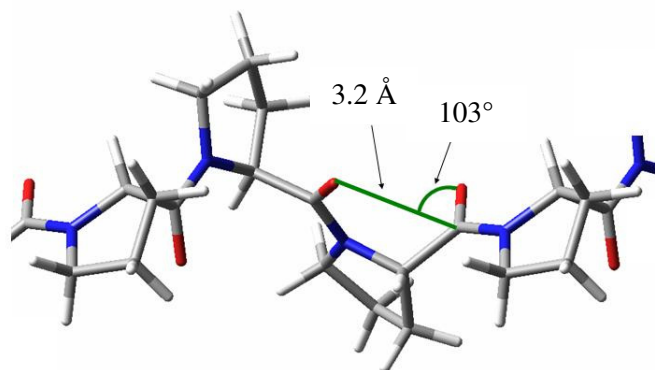


Abbildung 12: Geometrie für eine $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung in der PPII Helix.

Es finden sich auch synthetische Anwendungen der PPII Sekundärstruktur. Oligoproline werden als molekulare Abstandhalter eingesetzt. Die stabile helicale Struktur erlaubte die Distanzabhängigkeit des Förster Resonanz Energie Transfers (FRET) zu bestimmen.⁹⁶ Donor und Akzeptor Fluorophor wurden an den Enden von Oligoprolinen mit bestimmter Anzahl Einheiten eingefügt. Die Effizienz des Energietransfers wurde mit der Distanz, berechnet aufgrund der PPII Struktur, korreliert und damit geeicht. Dieser Energietransferprozess hat sich als wichtiges Werkzeug entwickelt, um Distanzen in Makromolekülen abzuschätzen, Protein Wechselwirkungen zu untersuchen oder auch Konformationsänderungen zu verfolgen.⁹⁷⁻⁹⁹ Auch in Anwendungen zum Elektronen-Transfer finden Polyprolinsequenzen als inerter Abstandhalter Verwendung.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ In den letzten Jahren sind Zweifel aufgekommen, inwiefern man Oligoproline insbesondere bei längeren Helices wirklich als idealen linearen Stab betrachten kann.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Uesugi und Mitarbeiter demonstrierten, dass ein inertes PPII Oligoprolin Zwischenstück von Biotin zu einem biologisch aktiven Molekül die Isolation des Protein Zielmoleküls erleichtert.¹⁰⁸

Eine andere Anwendung sind zellgängige Peptide, die auf der PPII Struktur aufbauen. Abgeleitet von natürlichen Peptiden haben Giralt¹⁰⁹, Chmielewski¹¹⁰⁻¹¹² sowie Schepartz¹¹³ und Mitarbeiter diese Geometrie genutzt, um amphiphile Strukturen aufzubauen, die Zellmembranen durchdringen.

1.4. Derivatisierung von Azidoprolin Einheiten und die Bedeutung molekularer Gerüste

Neben der dargestellten konformationsdirigierenden Wirkung ist eine Azidfunktion allgemein ein vielseitiges Intermediat in der organischen Synthese.¹¹⁴ Neben dem Einsatz als Synthon für ein Amin haben in den letzten Jahren Anwendungen der 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen grosse Aufmerksamkeit erlangt.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Ursprung war die unabhängige Beobachtung von Meldal¹¹⁸ und Sharpless¹¹⁹, dass Kupfer(I)-Ionen die [3+2] Cycloaddition zwischen Azid und terminalem Alkin zum 1,2,3-Triazol stark beschleunigen und auch die Regioselektivität (1,4-Substitution am Triazol) deutlich erhöht wird. Die unter dem Begriff „Click“ Chemie bekannte Reaktion ist sehr effizient und kann unter milden Bedingungen durchgeführt werden.¹²⁰ Insbesondere toleriert die Alkin-Azid „Click“ Reaktion eine Vielzahl von funktionellen Gruppen und läuft auch in wässriger Lösung ab. Zudem ist insbesondere eine Azidfunktion orthogonal zu vielen Standardreaktionen in der organischen Chemie. Auch die physikochemischen Eigenschaften des entstehenden 1,2,3-Triazols sind vorteilhaft für biologisch aktive Verbindungen.¹²¹ Der Abstand der Kohlenstoffatome an der 1,4-Position des 1,2,3-Triazols ist 5.0 Å, der aromatische Heterozyklus kann nicht hydrolytisch gespalten werden, ist stabil gegenüber Oxidationen und Reduktionen, besitzt ein grosses Dipolmoment von ca. 5 Debye und die Stickstoffatome sind schwache Wasserstoffbrückenakzeptoren.

In den letzten Jahren sind einige Publikationen erschienen, die 4-Azidoprolin Einheiten in Peptiden nutzen, um über die Azidfunktion neue Funktionalitäten einzubauen.¹²²⁻¹²⁵ Durch das Einführen der 1,4-substituierten Triazole über die „Click“ Reaktion an 4-Azidoprolin Einheiten wurden die biologischen Wirkungen von Antagonisten bzw. Inhibitoren optimiert.¹²²⁻¹²⁵ Die „Click“ Reaktion erlaubte es, effizient kleine Bibliotheken mit bis zu 22 Verbindungen herzustellen und auf ihre Aktivität zu testen.

Molekulare Gerüste mit einer wohldefinierten Struktur, die funktionelle Gruppen in einer spezifischen dreidimensionalen Anordnung generieren sind immer wichtiger geworden. Mögliche Anwendungen dieser variierbaren Grundstrukturen liegen in der Entwicklung von neuen Materialien, multivalenten Sensoren, zellgängigen Peptiden, Antibiotika oder Inhibitoren für spezifische Protein-Protein Interaktionen. Dieses Konzept wurde in den letzten Jahren für verschiedene unnatürliche Oligomere realisiert, die eine definierte Sekundärstruktur annehmen.¹²⁶ Dabei handelt es sich zum Beispiel um β -Peptide,¹²⁷⁻¹³⁰ α,β -Peptide,^{131,132} Peptide,¹³³⁻¹³⁵ Terphenyle,^{136,137} aromatische Oligoamide^{138,139} oder auch Oligo-*cis*- γ -aminoprolin,^{140,141} die unter dem Begriff „Foldamers“¹⁴² zusammengefasst

werden. Auch bestimmte Proteinstrukturen, unter ihnen die PPII Helix,^{110,111,113,143} wurden insbesondere zur molekularen Erkennung und bezüglich Zellgängigkeit untersucht.¹⁴⁴

1.5. Dissertationsprojekt

Die vorliegende Dissertation untersucht die Konformation von verschiedenen γ -substituierten Prolinderivaten in einfachen Modellverbindungen und eingebaut in Oligoprolin Peptide. Aufgeteilt in 4 Hauptkapitel geht es immer wieder um das Zusammenspiel von nicht-kovalenten Interaktionen und deren Einfluss auf das Konformerengleichgewicht von Prolylamidbindungen.

Kapitel 2:

Ein erster Schwerpunkt war die Untersuchung, wie sich der Einbau von (4*R*)- bzw. (4*S*)-Azidoprolin Einheiten auf die Sekundärstruktur von Oligoprolinen auswirkt. Dazu wurden 4-Azidoprolin-haltige Oligoproline hergestellt und die Stabilität der helicalen Konformation verglichen. Mittels CD Spektroskopie wurde dazu das lösungsmittelabhängige Gleichgewicht zwischen der PPI Helix (*s-cis* Amidbindungen) und der PPII Helix (*s-trans* Amidbindungen) betrachtet.

Kapitel 3:

Abgeleitet von Ac-Azp-OMe wurden ausgehend von der Azidfunktion neue γ -substituierte Prolinderivate synthetisiert und deren Konformation mittels NMR, FT-IR Spektroskopie sowie Kristallstrukturanalyse und ab initio Rechnungen analysiert. Anschliessend wurde der Methylester variiert, der in allen diesen Modellverbindungen vorlag, um zu untersuchen, was für einen Einfluss er auf die $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung hat. Des Weiteren wurde anstelle der Acetyl-Prolin Amidbindung eine Ala-Pro in einem kurzen Peptid untersucht.

Kapitel 4:

Um 4-Azidoprolin-haltige Oligoproline als molekulares Gerüst zu nutzen, wurde eruiert wie die Azidgruppen mit bestimmten Funktionalitäten dekoriert werden können. Dabei wurde zudem überprüft, ob die Tendenzen bezüglich der *s-cis:s-trans* Gleichgewichte aus den Monomerstudien auf die Stabilität der Oligoproline übertragbar sind, wie das in Kapitel 2 für die 4-Azidoproline untersucht wurde.

Kapitel 5:

Die Untersuchung der Oligoproline führte zu grundlegenden Fragen zur Polyprolin Sekundärstruktur, die für Anwendungen der PPII Helix als molekulares Gerüstmolekül relevant sein könnten: Wie beeinflussen die funktionellen Gruppen an den Termini der Helix, die Kettenlänge oder aber die Temperatur die Konformation? Zur Untersuchung wo die *s-cis:s-trans* Isomerisierung in der Helix startet wurden kinetischen Studien der Umwandlung PPII → PPI durchgeführt.

Kapitel 6:

In Zusammenarbeit mit Eva Schillinger und Prof. Peter Bächerle von der Universität Ulm wurden Oligothiophene über die „Click“ Reaktion an Azidoprolin Einheiten gebunden. Diese Konjugation mit den elektronisch und optisch interessanten Oligothiophenen versprechen neuartige Materialeigenschaften. Hier wird die Selbstorganisation eines Moleküls beschrieben, das ein Quaterthiophen über eine Triazoleinheit mit einem Boc-geschützten Prolin verbindet.

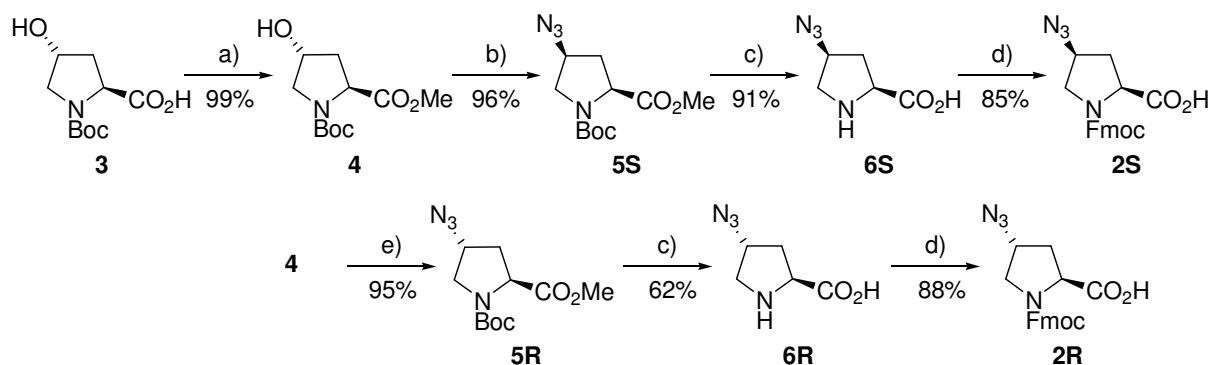
2. 4-Azidoprolin in Polyprolin Helices

2.1. Arbeitshypothese

Wie in der Einleitung dargestellt beeinflusst ein Azidsubstituent an C^γ von Prolin das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der Xaa-Pro Amidbindung. Ein gauche Effekt bestimmt die Pyrrolidin Ring Konformation und nimmt damit Einfluss auf die n→π* Wechselwirkung, die das *s-trans* Konformer stabilisiert. Im Vergleich zu unsubstituiertem Prolin begünstigt ein (4*S*)-konfigurierter Azidsubstituent das *s-cis* Konformer und eine (4*R*)-Stereochemie verschiebt das Gleichgewicht zu einem höheren Anteil des *s-trans* Isomers (die Konfiguration am C^α-Atom ist abgeleitet vom natürlichen L-Prolin immer S, ausgenommen wenn explizit etwas anderes vermerkt ist). Wenn die n→π* Wechselwirkung für die Stabilität der PPII Helix mitverantwortlich ist, wie das aufgrund der Struktur vermutet wird,¹⁹ müsste sich über die Azidsubstituenten auch die helicale Konformation beeinflussen lassen. Konkret sollten (4*S*)Azp Einheiten die PPII Helix, die aus *s-trans* Amidbindungen besteht, destabilisieren und (4*R*)Azp Einheiten die PPII Konformation begünstigen.

2.2. Synthese der 4-Azidoprolin-haltigen Oligomere

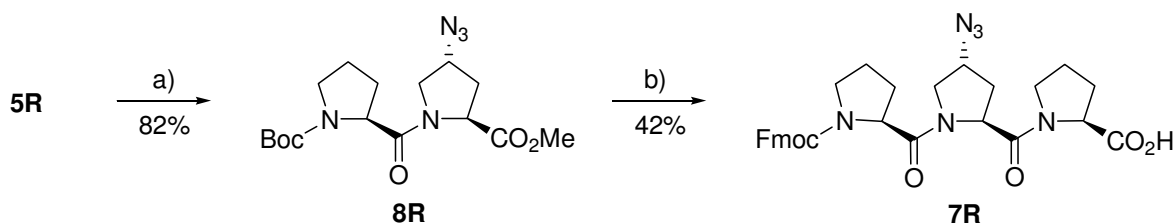
Um Azp Einheiten mittels Festphasenchemie in Peptide einbauen zu können, wurden zunächst die Fmoc-geschützten Aminosäuren Fmoc-(4*R*)Azp-OH (**2R**) und Fmoc-(4*S*)Azp-OH (**2S**) synthetisiert (Schema 2). Die Synthese startete mit dem kommerziell erhältlichen *N*-Boc-(4*R*)-Hydroxyprolin (**3**), das in den entsprechenden Methylester **4** umgewandelt wurde. Die Hydroxyfunktion von **4** wurde mit Mesylchlorid aktiviert und in einer S_N2 Reaktion mit NaN₃ umgesetzt. Durch die Inversion der Konfiguration an C^γ führte das zu *N*-Boc-(4*S*)-Azidoprolin-methylester (**5S**). Verseifung des Methylesters mit NaOH und Boc-Entschützung mit HCl in Dioxan, gefolgt von der erneuten Schützung der Aminfunktion mit Fmoc-Cl unter Schotten-Bauman Bedingungen führte zu Fmoc-(4*S*)Azp-OH (**2S**). Um das (4*R*)-Diastereomer **2R** herzustellen, wurde das geschützte Hydroxyprolinerivat **4** in einer Mitsunobu-Reaktion mit Methansulfonsäure zum Mesylat aktiviert. Hier führte die S_N2 Reaktion mit NaN₃ insgesamt unter Retention der Konfiguration zu *N*-Boc-(4*R*)-Azidoprolin-methylester (**5R**). Die Entschützung des Methylesters und die Boc-Entschützung/Fmoc-Schützung erfolgten analog zum (4*S*)-Diastereomer (**2S**).



a) i) Cs₂CO₃ (0.55 eq), MeOH, H₂O, RT; ii) MeI (2 eq), DMF, RT; b) i) CH₃SO₂Cl (1.5 eq), NEt₃ (3 eq), CH₂Cl₂, 0 °C; ii) NaN₃ (5 eq), DMF, 80 °C; c) i) NaOH (2 eq), H₂O, CH₃OH, THF, RT; ii) 4M HCl in Dioxan (20 eq), RT; d) Fmoc-Cl (1.2 eq), NaHCO₃ (2.5 eq), H₂O, Dioxan, RT; e) i) CH₃SO₃H (1.2 eq), PPh₃ (1.8), DIAD (2 eq), NEt₃ (0.4), Toluol, 0 °C -70 °C; ii) NaN₃ (5 eq), DMF, 80 °C.

Schema 2: Synthese von Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) und Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**).

Zur Synthese von Oligoprolin Peptiden, die eine Azp Einheit in jeder dritten Position enthalten, wurde ein trimerer Peptid-Baustein in der Festphasen Synthese eingesetzt. Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) und Fmoc-Pro-(4R)Azp-Pro-OH (**7R**) wurden gemäss Standard Peptidsynthese in Lösung synthetisiert, wie in Schema 3 für **7R** gezeigt. Dies erlaubt eine effizientere Synthese von längeren Peptiden und die Aufreinigung über Umkehrphasen HPLC gestaltet sich einfacher im Vergleich zu Einzelkupplungen, da weniger Abbruchfragmente abzutrennen sind.¹⁴⁵



a) i) 4M HCl in Dioxan (20 eq), RT; ii) Boc-Pro-OH (1.2 eq), EDC (1.5 eq), ⁱPr₂NEt (1.2 eq), CH₂Cl₂, RT; b) i) NaOH (1.2 eq), H₂O, THF, CH₃OH, RT; ii) H-Pro-OCH₃ (1.2 eq), EDC (1.5 eq), ⁱPr₂NEt (1.2 eq), CH₂Cl₂, RT; iii) wiederholen von Schritt bi) und ai); iv) Fmoc-Cl (1.2 eq), NaHCO₃ (2.5 eq), H₂O, Dioxan, RT.

Schema 3: Synthese des Tripeptids Fmoc-Pro-(4R)Azp-Pro-OH (**7R**). Das Diastereomer (**7S**) wurde ausgehend von **5S** analog synthetisiert.

Als Referenzverbindungen wurden zwei acetylierte Prolin-Homooligomere mit 9 bzw. 18 Einheiten (Ac-Pro₉-OH (**9**) und Ac-Pro₁₈-OH (**10**)) hergestellt (Abbildung 13). Um den Einfluss der Azidproline auf die Polyprolin Strukturen zu untersuchen, wurden einerseits 9-mere von (4S)Azp und (4R)Azp synthetisiert (Ac-[(4S)Azp]₉-OH (**11S**) und Ac-[(4R)Azp]₉-OH (**11R**)) und Oligoprolin 18-mere, die eine (4S)Azp bzw. eine (4R)Azp Einheit in jeder 3. Position aufweisen: Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₆-OH (**12S**) und Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₆-OH (**12R**).

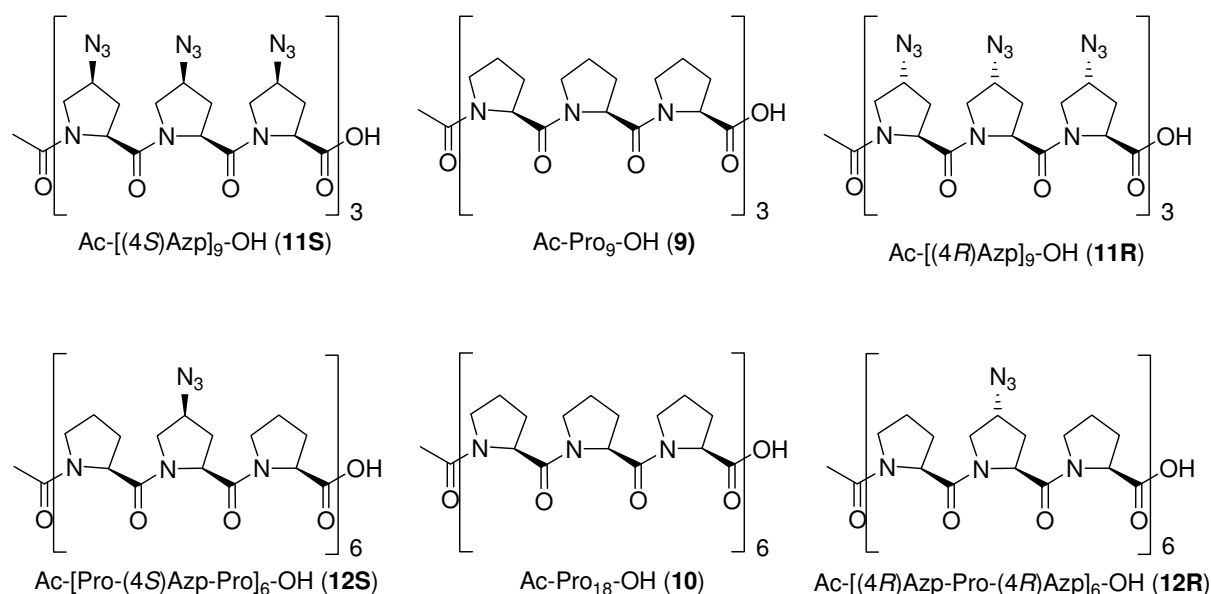


Abbildung 13: Synthetisierte Peptide **9-12** um den Einfluss von (4*S*)Azp und (4*S*)Azp Einheiten auf die Polyprolin Helix zu untersuchen.

Die Synthese dieser Peptide erfolgte mittels der Fmoc/^tBu-Strategie an fester Phase.¹⁴⁶ Um am C-Terminus nach dem Abspalten vom Harz die Carbonsäurefunktion zu erhalten, wurden Wang-Harz bzw. 2-Chlorotrytylchlorid-Harz verwendet. Die Peptide **9**, **10**, **11R** und **11S** wurden auf 2-Chlorotrytylchlorid-Harz in Einzelkupplungen aufgebaut, um Diketopiperazinbildung zu vermeiden. Nach der manuellen Kupplung auf das Harz mit einem 4-fachen Überschuss an ^tPr₂NEt zur Fmoc-geschützten Aminosäure in CH₂Cl₂ (Zielbeladung ca. 0.3 mmol/g) wurden die weiteren Kupplungen und Fmoc-Entschützungen mit einem Syro I Peptid Synthesizer in DMF durchgeführt. Es wurden 4 Äquivalente der Fmoc-geschützten Aminosäure und HCTU als Kupplungsreagenz sowie 12 Äquivalente ^tPr₂NEt als Base verwendet. Nach jeder Peptidkupplung wurden freie Aminfunktionen, die nicht reagiert hatten, mit Ac₂O/^tPr₂NEt acetyliert und damit für weitere Kupplungen inaktiviert. Das hat zum Ziel, dass Verunreinigungen durch unvollständige Kupplungen sich deutlich vom Zielmolekül unterscheiden und einfacher abzutrennen sind. Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen wurde jeweils Piperidin in DMF verwendet. Die Acetylierung der N-terminalen Prolin Einheit erfolgte auf dem Harz in CH₂Cl₂ wiederum mit Ac₂O und NEt₃. Die Peptide wurden vom 2-Chlorotrytylchlorid-Harz mit einer Mischung aus AcOH/TFE/CH₂Cl₂ im Verhältnis 1:1:8 abgespalten. Nach dem Abspalten vom Harz wurden alle in dieser Arbeit synthetisierten Peptide mit Et₂O gefällt und über Umkehrphasen HPLC gereinigt. Die Peptide **12R** und **12S** wurden durch sechs manuelle Kupplungen des jeweiligen trimeren Bausteins auf Wang-Harz mit HCTU als Kupplungsreagenz aufgebaut. Die Esterverbindung zum Harz

wurde in der ersten Kupplung durch die Zugabe von katalytischen Mengen DMAP erreicht. Die Abspaltung vom Wang-Harz erfolgte mit einer Mischung aus TFA und CH_2Cl_2 im Verhältnis 1:2.

2.3. Einfluss auf die Stabilität der helicalen Strukturen

Aufgrund der deutlich verschiedenen Konformationen einer PPI und einer PPII Helix unterscheiden sich auch ihre physikalischen und damit spektroskopischen Eigenschaften. Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie eignet sich hervorragend, um die beiden Konformationen zu identifizieren. Poly-L-Prolin in der rechtsgängigen PPI Konformation zeichnet sich durch eine schwache negative Bande um 232 nm, eine starke positive Bande um 215 nm und eine mittelstarke negative Bande im Bereich von 199 nm aus. Charakteristisch für die linksgängige PPII Konformation ist eine schwach positive Bande um 226 nm und eine stark negative Bande um 206 nm. Abbildung 14 zeigt diese beiden deutlich unterscheidbaren CD-Spektren für das 18-mer Oligoprolin Ac-Pro₁₈-OH (**10**): in wässriger Lösung die PPII Helix und die PPI Helix in 98% vol/vol n-PrOH in Phosphat Puffer.⁷¹

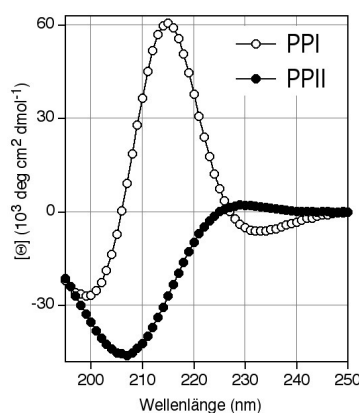


Abbildung 14: CD-Spektren von Ac-Pro₁₈-OH (**10**) in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) (●) und in 98% vol/vol n-PrOH in Phosphate Puffer (○). Die Spektren wurden bei einer Peptid Konzentration von 35 μM bei 25°C aufgenommen.

2.3.1. Methode zum Vergleich der Stabilität unterschiedlicher Peptide

Ein Aufbrechen der beiden helicalen Konformationen über das Erhöhen der Temperatur ist nicht möglich. Dadurch lässt sich kein Schmelzpunkt bestimmen, um die Stabilität der Sekundärstruktur anzugeben. Kapitel 5.2 zeigt, wie das System auf Temperaturänderungen reagiert und dabei die im Folgenden beschriebene Methode zur Beurteilung der Stabilität unterstützt.

Die absoluten Werte der Elliptizitäten zu vergleichen, um die Stabilität zu beurteilen, ist heikel. Einerseits ist das CD-Signal linear zur Konzentration. Das heisst, man muss die Konzentration sehr genau kennen, um kleine Differenzen im CD-Spektrum interpretieren zu können. Dass dies bei Peptiden nicht trivial ist, zeigt auch ein Vergleich der Literaturdaten für die Elliptizität bei 205 nm von Polyprolinen mit mehr als 20 Einheiten in wässriger Lösung. Die Werte für die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure der negativen Bande reichen von $31400 \text{ degcm}^2\text{dmol}^{-1}$ bis $57600 \text{ degcm}^2\text{dmol}^{-1}$.¹⁴⁷ Daneben gilt es auch zu bedenken, dass in verschiedenen Verbindungen die reinen Absorptionseigenschaften variieren können, was sich zwangsläufig auf die Intensität des CD Signals auswirkt, da es sich hierbei auch um eine Form von Absorptionsspektroskopie handelt. Entscheidender ist die Kurvenform bzw. der direkte Vergleich von Molekülen mit denselben Chromophoren-Systemen.

Creamer und Mitarbeiter haben aufgrund des Maximums der Spektren von „host-guest“ Peptiden in wässriger Lösung eine Skala für die Tendenz der 20 proteinogenen Aminosäuren eine PPII helicale Konformation auszubilden aufgestellt.^{73,148} Ein intensives Maximum um 228 nm gilt dabei als gutes Indiz für eine stabile PPII Helix. Um die Konzentration besser bestimmen zu können, wurden von Creamer *et al.* die spektroskopischen Eigenschaften von Tyrosin genutzt. Wie das Einfügen solcher UV absorbierender Gruppen aber die Konformation beeinflussen kann, wird in Kapitel 5.3.2 beschrieben. Diese Untersuchungen haben auch gezeigt, dass das Einwiegen zur Bestimmung der Konzentration einen überschaubaren Fehler produziert.

Anhand von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₆-OH **12S** sollen nun die Grundlagen der Methode erklärt werden, mit der in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Peptide miteinander verglichen werden. Dabei sind die absoluten Zahlen der Elliptizität nicht erstrangig. Das Prinzip beruht auf Untersuchungen von Prof. Jürgen Engel in den 1970-iger Jahren.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Damals wurde das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen PPI und PPII von polymerisiertem Prolin im Lösungsmittelgemisch Benzylalkohol/n-BuOH mit Hilfe der Polarimetrie beobachtet. Während die optische Drehung lediglich bei einer Wellenlänge bestimmt wurde, ergibt sich aus der CD Spektroskopie deutlich mehr Information zur Struktur. Hier wird das gemessene CD-Signal, die Elliptizität, über einen Wellenlängenbereich aufgenommen.

Abbildung 15 zeigt, wie sich das CD-Spektrum des Peptids **12S** über einen Zeitraum von 7h verändert, wenn eine Probe, die in n-PrOH equilibrierte war, mit wässrigem Phosphat Puffer verdünnt wird. Anfangs ist das charakteristische Signal einer PPI Helix zu erkennen (Maximum bei 215 nm, Minima bei 199 nm und 233 nm). Nach 7 Stunden ist bei Raumtemperatur das typische CD-Spektrum einer PPII Helix erkennbar (negative Bande bei

207 nm und positive bei 230 nm). Dieses Signal bleibt danach über Tage stabil. Das CD-Spektrum zu einem bestimmten Zeitpunkt lässt sich als eine Linearkombination des CD-Signals der PPII (Θ_{PPII}) Helix und der PPI Helix (Θ_{PPI}) beschreiben:

$$\Theta_{obs}(\lambda) = x \cdot \Theta_{PPI}(\lambda) + (1-x) \cdot \Theta_{PPII}(\lambda); \quad x = \text{Anteil PPI}, (1-x) = \text{Anteil PPII}.$$

Ein Hinweis, dass immer hauptsächlich nur diese beiden Konformationen vorliegen, ist der isodichroische Punkt, der bei 227 nm deutlich zu erkennen ist (ansatzweise auch bei 197 nm). Er zeigt sich, da eine Wellenlänge (λ) existiert, bei der $\Theta_{PPI} = \Theta_{PPII}$ gilt und damit Θ_{obs} unabhängig von der Gleichgewichtslage konstant sein muss. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine weitere vorliegende Konformation genau bei derselben Wellenlänge auch diese Elliptizität aufweist, ist gering. Da unter den vorliegenden Bedingungen immer das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen PPI und PPII betrachtet wird, ist eine Aussage zur Stabilität der einen Polyprolin Form immer relativ zur anderen Form zu verstehen.

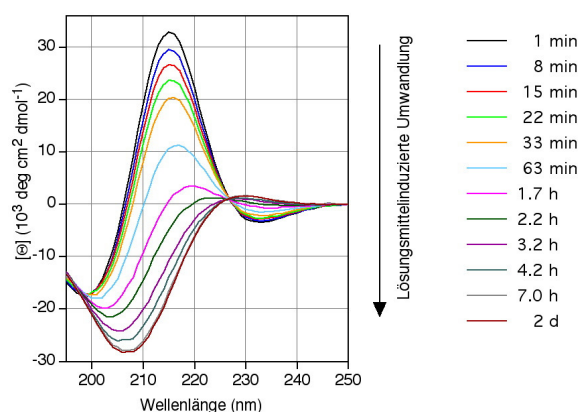


Abbildung 15: CD-Spektren des 18-mers **12S** in 90% Phosphat Puffer und 10% n-PrOH bei 25°C. Die einzelnen Kurven wurden 1 min, 8 min, 15 min, 22 min, 33 min, 63 min, 1.7 h, 2.2 h, 3.2 h, 4.2 h, 7.0 h bzw. 2 Tage nach der Zugabe von wässrigem Phosphat Puffer zu einer Probe in n-PrOH aufgenommen. Das Signal bei 213 nm nimmt mit der Zeit ab.

Um nun die Stabilität der unterschiedlichen Verbindungen zu vergleichen, werden Proben in verschiedenen Lösungsmittelgemischen von Puffer und n-PrOH gemessen, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. In Puffer wird die PPII Helix bevorzugt, in n-PrOH die PPI Helix. Die Menge n-PrOH die aufgewendet werden muss, um eine PPII Helix in eine PPI Helix umzuwandeln, ist damit ein Maß für die Stabilität der PPII Helix relativ zur PPI Helix.

2.3.2. CD Lösungsmittelstudien zum Vergleich der konformationellen Eigenschaften der Peptide 9-12

Die CD-Spektren in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) der Peptide **9-12** zeigen die typischen Merkmale einer PPII Helix (Abbildung 16 und 17). Um die Stabilität dieser helicalen Sekundärstrukturen zu vergleichen, wurden CD-Spektren in verschiedenen Lösungsmittelgemischen von diesem Puffer und n-PrOH aufgenommen. Auch in diesen Abbildungen ist ein isodichroischer Punkt sichtbar, der die Annahme bekräftigt, dass hier einzig das zwei Zustands-Gleichgewicht PPI/PPII vorliegt. Wie erwartet nimmt für alle Verbindungen **9-12** die Population der PPI Helix mit der Erhöhung des Anteils n-PrOH zu. Bei dieser Zunahme der PPI Population sind aber deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Peptiden erkennbar. Dies zeigt, dass die Peptide unterschiedliche konformationelle Eigenschaften haben.

Die Betrachtung des Peptids Ac-Pro₉-OH (**9**) in Abbildung 16 zeigt, dass die Kurven in Puffer, mit 25% n-PrOH und 50% n-PrOH praktisch deckungsgleich sind. Wenn der Anteil n-PrOH weiter erhöht wird, nimmt die PPI Konformation langsam zu. Erst ab 95% n-PrOH wird ein CD-Spektrum gemessen, das auf eine dominierende PPI Konformation hindeutet.

Deutlich anders verhält sich das Peptid Ac-[(4*S*)Azp]₉-OH (**11S**). Bereits geringe Mengen n-PrOH führen zu einer Zunahme des Anteils der PPI Helix, der mit dem Anteil n-PrOH weiter ansteigt. Ab 85% dominiert die PPI Helix. Dies beweist, dass (4*S*)Azp Einheiten die PPII Helix destabilisieren und eine PPI Helix favorisieren. Dies passt zu den Untersuchungen an der Modellverbindung Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**). Dort wurde eine Bevorzugung der *s-cis* Prolylamidbindung, wie sie in der PPI Helix vorkommt, gegenüber dem Prolinderivat nachgewiesen.

Die aus der Modellverbindung **1R** bekannte Tendenz von (4*R*)Azp Einheiten zur Stabilisierung von *s-trans* Amidbindungen, wie sie in der PPII Helix vorkommen, zeigt sich im Oligomer ebenso. Die CD-Spektren in den verschiedenen Lösungsmittelverhältnissen von Ac-[(4*R*)Azp]₉-OMe (**11R**) zeigen, dass eine PPII Konformation klar dominiert, ausser in reinem n-PrOH. Es ist sehr viel n-PrOH nötig um eine Änderung der Konformation herbeizuführen. (4*R*)Azp Einheiten stabilisieren die PPII Helix. Andererseits wird die PPI Helix durch (4*R*)Azp Einheiten destabilisiert. Auffallend ist das sehr intensive Maximum um 228 nm in den Spektren von **11R**, das für eine dominante PPII Konformation spricht, während **11S** auch in Wasser bei 228 nm kaum eine positive Bande erkennen lässt.

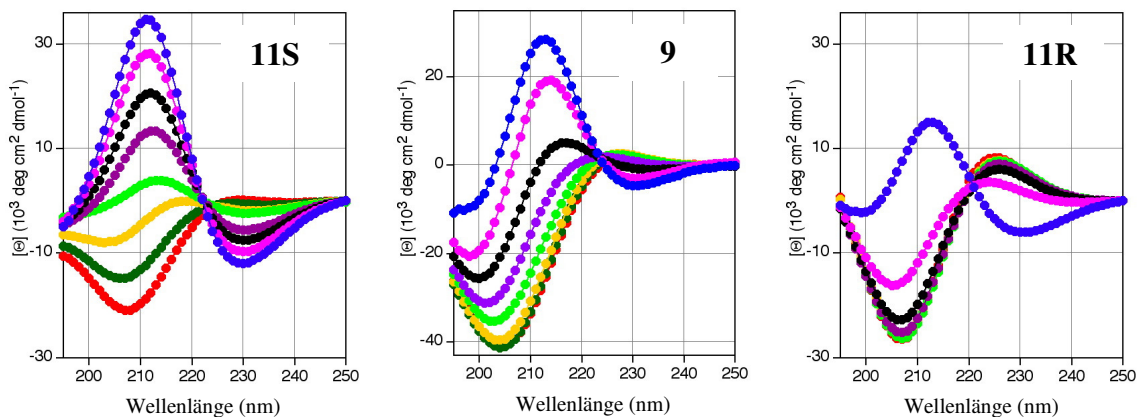


Abbildung 16: CD-Spektren von Ac-(4*S*)Azp₉-OH (**11S**), Ac-Pro₉-OH (**9**) und Ac-(4*R*)Azp₉-OH (**11R**) in Mischungen von wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) und n-PrOH. Phosphat Puffer (●), 25 % vol/vol n-PrOH in Puffer (●), 50 % n-PrOH (●), 75% n-PrOH (●), 85% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 99% n-PrOH (●). Die Spektren wurden bei einer Peptid Konzentration um 70 μM bei 25°C aufgenommen.

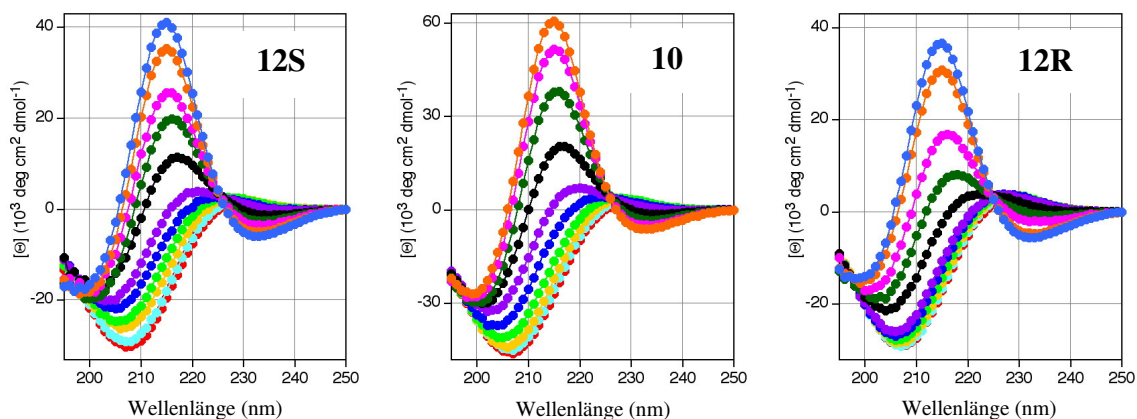


Abbildung 17: CD-Spektren von Ac-[Pro-(4*S*)Azp-Pro]₆-OH (**12S**), Ac-Pro₁₈-OH (**10**) und Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]₆-OH (**12R**) in Mischungen von wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) und n-PrOH. Phosphat Puffer (●), 20% vol/vol n-PrOH in Puffer (●), 50% n-PrOH (●), 70% n-PrOH (●), 80% n-PrOH (●), 85% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 93% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 98% n-PrOH (●) und 99.5% n-PrOH (●). Peptid (**10**) war in 99.5% n-PrOH nicht löslich. Die Spektren wurden bei einer Peptid Konzentration um 35 μM bei 25°C aufgenommen.

Abbildung 17 zeigt, dass diese Einflüsse auch sichtbar werden, wenn nur jede dritte Aminosäure Einheit in einem Oligoprolin Peptid mit einer Azp Einheit ersetzt wurde. Die Unterschiede sind aber entsprechend geringer. In Puffer ist das Maximum bei 228 nm für **12R** intensiver als für das Referenzpeptid **10** und bei **12S** ist es weniger ausgeprägt. Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel wird deutlich, wenn man beispielsweise die violette Kurve betrachtet, die bei 85% n-PrOH gemessen wurde. Für Peptid **12R** dominiert unter diesen Bedingungen die PPII Helix, wie in Puffer. Für Peptid **11S** ist bereits ein gewisser Anteil der PPI Helix erkennbar. Das reine Oligoprolin Peptid **10** verhält sich relativ ähnlich wie **11S** mit einer (4*S*)Azp Einheit in jeder 3. Position.

Dies ist ein experimenteller Hinweis, dass die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion für die Stabilität der PPII Helix wichtig ist. Die gefundene Bevorzugung der PPII Helix mit (4*R*)Azp Einheiten bzw. der PPI Helix mit (4*S*)Azp Einheiten kann mit den *s-cis:s-trans* Gleichgewichten der Modellverbindungen **1S** und **1R** korreliert werden: Ein Azidsubstituent mit (4*R*)-Konfiguration an C^γ bestimmt eine Pyrrolidin Ring Konformation, die eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion und damit das *s-trans* Konformer begünstigt, während ein Azidsubstituent mit (4*S*)-Konfiguration an C^γ diese Wechselwirkung stört. Diese Schlussfolgerungen werden durch quantenmechanischen Rechnungen von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld an Azidoprolin-haltigen Oligoprolinen gestützt.¹⁵²

2.3.3. Betrachtungen der helicalen Peptide mittels NMR Spektroskopie

Da CD-Spektren lediglich ein gemittelt Signal für alle Konformationen in Lösung liefern, wurde versucht, die Peptide **9-12** zusätzlich mittels NMR Spektroskopie zu analysieren. In den NMR-Spektren von Oligoprolinen in D_2O war normalerweise jeweils ein Signal für alle gleichartigen Protonen (bzw. Kohlenstoffatome) der verschiedenen Aminosäure Einheiten zu erkennen. Einzig das α -Proton der C-terminalen Einheit ist meist einzeln sichtbar (Hochfeld verschoben im Vergleich zu den restlichen H^α -Protonen, Abbildung 18). Im ^{13}C -Spektrum sind um die Hauptsignale kleinere Resonanzen zu erkennen, aber einzig C^α und C^β wiederum von der C-terminalen Prolin Einheit sind intensiver und daher mittels 2D-NMR Studien zuzuordnen (Abbildung 18). Diese starke Überlagerung wird auf die hohe Symmetrie der PPII Konformation zurückgeführt. Verfeinerte Messtechniken erlaubten Eaton und Mitarbeitern Konformere mit *s-cis* Prolylamidbindungen in einem Prolin 8-mer nachzuweisen, das N- und C-Terminal mit Alexa Fluorophoren funktionalisiert war.¹⁰⁵ In unseren NMR-Experimenten konnten keine *s-cis* Amidbindungen detektiert werden.

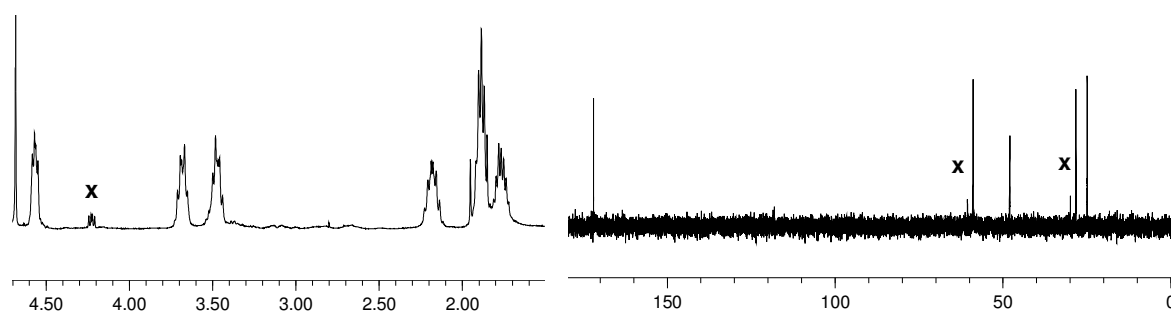


Abbildung 18: 1H -NMR-Spektrum (links) und ^{13}C -NMR-Spektrum (rechts) von Ac-Pro₁₈-NH₂, separierte Signale der C-terminalen Prolin Einheit sind markiert (x).

CD-spektroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Lösungsmitteln haben gezeigt, dass die PPII Helix neben Wasser auch in TFE stabil ist. Die PPI Helix wird neben n-PrOH auch in EtOH, 2-PrOH und n-BuOH stabilisiert. In Methanol liegt das Gleichgewicht dazwischen. Für das Peptid **12R** gelöst in MeOH wird zum Beispiel ein CD-Spektrum beobachtet das jenem mit 93% n-PrOH ähnelt (siehe Abbildung 17). Abbildung 19 zeigt die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren für Ac-[(4*S*)Azp]₉-OH (**11S**) und Ac-[(4*R*)Azp]₉-OH (**11R**) in D₂O und CD₃OD. In D₂O sind für beide Peptide fünf Hauptresonanzen für fünf Ringprotonen auszumachen (zusätzlich ein Singulett der Acetylgruppe). Diese überlagerten Signale für die jeweiligen Ringprotonen sind für Peptid **11R** auch in CD₃OD zu erkennen und deuten auf eine weiterhin geordnete symmetrische Struktur hin. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **11S** in CD₃OD ist hingegen deutlich komplexer. Dies ist weiterer Hinweis, dass die (4*S*)Azp Einheiten die PPII Helix destabilisieren und ein signifikanter Anteil der PPI Helix vorliegt.

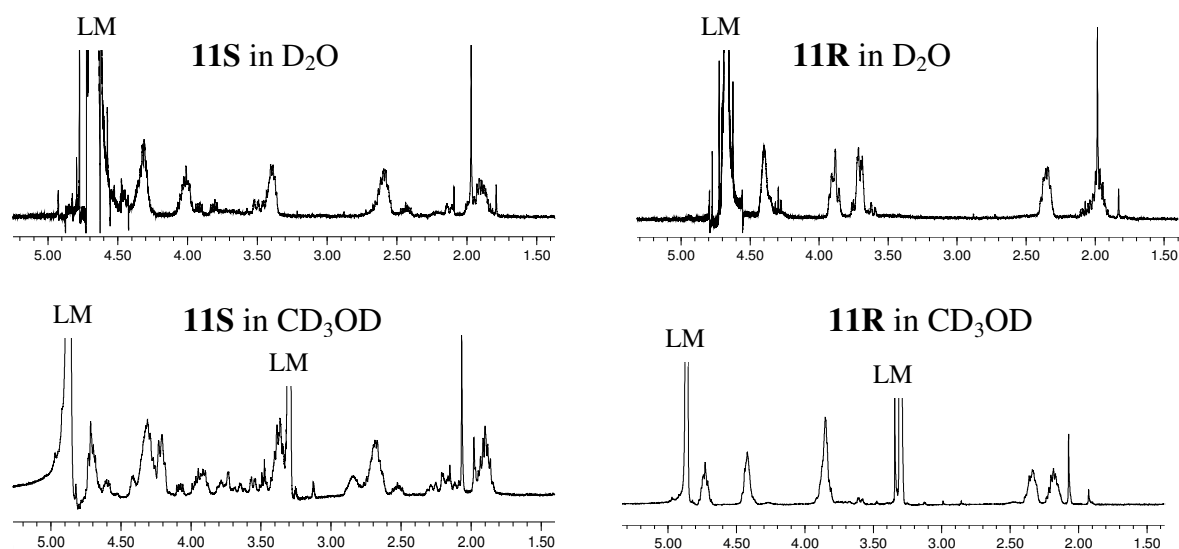


Abbildung 19: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Ac-[(4*S*)Azp]₉-OH (**11S**, links) und Ac-[(4*R*)Azp]₉-OH (**11R**, rechts) in D₂O (oben) und CD₃OD (unten). Ausser für Peptid **11S** in CDCl₃ (links unten) ist jeweils ein relativ geordnetes Spektrum zu erkennen für die Grösse des Peptids (C₄₇H₅₈N₃₆O₁₁). Mit LM sind die Resonanzen der Lösungsmittel gekennzeichnet. In D₂O sind von links nach rechts die Hauptsignale für die γ -, 2-mal δ -, 2-mal β -Protonen und die Acetylgruppe zu erkennen. Die H ^{α} Resonanzen sind vom Signal des Lösungsmittels überlagert. In CD₃OD erkennt man für **11R** von links nach rechts die Hauptsignale für H ^{α} , H ^{γ} , H ^{δ} und 2-mal H ^{β} sowie die Acetylgruppe.

3. Analyse des *s-cis:s-trans* Gleichgewichts von Prolylamidbindungen in acetylierten Aminosäurederivaten und kurzen Peptiden

Im vorangehenden Teil wurde gezeigt, wie die Stabilität der Polyprolin II und I Helices durch den Einbau der Aminosäuren (4*S*)-Azidoprolin und (4*R*)-Azidoprolin beeinflusst wird. Die in die helicale Struktur eingeführten Azidgruppen können aber auch synthetisch weiter genutzt werden. Beispielsweise kann die Azidfunktion in ein Triazol, ein Amid oder ein Amin umgewandelt werden. Durch die wohldefinierte Konformation insbesondere der PPII Helix eröffnen sich dadurch vielseitige Anwendungen von 4-Azidoprolin-haltigen Polyprolinen als molekulares Gerüst. Durch diese Derivatisierung der Azide verändern sich aber zwangsläufig die strukturdirigierenden Eigenschaften des Substituenten am C^γ-Atom des Prolinderivats. Um den Einfluss dieser Derivatisierung auf die Konformation zu analysieren, wurden in einem ersten Schritt die entsprechenden acetylierten Methylester der 4-substituierten Prolinderivate untersucht (Kapitel 3.1). Wie in Kapitel 2 dargestellt, lieferten die Daten zu den Modellverbindungen Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) und Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) gute Erfahrungswerte für den Einfluss von Azp Einheiten auf die Polyprolin Helix.¹⁵³ Die Untersuchungen mit verschiedenen Substituenten mit einer C^γ—N Bindung führten anschliessend zu einer genaueren Betrachtung von 4-Hydroxyprolinderivaten (Kapitel 3.2).

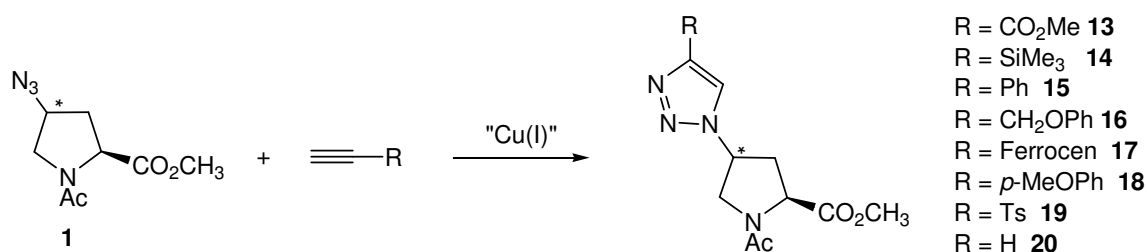
Die Wahl des Methylesters für diese einfachen Modellsysteme wird in Kapitel 3.3 genauer betrachtet. Dazu wurde als Vergleich eine Dimethylamidfunktion am C-Terminus untersucht. Diese funktionelle Gruppe gleicht eher der Situation in einem Oligoprolin Peptid und diese Absättigung verhindert wie der Methylester OH- bzw. NH-Wasserstoffbrücken. Zudem wird eine freie Carbonsäure am C-Terminus betrachtet, welche die Oligoproline am C-Terminus abschliesst.

Zusätzlich wurde der Einfluss von 4-Azidoprolin und 4-Hydroxyprolin Einheiten auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht um die Prolylamidbindung in einem kurzen Peptid untersucht. Damit lässt sich analysieren, was für Auswirkungen eine Änderung am N-terminalen Teil der Modellverbindungen hat, wenn anstelle des Acetylamids eine Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren betrachtet wird. In einer Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Kiefhaber und Dr. Annett Bachmann¹⁵⁴, wurde ein enzymatisches Verfahren genutzt, das thermodynamische Aussagen über das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht in diesem Peptid erlaubt (Kapitel 3.4).

3.1. Untersuchung von Prolinderivaten mit einem N-haltigen Substituenten an der γ -Position

3.1.1. Synthese der γ -substituierten Prolinderivate 13-24

Ausgehend von den gut untersuchten Epimeren Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) und Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**)³⁷ wurden neue γ -substituierte Prolinderivate der Form Ac-Xaa-OMe synthetisiert, die eine C—N Bindung zum Pyrrolidin Ring aufweisen. Mit der Cu(I) katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen („Click“ Chemie)^{118,119} wurden 1,2,3-Triazole als Substituenten am C $^{\gamma}$ -Atom von Prolin untersucht (Schema 4). Diese Reaktion eignet sich ausgezeichnet um Verbindungen kovalent an Makromoleküle zu binden.¹²⁰



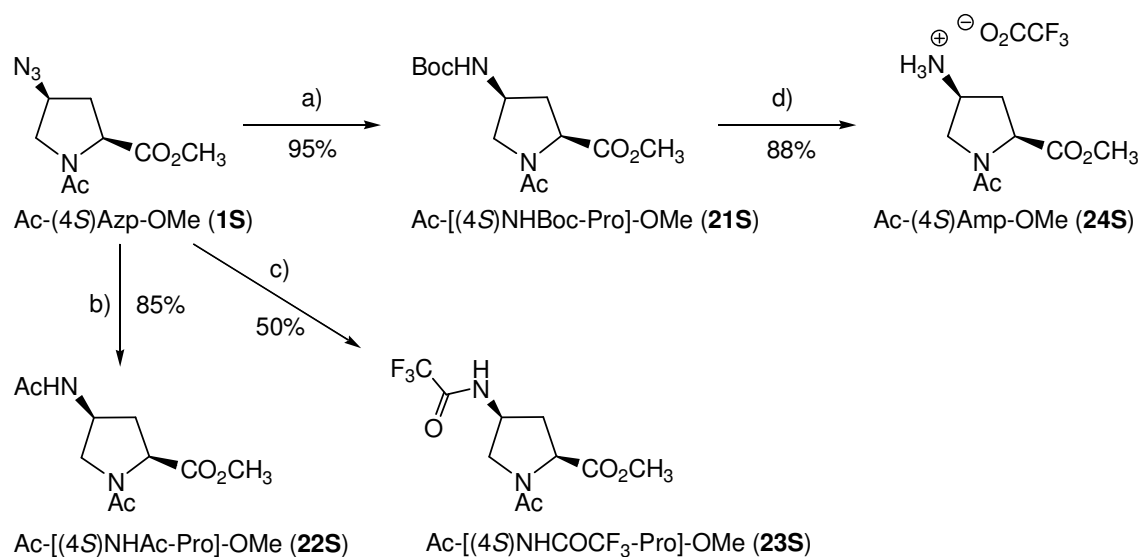
Schema 4: Alkin-Azid „Click“ Reaktion von Ac-Azp-OMe (**1**) mit einem terminalen Alkin.

Es wurden 8 kommerziell erhältliche terminale Alkine je mit Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) und Ac-(4*R*)Azp-OMe **1R** umgesetzt um die Triazole **13R/S** - **20R/S** darzustellen (Schema 4). Dabei wurden 3 unterschiedliche Reaktionsbedingungen angewendet, die alle zum gewünschten Produkt führten. In der generellsten Methode wird der Kupfer(I) Komplex [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ als Katalysator eingesetzt. Damit kann die Reaktion in CH₂Cl₂ durchgeführt werden.

Wenn der Kupfer(I) Katalysator ausgehend von CuSO₄•5H₂O durch den Zusatz von Natriumascorbat in-situ reduziert wurde, war der Erfolg der Reaktion stark vom Lösungsmittelgemisch H₂O/*t*BuOH abhängig und musste für jede Reaktion neu evaluiert werden. Eine Alternative ist die Verwendung von CuI und *i*Pr₂NEt in einem organischen Lösungsmittel (CH₃CN oder Toluol). Verbindungen **20R** und **20S** mit einem Triazolylsubstituent am C $^{\gamma}$ -Atom von Prolin wurden über die Reaktion mit Propiolsäure synthetisiert, wobei eine Decarboxylierung sowohl mit CuSO₄•5H₂O/Natriumascorbat als auch mit [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ erfolgte.

Schema 5 zeigt die Synthese der Prolinderivate, die über eine Reduktion der Azidfunktion hergestellt wurden: **21S** mit einem Boc-geschützten Amin, **22S** mit einem acetylierten Amin, **23S** einem trifluoroacetylierten Amin und **24S** mit dem freien TFA Salz des Amins als Substituent an C $^{\gamma}$. Der erste Schritt ist eine Hydrierung mit katalytischem Palladium in

Gegenwart des entsprechenden Anhydrids: Boc_2O zum Boc-geschützten Amin **21S**, Ac_2O zum Acetylamid **22S** und Trifluoressigsäureanhydrid zu Trifluoracetylamid **23S**. Das freie Amin (Ac-(4S)Amp-OMe•TFA, **24S**) wurde durch eine Boc-Entschützung von **21S** mit Trifluoressigsäure hergestellt. Eine direkte Hydrierung von Ac-(4S)Azp-OMe (**1S**) in Anwesenheit von HCl führte zu schwer separierbaren Verunreinigungen. Eine weitere Alternative liegt in der Staudinger Reduktion.¹⁵⁵ Diese kann angewendet werden, wenn andere funktionelle Gruppen im Molekül eine Pd-katalysierte Hydrierung nicht erlauben. Die entsprechenden (4R)-Diastereomere **21R–24R** wurden analog hergestellt ausgehend von Ac-(4R)Azp-OMe (**1R**).



a) Lindlar Katalysator, Boc_2O (1.3 eq), $\text{H}_2(\text{g})$, MeOH, RT; b) Pd/C, Ac_2O (2 eq), $\text{H}_2(\text{g})$, EtOAc, RT; c) Pd/C, TFA_2O (2 eq), $\text{H}_2(\text{g})$, EtOAc, RT; d) TFA (30 eq), CH_2Cl_2 , 0°C auf RT.

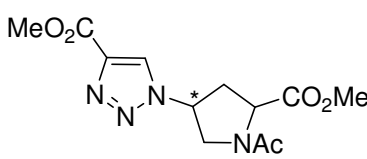
Schema 5: Synthesen der Prolinderivate **21S–24S** ausgehend von der Reduktion von Ac-(4S)Azp-OMe (**1S**).

3.1.2. Konformationsanalyse von Prolinderivaten mit einem Triazolylsubstituenten an C^γ

Um den Einfluss eines Triazolylsubstituenten auf die Pyrrolidin Ring Konformation und das *s-cis*:*s-trans* Gleichgewicht um die Amidbindung zu untersuchen, wurden die Triazolylprolinderivate **13S** und **13R** („Click“ Reaktion mit Methylpropiolat) in verschiedenen Lösungsmitteln mittels ¹H-NMR Spektroskopie analysiert (Tabelle 2). Die Zuordnung der zwei Spinsysteme zu den jeweiligen *s-cis* und *s-trans* Konformationen erfolgte mittels 2D-NOE Spektroskopie. Das *s-trans* Konformer zeigt NOE-Signale zwischen den Acetyl Protonen und H^δ, das *s-cis* Konformer zwischen den Acetyl Protonen und H^α. Wie erwartet,

ist das Hauptkonformer das *s-trans* Konformer, wobei **13R** immer einen höheren Anteil der *s-trans* Konformation zeigte im Vergleich zu **13S**. Aber einzig in D₂O (Eintrag 1) ist noch ein deutlicher Unterschied zwischen (4*R*)- und (4*S*)-konfiguriertem Triazolylprolin auszumachen. In weniger polaren Lösungsmitteln nähern sich die beiden Werte an.

Tabelle 2: *s-cis:s-trans* Verhältnis der Triazolylprolinderivate **13S** und **13R** bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie in verschiedenen Lösungsmitteln (25°C, 80 mM).

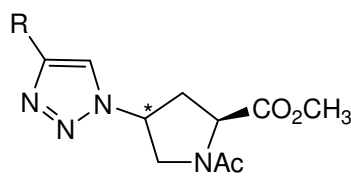
Verbindung 13	Eintrag	Lösungsmittel	13S	13R
			<i>s-cis:s-trans</i>	<i>s-cis:s-trans</i>
	1	D ₂ O	1:2.7	1:4.7
	2	CD ₃ OD	1:2.4	1:3.3
	3	Aceton-d ₆	1:2.8	1:3.0
	4	CDCl ₃	1:2.2	1:2.7
	5	Dioxan-d ₈	1:2.8	1:3.3

Beim Betrachten der vicinalen ¹H,¹H Kopplungskonstanten in den verschiedenen Lösungsmitteln fällt auf, dass für **13S** einzig in D₂O eine Präferenz für C^γ-endo vorliegt bzw. für **13R** ein deutliches Übergewicht der C^γ-exo Konformation entsprechend einer *gauche* Orientierung (Anhang, Seite 195). Die Experimente zeigen damit, dass in D₂O ein *gauche* Effekt die Ring Konformation und damit das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht mitbestimmt. Als Maß für den Elektronenzug eines Substituenten kann die chemische Verschiebung im ¹³C-NMR von C^γ verglichen werden.⁵³ Der Wert für die Triazole **13** (≈ 59 ppm) ist dabei sehr ähnlich wie für die Azidoproline (**1R** und **1S**) (≈ 60 ppm). Damit ist die Polarisation der C^γ—N Bindung beim Triazol ähnlich stark wie beim Azid, bei dem der *gauche* Effekt die Ring Konformation bestimmt. In weniger polaren Lösungsmitteln hat der *gauche* Effekt offenbar einen geringeren Einfluss und die gegenläufigen sterischen Effekte werden bedeutender. Auch für Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) wurde der hohe *s-trans* Anteil ($K_{cis/trans} = 6.1$) nur in D₂O gefunden und die Kopplungskonstanten waren in diesem Lösungsmittel am ausgeprägtesten.³⁷

Um zu testen, ob über den Substituenten am Triazol die *s-cis:s-trans* Gleichgewichte beeinflussbar sind, wurden die Triazolylprolinderivate **14-20** analysiert (Schema 5). Die *s-cis:s-trans* Verhältnisse in CDCl₃, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind, gleichen alle den Werten der entsprechenden diastereomeren Verbindungen **13**, egal ob der Substituent am Triazol eher elektronenreich (Trimethylsilyl- **14** und Anisolderivat **18**) oder

elektronenziehend (Tosylderivat **19**) ist. Die (4*R*)-Diastereomere zeigen immer leicht höhere *s-trans* Anteile ($K_{trans/cis} = 2.5 - 3$) als die (4*S*)-Derivate ($K_{trans/cis} = 2.2 - 2.8$) wobei die Unterschiede gering sind. Umgerechnet auf $\Delta\Delta G = -RT[\ln K_{XS} - \ln K_{XR}]$ macht das weniger als 0.6 kJ/mol bei Raumtemperatur. Die Kopplungskonstanten aller synthetisierten Triazolyllderivate **13S-20S** bzw. **13R-20R** sind sehr ähnlich (Anhang, Seite 195-202). Wie schon für die Verbindungen **13S** und **13R** in CDCl₃ sind damit die Vorzugskonformationen, die man durch den stereoelektronischen gauche Effekt erwarten würde, nicht dominierend.

Tabelle 3: *s-cis:s-trans* Verhältnis der Triazolylprolinderivate **13-20** (jeweils (4*S*)- und (4*R*)-Konfiguration) bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie in CDCl₃ (25°C, 80 mM).

Verbindungen	R=		S		R	
			<i>s-cis:s-trans</i>	<i>s-cis:s-trans</i>	<i>s-cis:s-trans</i>	<i>s-cis:s-trans</i>
	CO ₂ Me	13	1 : 2.2	1 : 2.7	1 : 2.7	1 : 2.7
	SiMe ₃	14	1 : 2.5	1 : 2.5	1 : 2.8	1 : 2.8
	Ph	15	1 : 2.4	1 : 2.5	1 : 2.5	1 : 2.5
	CH ₂ OPh	16	1 : 2.4	1 : 2.4	1 : 2.6	1 : 2.6
	Ferrocen	17	1 : 2.8	1 : 2.8	1 : 3.0	1 : 3.0
	<i>p</i> -MeOPh	18	1 : 2.4	1 : 2.4	1 : 2.6	1 : 2.6
	Ts	19	1 : 2.2	1 : 2.2	1 : 2.5	1 : 2.5
	H	20	1 : 2.3	1 : 2.3	1 : 2.9	1 : 2.9

Von den beiden Verbindungen **14** mit der Trimethylsilylgruppe konnte für beide Epimere Kristalle erhalten werden, was es ermöglichte die Kristallstrukturen zu lösen. Wie Abbildung 20 zeigt, kristallisiert Triazol **14S** in einer C^γ-exo Konformation und **14R** in einer C^γ-endo Konformation aus EtOAc, also je mit pseudo-äquatorialer Ausrichtung des Substituenten am C^γ-Atom. Die ¹H, ¹H Kopplungskonstanten der NMR Spektren in CDCl₃ zeigen dieselbe Vorzugskonformation in Lösung. Für **14S** wird ein Triplett mit 7.9 Hz für H^α beobachtet und auch alle anderen ³J Kopplungskonstanten sind zwischen 7.4 und 8.0 Hz. **14R** zeigt für H^α ein Duplett von einem Duplett mit ³J = 8.8 Hz bzw. 4.5 Hz.

Beide Kristalle enthalten nur das *s-trans* Konformer und die orthorombische Einheitszelle enthält jeweils 4 Moleküle. Interessanterweise lässt die Orientierung des Acetyl Sauerstoffatoms zum Methylester für beide Strukturen auf eine n→π* Wechselwirkung schliessen (Abbildung 20). Der Abstand ist für **14R** 2.99 Å bei einem Winkel von 114.4° und bei **14S** 2.85 Å bei einem Winkel von 112.1°. Distanz und Winkel deuten damit auf eine

Wechselwirkung hin. Im Vergleich mit der Struktur von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) (Abbildung 10) fällt auf, dass die Anordnung des Methylesters um ca. 180° um die C^α—C(O)-Bindung gedreht ist. Bei beiden Kristallstrukturen mit dem Triazolylsubstituent zeigt der Carbonyl-Sauerstoff weg vom Pyrrolidin Ring ($\Psi = -34.9^\circ$ bzw. -29.8°), während beim Azid die Methoxygruppe diese Position einnimmt ($\Psi = 146.6^\circ$). **14R** ist meines Wissens die erste Kristallstruktur, die auch für eine C^γ-endo Konformation eine direkte Wechselwirkung zwischen Acetyl Sauerstoffatom und Methylester zeigt. Es wurde vermutet, dass eine C^γ-endo Konformation allgemein zu weniger *s-trans* Anteil führt, da die stabilisierende $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion weniger auftritt.²² Eine Erklärung für das Zustandekommen der $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung in der Verbindung **14R** ist, dass der Triazolylsubstituent pseudo-äquatorial steht und damit im Vergleich zum pseudo-axialen Azid in **1S** die Konformation des Methylesters nicht derart beeinflusst, dass die Geometrie für eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion ungünstig wird. Dies wird im Zusammenhang mit den Verbindungen **21-24** vertieft diskutiert werden. Die Kristallstruktur von **14R** zeigt eindeutig, dass eine C^γ-endo Konformation die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion nicht verhindert.

