



Max-Planck-Institut
für Biochemie



Kollagenmodellpeptide: Synthese und biophysikalische Eigenschaften

Dissertation

DIRK BARTH

April 2003

**Max-Planck-Institut für Biochemie
Martinsried**

Kollagenmodellpeptide: Synthese und biophysikalische Eigenschaften

Dirk Barth

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Hiller

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Luis Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler

Die Dissertation wurde am 30.04.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.06.2003
angenommen.

**Meinen Eltern und
Viola Stolz**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis April 2003 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Prof. Dr. Luis Moroder angefertigt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Luis Moroder** für dieses sehr vielfältige und abwechslungsreiche Thema sehr herzlich danken, bei dessen Bearbeitung er mir jederzeit hilfsbereit zur Seite stand. Mit beständigem Interesse und enormer Diskussionsbereitschaft unterstützte er meine Arbeit und ließ mir dennoch den nötigen Freiraum zur Umsetzung meiner Ideen. Vor allem möchte ich meine Dankbarkeit jedoch für seine persönlichen Ermutigungen ausdrücken, welche es mir ermöglichten die schwierigen Teile dieser Arbeiten zu lösen. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei ihm für die Gelegenheit an verschiedenen Tagungen teilzunehmen.

Mein weiterer Dank gilt:

Otto Kyrieleis für die interessante Einführung und enge Zusammenarbeit bei Kristallisationsversuchen.

Dr. Dietmar Schmid und **Prof. Dr. G. Jung** für die Aufnahme des gezeigten FT-ICR-Massenspektrums.

Dr. Sabine Frank und **Prof. Dr. Jürgen Engel** für den Austausch von gesammelten Erfahrungen mit Kollagenmodellpeptiden.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie für die freundliche Aufnahme und angenehme Atmosphäre der letzten drei Jahre.

Jürgen Musiol für die chemische, aber auch menschliche und motivierende Unterstützung. Nicht nur sein chemisches Wissen und Literaturkenntnisse bleiben für mich bis heute unglaublich. Darüber hinaus ist seine stetige Fröhlichkeit und deren Unerschütterlichkeit in dieser Arbeitsgruppe unersetzlich.

Lissy Weyher-Stingel für die Einführung in alle analytischen Methoden, vor allem in die Massenspektroskopie, sowie für den freundlichen Umgang mit meiner unorthodoxen Spektrennumerierung und den persönlichen Gesprächen.

Dr. Christian Renner, Alexander Milbradt und **Dr. Stella Fiori** für etliche NMR-Experimente. Meinem langjährigen Freund **Dr. Markus Kaiser** verdanke ich ein unvergessenes Studentendasein in Frankfurt und Tübingen mit etlichen Skatrunden in unserer WG. Des weiteren danke ich:

Markus M. Müller (Tripel-M) für die mit Sicherheit grübigste Laborzeit eines Chemikers, die Toleranz meiner bisweilen verwirrenden Laborablage, Erläuterungen zum Pauli-Prinzip und einer unvergessbaren Zeit; **Markus Schütt** nicht nur für die Hilfe bei Fmoc-PO(tBu)G-OH, sondern auch für eine weltbewegende, gemeinsame Homepage; **Dr. Barbara Saccà** für ihre freundliche, konstruktive Zusammenarbeit ihren besonderen Witz und mitreißendes Lachen; **Dominga Delucca** für die Einführung in italienische Kochkünste und aufbauende Diskussionen; **Dr. „Ray“ Behrendt** für meinen Tenniserfolg am MPI nicht nur gegen, sondern auch mit ihm; **Ulrike Kusebauch** und **Leslie Hötzer** fürs Korrekturlesen, Weiterführung des Kollagenbereichs und Reduktion der Vermännlichung im AK; **José Pfitzer** für benötigten, hessischen Nachschub; **Dr. Alina Ariosa-Alvarez** für amüsante, deutsche Unterhaltungen; **Dr. Cyril Boulegue** für die Hoffnung doch noch den Fußballcup zu gewinnen; **Prajna Paramita Pal (Tabby)** für ihre liebe und lustige Art der Unterstützung; **Frank Freudenmann** für die Erinnerungen an die Gorge`; **Silva Andric** für etliche Einwaagen, ihr stetiges Lächeln und die Wasserversorgung; als auch **Dr. Norbert Schaschke** für sein chemisches Know-How und **Johanna Scheinost**, meiner Lieblingspraktikantin, für einen sehr amüsanten Monat.

Insbesondere möchte ich mich bei **Viola Stolz** für Ihren beständigen Glauben an mich und Ihre leider zu seltene, aufbauende Nähe bedanken.

Meinen herzlichen Dank gilt **meinen Eltern**, die mir fortwährend zur Seite standen und mich in jeder Situation unterstützten.

Publikationsliste:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden teilweise in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf Kongressen vorgestellt:

- 1) Barth, D.; Schütt, M.; Fiori, S.; Moroder, L. Synthesis of disulfide-bridged heterotrimeric collagen model peptides consisting of exclusively Gly-Pro-Hyp repeats. *19th Winter School on Proteinases and their Inhibitors. Recent Developments, Tiers, Italy* (2001).
- 2) Saccà, B.; Barth, D.; Musiol, H.-J.; Moroder, L. Conformation-dependent side reactions in interstrand-disulfide bridging of trimeric collagenous peptides by regioselective cysteine chemistry. *J. Pept. Sci.* **8**, 205-210 (2002).
- 3) Barth, D.; Musiol, H.; Renner, C.; Frank, S.; Engel, J.; Moroder, L. Synthesis of trimeric collagen peptides with artificial and natural cystine knots. *J. Pept. Sci.* **8**, 01.Suppl., P-D72 (2002).
- 4) Barth, D.; Musiol, H.-J.; Schütt, M.; Fiori, S.; Milbradt, A. G.; Renner C.; Moroder, L. The Role of Cystine Knots in Collagen Folding and Stability. I. Conformational Properties of (Pro-Hyp-Gly)₅ and (Pro-(4S)-FPro-Gly)₅ Model Trimers with an Artificial Cystine Knot *Chem.- Eur. J.* (2003) in press.
- 5) Barth, D.; Kyrieleis, O.; Renner, C.; Moroder, L.: The Role of Cystine Knots in Collagen Folding and Stability. II. Conformational Properties of (Pro-Hyp-Gly)_n Model Trimers with N- and C-Terminal Collagen Type III Cystine Knots *Chem.- Eur. J.* (2003) in press.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Kollagen.....	2
1.2. Biosynthese des Kollagens	4
1.3. Denaturierung und enzymatischer Abbau des Kollagens	7
1.4. Modellpeptide des Kollagens.....	8
1.5. Strukturuntersuchungen an Kollagen-Modellpeptiden.....	9
1.6. Stabilität und Dynamik tripelhelikaler Kollagenstrukturen.....	12
1.6.1. Einfluss der Peptidkettenlänge und Ladung der Termini	12
1.6.2. Einfluss der Aminosäuresequenz	13
1.6.3. Einsatz von Templaten für Kollagenmimetika	16
1.6.4. Stabilitätsänderungen durch Prolinderivate	22
1.6.5. Faltungskinetik von Kollagenpeptiden	27
1.7. Synthese von Kollagenpeptiden	29
1.7.1. Generelle Schwierigkeiten der Peptidsynthese.....	29
1.7.2. Bekannte Probleme der Synthese kollagenartiger Peptide	31
2. AUFGABENSTELLUNG	35
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1. Synthese von homo- und heterotrimeren Kollagenpeptiden.....	37
3.1.1. Synthese kollagenartiger Einzelketten aus Tripeptideinheiten.....	37
3.1.1.1. Synthese der Tripeptidsynthese	38
3.1.1.2. Synthese der Einzelketten mittels Tripeptidbausteinen.....	41
3.1.2. Synthese der Heterotrimere Ia und Ib mit artifiziellen Cystinknoten.	46

3.1.3. Synthese der Homotrimere II-XI mit dem natürlichen Kollagen Typ III-Cystinknoten	54
3.1.3.1. Mechanismus der Oxidation von Bis-Cysteinyl-Kollagenpeptiden zu Homotrimeren mit dem Kollagen Typ III-Cystinknoten	57
3.2. Konformationseigenschaften monomerer und trimerer Kollagenpeptide	59
3.2.1. Circular-Dichroismus tripelhelikaler Strukturen	60
3.2.2. Tripelhelizität der synthetischen Modellpeptide	61
3.2.3. Einflüsse der Kettenlänge und Endladungen	61
3.2.4. Strukturelle Einflüsse der unterschiedlichen Cystinknoten	64
3.2.5. Thermische Zersetzung der Cystinknoten	70
3.2.6. Thermodynamische Charakterisierung der Kollagenpeptide	74
3.2.7. Faltungskinetiken der Kollagenpeptide	80
3.2.8. Einfluss von (4S)- und (4R)-Fluorprolin auf Ausbildung und Stabilität der Tripelhelix	86
3.3. Kristallisationsversuche.....	91
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	94
5. EXPERIMENTELLER TEIL	97
5.1. Materialien und Methoden.....	97
5.1.1. Lösungsmittel und Chemikalien.....	97
5.1.2. Dünnschichtchromatographie	97
5.1.3. Analytische und präperative HPLC	98
5.1.4. Gelchromatographie	99
5.1.5. Schmelzpunkte.....	99
5.1.6. Aminosäureanalysen	99
5.1.7. Massenspektrometrie	100

5.1.8. NMR- Spektroskopie	100
5.1.9. UV-Spektroskopie	101
5.1.10. CD-Spektroskopie	101
5.1.11. Molecular modeling	102
5.1.12. Mikrokalorimetrische Messungen.....	102
5.1.13. Kristallisationsexperimente.....	103
5.2. Synthese.....	103
6. LITERATUR.....	135

Abkürzungen

AA	Aminosäure
ACN	Acetonitril
Acm	Acetamidomethyl
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
amu	atomic mass unit
aq.	wässrig
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BTC	Triphosgen
CD	Cirkular Dichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSC	differential scanning calorimetrie
EDCI hydrochlorid	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-IT	Electron Spray Ionisation – Ion Trap
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
(4 <i>S</i>)-FPro,	(4 <i>S</i>)-Fluoroprolin
(4 <i>R</i>)-FPro,	(4 <i>R</i>)-Fluoroprolin
FT-ICR	Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HOSu	Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	(4 <i>R</i>)-Hydroxyprolin
IR	Intrarot
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometrie
MeOH	Methanol

MMP	Matrix Metalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
MTB	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
NMP	N-Methylpyrrolidin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Npys	Nitropyridinesulfenyl
R _f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
R _{pn}	Ratio of positive peak intensity over negative peak intensity
RT	Raumtemperatur
SPI	selective pressure incorporation
StBu	<i>tert</i> -Butylthio
tBu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFFH	Fluoro-N,N,N',N'-tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
T _m	Schmelzpunkt der Tripelhelix
t _R	Retentionsfaktor in der HPLC
Trt	Triphenylmethyl
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl

1. Einleitung

Proteine sind in lebenden Organismen in allen regulativen und prozessierenden Vorgängen involviert. Um diese Abläufe zu verstehen und vor allem auf pathologische Prozesse, welche aus deren Fehlregulation hervorgeht, Einfluss zu nehmen, ist ein grundlegendes Verständnis der damit zusammenhängenden molekularen Interaktionen essentiell.