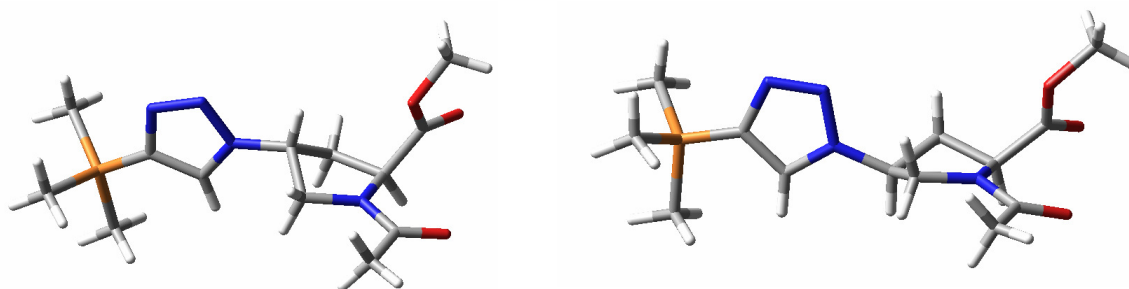


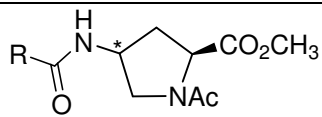
Abbildung 20: Kristallstrukturen von **14R** links und **14S** rechts („Click“ Reaktion von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) bzw. Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) mit TMS-Acetylen).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die „Click Reaktion“ der stereoelektronische Effekt des Substituenten am C^γ-Atom von Prolin abgeschwächt und der sterische Einfluss zunimmt, womit sich die *s-cis*:*s-trans* Verhältnisse von (4*R*)- und (4*S*)-Derivaten angleichen und auch die Pyrrolidin Ring Vorzugskonformationen je nach Lösungsmittel ändern kann. Im Kristall (**14S**, **14R**, **16S** und **20R**) werden für Triazolylsubstituenten pseudo-äquatoriale Konformationen beobachtet, was für einen dominierenden sterischen Effekt im Kristallgitter spricht. Wie ein Vergleich der acht unterschiedlich substituierten Triazole zeigt, hat der Substituent an C(4) des 1,2,3-Triazols einen geringen Einfluss auf die Konformationsgleichgewichte.

3.1.3. Konformationsanalyse der acylierten 4-Aminoprolinderivate **21-23**

Eine zweite Möglichkeit, neben der „Click“ Reaktion, die 4-Azidoprolin-haltigen Oligoprolin Gerüstmoleküle zu funktionalisieren verläuft über die Reduktion zum Amin, mit dem beispielsweise eine neue Amidbindung aufgebaut werden kann. Um den Einfluss einer Amid bzw. Carbamat Funktion an der γ -Position von Prolin auf die Konformation zu untersuchen, wurden die Modellverbindungen Ac-[(4)NHAc-Pro]-OMe (**22**), Ac-[(4)NHCOCF₃-Pro]-OMe (**23**) und Ac-[(4)NHBoc-Pro]-OMe (**21**) mittels ¹H-NMR Spektroskopie in D₂O und CDCl₃ analysiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: *s-cis:s-trans* Verhältnis der acylierten Aminoprolinderivate **21S-23S** und **21R-23R** bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie in CDCl₃ und D₂O (25°C, 80 mM).

Verbindungen	R=	<i>s-cis:s-trans</i> CDCl ₃		<i>s-cis:s-trans</i> D ₂ O		
		S	R	S	R	
	O ^t Bu	21	1:5.5	1:3.5	1:3.8	1:5.2
	CH ₃	22	1:5.8	1:5.2	1:4.3	1:5.8
	CF ₃	23	1:5.3	1:3.5	1:4.3	1:4.8

In D₂O zeigen die *s-cis:s-trans* Verhältnisse für die (4*R*)-konfigurierten Verbindungen **21R-23R** nur eine leichte Zunahme des *s-trans* Konformers im Vergleich zum unsubstituierten Prolinderivat Ac-Pro-OMe ($K_{trans/cis} = 4.8$). Auch die Werte für die Verbindungen **21S-23S** sind nicht viel tiefer als für Ac-Pro-OMe. In CDCl₃ fallen die hohen $K_{trans/cis}$ Werte der (4*S*)-konfigurierten Prolinderivate auf. Entgegen den Erwartungen für derartige $K_{trans/cis}$ Werte zeigen die vicinalen ¹H,¹H Kopplungskonstanten von Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) und Ac-[(4*S*)NHCOCF₃-Pro]-OMe (**23S**) dabei aber sehr eindeutig eine C^γ-endo Konformation (Anhang, Seite 203-205). Diese interessante Abweichung zu den eingangs beschriebenen Regeln⁵² von Raines und Mitarbeitern ($K_{trans/cis} > 4.6$: C^γ-exo Konformation) macht deutlich, dass Effekte die bislang noch nicht beobachtet wurden eine Rolle spielen. Da Amidfunktionen bekannt dafür sind Wasserstoffbrücken auszubilden, wurde vermutet dass eine intramolekulare Wasserstoffbrücke in den Verbindungen **21S-23S** einen Einfluss auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht hat, wie das in Abbildung 21a für **22S** dargestellt ist. Diese Wasserstoffbrücke vom NH Proton des Substituenten an C^γ zum Carbonyl-Sauerstoffatom des

Methylesters würde nämlich den Methylester in eine Konformation (Diederwinkel $\psi \approx 140^\circ$) orientieren, die für eine $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung ideal ist.

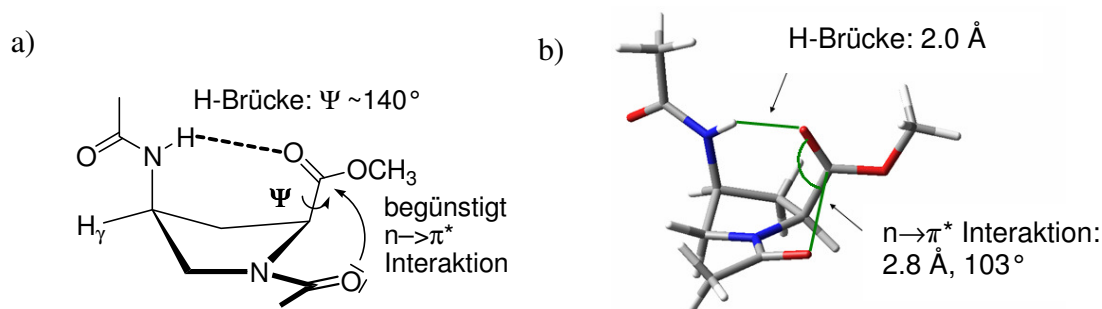


Abbildung 21: a) Modell einer Wasserstoffbrücke für Ac-[(4S)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) in einer C^γ -endo Konformation. b) Berechnete energieärmste Konformation (DFT) von Ac-[(4S)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) für das Lösungsmittel CHCl₃.¹⁵⁶

Diese Hypothese wird experimentell durch IR- und NMR-spektroskopische Daten gestützt sowie von DFT Rechnungen, die von Prof. P.-O. Norrby und J. Kleimark¹⁵⁶ durchgeführt wurden. Eine Wasserstoffbrücke ausgehend vom NH Proton des Substituenten an C^γ wurde zudem bereits für Cyclotri[(4S)-Acetamidoprolin] postuliert¹⁵⁷ und für Bn-[(4S)NHAc-Pro]-NHMe nachgewiesen.¹⁵⁸

Die mittels DFT-Rechnungen ermittelte energieärmste Konformation für Ac-[(4S)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) weist eine C^γ -endo Konformation auf. Es zeigt sich die vermutete Wasserstoffbrücke (Abstand $NH \cdots O$: 2.0 Å) und auch eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion (Distanz: 2.8 Å; Winkel: 103°) bei einem Diederwinkel ψ von 138° (siehe Abbildung 21).

Ein deutlicher Beleg für das Ausbilden einer Wasserstoffbrücke lieferten IR-spektroskopische Untersuchungen. Die Resonanzfrequenz der Carbonylfunktion des Methylesters ist für **21S-23S** deutlich tiefer als bei den entsprechend (4R)-Epimeren, wie für eine Wasserstoffbrücke zu erwarten¹⁵⁹, wenn die C=O Bindungsordnung erniedrigt wird (Tabelle 5). Durch die elektronenziehende CF₃-Gruppe sollte **23S** ein besserer H-Brücken Donor sein.¹⁶⁰ Tatsächlich ist der Wert bei den IR spektroskopischen Untersuchungen für **23S** am tiefsten. Die Stärke der Wasserstoffbrücke überträgt sich aber nicht direkt auf das *s-cis*:*s-trans* Verhältnis. Der *s-trans* Anteil wird durch die CF₃-Gruppe nicht erhöht. Bei den Azidoprolinderivaten war der Wert für das (4R)-Diastereomer **1R** tiefer als für **1S**, was auf eine stärkere $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion zurückgeführt wurde.³⁷ Die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion kann für **21S-23S** zusätzlich zur Erniedrigung der Wellenzahl beitragen. Für das Prolinderivat mit dem von Methylpropiolat abgeleiteten Triazolysubstituenten **13** (Kapitel 3.2.2) sind die Frequenzen für (4S)- und (4R)-Epimer sehr ähnlich. Hier liegen keine Wasserstoffbrückendonoren vor und auch die *s-cis*:*s-trans* Verhältnisse sind ähnlich.

Tabelle 5: Ester Carbonyl Streckschwingungen der Verbindungen **1**, **13** und **21-23** in CHCl₃ bestimmt mittels IR Spektroskopie (25°C, 10 mM).

Verb.	1 (N ₃)	13 (Triazol)	22 (NHAc)	23 (NHCOF ₃)	21 (NHBoc)
R	1745 cm ⁻¹	1743 cm ⁻¹	1748 cm ⁻¹	1746 cm ⁻¹ [a]	1746 cm ⁻¹
S	1749 cm ⁻¹	1743 cm ⁻¹	1733 cm ⁻¹	1723 cm ⁻¹	1737 cm ⁻¹

[a] breite Absorptionsbande mit mehreren Minima, wobei 1746 cm⁻¹ jenes mit der höchsten Wellenzahl ist.

Für eine Wasserstoffbrücke in CDCl₃ spricht des Weiteren, dass die vicinalen ¹H,¹H Kopplungskonstanten NH-H^γ der *s-trans* Konformere von **21S-23S** (7.9-8.6 Hz) höher sind als die der *s-cis* Konformere (5.4-6.5 Hz) und auch höher als in den Diastereomeren **21R-23R** (6.5-6.8 Hz). Hohe Werte werden erwartet, wenn in der C^γ-endo Konformation durch die H-Brücke der entsprechende Diederwinkel (H^γ-C^γ-N-H) so fixiert ist, dass er in der Nähe von 180° liegt (Abbildung 21).

Die H-Brücke stabilisiert nicht nur die C^γ-endo Konformation, sondern zieht ebenso Elektronendichte vom Methylester ab, womit die Carbonyl Funktion zu einem besseren Akzeptor für eine n→π* Interaktion wird. Dies erklärt, warum der *s-trans* Anteil für die Verbindungen **21S-23S** so hoch ist, insbesondere im aprotischen CDCl₃. In D₂O scheinen die Solvathüllen für eine Abschwächung dieses Effekts zu führen und die Interaktion mit dem Lösungsmittel konkurriert die intramolekulare Wasserstoffbrücke.

Die Kristallstruktur vom Triazololylderivat **14R** hat gezeigt, dass eine C^γ-endo Konformation eine n→π* Wechselwirkung nicht ausschliesst. Für (4*S*)-Substituenten, die keine Wasserstoffbrücke ausbilden aber die pseudo-axiale Position bevorzugen, wird die Anordnung des Methylesters, die eine n→π* Interaktion erlaubt, aus sterischen Gründen ungünstig (Abbildung 22a).^{22,152} Ein Abdrehen um die C^α—C(O) Bindung, weg von einem Diederwinkel ψ um 140° auf ca. 0° (oder 180°), ist sterisch vorteilhaft, verhindert dann aber eine effiziente n→π* Wechselwirkung. Dies kann die normalerweise geringen *s-trans* Präferenzen einer C^γ-endo Konformation erklären. Als Beispiel ist in Abbildung 22b die energieärmste Konformation von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) abgebildet. Die ab initio Rechnung kommt auf einen Diederwinkel ψ von 11° womit Abstand (3.4 Å) und Winkel (142°) keine effiziente n→π* Wechselwirkung erlauben. Interessanterweise führt ein (4*S*)-konfigurierter Substituenten der eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zum Methylester ausbilden kann, aber exakt zu einem Diederwinkel ψ (≈ 140°) der ideal ist für eine effiziente n→π* Wechselwirkung (Abbildung 21).

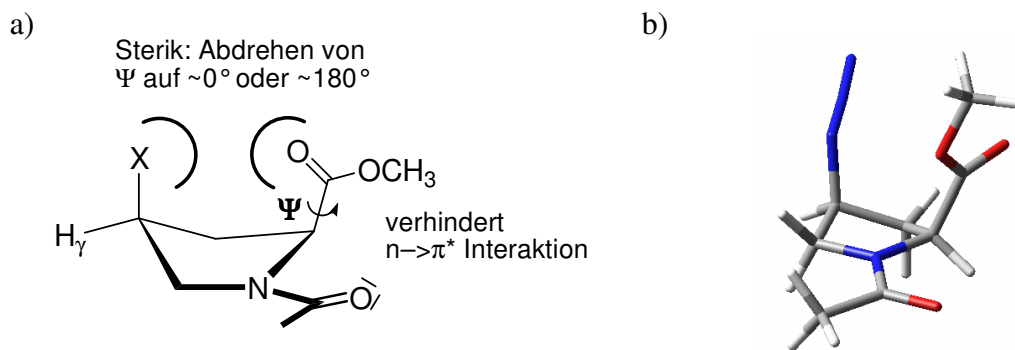


Abbildung 22: a) Model für ein (4*S*)-substituiertes Prolinderivat das keine Wasserstoffbrücke ausbildet. b) Berechnete energieärmste Konformation von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**)³⁷ mit einem Diederwinkel $\psi = 11^\circ$.

Die erhaltene Kristallstruktur von Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) zeigte aufgrund von Packungseffekten eine Konformation, die nicht zu den in Lösung gemessenen Kopplungskonstanten passt (Anhang, Seite 204).

Die Kopplungskonstanten der (4*R*)-konfigurierten Prolinderivate **21R-23R** (Anhang, Seiten 203-205) passen zu einer C^γ -*exo* Konformation, wie sie aufgrund eines gauche Effekts erwartet werden. Die chemischen Verschiebungen des C^γ -Atoms in den ¹³C-NMR-Spektren (48.7-50.3 ppm) zeigen, dass die C^γ —N Bindung schwächer polarisiert ist als vor Reduktion und Acylierung der Azidfunktion.

Bei den literaturbekannten 4-substituierten Prolinderivaten waren Ringkonformation und Präferenz für die Prolylamidbindung immer miteinander verknüpft (siehe Einleitung 1.2.4). Die acylierten Aminoprolinderivate **21-23** haben klar gezeigt, dass die in der Einleitung beschriebene Regel von Raines *et al.*⁵²: C^γ -*endo* favorisiert *s-cis*, C^γ -*exo* favorisiert *s-trans* nicht allgemein gültig ist. Auch bei Analysen der Brookhaven Protein Datenbank und von Kristallstrukturen von Peptiden aus der Cambridge Crystallographic Datenbank wurde allgemein ein Zusammenhang von *s-cis* Prolylamidbindungen und einer C^γ -*endo* Konformation gefunden.¹⁶¹ Unsere Beobachtungen mit acylierten 4-Aminoprolinderivaten haben gezeigt, dass das Ausbilden einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung in einer C^γ -*endo* Konformation zu einem hohen Anteil der *s-trans* Konformation führt, speziell in CDCl₃.

3.1.4. Konformationsanalyse der 4-Aminoprolinderivate **24**

Das Einführen von positiv geladenen Aminofunktionen in eine PPII helicale Struktur ist insbesondere für die Untersuchung von zellgängigen Peptiden interessant.¹⁶² Mit einer 4-Ammoniumfunktion ist nun ein sp^3 hybridisiertes Stickstoff-Atom an C^γ gebunden ist, was sterisch anspruchsvoller sein sollte, als die sp^2 N-Atome der zuvor betrachteten Substituenten. Neben gauche Effekt, $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion und Sterik können hier wieder eine intramolekulare Wasserstoffbrücke und auch noch die Ladung einen Einfluss auf die Konformation ausüben. Um dies zu untersuchen wurden die beiden Diastereomere Ac-(4*S*)Amp-OMe (**24S**) und Ac-(4*R*)Amp-OMe (**24R**) mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie in D_2O und DMSO-d_6 analysiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: *s-cis:s-trans* Verhältnis der Aminoprolinderivate **24S** und **24R** bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie in D_2O und DMSO-d_6 (25°C, 80mM).

	Ac-(4 <i>S</i>)Amp-OMe • TFA (24S)	Ac-(4 <i>R</i>)Amp-OMe • TFA (24R)
D_2O	1 : 5.7	1 : 3.5
DMSO-d_6	1 : 3.6	1 : 2.5

$K_{cis/trans}$ ist mit 5.7 sehr hoch für das TFA Salz von Ac-(4*S*)Amp-OMe (**24S**) in D_2O . Der Wert liegt höher als für das (4*R*)-Diastereomer. Die Kopplungskonstanten zeigen für **24S** und **24R** aber ein Übergewicht der pseudo-axialen Positionen (d.h. *gauche* Konformation) für die Ammoniumgruppen an. Einzig das *s-cis* Isomer von **24R** zeigt eine *endo* Vorzugskonformation (Anhang, Seite 206). Das Versetzen der NMR-Lösungen mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ (1 M TFA- d_1) veränderte die Spektren nicht. Auch die Chlorid-Salze zeigen keinen Unterschied im Vergleich zum TFA-Salz. Beim Versuch durch die Zugabe von NaOD oder mit Phosphat Puffer mit $\text{pH}=2$ die Ammoniumfunktion zu deprotonieren, wurde der Methylester gespalten. In CDCl_3 sind die TFA-Salze der Aminoprolinderivate nicht löslich. In DMSO-d_6 zeigt **24S** wiederum mehr *s-trans* Anteil als **24R**. Das Spektrum von **24S** zeigt nun eine pseudo-äquatoriale Position des Substituenten (d.h. *anti* Konformation).

Die Polarisierung der $C^\gamma\text{—N}$ Bindung ist weiterhin gegeben ($^{13}\text{C-NMR}$: C^γ -Resonanz bei 49 ppm, ähnlich wie für Verbindungen **21-23**) und damit ein gauche Effekt möglich. Moleküldynamik Simulationen von Klein und Mitarbeitern schliessen für einen (4*R*)-Ammoniumsubstituenten an C^γ von Prolin aufgrund des gauche Effekts auf eine stark ausgeprägte C^γ -exo Konformation wie bei (4*R*)Flp.¹⁶³ Ab initio Rechnungen von Flores-Ortega *et al.* sagen für Ac-(4*S*)Amp-NHMe eine Wasserstoffbrücke von der 4-Aminofunktion zum

Methylester voraus.¹⁶⁴ Eine Wasserstoffbrücke in **24S** könnte den hohen *s-trans* Überschuss erklären aber aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob dies der dominierende Einfluss auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht ist. Interessant ist jedenfalls, dass durch die Reduktion von einer (4*S*)Azp Aminosäure Einheit aus einem *s-cis* favorisierenden N₃-Substituenten ein Ammoniumrest entsteht, der in D₂O eine *s-trans* Konformation stark begünstigt. Die Pyrrolidin Ring Vorzugskonformation bleibt dabei bei C^γ-endo. Diese Kombination von hohem *s-trans* Gehalt und C^γ-endo Pyrrolidin Ring Konformation könnte spannende Auswirkungen auf Peptidstrukturen haben.

Zusätzlich kann die eingeführte Ladung weitreichende Effekte haben. Ganesh und Mitarbeiter^{165,166} haben (4*R*)Amp und (4*S*)Amp Einheiten in ein Collagenmodellpeptid der Sequenz Ac-Phe-(Xaa-Yaa-Gly)₆-NH₂ eingebaut. (4*S*)Amp stabilisiert dabei die Tripelhelix auch in der Xaa Position (Yaa=Pro) von pH=3-9 und das, obwohl die einzelnen Peptidstränge mehrfach positiv geladen sind. Kristallstrukturen an anderen Modellpeptiden haben gezeigt haben, dass Prolin Einheiten in der Xaa Position (C-Terminal zu Gly) eine C^γ-endo Konformation haben und jene in der Yaa Position (N-Terminal zu Gly) eine C^γ-exo Konformation.^{65,167,168} (4*R*)-konfigurierte elektronenziehende Substituenten mit einer C^γ-exo Vorzugskonformation wie das natürliche (4*R*)Hyp stabilisieren die Tripel Helix nur in der Yaa Position.^{66,169} Allerdings stehen die Resultate von Ganesh und Mitarbeitern im Widerspruch zu ersten Experimenten in der Forschungsgruppe Wennemers.¹⁷⁰

3.2. Einfluss einer Wasserstoffbrücke in Ac-Hyp-OMe?

Ähnlich wie für Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) (Kapitel 3.2.3) kann auch für Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) eine Wasserstoffbrücke von der Hydroxygruppe zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Esters ausgebildet werden. Diese ist in Abbildung 23 in der von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld mit ab initio Rechnungen ermittelten Struktur eingezeichnet.¹⁵² Die Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke wird durch IR spektroskopische Daten gestützt: In CHCl₃ ist die Ester Carbonylschwingung bei 1725 cm⁻¹, 21 Wellenzahlen tiefer als für die diastereomere Verbindung Ac-(4*R*)Hyp-OMe (**25R**), die keine intramolekulare H-Brücke ausbilden kann.²³ Damit stellt sich die Frage, ob die Wasserstoffbrücke, wie beim Acetamidoderivat **22S**, den Anteil des *s-trans* Konformers erhöht. Denn auch hier führt die Wasserstoffbrücke zu einer Orientierung des Methylesters, die zu einer n→π* Interaktion passt. Die Rechnung weist einen Abstand von 2.84 Å bei einem Winkel von 105° aus.¹⁵²

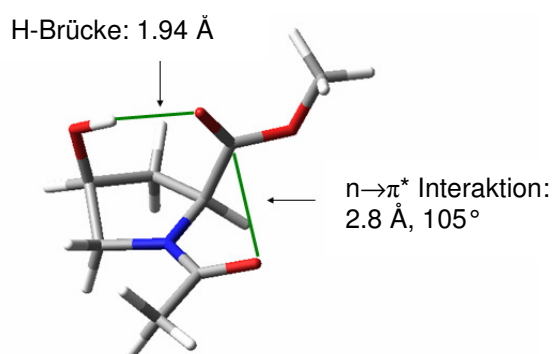
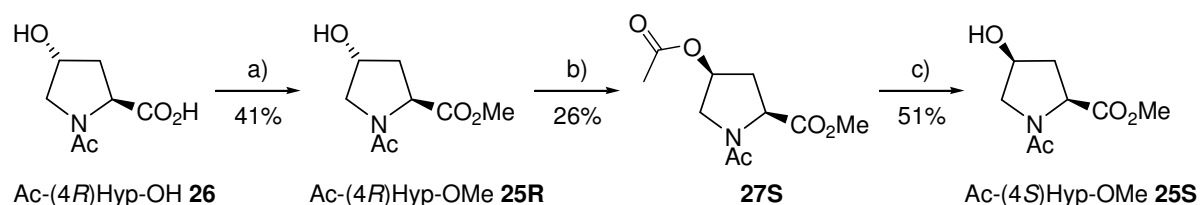


Abbildung 23: Struktur von Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) in der auf RIMP2/SVP//B3LYP/6-31G***-Niveau energetisch günstigsten Konformation (*s-trans*, C^γ-exo).¹⁵²

Das *s-cis:s-trans* Verhältnis wird in der Literatur lediglich in D₂O mit 1:2.4 (bei 25°C) und in Dioxan mit 1:1.8 (bei 37°C) angegeben.^{23,53} Die Resultate zu Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**) und quantenmechanische Rechnungen in der Gasphase von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld lassen einen höheren *s-trans* Anteil erwarten,¹⁵² worauf die literaturbekannten Verbindungen¹⁷¹ Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) und Ac-(4*R*)Hyp-OMe (**25R**) nachsynthetisiert wurden. Die kommerziell erhältliche Carbonsäure **26** wurde dafür mit SOCl₂ in MeOH in den Methyl ester **25R** überführt. Eine Mitsunobu Reaktion mit AcOH führte zum acetylierten Hydroxyprolinderivat **27S**, worauf der Acetyl ester in MeOH selektiv basisch gespalten wurde um Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) darzustellen (Schema 6).



a) SOCl₂ (1.5 eq), MeOH, 0°C; b) PPh₃ (2 eq), AcOH (2 eq), DIAD (2 eq), THF, Toluol, RT; c) K₂CO₃, MeOH, RT.

Schema 6: Synthese von Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) und Ac-(4*R*)Hyp-OMe (**25R**).

Tatsächlich zeigt das ¹H-NMR-Spektrum von Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) in CDCl₃ ein *s-cis:s-trans* Verhältnis von 1:4.7 (Tabelle 7A). Damit hat in CDCl₃, wie bei den acylierten Aminoprolinderivaten **21-23** das (4*S*)-Diastereomer einen höheren *s-trans* Anteil als das (4*R*)-Isomer. Der deutlich tiefere Wert in D₂O bedeutet, dass in Wasser diese intramolekulare Wasserstoffbrücke noch deutlicher als für die acylierten Aminoprolinderivate **21S-23S** an Einfluss verliert aufgrund der Interaktion mit dem Lösungsmittel. Die für das Lösungsmittel CDCl₃ publizierten IR-spektroskopischen Daten, die für eine Wasserstoffbrücke sprechen, konnten reproduziert werden. In 1,4-Dioxan, wo $K_{trans/cis}$ tief ist, findet sich hingegen auch im IR-Experiment kein Hinweis auf eine Wasserstoffbrücke (Tabelle 7B). Dies stützt den

Zusammenhang einer Wasserstoffbrücke vom C^γ-Substituent zum Methylester und dem *s-cis:s-trans* Gleichgewicht. Trotz der tiefen Dielektrizitätskonstanten von Dioxan ($\epsilon_r = 2.2$) verhindern Solvatationseffekte dieses H-Akzeptors eine intramolekulare Wasserstoffbrücke. Im Vergleich dazu scheint das H-Donor Lösungsmittel Chloroform die intramolekulare Wasserstoffbrücke nicht zu konkurrieren. Lubell und Mitarbeiter beobachteten für Ac-(4*R*)Hyp-NHMe und Ac-(4*S*)Hyp-NHMe in D₂O für beide Verbindungen ein $K_{trans/cis}$ von 3.8.¹⁷² Dies stützt unsere Daten, weil das Carboxamid ein besserer H-Brücken Akzeptor ist als der Ester.¹⁷³

Für den Einfluss der Wasserstoffbrücke auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht spricht zusätzlich, dass $K_{trans/cis}$ in CDCl₃ 2.1 beträgt, wenn die Hydroxygruppe acetyliert ist und damit keine Wasserstoffbrückendonator mehr vorliegt (Verbindung **27S**, Schema 6).

In allen getesteten Lösungsmitteln wurden für die Hydroxyprolinderivate **25S** und **25R** Ring Konformationen mit einer *gauche* Interaktion gefunden, d. h. C^γ-exo für **25R** und C^γ-endo für **25S** (Anhang, Seite 207). Besonders ausgeprägt sind die Kopplungskonstanten für **25S** in CDCl₃. Diese Ring Konformationen werden auch durch die quantenmechanischen Analysen von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld gestützt, die aufgrund der Wasserstoffbrücke in der Gasphase eine starke Bevorzugung der C^γ-endo Konformation für **25S** berechnen.¹⁵²

Tabelle 7: A) *s-cis:s-trans* Verhältnisse der Hydroxyprolinderivate **25S** und **25R** in bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie (25°C, 80 mM). B) Ester Carbonyl Streckschwingungen von **25S** und **25R** bestimmt mittels IR Spektroskopie (25°C, 10 mM).

A)	Ac-(4 <i>S</i>)Hyp-OMe 25S	Ac-(4 <i>R</i>)Hyp-OMe 25R
D ₂ O	1 : 2.5	1 : 6.8
CDCl ₃	1 : 4.7	1 : 4.2
CD ₂ Cl ₂	1 : 4.5	1 : 5.0
Dioxan-d ₈	1 : 2.2	1 : 4.1
DMSO-d ₆	1 : 1.9	1 : 5.0
B)	Ac-(4 <i>S</i>)Hyp-OMe 25S	Ac-(4 <i>R</i>)Hyp-OMe 25R
CHCl ₃	1725 cm ⁻¹	1745 cm ⁻¹
Dioxan	1754 cm ⁻¹	1750 cm ⁻¹

Unser Modell wie eine Wasserstoffbrücke die Konformation der Prolinderivate **21S-24S** beeinflusst, hat eine Voraussage für die Konformation von Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) erlaubt. Die Überprüfung zeigte, dass für Ac-(4*S*)Hyp-OMe (**25S**) der *s-trans* Anteil in CHCl₃ trotz

C^{γ} -endo Konformation höher ist, als für das (4*R*)-Epimer **25R** mit einer C^{γ} -exo Konformation bzw. als das unsubstituiertes Prolin (Ac-Pro-OMe, $K_{cis/trans}$ ($CDCl_3$) = 3.8).

3.3. Einfluss des Methylesters im Vergleich zu weniger elektrophilen Carbonsäurederivaten auf die Konformation der Verbindungen Ac-Azp-X (X= OMe, OH, O⁻, NMe₂)

Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Substituenten an C^{γ} auf die konformationellen Eigenschaften von Prolin wurden jeweils die Methylester als Modellverbindungen betrachtet. Ein wichtiger Aspekt dabei war die Frage inwiefern eine $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung vom Acetyl Sauerstoffatom zur Carbonylgruppe dieses Methylesters die Konformation mitbestimmt. Diese $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung führt zur mesomeren Grenzformel die in Abbildung 24 mit very Minor beschriftet ist und nur sehr geringfügig zur Resonanz beiträgt.

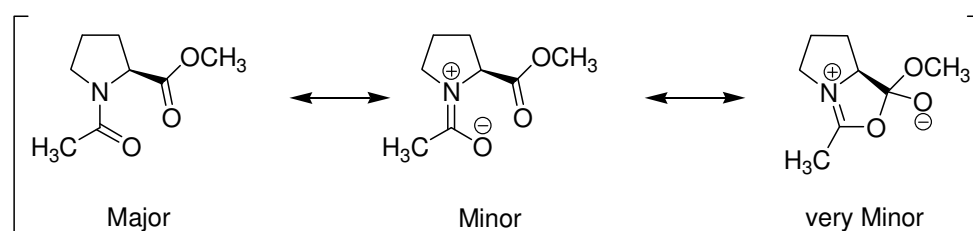


Abbildung 24: Major und Minor Resonanzformel des Amids und eine very Minor Resonanzstruktur, die der hyperkonjugativen Delokalisation einer $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion in Ac-Pro-OMe entspricht.

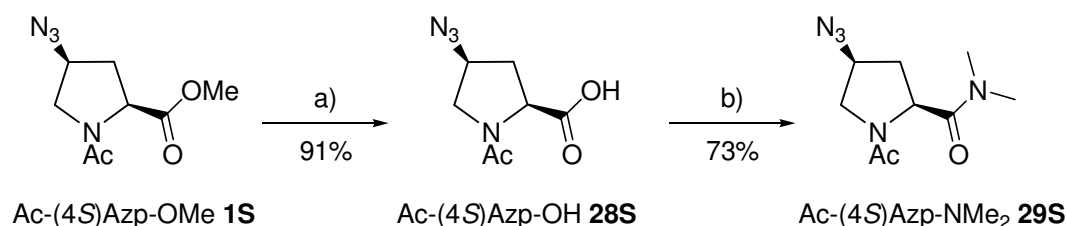
Diese $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung sollte von der Elektrophilie der Carbonylgruppe des Carbonsäurederivats abhängig sein. Die Carbonylgruppe des Methylesters in unseren Modellverbindungen ist elektrophiler als eine Amid Carbonylgruppe, die eine stärkere Mesomeriestabilisierung aufweist.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Um die Resultate von den Modellverbindungen besser auf Oligoprolin bzw. Peptide im Allgemeinen übertragen zu können, wurde der Einfluss des Esters gegenüber einem Amid oder einer Säure (C-Terminus in den Oligoprolinen) untersucht. Diese Versuchsreihe erlaubt auch den Einfluss der $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung zu untersuchen, wenn in Ac-Azp-X anstelle des Methylesters (X = COOMe) ein tertiäres Dimethylamid (X = CONMe₂) oder aber eine Säure (X = COOH) beziehungsweise ein Carboxylat (X = COO⁻) vorliegt. Die $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung sollte mit der geringer werdenden Elektrophilie in der Reihe -COOMe > -COOH \approx -CONMe₂ > -COO⁻ abnehmen. Vorausgesetzt andere Wechselwirkungen überwiegen nicht, erwartet man damit eine Abnahme von $K_{trans/cis}$ um die Amidbindung in der Reihe -COOMe > -COOH \approx

$-\text{CONMe}_2 > -\text{COO}^-$ für Verbindungen bei denen eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht mitbestimmt. Dazu wurden jeweils die beiden Diastereoisomere der acetylierten 4-Azidoproline analysiert.

Derivate mit einer sekundären Methylamidfunktion am C-Terminus ($X = \text{CONHMe}$) wurden nicht untersucht, da das NH Proton eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zum Acetyl-Sauerstoffatom ausbilden kann (γ -turn) und damit das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht beeinflusst.^{177,178}

3.3.1. Synthese der Carbonsäurederivate **28** und **29**

Die Synthese ging wiederum von den gut untersuchten diastereomeren Verbindungen Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) und Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) aus.³⁷ Zuerst erfolgte eine Verseifung des Methylesters zur Säure **28S** (Schema 7). Diese wurde mit Pentafluorphenol und EDC aktiviert, um mit Dimethylamin-hydrochlorid das Dimethylamid **29S** herzustellen.



a) NaOH (1.5 eq), H₂O, THF, MeOH, RT, 3h; b) i) C₆F₅OH (1.05 eq), EDC (1.5 eq), CH₂Cl₂, RT, 1h; ii) HNMe₂⁺ HCl (10 eq), NEt₃ (11 eq), CH₂Cl₂, RT, 1h.

Schema 7: Synthese von Ac-(4*S*)Azp-OH (**28S**) und Ac-(4*S*)Azp-NMe₂ (**29S**).

Die entsprechenden diastereomeren Verbindungen Ac-(4*R*)Azp-OH (**28R**) und Ac-(4*R*)Azp-NMe₂ (**29R**) wurden ausgehend von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) analog hergestellt. Ac-Pro-OH (**30**) wurde aus dem kommerziell erhältlichen Ac-Pro-OMe durch Verseifung mit NaOH synthetisiert.

3.3.2. Konformationsanalyse der Carbonsäurederivate **28** und **29**

Analyse der Carbonsäuren

Die Carbonsäuren Ac-(4*S*)Azp-OH (**28S**) und Ac-(4*R*)Azp-OH (**28R**) sowie Ac-Pro-OH (**30**) wurden mittels ¹H-NMR Spektroskopie analysiert (Tabelle 8). Für Acetyl-(4*R*)-Azidoproline verringert sich der *s-trans* Überschuss von $K_{trans/cis} = 6.1$ auf 4.0 durch die Verseifung des Methylesters. Die Beobachtung stimmt mit der erwarteten Abschwächung der $n \rightarrow \pi^*$

Interaktion überein. Auch für das (4*S*)-Epimer bei dem die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion keinen bedeutenden Einfluss hat, verschiebt sich das Gleichgewicht in diese Richtung ($K_{trans/cis} = 2.6$ zu 2.0), jedoch weniger stark.

Tabelle 8: *s-cis:s-trans* Verhältnis der Carbonsäurederivate **28S**, **28R** und **30** in wässriger Lösung bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (25°C, 80 mM).

Verbindung		<i>s-cis:s-trans</i>	
		neutral	basisch
Ac-(4 <i>S</i>)Azp-OH	28S	1 : 2.1	1.2 : 1
Ac-(4 <i>R</i>)Azp-OH	28R	1 : 4.0	1.4 : 1

Die Carbonsäure **28S** zeigt vicinale $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplungskonstanten einer C^γ -endo Konformation und Epimer **28R** jene der C^γ -exo Ringkonformation (Anhang, Seite 208). Der Azidsubstituent nimmt damit jeweils eine pseudo-axiale Position ein, die sich mit einem gauche Effekts erklären lässt.

Durch Zugaben von TFA ergeben sich nur geringe Veränderungen in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren.

Analyse der Carboxylate

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren im basischen Milieu (1M NaOD in D_2O) zeigen eine weitere Verschiebung des *s-cis:s-trans* Gleichgewichts in Richtung des *s-cis* Konformers für die deprotonierten Carbonsäurederivate **28S** und **28R** (Tabelle 8). Es überwiegt nun das *s-cis* Konformer. Die Werte für $K_{trans/cis}$ sind 0.7 für Ac-(4*S*)Azp- O^- und 0.9 für Ac-(4*R*)Azp- O^- . Vermutlich ist eine ungünstige Wechselwirkung des Carboxylates mit dem elektronegativen Sauerstoff des Amids in der *s-trans* Konformation für die starke Destabilisierung des *s-trans* Konformers verantwortlich, wohingegen bei der protonierten Carbonsäure eine stabilisierende Wasserstoffbrücke im *s-trans* Konformer möglich wird (Abbildung 25).¹⁵² Ähnliche Effekte waren bereits für Ac-Pro-OH bekannt.¹⁷⁹ Im Rahmen dieser Arbeit wurde in D_2O ein Wert von $K_{trans/cis} = 3.4$ bestimmt. Mit 0.15 M NaOD in D_2O wird ein $K_{trans/cis} = 0.8$ beobachtet.

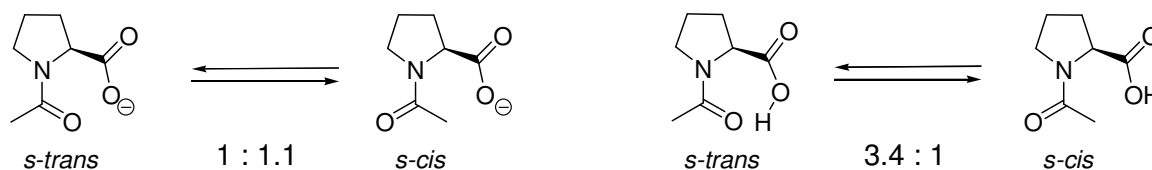


Abbildung 25: *s-cis:s-trans* Gleichgewicht in wässriger Lösung für Ac-Pro-OH (**30**) bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (25°C, 80 mM) in deprotonierter (links) und protonierter Form (rechts).

Die Pyrrolidin Ring Konformationen der Carbonsäuren **28S** und **28R**, wie auch die Bevorzugung des *s-cis* Konformers durch die Deprotonierung werden durch ab initio Rechnungen gestützt, die von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld durchgeführt wurden.¹⁵²

Der Effekt, dass ein (4*R*)-Azidsubstituent die *s-trans* Prolylamidbindung begünstigt und ein (4*S*)-Azidsubstituent die *s-cis* Konformation im Vergleich zum nicht substituierten Prolin, gilt damit nicht nur für die Methylesterderivate (Ac-Xaa-OMe), sondern auch für die Carbonsäuren (Ac-Xaa-OH) respektive die Carboxylate (Ac-Xaa-O⁻). Die vom entsprechenden Methylester bekannten Ring Konformationen bleiben ebenfalls erhalten.

Analyse der Dimethylamide

Auch die Analysen der beiden diastereomeren Verbindungen Ac-(4*S*)Azp-NMe₂ (**29S**) und Ac-(4*R*)Azp-NMe₂ (**29R**) können mit der schwächeren n→π* Interaktion erklärt werden (Tabelle 9). In D₂O ist der *s-trans* Anteil für das Dimethylamid **29R** (K_{*cis/trans*} = 3.7) geringer im Vergleich zum Methylester **1R** (K_{*cis/trans*} = 6.1). Weil ein Amid deutlich weniger elektrophil ist, wird damit die Wechselwirkung mit dem nucleophilen Acetyl-Sauerstoffatom schwächer und das *s-trans* Konformer wird weniger stark stabilisiert. Dies wurde in ähnlicher Weise auch beim Carbonsäurederivat **28R** mit einem *s-cis:s-trans* Verhältnis von 1:4.0 beobachtet. Die Kopplungskonstanten des ¹H-NMR-Spektrums zeigen eine C^γ-exo Konformation. Auch das (4*S*)-Epimer **27S** zeigt in D₂O die Pyrrolidin Ring Konformation (C^γ-endo), die man aufgrund des Azido gauche Effekts erwarten würde (Anhang, Seite 209). Das *s-cis:s-trans* Verhältnis ist mit 1:2.9 leicht höher als für den Methylester, aber tiefer im Vergleich zum Dimethylamid **29R** (1:3.7).

Tabelle 9: *s-cis:s-trans* Verhältnisse der Dimethylamide **29S** und **29R** in verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie (25°C, 80 mM).

	Ac-(4 <i>S</i>)Azp-NMe ₂ 29S	Ac-(4 <i>R</i>)Azp-NMe ₂ 29R
D ₂ O	1 : 2.9	1 : 3.7
CDCl ₃	1 : 6.4	1 : 9.3
Dioxan-d ₈	1 : 5.4	1 : 6.9

In CDCl₃ (und abgeschwächt auch in Dioxan-d₈) dagegen werden sehr hohe K_{*trans/cis*} Werte beobachtet: 6.4 für Dimethylamid **29S** und gar 9.3 für das Epimer **29R**. Die ¹H,¹H Kopplungskonstanten zeigen für **29S** eine C^γ-exo Konformation, also eine *anti* Anordnung des Azidsubstituenten. Alle vicinalen ¹H-¹H Kopplungskonstanten liegen zwischen 7.2 Hz

und 7.8 Hz (Anhang, Seite 209). Interessanterweise hat diese Struktur bei ab initio Rechnungen in der Gasphase die geringste Energie, während das *s-cis* Konformer von **29S**, wie im Experiment, eine C^γ -endo Konformation bevorzugt (Abbildung 26).¹⁵² Zu beachten ist, dass der sterische Anspruch vom Dimethylamid Rest grösser ist als vom Methylester oder der Säure. Für **29S** in einer C^γ -endo Konformation scheint diese 1,3 Interaktion zum Azid den Gewinn einer *gauche* Wechselwirkung zu überwiegen. Die Rechnungen sagen für die Gasphase eine starke Bevorzugung der *s-trans* Konformation voraus. Einen Beitrag dazu leistet eine Wechselwirkung des Acetyl-Sauerstoffatoms mit einem Wasserstoffatom aus einem Dimethylamid.¹⁵² Möglicherweise trät diese Wechselwirkung zu den grossen *s-trans* Überschüssen in $CDCl_3$ bzw. Dioxan- d_6 bei.

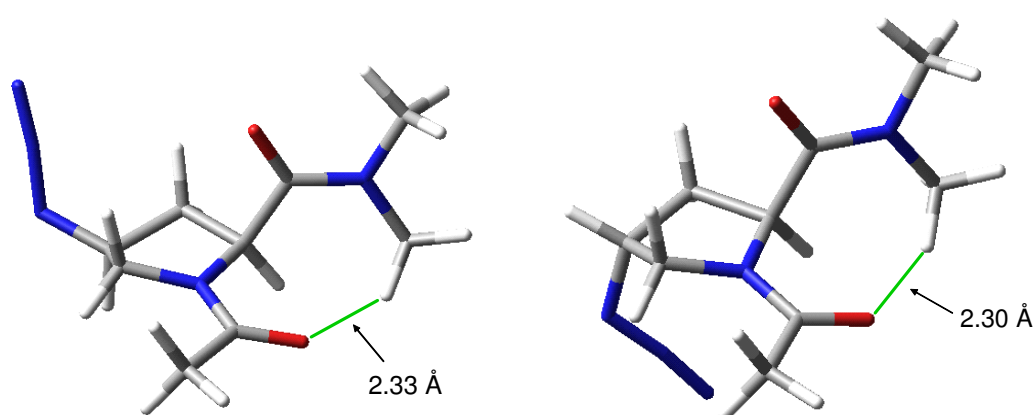


Abbildung 26: Strukturen von Ac-(4*S*)Azp-NMe₂ (**29S**) (links) und Ac-(4*R*)Azp-NMe₂ (**29R**) (rechts,) in der auf RIMP2/SVP//B3LYP/6-31G***-Niveau energetisch günstigsten Konformation (jeweils *s-trans* und C^γ -exo).¹⁵² In beiden Strukturen ist die Interaktion des Carbonylsauerstoffs des Acetylrestes mit einem Wasserstoffatom des Dimethylamids in grün eingezeichnet.

Zusammenfassend konnte in D_2O eine Abnahme des *s-trans* Überschusses nachgewiesen werden, wenn der Ester in der Verbindung Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) durch eine Säure bzw. ein Amid ersetzt wird. Die Abhängigkeit von der Elektrophilie des potentiellen π^* -Akzeptor Carbonyls bekräftigt, dass die stabilisierende $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion im *s-trans* Konformer für die Lage des *s-cis*:*s-trans* Gleichgewichts wichtig ist. In weniger polaren Lösungsmitteln treten andere Wechselwirkungen in Konkurrenz zum stereoelektronischen Effekt. Für alle Verbindungen findet sich mit einer (4*R*)-Konfiguration ein höherer *s-trans* Gehalt als bei den entsprechenden (4*S*)-Diastereomeren.

3.4. *s-cis:s-trans* Isomerie einer Prolylamidbindung in einem kurzen Peptid

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von einzelnen 4-Hydroxyprolin (Hyp) bzw. 4-Azidoprolin (Azp) Einheiten auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der Prolylamidbindung in einem kurzen Peptid untersucht. Dazu wurde eine Versuchsanordnung genutzt, die in der Forschungsgruppe von Prof. Kiefhaber¹⁵⁴ für das Peptid Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (**31**) (Abbildung 27 auf der folgenden Seite) etabliert ist. Eine isomerspezifische Proteolyse dieses Peptids ermöglicht das zeitliche Verfolgen der *s-cis:s-trans* Isomerisierung, vorausgesetzt das Enzym akzeptiert auch die 4-substituierten Prolinderivate anstelle der Prolin Einheit im Peptid.¹⁸⁰ Im Vergleich zu den bisher in dieser Arbeit untersuchten Modellverbindungen Ac-Xaa-OMe, bei denen jeweils die Acetyl Amidbindung betrachtet wurde, erlaubt dies die Analyse einer Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren in einer Peptidkette. Zudem können über die Temperaturabhängigkeit dieser Methode thermodynamische Aussagen zum *s-cis:s-trans* Gleichgewicht gemacht werden, ähnlich wie für die einfacheren Modellverbindungen über die 2D EXSY NMR Analysen.¹⁸¹

Die kinetischen Messungen an den synthetisierten Peptiden wurden von Dr. Annett Bachmann aus der Forschungsgruppe von Prof. Kiefhaber durchgeführt.¹⁵⁴

3.4.1. Theoretischer Teil zum Chymotrypsin Experiment

Die Untersuchung der Prolyl-*s-cis:s-trans*-Isomerisierung im Peptid Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (**31**) wird durch die Spezifität der Serin Endopeptidase α -Chymotrypsin ermöglicht. Diese spaltet die C-terminale Amidbindung nach der Phenylalanin Einheit kaum, wenn die Ala-Pro Amidbindung in einer *s-cis* Konformation vorliegt. Erst eine Umwandlung in die *s-trans* Konformation führt zu einer Abspaltung von *p*-Nitroanilin, dessen Freisetzung in der Lösung mittels UV Absorptionsspektroskopie bei 390 nm gut detektierbar ist (Abbildung 27).¹⁸²

Wird die Proteolyse bei hoher Enzymkonzentration durchgeführt, ist die Abspaltung deutlich schneller als die *s-cis:s-trans* Isomerie ($k_1 \gg k_{c-t}$) und die Proteolyse folgt einem Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung. Die Freisetzung von *p*-Nitroanilin setzt sich damit aus einer schnellen kinetischen Phase für die Spaltung der Peptide mit einer

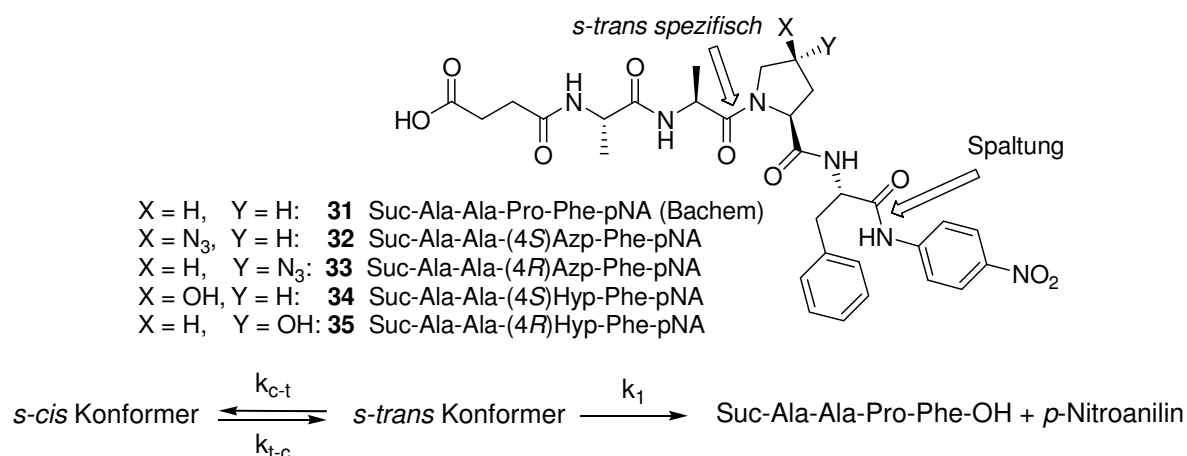


Abbildung 27: Oben: Untersuchte Verbindungen **31-35**. Die Endopeptidase α -Chymotrypsin spaltet die Phe-pNA Amidbindung nur, wenn die Ala-Pro Amidbindung in der *s-trans* Konformation vorliegt. Unten: Schematische Darstellung der Reaktionen in diesem Versuchsaubau: *s-cis*:*s-trans* Gleichgewicht und irreversible Proteolyse des *s-trans* Konformers.

s-trans Prolylamidbindung und einer langsamen kinetischen Phase zusammen. Dabei wird die letztere Phase von der Geschwindigkeit der *s-cis* \rightarrow *s-trans* Isomerisierung bestimmt.

$$A_{390nm}(t) = A_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{k_{c-t} \cdot t} + A_\infty \quad (1)$$

Durch Abgleichen der experimentell beobachteten Absorptionzunahme mit Gleichung 1 können die folgenden kinetischen Parameter bestimmt werden: A_1 ist die Amplitude der schnellen kinetischen Phase und k_1 die dazugehörige unimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Proteolyse der Moleküle mit einer *s-trans* Prolylamidbindung. A_2 ist die Amplitude der langsamen kinetischen Phase und k_{c-t} die Geschwindigkeitskonstante für die dazugehörige *s-cis* \rightarrow *s-trans* Isomerisierung. Das Amplitudenverhältnis der beiden Phasen entspricht der Gleichgewichtskonstanten $K_{trans/cis}$ (Gleichung 2, siehe auch experimentelle aufgenommene UV Absorption in Abhängigkeit der Zeit in Abbildung 28).¹⁸³

$$K_{trans/cis} = \frac{A_1}{A_2} = \frac{k_{c-t}}{k_{t-c}} = \frac{[s-trans]}{[s-cis]} \quad (2)$$

Nach van't Hoff (3) können Enthalpie (ΔH_{vH}°) und Entropie (ΔS°) der *s-cis*:*s-trans* Isomerisierung bestimmt werden. Das Auftragen von $\ln(K_{trans/cis})$ gegen $1/T$ ergibt eine Gerade. Aus der Steigung kann ΔH_{vH}° und aus dem Achsenabschnitt ΔS° bestimmt werden.

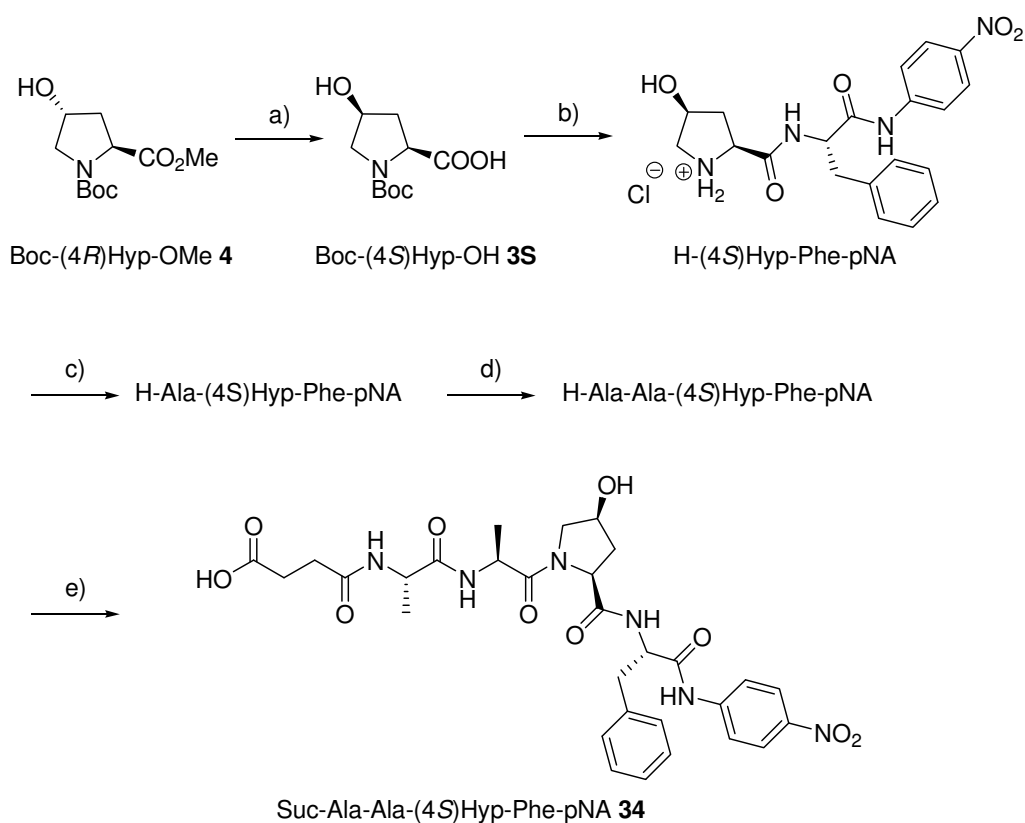
$$\ln(K_{trans/cis}) = \frac{\Delta H_{vH}^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (3)$$

Die Temperaturabhängigkeit von k_{c-t} erlaubt das Bestimmen der Aktivierungsenergie nach Arrhenius (4) durch eine lineare Regression von $\ln(k_{c-t})$ gegen $1/T$.

$$\ln(k_{c-t}) = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(A_2) \quad (4)$$

3.4.2. Synthese der Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA Peptide 32-35

Die Synthese der vier Peptide erfolgte in Lösung mit einer Boc-Schutzgruppen Strategie. Schema 8 zeigt den Syntheseweg exemplarisch anhand des Peptids Suc-Ala-Ala-(4*S*)Hyp-Phe-pNA (**34**). Die Peptide **32**, **33** und **35** wurden mit den entsprechenden Boc-geschützten Prolinderivaten analog hergestellt (Synthese der analogen Verbindungen zu **3S** siehe Schema 2).



a) i) DIAD (2 eq), HCOOH (2 eq), PPh₃ (2 eq) THF, Toluol, RT; ii) NaOH, RT, 25%; b) i) H-Phe-pNA (0.83 eq), EDC (1.25 eq), CH₂Cl₂, RT, 81%; ii) 4M HCl in Dioxan, RT, 73%; c) Boc-Ala-OH (1.2 eq), EDC (1.5 eq), ⁱPr₂NEt (1.2 eq), CH₂Cl₂, RT, 99%; ii) 4M HCl in Dioxan, RT, 55%; d) Boc-Ala-OH (1.2 eq), EDC (1.5 eq), ⁱPr₂NEt (1.2 eq), CH₂Cl₂, RT, 79%; ii) 4M HCl in Dioxan, RT, 86%; e) Bernsteinsäureanhydrid (1.2 eq), NEt₃ (1.2 eq), CH₂Cl₂, DMF, RT, 10%.

Schema 8: Synthese von Suc-Ala-Ala-(4*S*)Hyp-Phe-pNA (**34**).

Boc-(4*S*)Hyp-OH (**3S**) wurde in einer Mitsunobu Reaktion mit Ameisensäure aus Boc-(4*R*)Hyp-OMe (**4**) und anschließender basischer Verseifung hergestellt.¹⁸⁴ Ausgehend vom kommerziell erhältlichem H-Phe-pNA wurden drei Peptid Kupplungen mit EDC durchgeführt, zuerst mit Boc-(4*S*)Hyp-OH (**3S**) und dann zweimal mit Boc-Ala-OH. Die

Abspaltungen der Boc-Schutzgruppe erfolgten jeweils mit HCl in Dioxan. Die Ausbeuten dieser drei Peptid Kupplungen betragen bei der Synthese der vier Peptide zwischen 21% und 24%. Anschliessend wurde das freie Amin der N-terminalen Alanin Einheit mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt.¹⁸⁰ Die Aufreinigung der Produkte über Umkehrphasen HPLC führte zu niedrigen Ausbeuten im letzten Reaktionsschritt (13% für **32**, 23% für **33**, 33% für **35** und 10 % für **34**).

3.4.3. Resultate und Diskussion der Chymotrypsin Experimente

Die Freisetzung von *p*-Nitroanilin wurde in einer Stopped Flow Apparatur UV-spektroskopisch verfolgt. Die Peptid Konzentration in der Mischkammer war 0.015 mM in 35 mM HEPES/NaOH Puffer bei pH 7.8 mit 9% DMSO. DMSO ist nötig für die Löslichkeit der Peptide. Die Konzentration von α -Chymotrypsin betrug 0.1 mM. Abbildung 28 zeigt beispielhaft den Verlauf der Absorption bei 390 nm und 25 °C für die Proteolyse der beiden Peptide **34** und **35** die (4*S*)Hyp bzw. (4*R*)Hyp enthalten. Man erkennt deutlich die beiden unterschiedlich schnellen Prozesse und ihre Amplituden (A_1 und A_2) sowie die verschiedenen Anteile der beiden Phasen im Vergleich der beiden Peptide.

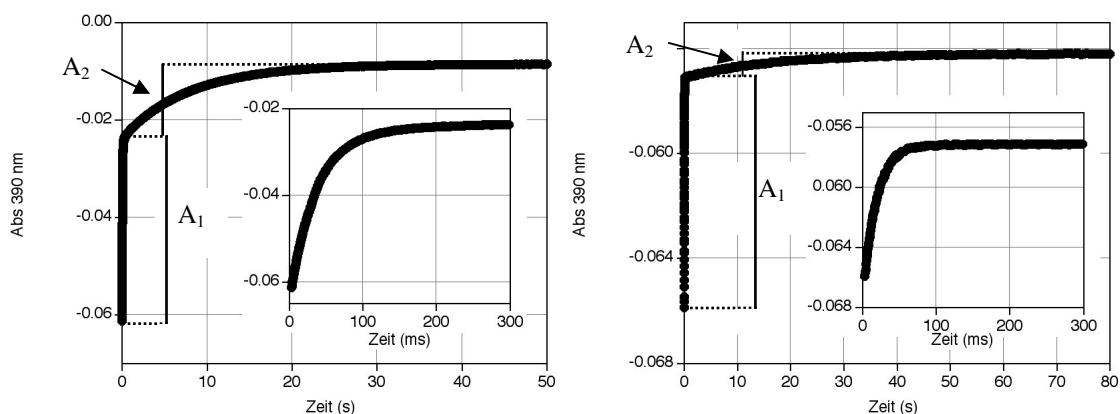


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Absorption von *p*-Nitroanilin bei 390 nm nach dem Mischen mit dem Enzym und von 3 ms bis 50 s bzw. 80 s inklusive einer Vergrößerung des Bereichs von 3 ms bis 300 ms für a) Peptid **34** mit (4*S*)Hyp und b) Peptid **35** mit (4*R*)Hyp. Eingezeichnet sind die Amplituden A_1 und A_2 deren Verhältnis $K_{trans/cis}$ ausmacht.

Erfreulicherweise wurden alle vier neu synthetisierten Peptide **32-35** als Substrat von α -Chymotrypsin akzeptiert. Der Substituent an C^{γ} verhindert weder die Spaltung, noch die Spezifität für die *s-trans* Prolylamidbindung. Die Proteolysegeschwindigkeitskonstante k_1 variiert leicht ($0.13-0.06 \text{ s}^{-1}$) für die fünf Peptide **31-35**. Tabelle 10 fasst den Einfluss des Substituenten an C^{γ} auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht bei 25°C zusammen. Das Prolin Referenzpeptid **31** zeigt ein *s-cis:s-trans* Verhältnis von 1:8.6, was 10.4 % *s-cis* Konformer

und 89.6 % *s-trans* Konformer entspricht. Der *s-cis* Anteil ist damit deutlich geringer als für die sterisch anspruchslosere Acetyl Amidbindung in den Modellverbindungen (Ac-Pro-OMe: 17 % *s-cis*²⁹; Ac-Pro-NHMe: 25 % *s-cis*¹⁸⁵). Die Wirkung von Hydroxy- und Azidsubstituent am C^γ-Atom von Prolin auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der Prolylamidbindung in den hier untersuchten Peptiden entspricht den Erwartungen aufgrund der Studien an den monomeren Verbindungen Ac-Azp-OMe (**1S**, **1R**) und Ac-Hyp-OMe (**25S**, **25R**). Peptid **35** mit einer (4*R*)Hyp Aminosäure Einheit und relativ schwach auch Peptid **33** mit (4*R*)Azp begünstigen die *s-trans* Konformation im Vergleich zum Prolin Referenz Peptid **31**. Im Gegensatz dazu verschieben (4*S*)-konfigurierte Substituenten das Gleichgewicht zur *s-cis* Konformation. Dabei erreicht das (4*S*)Azp enthaltende Peptid **32** den grösseren *s-cis* Anteil mit annähernd 25%.

Die *s-cis* → *s-trans* Isomerisierung (k_{c-t}) ist mit einem (4*S*)-konfigurierten Substituenten (**32**, **34**) schneller und mit einem (4*R*)-konfigurierten Substituenten (**33**, **35**) langsamer als das Prolin Referenzpeptid.

Für Suc-Ala-Ala-(4*R*)Flp-Phe-pNA und Suc-Ala-Ala-(4*S*)Flp-Phe-pNA wurden 11.0% bzw. 20.9% *s-cis* Anteil publiziert.¹² Das bedeutet, dass der Einfluss eines Fluorosubstituenten geringer ist, wobei nicht klar wird, ob exakt dieselben Bedingungen verwendet wurden.

Tabelle 10: Resultate der kinetischen Analyse bei 25°C für die Proteolyse der Peptide **31-35** mit α-Chymotrypsin.

Peptid	Amidbindung	$K_{trans/cis}$	% <i>s-cis</i>	k_{c-t} (s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (<i>cis-trans</i>)
31	Ala-Pro	8.6	10.4	0.076	9.2 s
33	Ala-(4 <i>R</i>)Azp	8.8	10.3	0.053	13 s
32	Ala-(4 <i>S</i>)Azp	3.0	24.8	0.13	5.4 s
35	Ala-(4 <i>R</i>)Hyp	12.5	7.4	0.057	12 s
34	Ala-(4 <i>S</i>)Hyp	4.5	18.2	0.094	7.4 s

In den Molekülen Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA führt damit ein elektronenziehender Substituent an C^γ von Prolin bei einer (4*S*)-Konfiguration zu einer Zunahme der *s-cis* Konformation und eine (4*R*)-Konfiguration verschiebt das Gleichgewicht zur *s-trans* Konformation, genau wie in den Modellverbindungen Ac-Pro-OMe. Die Wirkung der energetisch kleinen stereoelektronischen Effekte (gauche Effekt und daraus folgende Stärke der n→π* Interaktion) kann damit auch in deutlich komplexeren Systemen nachgewiesen werden. Stereoelektronische Effekte, welche das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der acetylierten Prolinderivate beeinflussen, sind also auch in kurzen Peptiden wirksam. Die Ergebnisse

zeigen, dass man 4-Azidoproline Einheiten einsetzen kann, um die Konformation von Peptiden gezielt zu manipulieren.