Dreidimensionale Strukturen von Proteinen aus modernen physikalischen Methoden wie Röntgenstrukturanalyse und Kernspinresonanz-Techniken fördern somit nicht nur die Kenntnisse dieser Wechselwirkungen, sondern insbesondere auch die damit zusammenhängende Wirkstoffentwicklung. Mit der Bindung der Proteine an die entsprechenden Substrate und deren Prozessierung beschreibt man jedoch einen dynamischen Prozess, welcher durch flexible Bereiche der Makromoleküle möglich wird. Unter diesem Gesichtspunkt ist ein genaues Studium der stabilisierenden Einflüsse auf die komplexen Proteinstrukturen eine elementare Ergänzung. Darüber hinaus werden erst die Kenntnisse der Beziehungen zwischen molekularen Feinheiten und dynamischen Strukturen ein effizientes Proteindesign gestatten.

Kollagen bietet hierbei durch seine äußerst gleichförmige und damit einfache Struktur die Gelegenheit, geringe Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften durch verschiedene Einflüsse zu erfassen, deren Aufklärung zum allgemeinen Verständnis der Proteinfaltung beitragen werden.

Kollagen als Hauptgewebsprotein besitzt besondere biologische Funktionen wie zum Beispiel die Stützung und Separation von Zellverbänden. Damit ist auch dessen Prozessierung in zahlreiche physiologische aber auch pathologische Vorgänge involviert. Die biophysikalischen Eigenschaften zusammen mit den strukturellen Daten dieser wichtigen Proteinklasse helfen somit Vorgänge wie Wundheilungsprozesse und Tumorinvasion zu verstehen und zu beeinflussen.

Darüber hinaus besitzen Kollagene, die sich häufig in Fibrillen anordnen, spezielle mechanische Eigenschaften, welche sie nicht zuletzt als Biomaterialien attraktiv machen.

1.1. Kollagen

Sowohl tierisches als auch humanes Gewebe wird hauptsächlich durch Zellorganisationen bestimmt, welche durch Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle fest in der Basalmembran verankert sind. Die Basalmembran, vornehmlich aus Kollagen Typ IV bestehend,¹⁻⁴ ist in ein interstitielles Stroma aus unterschiedlichen Kollagentypen (meist I, II und III), Gelatin, Elastin, Laminin, Fibronectin, Hyaluronsäure, Proteoglycane und andere Proteine eingebettet. Diese extrazelluläre Matrix⁵ setzt sich, je nach Gewebeart aus Fasern und Schichten unterschiedlicher Konsistenz zusammen sorgt für die mechanische Stabilität der Gewebe und separiert die Organe.

Kollagen als Hauptvertreter der extrazellulären Matrix stellt ca. 30 % der Gesamtproteinmasse in Wirbeltieren dar und ist damit deren häufigste Proteinklasse. Bislang sind 19 Kollagentypen bekannt,⁶ die sich in unterschiedlichen Primärsequenzen und Strukturen unterscheiden. Alle Typen zeichnet eine superhelikale Struktur aus, d.h. eine Tripelhelix, die vereinzelt auch in anderen Proteinen und Subdomänen, wie z.B. im Makrophagen-Scavenger Rezeptor,⁷ vorkommt.

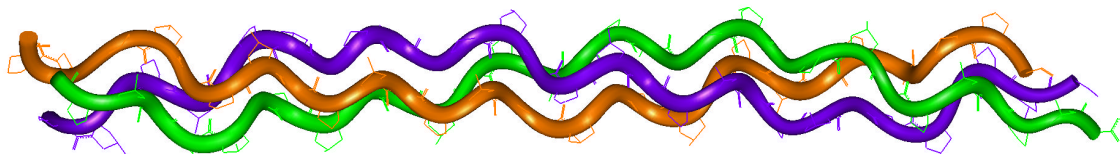


Abb. 1. Die Kollagenstruktur wird durch eine superstrukturierte Umwicklung von linksgängigen Polyprolin-II Einzelketten in rechtsgängige, tripelhelikale Tertiärstrukturen ausgebildet.

Kollagenproteine bestehen aus drei α -Ketten, die abhängig vom Typ gleicher oder unterschiedlicher Sequenz sein können. Diese α -Ketten sind jeweils in linksgängige Polyprolin-II Helices gefaltet, die wiederum mit einer Aminosäure-Versetzung eine rechtsgewundene Tripelhelix ausbilden (Abb. 1).^{8,9} Die klassische Polyprolin-II Helix besteht aus drei Aminosäureresten pro Windung mit einem Anstieg von 3.1 Å pro Aminosäure sowie Dihedralwinkeln von $\phi = -75^\circ$ und $\psi = 145^\circ$. Die tripelhelikale Superstruktur modifiziert diese Parameter zu 3.33 Reste/Windung, 2.9 Å Aminosäure-Anstieg und nahezu identischen Dihedralwinkeln ($\psi=155^\circ$).¹⁰ Die Polyprolin-II Helix hat somit eine Ganghöhe von ca. 0.86 nm, die Tripelhelix mit zehn (Xaa-Yaa-Gly)-Triplets von ca. 8.6 nm. Entscheidend in dieser strukturellen Anordnung der Ketten ist das repetitive charakteristische Muster von Wasserstoffbrücken zwischen dem Gly-Amid und Pro-Carbonyl von zwei benachbarten Ketten, wodurch die drei α -Ketten über interchenare (-N-H---O=C-) Wasserstoffbrücken vernetzt sind.

Die Kollagentypen I-III, V und XI bilden als interstitielle Proteine weitere Überstrukturen in Form von Mikrofibrillen und Fasern, die im Elektronenmikroskop als gestreifte Muster gut sichtbar sind (Abb. 2).

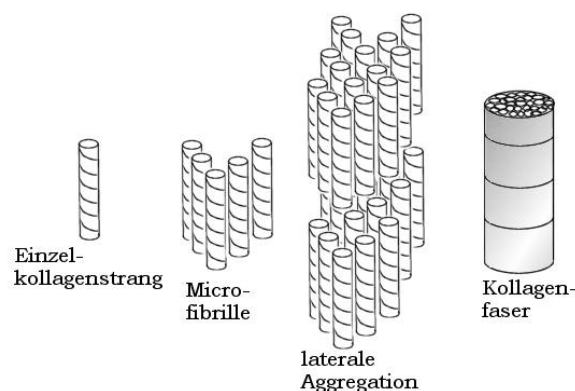


Abb. 2. Aggregation interstitieller Kollagene in Fasern.

Für die Ausbildung der Tripelhelix muss an jeder dritten Aminosäureposition der Sequenz ein Glycin-Rest vorhanden sein, um die dichte Packung dieser Superstruktur zu erlauben. Deshalb hat sich bei der Bezeichnung der Positionen von Kollagenpeptide die Konvention (Gly-Xaa-Yaa)_n durchgesetzt. Die beiden Positionen (Xaa und Yaa) werden sehr häufig durch Pro und Hyp, aber auch durch andere Reste wie Ala, Lys, Arg, Leu, Val, Ser und Thr besetzt, die durch ihre Seitenkettenfunktionalitäten für die selektive Erkennung durch interstitielle Proteine oder Zelladhäsionsrezeptoren, aber auch durch Enzyme verantwortlich sind. Das sehr häufige Vorkommen von Prolin in den Positionen Xaa und Yaa führt zur Erhöhung der Tripelhelixstabilität, die noch zusätzlich durch post-translationale enzymatische Hydroxylierung des Prolin-Restes in der Yaa-Position stark erhöht wird. Dadurch ist das Triplet Pro-Hyp-Gly mit ca. 10 % der am häufigsten anzutreffende Baustein im Kollagen Typ I.

Eine Serie von zusätzlichen Enzym-vermittelten Modifikationen inklusiv der Vernetzungen von Lysinresten stabilisieren zusätzlich die stabähnliche Struktur einzelner Kollagene und deren Fibrillen, teilweise auch in Folge von Alterungsprozessen.

1.2. Biosynthese des Kollagens

Bei der Biosynthese des Kollagens handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, welcher durch komplexe co- und post-translationale Modifikationen charakterisiert wird. Viele dieser Prozesse werden exklusiv bei der Prozessierung dieser Substanzklassen (oder Substanzen, die Kollagenmotive beinhalten) gefunden. Die Biosynthese wird in zwei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt umfasst die intrazellulären Vorgänge, aus welchen ein gefaltetes, lösliches Prokollagenmolekül resultiert. Der zweite beinhaltet die extrazellulären Vorgänge, wobei letztlich eine proteolytische

Spaltung das Kollagenmolekül freisetzt, welches dann in Fibrillen assembliert. Abschließend werden diese Fibrillen kovalent vernetzt.

Die Translation der Pre-prokollagen mRNA wird an freien Ribosomen vollzogen. Die Signalpeptide erkennen einen intermediären cytoplasmatischen Signalerkennungspartikel (SRP), um einen SRP-Polypeptid-Komplex zu generieren, welcher mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert. Im endoplasmatischen Retikulum werden die Signalpeptide abgespalten und spezifische Aminosäuren der entstandenen Prokollagenketten werden verschiedenen, kollagenspezifischen Modifikationen durch die Prolyl-(3)-Hydroxylase, Prolyl-(4)-Hydroxylase sowie Lysyl-Hydroxylase und zwei Glycosyl-Transferasen unterzogen. In N-terminaler Position zu Glycin werden Lysinreste modifiziert. Sie dienen sowohl als Anker für Galactose- und Glukose-Reste, die enzymatisch angebunden werden, als auch für Quervernetzungen.

Die stereoselektive enzymatische Hydroxylierung von Prolinresten in N-terminaler Position zu Gly favorisiert die Tripelhelixfaltung. Für diese Hydroxylierung durch die Prolyl-(4)-Hydroxylase wurde ein Zwei-Stufenmodell vorgeschlagen, welches im ersten Schritt eine weiche Anbindung des Enzyms an die pro- α -Kette in Random-Coil-Struktur und erst im zweiten produktiven Schritt die Erkennung der (Xaa-Pro-Gly)-Sequenz und die stereoselektive Prozessierung des Prolinrestes zu (4*R*)-Hydroxyprolin vorsieht.

Hydroxylierungen an der C3-Position erfolgen unregelmäßig und exklusiv an Prolinen der Xaa-Position sowie nur in Nachbarschaft zu (4*R*)-Hydroxyprolin. Während die Tripelhelix-stabilisierende Funktion von 4Hydroxyprolin belegt ist, ist die Funktion von (3)-Hydroxyprolin bis heute noch weitgehend unbekannt.