Aufgrund eines analogen Versuchsaufbaus konnten Fischer und Mitarbeiter Enzyme identifizieren, welche die *s-cis:s-trans* Isomerisierung von Amidbindungen katalysiert.¹³ Um zu untersuchen, ob eines dieser Enzyme, Human PPIase Cyclophilin 18 (hCyp18), auch die Isomerisierung in den hier untersuchten Peptiden **31-35** katalysiert, wurden die Versuch unter Anwesenheit des Enzym durchgeführt (103 μ M hCyp18). Wie Tabelle 11 zeigt, werden die Isomerisierungsreaktionen (k_{c-t} und k_{t-c}) einzig von Peptid **31** mit der Prolin Einheit schneller. Dies zeigt, dass weder 4-Azidoproline noch 4-Hydroxyproline Substrate für das Enzym hCyp18 sind.

Tabelle 11: Resultate der kinetischen Analyse bei 25°C für die Proteolyse der Peptide **31-35** mit α -Chymotrypsin und hCyp18 (103 μ M).

Peptid	Amidbindung	$t_{1/2} \text{ cis} \rightarrow \text{trans}$		$t_{1/2} \text{ trans} \rightarrow \text{cis}$	
		ohne hCyp18	mit hCyp18	ohne hCyp18	mit hCyp18
31	Ala-Pro	9.2 s	1.7	79	13
33	Ala-(4 <i>R</i>)Azp	13 s	11.4	115	115
32	Ala-(4 <i>S</i>)Azp	5.4 s	5.2	16	15
35	Ala-(4 <i>R</i>)Hyp	12 s	10.4	151	115
34	Ala-(4 <i>S</i>)Hyp	7.4 s	6.8	33	29

Die Temperaturabhängigkeit der Proteolyse wurde im Bereich von 5-45°C untersucht. Die Experimente wurden in Intervallen von 4°C durchgeführt. Tabelle 12 fasst die überraschenden Unterschiede für die 5 Peptide **31-35** zusammen. Einzig für Peptid **31** mit der Prolin Einheit favorisieren sowohl Enthalpie wie auch Entropie das *s-trans* Konformer ($\Delta H < 0$ und $\Delta S > 0$). Bei Peptid **33** mit (4*R*)Azp ist die Enthalpie für den *s-trans* Überschuss verantwortlich ($\Delta H < 0$ und $\Delta S < 0$). Während die Entropie bei den Peptiden **32**, **34** und **35** bei Raumtemperatur für ein negatives ΔG sorgt ($\Delta H > 0$ und $\Delta S > 0$). Abbildung 29 veranschaulicht das Verhalten von $K_{\text{trans/cis}}$ in Abhängigkeit der Temperatur. Für **31** und **33** nimmt $K_{\text{cis/trans}}$ mit zunehmender Temperatur ab während $K_{\text{cis/trans}}$ für die Peptide **32**, **34** und **35** zunimmt.

Weiterhin fällt auf, dass die Aktivierungsenergie für das Peptid **33** mit der (4*R*)Azp Aminosäure Einheit deutlich höher ist, wobei der prä-exponentielle Arrhenius Faktor ebenfalls sehr hoch ist.

Tabelle 12: Resultate der temperaturabhängigen Spaltung der Peptide **31-35** mit α -Chymotrypsin. Mit den Gleichungen 3 und 4 wurde die *s-cis*→*s-trans* Isomerisierung analysiert.

Peptid	Amidbindung	ΔH_{vH}° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/molK)	$E_a(c-t)$ (kJ/mol)	$A(c-t)$ (s ⁻¹)	$E_a(t-c)$ (kJ/mol)	$A(t-c)$ (s ⁻¹)
31	Ala-Pro	-3.6	4.5	77	$2 \cdot 10^{12}$	81	$1 \cdot 10^{12}$
33	Ala-(4 <i>R</i>)Azp	-8.3	-10	96	$4 \cdot 10^{15}$	104	$1 \cdot 10^{15}$
32	Ala-(4 <i>S</i>)Azp	5.5	26	74	$1 \cdot 10^{12}$	69	$5 \cdot 10^{10}$
35	Ala-(4 <i>R</i>)Hyp	4.2	34	74	$4 \cdot 10^{11}$	70	$7 \cdot 10^9$
34	Ala-(4 <i>S</i>)Hyp	7.8	38	75	$1 \cdot 10^{12}$	67	$1 \cdot 10^{10}$

In weiteren dynamischen Experimenten¹⁸⁶ wird die Forschungsgruppe um Prof. Kiefhaber untersuchen, ob dieser Unterschied auf eine Veränderung im Grund- oder Übergangszustand zurückzuführen ist. Es scheint jedenfalls, als ob die Mechanismen wie (4*R*)Azp und (4*R*)Hyp die *s-trans* Konformation in den Peptiden Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA begünstigen unterschiedlicher Natur sind. Ein besseres Verständnis dieser Unterschiede kann möglicherweise auch erklären, warum Azp und Hyp bei der Stabilisierung von Collagen Modellpeptiden unterschiedliche Abhängigkeiten von der Heizrate zeigen.¹⁷⁰

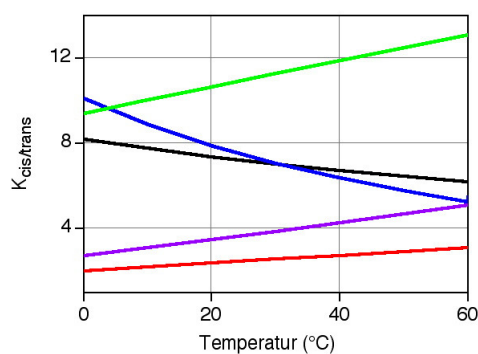


Abbildung 29: Temperaturabhängigkeit von $K_{cis/trans}$ für die Peptide **31** mit Pro (—), **33** mit (4*R*)Azp (—), **32** mit (4*S*)Azp (—), **35** mit (4*R*)Hyp (—) und **34** mit (4*S*)Hyp (—) berechnet aus den Werten für ΔH° und ΔS° .

3.5. Zusammenfassung Kapitel 3

Die Analyse von γ -substituierten Prolinderivaten in der Form ihrer acetylierten Methylester (Ac-Xaa-OMe) sollte erlauben, Tendenzen abzuschätzen, wie sich eine Funktionalisierung („Click“ Reaktion oder Reduktion/Acylierung) eines Azidoprolin-haltigen Polyprolin Gerüsts auf die Konformation auswirkt. Untersuchungen an den monomeren Systemen Ac-Azp-OH und Ac-Azp-NMe₂ und insbesondere einem kurzen Peptid zeigten auf, dass die beobachteten Effekte das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht betreffend nicht auf die Modellverbindungen und damit den Methylester beschränkt sind. Kapitel 4 diskutiert die Übertragbarkeit der gefundenen *s-cis:s-trans* Verhältnisse für Aminoprolin, Acetamidoprolin bzw. Triazolylprolin Einheiten auf die Polyprolin Struktur.

Darüber hinaus führten die Resultate zu einem verfeinerten Modell, wie die Konfiguration an C ^{γ} des Prolin Derivats das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht beeinflusst. Unbestritten bestimmt ein gauche Effekt eines elektronegativen Substituenten die Pyrrolidin Ringkonformation. Eine (4*R*)-Konfiguration führt zu C ^{γ} -exo, eine (4*S*)-Konfiguration zu C ^{γ} -endo. Der für die *s-cis:s-trans* Gleichgewichtslage gewichtige stereoelektronische Effekt ist eine n \rightarrow π^* Interaktion vom Acetyl Sauerstoffatom zur Carbonylfunktion des C-terminalen Carbonsäurederivats. Diese Wechselwirkung stabilisiert das *s-trans* Konformer. Der Einfluss dieser Interaktion ist wiederum entscheidend vom Winkel um die C ^{α} —C(O) Bindung (Diederwinkel ψ in einer Peptidkette) abhängig. Eine C ^{γ} -endo Konformation und insbesondere ein sterisch anspruchsvoller Substituent, der bei einer (4*S*)-Konfiguration pseudo-axial steht, verhindern eine Ausrichtung des Methylesters, wie er für die n \rightarrow π^* Interaktion nötig wäre (Abbildung 30a im Vergleich zu einer C ^{γ} -exo Konformation in Abbildung 30c). Bereits ein Fluorsubstituent der im Vergleich zu einem Wasserstoffatom einen ähnlichen van-der-Waals-Radius hat (1.35 Å bzw. 1.30 Å) aber eine längere Bindung zum C ^{γ} -Atom (1.4 Å zu 1.1 Å) macht einen deutlichen Unterschied.²² Wenn der Substituent an C ^{γ} allerdings eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff des Methylesters ausbilden kann, ergibt das einen Diederwinkel ψ in der Nähe von 140°, der gut zu einer n \rightarrow π^* Interaktion passt (Abbildung 30b). Unter aprotischen Bedingungen kann diese Wasserstoffbrücke für eine C ^{γ} -endo Konformation zu einem K_{*trans/cis*} Wert von bis zu 5.8 führen (in CDCl₃ für Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**)). Dies zeigt, dass nicht alleine die Pyrrolidin Ring Konformation entscheidend ist für eine effektive n \rightarrow π^* Interaktion sondern die Orientierung der Carbonylgruppen zueinander. Die Bedeutung des Diederwinkels ψ wird

deutlich, wenn Kristallstrukturen von acetylierten Methylestern von Prolinderivaten betrachtet werden. Im Anhang (Seite 210) sind publizierte Strukturen und teils unveröffentlichte Daten der Forschungsgruppe Wennemers aufgelistet. Eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion führt zu einem Diederwinkel ψ im Bereich von 140° (bzw. -30° , die Methoxygruppe kann auch vom Pyrrolidin Ring weg zeigen). Für Verbindungen, die keine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion zulassen (*s-cis* Konformation in den Kristallen) findet sich ein Diederwinkel um 180° . In der ab initio Rechnung der energieärmsten Konformation von Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) wurde ein Diederwinkel ψ von 11° bestimmt, womit die Interaktion vom Azidsubstituenten mit dem Methylester ebenso minimiert wird wie bei einem Diederwinkel ψ um 180° .³⁷

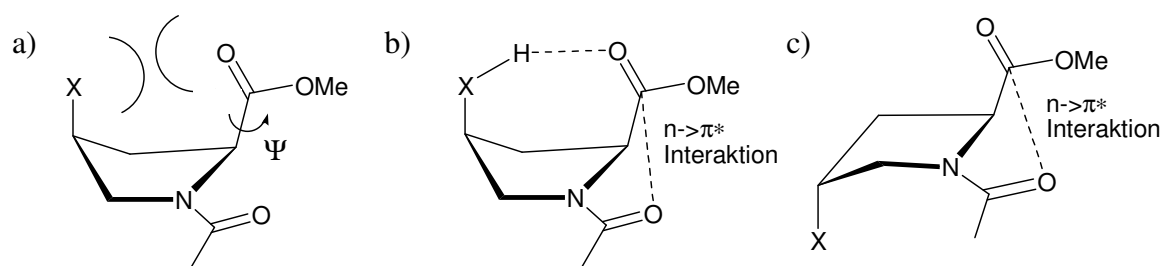


Abbildung 30: Modelle für die sterische Interaktion des Substituenten X mit Auswirkung auf den Diederwinkel ψ und die $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion in einer C^γ -endo Konformation von Ac-(4*S*)Xaa-OMe a) für einen Substituenten ohne H-Brückendonor; b) für einen Substituenten mit H-Brückendonor und c) von Ac-(4*R*)Xaa-OMe für eine C^γ -exo Konformation.

4. Funktionalisierung der helicalen Struktur

In Kapitel 2 dieser Arbeit wurde demonstriert, wie 4-Azidoprolin Einheiten in die Polyprolin Helix eingebaut werden können. Das vorangehende Kapitel 3 wiederum hat die Möglichkeiten aufgezeigt, die Azidfunktion in monomeren 4-Azidoprolinderivaten zu funktionalisieren. In diesem Kapitel geht es einerseits darum zu zeigen, wie man die Azidfunktion in Oligoprolin Peptiden synthetisch nutzen kann. Andererseits wurde deren Effekt auf die konformationellen Eigenschaften der derivatisierten Oligoproline untersucht. Es stellt sich die Frage, inwiefern die helicale Struktur bestehen bleibt und ob sich die Trends von den Untersuchungen an den Modellverbindungen Ac-Xaa-OMe **13-24** aus Kapitel 3 auf das Gleichgewicht PPI/PPII übertragen lassen, wenn die Azidfunktion in eine Ammoniumgruppe (Kapitel 4.2), ein Amid (Kapitel 4.3) oder ein Triazol (Kapitel 4.4) umgewandelt wurde.

4.1. Die Polyprolin Helix als molekulares Gerüst

Abbildung 31 verdeutlicht die Anordnung der Azidfunktionen, wenn beispielsweise jede dritte Aminosäure eine (4*R*)Azp Einheit ist. In der PPII Konformation sind die funktionalisierbaren Azidgruppen in einer Geraden entlang der Helixachse aufgereiht, mit einem regelmässigen Abstand von 9.4 Å. Dies wird insbesondere bei einem Blick entlang der Molekülachse deutlich, wo Prolin Einheiten nahezu deckungsgleich mit darüber- und darunterliegenden Einheiten zu liegen kommen. Hieraus ergeben sich interessante Muster für die Derivatisierung der Azidfunktionen und damit Anwendungen der PPII Helix als molekulares Gerüst (siehe Kapitel 1.4 für andere molekulare Gerüste). In einer PPI helicalen Konformation ist der Abstand der Azidfunktionen für dasselbe Molekül mit 5.6 Å deutlich geringer und die relative Anordnung der Substituenten verändert sich ebenfalls. Die PPI Helix bietet damit eine weitere definierte Anordnung von funktionalisierbaren Gruppen, wobei die Abhängigkeit vom Lösungsmittel die Anwendung einschränkt. Hingegen kann es interessant sein, zwei ineinander überführbare Anordnungen zu haben, um eine Art molekularen Schalter zu generieren.

Ein Vorteil der Polyprolin Struktur ist, dass bereits kurze Peptide ab 6 Aminosäuren eine stabile PPII Helix ausbilden. Dies wird anhand der CD-Spektren der Peptide Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]_n-OH mit n=2-6 (**12R**, **36R-39R**) deutlich (Abbildung 32a). In wässrigem Phosphat Puffer zeigen die Peptide sehr ähnliche molaren Elliptizitäten pro Aminosäure

(Abbildung 32b). Egal ob 6 oder 18 Aminosäure Einheiten lang, die PPII Helix ist deutlich ausgebildet und das Signal nimmt nur geringfügig mit der Kettenlänge zu. Für Anwendungen, die auf die PPI Helix abzielen, bzw. wenn beide ineinander überführbaren Strukturen erwünscht sind, sollte das Gerüstmolekül mindestens 9 Aminosäure Einheiten lang sein, da die PPI Helix erst ab einer Kettenlänge von 9 Einheiten ausgeprägt ist (Abbildung 32c). Die PPI Helix ist für das 6-mer in *n*-PrOH nicht dominant. Dies gilt genauso für Ac-Pro₆-OH (**40**) und Ac-[Pro-(4*S*)Azp-Pro]₂-OH (**36S**).

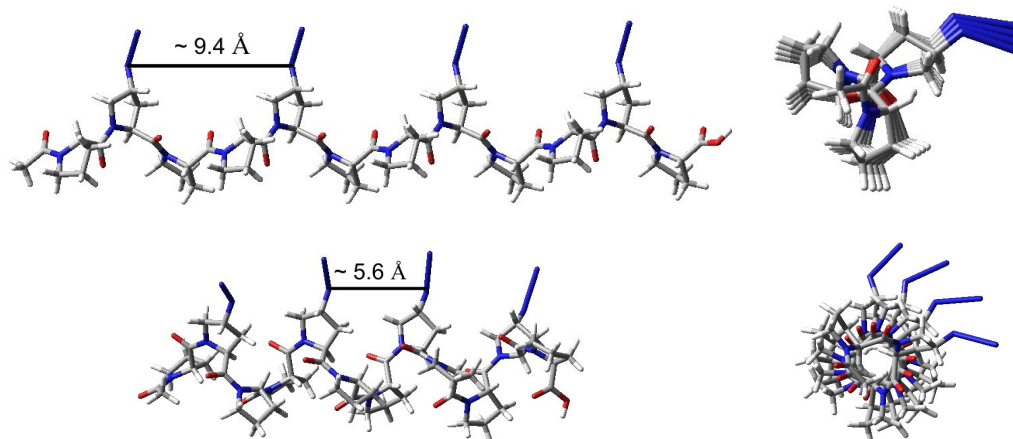


Abbildung 31: Modelle von Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]₄-OH (**38R**) in einer helicalen PPII Konformation (oben) und in einer PPI Konformation (unten), jeweils mit der Helixachse entlang (links) oder senkrecht zu Abbildungsebene (rechts). Die Modelle wurden von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld bereitgestellt.¹⁵²

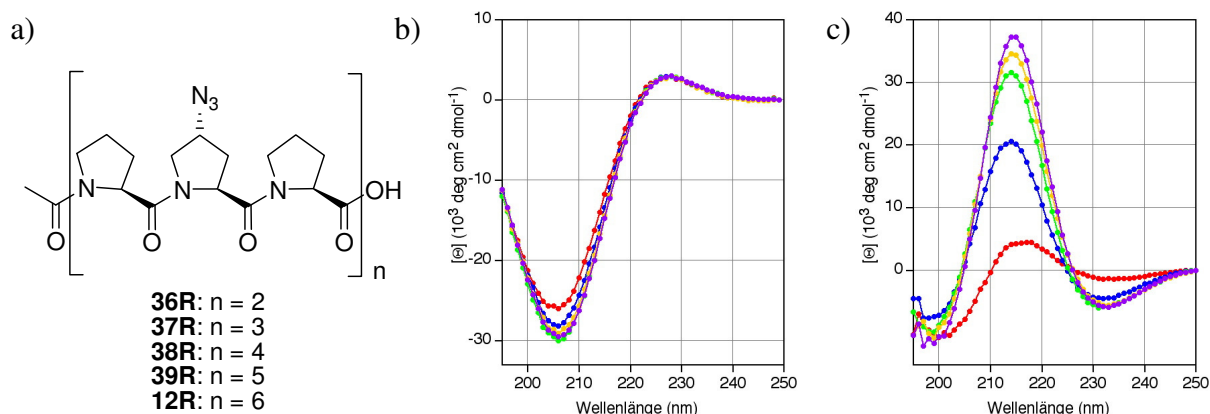


Abbildung 32: a) Peptide **36R**, **37R**, **38R**, **39R** und **12R** mit einer (4*R*)Azp Einheit in jeder 3. Position. b) CD-Spektren dieser Peptide in Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) und c) in *n*-PrOH. Die Spektren wurden bei einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-4}$ M pro Aminosäure Einheit bei 25° C aufgenommen. Peptide **36R-39R** wurden analog zu **12R** (Kapitel 2.2) synthetisiert.

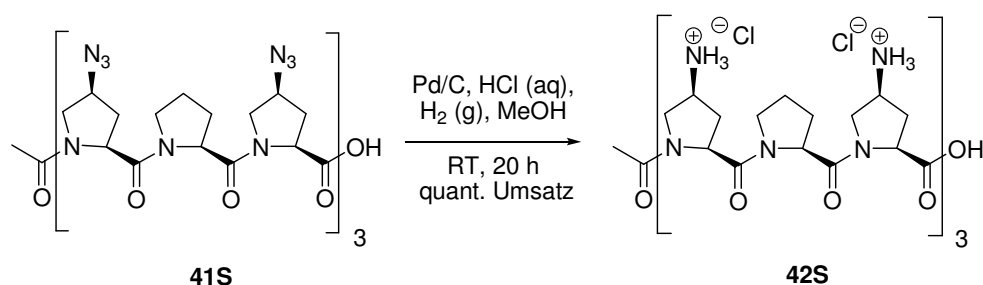
Diese Art molekulare Gerüste bietet auch die Möglichkeit Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen bzw. zu manipulieren. Dabei kommt zugute, dass es sich bei der PPII Helix um eine Struktur handelt, die in der Natur als Sekundärstruktur in Proteinen vorkommt. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Proteindomänen, die Peptidsegmente für die eine PPII

Struktur eine Grundvoraussetzung ist, selektiv erkennen.⁸⁰ Wenn ein Peptid erst eine PPII Helix annehmen muss um die Bindung einzugehen, kostet dies Entropie.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Durch den Einbau von 4-Azidoprolin Einheiten hat man einerseits die hohe Tendenz erhalten eine PPII Konformation auszubilden, hat aber die Möglichkeit über eine Derivatisierung der Azidfunktion gezielt eine zusätzliche Wechselwirkung zur Proteindomäne einzubauen.

4.2. 4-Aminoprolin in Polyprolin Helices

4.2.1. Synthese von Oligoprolinen mit 4-Aminoprolin Einheiten

Über die Reduktion der Azidfunktion von 4-Azidoprolin Einheiten in einer Polyprolinstruktur lassen sich positiv geladene Ammoniumgruppen in die helicale Struktur einbauen. Dies wurde im Rahmen einer Masterarbeit mit Fabien Monnard demonstriert.¹⁹⁰ Die synthetisierten und analysierten Verbindungen bestanden zu zwei Dritteln aus 4-Aminoprolin Einheiten und zu einem Drittel aus Prolin Einheiten. Die Idee dahinter war, durch die regelmässige Anordnung der Ammoniumgruppen, amphiphile Peptide zu generieren. Entsprechend fluoreszenzmarkierte und davon abgeleitete Peptide mit Guanidiniumfunktionen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Zellwand von lebenden Zellen zu durchdringen. Erste Ergebnisse waren sehr viel versprechend und sind Gegenstand von weiteren Untersuchungen in der Forschungsgruppe Wennemers.¹⁹¹ Die 4-Azidoprolin-haltigen Peptide **41S** und **41R** mit neun Aminosäure Einheiten wurden auf der festen Phase in Einzelkupplungen hergestellt, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Reduktion der Azidfunktion zu Ac-[(4*S*)Amp-Pro-(4*S*)Amp]₃-OH (**42S**) und Ac-[(4*R*)Amp-Pro-(4*R*)Amp]₃-OH (**42R**) erfolgte in saurer methanolischer Lösung mit katalytischen Mengen Palladium auf Aktivkohle bei Wasserstoffatmosphäre (Schema 9). Einzig das Endprodukt wurde über Umkehrphasen HPLC gereinigt.



Schema 9: Synthese von Ac-[(4*S*)Amp-Pro-(4*S*)Amp]₃-OH (**42S**) aus dem entsprechenden Azp-haltigen Peptid **41S** durch Hydrierung der Azidfunktion. Die Gesamtausbeute inklusive Festphasensynthese und HPLC Reinigung war gering (ca. 5%), obwohl die Umsetzung von Peptid **41S** quantitativ war (HPLC). Das Diastereomer **42R** wurde ausgehend von **41R** analog synthetisiert.

4.2.2. Konformationsanalyse der 4-Aminoprolin-haltigen Oligoproline 24S und 24R

Die NMR Analyse von Ac-(4*S*)Amp-OMe (**24S**) und Ac-(4*R*)Amp-OMe (**24R**) zeigte für eine (4*S*)-Konfiguration einen höheren *s-trans* Anteil für das Gleichgewicht um die Prolylamidbindung in D₂O ($K_{trans/cis} = 5.7$ zu 3.5, Kapitel 3.1.4). Wenn dieselben Kräfte auch im Peptid auf die Prolylamidbindungen wirken, erwartet man aufgrund dieser Werte eine Stabilisierung der PPII Helix (*s-trans* Amidbindungen) für das Peptid **42S** mit den (4*S*)Amp Einheiten. Die helicale Konformation wurde wiederum mit den Lösungsmittelstudien analysiert, die in Kapitel 2.3.1 beschrieben sind. Die CD-Spektren in den verschiedenen Lösungsmittelgemischen Puffer/n-PrOH sind in Abbildung 33 dargestellt. Für diese Untersuchungen wurde ein Phosphat Puffer mit einem pH-Wert von 2 gewählt, damit die Aminogruppen protoniert vorliegen.¹⁹²

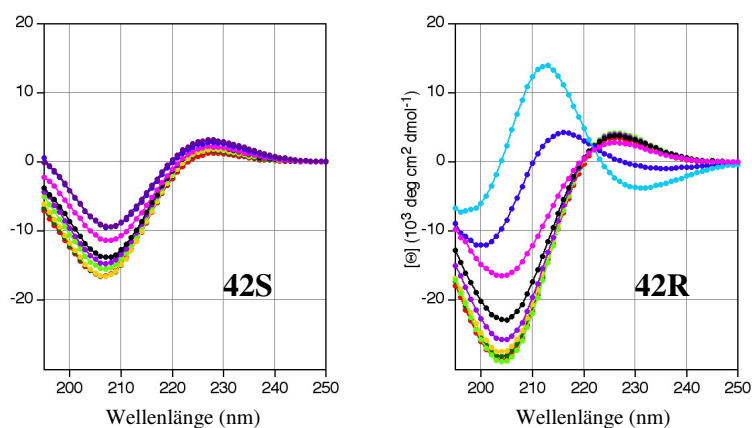


Abbildung 33: CD-Spektren von Ac-[(4*S*)Amp-Pro-(4*S*)Amp]₃-OH (**42S**, links) und Ac-[(4*R*)Amp-Pro-(4*R*)Amp]₃-OH (**42R**, rechts) in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 2) (●), 25% vol/vol n-PrOH in Puffer (●), 50% n-PrOH (●), 75% n-PrOH (●), 85% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 99% n-PrOH (●) und n-PrOH (●). Die Spektren wurden bei einer Konzentration von 70 μM bei 25°C aufgenommen.

Das CD-Spektrum von Ac-[(4*R*)Amp-Pro-(4*R*)Amp]₃-OH (**42R**) in Puffer ist charakteristisch für eine PPII Helix (Minimum bei 205 nm, Maximum bei 227 nm). Das CD-Spektrum in n-PrOH zeigt einen überwiegenden Anteil der PPII helicalen Konformation (Maximum bei 213 nm, Minimum bei 232 nm). Ab einem Anteil von mehr als 90% n-PrOH beginnt der Anteil der PPII Helix deutlich zuzunehmen. Diese Daten zeigen, dass mit (4*R*)Amp Einheiten je nach Lösungsmittel eine der beide helicalen Konformationen von Polyprolin bzw. ein Gleichgewicht zwischen den beiden Formen vorliegt.

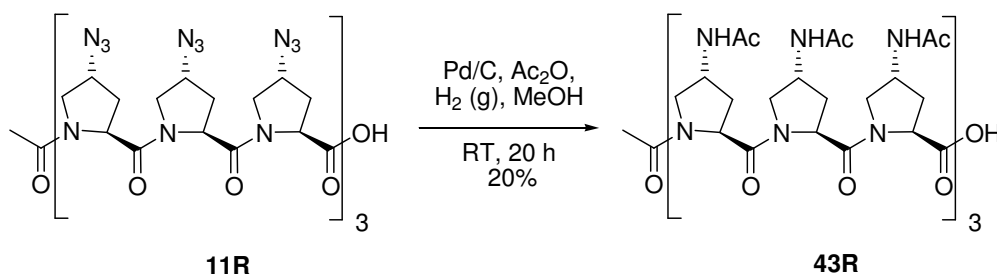
Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel ist für Ac-[(4*S*)Amp-Pro-(4*S*)Amp]₃-OH (**42S**) viel geringer. Es wird immer ein PPII ähnliches CD-Spektrum gemessen mit einer positiven Bande bei 228 nm und einer negativen Bande bei 207 nm. Auch in reinem n-PrOH wird kein

Umklappen zu mehr PPI helicalem Anteil beobachtet. Dies passt dazu, dass in der Modellverbindung Ac-(4*S*)Amp-OMe (**24S**) nur ein sehr geringer Anteil der *s-cis* Konformation gefunden wurde. Möglicherweise liegen auch im Oligomer Wasserstoffbrücken vor, welche die *s-trans* Konformation der Prolylamidbindungen und damit die PPII Helix begünstigen, wobei hierfür keine klaren experimentellen Hinweise gefunden wurden.¹⁹³ Es gilt zu bedenken, dass die PPI Helix deutlich kompakter ist als die PPII Helix. Dadurch kommen bei der Umwandlung von einer PPII Helix in eine PPI Helix die positiven Ladungen einander näher, was energetisch ungünstig ist. Dies gilt aber genauso für das diastereomere Peptid **42R**, das trotzdem eine PPI Helix annehmen kann. Für das Peptid **42S** ist das CD Signal nicht sehr intensiv. Möglicherweise beeinflussen die Ladungen oder eine potentielle intramolekulare Wasserstoffbrücke die elektronische Struktur der Amid-Chromophore.

4.3. 4-Acetamidoprolin in Polyprolin Helices

4.3.1. Synthese von Oligoprolinen mit 4-Acetamidoprolin Einheiten

Um den Einfluss von Acetamidoprolinen auf die helicalen Polyprolin Konformationen zu untersuchen wurden die 9-mere Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]₉-OH (**43S**) und Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]₉-OH (**43R**) synthetisiert. Dazu wurden die entsprechenden 4-Azidoprolin-haltigen Peptide **11S** und **11R** in Methanol gelöst und mit katalytischer Menge Palladium auf Aktivkohle und 4 Äquivalenten Essigsäureanhydrid pro Azidfunktion versetzt. Nach 20 h Rühren unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur konnten die Zielverbindungen isoliert und über Umkehrphasen HPLC gereinigt werden (Schema 10).



Schema 10: Synthese von Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]₉-OH (**43R**). Die Synthese des diastereomeren Peptids **43S** wurde analog durchgeführt ausgehend vom 4-Azidoprolin-haltigen Peptid **11S**.

4.3.2. Konformationsanalyse der Oligoacetamidoproline **43S** und **43R**

Die monomeren Modellverbindungen Ac-[NHAc-Pro]-OMe (**22S** und **22R**) wurden in Kapitel 3.1.3 ausführlich analysiert. In D₂O zeigte sich für eine (4*R*)-Konfiguration ein $K_{trans/cis}$ Wert von 5.8. Man erwartet daher, dass dieses Prolinderivat die PPII Helix stabilisiert. Auch für eine (4*S*)-Konfiguration zeigte sich mit 4.3 ein relativ hoher Wert für die Gleichgewichtskonstante, der dann in CDCl₃ aufgrund einer intramolekularen Wasserstoffbrücke nochmals höher war. Die Konformation der 9-mere **43S** und **43R** wurde wieder mittels CD Spektroskopie in verschiedenen Lösungsmittelgemischen von wässrigem Phosphat Puffer (pH=7.2) und n-PrOH analysiert (Abbildung 34) um zu bestimmen, wie sich die Acetamidosubstituenten auf die Peptid Konformation auswirken.

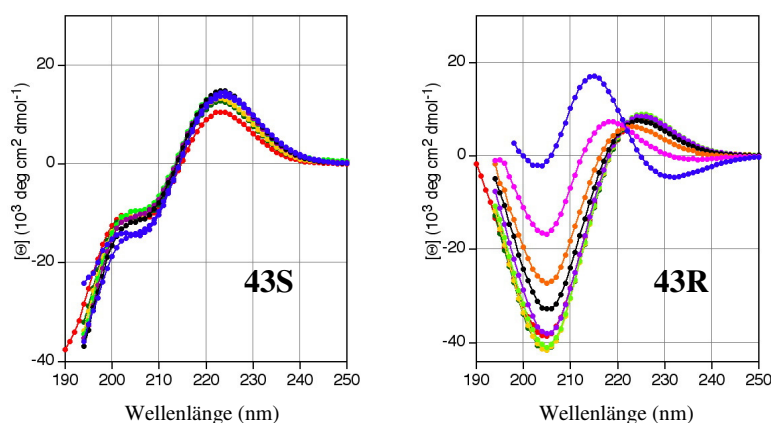


Abbildung 34: CD-Spektren von Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]₉-OH (**43S**) (links) und Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]₉-OH (**43R**) (recht) in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) (●), 25% vol/vol n-PrOH in Puffer (●), 50% n-PrOH (●), 75% n-PrOH (●), 85% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 92.5% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 99% n-PrOH (●). Die Spektren wurden bei einer Konzentration von 70 μM bei 25°C aufgenommen.

Das CD-Spektrum von Peptid **43R** in Puffer ist charakteristisch für eine PPII Konformation (Minimum bei 206 nm, Maximum bei 227 nm). Die Veränderung bei der Zunahme des Anteils n-PrOH ist ähnlich wie für Ac-[(4*R*)Azp]₉-OH (**11R**) (Abbildung 16). Der Anteil der PPI Helix wird erst bedeutend mit 99% n-PrOH (Maximum bei 215 nm, Minimum bei 232 nm). Damit stabilisieren (4*R*)Amp(NHAc) Einheiten die PPII Helix annähernd so stark, wie (4*R*)Azp Einheiten, wie das zu den *s-cis*:*s-trans* Verhältnissen um die Prolylamidbindung in den Modellverbindungen **1R** (1:6.1) und **22R** (1:5.7) passt.

Peptid **43S** zeigt spezielle CD-Spektren, die weder für eine PPI noch eine PPII Konformation typisch sind. Eine gewisse Ähnlichkeit zur PPII Konformation ist vorhanden. Unabhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung erscheint eine positive Bande um 225 nm und eine negative Bande gegen 190 nm mit einer Schulter um 205 nm. Durch die Acetamidosubstituenten enthält das Peptid für jede Prolylamidbindung eine zusätzliche

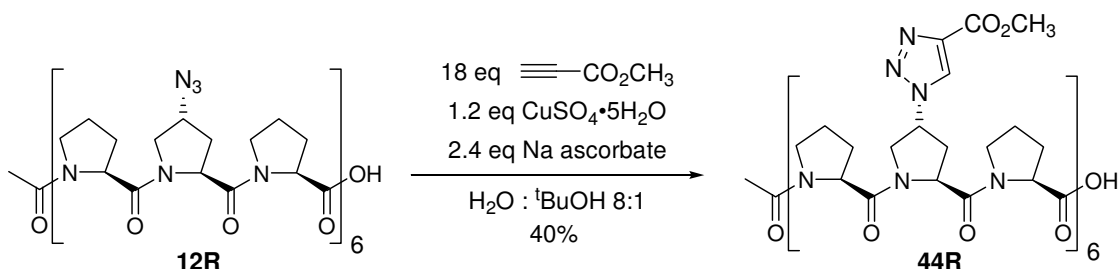
sekundäre Amidbindung, die ebenfalls zum CD Signal beitragen kann. Es ist nicht auszuschliessen, dass immer noch eine PPII Konformation vorliegt und durch intramolekulare Wasserstoffbrücken, wie in der Modellverbindung **22S** beobachtet, sich die elektronischen Eigenschaften der Chromophore verändert haben und dies zu den beschriebenen Spektren führt.¹⁹⁴ Die ¹H-NMR-Spektren der Peptide **43R** und **43S** zeigen wiederum hauptsächlich ein Signal für die einzelnen Protonen der neuen Aminosäure Einheiten in D₂O. Insbesondere die neuen Acetylgruppen an den Substituenten sind als ein Singulett auszumachen. Für Anwendungen der PPII Helix als molekulares Gerüst, bei dem die Funktionalisierung über Amidbindungen an das Polyprolingrundgerüst erfolgt, könnte eine (4*R*)-Konfiguration an den substituierten Prolinen vorteilhaft sein, um die beschriebene Unsicherheit mit dem Einfluss einer Wasserstoffbrücke auszuschliessen.

4.4. Funktionalisierung über „Click“ Chemie

4.4.1. „Click“ Reaktion in Lösung

Synthese der Hexatriazole 44R und 44S

Die Azidgruppen von 4-Azidoprolin-haltigen Oligoprolinen konnten ebenfalls über die Azid-Alkin Cycloaddition („Click“ Chemie) funktionalisiert werden. Als terminales Alkin für erste Testexperimente wurde das kommerziell erhältliche Methylpropiolat verwendet, das sich für die Löslichkeit der Produkte als vorteilhaft erwies. Schema 11 zeigt die Bedingungen, unter denen das 18-mer **12R** mit einer (4*R*)-Azidoprolin Einheit in jeder dritten Position in guter Ausbeute und Reinheit zum Hexatriazol **44R** umgewandelt wurde.



Schema 11: Funktionalisierung von Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]₆-OH (**12R**) über die „Click“ Reaktion mit Methylpropiolat zum Hexatriazol **44R**.

Es wurde ein Überschuss von 3 Äquivalenten Methylpropiolat pro Azidfunktion eingesetzt, sowie katalytische Mengen von CuSO₄•5H₂O und Natriumascorbat in einer Mischung aus ^tBuOH und Wasser. Das Produkt wurde durch Extraktion und anschliessende Fällung mit

Diethylether in einer Ausbeute von 40% HPLC rein isoliert. Aus Peptid **12S** wurde analog das Diastereomer **44S** synthetisiert.

CD Analyse der Hexatriazole **44S** und **44R**

Die CD Spektroskopie der funktionalisierten Peptide **44R** und **44S** zeigte weiterhin eine PPII Konformation in wässriger Lösung (Minima bei 205 nm und Maxima bei 227 nm, Abbildung 35). In n-PrOH dagegen ist nur für **44R** eine dominierende PPI Konformation zu beobachten (positive Bande bei 215 nm). **44S** zeigt kaum Anteil einer PPI Konformation in n-PrOH. Dies kann mit der Analyse der *s-cis:s-trans* Gleichgewichte in den Modellverbindungen **13R** und **13S** nicht begründet werden. Für die entsprechenden Modellverbindungen mit einem Triazolylsubstituent war in D₂O eine leichte Bevorzugung der *s-trans* Konformation mit einer (4*R*)-Konfiguration beobachtet worden ($K_{trans/cis} = 4.7$ für **13R** bzw. 2.7 für **13S**).

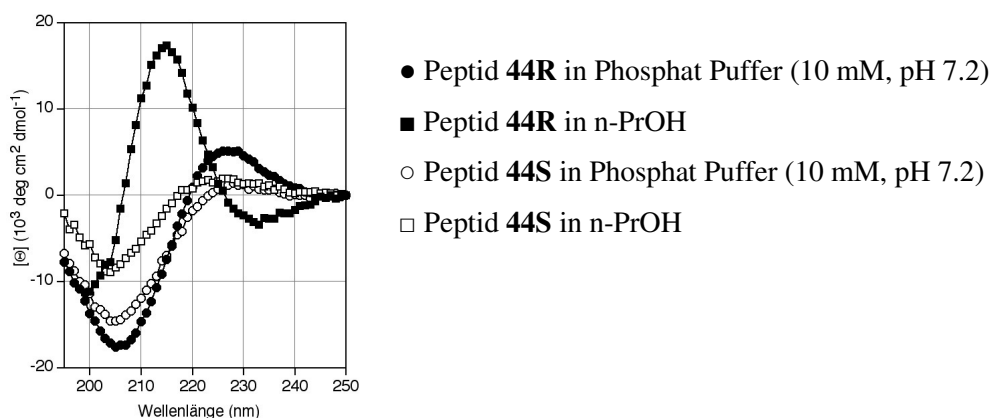


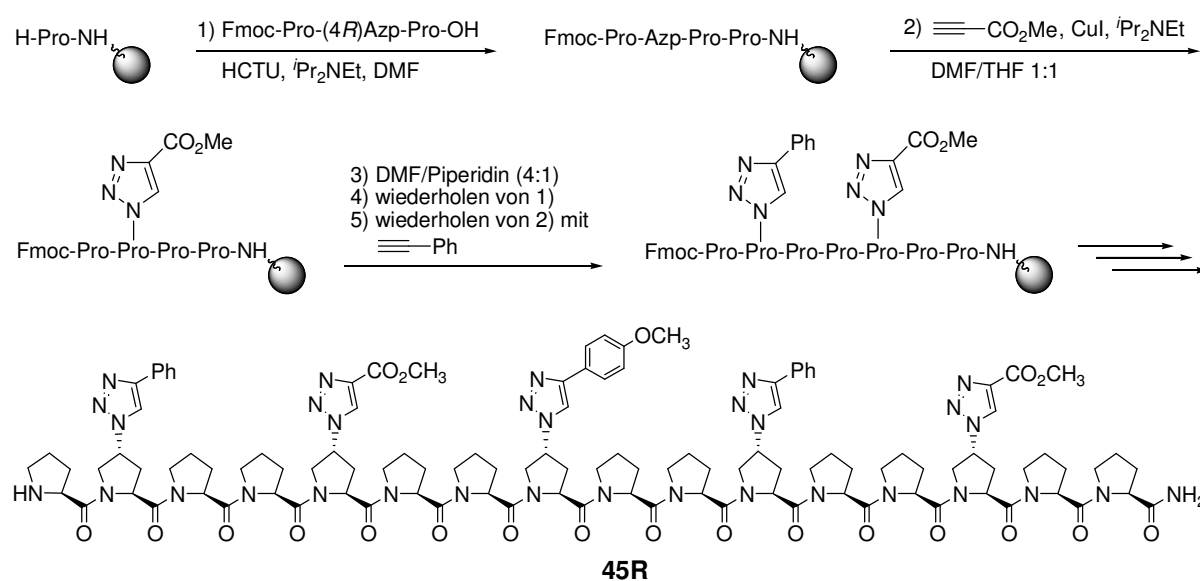
Abbildung 35: CD-Spektren der über eine „Click“ Reaktion funktionalisierten 18-meren **44S** und **44R** je in Phosphatpuffer und n-PrOH bei 25°C.

4.4.2. „Click“ Reaktion an der Festen Phase

Synthese der Pentatriazole **45S** und **45R**

Effizienter ist es die „Click“ Reaktion auf der Festen Phase durchzuführen. Das aufwendige Optimieren des Löslichkeitsverhaltens kann so umgangen werden. Um zu zeigen, dass zudem verschiedene Funktionalitäten an definierten Positionen des Peptids eingeführt werden können, wurden die Verbindungen **45R** und **45S** synthetisiert. Wie in Schema 12 für **45R** dargestellt, wurde dies erreicht in dem alternierend Peptidkupplungsschritte und „Click“ Reaktionen durchgeführt wurden. Die Synthese startete mit Rink-Amid Harz, das mit Prolin funktionalisiert wurde. Es folgte eine Peptidkupplung mit dem trimeren Baustein Fmoc-Pro-(4*R*)Azp-Pro-OH (**7R**). In der ersten „Click“ Reaktion wurde ein 5-facher Überschuss an Methylpropiolat, 3.8 Äquivalente ⁱPr₂NEt und katalytische Mengen CuI in DMF/THF 1:1

verwendet. Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde der nächste trimere Baustein **7R** gekuppelt. In den weiteren Cycloadditionen wurden Phenylacetylen, Ethynylanisol und nochmals Methylpropiolat und Phenylacetylen als Alkin Komponenten eingesetzt. Insgesamt wurde in 5 Zyklen ein 16-mer mit 5 Triazolylgruppen aufgebaut, wobei 3 verschiedene Alkine eingesetzt wurden. Die intensive und charakteristische IR Absorption einer Azidfunktion bei ca. 2100 cm^{-1} wurde ausgenutzt um den Umsatz der Cycloaddition auf dem Harz zu verfolgen. Für die „Click“ Reaktionen 1, 2, 4 und 5 waren die Reaktionen nach 12 h beendet. Einzig für die „Click“ Reaktion mit Ethynylanisol mussten die Reagenzien mehrmals zugegeben werden (2 Mal für **45R** und 5 Mal für **45S**), bis die Azidbande im IR-Spektrum nicht mehr detektiert wurde. Nach dem Abspalten vom Harz mit einer Mischung aus TFA/CH₂Cl₂ im Verhältnis 2:1 wurden die beiden Pentatriazole **45S** und **45R** mittels HPLC aufgereinigt. Die Reinheit vor der präparativen Aufreinigung lag bei ca. 60% für diese 17 Reaktionsschritte auf dem Harz.



Schema 12: Synthese des 16-mers **45R**, mit alternierenden Peptidkupplungen von Fmoc-Pro-(4R)Azp-Pro-OH (**7R**) und „Click“ Reaktionen auf der Festen Phase.

CD Analyse der Pentatriazole **45S** und **45R**

Bei der CD spektroskopischen Analyse wurde für die beiden funktionalisierten Peptide **45S** und **45R** in wässrigem Phosphat Puffer eine PPII Konformation beobachtet (Minimum bei 207 nm bzw. 203 nm, Maximum bei 228nm bzw. 227nm). In 99% n-PrOH wurde nur für **45R** ein dominierender Anteil der PPI Konformation nachgewiesen (Maximum bei 214 nm, Minimum bei 233 nm, Abbildung 36). Eine entsprechende Beobachtung wurde bereits für die Hexatriazole **44S** bzw. **44R** gemacht.

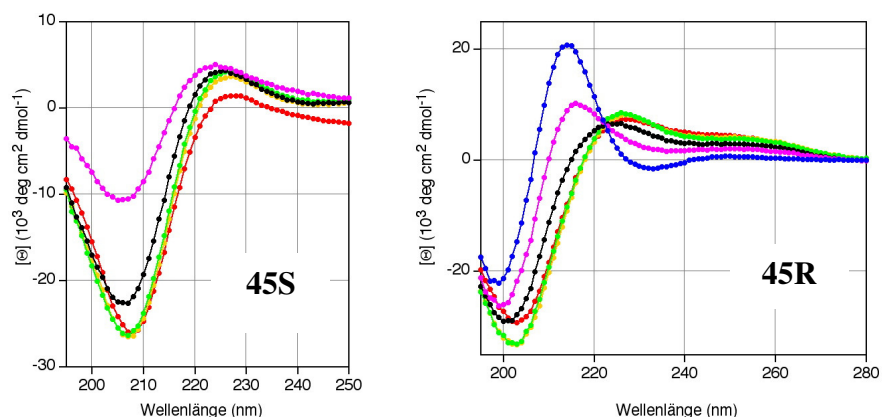


Abbildung 36: CD-Spektren der Pentatriazole **45S** (links) und **45R** (rechts) in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) (●), 50% n-PrOH (●), 75% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 99% n-PrOH (●). Die Spektren wurden bei einer Konzentration von ca. 70 μM bei 25°C aufgenommen. Peptid **45S** war in 99% n-PrOH nicht löslich.

Synthese der Nonatriazole **46S-48S** und **46R-46R**

Auch die 9-mere Ac-(4S)Azp₉-OH (**11S**) und Ac-(4R)Azp₉-OH (**11R**) wurden auf dem 2-Chlorotriethylharz über eine Alkin-Azid Cycloaddition funktionalisiert. Dies gelang für die „Click“ Reaktion mit Methylpropiolat, Propargylalkohol und acetyliertem Propargylamin (wofür Propargylamin mit Acetylchlorid acetyliert wurde):

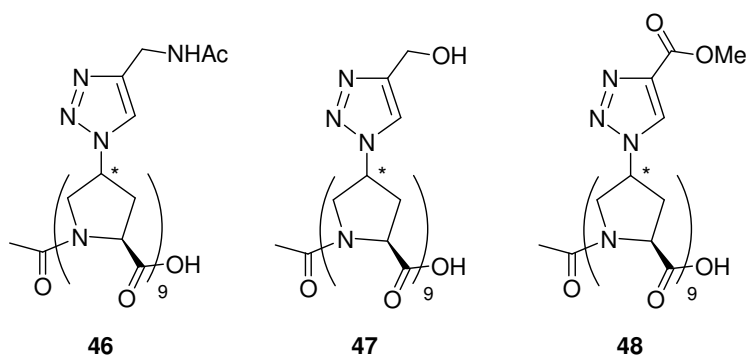


Abbildung 37: Nonatriazole, die über eine „Click“ Reaktion auf der festen Phase mit acetyliertem Propargylamin (\rightarrow **46**), Propargylalkohol (\rightarrow **47**) bzw. Methylpropiolat (\rightarrow **48**) synthetisiert wurden.

Die Cycloaddition erfolgte auf dem 2-Chlorotriethylharz mit CuI (ca. 0.2 eq) und $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (3.8 eq) in einem 1:1 Gemisch aus DMF/THF und 5 Äquivalenten des Alkins pro Azidfunktion. Normalerweise musste für 2 Tage geschüttelt werden, bis die Azidbande im IR-Spektrum nicht mehr nachzuweisen war. Auf Rink-Amid Harz konnten „Click“ Reaktionen in CH_2Cl_2 mit dem aktiveren $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ Katalysator durchgeführt werden. Der Chlorotriethylanker war für diese Bedingungen jedoch zu säurelabil und das Peptid wurde unter diesen Bedingungen vom Harz abgespalten. Für die entsprechenden Reaktionen mit Propargylamin, Phenylacetylen und Propargylhydrazin (Synthese nach K. G. Meyer¹⁹⁵) konnte das Produkt

nicht isoliert werden. IR-Spektren auf dem Harz und MS-Daten deuten darauf hin, dass die Schwierigkeit nicht bei der „Click“ Reaktion der 9 Azidfunktionen lag, sondern in der Aufarbeitung und insbesondere der Löslichkeit der Produkte.

CD Analyse der Nonatriazole **46S-48S** und **46R-46R**

Die CD spektroskopische Analyse der sechs Nonatriazole zeigte, dass die Derivatisierung jeder Aminosäure Einheit über eine „Click“ Reaktion einen starken Einfluss auf die Polyprolin Grundstruktur hat. Dieser geht über das Stabilisieren einer der beiden helicalen Formen hinaus. Im Gegensatz zu den Modellverbindungen **13-20** (Kapitel 3.1.2) zeigen sich auch grosse Unterschiede zwischen den verschiedenen Triazolylsubstituenten. Eine mögliche Ursache ist eine direkte Interaktion von Substituenten untereinander. In Abbildung 38 sind die CD-Spektren in verschiedenen Lösungsmittelgemischen von wässrigem Phosphat Puffer und n-PrOH im Einzelnen dargestellt.

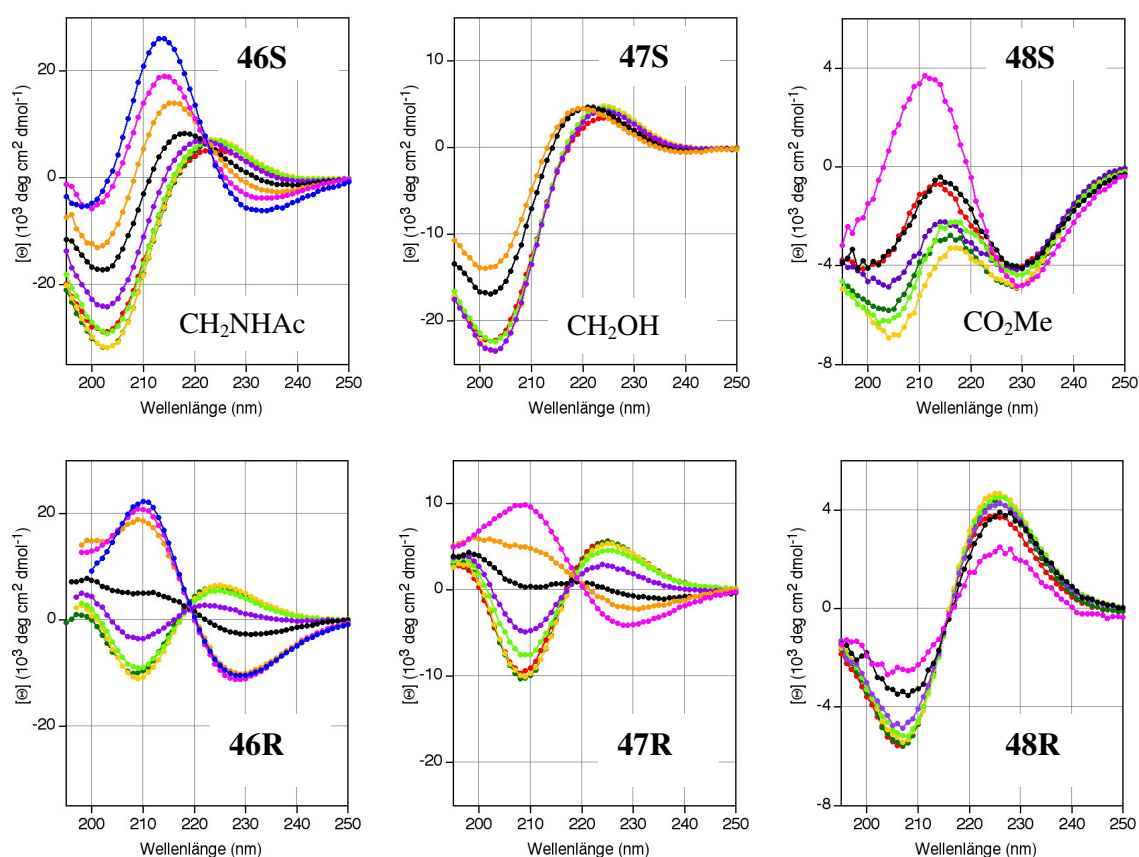


Abbildung 38: CD-Spektren von **46S**, **47S**, **48S**, **46R**, **47R** und **48R** in wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) (●), 25% vol/vol n-PrOH in Puffer (●), 50% n-PrOH (●), 75% n-PrOH (●), 85% n-PrOH (●), 90% n-PrOH (●), 92.5% n-PrOH (●), 95% n-PrOH (●), 99% n-PrOH (●). Die Spektren wurden bei einer Konzentration von 70 μM bei 25°C aufgenommen. Die Löslichkeit verhinderte teilweise die Aufnahme von Spektren mit hohen n-PrOH Anteilen.

Die CD-Spektren von Verbindung **46S** mit den Amidfunktionen zeigen eine Abhängigkeit vom Lösungsmittel, die noch stark an das PPI/PPII Gleichgewicht erinnern. In Puffer bestimmen eine intensive negative Bande bei 203 nm und eine positive bei 224 nm das Spektrum. Mit der Zunahme von n-PrOH im Lösungsmittelgemisch ist eine Zunahme einer PPI ähnlichen Konformation verbunden (Maximum bei 213 nm, Minimum bei 233 nm). Für die diastereomere Verbindung **46R** ist in Puffer das CD-Spektrum im Wellenlängenbereich 210-260 nm ähnlich wie für **46S**. Allerdings nimmt die Elliptizität bei kürzeren Wellenlängen wieder zu. Von 85% n-PrOH zu 92.5% n-PrOH verändert sich das Spektrum sehr stark zu einer PPI ähnlichen Konformation (Maximum bei 210 nm, Minimum bei 229 nm). Ausgenommen in diesem relativ engen Bereich ist die Abhängigkeit der Spektren vom Lösungsmittel gering.

Verbindung **47S** mit den Alkoholfunktionen war in Lösungsmittelgemischen mit hohem n-PrOH Anteil nicht löslich. Solange die Löslichkeit gegeben ist, zeigt sich ein PPII ähnliches Spektrum (Minimum bei 203 nm, Maximum um 223 nm). Die CD-Spektren von **47R** zeigen gewisse Ähnlichkeit zu **46R**: in Puffer PPII ähnlich mit Minimum bei 209 nm und Maximum bei 225 nm und mit 95% n-PrOH in Richtung PPI mit einem Maximum um 209 nm und einem Minimum bei 229 nm. Für **48S** und **48R** sind die Elliptizitäten relativ schwach und auch die Kurvenformen unterscheiden sich deutlich von zuvor beschriebenen Verbindungen. Das Signal von **48R**, mit einer negativen Bande bei 207 nm und einer positiven Bande bei 234 nm, ist nicht stark abhängig vom Lösungsmittel. Für **48S** zeigt sich kein isodichroischer Punkt und das CD Signal ändert sich nicht stetig mit der Zunahme vom Anteil n-PrOH.

Fazit: Funktionalisierung über die „Click“ Reaktion

Die „Click“ Reaktion eignet sich hervorragend um Azidfunktionen eines PPII helicalen Gerüstmoleküls zu funktionalisieren. Dass auch 9 Azidfunktionen in einem Molekül reagieren, zeigt wie effektiv die Cu(I) katalysierte Alkin-Azid Cycloadditionsreaktion ist. Zu viele Triazolylgruppen mit entweder polaren (Amin, Hydrazin) oder sehr hydrophilen (Phenyl) Substituenten führten aber zu problematischen Lösungsmiteleigenschaften, die eine Aufreinigung, Charakterisierung und Anwendung dieser Strukturen nicht erlaubten. Um die PPII Struktur und ihre vorteilhaften Lösungseigenschaften beizubehalten, sollte für Anwendungen nicht übermäßig viele Triazole eingeführt werden. Die Beispiele lassen vermuten, dass mit einer (4*S*)-Konfiguration die helicale PPII Grundstruktur eher erhalten bleibt als mit der entsprechenden (4*R*)-Konfiguration am Prolin.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Beispiele kann keine generelle Regel für den Einfluss einer „Click“ Reaktion auf die Konformation von 4-Azidoprolin-haltigen Oligoprolinen formuliert werden. Vermutlich beeinflussen auch andere Kräfte als gauche Effekt und $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung das Gleichgewicht und auch die UV-Absorption der Triazolylgruppen kann einen Einfluss auf das CD-Signal haben. Je nach Substituent am Triazol sind aber beide Polyprolin Grundstrukturen möglich und ein Umklappen von einer PPII Konformation in eine PPI Konformation ist gegeben durch eine Änderung des Lösungsmittels. Für eine konkrete Anwendung, muss die Konformation neu überprüft werden um zu gewährleisten, dass die helicale Grundordnung des Oligoprolingerüsts erhalten bleibt.

5. Untersuchungen zum Einfluss von Ladungen, Temperatur, Kettenlänge sowie der Position der 4-Azidoprolin Einheiten auf das Gleichgewicht zwischen der PPI und der PPII Helix

Trotz ihrer Bedeutung sind die Faktoren welche die Stabilität der Polyproline Konformation ausmachen nicht gut verstanden.¹⁹⁶ Wasserstoffbrücken wie bei den bekannten Protein Sekundärstrukturen α -Helix und β -Faltblatt sind nicht beteiligt. Sterische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der einzelnen Aminosäureeinheiten (speziell bei Prolin) und Solvatationseffekte durch die Interaktion mit Wassermolekülen wurden vorgeschlagen als Ursachen für die Stabilität der PPII Helix.^{77,83,89,93,197-199} Creamer *et al.* haben eine Skala erarbeitet, die die Tendenz jeder Aminosäure angibt, eine PPII Helix anzunehmen.^{73,148} Diese Untersuchungen an Peptiden, wo einzelne Aminosäuren in ein Oligoprolin Peptid eingebaut wurden, zeigen gewisse Übereinstimmung mit der Häufigkeit, mit der die einzelnen Aminosäuren in Polyprolin helicalen Abschnitten in Kristallstrukturen gefunden werden. Untersuchungen von Raines und Mitarbeiter an Collagen Modellpeptiden kommen zum Schluss, dass eine $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung innerhalb des Amid Rückgrats eines einzelnen PPII ähnlichen Stranges einen stabilisierenden Effekt auf die tripel helicale Konformation hat.^{19,66} Unsere Experimente mit 4-Azidoprolin-haltigen Peptiden¹⁵³ (Kapitel 2) zeigen, dass $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkungen für die Stabilität der Polyproline Struktur wichtig sind, wie das von Raines und Mitarbeitern aufgrund der Geometrie in der PPII Helix postuliert wurde.¹⁹

In diesem Kapitel werden Fragestellungen zur Polyproline Struktur diskutiert, die sich aus den Untersuchungen an den Azidoprolin-haltigen Peptiden ergeben haben:

In Kapitel 5.1 wird der überraschend starke Einfluss der Endgruppen auf das Gleichgewicht PPI/PPII analysiert und mit ab initio Rechnungen abgestützt, die in Kollaboration mit Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld durchgeführt wurden.¹⁵²

Kapitel 5.2 diskutiert die Temperaturabhängigkeit der PPII und der PPI Helices. Während die Beobachtungen zur PPII Helix in unseren Systemen den Daten aus der Literatur entsprechen, konnten für die PPI Helix Zusammenhänge aufgezeigt werden, die nicht bekannt waren. In Zusammenarbeit mit Prof. Jürgen Engel²⁰⁰ wurde dazu ein Modell entwickelt, das die beobachtete kinetische Hysterese zu beschreiben vermag.

In Kapitel 5.3 werden die konformationsdirigierenden Eigenschaften der 4-Azidoprolin gezielt eingesetzt um die Konformation zu beeinflussen. Aus den thermodynamischen und

kinetischen Untersuchungen lassen sich Informationen über den Ursprung der *s-cis:s-trans* Isomerisierung bei der Umwandlung der beiden helicalen Polyprolin Strukturen ableiten.

In Kapitel 5.4 wird die Kettenlängenabhängigkeit des Gleichgewichts PPI/PPII thematisiert.

5.1. Einfluss von Ladungen an den Endgruppen

Um Aggregationen aufgrund von Ladungseffekten auszuschliessen, werden für Konformationsuntersuchungen oft Peptide mit abgesättigten Enden studiert. Die in Kapitel 2 untersuchten Oligoprolin Peptide waren jeweils am N-Terminus acetyliert und wiesen am C-Terminus eine freie Carbonsäure auf ($\text{Ac-Xaa}_n\text{-OH}$). Dies liegt daran, dass Peptide, die auf Rink-Amid Harz synthetisiert wurden und damit ein Carboxamid am C-Terminus aufweisen, keine deutliche PPI Struktur in der CD Spektroskopie zeigten. In der Literatur finden sich ebenfalls keine klaren Beispiele¹⁴⁷ einer PPI Struktur mit Carboxamid C-Terminus, obwohl das nie auf den Terminus zurückgeführt wird.^{32,196,201,202} Dafür werden Effekte der funktionellen Gruppe am N-Terminus auf das PPI/PPII Gleichgewicht beschrieben, deren Ursachen aber nicht analysiert werden.²⁰³⁻²⁰⁷

Hier wurde nun in einer systematischen Untersuchung der Einfluss geladener und neutraler Gruppen an N- und C-Terminus von Oligoprolinen auf die Stabilität der Polyprolin Helix analysiert und mit den Dipolmomenten der helicalen Strukturen in Verbindung gebracht.

5.1.1. Aufbau und Synthese der Modellverbindungen

Um den Einfluss von geladenen und ladungsneutralen funktionellen Gruppen an N- und C-Terminus auf das Gleichgewicht zwischen den beiden helicalen Konformationen von Polyprolin zu untersuchen, wurden vier Oligoproline mit 12 Prolin Einheiten synthetisiert, die sich in den Termini unterscheiden: Peptid $\text{Ac-Pro}_{12}\text{-NH}_2$ (**49**) trägt keine Ladungen, Peptid $\text{H-Pro}_{12}\text{-NH}_2$ (**50**) ist bei neutralem pH am N-Terminus positiv geladen, Peptid $\text{Ac-Pro}_{12}\text{-OH}$ (**51**) weist am C-Terminus eine negative Ladung aus und $\text{H-Pro}_{12}\text{-OH}$ (**52**) liegt unter diesen Bedingungen als Zwitterion vor mit einer positiven Ladung am N- und einer negativen Ladung am C-Terminus (Abbildung 39).

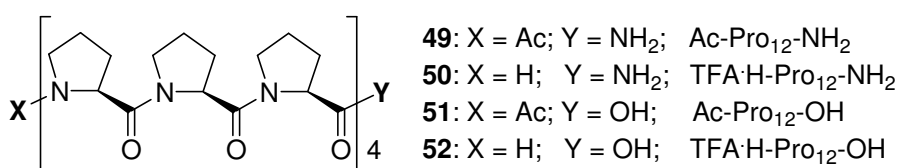


Abbildung 39: 12-mer Oligoproline **49-52** mit unterschiedlichen terminalen Endgruppen.

Die Peptide wurden auf fester Phase in Einzel-Kupplungen von Fmoc-Pro-OH mit HCTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Peptide **49** und **50** mit dem Carboxamid am C-Terminus wurden auf Rink-Amid Harz aufgebaut während für die Peptide **51** und **52** mit einer Carbonsäure am C-Terminus 2-Chlorotriylchlorid Harz verwendet wurde. Die Peptide **49** und **51** wurden am Ende der Synthese auf dem Harz mit Ac₂O und NEt₃ in CH₂Cl₂ acetyliert. Nach dem Abspalten vom Harz wurden die vier Peptide mittels Umkehrphasen HPLC gereinigt. Die Peptide **50** und **52** wurden damit als TFA Salze isoliert.

5.1.2. Lösungsmittel Studien bei neutralem pH

Um die Stabilität der helicalen Polyprolin Strukturen zu vergleichen, wurden die vier Peptide **49-52** mit den in Kapitel 2 eingeführten Lösungsmittel Studien untersucht. Dafür wurden die Konformationen der Oligoprolin Peptide in verschiedenen Mischungen von wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) und n-PrOH mittels CD Spektroskopie analysiert. Die Menge n-PrOH die nötig ist, um die Konformation von der in Wasser stabilen PPII Helix in die PPI Konformation umzuwandeln, ist ein Mass für die Stabilität der PPI Helix relativ zur PPII Helix.

Abbildung 40a-d zeigt, dass in wässriger Lösung alle vier Peptide **49-52** eine PPII Konformation (Minimum bei 205 nm und Maximum bei 228 nm) annehmen, während mit zunehmendem Anteil n-PrOH deutliche Unterschiede erkennbar werden. Für Peptid **52** mit Ladungen an N- und C-Termini verschiebt sich das Gleichgewicht der beiden Konformationen stetig Richtung PPI Helix mit zunehmendem n-PrOH Anteil. Zum Beispiel ist das CD-Spektrum von Peptid **52** in 95 vol% n-PrOH in Puffer typisch für eine PPI Helix mit einem Maximum bei 213 nm und Minima bei 198 nm und 230 nm (Abbildung 40d, pinkfarbene Kurve). Im Gegensatz dazu zeigt Peptid **49** mit geschützten Endgruppen unter denselben Bedingungen (95 vol% n-PrOH in Puffer) immer noch eine PPII Helix (Abbildung 40a, pinkfarbene Kurve). Einzig in reinem n-PrOH gleicht das CD-Spektrum von **49** einer PPI Helix (Abbildung 40a, blaue Kurve). Dass einzig das neutrale Peptid **49** kaum PPI Helix Anteil aufweist, zeigt, dass die Ladungen an den Endgruppen einen gewichtigen Einfluss haben.

Der Vergleich der Peptide **50** und **51** erlaubt es den Unterschied einer Ladung am C- oder am N-Terminus zu analysieren. Während 95 vol% n-PrOH nötig sind um die Umwandlung bei Peptide **50** mit einer positiv geladenen Ammoniumgruppe (Abbildung 40b, Kurve) zur PPII Konformation einzuleiten, reichen 75 vol% n-PrOH um einen ähnlichen Anteil PPI

Konformation zu erhalten mit Peptid **51**, das eine negative Ladung am Carboxylat C-Terminus trägt.

Abbildung 40e, wo die Intensität des CD Signals bei 213 nm gegen den Anteil n-PrOH aufgetragen ist, fasst diese Resultate zusammen. Sie zeigt deutlich, dass der Anteil n-PrOH, der nötig ist um eine PPI Konformation zu erreichen, ansteigt von Peptid **52** zu **49**. Damit steigt die relative Stabilität der PPI Helix von Peptid **52** zu **49**. Die Resultate demonstrieren aber nicht nur, dass Ladungen an den Termini die PPII Helix relativ zur PPI Helix destabilisieren, sondern auch dass eine negative Ladung am C-Terminus einen deutlich grösseren Einfluss hat als eine positive Ladung am N-Terminus.

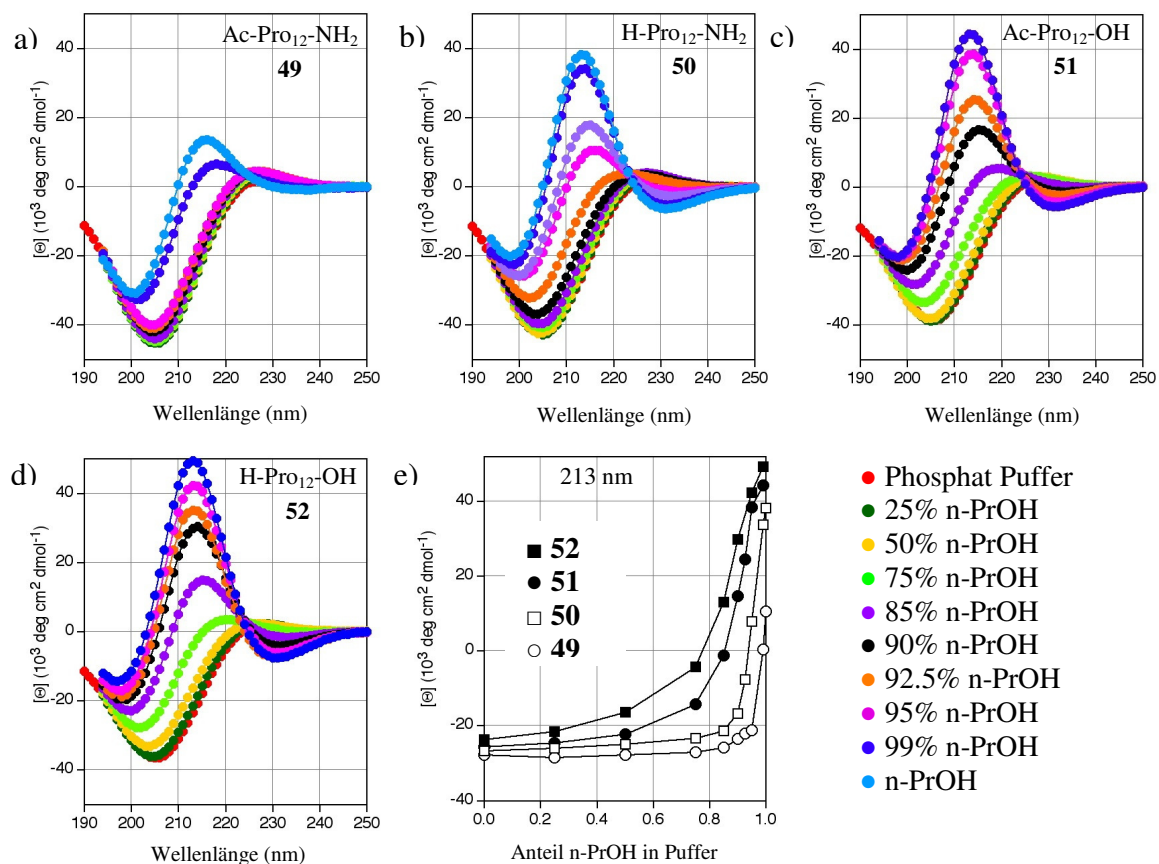


Abbildung 40: CD-Spektren der Oligoprolin Peptide **49** (a), **50** (b), **51** (c) und **52** (d) in Mischungen von wässrigem Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) und n-PrOH (Angabe in vol/vol % n-PrOH in Puffer). Die Spektren wurden bei einer Konzentration um 50 μM bei 25°C aufgenommen. Die Löslichkeit der beiden Peptide **51** und **52** mit Carboxylat C-Terminus erlaubt keine Aufnahme von Spektren in reinem n-PrOH. Für Peptid **50** wurde zusätzlich ein Spektrum in 97.5% n-PrOH (\bullet) aufgenommen. (e) CD Signal bei 213 nm für die Peptide **49-52** aufgetragen gegen den Anteil n-PrOH in Puffer.

5.1.3. Wechselwirkung der Ladungen mit dem helicalen Dipol Moment

Bei genauerem Betrachten der beiden Konformationen PPI und PPII fällt auf, dass die Carbonyl Bindungen in der PPI Helix näherungsweise entlang der Helixachse ausgerichtet sind, während sie in der PPII Helix senkrecht dazu stehen (Abbildungen 11 (Seite 14) und 41).¹⁴⁹ Diese unterschiedliche Anordnung macht die Polarisierung der beiden Helices deutlich verschieden. Das Dipol Moment einer einzelnen Amidbindung zeigt vom partiell negativ geladenen Carbonyl Sauerstoffatom hin zum Carbonyl Kohlenstoffatom und macht ca. 3.5 Debye aus.²⁰⁸ In der PPI Helix summieren sich diese einzelnen Amid Dipole, die alle vom N-Terminus zu C-Terminus ausgerichtet sind. In der PPII Helix hingegen zeigen die einzelnen Dipole zur Helixachse hin und heben sich näherungsweise gegenseitig auf.

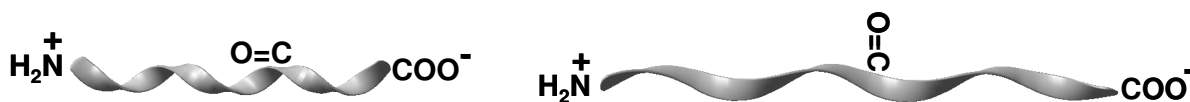


Abbildung 41: Schematische Darstellung einer PPI Helix (links) und einer PPII Helix (rechts) mit Ausrichtung der Carbonyl Funktionen in Relation zu den terminalen Ladungen.

Quantenchemische Rechnungen, die von Dr. Sabine Schweitzer und Prof. Christian Ochsenfeld durchgeführt wurden, bestätigten diese von Modellen abgeleiteten Erwartung.¹⁵² Für das ungeladene Peptid Ac-Pro₁₂-OMe in einer PPI Konformation wurde ein Dipolmoment von 54 Debye in der Gasphase berechnet, das hauptsächlich entlang der Helixachse verläuft. Dasselbe Molekül in der PPII Helix hat lediglich ein Macro-Dipolmoment von 10 D, wobei auch hier der Hauptanteil entlang der Helixachse vom N- zum C-Terminus ausgerichtet ist.²⁰⁹ Die Rechnungen erlauben es damit zu verstehen was geschieht, wenn Ladungen an den Endgruppen eingeführt werden. Diese Ladungen, positiv am Ammonium N-Terminus und negativ am Carboxylat C-Terminus, interagieren mit den einzelnen Amid Dipolen und führen zu einer Stabilisierung beider Helices. Allerdings ist diese Stabilisierung in der PPI Helix deutlich grösser. Neben der Ausrichtung der Dipolmomente kommt auch zu tragen, dass die PPI Helix deutlich kompakter ist (5.6 Å Ganghöhe gegen 9.4 Å für eine PPII Helix, Abbildungen 11 (Seite 14) und 41). Damit sind die terminalen Ladungen in der PPI Konformation näher an den Dipolen, was zu einer stärkeren Stabilisierung führt. Für das zwitterionische Peptid **52** sind zusätzlich auch die beiden gegensätzlichen Ladungen an den Endgruppen in der PPI Helix weniger weit voneinander getrennt. Eine Umwandlung in die PPII Form bedingt eine energetisch ungünstige grössere Ladungsseparation.

5.1.4. Einfluss des pH-Werts auf die Konformation

Wenn es die Ladungen an den Endgruppen sind, die die PPI Helix stabilisieren, müsste sich der Einfluss der freien Amin-Funktion und der Carbonsäure an den Termini stark vom Protonierungszustand abhängen. Um dies zu testen, wurden die CD-Spektren der Peptide **49-52** zusätzlich in Mischungen von n-PrOH und Puffer mit pH Werten von 2.0 bzw. 11.7 analysiert und mit den CD-Kurven mit neutralem Puffer verglichen. Abbildung 42 zeigt die CD-Spektren bei 95% n-PrOH und 5% Puffer. Wie erwartet ändern sich die Spektren von Peptid **49**, dessen Endgruppen abgesättigt sind, nicht. Dafür zeigen die anderen Peptide bemerkenswerte Unterschiede.

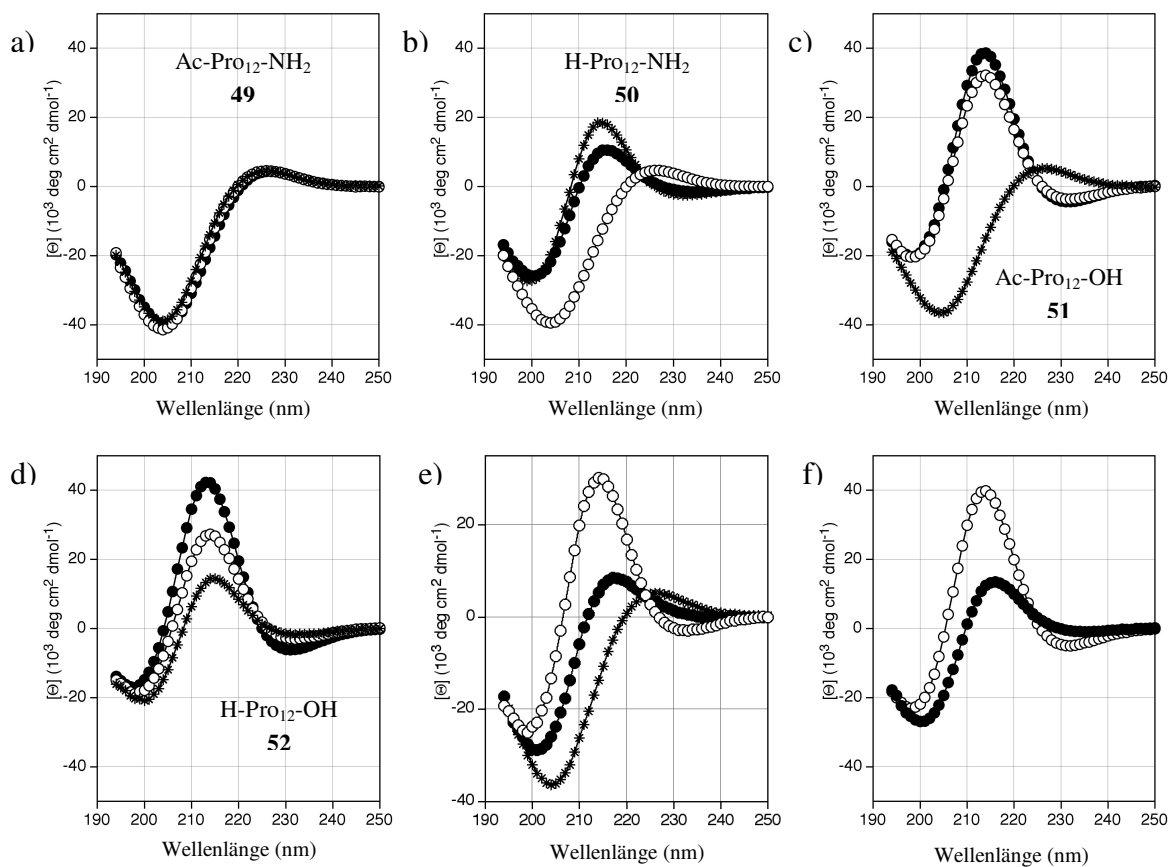


Abbildung 42: CD-Spektren von **49** (a), **50** (b), **51** (c), **52** (d) und **53** (e) in Mischungen von jeweils 95 vol% n-PrOH in 5% wässrigem Phosphat Puffer 10 mM, pH 7.2 (○), 5% wässrigem Phosphat Puffer 10 mM, pH 2.0 (*), und 5% Glycin Puffer 10 mM pH 11.7 (●). Die Spektren wurden bei einer Konzentration um 50 μM bei 25°C aufgenommen. f) CD-Spektrum von Peptid **51** in 95 vol% n-PrOH in wässrigem Phosphat Puffer 10 mM, pH 7.2 (○) und Probe die zusätzlich mit NaCl gesättigt ist (●).

Peptid **50** mit einem freien Amin am N-Terminus, das in basischer Umgebung keine Ladung trägt, nimmt bei pH 11.7 eine PPII Konformation ein. Solange dieses Peptid eine positive Ladung am N-Terminus trägt (pH 7.2 und 2.0) überwiegt die PPI Konformation. Entsprechend nimmt Peptid **51** im sauren Milieu eine PPII Konformation an, wenn die

Carbonsäure protoniert und damit nicht mehr geladen ist, während in neutralem und basischem Milieu eine PPI Konformation vorliegt. Für beide Peptide **50** und **51** ist das CD-Spektrum des neutralen Moleküls ähnlich zu dem vom acetylierten Carboxamid Peptid **49**. Die Spektren von Peptid **52**, das nur noch eine Ladung trägt in basischer bzw. saurer Umgebung gleichen den Spektren von **51** respektive **52** bei pH 7.2. Abbildung 42d zeigt, dass der Erhalt einer Ladung am C-Terminus (im basischen Milieu) einen grösseren Einfluss auf die Stabilität im Vergleich zu einer Ladung am N-Terminus (im Säuren). Dies ist im Einklang mit der Beobachtung dass Peptid **51** PPI mehr favorisiert als Peptid **50** in den Lösungsmittelstudien bei pH 7.2, was auch die ab initio Rechnungen¹⁵² aussagen.

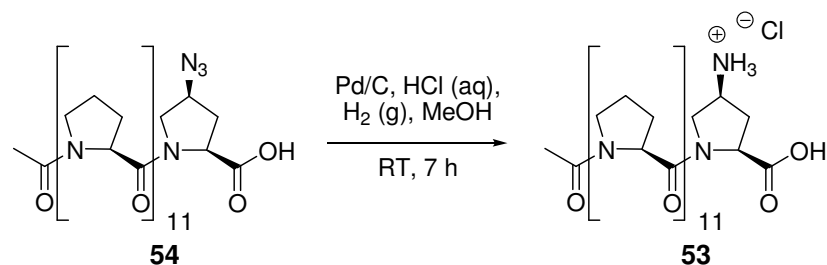
Eine Erklärung dieses Unterschiedes könnte in der elektrostatischen Abstossung vom C-terminalen Carboxylat und dem Sauerstoff der benachbarten Amidbindung begründet sein. Wie in Kapitel 3.3.2 (Abbildung 25) dargestellt, verringert sich $K_{trans/cis}$ von 3.4 auf 0.8 für Ac-Pro-OH wenn die Carbonsäure deprotoniert wird in D₂O. Im Gegenzug ergibt sich am N-Terminus keine derartige elektrostatische Interaktion aufgrund der Ladung die das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht der N-terminalen Amidbindung stark verändert. Dies zeigt sich beispielsweise mit H-Ala-Pro-NH₂ wo $K_{trans/cis}$ für das geladene Molekül 6.3 beträgt und mit einem Wert von 7.7 nur geringfügig ändert für das neutrale Molekül.⁶ In Kapitel 5.3 wird die Bedeutung der C-terminalen Amidbindung für das PPI/PPII Gleichgewicht genauer analysiert.

Diese deutliche Abhängigkeit vom pH Wert unterstützt die Erklärung, dass ein positiv geladener N-Terminus und ein negativ geladener C-Terminus die PPI Helix stabilisieren. Ein weiteres Indiz ist die Erhöhung des PPII Helix Anteils, wenn die Lösungen mit NaCl gesättigt werden. Mit einer erhöhten Ionenstärke wird der elektrostatische Einfluss von Ladungen an den Termini geringer und die PPI Helix entsprechend weniger stabilisiert (Abbildung 42f am Beispiel von Peptid **51**).

Zusätzlich wurde ein Peptid synthetisiert, das wie Verbindung **51** (Ac-Pro₁₂-OH) am N-Terminus acetyliert ist und am C-Terminus die freie Säure aufweist, jedoch als C-terminale Aminosäure Einheit ein (4*S*)-Aminoprolin trägt: Ac-Pro₁₁-(4*S*)Amp-OH (**53**, Schema 13). Dazu wurde Ac-Pro₁₁-(4*S*)Azp-OH (**54**) mit Pd/C und H₂(g) in MeOH hydriert.

Bei neutralem pH ist dieses Peptid am C-Terminus deprotoniert. Die negative Ladung wird aber kompensiert durch das protonierte Amin der Aminoprolin Einheit. Wenn die Interaktion der Ladungen mit den Amid-Dipolen elektrostatischer Natur ist, sollte die PPI Konformation damit weniger stark stabilisiert sein als in Peptid **51**. Das CD-Spektrum des Aminoprolin-haltigen Peptids **53** in 95 vol% n-PrOH und 5 vol% Puffer pH 7.2 zeigt tatsächlich deutlich

weniger Anteil PPI Helix (Abbildung 42c,e). Wenn die C-terminale Carbonsäure protoniert ist (pH 2.0) bleibt die positive Ladung am Aminoprolin in der Nähe des C-Terminus. Wie erwartet führt dies zu einer PPII Konformation. Nur wenn das Amin nicht protoniert ist (pH 11.7), wird eine PPI Konformation beobachtet. Peptid **53** unterstützt damit die Erklärung, dass es zu einem gewichtigen Teil die Ladung ist, welche die Konformation beeinflusst.



Schema 13: Synthese von Ac-Pro₁₁-(4S)Amp-OH (**53**) ausgehend vom Peptid Ac-Pro₁₁-(4S)Azp (**54**).

5.1.5. Zusammenfassung der Endgruppen Effekte auf das Gleichgewicht zwischen der PPI und der PPII Helix

Die Untersuchungen an den Peptiden **49-52** haben gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen den beiden helicalen Konformationen PPI und PPII stark von den terminalen funktionellen Gruppen abhängt. Quantenmechanische Rechnungen und der Einfluss des Protonierungszustandes zeigen, dass die Ladungen entscheidend sind. Eine positive Ladung am N-Terminus und noch stärker eine negative Ladung am C-Terminus stabilisieren die PPI Helix relativ zur PPII Helix aufgrund der Interaktion mit den Amid Dipolen. Ein ähnlicher Effekt ist auch für die α -Helix bekannt.²¹⁰⁻²¹² Sie besitzt wie die PPI Konformation einen grossen Macro-Dipol. In der α -Helix führen geladene Endgruppen aber zu einer destabilisierenden Interaktion, da die Amid Carbonyl Funktionen mit dem Sauerstoffatom zum C-Terminus zeigend näherungsweise parallel zur Helixachse angeordnet sind. Entsprechend destabilisieren Ladungen an den terminalen Endgruppen einer α -Helix diese Sekundärstruktur. Dass Ladung/Dipol Interaktionen auch bei β -Peptid Strukturen die Stabilität beeinflussen²¹³⁻²¹⁵, zeigt, dass dies ein allgemeines Phänomen in wohlgeordneten Sekundärstrukturen ist.

Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich zudem zwei wichtige Punkte für Anwendungen von Polyprolin Strukturen, die so nicht bekannt waren. Damit ein Peptid eine PPI Helix annehmen kann, sollte am C-Terminus eine Carbonsäure Funktion vorliegen. Wenn am C-Terminus keine negative Ladung vorhanden ist, wird es schwer einen grossen Anteil PPI Konformation zu beobachten. Umgekehrt wird eine möglichst stabile PPII Helix (gerade in hydrophilerer

Umgebung) erreicht indem die Endgruppen so modifiziert werden, dass keine Ladungen auftreten.

Zudem zeigen diese Untersuchungen, dass man die Umwandlung von einer der beiden helicalen Konformationen in die andere auch durch einen pH Sprung auslösen kann. Es braucht immer noch einen hohen Anteil n-PrOH, die Konformationsänderung durch die Zugabe von Säure oder Base auszulösen, ist experimentell einfacher als wenn die Zusammensetzung des Lösungsmittels geändert werden muss und kann mehrmals geändert werden ohne die Konzentration der Probe stark zu verändern.

5.2. Temperaturabhängigkeit der PPII und PPI helicalen Konformationen

Neben dem Lösungsmittel hängt die Stabilität einer Konformation auch von der Temperatur ab (falls $\Delta H^\circ \neq 0$). Um die Stabilität von Protein Sekundärstrukturen zu diskutieren, wird oft die thermische Denaturierung verfolgt. Dies ermöglicht die Angabe eines Schmelzpunktes (T_m), der aussagt, bei welcher Temperatur die freie Enthalpie (die eigentlich die Stabilität angibt) gleich 0 ist. Es ist bekannt, dass die PPII helicale Konformation von Oligoprolinen in wässriger Lösung aber auch nahe am Siedepunkt von Wasser erhalten bleibt.^{73,148,196,216,217} Über das Verhalten der PPI Helix beim Erhöhen der Temperatur ist hingegen wenig bekannt. Die einzige Publikation die dazu gefunden wurde, macht zu ein und demselben Peptid gegensätzliche Angaben.¹⁹⁶ Deshalb werden hier die vier Peptide Ac-Pro₁₂-NH₂ (**49**), H-Pro₁₂-NH₂ (**50**), Ac-Pro₁₂-OH (**51**) und H-Pro₁₂-OH (**52**) auf ihre thermische Stabilität hin untersucht. Die Lösungsmittelstudien (Kapitel 5.1) haben gezeigt, dass für diese vier Peptide mit unterschiedlichen Endgruppen deutliche Differenzen in der Stabilität der helicalen Konformation betreffend Lösungsmittel auftreten.

5.2.1. Einfluss der Temperatur auf die PPII Helix

Die CD-Spektren der vier untersuchten Peptide **49-52** mit unterschiedlichen funktionellen terminalen Gruppen in wässrigem Phosphat Puffer, zeigen keine substanziellen Veränderungen im Temperaturbereich von 10°C-80°C (Abbildung 43a für **51**).

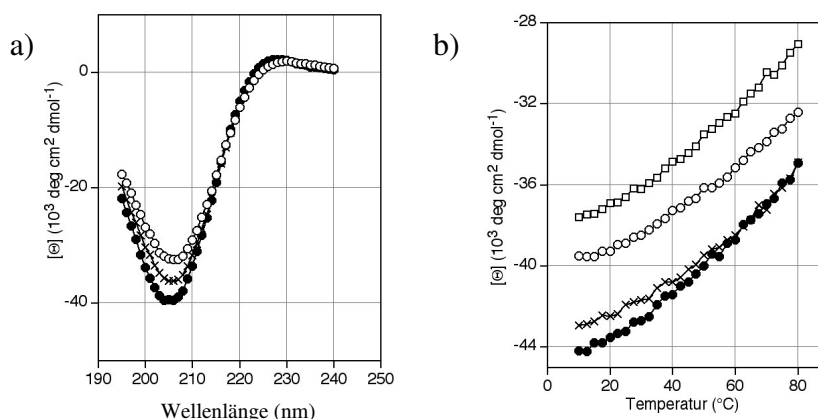


Abbildung 43: a) CD-Spektrum von Ac-Pro₁₂-OH (**51**) in Phosphat Puffer bei 10°C (●), 50°C (×) und 80°C (○). b) CD Signal bei 205 nm in Abhängigkeit der Temperatur für Peptid **49** (●), **50** (×), **51** (○) und **52** (□) gelöst in Phosphat Puffer.

Die Intensität des Minimums bei 205 nm nimmt mit zunehmender Temperatur kontinuierlich leicht ab, was auf eine erhöhte Flexibilität der Konformation zurückgeführt wird. Aber wie Abbildung 43b zeigt, bleibt die Grundstruktur für alle 4 Peptide mit 12 Prolin Einheiten gleichermassen erhalten. Es ist keine Denaturierung oder sonst eine Veränderung der PPII Struktur zu beobachten.

5.2.2. Einfluss der Temperatur auf die PPI Helix

Um den Einfluss der Temperatur auf die PPI Helix zu untersuchen, wurden CD-Spektren der Peptide **49-52** in 99% n-PrOH und 1% Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Insbesondere für das Peptid **50** (H-Pro₁₂-NH₂, Abbildung 44a) ergibt sich eine starke Abhängigkeit des CD-Signals von der Temperatur. Es zeigt sich zudem, dass ähnlich den Lösungsmittel Studien ein isodichroischer Punkt erkennbar ist. Die Differenz der Spektren bei 80°C und 5°C ist in Abbildung 44b dargestellt. Es ähnelt einem CD-Spektrum der PPII Helix. Ebenso gleichen sich die CD-Spektren von Peptid **50** in 99% n-PrOH bei 80°C und von 95% n-PrOH bei 25°C (Abbildung 44c). Dies deutet darauf hin, dass beim Erhitzen das Gleichgewicht von der PPI zur PPII Konformation verschoben wird, wie das auch in einer Publikation von R. Raines und Mitarbeitern angedeutet wird.¹⁹⁶

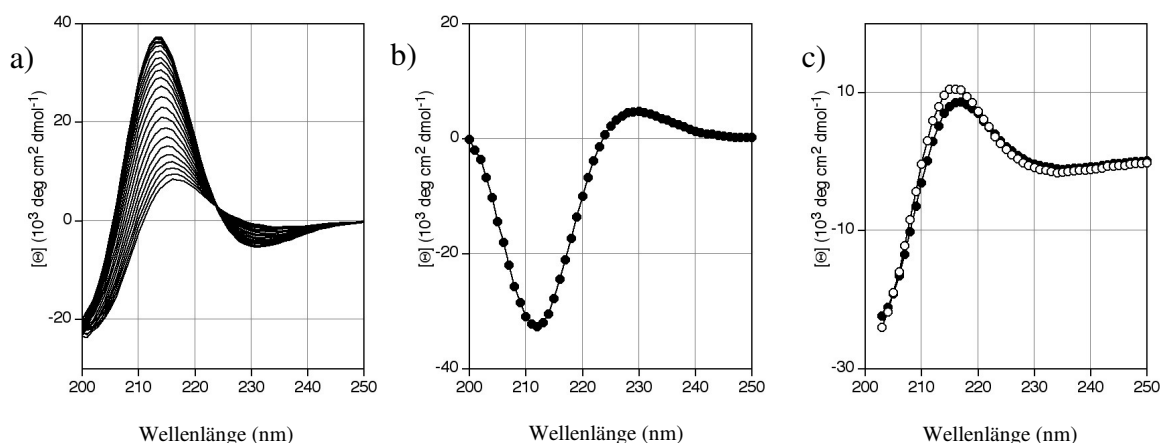


Abbildung 44: CD-Spektren von H-Pro₁₂-NH₂ (**50**) in 99% n-PrOH und 1% Phosphat Puffer. a) Spektren alle 2.5 °C im Temperaturbereich von 10-80°C. Das Maximum bei 213 nm nimmt ab, mit zunehmender Temperatur. b) Differenz der CD-Spektren bei 80°C und 5°C. c) Spektrum bei 80°C (●) im Vergleich zum Spektrum bei 25°C in 95% n-PrOH und 5% Phosphat Puffer (○).

Für das Peptid **52** ist die Änderung des CD Signals durch die Temperaturerhöhung geringer (siehe Abbildung 45a im Vergleich zu 44a für Peptid **50** bez. 45b für Peptid **51**). Dies kann mit der grösseren Stabilität der PPI Helix für dieses zwitterionische Molekül begründet werden. Eine deutlichere Abhängigkeit von der Temperatur kann für dieses Peptid unter

Bedingungen mit weniger n-PrOH Anteil erreicht werden (mit 90 % n-PrOH und 10 % Puffer nimmt die Elliptizität bei 213 nm von $3 \cdot 10^4 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ auf $1 \cdot 10^4 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ab). Die Lösungsmittelstudien haben gezeigt, dass das PPI/PPII Gleichgewicht unter diesen Bedingungen labiler ist (siehe Kapitel 5.1). Peptid **49** das kaum eine PPI Helix ausbildet, zeigt ebenfalls eine Veränderung zur PPII Helix hin (Abbildung 45c). Alle CD Experimente deutet darauf hin, dass unabhängig vom Peptid das Gleichgewicht von der PPI Helix hin zu PPII Helix verschoben wird durch Erhitzen der Proben. Das zeigt wiederum die thermische Stabilität der PPII Helix von Oligoprolinen auf.

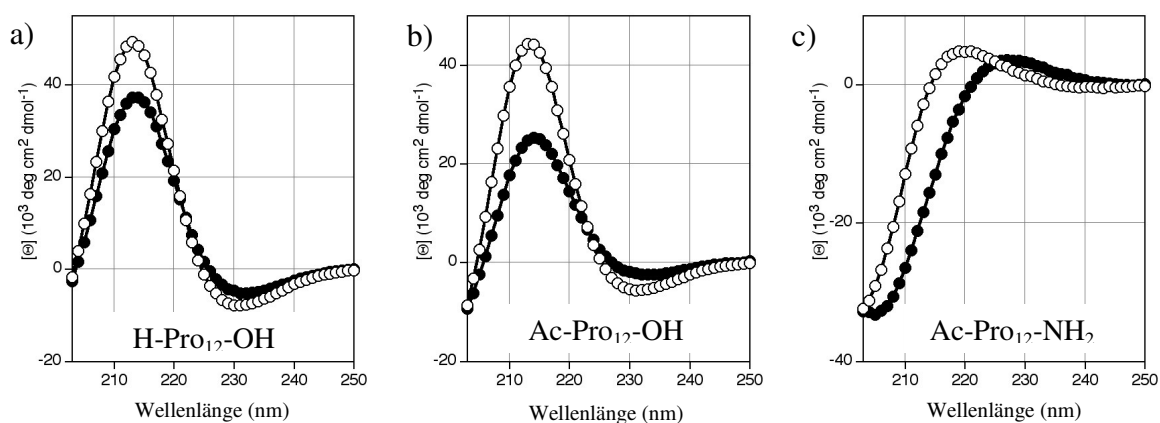


Abbildung 45: Veränderung des CD Signals beim Erhitzen von 25°C (○) auf 80°C (●) für eine Probe in 99% 1-PrOH und 1% Puffer. a) H-Pro₁₂-OH (**52**). b) Ac-Pro₁₂-OH (**51**) c) Ac-Pro₁₂-NH₂ (**49**) in 99% 1-PrOH.

5.2.3. Hysterese Effekt bei der Umwandlung PPI/PPII

Abbildung 46a zeigt nochmals den Verlauf des CD-Signals für das Peptid H-Pro₁₂-NH₂ (**52**) bei 213 nm, wenn mit einer konstanten Rate erhitzt und danach mit der derselben Geschwindigkeit wieder abgekühlt wird. Je höher das CD-Signal bei 213 nm ist, desto mehr PPI Konformation liegt vor. Auffallend ist eine starke kinetische Hysterese, wie sie auch für die Faltung/Entfaltung der Collagen Tripelhelix beobachtet wird.^{75,170} Eine schnellere Temperatur Änderung führt zu einem verstärkten Unterschied der Heiz- und Abkühlkurven.

In Zusammenarbeit mit Prof. Jürgen Engel vom Biozentrum wurde ein einfaches kinetisches Modell für diese thermische Umwandlung erarbeitet. Die resultierende Differentialgleichung wird iterativ mit dem Programm MicroMath® Scientist® for Windows™ Version 2.1 (MicroMath, Inc. Saint Louis, MO, USA) gelöst.

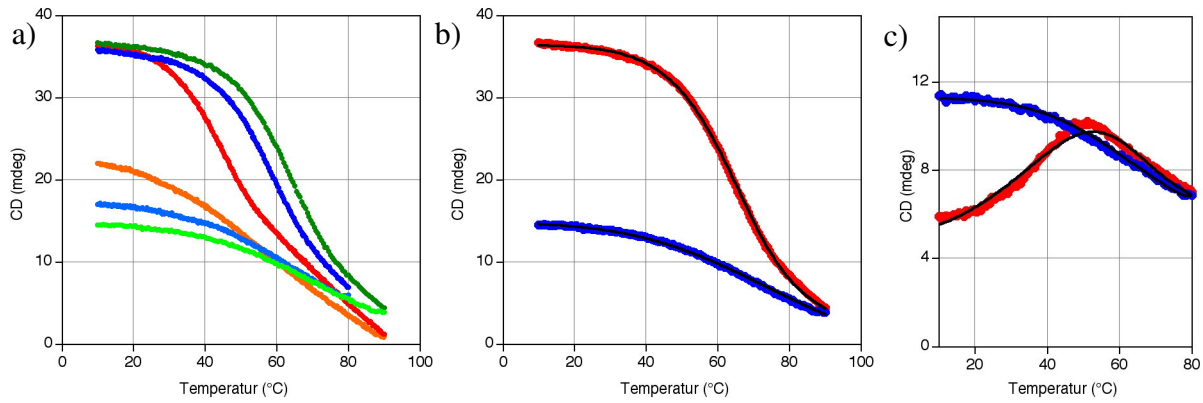
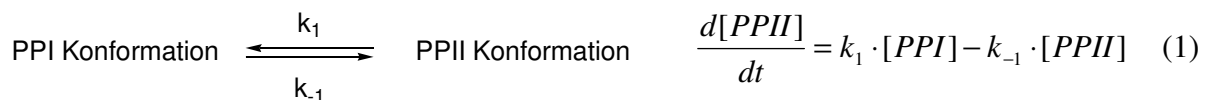


Abbildung 46: a) CD-Signal von H-Pro₁₂-NH₂ **50** (37 μ M in 99% n-PrOH und 1% Phosphat Puffer) bei 213 nm in Abhängigkeit der Temperatur bei einer Heizrate von 1 K/min (●), 0,5 K/min (●) und 0,1 K/min (●) bzw. einer Kühlrate von 1 K/min (●), 0,5 K/min (●) und 0,1 K/min (●). b) und c) nach einem kinetischen Hysterese-Modell gefittete Kurven (—) für die experimentelle Heiz- (●) bzw. Kühlrate (●) von 1 K/min. b) für H-Pro₁₂-NH₂ **50**, c) für H-Pro₆-OH **55**.

Dem Modell liegt die differentielle Gleichung für ein zwei Zustandsgleichgewicht (hier PPI/PPII) zugrunde mit zwei Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung:



Ausgedrückt im Grad der Umwandlung F ergibt das:

$$\frac{dF}{dt} = -k_1 \cdot F + k_{-1} \cdot (1 - F) \quad (2)$$

wobei $F = \frac{[\text{PPII}]}{c_0}$ und $[\text{PPII}] = (1 - F) \cdot c_0$ gilt. F geht damit gegen 1, wenn nur die PPI Konformation vorliegt, respektive gegen 0 wenn das Gleichgewicht auf der Seite der PPI Konformation liegt. Die mittlere molare Elliptizität ($\theta(T)$) wurden folgendermassen in F ausgedrückt:

$$\theta(T) = \theta_{\text{PPII}} + F \cdot (\theta_{\text{PPI}} - \theta_{\text{PPII}}) \quad (3)$$

Über die Heizrate (ρ) wird die Zeitabhängigkeit eingeführt:

$$T = T_{\text{start}} + \rho \cdot t \quad (4)$$

Die Aktivierungsenergie (E_a) kommt von der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten nach Arrhenius. k_{10} wird als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei $T_0 = 273^\circ\text{C}$ eingeführt:

$$k_1(T) = k_{10} \cdot e^{\left[\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right]} \quad (5)$$

Die Relation der Gleichgewichtskonstanten zur Enthalpie und Entropie ermöglicht auch ein Anpassen dieser Parameter durch das Fitten der experimentellen Graphen: $K(T) = e^{\frac{-\Delta H^{\circ} - T \cdot \Delta S^{\circ}}{RT}}$

und $k_{-1} = k_1 \cdot K$. Für das Heizen und Abkühlen wird derselbe Mechanismus einfach mit anderen Startbedingungen verwendet. Beim Aufheizen ist der Startwert für das Gleichgewicht auf der Seite der PPI Konformation, beim Abkühlen zu ca. 80% bei der PPII Konformation.

Wie Abbildung 46b zeigt, kann dieses kinetische Hysterese Modell die experimentell beobachteten CD-Werte gut beschreiben, insbesondere die starke Hysterese. Folgende Parameter werden für das mathematische Anpassen der Kurven verwendet: die Enthalpie ΔH° , die Entropie ΔS° , die Geschwindigkeitskonstante k_1 für die Umwandlung von PPI nach PPII bei 0°C und die dazugehörige Aktivierungsenergie E_a . Unabhängig von der Heizrate (0.1, 0.5 oder 1 K/min) und der Konzentration des Peptids (111 μM , 37 μM oder 18 μM) findet man folgende Werte:

$$\Delta H^{\circ} = 30\text{-}35 \text{ kJ/mol};$$

$$\Delta S^{\circ} = 94\text{-}109 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)};$$

$$k_1 (0^{\circ}\text{C}) = 7 \cdot 10^{-7} \text{-} 1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1};$$

$$E_a = 75\text{-}84 \text{ kJ/mol}.$$

Die Umwandlung von einer PPI Helix zu einer PPII Helix unter den beschriebenen Bedingungen ist endotherm. Auf eine Erhöhung der Temperatur reagiert das System mit einer Verschiebung des Gleichgewichts zur PPII Konformation hin wobei die Entropie zunimmt. Die Aktivierungsenergie entspricht der Erwartung für eine Prolyl *s-cis:s-trans* Isomerisierung. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei 80°C wurde zusätzlich in einem unabhängigen Temperatursprung Experiment bestimmt. Die Änderung des CD-Signals bei 213nm einer zuvor bei 10°C equilibrierten Probe wurde bei 80°C zeitlich verfolgt und nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung analysiert. Der so erhaltene Wert von 0.0054 s^{-1} ist vergleichbar zum Wert von 0.0034 s^{-1} , der mit dem kinetischen Hysterese Modell bestimmt wurde ($k_{10} (0^{\circ}\text{C})$ wurde nach Arrhenius auf k_1 bei 80°C umgerechnet unter Berücksichtigung von E_a). Das bekräftigt die Bedeutung dieses Modells.

Auswirkungen für H-Pro₆-OH 55

Die Analysen von anderen Peptiden haben gezeigt, dass man bei tiefen Temperaturen sehr vorsichtig sein muss, um sicher zu stellen, dass sich die Peptid Lösung im Gleichgewicht befindet. Ein extremes Beispiel wurde mit H-Pro₆-OH **55** beobachtet (Abbildung 46c). Eine Stammlösung dieses Peptids in Puffer (PPII Konformation) wurde mit n-PrOH verdünnt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Diese Bedingungen erlaubten kein Einstellen des

Gleichgewichts. Aufgrund der tiefen Temperaturen und der hohen Aktivierungsenergie war die PPII Konformation wie eingefroren. Erst im CD-Experiment, als die Temperatur langsam erhöht wurde, konnte sich die, unter diesen Bedingungen, thermodynamisch stabilere PPI Helix ausbilden (Anstieg des CD-Signals bei 213 nm). Das Maximum in der Kurve kommt dadurch zustande, dass ab einer gewissen Temperatur dann die positive Enthalpie überwiegen, dass also eine Erhöhung der Temperatur die PPII Helix bevorzugt.

Das kinetische Hysterese Modell kann auch diese Beobachtung qualitativ wiedergeben. Es muss dazu lediglich der Startwert für das Erhitzen angepasst werden (hier 5% PPI zu Beginn).

Zusammenfassung: Einfluss der Temperatur auf die helicalen Konformationen

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die PPII Konformation in Wasser gegenüber dem Erhitzen der Lösung äusserst stabil ist. In n-PrOH/Puffer Mischungen nimmt der Gleichgewichtsanteil der PPI Helix beim Erhitzen einer Probe zu Gunsten der PPII Konformation ab. Dabei wurde erstmals für Polyprolin zwischen Erhitzen und Abkühlen eine starke Hysterese beobachten. Hysterese Effekte sind eher von physikalischen Prozessen bekannt, wie dem Betrachten von magnetischen, elastischen, elektrischen oder flüssigkristallinen Eigenschaften von Stoffen. Aber auch in biologischen Systemen wird das Phänomen beschrieben. Für SNARE-Proteine, die bei der Fusion von intrazellulären Membranen wichtig sind, wird zum Beispiel auch eine biologische Relevanz der gefundenen Hysterese in der Komplexbildung diskutiert.²¹⁸

Dadurch, dass die Probe während der Temperaturänderung nicht im Gleichgewicht ist, werden auch kinetische Prozesse beobachtet. Mit Prof. Jürgen Engel ist es gelungen die Hysterese mit einem einfachen Modell zu beschreiben, das auch eine quantitative Beschreibung des Gleichgewicht PPI/PPII erlaubt. In Kapitel 5.4 wird diese Analyse verwendet, um die Kettenlängenabhängigkeit des Gleichgewichts zu diskutieren.

5.3. Wo startet die Umwandlung zwischen den beiden helicalen Konformationen?

Ein wichtiges Forschungsfeld in der biophysikalischen Chemie ist die Proteinfaltung. Das Beschreiben dieser komplexen Prozesse ist immer noch eine grosse Herausforderung. Ein besseres Verständnis von *s-cis:s-trans* Isomerisierungen, die oft geschwindigkeitslimitierend sind für die richtige Faltung von Proteinen, ist daher erstrebenswert.

Das Betrachten der Polyprolin Strukturen erlaubt es eine Konformationsänderung zwischen zwei geordneten Strukturen zu beobachten, während normalerweise in der Proteinfaltung die Struktur des denaturierten Zustandes schlecht beschrieben ist. Trotzdem ist die Umwandlung eines Oligoprolin Moleküls von einer PPI Helix in eine PPII Helix oder umgekehrt ein komplexer Prozess. Die wichtigste Änderung, die es zu vollziehen gilt, ist die Drehung aller Amidbindungen um 180° . Diese *s-cis:s-trans* Isomerisierungen benötigen hohe Aktivierungsenergien um 80 kJ/mol.²¹⁹ Dabei stellt sich die Frage, wie die einzelnen Isomerisierungsreaktionen ablaufen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den CD spektroskopischen Untersuchungen nie eine dritte Konformation neben der PPI und der PPII Helix nachgewiesen werden. Egal ob die Umwandlung durch eine Lösungsmittel- (Kapitel 2.3.1), eine pH- (Kapitel 5.1.4) oder eine Temperatur Änderung (Kapitel 5.2.2) induziert wurde, ist für alle Oligoprolin Peptide ein isodichroischer Punkt in den CD-Spektren erkennbar, wenn die CD-Spektren zu verschiedenen Zeiten nach dem Einleiten der Konformationsänderung übereinander gelegt werden. Dies zeigt, dass während der Umwandlung PPI/PPII keine grösseren Anteile einer weiteren Konformation angehäuft werden. Wenn man an einem Modell versucht Amidbindungen zu drehen, erkennt man relativ rasch, dass die entstehenden Knicke (Nahtstellen von PPI Helix zu PPII Helix) in der Helix starke sterische Konflikte auslösen.²²⁰ Die Vermutung liegt nahe, dass sich die Isomerisierung kooperativ durch ein Molekül hindurch zieht und Moleküle mit einem Knick rar sind, was wiederum zur Frage führt, wo die *s-cis:s-trans* Isomerisierungen beginnen. Mit den 4-Azidoprolin Bausteinen haben wir grundsätzlich die Möglichkeit die beiden Seiten einer Polyprolin Helix zu unterscheiden. Diese Möglichkeit zur Differenzierung des C- und N-terminalen Abschnitts der Helix sollte eine Aussage zum Ausgangspunkt der Isomerisierung erlauben. Mutter und Mitarbeiter haben das auf ähnliche Weise mit Pseudoprolin Einheiten versucht.²⁰¹ Aufgrund ihrer Daten konnte aber keine Aussage getroffen werden, was auf den ungenügenden Einfluss der *s-cis* Präferenz von einer Pseudoprolin Einheit zurückgeführt wurde.

In der Literatur findet sich auch sonst keine klare Antwort auf diese Frage. Oft zitiert werden NMR Untersuchungen von Torchia und Bovey²²¹ sowie enzymatische Untersuchungen von Brandts und Mitarbeitern.²²² Die beiden Publikationen gelangen allerdings zu entgegengesetzten Schlussfolgerungen. Die NMR Daten machen den N-Terminus als Startpunkt aus für die Umwandlung von der PPII zur PPI Konformation, und aufgrund der Messungen von Brandts wird der C-Terminus als Startpunkt auserkoren. Beide Analysen gehen von nicht bewiesenen Annahmen aus, was beide Argumentationen nicht schlüssig macht. Schliesslich findet sich eine interessante quantenmechanische Publikation von Farmer und Hopfinger²²³ zu dieser Frage. Ein Vergleich der berechneten Aktivierungsenergien für die verschiedenen Möglichkeiten der Umwandlung von einer PPI Helix zu einer PPII Helix macht einen Start am C-Terminus am wahrscheinlichsten.

Hier soll nun mit einem thermodynamischen sowie einem kinetischen Ansatz überprüft werden, ob experimentelle Hinweise auf einen Start der Umwandlung PPI Helix → PPII Helix am C-Terminus gefunden werden können.

5.3.1. Synthese der Modellpeptide

Um die verschiedenen Abschnitte einer Oligoprolin Helix zu differenzieren wurden 12-mer synthetisiert, wobei 4-Azidoprolin Einheiten in Viererblöcken in der Mitte des Peptids, am C- und am N-Terminus eingebaut wurden (Tabelle 13, Peptide **56S-58S** und **56R-58R**). Die Resultate aus Kapitel 2 haben gezeigt, dass der Einbau von (4*R*)Azp anstelle von Prolin Einheiten die PPII Helix relativ zur PPI Helix stabilisiert, während (4*S*)Azp Einheiten eine PPI Helix stabilisieren. Als Referenz wurden Ac-Pro₁₂-OH (**51**), sowie Peptide mit einer Azp Einheit in jeder dritten Position untersucht (Tabelle 13, Peptide **38S** und **38R**). Diese Peptide **38R** und **38S** bestehen, wie die Peptide mit den Viererblöcken, zu zwei Dritteln aus Prolin Einheiten und einem Drittel aus 4-Azidoprolin Einheiten.

Ein anderer Ansatz, die beiden Enden der Helix zu unterscheiden, ist der Einbau von Aminosäuren mit einem primären Amin. Für diese wird eine N-terminale Amidbindung in der *s-cis* Konformation unwahrscheinlich. Hier wurden Tyrosin Einheiten jeweils mit einer Glycin Einheit als Abstandhalter am C- oder am N-Terminus an ein 12-mer Oligoprolin Peptid angesetzt (Tabelle 13, Peptide **59** und **60**).

Die Peptide wurden auf fester Phase (2-Chlorotriethylchlorid Harz) in Einzel-Kupplungen von Fmoc-Pro-OH, Fmoc-(4*R*)Azp-OH (**2R**), Fmoc-(4*S*)Azp-OH (**2S**), Fmoc-Gly-OH und Fmoc-Tyr-OH mit HCTU als Kupplungsreagenz synthetisiert und am Ende der Synthese auf dem

Harz mit Ac₂O acetyliert. Nach dem Abspalten vom Harz wurden die Peptide mittels Umkehrphasen HPLC gereinigt.

Tabelle 13: Modell Peptide, die synthetisiert wurden mit dem Ziel die beiden Enden der Helix zu differenzieren.

Peptid	
Ac-[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₈ -OH	56S
Ac-[Pro] ₄ -[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₄ -OH	57S
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -OH	58S
Ac-[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₈ -OH	56R
Ac-[Pro] ₄ -[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₄ -OH	57R
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -OH	58R
Ac-Pro ₁₂ -OH	51
Ac-[Pro-(4 <i>S</i>)Azp-Pro] ₄ -OH	38S
Ac-[Pro-(4 <i>R</i>)Azp-Pro] ₄ -OH	38R
Ac-Pro ₁₂ -Gly-Tyr-OH	59
Ac-Tyr-Gly-Pro ₁₂ -OH	60
Ac-Pro ₁₁ -(4 <i>S</i>)Azp-OH	54

5.3.2. Betrachtung der Gleichgewichtslage

Die Peptide aus Tabelle 13 wurden in Lösungsmittelstudien CD-spektroskopisch analysiert, analog zur Methode in Kapitel 2.3.1. In Puffer liegt jeweils eine PPII Konformation vor. Mit der Zunahme von n-PrOH im Lösungsmittelgemisch nimmt der Anteil der PPI Konformation zu. Die unterschiedlichen Tendenzen eine PPI Konformation auszubilden, werden ausgenutzt um die Peptide zu vergleichen. Wie erwartet, stabilisieren die Peptide mit (4*R*)Azp Einheiten (**56R-58R**) die PPII Helix und jene mit (4*S*)Azp Einheiten (**56S-58S**) die PPI Helix. Abbildung 47 zeigt dies jeweils für die diastereomeren Verbindungen **56**, **57** und **58**. Je höher das CD-Signal bei 213 nm ist, desto grösser ist der Anteil der PPI Konformation. Ein Vergleich der 3 diastereoisomeren Paare untereinander zeigt, dass der Unterschied von (4*S*)Azp-haltigen Peptiden zu denen mit (4*R*)Azp Einheiten für diejenigen Peptide am grössten ist, welche die Azp Einheiten am C-Terminus tragen. **58S** zeigt die deutlichste Tendenz zur Ausbildung einer PPI Helix und für **58R** wird die geringste Tendenz zu einer PPI Helix nachgewiesen. Dies zeigt eindeutig, dass der Einbau von Azp Einheiten am C-Terminus

einen grösseren Einfluss auf die Konformation hat, als wenn diese sich am N-Terminus oder in der Mitte des Peptids befinden.

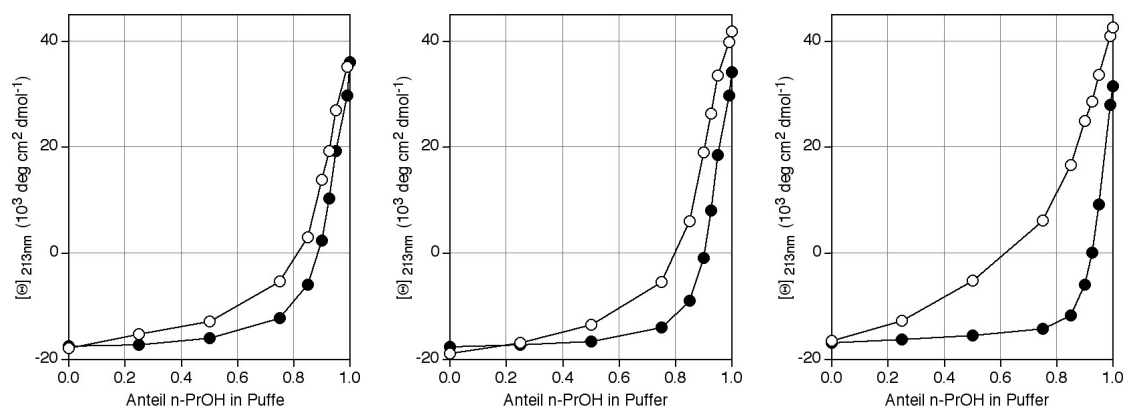


Abbildung 47: CD-Signal bei 213 nm aufgetragen gegen den Anteil n-PrOH in Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2). Links: **56S** (○) und **56R** (●), Mitte: **57S** (○) und **57R** (●), Rechts: **58S** (○) und **58R** (●).

Wird aber nur eine (4*S*)Azp Einheit direkt am C-Terminus eingebaut (Peptid **54**) lässt sich kein deutlicher Unterschied zum 12-mer Oligoprolin Peptid **51** nachweisen (Abbildung 48a). Wenn die vier Azp Einheiten gleichmässig über das Peptid verteilt sind (Peptide **38**), ist der unterschiedliche Einfluss von (4*R*)Azp und (4*S*)Azp Einheiten auf das PPI/PPII Gleichgewicht wieder gut zu beobachten (Abbildung 48b) und ist vergleichbar stark wie bei den Peptiden **56** und **57**, bei denen der Viererblock am N-Terminus oder zentral gelegen ist.

Um die Konzentration von Peptiden gut bestimmen zu können, wird gelegentlich eine Tyrosin Einheit an einem Ende angehängt.^{196, 224} Die UV Absorption der aromatischen Seitenkette von Tyrosin erlaubt es über das Lambert-Beersche Gesetz²¹⁸ die Konzentration des entsprechenden Peptids zu bestimmen. Normalerweise wird eine Glycin Einheit als Verbindungsstück zwischen dem Tyrosin-Tag und dem Peptid eingeführt, um die Beeinflussung der UV Absorption durch das zu untersuchende Peptid gering zu halten. Bei einer Wellenlänge von 276 nm wurde in 6 M Guanidinium-hydrochlorid bei einem pH-Wert von 6.5 ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ von $1450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt, was dann für ein beliebiges Peptid mit einer Tyrosin Einheit näherungsweise verwenden werden kann.²²⁵

Die CD Analyse zeigt jedoch, dass die Position, an der dieser Tyrosin Anhang eingebaut wird, eine grosse Rolle spielen kann, wenn die Konformation des Peptids betrachtet wird. Befindet er sich am N-Terminus eines 12-mer Oligoprolins (Peptid **60**) ist eine PPI Konformation nach wie vor möglich, am C-Terminus (Peptid **59**) behindert er aber das Ausbilden einer PPI Konformation. Selbst in reinem n-PrOH ist das Gleichgewicht nicht klar auf der PPI helicalen Seite (Abbildung 48c). Beide Peptide haben zwei sekundäre

Amidbindungen (**60** am C-Terminus und **59** am N-Terminus) für die eine *s-cis* Konformation energetisch sehr unvorteilhaft ist. Anscheinend kann der Oligoprolin Teil des Peptids die Umwandlung zur PPI Helix deutlich besser ausbilden, wenn die Amidbindungen welche die erforderliche *s-cis* Konformation nicht annehmen können, am N-Terminus sind und sich am C-Terminus damit eine Prolylamidbindung befindet.

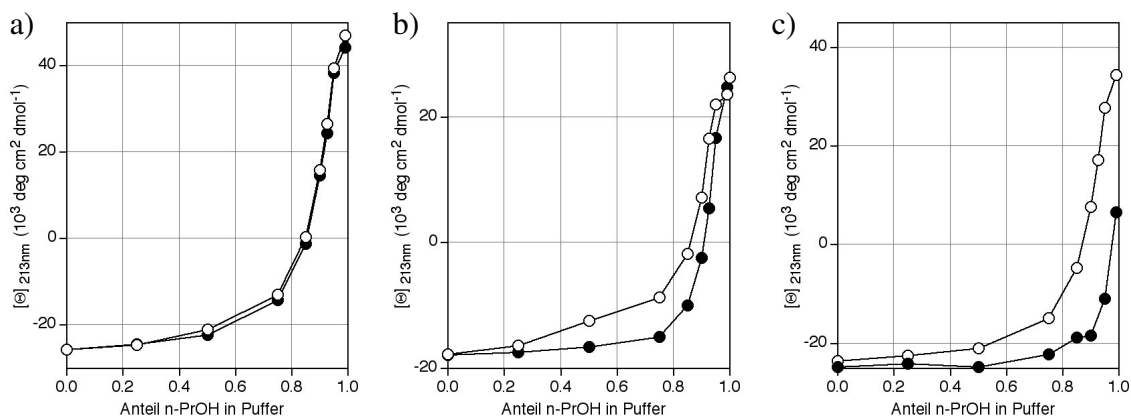


Abbildung 48: CD-Signal bei 213 nm aufgetragen gegen den Anteil n-PrOH in Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) a) **51** (○) und **54** (●), b) **38S** (○) und **38R** (●), c) **60** (○) und **59** (●).

Wie schon in Kapitel 5.1 bei der Analyse von Ladungen an den Endgruppen festgestellt wurde, zeigen diese Resultate, dass der C-Terminus einen grösseren Einfluss als der N-Terminus hat, wenn es darum geht eine PPI Helix auszubilden. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei einer Umwandlung von einer PPII zu einer PPI Helix die Isomerisierung der Amidbindungen vom C-Terminus ausgeht.

5.3.3. Kinetische Beschreibung der Umwandlung PPI → PPII

Mittels CD Spektroskopie lässt sich auch die zeitliche Abhängigkeit der Umwandlung von einer PPII zu einer PPI Helix nach einer sprunghaften Lösungsmitteländerung gut beobachten.^{201, 226} Im Nachfolgenden wird versucht diese kinetische Umwandlung zu beschreiben.¹⁵⁴

Abbildung 49a zeigt wie sich das CD-Spektrum des Peptids Ac-Pro₁₂-OH (**51**) über die Zeit verändert, wenn eine in Phosphat Puffer equilibrierte Probe zum Zeitpunkt Null so mit n-PrOH verdünnt wird, dass die Lösung dann zu 95% aus n-PrOH und zu 5% aus Phosphat Puffer besteht. Jede halbe Stunde wurde bei 25°C ein Spektrum aufgenommen. Man kann die Umwandlung von der anfangs beobachteten PPII Helix zur PPI Helix gut am Anstieg der mittleren molaren Elliptizität bei 213 nm erkennen. In Abbildung 49b sind die Messpunkte der mittleren molaren Elliptizität bei 213 nm gegen die Zeit aufgetragen. Eine Analyse mit

einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergibt die Kurve, die in Abbildung 49b eingezeichnet ist. Die damit bestimmte unimolekulare Geschwindigkeitskonstante für die Umwandlung von einer PPII zu einer PPI Konformation ist unabhängig von der gewählten Wellenlänge. Die Halbwertszeit betrat ca. 1,5 Stunden bei 25°C.

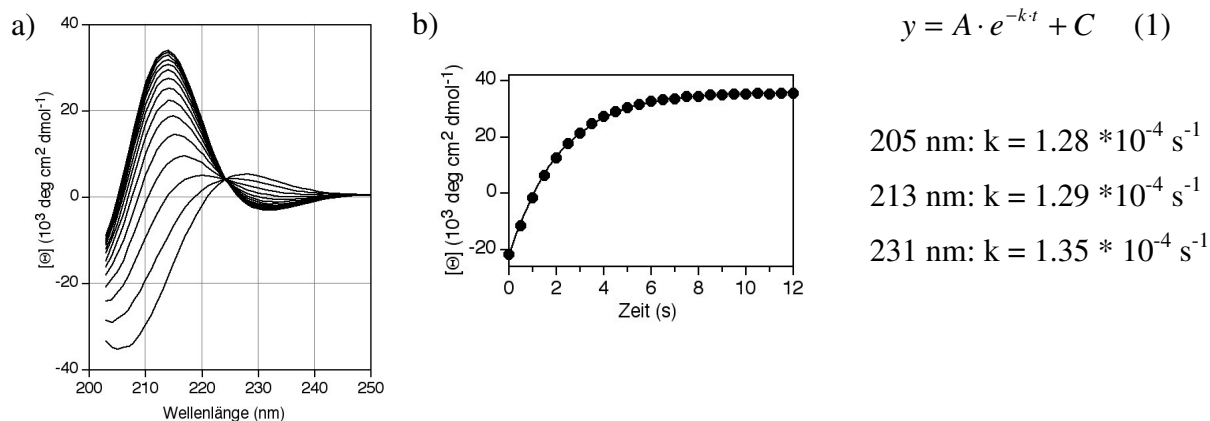


Abbildung 49: a) CD-Spektren von Ac-Pro₁₂-OH (**51**) aufgenommen alle 30 Minuten (bis 7h) nach der Zugabe von n-PrOH zu einer Lösung in Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2). Die Konzentration betrug 50 µM, die Temperatur 25°C und der vol/vol Anteil n-PrOH 95%, b) Mittlere molare Elliptizität aufgetragen gegen die Zeit. Neben den Messpunkten (•) aus Abbildung a ist die angepasste Kurve für eine Kinetik erster Ordnung (Gleichung 1) eingezeichnet. Rechts davon sind die Werte der resultierenden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k bei drei verschiedenen Wellenlängen angegeben.

Die Konzentration des Peptids hat keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, was die Analyse nach einer Kinetik erster Ordnung rechtfertigt. Beispielsweise wurde für Ac-Pro₁₁-(4S)Azp-OH (**54**) das CD Signal bei 25°C und 213 nm für die drei Konzentrationen 50 µM, 19 µM und 6 µM verfolgt und der Wert variiert lediglich von 0.00018 s⁻¹ zu 0.00016 s⁻¹ bzw. 0.00015 s⁻¹.

Wenn aber alle 5 Sekunden ein Messpunkt aufgenommen wird, kann zu Beginn eine Verzögerung beobachtet werden (Abbildung 50 für Ac-Pro₁₂-OH (**51**) bei 50°C). Die Anpassung mit einer Kinetik erster Ordnung kann den Beginn der Kurve nicht gut wiedergeben. Eine Verbesserung ergibt sich, wenn zwei exponentielle Terme verwendet werden (Gleichung 2, wobei eine Amplitude negativ wird) bzw. ein sequentieller Mechanismus mit zwei unimolekularen Reaktionen (Gleichung 3, ergibt selbe k 's wie Gleichung 2) verwendet wird.

$$y = A_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_2 \cdot t} + C \quad (2)$$

$$y = A \cdot \left[1 + \frac{1}{k_2 - k_1} \cdot (k_1 \cdot e^{-k_2 \cdot t} - k_2 \cdot e^{-k_1 \cdot t}) \right] + C \quad (3)$$

Die Abweichungen der Messwerte zur angepassten Kurve zeigen allerdings immer noch einen systematischen Fehler.

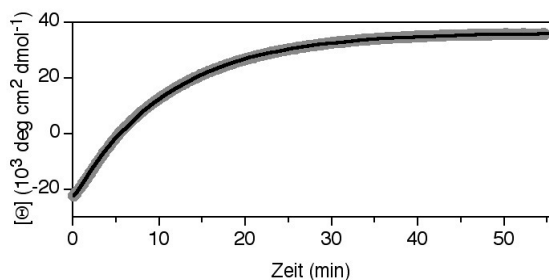


Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf des CD Signals (—) bei 213 nm von Ac-Pro₁₂-OH (**51**) bei 50°C nach der Zugabe von n-PrOH zu einer Lösung in Phosphat Puffer (10 mM, pH 7.2) mit angepasster Kurve nach Gleichung 3 (—).

Da aber die langsamere der beiden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sich nicht von jener unterscheidet, die mit einer einfachen Kinetik erster Ordnung bestimmt wurde ($k = 0.00154 \text{ s}^{-1}$ zu $k = 0.00155 \text{ s}^{-1}$), wird im folgenden Kapitel die Kinetik der Peptide nach Gleichung 3 analysiert und einzig die langsamere Geschwindigkeitskonstante betrachtet. Die Aktivierungsenergie der langsameren Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, bestimmt nach Arrhenius, entspricht der Erwartung an eine *s-cis:s-trans* Isomerisierung (für Ac-Pro₁₂-OH (**51**): $E_A = 84 \text{ kJ/mol}$). Die Halbwertszeit verkürzt sich damit von 1.5 Stunden bei 25°C auf 7.5 Minuten bei 50 °C (siehe Abbildung 49b und 50). Die schnellere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, dessen Amplitude ca. 6% der gesamten Änderung des CD Signals ausmacht, hat eine geringere Aktivierungsenergie. Über molekulare Ursprünge dieser Reaktion kann nur spekuliert werden. Es könnte sich um eine andere Konformationsänderung neben der *s-cis:s-trans* Isomerisierung handeln. Für einen Vergleich unter den Peptiden kann diese Unsicherheit vernachlässigt werden.