Die Assemblierung der pro- α -Ketten zu Pro-Kollagen in einem bestimmten Register erfolgt durch selektive Erkennung und Assoziation der globulären Domänen der C-Propeptide sowie durch Ausbildung der interchenaren

Quervernetzung der drei α -Ketten mittels Disulfidbrücken. Dadurch erfolgt meistens C-terminal die Nukleation der Tripelhelix, die sich reißverschlussartig vom C- zum N-Terminus des Proteins fortsetzt.^{11,12} Die Faltungsgeschwindigkeit wird dabei wesentlich von der langsamen *cis/trans*-Isomerisierung der Prolinreste vorgegeben.¹³⁻¹⁵

Prokollagene, die in Zellen unter Bedingungen synthetisiert werden, die nur eine mäßige Hydroxylierung der Proline zulassen, werden nur gering exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass nur tripelhelikal gefaltete Kollagene ausgeschieden werden. In fertig exprimierten und prozessierten Kollagenen bleiben mitunter Disulfidvernetzungen bestehen, häufig werden sie aber mit dem Pro-Peptidteil abgespalten. Kollagene ohne diese Quervernetzung, wie z. B. Typ I, können nach thermischer Entfaltung nur schwer korrekt gefaltet werden, während Prokollagene mit quervernetzten C-Propeptiden sich in die korrekten Tripelhelices zurückfalten. Diese Experimente haben die Bedeutung der C-Propeptide zur richtigen Registrierung und Ausrichtung der drei Pro- α -Ketten während des Assemblierungsprozesses eindeutig bewiesen. So besitzt z. B. Typ III Prokollagen Disulfidbrücken im C-terminalen Bereich der tripelhelikalen Domäne, welche eine korrekte Rückfaltung des Proteins erlauben, wobei dieser Rückfaltungsprozess vom C-terminalen Cystinknoten in Richtung N-Terminus erfolgt.

Im Golgi-Apparat werden Prokollagene in Vesikeln verpackt und aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert, in welchem durch enzymatische Prozessierungen die N- und C-Propeptide abgespalten werden. Dafür sind unterschiedliche C- und N- Peptidasen verantwortlich, die zur Familie der Matrix-Metalloproteasen gehören, aber bislang noch nicht vollständig in ihrer Funktion charakterisiert wurden.

1.3. Denaturierung und enzymatischer Abbau des Kollagens

Isoliertes Kollagen, welches nicht in Fibrillen organisiert vorliegt, denaturiert 1-2 °C über der Körpertemperatur des jeweiligen Organismus. Wie bereits erwähnt, prozessieren Prolyl-Hydroxylasen ausschließlich ungefaltete Proteine¹⁶ und regulieren sich somit selbst. Diese geringe, aber ausreichende Stabilität im jeweiligen Organismus ist notwendig, da Kollagenaggregate trotz all ihrer biologischen und mechanischen Eigenschaften abbaubar bleiben müssen, um eine Anpassung des Gewebes in vielen physiologischen Prozessen wie Differenzierung und Wundheilung, aber auch in pathophysiologischen Vorgängen wie Extravasation und Invasion von Tumorzellen zu ermöglichen.^{17,18}

Kollagene werden durch Kollagenasen gespalten. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die ein Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum besitzen, welches für die Proteolyse essentiell ist. Die Prozessierung wird durch komplexe Mechanismen geregelt, bei denen die TIMPS (tissue inhibitors of metalloproteases) regulierende Funktionen übernehmen.

Bei der enzymatischen Proteolyse der Kollagene werden alle drei α -Ketten der fibrillären Kollagentypen (I-III, V und XI) von MMPs in einem sehr langsamen, aber charakteristischen Proteolyseschnitt in zwei Fragmente ($\frac{3}{4}$ zu $\frac{1}{4}$) gespalten.¹⁹⁻²² Diese Fragmente werden zu Substraten für Gelatinasen und anderen Enzymen, die für den weiteren Abbau verantwortlich sind. Der entscheidende, erste Spaltschritt ist hochspezifisch und geschieht sowohl abhängig von der Spaltsequenz, als auch abhängig von der lokalen Konformation, da in Kollagenen viele spaltsequenzartige Stellen zu finden sind, aber nur eine einzige davon prozessiert wird. Diese außergewöhnlich langsame Enzymproteolyse ist einzigartig für Kollagene.²³ Andere nicht stabähnliche Kollagene, wie Kollagen Typ IV, welches den Hauptbestandteil der Basalmembran bildet, oder Kollagene der Typen VII und X sowie Elastin oder Fibronectin, die alle sowohl tripelhelikale als auch andere Domänen beinhalten, werden auch durch andere Enzyme prozessiert.

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften der Kollagene wurden die Fragestellungen zu Struktur und Stabilität sowie auch zur exakten spezifischen Erkennung der unterschiedlichen interagierenden Proteine sehr intensiv bearbeitet. Da aber natürliche Kollagene oder deren Fragmente sehr schwer zu handhaben sind, wurden für solche Studien meistens synthetische Modellpeptide verwendet.

1.4. Modellpeptide des Kollagens

Wegen der leichten Fibrillenbildung ist natives Kollagen schlecht löslich (Abb. 2.), deshalb auch nur begrenzt verwendbar und für viele Untersuchungen unzugänglich.²⁴ Fragmente, die durch chemischen und enzymatischen Abbau erhalten werden,²⁵⁻³⁰ können wegen ihrer Inhomogenität und Thermoinstabilität auf viele Fragestellungen nur unbefriedigende Antworten geben. Trotzdem konnten mit derartigen Experimenten wichtige Erkenntnisse über strukturelle Eigenschaften von Kollagenteilbereichen und deren biologische Funktion gewonnen werden. Zusätzliche wichtige Informationen wurden aber durch den Einsatz von synthetischen Modellpeptiden erhalten. So waren z. B. nur mit synthetischen Modellpeptiden kristallographische Strukturanalysen erfolgreich und gaben Detailinformationen zur Kollagen-Tripelhelix.

Sakakibara und Mitarbeitern gelang es erstmals homogene Kollageneinzelstränge bestehend aus (Pro-Hyp-Gly)- bzw. (Pro-Pro-Gly)-Tripletts an der festen Phase³¹⁻³⁴ zu synthetisieren.³⁵ Pulverdifraktogramme und spektroskopische Messungen bestätigten die tripelhelikale Struktur und erlaubten erste thermische Stabilitätsuntersuchungen.^{36,37} Vor diesem Durchbruch mittels Festphasensynthese waren Syntheseprodukte, die durch Polymerisation der repetitiven Einheit (Gly-Xaa-Yaa)_n erhalten wurden, für aussagekräftige Strukturuntersuchungen zu inhomogen.³⁸

Zahlreiche Arbeiten mit synthetischen Modellpeptiden folgten, die sich mit den unterschiedlichsten Eigenschaften des Kollagens beschäftigten. Es konnten Hinweise auf den Einfluss der Kettenlänge und der Aminosäurezusammensetzung gewonnen werden.³⁹ Genauso wurden unterschiedliche Sequenzen aus nativem Kollagen in Modellpeptide eingebaut, um deren biologische Funktion zu untersuchen. Einkristall-Röntgenstrukturaufnahmen wurden durchgeführt, die neuerdings Auflösungen von 1.0 Å⁴⁰ erreichen und damit einen Aufschluss über die Ringkonformationen der Prolinreste ergaben.

In Analogie zur Disulfidverknüpfung natürlicher Kollagene beschäftigen sich neuere Arbeiten mit templatassoziierten Kollagenketten. Interessant hierbei ist der starke Einfluss der Templatform auf die Stabilität der Modellpeptide. Durch die Verknüpfung der Peptidketten konnten Kollagenmimetika erzeugt werden, die dem natürlichen Vorbild sehr nahe kommen. Im eigenen Arbeitskreis wurden in diesem Zusammenhang erstmals heterotrimere Kollagenpeptide synthetisiert, die sowohl Aufschlüsse über das Spaltverhalten der relevanten Enzyme (siehe Abschnitt 1.3.)^{23,41-46} wie auch über Affinitäten zu Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie⁴⁷⁻⁵⁰ ergaben.

1.5. Strukturuntersuchungen an Kollagen-Modellpeptiden

Um die Stabilitätsparameter des Kollagens zu verstehen, waren genaue Strukturuntersuchungen unumgänglich. Deshalb wurde in den letzten 30 Jahren eine Reihe von unterschiedlichen Röntgenstrukturanalysen durchgeführt. Erste aussagekräftige Experimente an Kristallen des selbst-assoziiierenden Homotrimers aus H(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH von Sakakibara³⁵ erfolgten bereits in den frühen 70er Jahren.^{36,37} Weitere hochaufgelöste Strukturaufklärungen folgten, mit denen genauere Strukturinformationen zu Kollagen gesammelt

werden konnten. Mit Hilfe modernster Aufnahme- und Auswertungsmethoden von Röntgenexperimenten reichen diese bis zu Auflösungen von 1 Å.⁴⁰

Mit Sakakibaras Modellpeptiden H-(Gly-Pro-Pro)₁₀-OH und H-(Gly-Pro-Hyp)₁₀-OH wurden in Röntgenstrukturanalysen die Fragen der Ausrichtung der Kollagenmodellpeptide in festen Aggregaten⁵¹ und der intermolekularen Wasserbrücken⁵²⁻⁵⁴ untersucht. Auch an Kollagenmodellpeptiden mit natürlichen Sequenzfolgen wurden Untersuchungen durchgeführt.⁵⁵ Weitere Ergänzungen und Informationen wurden durch eine ebenso umfangreiche Ansammlung von NMR-Experimenten⁵⁶⁻⁶¹ erworben.

Durch Analysen von Kollagengelen konnten zunächst die Berechnungen von Ramachandran^{8,62} gefestigt werden. Anschließend folgte durch Einkristallaufnahmen von Traub et al.^{63,64} ein erstes empirisch bestätigtes Modell (Fraser-Modell).^{65,66} Schon in diesem Modell findet man die wichtige interchenare Wasserstoffbrücke von einem Gly-Amid zur Carbonyl-Funktion der Aminosäure in Xaa-Position eines Nachbarstranges, die im Modell der Tripelhelix nach Rich und Crick postuliert wurde.⁶⁷ Erste verfeinerte Einkristallanalysen des künstlichen Modellpeptids H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH von Okuyama⁶⁸ zeigten eine 7₅-Symmetrie der Modellpeptide im Gegensatz zu natürlichen Kollagenpeptiden mit 10₇-Schraubensymmetrie. Allerdings konnte die Proteinstruktur aufgrund der faserartigen Eigenschaft des Kristalls nicht vollständig gelöst werden. Erst 30 Jahre später erschien die erste vollständige Analyse eines Einkristalls des Kollagenmodellpeptids H(Pro-Hyp-Gly)₁₀-OH und einer Gly? Ala Substitution in der Mitte des Peptides mit 1.9 Å Auflösung.⁶⁹ Die 7₅-Symmetrie wurde in der iminosäurereichen Domäne bestätigt. Zudem wurden erstmalig unterschiedliche Ringkonformationen der Proline in ?-endo- und ?-exo-Pucker-Ausrichtung (siehe Abschnitt 1.6.4.) erkannt. Ebenso wurde aus der Tripelhelix-Veränderung an der Gly? Ala Substitution gezeigt, dass sich an dieser Stelle zusätzliche Wassermoleküle einlagern und die Struktur aufweichen, was für eine Erkennung durch Proteasen