5.3.4. Vergleichende Resultate der kinetischen Analyse

Die zuvor für Peptid **51** ausgeführten Überlegungen zur Kinetik gelten soweit auch für die Peptide **56-58**. Dies führt uns wieder zur eingangs formulierten Frage nach dem Start der Umwandlung PPI/PPII zurück. Entsprechend sind in Tabelle 14 die Geschwindigkeitskonstanten aufgeführt, die aufgrund von CD Messungen bei 50°C nach einer Lösungsmitteländerung von reinem Puffer zu 95 vol % n-PrOH in Puffer anhand von Gleichung 3 bestimmt wurden. Es fällt auf, dass einzig Peptid **58S**, das die vier (4*S*)Azp Einheiten am C-Terminus aufweist, deutlich schneller eine PPI helicale Konformation annimmt. Die anderen fünf Isomere mit einem Block von vier Azp Einheiten haben eine Reaktionsgeschwindigkeits-

konstante um $2 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, wie auch das Prolin Referenzpeptid **51**. Die Azp Einheiten am C-Terminus jedoch führen zu einem Wert der um einen Faktor 2 schneller ist. Ein Faktor 2 ist kinetisch betrachtet nicht sehr gross, aber aufgrund der zahlreichen vergleichenden Peptide und der guten Reproduzierbarkeit sicherlich signifikant.

Wie schon in den thermodynamischen Lösungsmittelstudien ist zwischen **51** und **54** kein Unterschied auszumachen. Eine einzelne (4*S*)Azp Einheit am C-Terminus vermag weder das Gleichgewicht zur PPI Konformation zu verschieben noch die Umwandlung zu beschleunigen im Vergleich zu einer Prolin Einheit. Hingegen beeinflussen vier aufeinander folgende (4*S*)Azp Einheiten sowohl die Gleichgewichtslage wie auch die Kinetik der Umwandlung, jedoch nur sofern sie sich am C-Terminus befinden.

Tabelle 14: CD spektroskopisch bestimmte unimolekulare Geschwindigkeitskonstanten (*k*) für die Umwandlung von einer PPII zu einer PPI Helix bei 50°C in 95% n-PrOH und 5% Phosphat Puffer und Halbwertszeit ($t_{1/2} = \ln(2)/k$).

Peptid		<i>k</i>	$T_{1/2}$
Ac-[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₈ -OH	56S	$1.6 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	7.2 min
Ac-[Pro] ₄ -[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₄ -OH	57S	$1.9 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	6.1 min
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -OH	58S	$4.6 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	2.5 min
Ac-[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₈ -OH	56R	$2.1 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	5.5 min
Ac-[Pro] ₄ -[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -[Pro] ₄ -OH	57R	$2.4 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	5.8 min
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -OH	58R	$2.1 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	5.5 min
Ac-Pro ₁₂ -OH	51	$1.7 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	6.8 min
Ac-Pro ₁₁ -(4 <i>S</i>)Azp-OH	54	$1.8 * 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	6.4 min

Tabelle 15 zeigt den Unterschied von Peptid **58S** zu **58R**, **51** und auch **54** nochmals für 25 °C auf. Die Trends bleiben klar erhalten. Wenn einzig aufgrund der beiden Temperaturen 25°C und 50°C die Aktivierungsenergie nach Arrhenius bestimmt wird, ergibt sich eine Erhöhung der Aktivierungsenergie für **58R** mit den (4*R*)Azp Einheiten und eine Erniedrigung für **58S** mit den (4*S*)Azp Einheiten, wie das auch die Studie mit den Chymotrypsin Substraten **31-35** in Kapitel 3.4 gezeigt hatten. Wie in diesen kurzen Peptiden ist der unterschiedliche Einfluss von (4*S*)Azp im Vergleich zu Prolin in einer Polyprolin Struktur deutlicher als von (4*R*)Azp zu Prolin.

Tabelle 15: CD spektroskopisch bestimmte unimolekulare Geschwindigkeitskonstanten (k) für die Umwandlung von einer PPII zu einer PPI Helix bei 25°C in 95% n-PrOH und 5% Phosphat Puffer inklusive der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und der Aktivierungsenergie (E_a).

Peptid		k	$t_{1/2}$	E_a
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>S</i>)Azp] ₄ -OH	58S	$3.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	31 min	79 kJ/mol
Ac-[Pro] ₈ -[(4 <i>R</i>)Azp] ₄ -OH	58R	$1.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	105 min	90 kJ/mol
Ac-Pro ₁₂ -OH	51	$1.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	89 min	84 kJ/mol
Ac-Pro ₁₁ -(4 <i>S</i>)Azp-OH	54	$1.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	96 min	87 kJ/mol

5.3.5. Zusammenfassung: Startpunkt der Isomerisierung

In wässriger Lösung ist die PPII Helix eindeutig die stabilere Struktur. Nur mit einem hohen n-PrOH Anteil gelingt es, die PPI Helix auszubilden. Wie sowohl thermodynamische und kinetische Messungen belegen, ist diese Umwandlung zur PPI Helix begünstigt, wenn *s-cis* favorisierenden (4*S*)Azp Einheiten am C-Terminus eingebaut werden. Sind diese am C-Terminus positioniert, ist ihr Einfluss auf die Gleichgewichtslage und die Umwandlungsgeschwindigkeit klar stärker, als wenn die vier Einheiten am N-Terminus oder in der Mitte des Peptids eingebaut werden. Dies unterstützt die These, dass bei einer Umwandlung von einer PPII in eine PPI Konformation die *s-cis:s-trans* Isomerisierungen vom C-Terminus ausgehen. Der Einfluss auf jene Amidbindungen die zuerst isomerisieren, wird sich stärker bemerkbar machen. Interessanterweise reicht aber eine einzelne (4*S*)Azp Aminosäure am C-Terminus nicht aus um einen Unterschied zu erkennen.

Die Untersuchungen haben im Weiteren gezeigt, dass eine sekundäre Amidbindung C-terminal zu Oligoprolinen das Ausbilden einer PPI Helix stark einschränkt. Um eine PPI Helix auszubilden, sollte die negative Ladung der C-terminalen Carbonsäure direkt an einem Prolin Derivat positioniert sein.

5.4. Einfluss der Kettenlänge

Ab initio Rechnungen von Dr. Sabine Schweizer und Prof. Christian Ochsenfeld zeigen, dass die PPI Konformation mit zunehmender Kettenlänge mehr und mehr bevorzugt wird.¹⁵² Bereits in Kapitel 4.1 wurde darauf hingewiesen, dass für die Serie Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]_n-OH, n=2-6 (**12R**, **36R-19R**) die PPI Helix erst ab 9 Aminosäuren deutlich ausgebildet ist, während die Zunahme der Intensität des CD-Signals pro Aminosäure in Puffer mit zunehmender Kettenlänge gering ist. Dies entspricht auch der Beobachtung für die reinen Oligoprolin Peptide Ac-Pro_n-OH, n=6, 9, 12, 15, 18 (Peptide **40**, **9**, **51**, **61**, **10**) und wurde bereits von Rothe und Mitarbeitern²⁰³ für Oligoproline mit bis zu 40 Einheiten beschrieben mit der Aussage, dass ab 15-20 Einheiten das PPII CD-Signal von Polyprolin erreicht wird. Vermutlich kommt diese Zunahme im CD Signal daher zustande, dass endständige Prolin Einheiten, die eine gewisse Flexibilität aufweisen, mit zunehmender Kettenlänge weniger ins Gewicht fallen.⁷³

Abbildung 51 fasst die Kettenlängenabhängigkeit für Oligoproline von 6-18 Einheiten im Lösungsmittelgemisch n-PrOH/Phosphat Puffer zusammen. Das CD-Signal bei 213 nm (Maximum der PPI Konformation) ist in Abhängigkeit des Anteils n-PrOH in Puffer dargestellt. Für beide Serien Ac-Pro_n-OH (n=6, 9, 12 und 18) und H-Pro_n-OH (n=6, 12, 18) begünstigen längere Kettenlängen das Ausbilden einer PPI Konformation bei hohem Anteil n-PrOH.

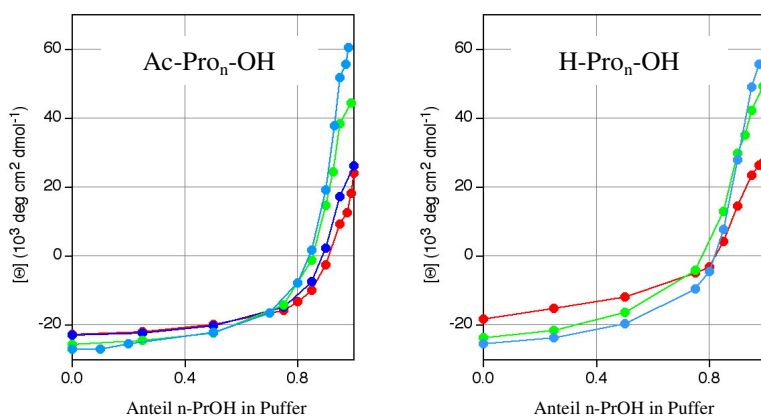


Abbildung 51: Lösungsmittel induzierte Umwandlung der beiden helicalen Konformationen PPI/PPII für Ac-Pro_n-OH (links) und H-Pro_n-OH (rechts) mit n=6 (●, **40** bzw. **55**), n=9 (●, **9**), n=12 (●, **51** bzw. **52**) und n=18 (●, **10** bzw. **62**). Das CD-Signal bei 213 nm ist gegen den Anteil n-PrOH in Phosphat Puffer (10 mM, pH=7.2) aufgetragen. Die Konzentrationen lagen bei $6 \cdot 10^{-4}$ M pro Aminosäure Einheit.

Es zeigt sich damit für diese relativ kurzen Kettenlängen eine Abhängigkeit wie sie für Polyproline mit mittleren Kettenlängen bis zu 217 Einheiten von J. Engel und G. Schwarz im Lösungsmittelgemisch n-BuOH/Benzylalkohol aufgrund von polarimetrischen Messungen beschrieben wurde²²⁰ und stützt die eingangs beschriebenen ab initio Rechnungen.

Für die Peptide H-Pro₆-OH (**55**), H-Pro₁₂-OH (**52**) und H-Pro₁₈-OH (**62**) wurde über die in Kapitel 5.2 eingeführte kinetische Hysterese ΔH° , ΔS° , und die Aktivierungsenergie (E_a) im Lösungsmittelgemisch n-PrOH/Phosphat Puffer 9:1 bestimmt (Tabelle 16). Für die Umwandlung PPI \rightarrow PPII ergibt sich überraschenderweise eine Abnahme der Enthalpie ΔH° mit der Kettenlänge. Möglicherweise trägt dazu die Coulomb-Energie bei, die benötigt wird um die terminalen Ladungen weiter voneinander zu entfernen. Hierfür muss bei einem 6-mer deutlich mehr Energie aufgewendet werden als für das 12- bzw. das 18-mer. Da auch die Reaktionsentropie mit zunehmender Kettenlänge unter diesen Bedingungen abnimmt, ergeben sich nur geringe Unterschiede in ΔG° , die im Bereich des Fehlers liegen.

Tabelle 16: ΔH° , ΔS° und E_a für die thermische Umwandlung der Peptide **63**, **52** und **62** im Lösungsmittelgemisch n-PrOH/Phosphat Puffer 9:1 bestimmt mittels kinetischer Hysterese.

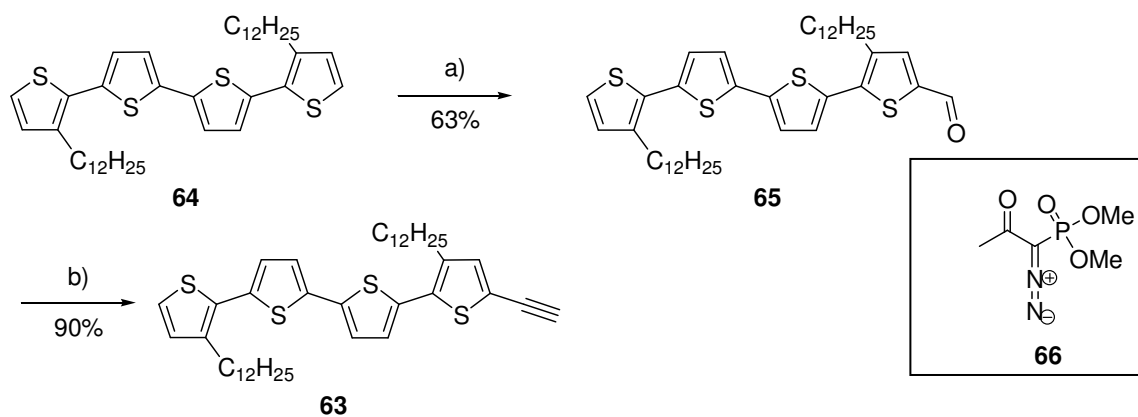
Peptid		ΔH°	ΔS°	E_a
H-Pro ₆ -OH	55	62 kJ/mol	188 Jmol ⁻¹ K ⁻¹	108 kJ/mol
H-Pro ₁₂ -OH	52	53 kJ/mol	162 Jmol ⁻¹ K ⁻¹	99 kJ/mol
H-Pro ₁₈ -OH	62	48 kJ/mol	150 Jmol ⁻¹ K ⁻¹	92 kJ/mol

6. Kontrolle der Superstruktur eines chiralen organischen Halbleiters mit einer einzelnen Aminosäure

In diesem Kapitel werden Prolinderivate untersucht, die durch eine „Click“ Reaktion mit einem Quaterthiophen Rest funktionalisiert wurden. Oligo- und Polythiophene gehören zu den am häufigsten verwendeten Systemen für organisch elektronische Anwendungen. Sie bilden die aktiven Komponenten von organischen Leuchtdioden, Solarzellen und Transistoren.^{227,228} In Zusammenarbeit mit Eva Schillinger und Prof. Peter Bäuerle von der Universität Ulm wurde versucht diese Eigenschaften mit der Organisationsfähigkeit von Peptiden zu verbinden. Die Organisation von organischen (Halb-) Leitern auf einer Oberfläche ist entscheidend für die physikalischen Eigenschaften und damit die Leistung von nanoelektronischen Einheiten.²²⁹ Chirale Überstrukturen von Oligo- und Polythiophenen mit chiralen Substituenten sind bereits beschrieben worden²³⁰⁻²³⁴, allerdings nie in Verbindung mit einer einzelnen Aminosäure. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Hybridmoleküle zeigten eine interessante Selbstorganisation.

6.1. Synthese der Hybridmoleküle

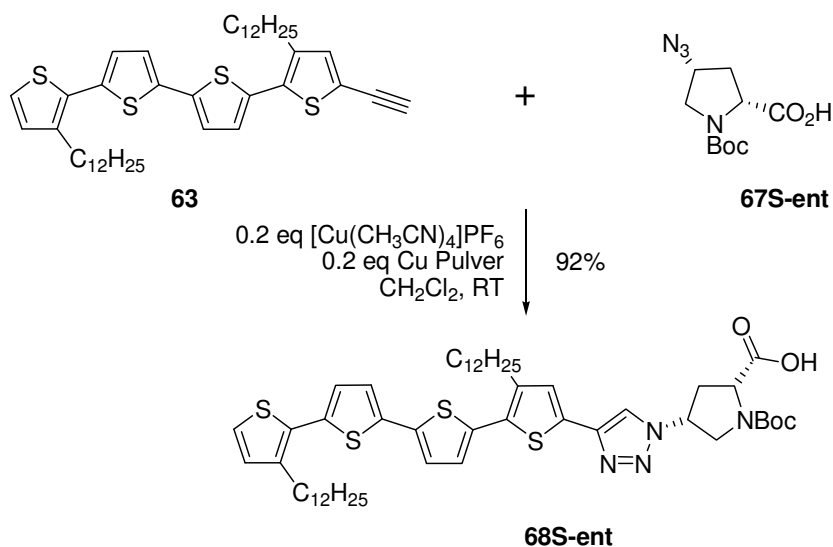
Nachdem in den bislang diskutierten „Click“ Reaktionen die Art der Alkin-Komponente eine untergeordnete Rolle beigemessen wurde und das Oligoprolin Rückgrat den Hauptteil der Konformation bestimmte, geht es nun darum über das Acetylen spezifische strukturelle Eigenschaften in das Molekül einzubauen, für Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften. Dafür wurde in Ulm eine Synthese für das Monoacetylen substituierte Quaterthiophen **63** entwickelt (Schema 14). Eine Vilsmeier-Haack Formylierung des symmetrisch Dodecyl-bifunktionalisierten Quaterthiophenes **64** führte zum Aldehyd **65**.



a) $POCl_3$ (1.5 eq), DMF (1.5 eq), 1,2-Dichlorethan, 1.5 h, RT ; b) **66** (10 eq), K_2CO_3 (18 eq), 20h, RT.

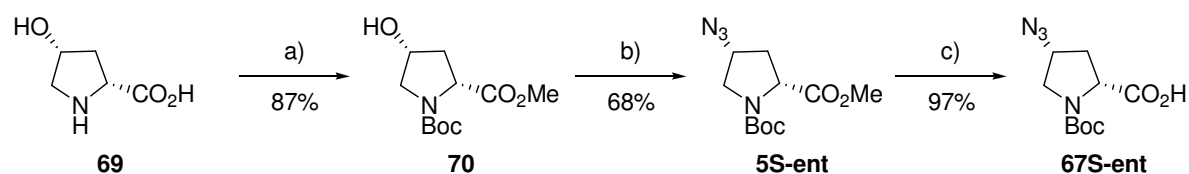
Schema 14: Synthese des Acetylens **63**.

Dieser wurde unter Ohira-Bestman Bedingungen^{235,236} in das Alkin **63** umgewandelt. Die Cycloaddition des Alkins **63** mit einem Boc-geschützten 4-Azidoprolin wurde in CH₂Cl₂ mit [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ und Kupfer Pulver als Katalysator durchgeführt. Für alle drei Prolinderivate Boc-(2*S*,4*S*)Azp-OH (**67S**), Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OH (**67S-ent**) und Boc-(2*S*,4*R*)Azp-OMe (**5R**) (hier wurde der Methylester nach der „Click“ Reaktion verseift) wurde das entsprechenden Triazol **68S**, **68S-ent** und **68R** in guten Ausbeuten synthetisiert (Schema 15).



Schema 15: „Click“ Reaktion zwischen Oligothiophen **63** und Azidoprolin **67S-ent** zum Quaterthiophen-Amiosäure Hybridmoleküle **68S-ent**.

Boc-(2*S*,4*S*)Azp-OH (**67S**) und Boc-(2*S*,4*R*)Azp-OMe (**5R**) wurden gemäss Schema 2 auf Seite 21 dargestellt. Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OH (**67S-ent**) das Enantiomer von **67S** wurde ausgehend vom kommerziell erhältlichen H-(2*R*,2*R*)Hyp-OH (**69**) synthetisiert (Schema 16). Mit Thionylchlorid in Methanol wurde die Carbonsäure verestert. Das sekundäre Amin wurde mit Boc-anhydrid geschützt um das Hydroxyprolinderivat **70** zu erhalten. Die Mitsunobu Reaktion und die Substitution mit NaN₃ wurden analog zur Synthese von Boc-(4*R*)Azp-OMe (**5R**) durchgeführt. Der Methylester **5S-ent** wurde basisch hydrolysiert.



a) i) SOCl₂ (2 eq), MeOH, 0 °C bis Rückfluss; ii) Boc₂O (1 eq), KHCO₃ (2.2 eq), H₂O, Dioxan, RT; b) i) CH₃SO₃H (1.2 eq), PPh₃ (1.8), DIAD (2 eq), NEt₃ (0.4), Toluol, 0 °C bis 70 °C; ii) NaN₃ (5 eq), DMF, 80 °C; c) NaOH (2.1 eq), H₂O, CH₃OH, THF, RT.

Schema 16: Synthese von Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OH (**67S-ent**).

6.2. Analyse der Aggregation

Oligothiophene sind bekannt für ihre Eigenschaften zur Selbstorganisation auf Oberflächen und in Lösung.²³⁰⁻²³⁴ Das Oligothiophen-Prolin Derivat **68S** zeigte in Lösung eine geordnete Selbstorganisation in chirale Überstrukturen. Das Molekül ist in organischen Lösungsmitteln löslich nicht aber in Wasser. Bisignate CD-Effekte wurden in Mischungen von n-PrOH und Wasser gefunden. In reinem n-PrOH zeigt die π - π^* Absorptionsbande des Quaterthiophen-Teils mit dem Absorptionsmaximum bei ≈ 390 nm kein CD-Signal. Das heisst links und rechts zirkular polarisiertes Licht wird vom molekular gelösten Molekül gleichermassen absorbiert. Durch die Zugabe von Wasser bilden sich Aggregationen, welche zu einer Interaktion der einzelnen Oligothiophen-Chromophore (exciton coupling) und damit zu einer Aufspaltung in einen positiven und negativen Cotton Effekt führen mit einem Nulldurchgang nahe dem Absorptionsmaximum im UV-Spektrum (Abbildung 52a). Am intensivsten sind die CD-Signale bei 5 vol/vol% n-PrOH in Wasser. Die Messungen wurden mit frisch hergestellten Lösungen ($70 \mu\text{M}$) aus einer Stammlösung in n-PrOH hergestellt. Das (2*S*,4*S*)-konfigurierte Quaterthiophen-Aminosäure Hybridmolekül **68S** zeigt ein Maximum bei einer Wellenlänge von 368 nm und einem Minimum bei 427 nm, was für eine linksgängig helicale Anordnung der Moleküle spricht.²³⁴ Verbindungen **68S** und das Enantiomer **68S-ent** zeigten zueinander spiegelbildliche bisignate CD-Effekte (Abbildung 52b), was beweist dass die induzierte Chiralität der Aggregate von der Stereochemie im Azidoprolin Molekülteil herrührt.

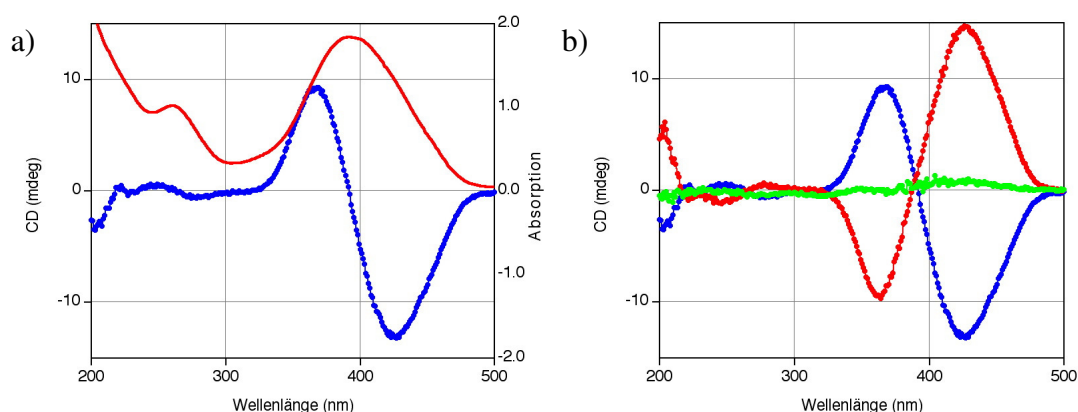


Abbildung 52: a) Absorptionsspektrum (rot) und CD-Spektrum (blau) des Quaterthiophen-Aminosäure Hybrids **68S**. b) CD-Spektren der 3 Diastereomere **68S** (blau), **68S-ent** (rot) und **68R** (grün). Die Spektren wurden in 5% vol/vol n-PrOH in Wasser bei einer Konzentration von $70 \mu\text{M}$ aufgenommen.

Das (2*S*,4*R*)-konfigurierte Epimer **68R** zeigte unter diesen Bedingungen kaum einen CD-Effekt, was bedeutet, dass beide Stereozentren für die Organisation entscheidend sind.

Der CD-Effekt bleibt erhalten, wenn anstelle von Wasser ein Phosphat Puffer mit einem pH Wert von 7.2 verwendet wird. Mit einem sauren Phosphat Puffer (pH = 2) hingegen nimmt das Signal stark ab, und nach einigen Stunden sammelt sich ein gelber Rückstand am Boden der Küvette. Das lässt darauf schliessen, dass die Carboxylat Funktion für die Aggregation/Löslichkeit wichtig ist.

Die Konzentrationsabhängigkeit wurde mittels UV und CD Spektroskopie im Bereich von 280-8.8 μM untersucht (CD: Abbildung 53a). Es zeigte sich näherungsweise ein linearer Zusammenhang. Das heisst, falls es eine kritische Konzentration für die Ausbildung der Aggregation gibt, liegt diese unter den gegebenen Bedingungen unterhalb von 8.8 μM .

Die Stabilität der Aggregate wurde über die Temperaturabhängigkeit des CD-Signals untersucht indem Spektren im Temperaturbereich von 10°C bis 90°C in Intervallen von 5°C aufgenommen wurden. Es ist eine Verringerung des CD-Effekts mit steigender Temperatur zu erkennen, aber auch bei 90°C sind noch chirale Aggregate vorhanden (Abbildung 53b).

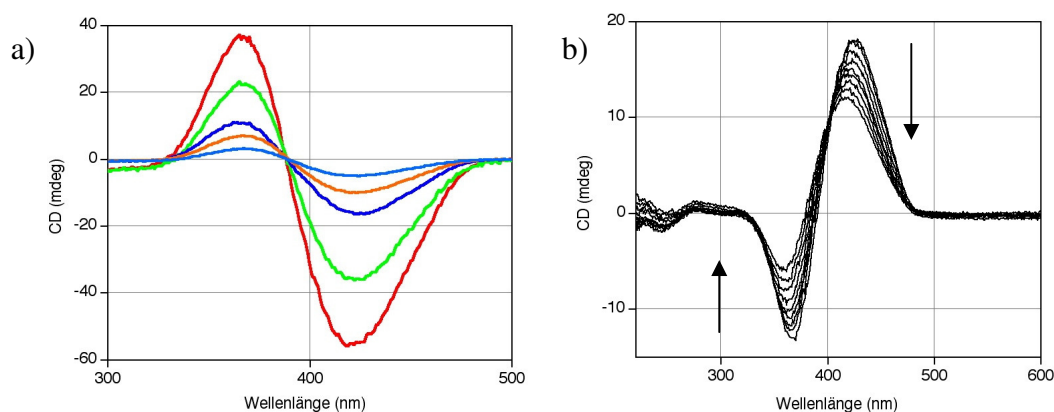


Abbildung 53: a) CD-Spektren des Quaterthiophen-Aminosäure Hybridmoleküles **68S** in 5 vol/vol% n-PrOH in Wasser bei der Konzentration von 280 μM , 140 μM , 70 μM , 35 μM und 17.7 μM . b) Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von **68S-ent** in 5 vol/vol% n-PrOH in Wasser (70 μM). Das Signal nimmt mit zunehmender Temperatur ab (Pfeile).

In Ulm zeigten erste AFM Untersuchungen der (2*S*,4*S*)-konfigurierten Verbindung **68S** linksgängige helicale Strukturen auf einer Mica Oberfläche. Eine Probe in Toluol wurde dazu durch spin coating auf die Oberfläche gebracht. Leider konnte für die enantiomere Verbindung **68S-ent** unter denselben Bedingungen keine helicale Struktur in den länglichen Aggregationen beobachtet werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit untersucht Einflüsse auf das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht von Prolylamidbindungen (Xaa-Pro), das für Oligoproline zu zwei helicalen Konformationen führt. (4*R*)-Azidoprolin Einheiten bevorzugen im Vergleich zu analogen Verbindungen mit dem unsubstituierten Prolin in monomeren Modellsystemen und kurzen Peptiden die *s-trans* Konformation, (4*S*)-Azidoproline hingegen führen zu einem tieferen Anteil der *s-trans* Konformation. Damit können diese beiden γ -substituierten Aminosäuren gezielt eingesetzt werden, um die Konformation von Peptiden zu beeinflussen. Insbesondere wurde gezeigt dass das Gleichgewichts der beiden helicalen Konformationen PPI (*s-cis* Amidbindungen) und PPII (*s-trans* Amidbindungen) von Oligoprolin Peptiden durch den Einbau von 4-Azidoprolin Einheiten kontrolliert werden kann. Über die Lösungsmittelabhängigkeit der helicalen Konformationen konnte mittels CD Spektroskopie gezeigt werden, dass der Einbau von (4*R*)-Azidoprolin Einheiten die PPII Helix stabilisiert, während (4*S*)-Azidoprolin Einheiten die PPII Helix relativ zur PPI Helix destabilisieren. Die Experimente legten damit auch nahe, dass $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkungen zwischen Amid Sauerstoffatomen und Carbonylgruppen der um eine Einheit Richtung C-Terminus liegenden Amidfunktionen zur Stabilität der PPII Sekundärstruktur beitragen.

Die beschriebenen Eigenschaften der 4-Azidoproline wurden genutzt, um zu zeigen, dass die Umwandlung von einer PPII helicalen Konformation in eine PPI Konformation mit der *s-cis:s-trans* Isomerisierung der C-terminalen Amidbindungen beginnt. Eine Variation der terminalen funktionellen Gruppen hat in Kombination mit ab initio Rechnungen¹⁵² aufgezeigt, wie Ladungen an den Termini die Stabilität der helicalen Konformationen beeinflusst. Anhand der Analyse der Temperaturabhängigkeit konnte erstmals ein kinetischer Hysterese Effekt für das Gleichgewicht zwischen der PPI und der PPII Helix beobachtet werden. Dies erlaubte thermodynamische Parameter der Umwandlung zu bestimmen²⁰⁰ und trug ebenfalls zu einem besseren Verständnis der Polyprolin II Konformation bei, die in der Natur vielfältige Aufgaben erfüllt.

Neben der strukturdirigierenden Wirkung bieten die Azidfunktionen die Möglichkeit einer weiteren Funktionalisierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, wie Azidfunktionen innerhalb der helicalen Oligoprolin Peptide über eine Reduktion oder eine Alkin-Azid „Click“ Reaktion als Angriffspunkt dienen können, um weitere funktionelle Gruppen einzuführen. Dieses Konzept, ein Oligoprolin Peptid als molekulares Gerüstmolekül mit 4-Azidoprolinen Einheiten als Andockstellen in einer definierten Geometrie zu verwenden, wird in Projekten

der Forschungsgruppe Wennemers weitergeführt. Vielversprechend gestalten sich Untersuchungen polykationischer Oligoproline als zellgängige Peptide.^{162,191} Weitere Ansätze nutzen das funktionalisierbare Polyprolin-Rückgrat zur kontrollierten Organisation von Silber- oder Gold-Nanopartikeln,²³⁷ beziehungsweise zur Entwicklung von multivalenten Tumor-Targeting-Vektoren, die Krebszellen markieren bzw. zur Therapie von Tumoren eingesetzt werden sollen.²³⁸ Erste Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften zeigten im Rahmen dieser Arbeit über die Konjugation mit Oligothiophenen eine interessante Selbstorganisation in Lösung bereits mit einer einzelnen Aminosäure Einheit. Dazu werden in Zukunft auch komplexere Strukturen mit mehreren Triazolylverknüpfungen in einem Molekül synthetisiert und auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

Um zu untersuchen, wie sich die Funktionalisierung auf die Konformation der Peptide auswirkt, wurden die entsprechenden γ -substituierten Prolinderivate in der Form ihrer acetylierten Methylester analysiert. Diese Modellsysteme trugen zu einem besseren Verständnis bei, wie die einzelnen Faktoren (gauche Effekt, Sterik, Ring Konformation, $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung) das *s-cis:s-trans* Verhältnis einer Prolylamidbindung (Xaa-Pro) beeinflussen. Insbesondere zeigte sich, dass eine C^γ -endo Pyrrolidin Ring Konformation eine $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion nicht ausschliesst. Im Gegenteil, mit einem Substituenten, der eine Wasserstoffbrücke zum Methylester Carbonyl ausbilden kann, wie beispielsweise ein acetyliertes Amin, ergänzt sich die intramolekulare H-Brücke ideal mit der $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion, was zu einem hohen *s-trans* Anteil führt.

Diese vielfältige Funktionalisierbarkeit der Azidfunktion eröffnet weitere Möglichkeiten Prozesse zu studieren, für die das *s-cis:s-trans* Gleichgewicht eine Bedeutung hat. Beispielsweise kann es interessant sein, peptidische Organokatalysatoren wie sie in der Forschungsgruppe Wennemers untersucht werden mit einem γ -substituierten Prolin Derivat zu modifizieren. Dies wurde im Rahmen einer Masterarbeit mit 4-Azidoprolin Einheiten in einem Tripeptid für die Katalyse einer Aldolreaktion bereits untersucht.²³⁹ Aufgrund der stabilisierenden Wirkung von (4*R*)-Hydroxyprolin Einheiten in natürlichem Collagen ist der Einfluss von γ -Substituenten an Prolin Einheiten von grossem Interesse. Eine Masterarbeit konnte bereits nachweisen, dass (4*R*)-Azidoprolin Einheiten die tripelhelicale Collagen Struktur in Modellpeptiden ähnlich stark stabilisieren wie das natürliche (4*R*)-Hydroxyprolin.¹⁷⁰ Mit den hier untersuchten γ -substituierten Prolinderivaten können weitere Einflüsse in Collagen Modellpeptiden untersucht werden und auch eine Quervernetzung der einzelnen PPII-artigen Peptidstränge über den Angriffspunkt an C^γ wird möglich, mit dem Ziel stabilere Strukturen zu erforschen.²⁴⁰

8. Experimenteller Teil

8.1. Allgemeine Bemerkungen

8.1.1. Geräte und Materialien

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker DPX 500, einem DPX 400 und einem av250 Spektrometer aufgenommen. Chemische Verschiebungen werden in ppm angegeben, für ^1H und ^{13}C -Spektren diente TMS oder das Lösungsmittelsignal als Referenz. Finnigan MAT LCQ und Bruker esquire 3000plus Geräte wurde für die Elektrosprayionisation (ESI) Massenspektrometrie verwendet. Für MALDI-TOF MS-Spektren wurde ein Applied Biosystems Voygaer-DE PRO Gerät verwendet. Elementaranalysen wurden von Dr. W. Kirsch (Universität Basel) mit einem Perkin-Elmer 240 Analyser durchgeführt. Hochaufgelöste Massen wurden auf einem Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II Instrument gemessen (MS Service UNI-Fribourg). HPLC-Analysen wurden mit einer LiChrospher 100 RP-18e $5\mu\text{m}$ (250mm x 4mm) Säule von Merck oder einer Sunfire RP-18e $3.5\mu\text{m}$ (150mm 4.6mm) von Waters durchgeführt und für die präparative Aufreinigung mittels HPLC wurde eine LiChrospher 100 RP-18e $5\mu\text{m}$ (250mm x 10mm) Säule verwendet. HPLC Lösung B bezeichnet 0.1% TFA in H_2O während der fehlende Anteil entsprechend aus Lösung A: CH_3CN besteht. Die CD-Spektren wurden mit einem Applied Biophysics Chirscan Spektrometer oder einem Aviv® Circular Dichroism Spektrometer Model 62A DC gemessen. UV-Vis-Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer Spektrometer (Lambda Bio 40) aufgenommen. Automatisierte Peptidsynthesen wurden mit einem Syro I Peptide Synthesizer von MultiSynTech durchgeführt. IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer 781 oder 1600 FTIR-Spektrometer aufgenommen. Röntgenstrukturanalysen wurden von M. Neuburger und Dr. S. Schaffner (Universität Basel) durchgeführt.

Lösungsmittel für Extraktionen und die Säulenchromatographie wurden vor dem Einsatz destilliert. Wasser für spektroskopische Messungen und die HPLC wurde über ein Barnstead Ultrapure Water System filtriert. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen hoher Qualität, wurden von Fluka, Aldrich, Iris Biotech und Acros bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Harze für die Festphasen Synthese wurden von Novabiochem (Merck Biosciences) bezogen. Die Aminosäuren wurden von Bachem bezogen. Reaktionen wurden

mittels Dünnschichtchromatographie auf Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ – Platten verfolgt. Die Verbindungen wurden mittels UV (254 nm) oder durch Anfärben mit KMnO₄ bzw. Ninhydrin detektiert. Flashchromatographien wurden mit Fluka oder Merck Kieselgel 60, Korngrösse 40-63µm durchgeführt.

8.1.2. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (1Å = 10 ⁻¹⁰ m)
abs	absolut
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Amp	4-Aminoprolin
Azp	4-Azidoprolin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	<i>tert</i> -Butyloxycarbonylanhydrid
Bn	Benzoyl
°C	Grad Celsius
CD	Zirkulardichroismus
D	Debye (Einheit des elektrischen Dipolmoments 1D = 3.34 * 10 ⁻³⁰ Cm)
d	Duplett (NMR)
Δ	Unterschied
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschicht Chromatographie
DFT	Dichtefunktionaltheorie
ΔH°	Änderung der Enthalpie unter Standard Bedingungen
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Deoxyribonucleinsäure
ε	Extinktionskoeffizient
E _a	Aktivierungsenergie
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid

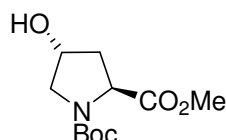
eq	Äquivalent
ESI-MS	Elektronsprayionisation Massenspektroskopie
EtOAc	Essigsäureethylester
EXSI	Exchange spectroscopy
Flp	4-Fluoroprolin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
ges.	gesättigt
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HATU	O-(7-Azabenotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chloro-1H-benotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	high resolution Massenspektroskopie
HV	Hochvakuum
Hyp	4-Hydroxyprolin
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
kJ	Kilojoule (10^3 J)
λ	Wellenlänge
M	Molar (mol/L)
M^+	Molekülkation
m	milli (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
Me	Methyl
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
Mop	4-Methoxyprolin
MsCl	Methansulfonylchlorid

m/z	Masse/Ladung
n	nano (10^{-9})
NaN ₃	Natriumazid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
NOE	nuclear overhauser enhancement
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
Pfp	Pentafluorphenol
PPI	Polyprolin Form I
PPII	Polyprolin Form II
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
R _f	Retentionsfaktor (DC)
Pro	Prolin
quant.	quantitative
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
t	Triplett (NMR)
t _R	Retentionszeit HPLC
Θ	mittlere molare Elliptizität
TFA	2,2,2-Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Xaa	beliebige Aminosäure

8.2. Synthese in Lösung

8.2.1. Synthese von Fmoc-Azp-OH (2)

Synthese von Boc-(4R)Hyp-OMe 4



39.9 g (173 mmol) Boc-Hyp-OH wurden in 95 ml MeOH gelöst und mit 31.1 g (95.5 mmol) Cs_2CO_3 in 20 ml Wasser versetzt. Nach 2 Minuten im Ultraschallbad wurde das Lösungsmittel entfernt und zehnmal mit Toluol und wenig MeOH co-evaporiert, bis ein Feststoff vorlag. Dieser wurde in 120 ml abs. DMF suspendiert und mit 21.4 ml (343 mmol) Methyljodid versetzt. Im Ultraschallbad wurde die überstehende Suspension gelblich und es bildete sich ein feinerer Niederschlag. Das Lösungsmittel wurde nach 1.5 Stunden im Ultraschallbad entfernt und der Rückstand in Et_2O aufgeschlemmt und über eine Glasfilterfritte filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser gewaschen und die H_2O -Phase achtmal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt 41.8 g eines gelblichen Feststoffs (171 mmol, entsprechend 99% der Theorie).

$R_f = 0.2$ (Pentan / EtOAc, 1:1, Ninhydrin).

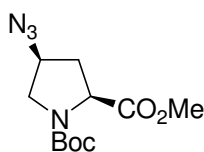
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:2.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.50 und 4.40 (2m, 2H; H_α , H_γ), 3.73 (s, 3H; OCH_3), 4.64 (m, 1H; H_δ), 3.56 (m, 1H; H_δ), 2.37-2.01 (m, 3H; H_β , OH), 1.41 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkonformers) = 3.45 (m, 1H; H_δ), 1.46 (s, 9H; *t*Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.6, 153.9, 80.4, 69.5, 57.9, 54.7, 52.1, 39.1, 28.3. (Nebenkonformer) = 173.4, 153.9, 80.3, 70.2, 57.5, 54.8, 52.3, 38.5, 28.4.

MS (ESI): m/z (%) = 268.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5$.

Synthese von Boc-(4*S*)Azp-OMe **5S**



20.2 g (82.4 mmol) Boc-Hyp-OMe (**4**) wurden in 200 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 13.6 ml (97.6 mmol) Et₃N versetzt. Nach 10 min wurde unter Eiskühlung langsam 7.6 ml (97.8 mmol) MsCl zugetropft. Nach 30 min wurde die Lösung gegen 200 ml und gegen 150 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Man erhielt 29 g (mmol) eines gelben Öls, welches in 200 ml DMF gelöst und mit 26.8 g (412 mmol) NaN₃ über Nacht bei 80 °C gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml Et₂O gelöst und gegen 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen (500 ml) wurden über Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und über Kieselgel filtriert (Pentan / EtOAc, 2:1→1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 21.3 g (78.8 mmol, 96% Ausbeute der Theorie) eines leicht gelben Öls.

R_f = 0.6 (Pentan / EtOAc, 1:1, Ninhydrin).

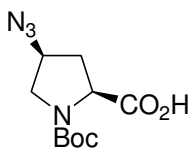
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 3:4.

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.33 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.4 Hz, 1H; H_α), 4.16 (m, 1H; H_γ), 3.76 (s, 3H; CH₃), 3.77-3.53 (m, 1H; H_δ), 3.54-3.44 (m, 1H; H_δ), 2.48(m, 1H; H_β), 2.16 (m, 1H; H_β), 1.42 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkongomeres) = 4.43 (dd, *J* = 9.0 Hz, 3.8 Hz, 1H; H_α), 1.48 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.2, 154.0, 80.5, 58.2, 57.7, 52.3, 50.7, 36.0, 28.2. (Nebenkongomer) = 171.9, 153.4, 80.5, 59.2, 57.3, 52.4, 51.2, 35.1, 28.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 293.0 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₁H₁₈N₄O₄.

Synthese von Boc-(4S)Azp-OH **67S**



20.9 g (77.5 mmol) Boc-(4S)Azp-OMe (**5S**) wurden in 60 ml THF gelöst und mit 60 ml MeOH verdünnt. Die Lösung wurde mit 6.20 g (155 mmol) NaOH, gelöst in ca. 50 ml H₂O, versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt wobei sich die Lösung trübte. Das Gemisch wurde mit 200 ml EtOAc und 150 ml 1M HCl-Lösung versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurden 19.8 g (77.5 mmol, quantitative Ausbeute) eines klaren Öls isoliert.

R_f = 0.6 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9:1, Ninhydrin).

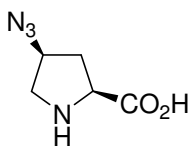
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.3.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.8 ppm (bs, 1H; COOH), 4.46 (m, 1H; H_α), 4.21 (m, 1H; H_γ), 3.62 (m, 1H; H_δ), 3.42 (m, 1H; H_δ), 2.54 (m, 1H; H_β), 2.39 (m, 1H, H_β), 1.49 (s, 9H; *t*Bu). (Nebenkonformer) = 8.8 ppm (bs, 1H; COOH), 4.36 (m, 1H; H_α), 4.21 (m, 1H; H_γ), 3.75 (m, 1H; H_δ), 3.53 (m, 1H; H_δ), 2.54 (m, 1H; H_β), 2.26 (m, 1H, H_β), 1.44 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 177.2, 155.5, 82.0, 59.1, 57.7, 51.8, 35.9, 28.2. (Nebenkonformer) δ = 174.6, 153.6, 81.0, 58.3, 57.6, 50.9, 36.8, 28.2.

MS (ESI, neg): *m/z* (%): 255.1 (100) [*M*-H]⁻, gerechnet für C₁₀H₁₆N₄O₄.

Synthese von HCl*H-(4S)Azp-OH 6S



19.8 g (77.5 mmol) Boc-(4S)Azp-OH (**67S**) wurden vorgelegt und in 380 ml 4 M HCl (1.52 mol) in Dioxan gelöst. Nach 2.5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ und wenig MeOH gelöst und mit Et₂O gefällt. Der isolierte und getrocknete weisse Feststoff machte 13.6 g (70.6 mmol, 91% Ausbeute der Theorie) aus.

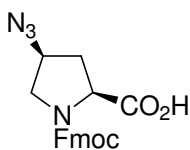
R_f = 0.1 (CH₃CN / H₂O, 4:1, Ninhydrin).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, 25°C): δ/ppm = 4.47 (m, 2H; H_γ, H_α), 3.42 (dd, *J* = 12.5 Hz, 5.0 Hz, 1H; H_δ), 3.35 (dd, *J* = 11.5 Hz, 5.6 Hz, 1H; H_δ), 2.56 (ddd, *J* = 14.6 Hz, 10.0 Hz, 5.5 Hz, 1H; H_β), 2.33 (ddt, *J* = 14.4 Hz, 3.9 Hz, 1.9 Hz, 1H; H_β).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm = 170.9, 60.7, 59.6, 52.1, 35.4.

MS (ESI): *m/z* (%): 157 (100) [M+H]⁺, gerechnet für C₅H₈N₄O₂.

Synthese von Fmoc-(4S)Azp-OH 2S



13.6 g (70.6 mmol) H-(4S)Azp-OH (**6S**) wurden in 90 ml Dioxan und 140 ml wässriger NaHCO₃-Lösung (176.5 mmol) gelöst. 22.0 g Fmoc-Cl (85.0 mmol) gelöst in insgesamt 70 ml Dioxan wurden zugegeben und die Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Vakuum wurde der grösste Teil des Dioxan entfernt. Der basische Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen, mit 1 M HCl sauer gestellt und mit EtOAc (3x100ml) extrahiert. Die vereinigten Esterphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittelvolumen wurde im Vakuum verkleinert, worauf das Produkt durch die Zugabe von Pentan ausgefällt werden konnte. Der filtrierte Feststoff wurde im Vakuum getrocknet, wobei 22.6 g (59.8 mmol, 85% Ausbeute der Theorie) eines weissen Feststoffs isoliert wurden.

$R_f = 0.2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$, 9:1, UV, Ninhydrin).

Analytische HPLC: $t_R = 14.6$ min; Gradient: 70% zu 10% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

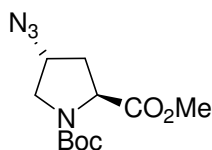
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 25°C): δ/ppm (Konformer a) 7.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H; Fmoc), 7.59 (m, 2H; Fmoc), 7.40 (m, 2H; Fmoc), 7.32 (m, 2H; Fmoc), 4.51-4.19 (m, 5H; Fmoc, $\text{H}\alpha$, $\text{H}\gamma$), 3.79 (dd, $J = 11.5$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 3.55 (dd, $J = 11.6$ Hz, 3.3 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 2.52 (m, 1H; $\text{H}\beta$), 2.32 (m, 1H, $\text{H}\beta$). (Konformer b) = 7.76 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H; Fmoc), 7.59 (m, 2H; Fmoc), 7.40 (m, 2H; Fmoc), 7.32 (m, 2H; Fmoc), 4.51-4.19 (m, 5H; Fmoc, $\text{H}\alpha$, $\text{H}\gamma$), 3.71 (dd, $J = 11.9$ Hz, 6.0 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 3.57 (dd, $J = 11.8$ Hz, 3.0 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 2.52 (m, 1H; $\text{H}\beta$), 2.32 (m, 1H, $\text{H}\beta$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO, 25°C): δ/ppm (beide Konformere) = 172.7, 172.3, 153.7, 153.7, 143.7, 143.6, 140.6, 140.5, 127.6, 127.1, 125.1, 120.1, 66.7, 66.3, 58.8, 58.0, 57.5, 57.2, 51.4, 50.7, 46.6, 46.5, 35.5, 35.4.

MS (ESI): m/z (%) = 423.3 $[\text{M-H}+2\text{Na}]^+$ (100), 823.4 $[\text{2M-2H}+3\text{Na}]^+$ (90), gerechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$.

Synthese von Boc-(4R)Azp-OMe **5R**



3.2 ml (49.3 mmol) Methansulfonsäure und 2.3 ml (16.5 mmol) NEt_3 wurden nacheinander zu einer Lösung von 19.3 g (73.6 mmol) PPh_3 in 40 ml trockenem Toluol gegeben. Die Lösung wurde mit einem Eisbad gekühlt und mit einer Suspension von 10 g (40.8 mmol) Boc-(4R)Hyp-OMe (**4**) in 50 ml trockenem Toluol versetzt. Es folgte die langsame Zugabe von 15.8 ml (81.5 mmol) DIAD. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde für 3 h auf 70°C erhitzt. Die Mischung wurde mit 200 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit 150 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde noch 2 Mal mit je 150 ml CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen aller leichtflüchtigen Komponenten im Vakuum, wurde das zurückbleibende

Öl in 100 ml DMF gelöst und mit 13.5 g (208 mmol) NaN_3 versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert, worauf 200 ml Et_2O zugegeben wurden und mit 200 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen wurde. Die wässrige Phase wurde noch 3 Mal mit 150 ml Et_2O rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Das Volumen der Lösung wurde im Vakuum verkleinert und durch die Zugabe von Pentan und Impfkristallen von Triphenylphosphinoxid konnte ein grosser Teil des Triphenylphosphinoxids durch Filtration entfernt werden. Anschliessend wurden alle leichtflüchtigen Anteile bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand durch eine Filtration über Kieselgel (Pentan / EtOAc, 4:1→3:1) gereinigt. Es wurden 11.1 g (41.0 mmol, 95% Ausbeute der Theorie) eines farblosen Öls isoliert.

Rf = 0.6 (Pentan / EtOAc, 1:1, Ninhydrin).

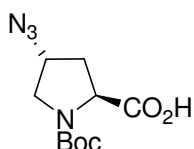
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.5.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 4.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H; $\text{H}\alpha$), 4.22-4.17 (m, 1H; $\text{H}\gamma$), 3.76-3.69 (m, 4H, OCH_3 ; $\text{H}\delta$), 3.60 (dd, $J = 11.3$ Hz, 3.3 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 2.38-2.27 (m, 1H; $\text{H}\beta$), 2.21-2.14 (m, 1H; $\text{H}\beta$), 1.42 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkonformers) = 4.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H; $\text{H}\alpha$), 3.46 (dd, $J = 11.6$ Hz, 2.0 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 1.47 (s, 9H; *t*Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 172.9, 153.3, 80.6, 58.7, 57.7, 52.1, 51.2, 36.2, 28.1. (Nebenkonformer) = 172.7, 153.9, 80.6, 59.2, 57.3, 52.3, 51.3, 35.3, 28.3.

MS (ESI): m/z (%): 293.0 (100) [$M+\text{Na}$] $^+$, gerechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$.

Synthese von Boc-(4*R*)Azp-OH **67R**



Boc-(4*R*)Azp-OH (**67R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Boc-(4*S*)Azp-OH (**67S**, Seite 109) synthetisiert. Ausgehend von 9.90 g (36.7 mmol) Boc-(4*R*)Azp-

OMe (**5R**) wurden 9.39 g (36.7 mmol, quantitative Ausbeute) eines leicht gelblichen Öls isoliert.

Rf = 0.6 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9:1, Ninhydrin).

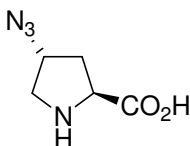
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (beide Konformere) = 9.2 (bs, 1H+1H; COOH), 4.43 (dd, *J* = 7.9 Hz, 6.4 Hz, 1H; Hα), 4.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H; Hα), 4.19 (m, 1H+1H; Hγ), 3.69 (dd, *J* = 11.6 Hz, 5.2 Hz, 1H; Hδ), 3.63 (dd, *J* = 11.5 Hz, 5.6 Hz, 1H; Hδ), 3.57 (dd, *J* = 11.6 Hz, 2.3 Hz, 1H; Hδ), 3.47 (dd, *J* = 11.5 Hz, 3.9 Hz, 1H; Hδ), 2.37 (m, 1H+1H; Hβ), 2.26 (m, 1H+1H; Hβ), 1.46 (s, 9H; *t*Bu), 1.41 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (beide Konformere) = 176.9, 174.7, 155.3, 153.5, 81.8, 81.1, 58.9, 58.7, 57.4, 57.3, 51.4, 51.2, 36.2, 34.6, 28.3, 28.1.

MS (ESI, neg): *m/z* (%): 255.3 (100) [*M*-H]⁻, gerechnet für C₁₀H₁₆N₄O₄.

Synthese von HCl*H-(4*R*)Azp-OH **6R**



18.7 g (73.0 mmol) Boc-(4*R*)Azp-OH (**67R**) wurden vorgelegt und in 365 ml 4 M HCl (1.46 mol) in Dioxan gelöst. Nach 2.5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ und wenig MeOH gelöst und mit Et₂O gefällt. Der isolierte Feststoff wurde getrocknet und die Fällung wurde noch 2 Mal wiederholt, worauf 8.66 g (45.0 mmol, 62% Ausbeute der Theorie) des weissen Feststoffs erhalten wurden.

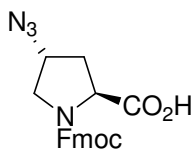
Rf = 0.1 (CH₃CN / H₂O, 4:1, Ninhydrin).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 25°C): δ/ppm = 4.36 (m, 1H; Hγ), 4.23 (dd, *J* = 10.0 Hz, 7.8 Hz; Hα), 3.46 (dd, *J* = 12.7 Hz, 5.4 Hz, 1H; Hδ), 3.20 (ddd, *J* = 12.7 Hz, 2.3 Hz, 1.5 Hz; Hδ), 2.34 (dddd, *J* = 14.0 Hz, 7.7 Hz, 2.5 Hz, 1.4 Hz; Hβ), 2.23 (ddd, *J* = 14.1 Hz, 9.9 Hz, 5.4 Hz, 1H; Hβ).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta/\text{ppm} = 168.7, 59.2, 57.8, 50.3, 34.4$.

MS (ESI): m/z (%): 157 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, gerechnet für $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$.

Synthese von Fmoc-(4R)Azp-OH **2R**



8.66 g (45.0 mmol) H-(4R)Azp-OH (**6R**) wurden in 50 ml THF gelöst und mit 100 ml einer 10%-igen NaHCO_3 -Lösung versetzt. 14.0 g Fmoc-Cl (54.1 mmol) gelöst in 55 ml THF wurden zugegeben. Nach 4 h rühren bei RT wurden nochmals 3.57 g (13.8 mmol) Fmoc-Cl zugegeben. Nachdem dann ein vollständiger Umsatz erreicht war, wurde die Mischung mit Wasser verdünnt, mit Et_2O gewaschen dann mit verdünnter Salzsäure sauer gestellt und mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Das zurückgebliebene Öl wurde in wenig CH_2Cl_2 gelöst und mit Pentan trituriert, bis ein leicht bräunlicher Feststoff vorlag (15.3 g, 40.5 mmol, 88 % der Theorie).

$R_f = 0.2$ (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1, UV, Ninhydrin).

Analytische HPLC(LiChrospher Säule): $t_R = 13.8$ min; Gradient: 70% zu 10% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:2.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H; Fmoc), 7.57 (m, 2H; Fmoc), 7.44-7.28 (m, 4H; Fmoc), 4.54-4.11 (m, 5H; Fmoc, $\text{H}\alpha$, $\text{H}\gamma$), 3.73-3.62 (m, 1H; $\text{H}\delta$), 3.55 (dd, $J = 11.3$ Hz, 3.6 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 2.45-2.17 (m, 2H, $\text{H}\beta$). (Nebenkonformer) = 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H; Fmoc), 7.57 (m, 2H; Fmoc), 7.44-7.28 (m, 4H; Fmoc), 4.54-4.11 (m, 5H; Fmoc, $\text{H}\alpha$, $\text{H}\gamma$), 3.73-3.62 (m, 2H; $\text{H}\delta$), 2.45-2.17 (m, 2H, $\text{H}\beta$).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 175.0, 155.5, 143.5, 141.3, 127.8, 127.1, 124.9, 120.0, 68.1, 59.1, 57.9, 51.4, 47.0, 34.7. (Nebenkonformer) = 176.6, 154.2, 143.6, 141.3, 127.7, 127.0, 124.7, 119.9, 67.8, 58.4, 57.1, 51.8, 47.1, 36.3.

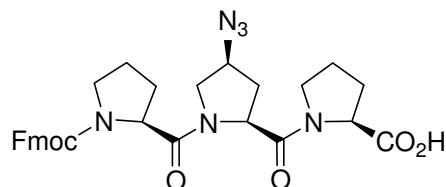
MS (ESI): m/z (%) = 401.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (25), 423.3 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ (65), 823.4 $[2\text{M}-2\text{H}+3\text{Na}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$.

8.2.2. Analytik von Fmoc-Pro-Azp-Pro-OH (7S) und (7R)

Die Synthese ist in der Diplomarbeit von Michael Kümin ausführlich beschrieben.¹⁴⁵

Nachfolgend ist die Analytik der beiden Bausteine nochmals angegeben:

Analytik von Fmoc-Pro (4S)Azp-Pro-OH 7S



R_f = 0.3 (CH₃CN / H₂O, 4:1, UV 254 nm, Ninhydrin).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:2.3

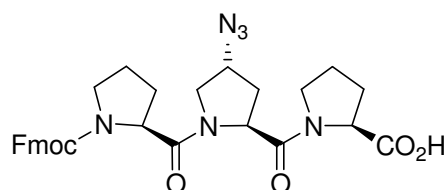
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.76 (m, 2H; Fmoc), 7.63-7.53 (m, 2H; Fmoc), 7.43-7.37 (m, 2H; Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H; Fmoc), 4.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H; Azp-H α), 4.62 (dd, *J* = 8.6 Hz, 3.2 Hz, 1H; Pro^C-H α), 4.52 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1H; Pro^N-H α), 4.35-4.30 (m, 2H; Fmoc), 4.26-4.20 (m, 3H; Fmoc, Azp-H γ , Azp-H δ), 3.76 (dd, 1H; Pro^C-H δ), 3.69 (m, 1H; Pro^N-H δ), 3.58-3.45 (m, 3H; Pro^N-H δ , Pro^C-H δ , Azp-H δ), 2.59 (m, 1H; Azp-H β), 2.30-1.70 (m, 9H; Pro^C-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H γ , Pro^C-H β , Pro^C-H γ , Azp-H β , Pro^C-H γ , Pro^N-H γ). (Nebenkonformer) = 7.76 (m, 2H; Fmoc), 7.63-7.53 (m, 2H; Fmoc), 7.43-7.37 (m, 2H; Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H; Fmoc), 4.59-5.54 (m, 2H; Fmoc, Pro^C-H α), 4.35 (m, 1H; Azp-H α), 4.15 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H; Fmoc), 4.00 (dd, *J* = 8.5 Hz, 3.2 Hz, 1H; Pro^N-H α), 3.92 (quintett, 1H; Azp-H γ), 3.70 (m, 1H; Pro^C-H δ), 3.58-3.45 (m, 2H; Pro^N-H δ , Pro^C-H δ), 3.45-3.36 (m, 2H; Pro^N-H δ , Azp-H δ), 3.21 (dd, *J* = 9.8 Hz, 8.0 Hz, 1H; Azp-H δ), 2.45 (m, 1H; Azp-H β), 2.30-1.70 (m, 9H; Pro^C-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H γ , Pro^C-H β , Pro^C-H γ , Azp-H β , Pro^C-H γ , Pro^N-H γ).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.5 (C=O), 171.2 (C=O), 171.0 (C=O), 155.1 (C=O), 144.1 und 143.9 (Fmoc), 141.3 und 141.3 (Fmoc), 127.7 (Fmoc), 127.1 (Fmoc), 125.2 und 125.1 (Fmoc), 120.0 (Fmoc), 67.6 (Fmoc), 59.5 (Pro^C-C α), 58.8 (Azp-C γ), 58.1 (Pro^N-C α), 56.7 (Azp-C α), 51.2 (Azp-C δ), 47.7, 47.2, 47.1 und 46.8 (Pro^N-C δ , Pro^C-C δ , Fmoc), 34.1 (Azp-C β), 29.0 (Pro^N-C β), 27.8 (Pro^C-C β), 25.0, 24.7 (Pro^C-C γ , Pro^N-C γ). (Nebenkonformer) = 173.5 (C=O), 171.2 (C=O), 171.0 (C=O), 155.1 (C=O), 144.6 und 143.7 (Fmoc), 141.4 und 141.1 (Fmoc), 127.8, 127.5, 127.2 und 126.8 (Fmoc, Fmoc),

124.9 und 124.8 (Fmoc), 119.7 (Fmoc), 65.6 (Fmoc), 59.4 (Pro^C-C α), 58.7 (Azp-C γ), 57.5 (Pro^N-C α), 56.4 (Azp-C α), 50.4 (Azp-C δ), 47.7, 47.2, 47.1 und 46.8 (Pro^N-C δ , Pro^C-C δ , Fmoc), 33.2 (Azp-C β), 29.6 (Pro^N-C β), 27.8 (Pro^C-C β), 25.0, 23.3 (Pro^C-C γ , Pro^N-C γ).

MS (ESI): $m/z = 595.0$ [M+Na]⁺ (74%), gerechnet für C₃₀H₃₂N₆O₆.

Analytik zu Fmoc-Pro-(4R)Azp-Pro-OH 7R



R_f = 0.3 (CH₃CN / H₂O, 4:1, UV 254 nm, Ninhydrin).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:2.3.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 7.76 (m, 2H; Fmoc), 7.57 (m, 2H; Fmoc), 7.39 (m, 2H; Fmoc), 7.30 (m, 2H; Fmoc), 4.82 (dd, $J = 7.9$ Hz, 5.8 Hz, 1H; Azp-H α), 4.59-4.46 (m, 4H; Pro^C-H α , CH₂-Fmoc, Pro^N-H α , Azp-H γ), 4.42-4.32 (m, 1H; CH₂-Fmoc), 4.25 (dd, $J = 7.3$ Hz, 7.3 Hz, 1H; Fmoc), 3.90 (dd, $J = 10.3$ Hz, 6.1 Hz, 1H; Azp-H δ), 3.87-3.75 (m, 2H; Pro^C-H δ , Azp-H δ), 3.69 (m, 1H; Pro^N-H δ), 3.60-3.50 (m, 2H; Pro^N-H δ , Pro^C-H δ), 2.99-1.82 (m, 10H; Azp-H β , Pro^C-H β , Azp-H β , Pro^C-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H γ , Pro^C-H γ , Pro^N-H γ , Pro^C-H γ , Pro^N-H β). (Nebenkonformer) = 7.76 (m, 2H; Fmoc), 7.57 (m, 2H; Fmoc), 7.39 (m, 2H; Fmoc), 7.30 (m, 2H; Fmoc), 4.59-4.46 (m, 2H; Azp-H α , Pro^C-H α), 4.39 (m, 1H; Azp-H γ), 4.42-4.32 (m, 2H; CH₂-Fmoc), 4.26-4.16 (m, 2H; Pro^N-H α , Fmoc), 3.79 (m, 1H), 3.69 (m, 1H; Azp-H δ), 3.6-3.45 (m, 3H; Pro^N-H δ , Pro^C-H δ), 3.19 (dd, $J = 10.4$ Hz, 5.3 Hz, 1H; Azp-H δ), 2.99-1.82 (m, 10H; Azp-H β , Pro^C-H β , Azp-H β , Pro^C-H β , Pro^N-H β , Pro^N-H γ , Pro^C-H γ , Pro^N-H γ , Pro^C-H γ , Pro^N-H β).

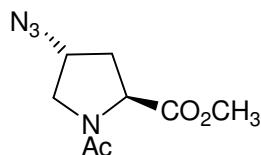
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 173.6 (C=O), 171.7 (C=O), 171.3 (C=O), 155.1 (C=O), 144.3 und 144.0 (Fmoc), 141.4 (Fmoc), 127.8 (Fmoc), 127.2, 127.2, 127.2 (Fmoc), 125.4 und 125.3 (Fmoc), 120.1 (Fmoc), 67.7 (CH₂-Fmoc), 59.8, 59.6 (Azp-C γ , Pro^C-C α), 58.3 (Pro^N-C α), 56.9 (Azp-C α), 51.7 (Azp-C δ), 47.7, 47.5, 47.4 und 46.9 (Pro^N-C δ , Pro^C-C δ , Fmoc), 33.7 (Azp-C β), 29.1, 28.2 (Pro^N-C β , Pro^C-C β), 25.1, 24.6, 23.3 (Pro^C-C γ , Pro^N-C γ). (Nebenkonformer) = 173.6 (C=O), 171.4 (C=O), 171.1 (C=O),

154.4 (C=O), 144.6 und 144.0 (Fmoc), 141.3 (Fmoc), 127.6 (Fmoc), 127.0 (Fmoc), 125.0 und 125.0 (Fmoc), 120.0 (Fmoc), 66.7 (Fmoc), 59.5 (Azp-C γ , Pro^C-C α), 57.8 (Pro^N-C α), 56.8 (Azp-C α), 51.2 (Azp-C δ), 47.7, 47.5, 47.4 und 46.9 (Pro^N-C δ , Pro^C-C δ , Fmoc), 33.6 (Azp-C β), 29.9, 28.1 (Pro^N-C β , Pro^C-C β), 25.1, 24.6, 23.3 (Pro^C-C γ , Pro^N-C γ).