eine bedeutende Rolle spielen könnte. Das zunächst aufgrund empirischer Daten formulierte Hydratisierungsmuster, welches Hydroxy-Proline stark in eine stabilisierende Wasserhülle involviert, ist immer noch Bestandteil heftiger Diskussionen.⁷⁰ Mit dieser Wasserhülle haben sich weitere Untersuchungen beschäftigt, wie z. B. Brodsky et al.,⁷¹ die für dieses Netzwerk an Wasserbrücken auch eine Nomenklatur definiert haben (Abb. 3.).

Die Arbeitsgruppe von Zagari^{52,72,73} konnte in den Strukturanalysen von H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH Kristallen, die in Mikrogravitation gewachsen waren, eine Auflösung von 1.4 Å erreichen und dadurch die unterschiedlichen *?*-*endo*- und *?*-*exo*-Pucker der Prolin-Ringe ermitteln, wie sie aus NMR- und Röntgenstrukturdaten von Prolin und einfachen Derivaten bereits bekannt waren.

Die zur Zeit beste Auflösung von Kollagenpeptiden wurde von Nishino et al.⁴⁰ veröffentlicht, die mit 1 Å Auflösung die Grenze der Wasserstoffatome erreicht.

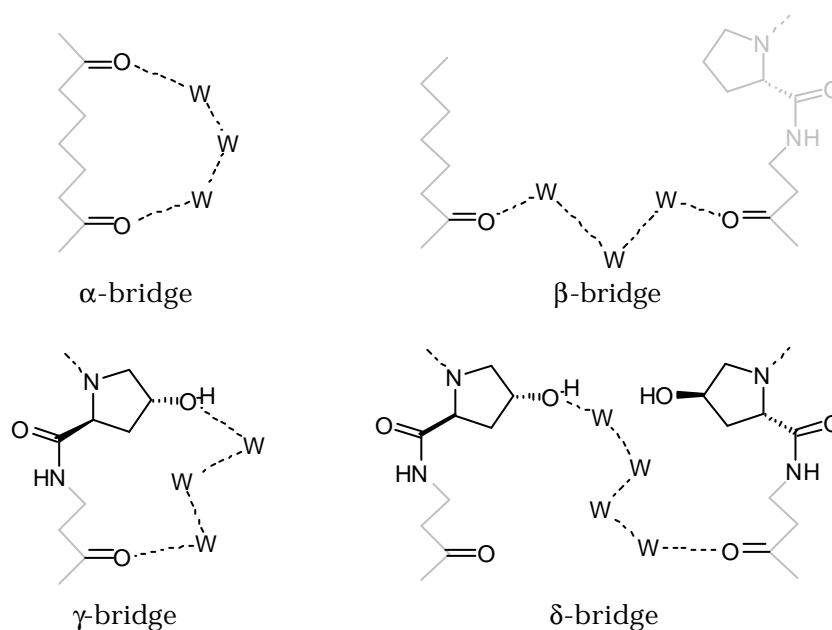


Abb. 3. Unterschiedliche inter- oder intrachenare Wasserbrücken bei Kollagenpeptiden.

1.6. Stabilität und Dynamik tripelhelikaler Kollagenstrukturen

Ein tiefreichendes Verständnis über die Parameter, welche eine spezielle dreidimensionale Struktur eines Proteins induzieren und stabilisieren, ist die Grundvoraussetzung für Strukturvoraussagen und Proteindesign. Verschiedene Faktoren sind zu berücksichtigen, um verstehen zu können, wie komplexe Proteine ihre thermodynamisch stabilste 3D-Struktur finden.

Obwohl die tripelhelikale Kollagenstruktur weitgehend aufgeklärt ist, bleiben Fragen nach den stabilisierenden Faktoren weiterhin offen. Schon sehr früh wurde der Einfluss der Untersuchungsbedingungen⁷⁴⁻⁷⁷ erkannt. Im Folgenden werden die zur Zeit bekannten Faktoren kurz diskutiert.

1.6.1. Einfluss der Peptidkettenlänge und Ladung der Termini

Durch Untersuchungen an synthetischen Kollagenmodellpeptiden konnte sehr bald der starke Einfluss der Kettenlänge auf die Schmelztemperatur der Tripelhelix festgestellt werden. Dabei beobachtet man eine nahezu parallele Zunahme der Enthalpie,⁷⁸ die einem Anstieg der interchenaren Wechselwirkungen entspricht, wobei der Stabilitätsbeitrag abnimmt. So ist die Schmelzpunkterhöhung zwischen (Gly-Pro-Hyp)₆ und (Gly-Pro-Hyp)₇ zahlenmäßig vergleichbar mit der zwischen (Gly-Pro-Hyp)₈ und (Gly-Pro-Hyp)₁₀.