MS (ESI): m/z = 571.1 [M-H]⁻ (100%), M = 372.2 g/mol gerechnet für C₃₀H₃₂N₆O₆.

8.2.3. Synthese von Ac-(4*S*)Azp-OMe (1*S*) und Ac-(4*R*)Azp-OMe (1*R*)

Synthese von Ac-(4*S*)Azp-OMe (1*S*)¹⁸¹



10.6 g (39.2 mmol) Boc-(4*S*)Azp-OMe (**5S**) wurden in 100 ml 4 M HCl (400 mmol) in Dioxan gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ und wenig MeOH gelöst und mit Et₂O gefällt. Der isolierte Feststoff (H-(4*S*)Azp-OMe) wurde in 30 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 16.2 ml (117 mmol) NEt₃ versetzt. Dazu wurden bei 0°C 7.4 ml (78 mmol) Ac₂O zugetropft. Nach 4 Stunden rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit 1 M HCl-Lösung verdünnt und mit EE (4 x 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum getrocknet. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung über Kiesegel (3% MeOH in CH₂Cl₂) wurden 7.21 g (34.0 mmol, 87% Ausbeute der Theorie) eines gelben Öls isoliert.

R_f = 0.5 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9:1, UV, Ninhydrin).

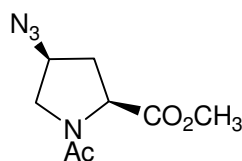
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:2.6.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.65 (dd, *J* = 9.6 Hz, 2.5 Hz, 1H; H α), 4.48 (m, 1H; H γ), 3.87 (dd, *J* = 11.8 Hz, 5.3 Hz, 1H; H δ), 3.78 (s, 3H; OCH₃), 3.68 (dt, *J* = 11.8 Hz, 1.6 Hz, 1H; H δ), 2.50-2.59 (m, 1H; H β), 2.31 (dm, *J* = 14.2 Hz, 1H; H β), 2.01 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.84 (dd, *J* = 6.9 Hz, 3.4 Hz, 1H; H α), 4.48 (m, 1H; H γ), 3.71 (s, 3H; OCH₃), 3.67 (dd, *J* = 13.1 Hz, 5.5 Hz, 1H; H δ), 3.53 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H; H δ), 2.50-2.59 (m, 2H; H β), 1.94 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 174.1, 173.7, 60.1, 57.9, 53.5, 53.3, 34.5, 21.7. (Nebenkonformer) = 174.4, 174.2, 59.6, 58.9, 53.8, 52.0, 36.1, 21.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 235.0 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₈H₁₂N₄O₃.

Synthese von Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**)¹⁸¹



Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) synthetisiert. Ausgehend von 10.6 g (39.2 mmol) Boc-(4*R*)Azp-OMe (**5R**) wurden 7.42 g Produkt (35.0 mmol, 89% Ausbeute der Theorie) als kristalliner Feststoff isoliert.

$R_f = 0.5$ (CH₂Cl₂ / MeOH, 9:1, UV, Ninhydrin).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:6.1.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 4.40 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H; H α), 4.35 (m, 1H; H γ), 3.77 (dd, $J = 11.7$ Hz, 4.9 Hz, 1H; H δ), 3.65 (s, 3H; OCH₃), 3.60 (ddd, $J = 11.7$ Hz, 2.4 Hz, 1.6 Hz, 1H; H δ), 2.37 (dddd, $J = 13.7$ Hz, 8.0 Hz, 3.3 Hz, 1.5 Hz, 1H; H β), 2.15 (ddd, $J = 13.7$ Hz, 8.5 Hz, 5.3 Hz, 1H; H β), 2.01 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.84 (dd, $J = 6.9$ Hz, 3.4 Hz, 1H; H α), 4.25 (m, 1H; H γ), 3.70 (s, 3H; OCH₃), 3.60 (m, 1H; H δ), 3.50 (dd, $J = 12.4$ Hz, 5.5 Hz, 1H; H δ), 2.46 (dddd, $J = 13.7$ Hz, 8.5 Hz, 4.6 Hz, 1.4 Hz, 1H; H β), 2.32 (m, 1H; H β), 1.89 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 174.5, 173.5, 60.2, 58.0, 53.5, 53.4, 36.7, 21.7. (Nebenkonformer) = 174.1, 174.1, 59.2, 58.5, 53.8, 51.5, 36.2, 21.1.

MS (ESI): m/z (%) = 235.0 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₈H₁₂N₄O₃.

8.2.4. Synthese der Triazole 13-20

Protokolle für die Click-Reaktion

A) mit CuSO₄, Natriumascorbat in H₂O/^tBuOH¹¹⁹

Die Azid-Komponente (0.15 mmol, 1 eq) wurde in 100 µl ^tBuOH gelöst und mit 200 µl H₂O versetzt. Nach der Zugabe von 3 eq der Alkin-Komponente und einer frisch vorbereiteten wässrigen 0.4 M Lösung CuSO₄ 5H₂O (0.1 eq) sowie einer 1 M Lösung von Natriumascorbat (0.2 eq) und wurde die Suspension für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 5 ml H₂O verdünnt und 4 Mal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt.

B) mit CuI in Toluol oder Acetonitril

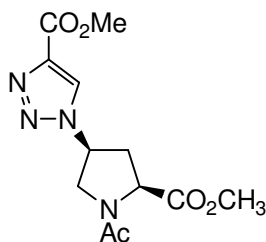
Die Azid-Komponente (0.15 mmol, 1 eq) wurde in Toluol oder CH₃CN vorgelegt und mit 0.1 eq CuI, 1 eq ⁱPr₂NEt und 2-3 eq des Alkins versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 10-24 h gut durchmischt und nachdem eine vollständiger Umsatz erreicht wurde mit 5 ml CH₂Cl₂ verdünnt, über PVP filtriert und 3 Mal mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und dann im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt.

C) mit [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ in CH₂Cl₂²⁴¹

Die Azid-Komponente (0.30 mmol, 1 eq) wurde in 2 ml CH₂Cl₂ vorgelegt und mit (1.5 eq) des Alkins versetzt. Anschliessend wurden 0.2 eq [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ und 0.2 eq Kupfer Pulver zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT gerührt (ca. 20h) und nachdem das Edukt vollständig umgesetzt war, mit halbkonzentriertem Ammoniak ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und dann im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel filtriert.

Analytik der Triazole 13-20

Synthese von Triazol **13S**



“Click” Reaktion nach Methode A.

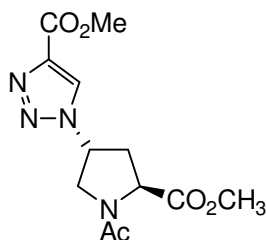
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.7 in D₂O.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.68 (s, 1H; Triazol), 5.43 (m, 1H; H γ), 4.72 (dd, J = 9.3 Hz, 4.1 Hz, 1H; H α), 4.36 (dd, J = 12.1 Hz, 4.2 Hz, 1H; H δ), 4.32 (dd, J = 12.1 Hz, 6.2 Hz, 1H; H δ), 3.92 (s, 3H; OCH₃ (Triazol)), 3.63 (s, 3H; OCH₃ (Pro)), 3.00 (ddd, J = 14.3 Hz, 9.4 Hz, 6.4 Hz, 1H; H β), 2.89 (dt, J = 14.3 Hz, 4.3 Hz, 1H; H β), 2.17 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 8.64 (s, 1H; Triazol), 5.38 (m, 1H; H γ), 4.98 (dd, J = 8.1 Hz, 3.1 Hz, 1H; H α), 4.20 (dd, J = 13.7 Hz, 2.9 Hz, 1H; H δ), 4.15 (dd, J = 13.9 Hz, 5.8 Hz, 1H; H δ), 3.92 (s, 3H; OCH₃ (Triazol)), 3.62 (s, 3H; OCH₃ (Pro)), 3.06 (m, 1H; H β), 3.06 (m, 1H; H β), 2.07 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.2, 172.9, 162.1, 139.2, 128.7, 59.4, 57.6, 53.0, 52.6, 52.3, 34.1, 21.3. (Nebenkonformer) = 174.0, 172.9, 162.0, 139.2, 128.7, 59.2, 58.5, 53.2, 52.6, 51.4, 35.8, 21.2.

MS (ESI): m/z (%) = 319.2 [M+Na]⁺ (10), 615.0 [2M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₂H₁₆N₄O₅.

Synthese von Triazol **13R**



“Click” Reaktion nach Methode A.

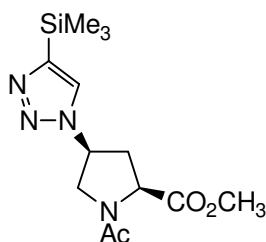
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:4.7 in D₂O.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.60 (s, 1H; Triazol), 5.51 (m, 1H; H γ), 4.74 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H; H α), 4.31 (dd, $J = 12.0$ Hz, 6.1 Hz, 1H; H δ), 4.17 (dd, $J = 11.9$ Hz, 3.4 Hz, 1H; H δ), 3.92 (s, 3H; OCH₃ (Triazol)), 3.79 (s, 3H; OCH₃ (Pro)), 2.91 (dddd, $J = 14.0$ Hz, 8.5 Hz, 4.3 Hz, 1 Hz, 1H; H β), 2.70 (dt, $J = 14.0$ Hz, 6.8 Hz, 1H; H β), 2.13 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 8.58 (s, 1H; Triazol), 5.44 (m, 1H; H γ), 5.05 (dd, $J = 8.8$ Hz, 5.2 Hz, 1H; H α), 4.11 (dd, $J = 13.1$ Hz, 4.0 Hz, 1H; H δ), 4.00 (dd, $J = 12.8$ Hz, 6.7 Hz, 1H; H δ), 3.92 (s, 3H; OCH₃ (Triazol)), 3.85 (s, 3H; OCH₃ (Pro)), 3.05 (dddd, $J = 14.5$ Hz, 8.9 Hz, 5.7 Hz, 1 Hz, 1H; H β), 2.90 (m, 1H; H β), 2.06 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.6, 173.0, 162.1, 139.0, 128.5, 59.6, 58.0, 53.2, 53.0, 52.6, 34.5, 21.3. (Nebenkonformer) = 173.6, 173.2, 162.1, 139.0, 128.4, 59.1, 58.0, 53.5, 53.5, 51.3, 34.9, 20.7.

MS (ESI): m/z (%) = 615.0 [2M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₂H₁₆N₄O₅.

Synthese von Triazol **14S**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH₃CN

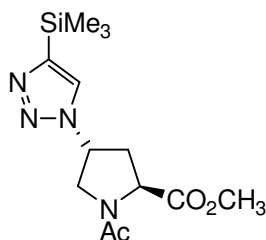
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.5 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.62 (s, 1H; Triazol), 5.26 (m, 1H; H γ), 4.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H; H α), 4.22 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.4 Hz, 1H; H δ), 4.02 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.7 Hz, 1H; H δ), 3.69 (s, 3H; OCH₃), 2.92 (dt, *J* = 13.3 Hz, 8.0 Hz, 1H; H β), 2.55 (dt, *J* = 13.4 Hz, 7.8 Hz, 1H; H β), 2.10 (s, 3H; Ac), 0.31 (s, 9H; (CH₃)₃Si). (Nebenkonformer) = 7.55 (s, 1H; Triazol), 5.15 (m, 1H; H γ), 4.55 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H; H α), 4.28 (dd, *J* = 13.1 Hz, 7.1 Hz, 1H; H δ), 3.98 (dd, *J* = 13.2 Hz, 4.2 Hz, 1H; H δ), 3.62 (s, 3H; OCH₃), 2.99-2.93 (m, 2H; H β), 2.01 (s, 3H; Ac), 0.30 (s, 9H; (CH₃)₃Si).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.4, 169.2, 147.2, 127.7, 57.3, 57.1, 52.5, 52.4, 37.1, 22.2, -1.26. (Nebenkonformer) = 171.0, 170.0, 146.8, 127.4, 58.5, 56.3, 52.8, 51.3, 34.9, 21.8, -1.26.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 311 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₃H₂₂N₄O₃Si.

Synthese von Triazol **14R**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH₃CN

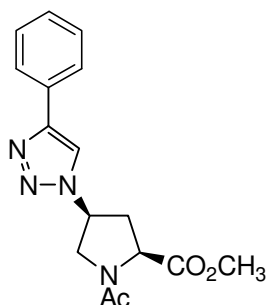
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.8 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.52 (s, 1H; Triazol), 5.35 (m, 1H; H_γ), 4.75 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_α), 4.22 (dd, *J* = 10.5 Hz, 7.0 Hz, 1H; H_δ), 4.03 (dd, *J* = 10.5 Hz, 6.0 Hz, 1H; H_δ), 3.77 (s, 3H; OCH₃), 2.82 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.5 Hz, 7.5 Hz, 1H; H_β), 2.55 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 6.6 Hz, 4.4 Hz, 1H; H_β), 2.10 (s, 3H; Ac), 0.31 (s, 9H, (CH₃)₃Si). (Nebenkonformer) = 7.52 (s, 1H; Triazol), 5.19 (m, 1H; H_γ), 4.76 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.8 Hz, 1H; H_α), 4.11 (dd, *J* = 12.5 Hz, 4.6 Hz, 1H; H_δ), 4.15 (dd, *J* = 12.6 Hz, 6.8 Hz, 1H; H_δ), 3.82 (s, 3H; OCH₃), 3.01 (dddd, *J* = 13.7 Hz, 8.6 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1 Hz, 1H; H_β), 2.69 (ddd, *J* = 13.4 Hz, 6.3 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H; H_β), 2.01 (s, 3H; Ac), 0.30 (s, 9H, (CH₃)₃Si).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.1, 169.3, 147.2, 127.9, 57.8, 57.3, 53.0, 52.7, 35.3, 22.2, -1.20. (Nebenkonformer) = 171.9, 169.7, 147.2, 127.7, 59.0, 56.6, 52.5, 51.8, 37.2, 21.6, -1.20.

MS (ESI): *m/z* (%) = 333.0 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₃H₂₂N₄O₃Si.

Synthese von Triazol **15S**



“Click” Reaktion nach Methode B in Toluol.

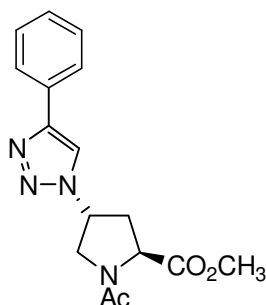
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.4 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.97 (s, 1H; Triazol), 7.81 (m, 2H; Arom), 7.44 (m, 2H; Arom), 7.34 (m, 1H; Arom), 5.30 (m, 1H; Hγ), 4.65 (dd, *J* = 8.8 Hz, 6.7 Hz, 1H; Hα), 4.25 (dd, *J* = 10.8 Hz, 7.3 Hz, 1H; Hδ), 4.12 (dd, *J* = 10.8 Hz, 7.1 Hz, 1H; Hδ), 3.72 (s, 3H; OCH₃), 2.97 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.6 Hz, 7.7 Hz, 1H; Hβ), 2.60 (dt, *J* = 13.6 Hz, 7.0 Hz, 1H; Hβ), 2.15 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.82 (s, 1H; Triazol), 7.81 (m, 2H; Arom), 7.44 (m, 2H; Arom), 7.34 (m, 1H; Arom), 5.18 (m, 1H; Hγ), 4.59 (dd, *J* = 8.9 Hz, 3.8 Hz, 1H; Hα), 4.32 (dd, *J* = 13.2 Hz, 7.0 Hz, 1H; Hδ), 4.09 (dd, *J* = 13.1 Hz, 4.1 Hz, 1H; Hδ), 3.66 (s, 3H; OCH₃), 3.08-2.00 (m, 2H; Hβ), 2.05 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.0, 169.7, 148.7, 130.5, 129.3, 128.9, 126.1, 118.8, 58.6, 57.7, 53.1, 52.9, 35.3, 22.7. (Nebenkonformer) = 171.6, 170.5, 148.5, 130.6, 129.3, 128.8, 126.1, 119.1, 59.0, 57.5, 53.4, 51.8, 37.3, 22.1.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 315.7 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₆H₁₈N₄O₃.

Synthese von Triazol **15R**



„Click“ Reaktion nach Methode B in Toluol.

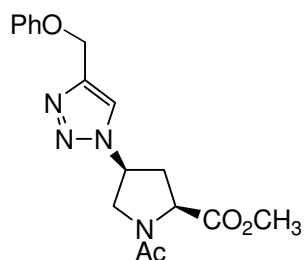
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.5 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.80 (m, 2H; Arom), 7.78 (s, 1H; Triazol), 7.43 (m, 2H; Arom), 7.36 (m, 1H; Arom), 5.37 (m, 1H; H_γ), 4.77 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_α), 4.26 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.0 Hz, 1H; H_δ), 4.07 (dd, *J* = 10.4 Hz, 5.6 Hz, 1H; H_δ), 3.78 (s, 3H; OCH₃), 2.86 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.8 Hz, 7.6 Hz, 1H; H_β), 2.60 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.7 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_β), 2.12 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.82 (m, 2H; Arom), 7.80 (s, 1H; Triazol), 7.43 (m, 2H; Arom), 7.36 (m, 1H; Arom), 5.23 (m, 1H; H_γ), 4.75 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.1 Hz, 1H; H_α), 4.20 (ddd, *J* = 12.6 Hz, 4.7 Hz, 1.0 Hz, 1H; H_δ), 4.04 (dd, *J* = 12.6 Hz, 6.6 Hz, 1H; H_δ), 3.83 (s, 3H; OCH₃), 3.17 (dddd, *J* = 13.7 Hz, 8.6 Hz, 6.1 Hz, 1.0 Hz, 1H; H_β), 2.73 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.6 Hz, 5.1 Hz, 1H; H_β), 2.02 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.5, 170.0, 148.7, 129.4, 129.3, 129.0, 126.2, 118.9, 58.8, 57.8, 53.1, 52.9, 35.5, 22.6. (Nebenkonformer) = 172.3, 170.2, 148.7, 130.4, 129.3, 128.8, 126.2, 119.0, 59.3, 57.7, 53.5, 52.0, 37.4, 22.1.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 315.6 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₆H₁₈N₄O₃.

Synthese von Triazol **16S**



“Click” Reaktion nach Methode B in Toluol.

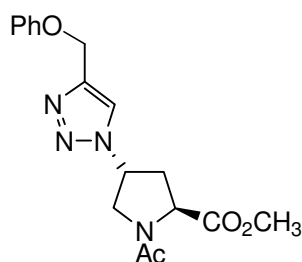
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.4 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.64 (s, 1H; Triazol), 7.32-7.25 (m, 2H; Arom), 7.00-6.94 (m, 3H; Arom), 5.23 (m, 1H; Hγ), 5.20 (s, 2H; CH₂), 4.64 (dd, *J* = 8.5 Hz, 7.2 Hz, 1H; Hα), 4.23 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hδ), 4.07 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hδ), 3.71 (s, 3H; OCH₃), 2.94 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 8.5 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hβ), 2.56 (dt, *J* = 13.6 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hβ), 2.13 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.69 (s, 1H; Triazol), 7.32-7.25 (m, 2H; Arom), 7.00-6.94 (m, 3H; Arom), 5.18 (s, 2H; CH₂), 5.12 (m, 1H; Hγ), 4.56 (dd, *J* = 9.0 Hz, 3.8 Hz, 1H; Hα), 4.12 (dd, *J* = 13.2 Hz, 7.1 Hz, 1H; Hδ), 4.01 (dd, *J* = 13.2 Hz, 4.3 Hz, 1H; Hδ), 3.66 (s, 3H; OCH₃), 3.08-2.95 (m, 2H; Hβ), 2.03 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.8, 169.7, 158.5, 145.4, 130.0, 121.8, 121.8, 115.1, 62.2, 58.5, 57.6, 53.1, 52.8, 35.2, 22.7.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 345.7 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₄.

Synthese von Triazol **16R**



“Click” Reaktion nach Methode B in Toluol.

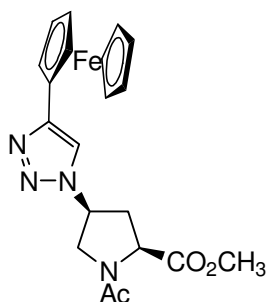
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.6 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.64 (s, 1H; Triazol), 7.32-7.27 (m, 2H; Arom), 7.00-6.94 (m, 3H; Arom), 5.32 (m, 1H; Hγ), 5.21 (s, 2H; CH₂), 4.74 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.4 Hz, 1H; Hα), 4.21 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.0 Hz, 1H; Hδ), 4.01 (dd, *J* = 10.5 Hz, 5.8 Hz, 1H; Hδ), 3.77 (s, 3H; OCH₃), 2.82 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 8.6 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hβ), 2.56 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 6.6 Hz, 4.4 Hz, 1H; Hβ), 2.10 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.63 (s, 1H; Triazol), 7.32-7.27 (m, 2H; Arom), 7.00-6.94 (m, 3H; Arom), 5.20 (m, 1H; Hγ), 5.20 (s, 2H; CH₂), 4.72 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.9 Hz, 1H; Hα), 4.12 (dd, *J* = 12.5 Hz, 4.3 Hz, 1H; Hδ), 4.01 (dd, *J* = 12.6 Hz, 6.6 Hz, 1H; Hδ), 3.80 (s, 3H; OCH₃), 3.10 (dddd, *J* = 13.4 Hz, 8.6 Hz, 5.0 Hz, 1.0 Hz, 1H; Hβ), 2.69 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.5 Hz, 5.0 Hz, 1H; Hβ), 2.01 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.5, 169.7, 158.5, 145.3, 130.0, 122.1, 121.8, 115.1, 62.2, 58.8, 57.7, 53.1, 52.9, 35.5, 22.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 367.6 [M+Na]⁺ (100), 711.4 [2M+Na]⁺, gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₄.

Synthese von Triazol **17S**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH₃CN.

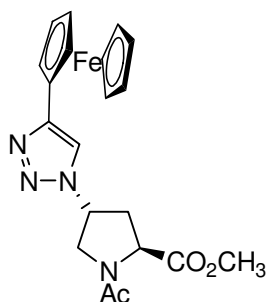
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.8 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.46 (s, 1H; Triazol), 5.32 (m, 1H; H γ), 4.77 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.4 Hz, 1H; H α), 4.71-4.67 (m, 2H; Arom), 4.31 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H; Arom), 4.24 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.0 Hz, 1H; H δ), 4.07 (s, 5H; Arom), 4.05 (dd, *J* = 10.6 Hz, 6.7 Hz, 1H; H δ), 3.79 (s, 3H; OCH₃), 2.84 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 8.6 Hz, 7.7 Hz, 1H; H β), 2.60 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 6.7 Hz, 4.4 Hz, 1H; H β), 2.17 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.46 (s, 1H; Triazol), 5.18 (m, 1H; H γ), 4.73 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.9 Hz, 1H; H α), 4.67-4.65 (m, 2H; Arom), 4.30 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H; Arom), 4.16 (dd, *J* = 12.2 Hz, 7.8 Hz, 1H; H δ), 4.07 (s, 5H; Arom), 4.04 (dd, *J* = 12.5 Hz, 6.7 Hz, 1H; H δ), 3.83 (s, 3H; OCH₃), 3.14 (dddd, *J* = 13.7 Hz, 8.5 Hz, 6.2 Hz, 1 Hz, 1H; H β), 2.72 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.5 Hz, 4.8 Hz, 1H; H β), 2.03 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.5, 169.8, 147.9, 118.1, 75.2, 70.0, 69.2, 67.1, 58.6, 57.7, 53.4, 52.8, 35.5, 22.6. (Nebenkonformer) = 172.3, 170.2, 147.8, 117.9, 75.3, 70.0, 69.2, 67.1, 59.3, 57.6, 53.1, 52.0, 37.3, 22.1.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 422.8 [M+H]⁺, gerechnet für C₂₀H₂₂FeN₄O₃.

Synthese von Triazol **17R**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH_3CN .

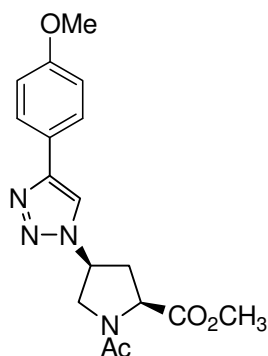
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:3.2 in CDCl_3 .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.11 (s, 1H; Triazol), 5.39 (m, 1H; $\text{H}\gamma$), 4.74-4.68 (m, 3H; $\text{H}\alpha$, Arom), 4.34-4.31 (m, 2H; Arom), 4.26 (dd, $J = 11.2$ Hz, 6.4 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 4.12 (dd, $J = 11.4$ Hz, 4.7 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 4.06 (s, 5H; Arom), 3.78 (s, 3H; OCH_3), 2.91 (dddd, $J = 13.6$ Hz, 8.6 Hz, 5.7 Hz, 1 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.62 (dt, $J = 13.6$ Hz, 6.2 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.11 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 8.08 (s, 1H; Triazol), 5.32 (m, 1H; $\text{H}\gamma$), 4.97 (dd, $J = 8.8$ Hz, 4.8 Hz, 1H; $\text{H}\alpha$), 4.74-4.68 (m, 2H; Arom), 4.34-4.31 (m, 2H; Arom), 4.07 (m, 1H; $\text{H}\delta$), 4.05 (s, 5H; Arom), 3.97 (dd, $J = 12.3$ Hz, 6.0 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 3.84 (s, 3H; OCH_3), 3.08 (dddd, $J = 13.8$ Hz, 8.7 Hz, 6.2 Hz, 1 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.81 (ddd, $J = 13.7$ Hz, 6.7 Hz, 4.8 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.04 (s, 3H; Ac).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD , 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.0, 169.6, 145.8, 118.3, 73.3, 68.0, 67.4, 65.2, 57.6, 56.6, 51.5, 50.5, 33.4, 19.5. (Nebenkonformer) = 170.7, 170.2, 145.8, 118.2, 72.9, 68.0, 67.4, 65.2, 57.9, 56.3, 51.0, 50.2, 34.8, 19.1.

MS (MALDI-TOF): $m/z = 422.8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FeN}_4\text{O}_3$.

Synthese von Triazol **18S**



“Click” Reaktion nach Methode B in Toluol.

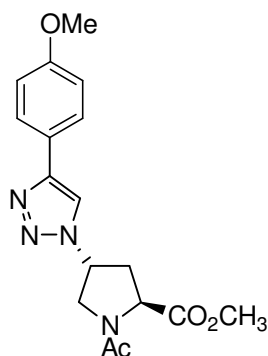
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.4 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.84 (s, 1H; Triazol), 7.77-7.71 (m, 2H; Arom), 6.99-6.94 (m, 2H; Arom), 5.31 (m, 1H; H_γ), 4.76 (dd, *J* = 8.8 Hz, 6.7 Hz, 1H; H_α), 4.26 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.4 Hz, 1H; H_δ), 4.11 (dd, *J* = 10.8 Hz, 7.2 Hz, 1H; H_δ), 3.85 (s, 3H; OCH₃), 3.74 (s, 3H; OCH₃), 3.11-2.94 (m, 1H; H_β), 2.58 (dt, *J* = 13.6 Hz, 7.4 Hz, 1H; H_β), 2.16 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.77-7.71 (m, 3H; Triazol, Arom), 6.99-6.94 (m, 2H; Arom), 5.18 (m, 1H; H_γ), 4.58 (dd, *J* = 9.0 Hz, 3.7 Hz, 1H; H_α), 4.33 (dd, *J* = 13.2 Hz, 7.1 Hz, 1H; H_δ), 4.09 (m, 1H; H_δ), 3.84 (s, 3H; OCH₃), 3.66 (s, 3H; OCH₃), 3.11-2.94 (m, 2H; H_β), 2.06 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.2, 169.0, 148.5, 130.4, 129.4, 129.1, 126.5, 118.4, 58.4, 57.7, 56.1, 53.1, 52.9, 35.3, 22.5. (Nebenkonformer) = 171.4, 170.3, 148.9, 130.6, 129.7, 128.4, 126.2, 119.1, 59.2, 57.6, 57.2, 53.3, 51.9, 37.1, 22.0.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 345.8 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₃.

Synthese von Triazol **18R**



“Click” Reaktion nach Methode B in Toluol.

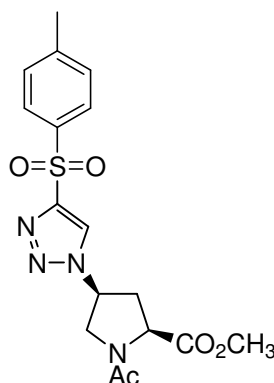
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.6 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.74-7.68 (m, 3H; Triazol, Arom), 6.97-6.92 (m, 2H; Arom), 5.35 (m, 1H; Hγ), 4.76 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.6 Hz, 1H; Hα), 4.23 (dd, *J* = 10.6 Hz, 6.9 Hz, 1H; Hδ), 4.04 (dd, *J* = 10.6 Hz, 5.7 Hz, 1H; Hδ), 3.83 (s, 3H; OCH₃), 3.77 (s, 3H; OCH₃), 2.84 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.7 Hz, 7.4 Hz, 1H; Hβ), 2.58 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 6.7 Hz, 4.6 Hz, 1H; Hβ), 2.10 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.74-7.68 (m, 3H; Triazol, Arom), 6.97-6.92 (m, 2H; Arom), 5.20 (m, 1H; Hγ), 4.75 (dd, *J* = 5.1 Hz, andere *J* überlagert, 1H; Hα), 4.17 (ddd, *J* = 12.5 Hz, 4.5 Hz, < 1Hz, 1H; Hδ), 4.02 (dd, *J* = 12.5 Hz, 6.6 Hz, 1H; Hδ), 3.82 (s, 3H; OCH₃), 3.82 (s, 3H; OCH₃), 3.14 (dddd, *J* = 13.6 Hz, 8.6 Hz, 6.0 Hz, 1.2 Hz, 1H; Hβ), 2.90 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 6.5 Hz, 5.0 Hz, 1H; Hβ), 2.01 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.5, 168.8, 160.2, 148.6, 127.5, 123.1, 118.1, 114.7, 58.8, 57.8, 55.7, 53.1, 52.9, 35.5, 22.6. (Nebenkonformer) = 172.3, 170.2, 160.2, 148.4, 127.5, 123.2, 118.2, 114.7, 59.3, 57.6, 55.7, 53.1, 52.0, 37.4, 22.1.

MS (MALDI-TOF): *m/z* = 345.8 [M+H]⁺, gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₃.

Synthese von Triazol **19S**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH₃CN.

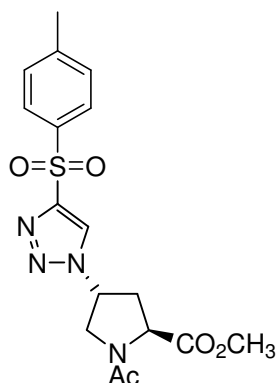
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.2 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.30 (s, 1H; Triazol), 7.96 (m, 2H; Arom), 7.35 (m, 2H; Arom), 5.27 (m, 1H; H_γ), 4.63 (dd, *J* = 8.9 Hz, 6.2 Hz, 1H; H_α), 4.23 (dd, *J* = 11.2 Hz, 7.3 Hz, 1H; H_δ), 4.08 (dd, *J* = 11.0 Hz, 6.5 Hz, 1H; H_δ), 3.64 (s, 3H; OCH₃), 2.94 (ddd, *J* = 13.8 Hz, 8.9 Hz, 7.4 Hz, 1H; H_β), 2.58 (dt, *J* = 13.8 Hz, 6.5 Hz, 1H; H_β), 2.42 (s, 3H; CH₃), 2.13 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 8.21 (s, 1H; Triazol), 7.96 (m, 2H; Arom), 7.36 (m, 2H; Arom), 5.18 (m, 1H; H_γ), 4.56 (dd, *J* = 8.7 Hz, 3.7 Hz, 1H; H_α), 4.29 (dd, *J* = 13.5 Hz, 7.0 Hz, 1H; H_δ), 4.03 (dd, *J* = 13.3 Hz, 3.7 Hz, 1H; H_δ), 3.57 (s, 3H; OCH₃), 3.05-2.97 (m, 2H; H_β), 2.43 (s, 3H; CH₃), 2.02 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.6, 169.7, 145.7, 137.3, 130.4, 128.6, 128.5, 125.6, 59.4, 56.6, 53.1, 52.6, 35.1, 22.7, 22.1.

MS (MALDI-TOF): = 394.6 [M+H]⁺, 416.7 [M+Na]⁺, gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₅S.

Synthese von Triazol **19R**



“Click” Reaktion nach Methode B in CH₃CN.

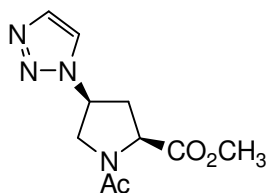
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.5 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.16 (s, 1H; Triazol), 7.99-7.94 (m, 2H; Arom), 7.38-7.33 (m, 2H; Arom), 5.34 (m, 1H; H_γ), 4.72 (dd, *J* = 8.7 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_α), 4.24 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.0 Hz, 1H; H_δ), 4.01 (dd, *J* = 10.8 Hz, 5.8 Hz, 1H; H_δ), 3.77 (s, 3H; OCH₃), 2.80 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.5 Hz, 7.7 Hz, 1H; H_β), 2.58 (ddd, *J* = 13.8 Hz, 6.7 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_β), 2.43 (s, 3H; CH₃), 2.10 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 8.14 (s, 1H; Triazol), 7.99-7.94 (m, 2H; Arom), 7.38-7.33 (m, 2H; Arom), 5.22 (m, 1H; H_γ), 4.71 (dd, *J* = 8.5 Hz, 5.0 Hz, 1H; H_α), 4.12 (ddd, *J* = 12.6 Hz, 4.5 Hz, 1.0 Hz, 1H; H_δ), 4.02 (m, 1H; H_δ), 3.82 (s, 3H; OCH₃), 3.04 (dddd, *J* = 14.1 Hz, 8.5 Hz, 5.8 Hz, 1.1 Hz, 1H; H_β), 2.72 (ddd, *J* = 13.7 Hz, 8.5 Hz, 7.7 Hz, 1H; H_β), 2.43 (s, 3H; CH₃), 2.01 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.3, 169.7, 145.8, 137.1, 130.5, 128.7, 128.6, 125.3, 59.6, 57.6, 53.2, 52.7, 35.4, 22.6, 22.1.

MS (ESI): *m/z* (%) = 415.2 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₇H₂₀N₄O₅S.

Synthese von Triazol **20S**



“Click” Reaktion nach Methode C.

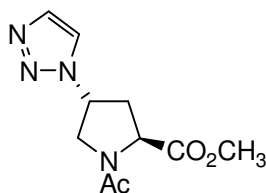
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.3 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.75 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H; Triazol), 7.71 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H; Triazol), 5.26 (m, 1H; Hγ), 4.67 (dd, *J* = 8.7 Hz, 6.9 Hz, 1H; Hα), 4.26 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.3 Hz, 1H; Hδ), 4.10 (dd, *J* = 10.7 Hz, 7.2 Hz, 1H; Hδ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 2.96 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 8.6 Hz, 7.8 Hz, 1H; Hβ), 2.55 (dt, *J* = 13.5 Hz, 7.3 Hz, 1H; Hβ), 2.15 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.71 (m, 1H; Triazol/COOH), 7.63 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H; Triazol/COOH), 5.15 (m, 1H; Hγ), 4.58 (dd, *J* = 9.1 Hz, 3.7 Hz, 1H; Hα), 4.33 (dd, *J* = 13.6 Hz, 7.3 Hz, 1H; Hδ), 4.10 (dd, *J* = 13.6 Hz, 3.9 Hz, 1H; Hδ), 3.68 (s, 3H; OCH₃), 2.94 (dt, *J* = 13.9 Hz, 3.7 Hz, 1H; Hβ), 3.00 (ddd, *J* = 13.9 Hz, 9.0 Hz, 6.8 Hz, 1H; Hβ), 2.04 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.5, 169.2, 134.3, 122.1, 57.9, 57.2, 52.6, 52.4, 34.9, 22.3. (Nebenkonformer) = 170.1, 170.0, 134.1, 122.4, 58.5, 56.9, 53.0, 51.3, 36.9, 21.8.

MS (ESI): *m/z* (%) = 261.1 [M+Na]⁺ (100), 499.2 [2M+Na]⁺, gerechnet für C₁₀H₁₄N₄O₃.

Synthese von Triazol **20R**



“Click” Reaktion nach Methode C.

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.9 in CDCl₃.

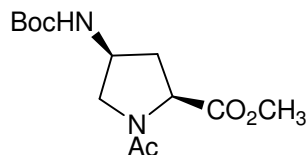
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.76 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H; Triazol), 7.58 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H; Triazol), 5.37 (m, 1H; Hγ), 4.77 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.3 Hz, 1H; Hα), 4.20 (dd, *J* = 10.6 Hz, 7.0 Hz, 1H; Hδ), 4.04 (dd, *J* = 10.4 Hz, 5.8 Hz, 1H; Hδ), 3.79 (s, 3H; OCH₃), 2.84 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 8.7 Hz, 7.9 Hz, 1H; Hβ), 2.58 (ddd, *J* = 13.5 Hz, 6.6 Hz, 4.3 Hz, 1H; Hβ), 2.12 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.73 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H; Triazol/COOH), 7.58 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H; Triazol/COOH), 5.22 (m, 1H; Hγ), 4.74 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.0 Hz, 1H; Hα), 4.15 (ddd, *J* = 12.8 Hz, 4.6 Hz, 1.0 Hz, 1H; Hδ), 4.02 (dd, *J* = 12.5 Hz, 6.5 Hz, 1H; Hδ), 3.84 (s, 3H; OCH₃), 3.01 (dddd, *J* = 13.7 Hz, 8.7 Hz, 5.9 Hz, 1.0 Hz, 1H; Hβ), 2.69 (ddd, *J* = 13.7 Hz, 6.5 Hz, 4.9 Hz, 1H; Hβ), 2.03 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.1, 169.3, 134.3, 122.5, 58.2, 57.3, 52.7, 52.5, 35.1, 22.2. (Nebenkonformer) = 171.8, 169.7, 134.3, 122.5, 58.8, 57.1, 53.0, 51.7, 37.0, 21.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 261.2[M+Na]⁺ (100), 499.2 [2M+Na]⁺, gerechnet für C₁₀H₁₄N₄O₃.

8.2.5. Synthese der Aminoprolinderivate 21-24

Synthese von Ac-[(4*S*)NHBoc-Pro]-OMe **21S**



200 mg (0.943 mmol) Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) wurden in 15 ml MeOH gelöst und mit 267 mg Boc_2O (1.23 mmol) und 60 mg Lindlar Katalysator (5% Pd auf CaCO_3 vergiftet mit Pb) versetzt. Die Suspension wurde für 7 h unter einer H_2 -Atomospäre bei Raumtemperatur gerührt und dann über Celite filtriert und mit MeOH gespült. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel gesäut (1-2% MeOH in CH_2Cl_2). **21S** wurde als farbloser Feststoff isoliert (225 mg, 0.894 mmol, 95% Ausbeute der Theorie).

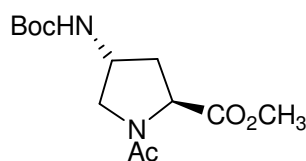
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:5.5 in CDCl_3 .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 5.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H; NH), 4.44 (dd, $J = 9.6$ Hz, 3.4 Hz, 1H; $\text{H}\alpha$), 4.39 (m, 1H; $\text{H}\gamma$), 3.78 (dd, $J = 10.6$ Hz, 6.0 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 3.75 (s, 3H; OCH_3), 3.48 (dd, $J = 10.6$ Hz, 2.2 Hz, 1H; $\text{H}\delta$), 2.25 (ddd, $J = 13.9$ Hz, 9.6 Hz, 6.5 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.06 (s, 3H; Ac), 1.90 (dt, $J = 13.8$ Hz, 3.4 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 1.42 (s, 9H; ^tBu). (Nebenkonformer) = 5.05 (bs, 1H; NH), 4.39 (m, 2H; $\text{H}\alpha$, $\text{H}\gamma$), 3.78 (s, 3H; OCH_3), 3.85-3.75 (m, 2H; $\text{H}\delta$), 2.60 (ddd, $J = 14.0$ Hz, 9.3 Hz, 6.0 Hz, 1H; $\text{H}\beta$), 2.26 (m, 1H; $\text{H}\beta$), 1.96 (s, 3H; Ac), 1.40 (s, 9H; ^tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.7, 169.5, 155.2, 79.8, 57.4, 54.6, 52.6, 50.3, 35.1, 28.3, 22.2. (Nebenkonformer) = 173.7, 169.8, 155.2, 79.8, 58.7, 52.8, 52.6, 50.3, 37.7, 30.9, 22.0.

MS (ESI): m/z (%) = 309 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$.

Synthese von Ac-[(4*R*)NHBoc-Pro]-OMe **21R**



Ac-[(4*R*)NHBoc-Pro]-OMe (**21R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-[(4*S*)NHBoc-Pro]-OMe (**21S**, Seite 137) synthetisiert. Ausgehend von 94 mg (0.44 mmol) Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) wurden 114 mg Produkt (0.40 mmol, 85% Ausbeute der Theorie) als farbloser Feststoff isoliert.

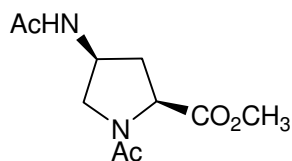
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:3.5 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.74 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H; NH), 4.53 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.3 Hz, 1H; H α), 4.35 (m, 1H; H γ), 3.91 (dd, *J* = 10.3 Hz, 6.3 Hz, 1H; H δ), 3.76 (s, 3H; OCH₃), 3.37 (dt, *J* = 10.1 Hz, 4.7 Hz, 1H; H δ), 2.23 (dt, *J* = 13.1 Hz, 5.8 Hz, 1H; H β), 2.13 (m, 1H; H β), 2.07 (s, 3H; Ac), 1.43 (s, 9H; ^tBu). (Nebenkonformer) = 4.66 (bs, 1H; NH), 4.44 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.3 Hz, 1H; H α), 4.35 (m, 1H; H γ), 3.80 (dd, *J* = 12.5 Hz, 6.6 Hz, 1H; H δ), 3.80 (s, 3H; OCH₃), 3.45 (dd, *J* = 12.1 Hz, 5.9 Hz, 1H; H δ), 2.43 (m, 1H; H β), 2.29 (m, 1H; H β), 1.96 (s, 3H; Ac), 1.43 (s, 9H; ^tBu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.2, 169.6, 155.1, 80.1, 57.1, 53.3, 52.4, 49.8, 35.1, 28.3, 22.2.

MS (ESI): *m/z* (%) = 309 [M+Na]⁺ (90), 595 [2M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₃H₂₂N₂O₅.

Synthese von Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe **22S**



45 mg (0.21 mmol) Ac-(4*S*)Azp-OMe (**1S**) wurden in 3 ml EtOAc gelöst und mit 40 μ l Ac₂O (0.43 mmol) und 3 mg Pd/C (10% Pd/C) versetzt. Nach starkem Rühren der Mischung unter H₂-Atmosphäre für 3,5 h wurde die Suspension über Celite filtriert und mit EtOAc und MeOH gespült. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel gesäult (5% MeOH in CH₂Cl₂). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man ein farbloses Öl (41 mg, 0.18 mmol, 85% Ausbeute der Theorie).

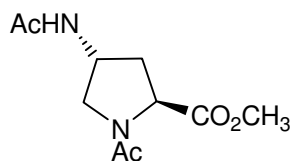
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:5.8 in CDCl₃.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 7.00 (d, J = 8.6 Hz, 1H; NH), 4.72 (m, 1H; H γ), 4.47 (dd, J = 10.0 Hz, 2.2 Hz, 1H; H α), 3.79 (dd, J = 10.7 Hz, J = 5.3 Hz, 1H; H δ), 3.79 (s, 3H; OCH₃), 3.54 (dm, J = 11.8 Hz, 1H; H δ), 2.47 (ddd, J = 14.2 Hz, 10.0 Hz, 6.2 Hz, 1H; H β), 1.96 (m, 1H; H β), 2.01 (s, 3H; Ac), 1.98 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 6.54 (d, J = 5.4 Hz, 1H; NH), 4.55 (m, 1H; H γ), 4.43 (dd, 1H, J = 9.5 Hz, 1.6 Hz, 1H; H α), 3.80 (s, 3H; OCH₃), 3.79 (m, 1H; H δ), 3.59 (dm, J = 12.6 Hz, 1H; H δ), 2.56 (ddd, J = 14.0 Hz, 9.6 Hz, 5.9 Hz, 1H; H β), 2.26 (m, 1H; H β), 1.99 (s, 3H; Ac), 1.94 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 174.4, 169.6, 169.5, 57.4, 54.5, 52.8, 48.7, 34.7, 23.2, 22.2. (Nebenkonformer) = 173.6, 169.8, 169.7, 58.6, 52.8, 52.4, 47.4, 37.4, 23.0, 22.0.

MS (ESI): m/z (%) = 251.7 [M+Na]⁺ (100), 479.1 [2M+Na]⁺ (20), gerechnet für C₁₀H₁₆N₂O₄.

Synthese von Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]-OMe **22R**



Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]-OMe (**22R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe (**22S**, Seite 139) synthetisiert. Ausgehend von 67 mg (0.32 mmol) Ac-(4*R*)Azp-OMe (**1R**) wurden 62 mg (0.27 mmol, 85% Ausbeute der Theorie) Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

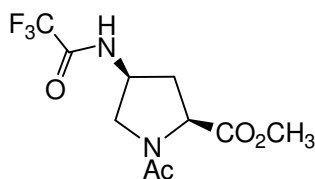
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:5.2 in CDCl₃.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; NH), 4.58 (m, 1H; Hγ), 4.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H; Hα), 3.87 (dd, *J* = 10.7 Hz, 5.6 Hz, 1H; Hδ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 3.48 (ddd, *J* = 10.6 Hz, 3.2 Hz, 1 Hz, 1H; Hδ), 2.27 (dddd, *J* = 13.4 Hz, 8.2 Hz, 4.5 Hz, 1 Hz, 1H; Hβ), 2.19 (ddd, *J* = 13.4 Hz, 7.3 Hz, 6.1 Hz, 1H; Hβ), 2.06 (s, 3H; Ac), 1.98 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 6.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; NH), 4.58 (m, 1H; Hγ), 4.48 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.5 Hz, 1H; Hα), 3.79 (m, 1H; Hδ), 3.79 (s, 3H; OCH₃), 3.52 (m, 1H; Hδ), 2.45 (ddd, *J* = 13.2 Hz, 6.2 Hz, 4.5 Hz, 1H; Hβ), 2.36 (ddd, *J* = 12.9 Hz, 8.0 Hz, 7.3 Hz 1H; Hβ), 1.99 (s, 3H; Ac), 1.98 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.1, 170.4, 169.8, 57.3, 53.7, 52.4, 49.0, 35.1, 22.9, 22.3. (Nebenkonformer) = 171.8, 170.4, 167.0, 58.9, 52.8, 50.7, 47.1, 37.3, 23.0, 21.7.

MS (ESI): *m/z* (%) = 251.1 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₀H₁₆N₂O₄.

Synthese von Ac-[(4*S*)NHCOCF₃-Pro]-OMe **23S**



62 mg (0.21 mmol) Ac-(4*S*)Amp-OMe•TFA (**24S**) wurden in 3 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst und mit 108 µl (0.63 mmol) *i*Pr₂NEt und 58 µl (0.42 mmol) TFA₂O versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde 3 ml einer 1 M HCl-Lösung zugegeben und die Mischung 3 Mal mit 8 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung wurden 46 mg **23S** (0.16 mmol, 78% Ausbeute der Theorie) als farbloses Öls isoliert.

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:5.3.

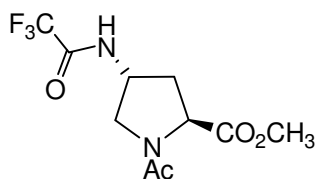
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H; NH), 4.80 (m, 1H; H_γ), 4.52 (dd, *J* = 9.9 Hz, 1.5 Hz, 1H; H_α), 3.82 (m, 1H; H_δ), 3.80 (s, 3H; OCH₃), 3.65 (dt, *J* = 12.4 Hz, 1.3 Hz, 1H; H_δ), 2.24 (ddd, *J* = 14.5 Hz, 9.9 Hz, 6.1 Hz, 1H; H_β), 2.17 (dq, *J* = 14.6 Hz, 1.3 Hz, 1H; H_β), 2.10 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.67 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H; NH), 4.68 (m, 1H; H_γ), 4.48 (dd, *J* = 9.5 Hz, 1.1 Hz, 1H; H_α), 3.82 (s, 3H; OCH₃), 3.9-3.7 (m, 2H; H_δ), 2.60 (ddd, *J* = 14.4 Hz, 9.5 Hz, 6.0 Hz, 1H; H_β), 2.33 (dq, *J* = 13.9 Hz, 1.3 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H; H_β), 2.02 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 175.1, 169.6, 156.6 (q, ²*J*_{CF} = 37 Hz), 115.7 (q, ¹*J*_{CF} = 287 Hz), 57.5, 54.5, 53.1, 49.6, 34.4, 22.2. (Nebenkonformer) = 58.6, 53.3, 52.7, 47.9, 36.9, 22.1.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = -77.4. (Nebenkonformer) = -77.4.

MS (ESI): *m/z* (%) = 305.1 [M+Na]⁺ (100), 586.9 [M+Na]⁺ (20), gerechnet für C₁₀H₁₃F₃N₂O₄.

Synthese von Ac-[(4*R*)NHCOCF₃-Pro]-OMe **23R**



Ac-[(4*R*)NHCOCF₃-Pro]-OMe (**23R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-[(4*S*)NHCOCF₃-Pro]-OMe (**23S**, Seite 140) synthetisiert. Ausgehend von 47 mg (0.16 mmol) Ac-(4*R*)Amp-OMe•TFA (**24R**) wurden 32 mg Produkt (0.11 mmol, 71% Ausbeute der Theorie) als farbloses Öl isoliert.

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:3.5 in CDCl₃.

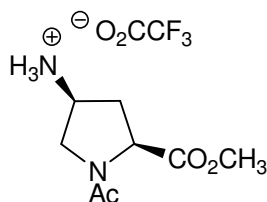
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 7.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H; NH), 4.65 (m, 1H; H_γ), 4.59 (dd, *J* = 7.9 Hz, 7.0 Hz, 1H; H_α), 3.82 (dd, *J* = 10.9 Hz, 5.9 Hz, 1H; H_δ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 3.54 (dd, *J* = 10.9 Hz, 3.5 Hz, 1H; H_δ), 2.37 (ddd, *J* = 13.3 Hz, 8.3 Hz, 4.8 Hz, 1H; H_β), 2.28 (dt, *J* = 13.4 Hz, 6.5 Hz, 1H; H_β), 2.05 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 7.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H; NH), 4.59 (m, 1H; H_γ), 4.53 (dd, *J* = 8.4 Hz, 4.2 Hz, 1H; H_α), 3.80 (s, 3H; OCH₃), 3.77 (dd, *J* = 13.1 Hz, 6.8 Hz, 1H; H_δ), 3.63 (dd, *J* = 12.4 Hz, 5.6 Hz, 1H; H_δ), 2.50 (ddd, *J* = 13.4 Hz, 6.6 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_β), 2.42 (m, 1H; H_β), 1.98 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.2, 170.4, 157.9 (q, ²*J*_{CF} = 38 Hz), 116.0 (q, ¹*J*_{CF} = 288 Hz), 57.7, 53.3, 53.0, 50.1, 34.9, 22.5. (Nebenkonformer) = 59.3, 53.4, 50.5, 48.2, 36.9, 22.0.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = -76.6. (Nebenkonformer) = -76.7.

MS (ESI): *m/z* (%) = 305.2 [M+Na]⁺ (100), 587.0 [M+Na]⁺ (40), gerechnet für C₁₀H₁₃F₃N₂O₄.

Synthese von Ac-(4S)Amp-OMe•TFA **24S**



290 mg (1.01 mmol) Ac-[(4S)NHBoc-Pro]-OMe (**21S**) wurden in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst, worauf 2 ml TFA bei 0°C zugetropft wurden. Die Eiskühlung wurde entfernt und die Lösung für 1 h weiter gerührt. Lösungsmittel und TFA wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl₃ gelöst um mit Et₂O gefällt, worauf 247 mg **24S** (0.823 mmol, 81% der Theorie) als weisser Feststoff isoliert wurden.

R_f = 0.2 (MeOH / CH₂Cl₂, 1:9, Ninhydrin).

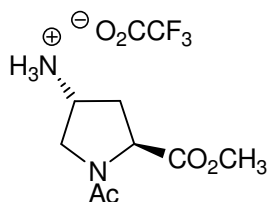
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:5.7 in D₂O.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.39 (dd, *J* = 9.1 Hz, 5.8 Hz, 1H; H_α), 4.01-3.94 (m, 2H; H_γ, H_δ), 3.71 (m, 1H; H_δ), 3.67 (s, 3H; OCH₃), 2.69 (ddd, *J* = 14.5 Hz, 9.0 Hz, 6.8 Hz, 1H; H_β), 2.07 (dt, *J* = 14.3 Hz, 5.6 Hz, 1H; H_β), 2.01 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.71 (dd, *J* = 9.5 Hz, 4.4 Hz, 1H; H_α), 4.01-3.90 (m, 2H; H_γ, H_δ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 3.45 (dd, *J* = 12.4 Hz, 4.9 Hz, 1H; H_δ), 2.81 (ddd, *J* = 14.6 Hz, 9.5 Hz, 7.4 Hz, 1H; H_β), 2.24 (dt, *J* = 14.6 Hz, 4.6 Hz, 1H; H_β), 1.92 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 174.8, 173.6, 58.1, 53.7, 51.3, 49.8, 32.6, 21.6. (Nebenkonformer) = 174.4, 175.0, 59.2, 54.1, 50.0, 48.3, 34.0, 21.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 187.0 [M+H]⁺ (100), 373.1 [2M+H]⁺ (20), gerechnet für C₈H₁₄N₂O₃.

Synthese von Ac-(4*R*)Amp-OMe•TFA **24R**



240 mg (0.839 mmol) Ac-[(4*R*)NHBoc-Pro]-OMe (**21R**) wurden in 2.5 ml CH₂Cl₂ gelöst, worauf 1.9 ml TFA bei 0°C zugetropft wurden. Die Eiskühlung wurde entfernt und die Lösung für 1 h weiter gerührt. Lösungsmittel und TFA wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl₃ gelöst um mit Et₂O gefällt, worauf 225 mg **24S** (0.750 mmol, 89% der Theorie) als weisser Schaums isoliert wurden.

R_f = 0.2 (MeOH / CH₂Cl₂, 1:9, Ninhydrin).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:3.5 in D₂O.

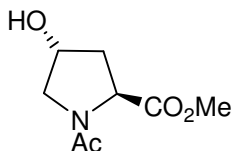
¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.53 (dd, *J* = 7.9 Hz, 7.2 Hz, 1H; H_α), 4.05-3.89 (m, 2H; H_γ, H_δ), 3.69 (m, 1H; H_δ), 3.65 (s, 3H; OCH₃), 2.33-2.42 (m, 2H; H_β), 2.03 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.80 (dd, *J* = 8.9 Hz, 4.1 Hz, 1H; H_α), 4.05-3.89 (m, 2H; H_γ, H_δ), 3.70 (s, 3H; OCH₃), 3.73-3.66 (m, 1H; H_δ), 2.56 (ddd, *J* = 14.0 Hz, 6.8 Hz, 4.2 Hz, 1H; H_β), 2.47 (ddd, *J* = 13.8 Hz, 8.8 Hz, 6.8 Hz, 1H; H_β), 1.92 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.7, 173.6, 57.6, 53.6, 51.3, 49.9, 32.8, 21.7. (Nebenkonformer) = 173.7, 173.5, 59.1, 53.9, 49.4, 48.2, 34.2, 21.2.

MS (ESI): *m/z* (%) = 187.0 [M+H]⁺ (100), 373.1 [2M+H]⁺ (40), gerechnet für C₈H₁₄N₂O₃.

8.2.6. Synthese der Hydroxyprolinderivate 25R, 25S und 27S

Synthese von Ac-(4R)Hyp-OMe 25R



4.02 g (23.2 mmol) Ac-(4R)Hyp-OH wurden in 50 ml MeOH gelöst. Bei 0°C wurden 2.5 ml (34 mmol) SOCl₂ zugetropft und anschliessend auf Rückfluss erhitzt für 15 Stunden. Die Lösung wurde eingengt und der Rückstand über Kieselgel gesäult mit 7% MeOH in CH₂Cl₂. Es wurden 1.72 g (9.18 mmol, 29% Ausbeute der Theorie) eines farblosen Öls isoliert.

R_f = 0.7 (MeOH / CH₂Cl₂, 1:9, KMnO₄).

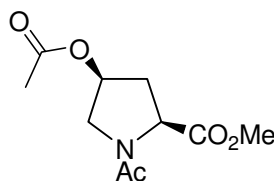
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:4.2 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.59-4.52 (m, 2H; H_γ, H_α), 3.78 (dd, *J* = 10.8 Hz, 4.5 Hz, 1H; H_δ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 3.50 (ddd, *J* = 10.8 Hz, 2.2 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H; H_δ), 2.77, (d, *J* = 3.4 Hz, 1H; OH), 2.28 (dddd, *J* = 13.1 Hz, 8.1 Hz, 3.4 Hz, 1.5 Hz, 1H; H_β), 2.09 (ddd, *J* = 13.0 Hz, 7.8 Hz, 4.8 Hz, 1H; H_β), 2.08 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) 4.59-4.52 (m, 1H; H_α), 4.48 (m, 1H; H_γ), 3.81 (dt, ²*J* überlagert, *J* = 2.3 Hz, 1H; H_δ), 3.78 (s, 3H; OCH₃), 3.53 (dd, ²*J* überlagert, *J* = 4.6 Hz, 1H; H_δ), 2.70 (bs, 1H; OH), 2.44 (dddd, *J* = 13.5 Hz, 8.3 Hz, 3.3 Hz, 2.0 Hz, 1H; H_β), 2.20 (ddd, *J* = 13.4 Hz, 7.2 Hz, 5.0 Hz, 1H; H_β), 1.96 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.9, 169.9, 70.2, 57.4, 55.8, 52.3, 38.0, 22.2. (Nebenkonformer) = 172.9, 169.9, 68.5, 58.7, 54.5, 52.7, 39.7, 21.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 210.0 [M+Na]⁺ (100), 397.0 [2M+Na]⁺ (30), gerechnet für C₈H₁₃NO₄.

Synthese von Ac-(4*S*)Hyp(OAc)-OMe **27S**



250 mg (1.34 mmol) Ac-(4*R*)Hyp-OMe (**25R**) und 697 mg (2.59 mmol) PPh₃ wurden in 5 ml THF gelöst und mit 517 µl DIAD (2.67 mmol) in 800 µl Toluol versetzt. Die gelbe Lösung wurde für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit 1 M HCl Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel teilweise im Vakuum entfernt worauf ein Grossteil des Triphenylphosphinoxids durch eine Kristallisation abgetrennt wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand über Kieselgel gesäult und 133 mg **27S** (580 µmol, 43% Ausbeute der Theorie) als farbloses Öl isoliert.

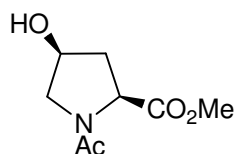
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:2.1 in CDCl₃.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 5.31-5.25 (m, 1H; H_γ), 4.70 (dd, *J* = 9.2 Hz, 2.9 Hz, 1H; H_α), 3.85 (dd, *J* = 11.7 Hz, 5.5 Hz, 1H; H_δ), 3.73 (s, 3H; OCH₃), 3.65 (ddd, *J* = 11.7 Hz, 2.9 Hz, 1.0 Hz, 1H; H_δ), 2.42 (ddd, *J* = 14.4 Hz, 9.3 Hz, 5.3 Hz, 1H; H_β), 2.31 (dtd, *J* = 14.2 Hz, 2.6 Hz, 0.9 Hz, 1H; H_β), 2.09 (s, 3H; Ac), 2.02 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 5.31-5.25 (m, 1H; H_γ), 4.47 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1.3 Hz, 1H; H_α), 3.80 (dd, *J* = 14.0 Hz, 5.3 Hz, 1H; H_δ), 3.78 (s, 3H; OCH₃), 3.66 (dt, *J* = 13.9 Hz, 1.0 Hz, 1H; H_δ), 2.55 (dq, *J* = 14.4 Hz, 1.5 Hz, 1H; H_β), 2.48 (ddd, *J* = 14.0 Hz, 8.9 Hz, 4.6 Hz, 1H; H_β), 2.04 (s, 3H; Ac), 1.97 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 23°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 171.4, 170.3, 169.4, 72.8, 56.9, 53.1, 52.3, 34.8, 22.2, 20.9. (Nebenkonformer) = 171.6, 169.9, 168.7, 71.4, 58.8, 52.6, 52.2, 37.0, 22.1, 20.8.

MS (ESI): *m/z* (%) = 252.2 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₀H₁₅NO₅.

Synthese von Ac-(4S)Hyp-OMe **25S**¹⁷¹



16 mg (70 μ mol) Ac-(4S)Hyp(OAc)-OMe (**27S**) wurden in 1 ml MeOH gelöst und mit 1 mg (7 μ mol) wasserfreiem K_2CO_3 versetzt. Die Mischung wurde 1h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit 4 % MeOH in CH_2Cl_2 über Kieselgel gesäult. 10 mg (53 μ mol, 76% Ausbeute der Theorie) eines farblosen Öls wurde isoliert.

$R_f = 0.7$ (MeOH / CH_2Cl_2 , 1:9, $KMnO_4$).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die tertiäre Amidbindung) im Verhältnis 1:4.7 in $CDCl_3$.

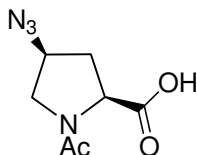
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 4.85 (dd, $J = 9.9$ Hz, 1.4 Hz, 1H; $H\alpha$), 4.81-4.74 (m, 1H; $H\gamma$), 3.80 (s, 3H; OCH_3), 3.74-3.65 (m, 3H; $H\delta$, $H\delta$, OH), 2.32 (ddd, $J = 14.4$ Hz, 9.9 Hz, 4.7 Hz, 1H; $H\beta$), 2.11 (ddd, $J = 14.3$ Hz, 2.9 Hz, 1.5 Hz, Hz, 1H; $H\beta$), 2.10 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.81-4.74 (m, 2H; $H\gamma$, $H\alpha$), 3.80 (s, 3H; OCH_3), 3.74-3.65 (m, 3H; $H\delta$, $H\delta$, OH), 2.38 (m, 1H; $H\beta$), 2.09 (m, 1H; $H\beta$), 2.03 (s, 3H; Ac).

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O , 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 175.2, 169.9, 71.4, 57.5, 56.5, 52.9, 37.1, 22.6. (Nebenkonformer) = 173.4, 170.1, 69.3, 58.9, 55.5, 52.9, 39.5, 22.1.

MS (ESI): m/z (%) = 209.9 $[M+Na]^+$ (100), 397.0 $[2M+Na]^+$ (10), gerechnet für $C_8H_{13}NO_4$.

8.2.7. Synthese der Carbonsäurederivate 28 und 29

Synthese von Ac-(4S)Azp-OH 28S



300 mg (1.41 mmol) Ac-(4S)Azp-OMe (**1S**) wurden in 7 ml THF gelöst und mit 7 ml MeOH verdünnt. Die Lösung wurde mit 85 mg (2.1 mmol) NaOH, gelöst in 1.4 ml H₂O, versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit 30 ml 1 M HCl-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurden 254 mg (1.28 mmol, 91% Ausbeute der Theorie) eines klaren Öls isoliert.

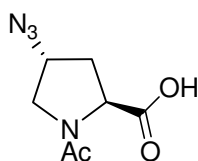
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:2.1 in D₂O.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.49 (dd, *J* = 9.7 Hz, 2.3 Hz 1H; H_α), 4.37 (m, 1H; H_γ), 3.74 (dd, *J* = 11.8 Hz, 5.3 Hz, 1H; H_δ), 3.58-3.52 (m, 1H; H_δ), 2.50-2.35 (m, 1H; H_β), 2.19 (ddd, *J* = 14.2 Hz, 3.7 Hz, 2.4 Hz, 1H; H_β), 1.20 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.63 (dd, *J* = 8.9 Hz, 1.6 Hz, 1H; H_α), 4.33 (m, 1H; H_γ), 3.58-3.52 (m, 1H; H_δ), 3.41 (bd, *J* = 13.2 Hz, 1H; H_δ), 2.52-2.35 (m, 2H; H_β), 1.93 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃+CD₃OD, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.3, 170.5, 59.1, 57.3, 52.5, 34.1, 22.0. (Nebenkonformer)= 172.6, 170.5, 58.6, 58.0, 51.2, 36.4, 21.7.

MS (ESI, neg): *m/z* (%) = 395.2 [2M-H]⁻ (100), 197.3 [M-H]⁻ (55), gerechnet für C₇H₁₀N₄O₃.

Synthese von Ac-(4R)Azp-OH **28R**



300 mg (1.41 mmol) Ac-(4R)Azp-OMe (**1R**) wurden in 7 ml THF gelöst und mit 7 ml MeOH verdünnt. Die Lösung wurde mit 85 mg (2.1 mmol) NaOH, gelöst in 1.4 ml H₂O, versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 1 M HCl-Lösung neutral gestellt und das Lösungsmittel im Vakuum verkleinert. Anschliessend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit 30 ml 1 M HCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde 4 Mal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurden 281 mg (1.41 mmol, quantitative Ausbeute) eines weissen Feststoffs isoliert.

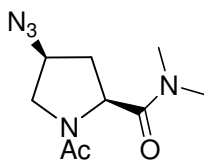
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:4 in D₂O.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.39-4.32 (m, 2H; H α , H γ), 3.75 (dd, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H; H δ), 3.63-3.56 (m, 1H; H δ), 2.39 (dddd, $J = 13.3$ Hz, 8.1 Hz, 3.4 Hz, 1.5 Hz, 1H; H β), 2.32 (ddd, $J = 13.7$ Hz, 8.3 Hz, 5.4 Hz, 1H; H β), 2.00 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.63 (dd, $J = 8.3$ Hz, 6.9 Hz, 1H; H α), 4.33 (m, 1H; H γ), 3.58-3.52 (m, 1H; H δ), 3.41 (dd, $J = 12.6$ Hz, 5.4 Hz, 1H; H δ), 2.19 (dddd, $J = 13.7$ Hz, 8.5 Hz, 4.4 Hz, 1.5 Hz, 1H; H β), 2.19 (ddd, $J = 13.8$ Hz, 6.7 Hz, 5.6 Hz, 1H; H β), 1.89 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O+0.07 M NaOD, 25°C): δ/ppm (beide Konformere) = 179.1, 179.0, 174.0, 172.9, 61.9, 60.4, 60.2, 58.9, 53.9, 51.7, 37.0, 35.0, 21.9, 21.1.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 395.3 [2M-H]⁻ (100), 197.2 [M-H]⁻ (25), gerechnet für C₇H₁₀N₄O₃.

Synthese von Ac-(4S)Azp-NMe₂ **29S**¹⁸¹



30 mg (0.152 mmol) Ac-(4S)Azp-OH (**28S**) wurden in 500 μ l CH₂Cl₂ gelöst und mit 29 mg (0.158 mmol) Pentafluorophenol und 43 mg (0.225 mmol) EDC versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt, mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit 0.5M HCl-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Zurück blieben 55 mg (0.151 mmol, 99% Ausbeute der Theorie) eines zähflüssigen Öls.

51 mg des Pentafluorophenylesters (0.14 mmol) wurden in 1 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst und mit 213 μ l (1.53 mmol) NEt₃ und 114 mg (1.40 mmol) Dimethylamid Hydrochlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit 1M HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: 4% bis 6% MeOH in CH₂Cl₂). Es wurden 25 mg (0.11 mmol, 78% Ausbeute über beide Stufen) des Dimethylamids **29S** isoliert.

R_f = 0.4 (MeOH / CH₂Cl₂, 1:9, Ninhydrin).

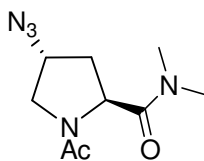
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:2.9 in D₂O.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 4.77 (dd, *J* = 9.6 Hz, 4.5 Hz, 1H; H α), 4.31 (m, 1H; H γ), 3.84 (dd, *J* = 11.5 Hz, 6.0 Hz, 1H; H δ), 3.52 (dd, *J* = 11.5 Hz, 3.9 Hz, 1H; H δ), 2.97 (s, 3H; NCH₃); 2.82 (s, 3H, NCH₃), 2.58 (ddd, *J* = 13.9 Hz, 9.5 Hz, 6.1 Hz, 1H; H β), 1.91 (dt, *J* = 13.4 Hz, 4.0 Hz, 1H; H β), 1.99 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 4.94 (dd, *J* = 9.5 Hz, 2.3 Hz, 1H; H α), 4.31 (m, 1H; H γ), 3.69 (dd, *J* = 13.1 Hz, 5.9 Hz, 1H; H δ), 3.44 (bd, *J* = 13.1 Hz, 1H; H δ), 3.00 (s, 3H; NCH₃); 2.87 (s, 3H, NCH₃), 2.66 (ddd, *J* = 14.1 Hz, 9.5 Hz, 5.9 Hz, 1H; H β), 2.11 (dm, *J* = 14.3 Hz, 1H; H β), 1.80 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 170.6, 168.9, 58.9, 54.7, 52.1, 37.1, 36.0, 34.1, 22.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 248.2 [M+Na]⁺ (100), 473.1 [2M+Na]⁺ (60), gerechnet für C₉H₁₅N₅O₂.

Synthese von Ac-(4R)Azp-NMe₂ **29R**¹⁸¹



Ac-(4R)Azp-NMe₂ **29R** wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-(4R)Azp-NMe₂ (**29S**, Seite 150) synthetisiert. Ausgehend von 91 mg (0.46 mmol) Ac-(4R)Azp-OH (**28R**) wurden 55 mg (0.244 mmol, 53% Ausbeute über beide Stufen) des Dimethylamids **29S** isoliert.

$R_f = 0.4$ (MeOH / CH₂Cl₂, 1:9, Ninhydrin).

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:3.7 in D₂O.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 4.80 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H; H α), 4.33 (m, 1H, H γ), 3.73 (dd, $J = 11.8$ Hz, 4.8 Hz, 1H; H δ), 3.63 (dt, $J = 11.8$ Hz, 2 Hz, 1H; H δ), 3.03 (s, 3H; NCH₃); 2.82 (s, 3H, NCH₃), 2.39 (dddd, $J = 13.5$ Hz, 8.0 Hz, 3.0 Hz, 1.4 Hz, 1H; H β), 1.99 (m, 1H; H β), 1.99 (s, 3H; Ac). (Nebenkonformer) = 5.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H; H α), 4.25 (m, 1H, H γ), 3.67 (dt, $J = 13.0$ Hz, 2 Hz, 1H; H δ), 3.48 (dd, $J = 12.6$ Hz, 5.1 Hz, 1H; H δ), 3.04 (s, 3H; NCH₃); 2.86 (s, 3H, NCH₃), 2.53 (dddd, $J = 13.6$ Hz, 8.2 Hz, 3.6 Hz, 1.6 Hz, 1H; H β), 2.12 (ddd, $J = 13.7$ Hz, 7.2 Hz, 5.7 Hz, 1H; H β), 1.79 (s, 3H; Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 172.9, 172.8, 60.3, 56.0, 53.8, 37.4, 36.3, 34.3, 21.7. (Nebenkonformer) = 173.8, 172.7, 58.7, 57.7, 52.0, 37.2, 36.4, 35.9, 21.0.

MS (ESI): m/z (%) = 248.0 [M+Na]⁺ (100), 473.1 [2M+Na]⁺ (60), gerechnet für C₉H₁₅N₅O₂.

8.2.8. Synthese der Chymotrypsin-Substrate Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA 31-35

Protokoll für Peptidkupplungen mit EDC in Lösung

Die Carbonsäure (1.2 eq) wurde in abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit EDC (1.5 eq) versetzt. Die Aminkomponente (1 eq) wurde zugegeben (falls das Amin als HCl-Salz vorlag, wurden zusätzlich 1.2 eq ⁱPr₂NEt zugegeben) und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt, bis der Umsatz vollständig war (DC). Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc verdünnt und mit 1M HCl-Lösung und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Protokoll zur Boc-Entschützung mit HCl in Dioxan

Das Boc-geschützte Peptid wurde mit 4 M HCl-Lösung (20 eq) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis ein vollständiger Umsatz erreicht wurde (DC). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ und wenig MeOH gelöst und mit Et₂O gefällt.

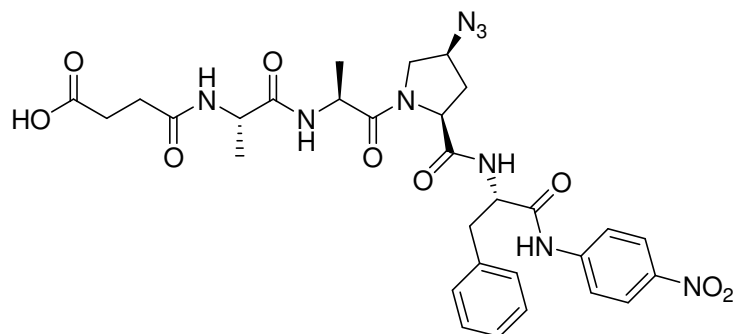
Protokoll zur Kupplung von Bernsteinsäureanhydrid¹⁸⁰

Das Peptid wurde in abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit NEt₃ (1.2 eq) versetzt. Dazu wurde eine Lösung von Bernsteinsäureanhydrid gelöst in DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl wurde mittels HPLC aufgereinigt. Das isolierte Produkt wurde in THF/CH₂Cl₂ gelöst und mit Et₂O gefällt. Der weisse Feststoff wurde vor dem Chymotrypsin Experiment in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Ausbeuten der einzelnen Stufen

Produkt	Ausbeute in % der Theorie			
	Xaa=(4S)Azp	Xaa=(4R)Azp	Xaa=(4S)Hyp	Xaa=(4R)Hyp
Boc-Xaa-Phe-pNA	64%	62%	81%	90%
H-Xaa-Phe-pNA	81%	97%	73%	71%
Boc-Ala-Xaa-Phe-pNA	66%	70%	99%	90%
H-Ala-Xaa-Phe-pNA	91%	80%	55%	76%
Boc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA	98%	75%	79%	53%
H-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA	78%	85%	86%	95%
Suc-Ala-Ala-Xaa-Phe-pNA	13%	23%	10%	35%

Synthese von Suc-Ala-Ala-(4*S*)Azp-Phe-pNA **32**



Die Synthese erfolgte ausgehend von 540 mg Boc-(4*S*)Azp-OH (**67S**) gemäss den allgemeinen Protokollen für die Peptidsynthese in Lösung (Seite 152). Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in der Tabelle auf Seite 152 aufgeführt. Schliesslich wurden 12 mg (18 μ mol) des weissen Feststoffes **32** isoliert.

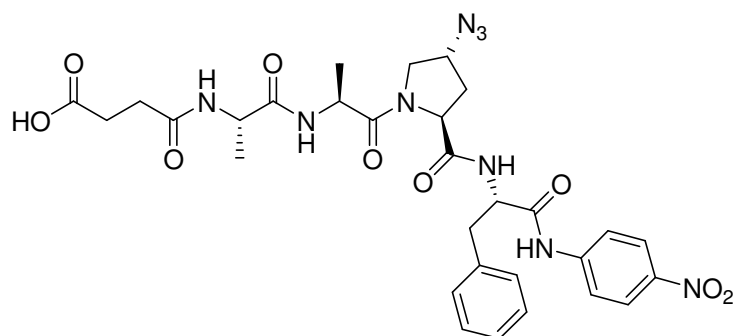
Analytische HPLC: t_R = 12.4 min; Gradient: 70% zu 40% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 8.20(d, J = 9.2 Hz, 2H; pNA), 7.96 (d, J = 9.3 Hz, 2H; pNA), 7.33-7.12 (m, 5H; Phe), 4.74 (dd, J = 10.6 Hz, J = 5.2 Hz, 1H; $\text{H}\alpha$ Phe), 4.50-4.37 (m, 3H; $\text{H}\alpha$ Azp, $\text{H}\alpha$ Ala; $\text{H}\alpha$ Ala), 4.09 (m, 1H; $\text{H}\gamma$ Azp), 3.63 (dd, J = 11.7 Hz, 4.7 Hz, 1H; $\text{H}\delta$ Azp), 3.52 (m, 1H; $\text{H}\delta$ Azp), 3.40 (dd, J = 14.1 Hz, 5.2 Hz, 1H; $\text{H}\beta$ Phe), 3.06 (dd, J = 14.0 Hz, 10.6 Hz, 1H; $\text{H}\beta$ Phe), 2.87 (ddd, J = 17.6 Hz, 10.8 Hz, 4.8 Hz, 1H; Suc), 2.60 (ddd, J = 17.7 Hz, 5.4 Hz, 4.3 Hz, 1H; Suc), 2.50 (ddd, J = 14.8 Hz, 10.6 Hz, 4.1 Hz, 1H; Suc), 2.40 (dt, J = 15.1 Hz, 5.1 Hz; Suc), 2.18 (m, 1H; $\text{H}\beta$ Azp), 1.56 (ddd, J = 13.4 Hz, 8.3 Hz, 5.1 Hz, 1H; $\text{H}\beta$ Azp), 1.44 (d, J = 7.3 Hz, 3H; $\text{H}\beta$ Ala), 1.42 (d, J = 7.3 Hz, 3H; $\text{H}\beta$ Ala).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 182.7, 180.4, 173.6, 173.3, 170.6, 168.8, 145.6, 144.8, 138.1, 130.4, 129.6, 128.0, 125.7, 120.6, 61.5, 57.5, 53.6, 50.1, 38.5, 36.8, 36.7, 35.9, 17.6, 16.9.

MS (ESI): m/z (%) = 688.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100) und MS (ESI, neg): m/z (%) = 779.6 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$ (100), gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9$.

Synthese von Suc-Ala-Ala-(4*R*)Azp-Phe-pNA **33**



Die Synthese erfolgte ausgehend von 647 mg Boc-(4*R*)Azp-OH **67R** gemäss den allgemeinen Protokollen für die Peptidsynthese in Lösung (Seite 152). Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in der Tabelle auf Seite 152 aufgeführt. Schliesslich wurden 15 mg (23 μ mol) des weissen Feststoffs **33** isoliert.

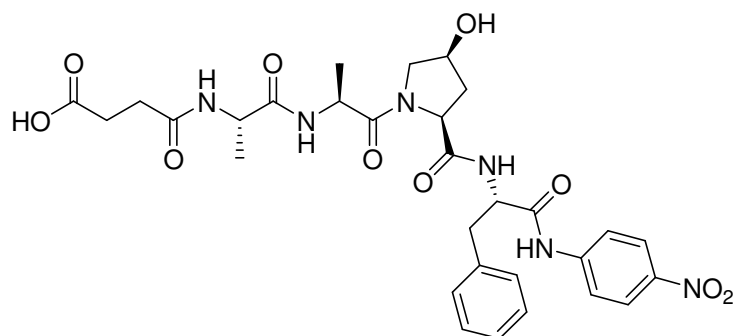
Analytische HPLC: $t_R = 11.8$ min; Gradient: 70% zu 40% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 12.07 (s, 1H; COOH), 10.35 (s, 1H; NH), 8.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H; NH), 8.23 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H; pNA), 8.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H; NH), 8.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H; NH), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H; pNA), 7.29-7.17 (m, 5H; Phe), 4.57 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 3.69 (m, 2H), 3.12 (dd, $J = 13.8$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H; H δ Azp), 2.98 (dd, $J = 13.7$ Hz, 9.1 Hz, 1H; H δ Azp), 2.55 (m, 1H), 2.43-2.31 (m, 3H), 2.20-2.12 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.17 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; H β Ala), 1.15 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; H β Ala).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 173.8, 171.9, 170.9, 170.8, 170.7, 170.6, 144.7, 142.3, 137.2, 129.1, 128.1, 126.4, 124.9, 124.8, 118.9, 64.8, 59.6, 58.1, 55.2, 51.8, 47.7, 46.2, 30.3, 29.7, 28.9, 18.1, 16.6.

MS (ESI): m/z (%) = 688.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100) und MS (ESI, neg): m/z (%) = 664.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100), 778.5 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$ (80), gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9$.

Synthese von Suc-Ala-Ala-(4*S*)Hyp-Phe-pNA **34**



4.28 g (16.3 mmol) PPh₃ und 2.00 g (8.15 mmol) Boc-(4*R*)Hyp-OMe (**3R**) wurden in 21 ml THF gelöst und mit 615 μ l (16.3 mmol) HCOOH versetzt. 40% DIAD in Toluol wurden zugetropft, bis die gelbe Farbe bestehen blieb (ca. 2.9 ml (15.0 mmol) DIAD in 4.2 ml Toluol). Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Lösung wurde mit 27 ml 1 M NaOH-Lösung versetzt. Das Zweiphasensystem wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Vakuum wurde das Lösungsmittel verringert, die wässrige Phase wurde mit EtOAc gewaschen und anschliessend mit HCl-Lösung angesäuert und 3 Mal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Durch das mechanische Behandeln mit Et₂O wurden 468 mg Boc-(4*S*)Hyp-OH (**3S**) (2.02 mmol, 25 % Ausbeute der Theorie) als weisser Feststoffs isoliert.

Ausgehend von 410 mg Boc-(4*S*)Hyp-OH (**3S**) erfolgte die Synthese dann gemäss den allgemeinen Protokollen für die Peptidsynthese in Lösung (Seite 152). Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in der Tabelle auf Seite 152 aufgeführt. Schliesslich wurden 21 mg (33 μ mol) des weissen Feststoffs **34** isoliert.

Analytische HPLC: t_R = 8.5 min; Gradient: 70% zu 40% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

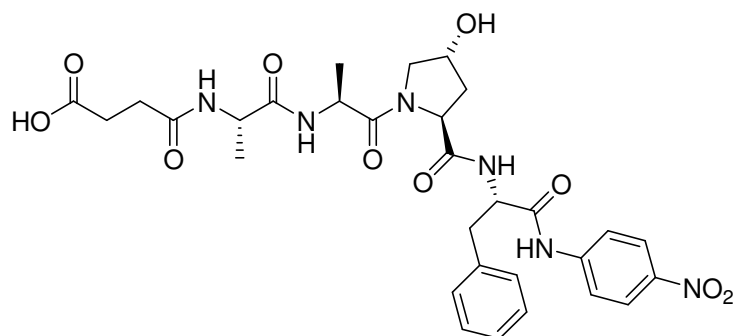
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 12.7 (s, 1H; COOH), 10.2 (s, 1H; NH), 8.19 (d, J = 9.2 Hz, 2H; pNA), 8.15 (d, J = 7.2 Hz, 1H; NH Phe), 8.05 (d, J = 6.9 Hz, 1H; NH Ala2), 7.98 (d, J = 7.5 Hz, 1H; NH Ala1), 7.84 (d, J = 9.3 Hz, 2H; pNA), 7.24-7.12 (m, 5H; Phe), 5.27 (bs, 1H; OH Hyp), 4.52 (ψ q, J = 7.4 Hz, 1H; H α Phe), 4.40 (ψ Quintett, J = 6.9 Hz, 1H; H α Ala2), 4.28-4.18 (m, 3H; H α Hyp, H α Ala1, H γ Hyp), 3.74 (dd, J = 10.3 Hz, 5.3 Hz, 1H; H δ Hyp), 3.29 (dd, J = 10.3 Hz, 4.8 Hz, 1H; H δ Hyp), 3.06 (dd, J = 13.8 Hz, 5.7 Hz, 1H; H β Phe), 3.00 (dd, J = 13.8 Hz, 8.3 Hz, 1H; H β Phe), 2.39-2.27 (m,

4H; Suc), 2.22 (ddd, $J = 14.0$ Hz, 9.2 Hz, 5,7 Hz, 1H; H β Hyp), 1.64 (dt, $J = 12.3$ Hz, 5.5 Hz, 1H; H β Hyp), 1.13 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H; Ala H β), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H; Ala H β).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , 23°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 173.8, 171.9, 171.8, 171.4, 170.6, 170.5, 144.6, 142.3, 137.0, 129.1, 128.1, 126.4, 124.9, 118.9, 68.9, 58.7, 55.1, 54.3, 47.7, 46.3, 36.6, 36.5, 29.8, 29.0, 18.0, 16.5.

MS (ESI): m/z (%) = 641.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100). MS (ESI, neg): m/z (%) = 752.9 $[\text{M}+\text{TFA}]^-$ (100), gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_{10}$.

Synthese von Suc-Ala-Ala-(4*R*)Hyp-Phe-pNA **35**



Ausgehend von Boc-(4*R*)Hyp-OH (**3R**) wurde Suc-Ala-Ala-(4*R*)Hyp-Phe-pNA (**35**) gemäss den allgemeinen Protokollen für die Peptidsynthese in Lösung synthetisiert (Seite 152). Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in der Tabelle auf Seite 152 aufgeführt. Schliesslich wurden 17 mg (27 μ mol) des weissen Feststoffs **35** isoliert.

Analytische HPLC: t_R = 8.6 min; Gradient: 70% zu 40% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

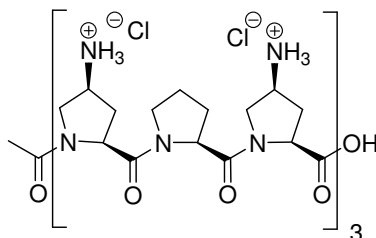
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 12.1 (s, 1H; COOH), 10.2 (s, 1H; NH), 8.31 (d, J = 7.3 Hz, 1H; NH), 8.24 (d, J = 9.3 Hz, 2H; pNA), 8.07 (d, J = 7.1 Hz, 1H; NH), 8.04 (d, J = 7.5 Hz, 1H; NH), 7.90 (d, J = 9.3 Hz, 2H; pNA), 7.30-7.17 (m, 5H; Phe), 4.56-4.25 (m, 5H), 3.60 (dd, J = 10.3 Hz, J = 4.1 Hz, 1H), 3.45 (1H mit H₂O), 3.15 (dd, J = 13.8 Hz, 5.4 Hz, 1H; H δ Azp), 2.98 (dd, J = 13.7 Hz, 9.4 Hz, 1H; H δ Azp), 2.44-2.30 (m, 4H), 1.94 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.18 (d, J = 7.2 Hz, 3H; H β Ala), 1.16 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H β Ala).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ /ppm (Hauptkonformer) = 177.2, 175.2, 173.7, 171.6, 171.1, 170.7, 144.7, 142.2, 142.2, 129.0, 128.1, 126.4, 124.9, 118.9, 68.6, 58.9, 55.2, 54.7, 47.8, 42.6, 34.3, 30.3, 29.8, 28.9, 18.0, 16.7.

MS (ESI): m/z (%) = 641.2 [M+H]⁺ (100), 1281.0 [2M+H]⁺ (90), 1303.1 [2M+Na]⁺ (80). MS (ESI, neg): m/z (%) = 639.5 [M-H]⁻ (45), 753.1 [M+TFA]⁻ (100), gerechnet für C₃₀H₃₆N₆O₁₀.

8.2.9. Synthese der Aminoprolin-haltigen Peptide 42S und 42R

Synthese von Ac-[(4S)Amp-Pro-(4S)Amp]₃-OH **42S**

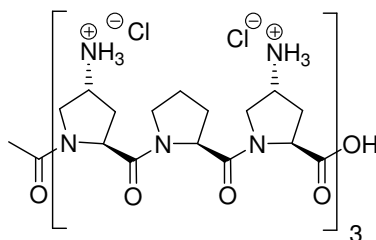


18 mg (14 μ mol) Ac-[(4S)Azp-Pro-(4S)Azp]₃-OH (**41S**) wurden in 2 ml MeOH gelöst und mit 5 mg Pd/C (10% Pd) sowie 10 μ l konz. HCl-Lösung versetzt. Nach einem Tag rühren bei einer H₂-Atmosphäre wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum getrocknet und der Rückstand über Umkehrphasen HPLC gereinigt. Das Produkt wurde als weisser Feststoff (4 mg, 3 μ mol, 25% Ausbeute der Theorie) isoliert.

Analytische HPLC: t_R = 11.3 min; Gradient: 98% zu 75% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (MALDI-TOF): m/z = 1024.2 [M+H]⁺, gerechnet für C₄₇H₇₃N₁₅O₁₁.

Synthese von Ac-[(4R)Amp-Pro-(4R)Amp]₃-OH **42R**



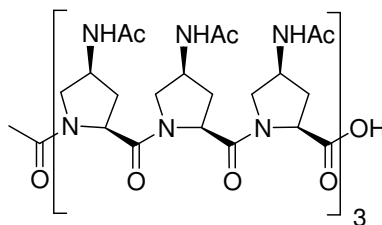
Ac-[(4R)Amp-Pro-(4R)Amp]₃-OH (**42R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer **42S** (siehe oben) synthetisiert. Ausgehend von 72 mg (14 μ mol) Ac-[(4R)Azp-Pro-(4R)Azp]₃-OH (**41R**) wurden 8 mg (7 μ mol, 12% Ausbeute der Theorie) Produkt als weisser Feststoff isoliert.

Analytische HPLC: t_R = 11.3 min; Gradient: 98% zu 75% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (MALDI-TOF): m/z (%) = 1023.8 (100) [M+H]⁺, gerechnet für C₄₇H₇₃N₁₅O₁₁.

8.2.10. Synthese der Acetamidoprolin-haltigen Peptide 43S und 43R

Synthese von Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]₉-OH **43S**



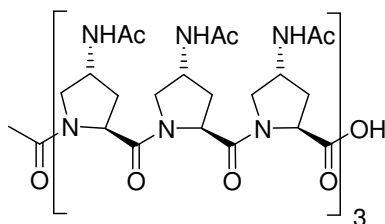
20 mg (15 μmol) Ac-(4*S*)Azp-OH (**11S**) wurden in 2 ml MeOH gelöst und mit 62 μl (620 μmol) Ac_2O und 8 mg Pd/C versetzt. Die Mischung wurde für 20 h unter einer H_2 -Atmosphäre gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und mit MeOH gespült. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Umkehrphasen HPLC aufgereinigt. Isoliert wurden 4 mg (3 μmol , ~ 20% Ausbeute der Theorie) **43S** als weisser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O , 25°C): δ/ppm = 4.38 (m, 9H; H γ), 3.72 (m, 17H; H δ), 3.44 (dd, J = 11.3 Hz, 4.3 Hz, 1H; H δ), 2.28 (m, 9H; H β), 2.18-1.95 (m, 9H; H β), 1.98 (s, 3H; Ac^{N-Terminal}), 1.86 (s, 27H, Ac), die Signale für H α fallen mit dem Lösungsmittelsignal bei ~ 4.7 ppm zusammen.

Analytische HPLC: t_{R} = 9.7 min; Gradient: 92% zu 76% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1491.6 $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$ (100), 1513.5 $[\text{M}+3\text{Na-H}]^+$ (50), gerechnet für $\text{C}_{65}\text{H}_{94}\text{N}_{18}\text{O}_{20}$. MS (MALDI-TOF): m/z (%) = 1446.7 $[\text{M}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$.

Synthese von Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]₉-OH **43R**



Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]₉-OH (**43R**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]₉-OH (**43S**) (Seite 159) synthetisiert. Ausgehend von 20 mg (15 μ mol) Ac-[(4*R*)Azp]₉-OH (**11R**) wurden 4 mg Produkt (3 μ mol, ~ 20% Ausbeute der Theorie) als weisser Feststoff isoliert.

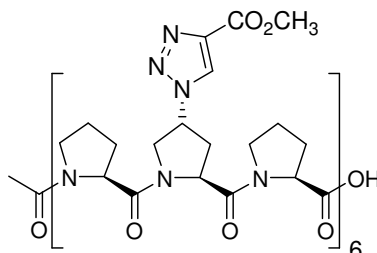
¹H-NMR (400MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.39 (m, 9H; H γ), 4.02 (m, 8H; H δ), 3.87 (dd, J = 10.9 Hz, 6.7 Hz, 1H; H δ), 3.32 (m, 9H; H δ), 2.59 (m, 9H; H β), 1.97 (s, 3H; Ac^{N-Terminal}), 1.84 (s, 27H, Ac) 1.75 (m, 8H; H β), die Signale für H α fallen mit dem Lösungsmittelsignal bei ~ 4.7 ppm zusammen.

Analytische HPLC: t_R = 9.1 min; Gradient: 92% zu 76% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1491.6 [M+2Na-H]⁺ (100), 1513.5 [M+3Na-H]⁺ (60), gerechnet für C₆₅H₉₄N₁₈O₂₀.

8.2.11. Synthese der Triazolylpeptide **44S** und **44R**

Synthese des Hexatriazols **44R**

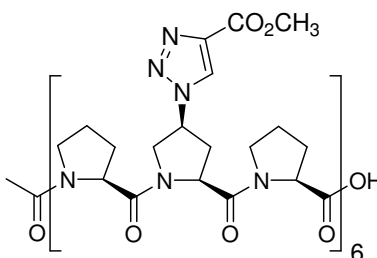


16 mg (7.8 μmol) Ac-[Pro-(4*R*)Azp-Pro]₆-OH (**12R**) und 12 μl (144 μl) Methylpropiolat wurden in 30 μl *t*BuOH und 240 μl H₂O suspendiert. 17 μl einer 1 M wässrigen Lösung von Natriumascorbat und 23 μl einer 0.4 M wässrigen Lösung von CuSO₄•5H₂O wurden zugegeben. Die heterogene Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann 4 Mal mit 10 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in ~ 0.3 ml CHCl₃ aufgenommen und mit 5 ml Et₂O gefällt. Das Produkt wurde als weisses Pulver isoliert (8 mg, 40%).

Analytische HPLC: t_R = 13.3 min; Gradient: 80% zu 50% Lösung B über 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 2556.2 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₁₁₆H₁₄₈N₃₆O₃₂.

Synthese des Hexatriazols **44S**



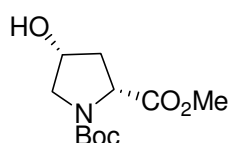
Hexatriazol **44S** wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer **44R** (siehe oben) synthetisiert. Ausgehend von 3 mg Ac-[Pro-(4*S*)Azp-Pro]₆-OH (**12S**) wurden 2 mg (40% Ausbeute der Theorie) Produkt als weisses Pulver isoliert.

Analytische HPLC: t_R = 14.5 min; Gradient: 80% zu 50% Lösung B über 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 2556.2 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₁₁₆H₁₄₈N₃₆O₃₂.

8.2.12. Synthese der Prolinderivate mit einer Quaterthiophen Einheit

Synthese von Boc-(2*R*,4*R*)Hyp-OMe **70**



(2*R*,4*R*)-Hydroxyprolin (**69**) (5.00 g, 38.1 mmol) wurden in 80 ml MeOH suspendiert worauf 5.6 ml (77.2 mmol) Thionylchlorid bei 0°C zugetropft wurden. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss gerührt. Alle leichtflüchtigen Anteile wurden im Vakuum entfernt. Der resultierende Feststoff wurde in einer 1 M KHCO₃-Lösung (8.50 g in 85 ml Wasser) gelöst und tropfenweise mit 10.7 g (38.0 mmol) Boc₂O gelöst in 20 ml Dioxan versetzt. Nach 8 h bei Raumtemperatur wurde das Dioxan im Vakuum entfernt. Die resultierende wässrige Lösung wurde 3 Mal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungen wurden mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und mit einer 1 M HCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt um 8.11 g (33.1 mmol, 87% Ausbeute der Theorie) eines klaren Öls zu isolieren.

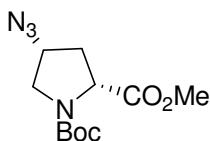
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.2.

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.38-4.31 (m, 1H; H_γ), 4.33-4.28 (dd, *J* = 9.8 Hz, 1.5 Hz, 1H; H_α), 3.77 (s, 3H; CH₃), 3.67 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; H_δ), 3.56-3.47 (m, 1H; H_δ), 2.33 (ddd, *J* = 19.0 Hz, 9.6 Hz, 4.7 Hz, 1H; H_β), 2.11-2.03 (m, 1H; H_β), 1.41 (s, 9H; *t*Bu). (Nebenkonformer) = 4.38-4.31 (m, 2H; H_γ, H_α), 3.78 (s, 3H; CH₃), 3.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; H_δ), 3.56-3.47 (m, 1H; H_δ), 2.30 (ddd, *J* = 19.0 Hz, 9.7 Hz, 4.6 Hz, 1H; H_β), 2.11-2.03 (m, 1H; H_β), 1.45 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 175.5, 153.6, 80.4, 70.3, 57.9, 55.4, 52.5, 38.5, 28.2. (Nebenkonformer) = 175.7, 154.4, 85.2, 71.3, 57.7, 55.4, 52.8, 37.7, 28.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 268.7 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₁H₁₉NO₅.

Synthese von Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OMe **5S-ent**



Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OMe (**5S-ent**) wurde nach demselben Protokoll wie das Diastereomer Boc-(4*R*)Azp-OMe (**5R**) synthetisiert (Seite 111). Ausgehend von 4.00 g (16.3 mmol) Boc-(2*R*,4*R*)Hyp-OMe (**70**) wurden 3.00 g (11.2 mmol, 68% Ausbeute der Theorie) als farbloses Öl isoliert.

Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.3.

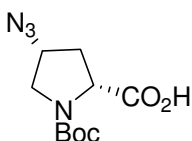
¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.33 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.4 Hz, 1H; H α), 4.20-4.12 (m, 1H; H γ), 3.76 (s, 3H; CH₃), 3.76 (dd, *J* = 11.7 Hz, 6.1 Hz, 1H; H δ), 3.50 (dd, *J* = 11.6 Hz, 4.3 Hz, 1H; H δ), 2.54-2.40(m, 1H; H β), 2.22-2.14 (m, 1H; H β), 1.42 (s, 9H; *t*Bu). (Nebenkonformer) = 4.44 (dd, *J* = 8.9 Hz, 3.8 Hz, 1H; H α), 4.20-4.12 (m, 1H; H γ), 3.76 (s, 3H; CH₃), 3.70 (dd, *J* = 11.6 Hz, 6.1 Hz, 1H; H δ), 3.46 (dd, *J* = 11.9 Hz, 4.0 Hz, 1H; H δ), 2.54-2.40(m, 1H; H β), 2.22-2.14 (m, 1H; H β), 1.48 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.2, 153.4, 80.5, 58.2, 57.7, 52.3, 50.8, 36.0, 28.2. (Nebenkonformer) = 172.2, 153.4, 59.2, 57.3, 52.4, 51.2, 35.1, 28.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 293.2 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₁H₁₈N₄O₄.

Elementar Analyse: gerechnet: C 48.88, H 6.71, N 20.73, O 23.68; gefunden: C 49.12, H 6.78, N 20.91.

Synthese von Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OH **67S-ent**²⁴²



Eine Lösung von 200 mg (0.739 mmol) Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OMe (**5S-ent**) in 40 ml THF/Wasser/MeOH im Verhältnis (2:1:1) wurde mit 62.2 mg (1.55 mmol) NaOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel

wurden im Vakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff in Wasser aufgenommen und auf einen pH-Wert von 3 eingestellt durch die Zugabe von HCl-Lösung. Diese Lösung wurde 3 Mal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc/MeOH 1:1). Es wurden 184 mg (0.720 mmol, 97% Ausbeute der Theorie) eines farblosen Öls isoliert.

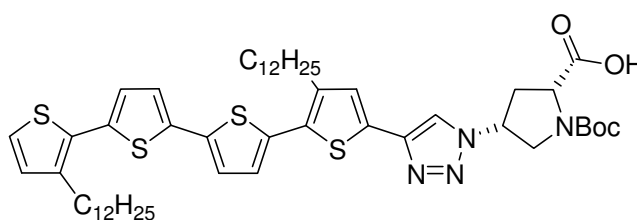
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung) im Verhältnis 1:1.2.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 9.40 ppm (bs, 1H; COOH), 4.38 (m, 1H; H_α), 4.14 (m, 1H; H_γ), 3.73-3.31 (m, 2H; H_δ), 2.57-2.18 (m, 2H; H_β), 1.44 (s, 9H; *t*Bu). (Nebenkonformer) = 9.40 ppm (bs, 1H; COOH), 4.31 (m, 1H; H_α), 4.14 (m, 1H; H_γ), 3.73-3.31 (m, 2H; H_δ), 2.57-2.18 (m, 2H; H_β), 1.41 (s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C): δ/ppm (Hauptkonformer und Nebenkonformer) = 176.7, 175.2, 155.2, 153.6, 81.5, 80.8, 58.9, 58.2, 58.0, 57.6, 51.5, 50.7, 35.9, 34.1, 28.2, 28.1

MS (ESI): *m/z* (%) = 279.1 [M+Na]⁺ (100), gerechnet für C₁₀H₁₆N₄O₄.

Synthese des Quaterthiophen-Aminosäure Hybridmoleküls **68S-ent** („Click“ Reaktion von **63** und **59S-ent**)²⁴²



Eine Lösung von 118 mg (0.170 mmol) des frisch hergestellten Didodecylquaterthiophen monoacetylen **63** in 7 ml CH₂Cl₂ wurde unter Argon mit 87.5 mg (0.341 mmol) Boc-(2*R*,4*R*)Azp-OH, 2.2 mg (34 μmol) Kupfer Pulver und 76.4 mg (0.204 mmol) [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt und dann auf eine halbkonzentrierte Ammonium-Lösung gegeben. Die zwei Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphasen HPLC gereinigt (t=0 min: 50% Wasser, 45% CH₃CN und 5% THF; t=17: 2% Wasser, 60% CH₃CN und 38% THF; t_R=11.2 min). Das Produkt wurde über eine

zyklische GPC mit THF weiter aufgereinigt um 149 mg (0.157 mmol, 92% Ausbeute der Theorie) eines intensiv gelben Feststoffs zu isolieren.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 50:50, 25°C): $\delta/\text{ppm} = 7.87$ (bs, 1H; Triazol), 6.92 (s, 1H; Arom), 6.87 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H; Arom), 6.81 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H; Arom), 6.73 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; Arom), 6.68 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; Arom), 6.60 (d, $J = 5.2$, 1H; Arom), 4.91 (m, 1H; H γ), 4.10, 3.87 and 3.58 (m, 3H; H α , H δ), 2.68 (m, 1H; H β), 2.45 (m, 4H; Alkyl), 2.32 (m, 1H; H β), 1.33 (m, 4H; Alkyl), 1.14 (s, 9H; *t*Bu), 0.92 (m, 36H; Alkyl), 0.53 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H; Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 50:50, 25°C): $\delta/\text{ppm} = 173.5, 173.2, 153.8, 153.5, 142.1, 139.8, 139.3, 136.5, 136.0, 134.9, 134.1, 129.7, 129.5, 129.4, 126.9, 126.1, 125.9, 123.3, 123.3, 123.2, 118.4, 118.4, 80.8, 80.6, 57.8, 57.5, 57.0, 51.0, 50.4, 35.4, 34.6, 31.3, 30.0, 29.8, 29.0, 29.0, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.7, 28.5, 27.4, 27.2, 22.0, 13.1$.

Elementar Analyse: gerechnet für $\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_4$: C 65.92, H 7.87, N 5.91; gefunden: C 65.93, H 7.93, N 5.81.

Die Diastereomere **68S** und **68R** wurden ausgehend von Boc-(4*S*)Azp-OH (**67S**) bzw. Boc-(4*R*)Azp-OMe (**5R**) analog durchgeführt.²⁴² Für die „Click“ Reaktionen wurden Ausbeuten von 82% bzw. 86% erhalten. Für das (2*S*,4*R*)-konfigurierte Derivat **68R** wurde der Methyl ester nach der „Click“ Reaktion gespalten. Dieser Reaktionsweg führte für **68S** und **68S-ent** zu einer teilweisen Epimerisierung.

8.3. Festphasensynthese

8.3.1. allgemeine Protokolle für die Festphasensynthese, HPLC Reinigung und CD Analyse der Peptide

Allgemeines Protokoll für die Kupplung der ersten Aminosäure auf 2-Chlorotrityl-chlorid Harz

1 eq der Fmoc-geschützten Aminosäure und 4 eq $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ gelöst in trockenem CH_2Cl_2 wurden zum in CH_2Cl_2 gequollenen Harz gegeben und für 1 h geschüttelt. Danach wurde das Harz 3 Mal mit einer Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/i\text{Pr}_2\text{NEt}$ im Verhältnis 17:2:1 gewaschen um nicht reagierte Funktionalitäten abzusättigen. Des Weiteren wurde 3 Mal mit CH_2Cl_2 , 3 Mal mit DMF und nochmals 5 Mal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die erreichte Beladung des Harzes wurde mit dem quantitativen Fmoc-Test bestimmt. Dazu wurden ca. 1-2 mg gut getrocknetes Harz in eine 1 cm UV-Küvette eingewogen (m), mit 3 ml einer 20%-igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und gut durchmischt. Über die UV Absorption bei 290 nm (A_{290}) wurde die

Beladung (B) berechnet:
$$\frac{B}{[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}]} = \frac{A_{290}}{1.65 \cdot \frac{m}{[\text{mg}]}}$$
 Es wurde eine Beladung von 0.3 mmol/g

angestrebt.

Allgemeines Protokoll für die Kupplung der ersten Aminosäure auf Wang Harz

In DMF gequollenes Wang Harz wurde mit 1 eq HCTU, 1 eq Fmoc-Xaa-OH, 3 eq $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ und katalytischen Mengen von DMAP in DMF versetzt. Nach 1 h schütteln wurde das Harz 5 Mal mit DMF und 5 Mal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Mittels quantitativem Fmoc-Test wurde die Beladung des Harzes bestimmt.

Allgemeines Protokoll für manuelle Peptidkupplungen

Die Carbonsäure (3 eq) und HCTU (3 eq) wurden in abs. DMF (ca. 5 ml/g Peptid) und $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (9 eq) gelöst. Diese Lösung wurde zum Harz im Merryfield-Kolben gegeben, das in DMF (ca. 8 ml/g Harz) suspendiert war. Nach 1.5 h schütteln, wurde die Suspension abfiltriert und 3 Mal mit DMF und mindestens 5 Mal mit CH_2Cl_2 gewaschen für 1-3 min. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mit dem Kaiser-Test oder dem Chloranil-Test überprüft.

Allgemeines Protokoll für Peptidkupplung mit dem Syro I Peptid Synthesizer

Fmoc-Xaa-OH (4eq) und HCTU (4eq) je gelöst in DMF als 0.5 molare Lösung wurden zum amino-funktionalisierten Harz gegeben gefolgt von $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (12 eq, 3M in NMP). Die Mischung wurde 1 h geschüttelt und anschliessend 3 Mal mit DMF gewaschen. Kupplungen wurden sporadisch mit dem Chloranil-Test manuell auf ihre Vollständigkeit überprüft. Ansonsten wurden potentielle vorhandene Amin Funktionalitäten, die während der Kupplung nicht reagiert hatten, mit Ac_2O (1 eq) und $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (1 eq) acetyliert (capping), worauf wieder 3 Mal mit DMF gewaschen wurde.

Allgemeines Protokoll zur Fmoc-Entschützung

40% (v/v) Piperidin in DMF wurde zum Harz gegeben und für 5 min geschüttelt. Die Lösung wurde abfiltriert und der Vorgang für weitere 10 min mit 20 %-iger Lösung wiederholt. Schliesslich wurde das Harz 5 Mal mit DMF gewaschen.

Allgemeines Protokoll zur Acetylierung

NEt_3 (20eq) und Ac_2O (20eq) wurden zum Harz gegeben das in CH_2Cl_2 (≈ 120 mM) gequollen war. Die Mischung wurde für 1 h geschüttelt und dann mit 7 Mal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels Chloranil- oder Kaiser-Test überprüft.

Allgemeines Protokoll zum Abspalten von Rink-Amid Harz

Das trockene Harz wurde mit CH_2Cl_2 und TFA im Verhältnis 1:2 versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und gut mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die leichtflüchtigen Anteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig CH_2Cl_2 gelöst und mit Et_2O gefällt.

Allgemeines Protokoll zum Abspalten von Wang Harz

Für die Abspaltung vom Wang Harz wurde eine Mischung von CH_2Cl_2 und TFA im Verhältnis 2:1 verwendet.

Allgemeines Protokoll zum Abspalten von 2-Chlorotrityl Harz

Die Festphasen gebundenen Peptide wurden vom 2-Chlorotrityl Harz abgespalten indem das Harz für 1 h und nochmals für 20 min in einer Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}/\text{TFE}$ im Verhältnis 8:1:1 geschüttelt wurde. Die Lösung wurde vom Harz abfiltriert und mehrmals mit

Hexan co-evaporiert um die Essigsäure zu entfernen. Nach dem Entfernen aller leichtflüchtigen Komponenten im Vakuum wurde der Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst und mit Et_2O gefällt. Die Ausbeuten der Rohprodukte lag ca. bei 70-80% der Theorie.

Allgemeines Protokoll zur HPLC Reinigung

Alle synthetisierten Peptide wurden mittels Umkehrphasen HPLC gereinigt. Als Eluent wurden Acetonitril (Lösung A) und Wasser versetzt mit 0.1% TFA (Lösung B) verwendet. Die UV Absorption wurde bei 190 nm detektiert. Für jedes Trennproblem wurde ein Gradient gewählt, so dass das Produkt eine Retentionszeit um 15 min hatte. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min wurden Fraktionen zu 2 ml gesammelt, die anschliessend mittels analytischer HPLC einzeln auf ihre Reinheit untersucht wurden. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Meist wurden nur wenige mg der Peptide aufgereinigt.

Allgemeines Protokoll zur CD-Analyse

CD-Spektren wurden aufgenommen mit einer Spaltbreite von 1 nm (Chirascan) bzw. 1.5 nm (Aviv) bei 25°C, einer Zeitkonstante von 5 s und eine Auflösung von 1 nm. Die CD Daten wurden als mittlere molare Elliptizität (Θ in $\text{deg cm}^1 \text{dmol}^{-1}$) angegeben. Dazu wird der gemessene Wert in mdeg durch die Konzentration (in mol/l), die Anzahl Aminosäuren und die Schichtdicke der Küvette (in mm) geteilt. Gemessen wurde in einer Quarzküvette (Hellma) mit einer Schichtdicke von 2 mm. Die Lösungen enthielten ungefähr 70 $\mu\text{g/ml}$ Peptid (6×10^{-4} M pro Aminosäure Einheit). Alle CD-Spektren wurden für mindestens 12 h bei Raumtemperatur equilibriert, wenn nichts anderes vermerkt ist.

8.3.2. Synthese der Oligoprolin Peptide Ac-Pro_n-OH, n=6, 9, 12, 15, 18

Synthese von Ac-Pro₆-OH 40

Peptid **40** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 90 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.56 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 12.0$ min; Gradient: 93% zu 70% Lösung B über 22 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 642.3 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₃₂H₄₆N₆O₈.

Synthese von Ac-Pro₉-OH 9

Peptid **9** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.12 mmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.51 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 14.2$ min; Gradient: 93% zu 70% Lösung B über 22 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.40 (dd, $J = 8,7$ Hz, 4.4 Hz, 1H; H α), 3.70 (m, 8H; H δ), 3.50 (m, 10H; H δ), 2.22 (m, 9H; H β), 1.96 (s, 3H; Ac), 1.95-1.72 (m, 27H; H γ , H β) die weiteren Signale für H α fallen mit dem Lösungsmittelsignal bei ~ 4.70 ppm zusammen.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 932.5 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₆₇N₉O₁₁.

Synthese von Ac-Pro₁₂-OH 51

Peptid **51** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.12 mmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.51 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 15.5$ min; Gradient: 93% zu 70% Lösung B über 23 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1225.6623$ gerechnet für C₆₂H₈₈N₁₂O₁₄+H [M+H]⁺; gefunden: 1225.6609.

Synthese von Ac-Pro₁₅-OH 61

Peptid **61** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.12 mmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.51 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 10.5$ min; Gradient: 88% zu 65% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1515.3 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₇₇H₁₀₉N₁₅O₁₇.

Synthese von Ac-Pro₁₈-OH **10**

Peptid **10** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.11 mmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.55 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 10.9$ min; Gradient: 88% zu 65% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1806.3 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₉₂H₁₃₀N₁₈O₂₀.

8.3.3. Synthese der Peptide mit einer Azp Einheit in jeder 3. Position, Ac-[Pro-Azp-Pro]_n-OH, n=2-6

Synthese von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₂-OH 36S

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 60 µmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 9.4$ min; Gradient: 90% zu 70% Lösung B über 21 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 723.9 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₃₂H₄₄N₁₂O₈.

Synthese von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₃-OH 37S

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 40 µmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 8.3$ min; Gradient: 85% zu 65% Lösung B über 25 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1055.8 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₆₄N₁₈O₁₁.

Synthese von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₄-OH 38S

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 75 µmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 6.6$ min; Gradient: 80% zu 73% Lösung B über 10 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = (100) 1387.4 [M+Na]⁺, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₅-OH 39S

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 75 µmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 7.7$ min; Gradient: 80% zu 75% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1719.8 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₇₇H₁₀₄N₃₀O₁₇.

Synthese von Ac-[Pro-(4S)Azp-Pro]₆-OH **12S**

Peptid **12S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.14 mmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 11.7$ min; Gradient: 80% zu 60% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , 25°C): $\delta/\text{ppm} = 4.79 - 4.69$ (m, 6H), 4.41 (m, 7H), 4.14 (m, 6H), 3.80 (m, 12H), 3.57 (m, 18H), 2.71 (m, 6H), 2.31 (m, 12H), 2.09 – 1.82 (m, 45H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 23°C): $\delta/\text{ppm} = 175.9, 172.5, 172.2, 172.0, 171.4, 170.5, 170.2, 59.5, 59.0, 58.9, 58.6, 58.5, 58.4, 58.2, 57.4, 57.3, 51.7, 48.6, 47.4, 47.2, 32.7, 28.7, 28.5, 27.9, 27.8, 24.6, 24.1, 21.2$.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 2052.6 (100) $[\text{M-H}]^-$, gerechnet für $\text{C}_{92}\text{H}_{124}\text{N}_{36}\text{O}_{20}$.

Synthese von Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₂-OH **36R**

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 80 μmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 11.0$ min; Gradient: 90% zu 70% Lösung B über 21 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 723.9 (100) $[\text{M-H}]^-$, gerechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_{12}\text{O}_8$.

Synthese von Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₃-OH **37R**

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 75 μmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 14.9$ min; Gradient: 90% zu 70% Lösung B über 21 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1056.0 (100) $[\text{M-H}]^-$, gerechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{64}\text{N}_{18}\text{O}_{11}$.

Synthese von Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₄-OH **38R**

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 μ mol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 7.5$ min; Gradient: 80% zu 75% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1387.6 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₅-OH **39R**

Peptid **36S** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 55 μ mol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH (**7S**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 9.8$ min; Gradient: 80% zu 70% Lösung B über 16 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1719.6 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₇₇H₁₀₄N₃₀O₁₇.

Synthese von Ac-[Pro-(4R)Azp-Pro]₆-OH **12R**

Peptid **12R** wurde entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.14 mmol auf Wang Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.39 mmol/g) synthetisiert. Dazu wurde der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4R)Azp-Pro-OH (**7R**) manuell gekoppelt.

Analytische HPLC: $t_R = 12.8$ min; Gradient: 80% zu 60% Lösung B über 21 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.80 (m, zusammen mit dem Signal des Lösungsmittels), 4.70 (m, 12H), 4.50 (m, 6H), 4.42 (m, 1H), 3.96 (m, 6H), 3.82 (m, 18H), 3.61 (m, 12H), 2.49 (m, 6H), 2.32 (m, 12H), 2.15 – 1.81 (m, 45H). ¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 23°C): δ /ppm = 175.9, 172.5, 172.4, 171.8, 171.4, 171.1, 170.6, 60.1, 60.1, 59.5, 58.6, 58.4, 58.1, 57.0, 52.2, 52.1, 48.5, 47.6, 47.4, 33.1, 33.0, 28.7, 28.4, 27.8, 27.7, 24.4, 24.2, 21.1.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 2052.4 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₉₂H₁₂₄N₃₆O₂₀.

8.3.4. Synthese der Azidoprolin 9-mere **11S** und **11R**

Synthese von Ac [(4S)Azp]₉-OH **11S**

Peptid **11S** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 80 μ mol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.40 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: t_R = 16.6 min; Gradient: 80% zu 50% Lösung B über 25 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.31 (m, 9H; H γ), 4.01 (m, 7H; H δ), 3.92 (m, 1H; H δ), 3.81 (m, 1H; H δ), 3.51 (m, 1H; H δ), 3.41 (m, 8H; H δ), 2.59 (m, 8H; H β), 2.44 (m, 1H; H β), 2.12 (m, 1H; H β), 1.97 (s, 3H; Ac), 1.91 (m, 8H; H β), die Signale für H α fallen mit dem Lösungsmittelsignal bei ~ 4.70 ppm zusammen.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1301.5 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₅₈N₃₆O₁₁.

Synthese von Ac [(4R)Azp]₉-OH **11R**

Peptid **11R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-(4S)Azp-OH (**2R**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 80 μ mol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.40 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: t_R = 22.9 min; Gradient: 80% zu 50% Lösung B über 25 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.40 (m, 9H; H γ), 3.89 (m, 8H; H δ), 3.76 (m, 1H; H δ), 3.71 (m, 8H; H δ), 3.36 (m, 1H; H δ), 2.36 (m, 9H; H β), 2.11-1.90 (m, 9H; H β), 1.98 (s, 3H; Ac), die Signale für H α fallen mit dem Lösungsmittelsignal bei ~ 4.70 ppm zusammen.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1301.5 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₅₈N₃₆O₁₁.

8.3.5. Synthese der Oligoprolin Peptide 71, 49, 50, 72 auf Rink-Amid Harz

Allgemeine Bemerkung zur Aufreinigung

Als Verunreinigung trat jeweils das Peptid mit der Carbonsäure anstelle vom Carboxamid auf. Diese hat mit dem Lösungsmittelsystem 0.1% TFA in H₂O/CH₃CN eine nur geringfügig erhöhte HPLC-Retentionszeit im Vergleich zu Produkt. Wenn kein TFA beigefügt wurde, war die Retentionszeit der Säure deutlich geringer und konnte besser abgetrennt werden.

Synthese von Ac-Pro₁₈-NH₂ 71

Peptid **12R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 0.080 mmol auf Rink-Amid Harz (Beladung: 0.62 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 15.1$ min; Gradient: 90% to 70% Lösung B über 21 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25°C): δ /ppm = 4.58 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 17H), 4.24 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.79 (dt, $J = 9.7$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 18H), 3.48 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 6.6$ Hz, 18H), 2.20 (m, 18H), 1.97- 1.73(m, 57H). NMR (126 MHz, D₂O, 23°C): δ /ppm = 172.0, 60.6, 58.9, 48.1, 29.9, 28.4, 28.3, 24.9.

MS (ESI): m/z (%) = 1828.9 (75) [M+Na]⁺, 926.5 (100) [M+2Na]²⁺ gerechnet für C₉₂H₁₃₁N₁₉O₁₉.

Synthese von Ac-Pro₁₂-NH₂ 49

Peptid **12R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 36 μ mol auf Rink-Amid Harz (Beladung: 0.71 mmol/g) synthetisiert.

Analytical HPLC: $t_R = 14.7$ min; gradient: 93% to 66% solvent B over 20 min at a flow rate of 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1224.6783$ gerechnet für C₆₂H₈₉N₁₃O₁₃+H [M+H]⁺; gefunden: 1224.6780.

Synthese von TFA•H-Pro₁₂-NH₂ 50

Peptid **12R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 36 μ mol auf Rink-Amid Harz (Beladung: 0.71 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 12.7$ min; Gradient: 93% zu 69% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1182.6677$ gerechnet für $C_{60}H_{87}N_{13}O_{12}+H$ $[M+H]^+$; gefunden: 1182.6652.

Ac-[Pro]₁₂-Gly-Tyr-NH₂ **72**:

Peptid **12R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH bzw. Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 36 μ mol auf Rink-Amid Harz (Beladung: 0.71 mmol/g) synthetisiert.

Analytical HPLC: $t_R = 8.3$ min; gradient: 85% to 65% solvent B over 15 min at a flow rate of 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1444.7631$ gerechnet für $C_{72}H_{101}N_{15}O_{16}+H$ $[M+H]^+$; gefunden: 1444.7626.

8.3.6. Synthese der Peptide 63, 52 und 62 mit freiem N- und freiem C-Terminus

Synthese von TFA•H-Pro₆-OH 55

Peptid **55** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 64 μmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC (Sunfire Säule): $t_R = 11.6$ min; Gradient: 97% zu 80% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 645.6 (100) $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_7$.

Synthese von TFA•H-Pro₁₂-OH 52

Peptid **52** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 μmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.31 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 12.3$ min; Gradient: 90% zu 70% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1183.6517$ gerechnet für $\text{C}_{60}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{13}+\text{H}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1183.6516.

Synthese von TFA•H-Pro₁₈-OH 62

Peptid **62** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 64 μmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.32 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC (Sunfire Säule): $t_R = 10.4$ min; Gradient: 89% zu 74% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1809.9 (100) $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{90}\text{H}_{128}\text{N}_{18}\text{O}_{19}$.

8.3.7. Synthese der Peptide 56-60 und 53-54 zur Untersuchung des Startpunktes der Umwandlung PPI/PPII

Synthese von Ac-[(4S)Azp]₄-[Pro]₈-OH 56S

Peptid **46S** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.30 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 11.6$ min; Gradient: 85% zu 59% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1387.1 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro]₄-[(4S)Azp]₄-[Pro]₄-OH 57S

Peptid **57S** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.30 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 12.7$ min; Gradient: 85% zu 50% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1387.3 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro]₈-[(4S)Azp]₄-OH 58S

Peptid **58S** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.31 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 11.3$ min; Gradient: 85% zu 50% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1387.6 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[(4R)Azp]₄-[Pro]₈-OH 56R

Peptid **56R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.30 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 14.7$ min; Gradient: 85% zu 59% Lösung B über min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1388.4 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro]₄-(4R)Azp]₄-[Pro]₄-OH **57R**

Peptid **57R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.30 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 14.2$ min; Gradient: 85% zu 59% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1387.8 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-[Pro]₈-(4R)Azp]₄-OH **58R**

Peptid **58R** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH bzw. Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**) entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.33 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 14.5$ min; Gradient: 85% zu 59% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1388.0 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₆₂H₈₄N₂₄O₁₄.

Synthese von Ac-Pro₁₂-Gly-Tyr-OH **59**

Peptid **59** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH bzw. Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.33 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 12.2$ min; Gradient: 88% zu 50% Lösung B über 27 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1445.7471$ gerechnet für C₇₃H₁₀₀N₁₄O₁₇+H [M+H]⁺; gefunden: 1445.7470.

Synthese von Ac-Tyr-Gly-Pro₁₂-OH **60**

Peptid **60** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH bzw. Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 50 µmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.30 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC: $t_R = 11.4$ min; Gradient: 88% zu 50% Lösung B über 27 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

HRMS (ESI): $m/z = 1445.7471$ gerechnet für C₇₃H₁₀₀N₁₄O₁₇+H [M+H]⁺; gefunden: 1445.7458.

Synthese von Ac-Pro₁₁-(4S)Azp-OH **54**

Peptid **54** wurde in Einzelkupplungen von Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) bzw. Fmoc-Pro-OH entsprechend dem allgemeinen Protokoll im Massstab von 80 μmol auf 2-Chlorotrityl Harz (Beladung nach erster Kupplung: 0.40 mmol/g) synthetisiert.

Analytische HPLC (Sunfire Säule): $t_R = 11.6$ min; Gradient: 90% zu 75% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1310.6 (100) $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{62}\text{H}_{87}\text{N}_{15}\text{O}_{14}$.

Synthese von Ac-Pro₁₁-(4S)Amp-OH **53**

12 mg (10 μmol) Ac-Pro₁₁-(4S)Azp-OH (**54**) wurden in 1 ml MeOH gelöst und mit 5 mg Pd/C (10% Pd) und 1 μl konz. HCl-Lösung versetzt. Nach starkem Rühren der Mischung bei einer H_2 -Atmosphäre für 7 h wurde die Suspension über Celite filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Et_2O aus MeOH/ CH_2Cl_2 gefällt. Isoliert wurden 12 mg (9.4 μmol) **53** als weisser Feststoff.

Analytische HPLC: $t_R = 10.4$ min; Gradient: 88% zu 70% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI, neg): m/z (%) = 1263.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gerechnet für $\text{C}_{62}\text{H}_{89}\text{N}_{13}\text{O}_{14}$.

8.3.8. Synthese der Peptide **41S** und **41R** als Vorstufen der Aminoprolin-haltigen Peptide **42S** und **42R**

Synthese von Ac-[(4S)Azp-Pro-(4S)Azp]₃-OH **41S**

Peptid **41S** wurde auf 2-chlorotrityl Harz in Einzelkupplungen von Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) bzw. Fmoc-Pro-OH nach den allgemeinen Protokollen in einem Massstab von 0.17 mmol synthetisiert. Die Funktionalisierung des Harzes mit Fmoc-(4S)Azp-OH (**2S**) ergab eine Beladung von 0.28 mmol/g.

Analytische HPLC: $t_R = 17.3$ min; Gradient: 88% zu 50% Lösung B über 27 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1178 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₆₁N₂₇O₁₁.

Synthese von Ac-[(4R)Azp-Pro-(4R)Azp]₃-OH **41R**

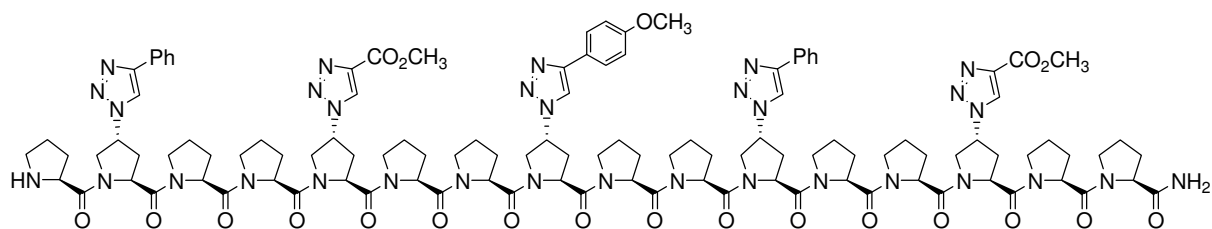
Peptid **41R** wurde auf 2-chlorotrityl Harz in Einzelkupplungen von Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**) bzw. Fmoc-Pro-OH nach den allgemeinen Protokollen in einem Massstab von 0.18 mmol synthetisiert. Die Funktionalisierung des Harzes mit Fmoc-(4R)Azp-OH (**2R**) ergab eine Beladung von 0.30 mmol/g.

Analytische HPLC: $t_R = 17.3$ min; Gradient: 88% zu 50% Lösung B über 27 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1178 (100) [M-H]⁻, gerechnet für C₄₇H₆₁N₂₇O₁₁.

8.3.9. Synthese der Triazolylpeptide („Click Reaktion“) 45-48

Synthese des 16-mer **45R**

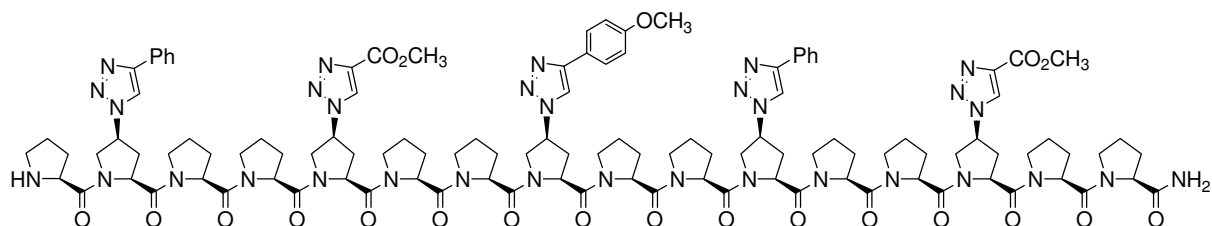


In einer ersten Kupplung nach dem allgemeinen Protokoll wurde die Beladung vom Rink-Amid Harz von 0.71 mmol g^{-1} auf 0.30 mmol g^{-1} reduziert. Dazu wurden je 1.5 eq Fmoc-Pro-OH and AcOH als Carbonsäure Komponente eingesetzt. Nach dem allgemeinen Protokoll wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4*R*)Azp-Pro-OH (**7R**) auf 200 mg Harz gekuppelt. Das Harz wurde dann in 500 μl DMF und 500 μl THF suspendiert, mit 26 μl (310 μmol) Methylpropiolat, 1.0 mg (5.2 μmol) CuI, 39 μl (236 μmol) $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mit IR Spektroskopie von wenig Harz, das mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen wurde, verfolgt. Nachdem das Signal der Azid-Schwingung bei 2103 cm^{-1} nicht mehr vorhanden war, wurde die Suspension abfiltriert und das Harz mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen. Die Fmoc-Entschützung und die Kupplung von **7R** wurden nach dem allgemeinen Protokoll vorgenommen. Die zweite „Click“ Reaktion wurde mit 33 μl (310 μmol) Phenylacetylen, die dritte mit 39 μl (308 μmol) Ethynylanisol (2 Mal wiederholt), die vierte mit 26 μl (310 μmol) Methylpropiolat und die fünfte mit 33 μl (310 μmol) Phenylacetylen unter anderweitig identischen Bedingungen wiederholt. Fmoc-Entschützung und Abspaltung vom Rink-Amid Harz wurden gemäss dem allgemeinen Protokoll durchgeführt, worauf 74 mg (52% Ausbeute der Theorie, nicht eingerechnet sind die kleinen Harzproben (ca. 5 mg) für die IR und MS-ESI Analysen eingesetzt wurden) Rohprodukt **45R** isoliert wurden. Das Rohprodukt (HPLC ca. 60% rein) wurde mittels Umkehrphasen HPLC gereinigt: Gradient: 75% auf 55% Lösung B (0.1% TFA in H_2O) zu Lösung A (CH_3CN) über 30 min bei einer Flussrate von 4 ml/min.

Analytische HPLC: $t_R = 17.0 \text{ min}$; Gradient: 80% zu 40% Lösung B über 25 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 2279.9 (10) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1140.6 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, gerechnet für $\text{C}_{113}\text{H}_{118}\text{N}_{32}\text{O}_{21}$.

Synthese des 16-mers **45S**

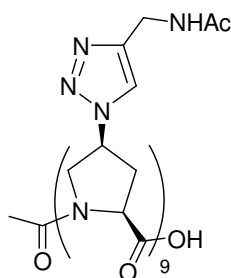


Das 16-mer **45S** wurde analog zu **45R** synthetisiert, wobei der trimere Baustein Fmoc-Pro-(4*S*)Azp-Pro-OH (**7S**) eingesetzt wurde. Isoliert wurden 41 mg (18 μ mol, nach der dritten „Click“ Reaktion wurde $\frac{1}{2}$ des Harzes entnommen, ansonsten selber Massstab wie für **45R**) **45S** als weisses Pulver.

Analytische HPLC: $t_R = 14.8$ min; Gradient: 80% zu 40% Lösung B über 25 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (ESI): m/z (%) = 1151.5 (100) $[M+Na+H]^{2+}$, gerechnet für $C_{113}H_{118}N_{32}O_{21}$.

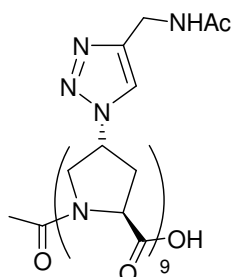
Synthese des 9-mers **46S**



2-Chlorotrityl Harz wurde in Einzelkupplungen nach dem allgemeinen Protokoll mit Ac-[(4*S*)Azp]₉-funktionalisiert. Die Beladung nach der ersten Kupplung auf das Harz betrug 0.33 mmol/g. Die „Click“ Reaktion wurde mit 22 μ mol durchgeführt. Dazu wurde das Harz in 500 μ l DMF und 500 μ l THF suspendiert und mit 9 x 5 eq Alkin (96 mg acetyliertes Propargylamin) 1 mg CuI und 9 x 3.8 eq *i*Pr₂NEt versetzt und für mindestens 12 h geschüttelt. Der Umsatz der Reaktion wurde wiederum mittels IR Spektroskopie verfolgt. Danach wurde die Mischung vom Harz abfiltriert und das Harz mit DMF, MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen. Die Abspaltung vom Harz mit TFE/AcOH/CH₂Cl₂ im Verhältnis 1:1:8 und die HPLC Aufreinigung erfolgte nach dem allgemeinen Protokoll.

Analytische HPLC: $t_R = 13.0$ min; Gradient: 96% zu 72% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

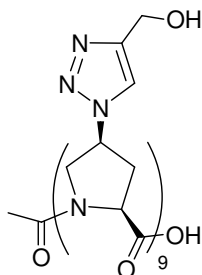
MS (MALDI-TOF): $m/z = 2176.0$ [M]⁻, gerechnet für $C_{92}H_{121}N_{45}O_{20}$.

Synthese des 9-mers **46R**

Die „Click“ Reaktion wurde mit Ac-[(4*R*)Azp]₉- auf 2-Chlorotriptyl Harz mit einer Beladung von 0.30 mmol/g nach der ersten Kupplung im Massstab von 27 μmol durchgeführt. Die Bedingungen der Peptidkupplungen und der Cycloaddition entsprachen der Synthese von **46S** (Seite 183).

Analytische HPLC: $t_R = 13.3$ min; Gradient: 96% zu 72% Lösung B über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

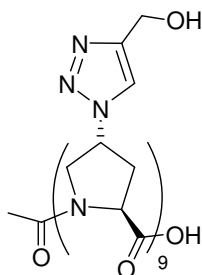
MS (MALDI-TOF): $m/z = 2176.0$ [M+1]⁻, gerechnet für C₉₂H₁₂₁N₄₅O₂₀.

Synthese des 9-mers **47S**

Die „Click“ Reaktion wurde mit Ac-[(4*S*)Azp]₉- auf 2-Chlorotriptyl Harz mit einer Beladung von 0.33 mmol/g nach der ersten Kupplung im Massstab von 22 μmol durchgeführt. Die Bedingungen der Peptidkupplungen und der Cycloaddition entsprachen der Synthese von **46S** (Seite 183) mit Propargylalkohol als Alkin Komponente.

Analytische HPLC: $t_R = 13.1$ min; Gradient: 98% zu 75% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

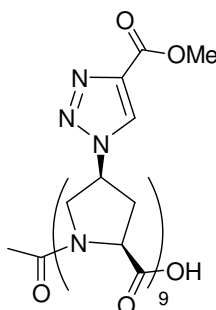
MS (MALDI-TOF): $m/z = 1830.9$ [M+Na+1]⁺, 1808.9 [M+H+1]⁺ bzw. 1806.7 [M]⁻, gerechnet für C₇₄H₉₄N₃₆O₂₀.

Synthese des 9-mers **47R**

Die „Click“ Reaktion wurde mit Ac-[(4*R*)Azp]₉- auf 2-Chlorotrityl Harz mit einer Beladung von 0.30 mmol/g nach der ersten Kupplung im Massstab von 27 μmol durchgeführt. Die Bedingungen der Peptidkupplungen und der Cycloaddition entsprachen der Synthese von **46S** (Seite 183) mit Propargylalkohol als Alkin Komponente.

Analytische HPLC: $t_R = 13.1$ min; Gradient: 98% zu 75% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

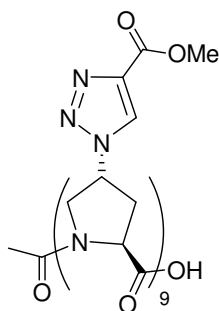
MS (MALDI-TOF): $m/z = 1831.0$ [M+Na+1]⁺, 1847.0 [M+K+1]⁺, 1809.1 [M+H+1]⁺, gerechnet für C₇₄H₉₄N₃₆O₂₀.

Synthese des 9-mers **48S**

Die „Click“ Reaktion wurde mit Ac-[(4*S*)Azp]₉- auf 2-Chlorotrityl Harz mit einer Beladung von 0.37 mmol/g nach der ersten Kupplung im Massstab von 26 μmol durchgeführt. Die Bedingungen der Peptidkupplungen und der Cycloaddition entsprachen der Synthese von **46S** (Seite 183) mit Methylpropiolat als Alkin Komponente.

Analytische HPLC: $t_R = 9.5$ min; Gradient: 75% zu 50% Lösung B über 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (MALDI-TOF): $m/z = 2058.7$ [M+1]⁺, gerechnet für C₈₃H₉₄N₃₆O₂₉.

Synthese des 9-mers **48R**

Die „Click“ Reaktion wurde mit Ac-[(4*R*)Azp]₉- auf 2-Chlorotrityl Harz mit einer Beladung von 0.30 mmol/g nach der ersten Kupplung im Massstab von 27 μmol durchgeführt. Die Bedingungen der Peptidkupplungen und der Cycloaddition entsprachen der Synthese von **46S** (Seite 183) mit Methylpropiolat als Alkin Komponente.

Analytische HPLC: $t_R = 12.1$ min; Gradient: 80% zu 40% Lösung B über 18 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

MS (MALDI-TOF): $m/z = 2058.7$ [M+1]⁺, gerechnet für C₈₃H₉₄N₃₆O₂₉.

8.4. Kristallstrukturdaten

Crystal data for triazole **14S**: formula $C_{13}H_{22}N_4O_3Si_1$, $M = 310.43$, $F(000) = 664$, colorless plate, size $0.12 \cdot 0.26 \cdot 0.32 \text{ mm}^3$, orthorhombic, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 8.9950(2) \text{ \AA}$, $b = 9.9946(2) \text{ \AA}$, $c = 18.4970(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1662.91(6) \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.240 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Nonius KappaCCD diffractometer at 173K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 27.900^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.96/0.98, $\mu = 0.156 \text{ mm}^{-1}$. The COLLECT suite²⁴³ has been used for datacollection and integration. From a total of 14016 reflections, 3959 were independent (merging $r = 0.042$). From these, 2739 were considered as observed ($I > 3.0\sigma(I)$) and were used to refine 191 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0280$ (observed data), $wR = 0.0433$ (all data), $GOF = 1.1148$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.18/0.15 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement

Crystal data for triazole **14R**: formula $C_{13}H_{22}N_4O_3Si_1$, $M = 310.43$, $F(000) = 664$, colorless plate, size $0.14 \cdot 0.21 \cdot 0.22 \text{ mm}^3$, orthorhombic, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 8.8499(2) \text{ \AA}$, $b = 9.7173(2) \text{ \AA}$, $c = 19.1010(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1642.63(6) \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.255 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Nonius KappaCCD diffractometer at 173K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 27.874^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.97/0.98, $\mu = 0.158 \text{ mm}^{-1}$. The COLLECT suite²⁴³ has been used for datacollection and integration. From a total of 13669 reflections, 3928 were independent (merging $r = 0.049$). From these, 2423 were considered as observed ($I > 3.0\sigma(I)$) and were used to refine 191 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0283$ (observed data), $wR = 0.0421$ (all data), $GOF = 1.1443$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.16/0.18 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement.

Crystal data for triazole **18S**: formula $C_{17}H_{20}N_4O_4$, $M = 344.37$, $F(000) = 728$, colorless plate, size $0.04 \cdot 0.10 \cdot 0.52 \text{ mm}^3$, orthorhombic, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 6.4949(2) \text{ \AA}$, $b = 10.3056(2) \text{ \AA}$, $c = 24.4612(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1637.28(7) \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.397 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Nonius KappaCCD diffractometer at 173K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 28.015^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.99/1.00, $\mu = 0.102 \text{ mm}^{-1}$. The COLLECT suite²⁴³ has been used for datacollection and integration. From a total of 11998 reflections, 2275 were independent (merging $r = 0.046$). From these, 1916 were considered as observed ($I > 1.0\sigma(I)$) and were used to refine 226 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0342$ (observed data), $wR = 0.0466$ (all data), $GOF = 0.9920$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.25/0.15 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement.

Crystal data for the triazole **20R**: formula $C_{10}H_{14}N_4O_3$, $M = 238.25$, $F(000) = 252$, colorless plate, size $0.07 \cdot 0.31 \cdot 0.40 \text{ mm}^3$, monoclinic, space group $P 2_1$, $Z = 2$, $a = 6.3423(4) \text{ \AA}$, $b = 9.5450(7) \text{ \AA}$, $c = 9.7259(7) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 101.2550(10)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 577.46(7) \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.370 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Kappa APEX diffractometer at 123K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 37.250^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.97/0.99, $\mu = 0.104 \text{ mm}^{-1}$. The APEX2 software²⁴⁷ has been used for datacollection and integration. From a total of 19119 reflections, 3101 were independent (merging $r = 0.021$). From these, 3055 were considered as observed ($I > 2.0\sigma(I)$) and were used to refine 154 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0274$ (observed data), $wR = 0.0346$ (all data), $GOF = 1.0409$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.16/0.30 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement.

Crystal data for Ac-[(4S)NHAc-Pro]-OMe (**24S**): formula $C_{10}H_{16}N_2O_4$, $M = 228.25$, $F(000) = 488$, colorless prism, size $0.09 \cdot 0.16 \cdot 0.34 \text{ mm}^3$, orthorhombic, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 9.7275(3) \text{ \AA}$, $b = 9.9461(3) \text{ \AA}$, $c = 11.9118(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1152.47(6) \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.315 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Kappa APEX diffractometer at 123K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 33.107^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.98/0.99, $\mu = 0.102 \text{ mm}^{-1}$. The APEX2 software²⁴⁷ has been used for datacollection and integration. From a total of 10806 reflections, 2370 were independent (merging $r = 0.026$). From these, 2080 were considered as observed ($I > 2.0\sigma(I)$) and were used to refine 154 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0377$ (observed data), $wR = 0.0488$ (all data), $GOF = 1.1174$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.22/0.37 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement.

Crystal data for Ac-(4S)Azp-OMe (**28S**): formula $C_7H_{10}N_4O_3$, $M = 198.18$, $F(000) = 416.199$, colourless plate, size $0.04 \cdot 0.24 \cdot 0.58 \text{ mm}^3$, orthorhombic, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 5.4557(5) \text{ \AA}$, $b = 12.2227(11) \text{ \AA}$, $c = 13.4536(14) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 897.1 \text{ \AA}^3$, $D_{\text{calc.}} = 1.467 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. The crystal was measured on a Enraf Nonius Kappa CCD diffractometer at 173K using graphite-monochromated Mo K_α -radiation with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, $\Theta_{\text{max}} = 30.00^\circ$. Minimal/maximal transmission 0.97/1.00, $\mu = 0.117 \text{ mm}^{-1}$. The COLLECT suite²⁴³ has been used for datacollection and integration. From a total of 22514 reflections, 2619 were independent (merging $r = 0.13$). From these, 1801 were considered as observed ($> 3.00\sigma(I)$) and were used to refine 132 parameters. The structure was solved by direct methods using the program SIR92.²⁴⁴ Least-squares refinement against F was carried out on all non-hydrogen atoms using the program CRYSTALS.²⁴⁵ $R = 0.0425$ (observed data), $wR = 0.0444$ (all data), $GOF = 1.0108$. Minimal/maximal residual electron density = $-0.42/0.36 \text{ e \AA}^{-3}$. Chebychev polynomial weights²⁴⁶ were used to complete the refinement.

9. Anhang

9.1. Literaturverzeichnis und Anmerkungen

1. Wedemeyer, W. J.; Welker, E.; Scheraga H. A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14637-14644.
2. Schmuck, C.; Wennemers, H. *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications* **2004**, VCH, Weinheim, S. 19-30.
3. Reiersen, H.; Rees, A. R. *Trends Biochem. Sci* **2001**, *26*, 679-684.
4. Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744.
5. Schmid, F. *Protein Folding Handbook* **2005**, VCH, Weinheim, 916-945.
6. Grathwohl, C.; Wuethrich, K. *Biopolymers* **1976**, *15*, 2043-57.
7. Reimer, U.; Scherer, G.; Drewello, M.; Kruber, S.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 449-460.
8. Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253-260.
9. MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412.
10. Weiss, M. S.; Jabs, A.; Hilgenfeld, R. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 676.
11. Buchner, J.; Kiefhaber, T. *Protein Folding Handbook*, **2005**, VCH, Weinheim, S. 917.
12. Dugave, C.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475-2532.
13. Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101-1111.
14. Fischer, G. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119-127.
15. Sarkar, P.; Reichman, C.; Saleh, T.; Birge R. B.; Kalodimos C. G. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 413-426.
16. Andreotti, A. H. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9515-9524.
17. Lummis, S. C. R.; Beene, D. L.; Lee, L. W.; Lester, H. A.; Broadhurst, R. W.; Dougherty, D. A. *Nature* **2005**, *438*, 248-252.
18. Eckert, B.; Martin, A.; Balbach, J.; Schmid, F. X. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 619-623.
19. Hinderaker, M. P.; Raines, R. T. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1188-1194.
20. Paulini, R.; Muller, K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1788-1805.
21. Maccallum, P. H.; Poet, R.; Milner-White, E. J. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 374-384.
22. DeRider, M. L.; Wilkens, S. J.; Waddell, M. J.; Bretscher, L. E.; Weinhold, F.; Raines, R. T. Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497-2505.
23. Bretscher, L. E.; Jenkins, C. L.; Taylor, K. M.; DeRider, M. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777-778.
24. Hodges, J. A.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4695-4697.
25. Burgi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5065-5067.
26. Buergi, H. B.; Dunitz, J. D.; Lehn, J. M.; Wipff, G. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1563-1572.
27. Buergi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1974**, *30*, 1517-1527.
28. Buergi, H. B.; Lehn, J. M.; Wipff, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1956-1957.
29. $K_{cis/trans}$ von Ac-Pro-OMe wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ in D_2O bestimmt. $K = 4.9$ wird ebenso von Renner, C.; Alefelder, S.; Bae, J. H.; Budisa, N.; Huber, R.; Moroder, L. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **2001**, *40*, 923-925 angegeben, während Raines und Mitarbeiter Werte von 4.6 (Ref. 19) oder 5.3 (unter anderem Ref. 23) beschreibt.
30. Magaard, V. W.; Sanchez, R. M.; Bean, J. W.; Moore, M. L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 381-384.

31. An, S. S. A.; Lester, C. C.; Peng, J.-L.; Li, Y.-J.; Rothwarf, D. M.; Welker, E.; Thannhauser, T. W.; Zhang, L. S.; Tam, J. P.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11558-11566.
32. Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *Biopolymers* **2000**, *53*, 249-256.
33. Delaney, N. G.; Madison, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635-6641.
34. Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D. E.; Rohwedder, B.; Woehr, T.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 918-925.
35. Woehr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
36. Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wuhr, T. *Peptide Res.* **1995**, *8*, 145-153.
37. Sonntag, L.-S.; Schweizer, S.; Ochsenfeld, C.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14697-14703.
38. Wennemers, H.; Conza, M.; Nold, M.; Krattiger, P. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3342-3347.
39. Conza, M.; Wennemers, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696-2698.
40. Sonntag, L.-S.; Ivan, S.; Langer, M.; Conza, M. M.; Wennemers, H. *Synlett* **2004**, *7*, 1270-1272.
41. Cadamuro, S. A.; Reichold, R.; Kusebauch, U.; Musiol, H.-J.; Renner, C.; Tavan, P.; Moroder, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2143-2146.
42. Song, I. K.; Kang, Y. K. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16982-16987.
43. DeTar, D. F.; Luthra, N. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1232-1244.
44. Wolfe, S. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 102-111.
45. Bitencourt, M.; Freitas, M. P.; Rittner, R. *J. Mol. Struct.* **2007**, *840*, 133-136.
46. Freitas, M. P.; Rittner, R. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 7233-7236.
47. Rablen, P. R.; Hoffmann, R. W.; Hrovat, D. A.; Borden, W. T. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1999**, *8*, 1719-1726.
48. Goodman, L.; Gu, H.; Pophristic, V. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1223-1229.
49. Deslongchamps, P. *Organic Chemistry Series, Vol. 1: Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry* **1983**, S. 390.
50. Kotch, F. W.; Guzei, I. A.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2952-2953.
51. Shoulders, M. D.; Hodges, J. A.; Raines, R. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8112-8113.
52. Shoulders, M. D.; Guzei, I. A.; Raines, R. T. *Biopolymers* **2008**, *89*, 443-454.
53. Jenkins, C. L.; McCloskey, A. I.; Guzei, I. A.; Eberhardt, E. S.; Raines, R. T. *Biopolymers* **2005**, *80*, 1-8.
54. Thomas, K. M.; Naduthambi, D.; Tririya, G.; Zondlo, N. J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2397-2400.
55. Owens, N. W.; Braun, C.; O'Neil, J. D.; Marat, K.; Schweizer, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11670-11671.
56. Mauger, A. B. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1205-1211.
57. Raines Ronald, T. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1219-1225.
58. Brodsky, B.; Baum, J. *Nature* **2008**, *453*, 998-999.
59. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 3rd Edition, **2004**, VCH, Weinheim, S. 234-235.
60. Berg, R. A.; Prockop, D. J. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1973**, *52*, 115-120.
61. Privalov, P. L. *Adv. Protein Chem.* **1982**, *35*, 1-104.
62. Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Science* **1994**, *266*, 75-81.
63. Holmgren, S. K.; Taylor, K. M.; Bretscher, L. E.; Raines, R. T. *Nature* **1998**, *392*, 666-667.
64. Shoulders, M. D.; J., K. K.; Raines, R. T. "Origin of the Stability Coferred upon Collagen by Fluorination", *Bioorg. Med. Chem.* **2009**.
65. Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mazzarella, L.; Zagari, A. *Biopolymers* **2001**, *58*, 459-464.

66. Jenkins, C. L.; Raines, R. T. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 49-59.
67. Berisio, R.; De Simone, A.; Ruggiero, A.; Improta, R.; Vitagliano, L. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 131-140.
68. Steinberg, I. Z.; Harrington, W. F.; Berger, A.; Sela, M.; Katchalski, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5263-5279.
69. Cowan, P. M.; McGavin, S. *Nature* **1955**, *176*, 501-503.
70. Tranb, W.; Shmueli, U. *Nature* **1963**, *198*, 1165-1166.
71. Rabanal, F.; Ludevid, M. D.; Pons, M.; Giralt, E. *Biopolymers* **1993**, *33*, 1019-1028.
72. Silifardi, G.; Drake, A. F. *Biopolymers* **1995**, *37*, 281-292.
73. Kelly, M. A.; Chellgren, B. W.; Rucker, A. L.; Troutman, J. M.; Fried, M. G.; Miller, A.-F.; Creamer, T. P. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14376-14383.
74. Traub, W.; Piez, K. A. *Adv. Protein Chem.* **1971**, *25*, 243-352.
75. Engel, J.; Baechinger, H. P. *To. Curr. Chem.* **2005**, *247*, 7-33.
76. Baechinger, H. P.; Engel, J. *Protein Folding Handbook* **2005**, VCH, Weinheim , 1059-1110.
77. Bochicchio, B.; Tamburro, A. M. *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.
78. Pepe, A.; Armenante, M. R.; Bochicchio, B.; Tamburro, A. M. *Soft Matter* **2008**, *5*, 104-113.
79. Ferris, P. J.; Woessner, J. P.; Waffenschmidt, S.; Kilz, S.; Drees, J.; Goodenough, U. W. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2978-2987.
80. Kay, B. K.; Williamson, M. P.; Sudol, M. *FASEB J.* **2000**, *14*, 231-241.
81. Holt, M. R.; Koffer, A. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 38-46.
82. Stapley, B. J.; Creamer, T. P. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 587-595.
83. Rath, A.; Davidson, A. R.; Deber, C. M. *Biopolymers* **2005**, *80*, 179-185.
84. Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. E. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 472-493.
85. Hicks, J. M.; Hsu, V. L. *Proteins* **2004**, *55*, 330-338.
86. Toyota, H.; Hosokawa, M.; Urabe, I.; Yomo, T. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1113-1119.
87. Sreerama, N.; Woody, R. W. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10022-10025.
88. Cubellis, M. V.; Caillez, F.; Blundell, T. L.; Lovell, S. C. *Proteins* **2005**, *58*, 880-892.
89. Krimm, S.; Tiffany, M. L. *Isr. J. Chem.* **1974**, *12*, 189-200.
90. Shi, Z.; Chen, K.; Liu, Z.; Kallenbach, N. R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1877-1897.
91. Dukor, R. K.; Keiderling, T. A. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747-1761.
92. Woody, R. W. *Adv. Biophys. Chem.* **1992**, *2*, 37-79.
93. Mezei, M.; Fleming, P. J.; Srinivasan, R.; Rose, G. D. *Proteins* **2004**, *55*, 502-507.
94. Whittington, S. J.; Chellgren, B. W.; Hermann, V. M.; Creamer, T. P. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6269-6275.
95. Blanch, E. W.; Morozova-Roche, L. A.; Cochran, D. A. E.; Doig, A. J.; Hecht, L.; Barron, L. D. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 553-563.
96. Stryer, L.; Haugland, R. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1967**, *58*, 719-726.
97. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4588.
98. Majumdar, Z. K.; Hickerson, R.; Noller, H. F.; Clegg, R. M. *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 1123-1145.
99. Roda, A.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Mirasoli, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 109-123.
100. Cordes, M.; Kottgen, A.; Jasper, C.; Jacques, O.; Boudebous, H.; Giese, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3461-3463.
101. Giese, B.; Graber, M.; Cordes, M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 755-759.
102. Serron Scafford, A.; Aldridge Iii, W. S.; Fleming Cavan, N.; Danell Ryan, M.; Baik, M.-H.; Sykora, M.; Dattelbaum Dana, M.; Meyer Thomas, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14506-14514.

103. Striplin, D. R.; Reece, S. Y.; McCafferty, D. G.; Wall, C. G.; Friesen, D. A.; Erickson, B. W.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5282-5291.
104. Giese, B.; Wang, M.; Gao, J.; Stoltz, M.; Muller, P.; Graber, M. *J. Org. Chem.* ACS ASAP.
105. Best, R. B.; Merchant, K. A.; Gopich, I. V.; Schuler, B.; Bax, A.; Eaton, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 18964-18969.
106. Schuler, B.; Lipman, E. A.; Steinbach, P. J.; Kumke, M.; Eaton, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 2754-2759.
107. Doose, S.; Neuweiler, H.; Barsch, H.; Sauer, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 17400-17405.
108. Sato, S.-I.; Kwon, Y.; Kamisuki, S.; Srivastava, N.; Mao, Q.; Kawazoe, Y.; Uesugi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 873-880.
109. Pujals, S.; Giralt, E. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 473-484.
110. Fillon, Y. A.; Anderson, J. P.; Chmielewski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11798-11803.
111. Geisler, I.; Chmielewski, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2765-2768.
112. Geisler, I.; Chmielewski, J. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73*, 39-45.
113. Daniels, D. S.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14578-14579.
114. Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240.
115. Meldal, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1016-1051.
116. Moses John, E.; Moorhouse Adam, D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-62.
117. Meldal, M.; Tornoe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
118. Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
119. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
120. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
121. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
122. Gopi, H.; Umashankara, M.; Pirrone, V.; LaLonde, J.; Madani, N.; Tuzer, F.; Baxter, S.; Zentner, I.; Cocklin, S.; Jawanda, N.; Miller, S. R.; Schoen, A.; Klein, J. C.; Freire, E.; Krebs, F. C.; Smith, A. B.; Sodroski, J.; Chaiken, I. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2638-2647.
123. Gopi, H. N.; Tirupula, K. C.; Baxter, S.; Ajith, S.; Chaiken, I. M. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 54-57.
124. Kapoerchan, V. V.; Wiesner, M.; Overhand, M.; van der Marel, G. A.; Koning, F.; Overkleeft, H. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2053-2062.
125. Naud, J.; Lemke, C.; Goudreau, N.; Beaulieu, E.; White, P. D.; Llinas-Brunet, M.; Forgione, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3400-3404.
126. Bautista, A. D.; Craig, C. J.; Harker, E. A.; Schepartz, A. *Curr. Opin. Chem Biol.* **2007**, *11*, 685-692.
127. Liu, D.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.
128. Stephens, O. M.; Kim, S.; Welch, B. D.; Hodsdon, M. E.; Kay, M. S.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13126-13127.
129. Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R.; Seebach, D. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1345-1347.
130. Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368-369.
131. Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848-6849.
132. Sadowsky, J. D.; Schmitt, M. A.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Wang, S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11966-11968.
133. Patch, J. A.; Barron, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12092-12093.
134. Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1497-1502.

135. Yoo, B.; Kirshenbaum, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 714-721.
136. Yin, H.; Lee, G.-i.; Park, H. S.; Payne, G. A.; Rodriguez, J. M.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2704-2707.
137. Yin, H.; Lee, G.-i.; Sedey, K. A.; Kutzki, O.; Park, H. S.; Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Wang, H.-G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10191-10196.
138. Gillies, E. R.; Deiss, F.; Staedel, C.; Schmitter, J.-M.; Huc, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4081-4084.
139. Gillies, E. R.; Dolain, C.; Leger, J.-M.; Huc, I. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7931-7939.
140. Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459-9468.
141. Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048-6057.
142. Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.
143. Yang, L.; Schepartz, A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7469-7478.
144. Hosse, R. J.; Rothe, A.; Power, B. E. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 14-27.
145. Kümin, M., Diplomarbeit, Universität Basel (CH), **2005**.
146. Bodansky, M.; Bodansky, A. *The Practice of Peptide Synthesis* **1994**, 2nd Edition, Springer-Verlag, New York.
147. Kakinoki, S.; Hirano, Y.; Oka, M. *Polym. Bull.* **2005**, *53*, 109-115.
148. Rucker, A. L.; Pager, C. T.; Campbell, M. N.; Qualls, J. E.; Creamer, T. P. *Proteins* **2003**, *53*, 68-75.
149. Engel, J.; Schwarz, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 389-400.
150. Ganser, V.; Engel, J.; Winklmaier, D.; Krause, G. *Biopolymers* **1970**, *9*, 329-352.
151. Engel, J. *Biopolymers* **1966**, *4*, 945-948.
152. Schweizer, S., Dissertation, Universität Tübingen (D), **2009**.
153. Kuemin, M.; Sonntag, L.-S.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 466-467.
154. Zusammenarbeit mit Prof. T. Kiefhaber von der Technischen Universität München (D).
155. Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
156. Zusammenarbeit mit Prof. P.-O. Norrby, Universität Göteborg (S).
157. Sonntag, L.-S. Dissertation, Universität Basel (CH), **2005**.
158. Curran, T. P.; Chandler, N. M.; Kennedy, R. J.; Keaney, M. T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1933-1936.
159. Susi, H. *Methods Enzymol.* **1972**, *26*, 381-391.
160. Steffel, L. R.; Cashman, T. J.; Reutershan, M. H.; Linton, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12956-12957.
161. Milner-White, E. J.; Bell, L. H.; Maccallum, P. H., *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 725-734.
162. Monnard, F. Masterarbeit, Universität Basel (CH), **2007**.
163. Mooney, S. D.; Kollman, P. A.; Klein, T. E. *Biopolymers* **2002**, *64*, 63-71.
164. Flores-Ortega, A.; Casanovas, J.; Nussinov, R.; Aleman, C. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14045-14055.
165. Babu, I. R.; Ganesh, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2079-2080.
166. Umashankara, M.; Ramesh Babu, I.; Ganesh, K. N. *Chem. Commun.* **2003**, 2606-2607.
167. Kramer, R. Z.; Vitagliano, L.; Bella, J.; Berisio, R.; Mazzarella, L.; Brodsky, B.; Zagari, A.; Berman, H. M. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 623-638.
168. Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A., *Protein Sci.* **2002**, *11*, 262-270.
169. Improta, R.; Mele, F.; Crescenzi, O.; Benzi, C.; Barone, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7857-7865.
170. Erdmann, R., Masterarbeit, Universität Basel (CH), **2008**.
171. Panasik, N., Jr.; Eberhardt, E. S.; Edison, A. S.; Powell, D. R.; Raines, R. T. *Int. J. Pept. Pro. Res.* **1994**, *44*, 262-269.

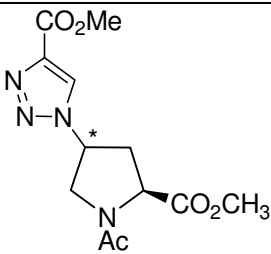
172. Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S. W.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572-6578.
173. Arnett, E. M.; Mitchell, E. J.; Murty, T. S. S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3875-3891.
174. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2000**, S. 287.
175. Wiberg, K. B.; Hadad, C. M.; Rablen, P. R.; Cioslowski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8644-8654.
176. Gorske, B. C.; Bastian, B. L.; Geske, G. D.; Blackwell, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8928-8929.
177. Taylor Carol, M.; Hardre, R.; Edwards Patrick, J. B.; Park Jae, H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4413-4416.
178. Liang, G. B.; Rito, C. J.; Gellman, S. H. *Biopolymers* **1992**, *32*, 293-301.
179. Hunston, R. N.; Gerathanassis, I. P.; Lauterwein, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2654-2661.
180. DelMar, E. G.; Largman, C.; Brodrick, J. W.; Geokas, M. C. *Anal. Biochem.* **1979**, *99*, 316-320.
181. Sonntag, S., Dissertation, Universität Basel (CH), **2005**.
182. Fischer, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1415-1436.
183. Für eine bessere mathematische Anpassung der Kurve wurde noch ein dritter exponentieller Faktor eingeführt.
184. Doi, M.; Nishi, Y.; Kiritoshi, N.; Iwata, T.; Nago, M.; Nakano, H.; Uchiyama, S.; Nakazawa, T.; Wakamiya, T.; Kobayashi, Y. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8453-8459.
185. Higashijima, T.; Tasumi, M.; Miyazawa, T., *Biopolymers* **1977**, *16*, 1259-1270.
186. Krieger, F.; Moeglich, A.; Kiefhaber, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3346-3352.
187. Hamburger James, B.; Ferreon Josephine, C.; Whitten Steven, T.; Hilser Vincent, J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9790-9799.
188. Ferreon, J. C.; Hilser, V. J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7787-7797.
189. Whitten, S. T.; Yang, H.-W.; Fox, R. O.; Hilser, V. J. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1200-1211.
190. Fabien, M., Masterarbeit, Universität Basel (CH), **2007**.
191. Nagel, Y. Dissertation, Universität Basel (CH).
192. Bei bestimmten Lösungsmittelgemischen mit Puffer pH 7.2 bzw. 12 wurde vermutlich aufgrund von Aggregationen kein CD Signal beobachtet. Dies wird in Zukunft genauer untersucht werden.
193. Ac-[(4*S*)Amp-Pro-(4*S*)Amp]₃-OH (**42S**) und Ac-[(4*R*)Amp-Pro-(4*R*)Amp]₃-OH (**42R**) sind in CDCl₃ nicht löslich, womit keine IR-Spektren in diesem Lösungsmittel aufgenommen werden konnten.
194. IR-Spektren von Ac-[(4*S*)Azp]₉-OH (**11S**) und Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]₉-OH (**43S**) zeigen in einem KBr-Pressling jeweils eine Schwingung für die Amidbindung bei 1654 cm⁻¹.
195. Meyer, K. G. *Synlett* **2004**, *13*, 2355-2356.
196. Horng, J.-C.; Raines, R. T. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 74-83.
197. Chellgren, B. W.; Creamer, T. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14734-14735.
198. Schimmel, P. R.; Flory, P. J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1967**, *58*, 52-59.
199. Creamer, T. P.; Campbell, M. N. *Adv. Prot. Chem.* **2002**, *62*, 263-282.
200. Zusammenarbeit mit Prof. J. Engel, Universität Basel (CH).
201. Mutter, M.; Wohn, T.; Gioria, S.; Keller, M. *Biopolymers* **1999**, *51*, 121-128.
202. Zhang, A.; Guo, Y. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8939-8946.
203. Rothe, M.; Rott, H.; Mazanek, J. *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 14th* **1976**, 309-318.
204. Zhang, r.; Madalengoitia, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6235-6238.
205. Unnithan, A. G.; Myer, M. J.; Veale, C. J.; Danell, A. S. *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* **2007**, *18*, 2198-2203.

-
206. Crespo, L.; Sanclimens, G.; Montaner, B.; Perez-Tomas, R.; Royo, M.; Pons, M.; Albericio, F.; Giralt, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8876-8883.
207. Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4885-4898.
208. Hol, W. G. J.; Van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
209. Ref 104, in welcher der Elektronentransport entlang einer PPII Helix untersucht wird, liefert einen experimentellen Hinweis, dass das Dipolmoment den negativen Pol am N-Terminus hat.
210. Fairman, R.; Shoemaker, K. R.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. *Proteins* **1989**, *5*, 1-7.
211. Shoemaker, K. R.; Kim, P. S.; Brems, D. N.; Marqusee, S.; York, E. J.; Chaiken, I. M.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 2349-2353.
212. Hol, W. G. J. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1985**, *45*, 149-195.
213. Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J., *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 1111-1239.
214. Gee, P. J.; van Gunsteren, W. F. *Proteins* **2006**, *63*, 136-143.
215. Hart, S. A.; Bahadoor, A. B. F.; Matthews, E. E.; Qiu, X. J.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4022-4023.
216. Eker, F.; Griebenow, K.; Schweitzer-Stenner, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8178-8185.
217. Chen, K.; Liu, Z.; Kallenbach, N. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 15352-15357.
218. Fasshauer, D.; Antonin, W.; Subramaniam, V.; Jahn, R. *Nature Structural Biology* **2002**, *9*, 144-151.
219. MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412.
220. Engel, J.; Schwarz, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 389-400.
221. Torchia, D. A.; Bovey, F. A. *Macromolecules* **1971**, *4*, 246-251.
222. Lin, L.-N.; Brandts, J. F. *Biochemistry* **1980**, *19*, 3055-3059.
223. Farmer, B. L.; Hopfinger, A. J. *Macromolecules* **1974**, *7*, 793-796.
224. Chellgren, B. W.; Creamer, T. P. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5864-5869.
225. Gill, S. C.; Von Hippel, P. H. *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319-326.
226. Slate, C. A.; Binstead, R. A.; Meyer, T. J.; Erickson, B. W. *Lett. Pept. Sci.* **1999**, *6*, 61-69.
227. Barbarella, G.; Melucci, M.; Sotgiu, G. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1581-1593.
228. Mishra, A.; Ma, C.-Q.; Baeuerle, P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1141-1276.
229. Siringhaus, H.; Brown, P. J.; Friend, R. H.; Nielsen, M. M.; Bechgaard, K.; Langeveld-Voss, B. M. W.; Spiering, A. J. H.; Janssen, R. A. J.; Meijer, E. W.; Herwig, P.; De Leeuw, D. M. *Nature* **1999**, *401*, 685-688.
230. Schenning, A. P. H. J.; Kilbinger, A. F. M.; Biscarini, F.; Cavallini, M.; Cooper, H. J.; Derrick, P. J.; Feast, W. J.; Lazzaroni, R.; Leclere, P.; McDonell, L. A.; Meijer, E. W.; Meskers, S. C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1269-1275.
231. Leclere, P.; Surin, M.; Lazzaroni, R.; Kilbinger, A. F. M.; Henze, O.; Jonkheijm, P.; Biscarini, F.; Cavallini, M.; Feast, W. J.; Meijer, E. W.; Schenning, A. P. H. J. *J. Matr. Che.* **2004**, *14*, 1959-1963.
232. Klok, H.-A.; Roesler, A.; Goetz, G.; Mena-Osteritz, E.; Baeuerle, P. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3541-3544.
233. Nilsson, K. P. R.; Olsson, J. D. M.; Konradsson, P.; Inganaes, O. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6316-6321.
234. Henze, O.; Feast, W. J.; Gardebien, F.; Jonkheijm, P.; Lazzaroni, R.; Leclere, P.; Meijer, E. W.; Schenning, A. P. H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5923-5929.
235. Ghosh, A. K.; Bischoff, A.; Cappiello, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *5*, 821-832.
236. Kraemer, C. S.; Mueller, T. J. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *18*, 3534-3548.

-
237. Upert, G., Postdoc Arbeitskreis Wennemers, Universität Basel (CH).
238. Kroll, C. Dissertation, Universität Basel (CH).
239. Ragetti, C. Masterarbeit. Universität Basel (CH) **2006**.
240. Erdmann, R. Dissertation, Universität Basel (CH).
241. Aucagne, V.; Leigh, D. A. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4505-4507.
242. Experiment durchgeführt von Eva Schillinger, Universität Ulm (D).
243: Nonius BV, Delft, Netherlands (1997-2001).
244: Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M.C.; Polidori, G.; Camalli, M.). *J. Appl. Cryst.* **1994**, 27, 435.
245: Betteridge, P.W.; Carruthers, J.R.; Cooper, R.I.; Prout, K.; Watkin, D.J. *J. Appl. Cryst.* **2003**, 36, 1487.
246: Carruthers, J. R.; Watkin, D. J. *Acta Cryst. A*, **1979**, 35, 698-699.
247: Bruker Analytical X-ray Systems, Inc., 2006. APEX2, Version 2, Madison, USA.

9.2. $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen 13-25, 28 und 29

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 13	Eintrag	Lösungsmittel	13S	13R
	1	D ₂ O	1:2.7	1:4.7
	2	Aceton-d ₆	1:2.8	1: 3.0
	3	CDCl ₃	1:2.2	1:2.7
	4	Dioxan-d ₈	1:2.8	1:3.3
	5	CD ₃ OD	1:2.4	1:3.3

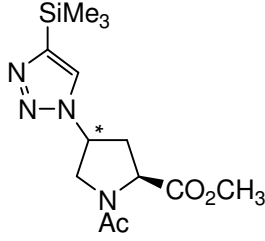
$^1\text{H-}^1\text{H}$ Kopplungskonstanten in Hz: **13S**

Eintrag	$^3J_{(\text{H,H})}$	D ₂ O		Dioxan-d ₈		Aceton-d ₆		CDCl ₃	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.4	8.1	8.0	8.3	8.8	9.2	8.8	8.3
2	H ^α -H ^{β'}	4.2	3.1	7.9	4.5	6.5	3.6	6.5	4.1
3	H ^β -H ^γ	6.4	-	8.0	6.4	7.0	7.0	7.5	7.0
4	H ^{β'} -H ^γ	4.3	-	7.9	6.4	6.8	4.5	6.8	4.0
5	H ^γ -H ^δ	6.2	5.8	7.3	6.9	7.0	7.0	7.2	7.1
6	H ^γ -H ^{δ'}	4.2	2.9	7.5	6.4	6.5	4.3	6.7	3.7
7	H ^{β'} -H ^{δb}	-	-	-	-	-	-	-	-

$^1\text{H-}^1\text{H}$ Kopplungskonstanten in Hz: **13R**

Eintrag	$^3J_{(\text{H,H})}$	D ₂ O		Dioxan-d ₈		Aceton-d ₆		CDCl ₃	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.5	8.8	8.9	8.7	8.7	8.8	8.6	8.5
2	H ^α -H ^{β'}	6.8	5.2	4.1	4.3	5.5	4.6	4.5	6.6
3	H ^β -H ^γ	4.3	5.7	8.3	7.3	6.0	6.3	7.4	6.0
4	H ^{β'} -H ^γ	6.8	-	6.6	6.5	6.4	6.7	6.7	4.8
5	H ^γ -H ^δ	3.4	4.0	6.1	~5	6.0	4.9	6.9	6.5
6	H ^γ -H ^{δ'}	6.1	6.7	7.0	~5	6.6	6.7	5.6	4.4
7	H ^β -H ^{δb}	1	1	-	-	1	1	-	1.1

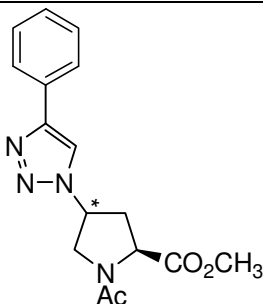
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 14	Lösungsmittel	14S	14R
	CDCl ₃	1:2.5	1:2.8
	CD ₃ OD	1:2.5	1:3.3

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **14** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	14S		14R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	7.9	8.0	8.8	8.6
2	H ^α -H ^β	7.9	8.0	4.5	4.8
3	H ^β -H ^γ	8.0	-	7.5	6.1
4	H ^β -H ^γ	7.8	-	6.6	6.3
5	H ^γ -H ^δ	7.4	7.1	7.0	4.6
6	H ^γ -H ^δ	7.7	4.2	6.0	6.8
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

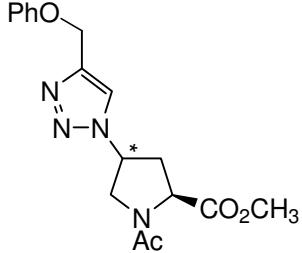
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 15	Lösungsmittel	15S	15R
	CDCl ₃	1:2.4	1:2.5

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **15** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	15S		15R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.8	8.9	8.8	8.6
2	H ^α -H ^β	6.7	3.8	4.5	5.1
3	H ^β -H ^γ	7.7	-	7.6	6.1
4	H ^β -H ^γ	7.0	-	6.7	6.6
5	H ^γ -H ^δ	7.3	7.0	7.0	4.7
6	H ^γ -H ^δ	7.1	4.1	5.6	6.6
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

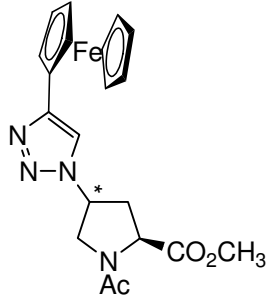
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 16	Lösungsmittel	16S	16R
	CDCl ₃	1:2.4	1:2.6
	CD ₃ OD	1:2.4	1:3.3

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **16** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	16S		16R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.5	9.0	8.8	8.6
2	H ^α -H ^β	7.2	3.8	4.3	4.9
3	H ^β -H ^γ	7.4	-	7.4	5.0
4	H ^β -H ^γ	7.4	-	6.6	6.5
5	H ^γ -H ^δ	7.4	7.1	7.0	4.3
6	H ^γ -H ^δ	7.4	4.3	5.8	6.6
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

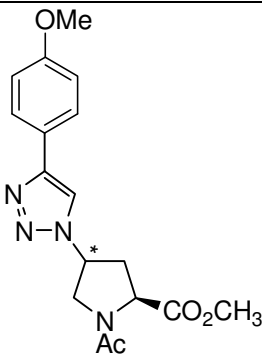
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 17	Lösungsmittel	17S	17R
	CDCl ₃	1:2.5	1:2.8
	CD ₃ OD	1:2.3	1:3.2

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **17** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	17S		17R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.8	8.6	8.6	8.8
2	H ^α -H ^β	4.4	4.9	6.2	4.8
3	H ^β -H ^γ	7.7	6.2	5.7	6.2
4	H ^β -H ^γ	6.7	6.5	6.2	6.7
5	H ^γ -H ^δ	7.0	7.8	6.4	-
6	H ^γ -H ^δ	6.8	6.7	4.7	6.0
7	H ^β -H ^δ	-	1	-	1

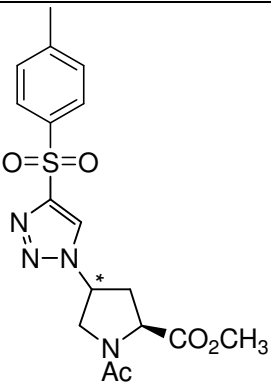
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 18	Lösungsmittel	18S	18R
	CDCl ₃	1:2.4	1:2.6
	CD ₃ OD	1:2.5	1:3.1

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **18** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	18S		18R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.8	9.0	8.8	8.6
2	H ^α -H ^β	6.7	3.7	4.6	5.1
3	H ^β -H ^γ	-	-	7.4	6.0
4	H ^β -H ^γ	7.4	-	6.7	6.5
5	H ^γ -H ^δ	7.4	7.1	6.9	4.5
6	H ^γ -H ^δ	7.2	-	5.7	6.6
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

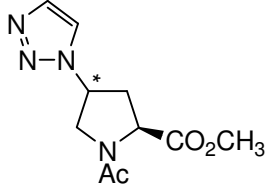
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 19	Lösungsmittel	19S	19R
	CDCl ₃	1:2.2	1:2.5

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **19** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	19S		19R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.9	8.7	8.7	8.5
2	H ^α -H ^β	6.2	3.7	4.5	5.0
3	H ^β -H ^γ	7.4	-	7.7	7.7
4	H ^β -H ^γ	6.5	-	6.7	6.7
5	H ^γ -H ^δ	7.3	7.0	7.0	4.5
6	H ^γ -H ^δ	6.5	3.7	5.8	5.8
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

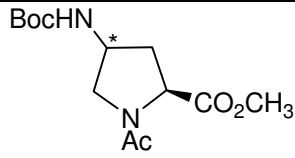
s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 20	Lösungsmittel	20S	20R
	CDCl ₃	1:2.3	1:2.9

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: **20** in CDCl₃.

Eintrag	³ J _(H,H)	20S		20R	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.7	9.1	8.8	8.6
2	H ^α -H ^β	6.9	3.7	4.3	5.0
3	H ^β -H ^γ	7.8	6.8	7.9	5.9
4	H ^β -H ^γ	7.3	3.7	6.6	6.5
5	H ^γ -H ^δ	7.3	7.3	7.0	4.6
6	H ^γ -H ^δ	7.2	3.9	5.8	6.5
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	1

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 21	Eintrag	Lösungsmittel	21S	21R
	1	D ₂ O	1:3.8	1:5.2
	2	CDCl ₃	1:5.5	1:3.5
	3	CD ₃ OD	1:4.1	1:4.1

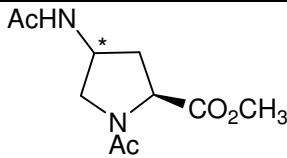
¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*S*)NHBoc-Pro]-OMe **21S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		CD ₃ OD	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>Cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.7	-	9.6	8.4	8.3	9.1
2	H ^α -H ^{β'}	5.8	-	3.4	-	7.1	4.3
3	H ^β -H ^γ	6.1	-	6.5	-	6.6	6.1
4	H ^{β'} -H ^γ	-	-	3.4	-	6.8	4.3
5	H ^γ -H ^δ	6.5	-	6	5.4	6.8	6.8
6	H ^γ -H ^δ	5.3	2.1	2.2	-	6.8	6.6
7	H ^{β'} -H ^δ	-	-	-	-	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*R*)NHBoc-Pro]-OMe **21R**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		CD ₃ OD	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	7.4	-	8.6	8.6	8.2	8.3
2	H ^α -H ^{β'}	7.4	-	5.3	4.2	5.9	6.0
3	H ^β -H ^γ	-	-	-	-	6.4	8.3
4	H ^{β'} -H ^γ	-	-	5.8	-	5.4	6.3
5	H ^γ -H ^δ	4.6	-	4.7	5.9	3.9	6.3
6	H ^γ -H ^δ	6.1	-	6.3	6.6	6.3	5.4
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	-	-	-

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 22	Eintrag	Lösungsmittel	22S	22R
	1	D ₂ O	1:4.3	1:5.8
	2	CDCl ₃	1:5.8	1:5.2
	3	CD ₃ OD	1:4.0	1:4.6

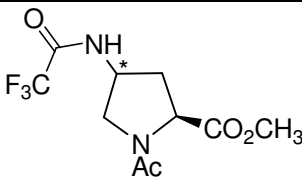
¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*S*)NHAc-Pro]-OMe **22S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		CD ₃ OD	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.9	-	10.0	9.6	6.8	9.1
2	H ^α -H ^{β'}	5.7	-	2.2	1.6	3.7	3.8
3	H ^β -H ^γ	6.3	-	6.3	5.9	6.6	6.3
4	H ^{β'} -H ^γ	-	-	-	2.0	4.1	4.0
5	H ^γ -H ^δ	6.6	6.4	5.3	6.0	6.8	6.8
6	H ^γ -H ^{δ'}	5.3	2.9	1.6	1.7	6.6	6.6
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	-	-	1.3	1.5	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*R*)NHAc-Pro]-OMe **22R**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		CD ₃ OD	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	7.5	6.5	8.2	8.6	8.1	8.7
2	H ^α -H ^{β'}	7.5	6.5	7.3	4.4	6.3	3.8
3	H ^β -H ^γ	-	-	4.5	7.2	-	-
4	H ^{β'} -H ^γ	-	-	6.1	6.2	-	-
5	H ^γ -H ^δ	4.4	6.0	3.2	4.5	4.8	-
6	H ^γ -H ^{δ'}	6.1	6.1	5.6	5.6	6.3	6.3
7	H ^β -H ^δ	-	-	1	1	-	-

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 23	Lösungsmittel	23S	23R
	CDCl ₃	1:5.3	1:3.5
	D ₂ O	1:4.3	1:4.8
	CD ₂ Cl ₂	1:5.3	1:3.6

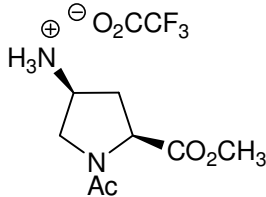
¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*S*)NHCOCF₃-Pro]-OMe **23S**

Eintrag	³ J _(H,H)	CDCl ₃		D ₂ O		CD ₂ Cl ₂	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.9	9.5	8.8	9.2	10.0	9.6
2	H ^α -H ^{β'}	1.5	1.1	5.6	2.7	1.9	1.5
3	H ^β -H ^γ	6.1	6.0	6.4	5.9	6.0	6.1
4	H ^{β'} -H ^γ	1.4	1.4	5.7	2.9	1.7	1.5
5	H ^γ -H ^δ	-	-	6.5	6.5	5.2	-
6	H ^γ -H ^{δ'}	1.3	-	5.3	2.5	1.5	-
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	1.3	1.4	-	1	1.6	1.5

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-[(4*R*)NHCOCF₃-Pro]-OMe **23R**

Eintrag	³ J _(H,H)	CDCl ₃		D ₂ O		CD ₂ Cl ₂	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.0	8.4	-	8.7	7.3	7.9
2	H ^α -H ^{β'}	7.0	4.2	-	4.0	7.3	4.2
3	H ^β -H ^γ	4.9	-	-	-	-	7.9
4	H ^{β'} -H ^γ	6.5	6.4	-	6.6	5.6	6.4
5	H ^γ -H ^δ	3.7	5.6	4.9	6.3	5.4	5.4
6	H ^γ -H ^{δ'}	5.9	6.8	6.3	7.3	6.1	6.1
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	-	-	-

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 24	Eintrag	Lösungsmittel	24S	24R
	1	D ₂ O	1:5.7	1:3.5
	2	D ₂ O 1M TFA	1:6.3	1:3.7
	3	DMSO-d ₆	1:3.6	1:2.5
	4	CDCl ₃	nicht löslich	
	5	D ₂ O 0.1M NaOD	Spaltung Methylester	

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*S*)Amp-OMe TFA **24S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		D ₂ O + TFA		DMSO-d ₆	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.1	9.5	9.1	9.4	8.2	9.0
2	H ^α -H ^{β'}	5.8	4.1	5.8	4.3	8.2	6.5
3	H ^β -H ^γ	6.8	7.4	6.7	7.3	7.5	8.4
4	H ^{β'} -H ^γ	5.6	4.6	4.7	4.7	8.4	7.4
5	H ^γ -H ^δ	6.5	-	6.8	7.3	7.1	8.0
6	H ^γ -H ^{δ'}	-	4.9	5.6	4.9	7.6	7.4
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	-	-	-	-	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*R*)Amp-OMe TFA **24R**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		D ₂ O + TFA		DMSO-d ₆	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	7.9	8.9	8.3	8.9	8.1	7.4
2	H ^α -H ^{β'}	7.2	4.1	6.7	4.2	7.3	6.4
3	H ^β -H ^γ	-	6.8	-	-	4.1	-
4	H ^{β'} -H ^γ	-	6.8	-	6.8	6.6	6.4
5	H ^γ -H ^δ	3.7	-	-	-	3.3	4.1
6	H ^γ -H ^{δ'}	6.3	-	-	-	5.9	-
7	H ^β -H ^δ	-	-	-	-	-	-

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 25	Eintrag	Lösungsmittel	25S	25R
	1	D ₂ O	1:2.5	1:7
	2	CDCl ₃	1:4.7	1:4.2
	3	DMSO-d ₆	1:1.9	1:5.0
	4	Dioxan-d ₈	1:2.2	1:4.1
	5	CD ₂ Cl ₂	1:4.5	1:5.0

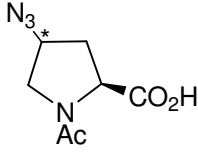
¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*S*)Hyp-OMe **25S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		Dioxan		DMSO	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.6	-	9.9	-	9.1	7.9	8.9	8.9
2	H ^α -H ^{β'}	2.6	-	1.4	-	4.2	2.8	5.1	1.7
3	H ^β -H ^γ	4.4	-	4.7	-	5.6	-	5.4	4.1
4	H ^{β'} -H ^γ	4.1	-	2.9	-	3.6	klein	4.9	klein
5	H ^γ -H ^δ	4.6	4.4	(4.6)	-	5.2	-	5.6	4.7
6	H ^γ -H ^{δ'}	1.7	klein	(1.6)	-	4.4	-	4.3	klein
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	1.7	-	-	-	0.8	-	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*R*)Hyp-OMe **25S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		Dioxan		DMSO	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.4	-	8.1	8.3	8.3	8.1	8.3	8.3
2	H ^α -H ^{β'}	8.4	-	7.8	7.2	7.2	6.8	8.3	6.4
3	H ^β -H ^γ	1.6	-	3.4	3.3	4.1	3.9	4.8	4.2
4	H ^{β'} -H ^γ	4.1	-	4.8	5.0	5.2	-	-	-
5	H ^γ -H ^δ	1.9	-	2.2	2.3	3.0	2.0	klein	klein
6	H ^γ -H ^{δ'}	4.5	-	4.5	4.6	4.9	4.6	4.5	4.9
7	H ^β -H ^δ	1.9	-	1.7	2.0	1.2	1.7	-	1.2

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 28	Eintrag	Lösungsmittel	28S	28R
	1	D ₂ O	1:2.1	1:4.0
	2	D ₂ O 1M TFA	1:2.1	1:4.3
	4	D ₂ O 1M NaOD	1:0.7	1:0.9
	5	CDCl ₃ +CD ₃ OD	1:1.7	-
	6	DMF-d ₇	1:1.2	1:2.1

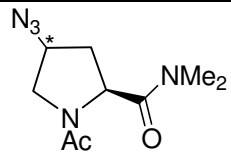
¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4S)Azp-OH **28S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		D ₂ O 1M TFA		+ 0.07M NaOD		DMF-d ₇	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.7	8.9	9.6	8.6	9.4	9.4	9.3	9.2
2	H ^α -H ^{β'}	2.3	1.6	2.4	1.8	2	3.1	4.2	1.5
3	H ^β -H ^γ	5.2	4.8	-	-	5.3	5.6	-	-
4	H ^{β'} -H ^γ	klein	klein	klein	-	2	3.1	4.2	-
5	H ^γ -H ^δ	5.3	-	5.2	-	5.7	5.9	6.1	5.7
6	H ^γ -H ^{δ'}	klein	klein	klein	klein	klein	2.8	4.0	-
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	-	-	-	-	-	-	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4R)Azp-OH **28R**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		D ₂ O 1M TFA		+ 0.07M NaOD	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.1	8.3	8.1	8.3	8.2	8.2
2	H ^α -H ^{β'}	8.3	6.9	8.3	6.9	7.4	8.2
3	H ^β -H ^γ	3.5	4.4	3.5	4.4	3.8	3.5
4	H ^{β'} -H ^γ	5.4	5.6	5.4	5.6	5.4	5.6
5	H ^γ -H ^δ	klein	5.6	klein	5.6	klein	klein
6	H ^γ -H ^{δ'}	4.9	5.4	4.9	5.4	4.9	5.1
7	H ^β -H ^δ	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7

s-cis:s-trans Verhältnis um die Amidbindung

Verbindung 29	Eintrag	Lösungsmittel	29S	29R
	1	CDCl ₃	1:6.4	1:9.3
	2	D ₂ O	1:2.9	1:3.7
	3	DMF-d ₇	1:1.8	1:2.1
	4	Dioxan-d ₈	1 : 5.4	1 : 6.9

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*S*)Azp-NMe₂ **29S**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		DMF-d ₇		Dioxan-d ₈	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	9.6	9.5	7.8	8.9	8.5	9.0	7.8	8.7
2	H ^α -H ^{β'}	4.5	2.3	7.8	4.9	6.6	4.3	7.8	5.4
3	H ^β -H ^γ	6.1	5.9	7.7	-	-	-	7.4	-
4	H ^{β'} -H ^γ	4.0	2	7.8	-	6.9	-	-	-
5	H ^γ -H ^δ	6.0	5.9	8.1	-	7.1	5.0	8.6	-
6	H ^γ -H ^{δ'}	3.9	1	7.2	-	7.3	6.7	7.2	-
7	H ^{β'} -H ^{δ'}	1	1	-	-	-	-	-	-

¹H-¹H Kopplungskonstanten in Hz: Ac-(4*R*)Azp-NMe₂ **29R**

Eintrag	³ J _(H,H)	D ₂ O		CDCl ₃		DMF-d ₇		Dioxan-d ₈	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
1	H ^α -H ^β	8.1	7.7	7.5	8.1	8.3	8.5	7.6	8.2
2	H ^α -H ^{β'}	8.1	7.7	6.3	6.9	6.1	5.9	5.7	5.8
3	H ^β -H ^γ	3.0	3.6	-	4.5	4.5	4.4	-	-
4	H ^{β'} -H ^γ	5.4	5.7	-	-	6.0	5.9	-	-
5	H ^γ -H ^δ	2	2	3.8	3.4	3.4	3.2	4.3	4.7
6	H ^γ -H ^{δ'}	4.8	5.1	5.8	5.5	5.5	5.5	6.1	-
7	H ^β -H ^δ	1.5	2	-	1.0	1.1	1.5	-	1.3

9.3. Übersicht von Kristallstrukturen der Form Ac-Xaa-OMe

Verbindung	ϕ	ψ	ω	n- π^*	n- π^*	pucker	Ref.
Ac-Pro-OMe	-78.9°	176.7°	-3.1°	---	---		171
Ac-(4 <i>R</i>)Flp-OMe	-55.0°	140,5°	-178.9°	98°	2.76 Å	exo	171
Ac-(4 <i>R</i>)Hyp-OMe 25R	-57.0°	150.8°	-178.8°	[a]	[a]	exo	171
Ac-[(4 <i>R</i>)OAc-Pro]-OMe	-58.2°	142.0°	[b]	[a]	[a]	exo	53
Ac-[(4 <i>S</i>)OAc-Pro]-OMe 27S	-73.9°	-170.8°	-2.7°	---	---	exo	53
Ac-(4 <i>R</i>)Azp-OMe 1R							37
<i>s-cis</i>	-82.3°	172.6°	-0.8°	---	---	exo	
<i>s-trans</i>	-60.3°	146.6°	-177.5°	-97.7°	2.85 Å	exo	
Ac-(4 <i>R</i>)Mop-OMe	-58.1°	147.9°	179.7°	94.5°	2.84 Å	exo	50
Ac-(4 <i>S</i>)Azp-OH 28S	-71.7°	-174.3°	-8.8°	---	---	endo ^[c]	[e]
Ac-[(4 <i>S</i>)TMS-Triazolyl Pro]-OMe 14S	-61.0°	-34.9°	-172.8°	112.1°	2.85 Å	exo	[e]
Ac-[(4 <i>R</i>)TMS-Triazolyl Pro]-OMe 14R	-69.0°	-29.8°	-175.8°	114.4°	2.99 Å	endo	[e]
Ac-[(4 <i>S</i>)Anisol-Trizolyl Pro]-OMe 18S	-56.7°	-44.4°	-175.1°	106.2°	2.78 Å	exo	[e]
Ac-[(4 <i>R</i>)Trizolyl-Pro]- OMe 20R	-65.9°	152.3	178.7°	96.8°	2.94 Å	endo	[e]
Ac-[(4 <i>S</i>)NHAc-Pro]- OMe 22S	-73.9°	-40.7°	-169.3°	101.1°	3.06 Å	exo	[e]
Ac-(4 <i>S</i>)Amp-OMe 24S	51.3°	132.1°	178.4°	100.7°	2.63 Å	exo ^[d]	191
Ac-(4 <i>R</i>)Amp-OMe 24R	-74.5°	-178.0°	4.1°	---	---	exo	191

[a] Interaktion ist vorhanden aber die Werte sind nicht publiziert, [b] Die Amidbindung ist *s-trans* aber publiziert ist ein Winkel von 0.3°; [c] C^β-exo, [d] C^β-endo, [e] Kristallstrukturdaten sind in Kapitel 9.4 beschrieben.

Dipl.-Chem. Michael Kümin

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation mit dem Titel: „Konformationsanalyse von C(4)-substituierten Prolinderivaten und ihre strukturdirigierenden Eigenschaften auf die Polyprolin II Helix – Entwicklung funktionalisierbarer molekularer Gerüste“ nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Universität und keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.

Basel, den 08.05.2009

Michael Kümin

An meiner Hochschulausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Prof. Dr. Edwin Constable, Prof. Dr. Jürgen Engel, Prof. Peter C. Hauser, Prof. Dr. Hanspeter Huber, Prof. Dr. Bernd Giese, Prof. Dr. Martin Jungen, Prof. Dr. Thomas Kaden, Prof. Dr. Thomas Kiefhaber, Prof. John P. Maier, Prof. Dr. Wolfgang Meier, Prof. Dr. Margareta Neuburger-Zehnder, Prof. Dr. Michael Oehme, Prof. Dr. Andreas Pfaltz, Prof. Dr. Joachim Seelig, Prof. Dr. Urs Séquin, Prof. Dr. Dr. h.c. Helmut Siegel, Prof. Dr. Peter Strazewski, Prof. Dr. Helma Wennemers, Prof. Dr. Jakob Wirz, Prof. Dr. Wolf-Diedrich Woggon, Prof. Dr. Andreas Zuberbühler,

Lebenslauf

Michael Kümin

Geboren am 02.10.1980



Ausbildung

1996-1999	Matura am Gymnasium Münchenstein (BL), Typus C (Mathematik)
10/2000-03/2005	Studium der Chemie an der Universität Basel
10/2001	1. Vordiplom
09/2002	2. Vordiplom
10/2004	Diplomprüfung
11/2004-03/2005	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Helma Wennemers Departement Chemie, Universität Basel <i>Synthese und Konformationsanalyse von Oligopeptiden bestehend aus Prolin und Azidoprolin</i>
04/2005-05/2009	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Helma Wennemers Departement Chemie, Universität Basel <i>Konformationsanalyse von C(4)-substituierten Prolinderivaten und ihre strukturdirigierenden Eigenschaften auf die Polyprolin II Helix - Entwicklung funktionalisierbarer molekularer Gerüste</i>
ab 08/2009	Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Prof. Dr. Wilfred van der Donk, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

Berufliche Tätigkeiten

2000:	Praktikum bei Novartis (Schweizerhalle)
2005:	Assistent an der Universität Basel: organisch chemisches Praktikum für Studenten der Biologie
2006/2007:	Assistent an der Universität Basel: organisch chemisches Praktikum (I und II) für Studenten der Chemie

Stipendien:

2006/2007:	Novartis NURPOC fellowship
02/2008:	Förderstipendium 2008 des Camille und Henry Dreyfus-Fonds