Ebenso ist die Stabilisierung durch Kettenverlängerung bei templatassozierten trimeren Modellpeptiden erheblich geringer. In solchen Trimeren genügt bereits eine Kettenlänge von 5-7 Gly-Xaa-Yaa Triplets, um tripelhelikale Strukturen zu induzieren.⁷⁹

Vergleichende Konformationsuntersuchungen an N- und/oder C-gekappten und nicht gekappten Modellpeptiden zeigten eindeutig einen Einfluss dieser Endladungen auf die Stabilität der Tripelhelix. Durch die parallele Ausrichtung der Einzelketten wirken diese Ladungen durch elektrostatische Abstoßungen

destabilisierend und führen zum „Ausfranzen“ der Tripelhelix. Häufig werden bei Modellpeptiden dennoch die Endladungen beibehalten, da bessere Kristallisierungseigenschaften beobachtet wurden.^{72,80,81}

1.6.2. Einfluss der Aminosäuresequenz

Nach dem Wirt-Gast-Prinzip konnte der Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Stabilität von α -Helices, α -helikaler Coiled-Coils und von β -Faltblatt-Strukturen ermittelt werden.⁸²⁻⁸⁴ Dieses Prinzip basiert auf Konformationsuntersuchungen eines Wirtpeptids nach Austausch einzelner Aminosäurereste als Gäste. Dadurch entstehen Datenbanken von analysierten und quantifizierten Sekundärstrukturen in Abhängigkeit von Aminosäureresten in unterschiedlichen Positionen. Auch kooperative Änderungen von zwei oder mehreren Aminosäuren sind mit ähnlichen Systemen erfassbar.

Im speziellen Fall des Kollagens wurden vorwiegend die besonders stabilisierenden repetitiven (Gly-Pro-Hyp)_n Wirtpeptide zugrunde gelegt,⁸⁵ die gleichzeitig wegen ihrer Häufigkeit in Kollagensequenzen einen natürlichen Zusammenhang bieten.

Glycin ist in jeder dritten Position wegen des engen Kontaktes der drei α -Ketten an dieser Stelle in der Tripelhelix essentiell. Jeder Ersatz des Glycins führt zur Unterbrechung der Tripelhelix in diesem Bereich. Die beiden Reste Xaa und Yaa sind hingegen zum Lösungsmittel exponiert, mit dem sie interagieren können. Auch sind Wechselwirkungen mit Seitenketten oder dem Rückgrat der Nachbarkette direkt als auch über Wasserbrücken möglich (Abb. 4).⁷⁰ Der Rest Xaa ist dabei zum Lösungsmittel noch stärker exponiert als der Rest Yaa.

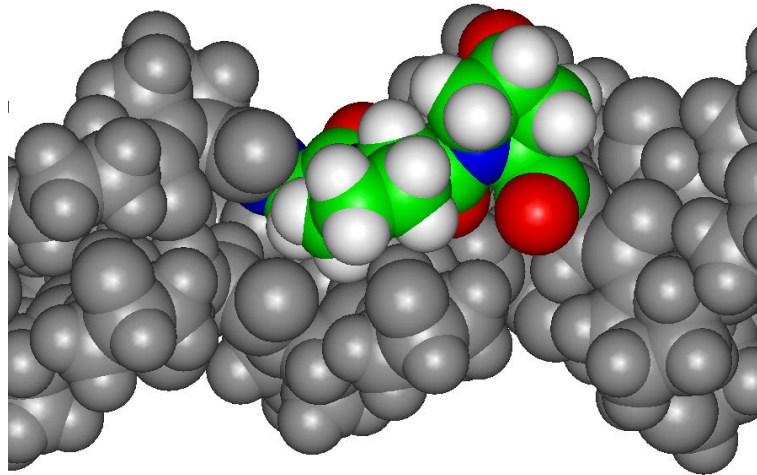


Abb. 4. Teilausschnitt der Kollagenstruktur, der die Lage der einzelnen Aminosäurereste verdeutlichen soll. Man erkennt an der (Pro-Hyp-Gly)-Abfolge, dass die Seitenketten der Reste in Xaa und Yaa in das Lösungsmittel reichen, während Glycin im Innern der Struktur eingebettet ist.

Eine mögliche elektrostatische Stabilisierung zwischen den Resten Xaa der einen Kette und Yaa der zweiten Kette wurde durch die Gast-Triplets (Gly-Lys-Asp) und (Gly-Arg-Asp) in (Gly-Pro-Hyp)₈ gefunden. Diese Arbeiten zeigen, dass Reste in den Xaa-Positionen mit den Yaa-Resten der Nachbarkette wechselwirken können.⁸⁶ In diesen Studien wurde Prolin und Hydroxyprolin sukzessive durch die meisten natürlichen Aminosäuren ersetzt, aber um alle 400 theoretisch möglichen Permutationen auf ein handhabbares Maß zu reduzieren, hat man sich weitgehend auf die im Kollagen vorkommenden Aminosäurefolgen beschränkt.⁸⁷⁻⁹²

Diese Untersuchungen bewiesen unterschiedliche Effekte bei Substitutionen in den Positionen Xaa und Yaa. Der Austausch von Pro oder Hyp durch eine andere natürliche Aminosäure führt allgemein zu einer Absenkung der Stabilität. Das kann dadurch erklärt werden, dass die beiden Iminosäuren die geringste Konformations-Freiheit besitzen, und dass deren Austausch zu einem erhöhten Entropieverlust beim Faltungsprozess führt. Dementsprechend führt

die Substitution einer der beiden Reste durch Glycin mit seinem größten Konformations-Freiraum zu einer äußerst starken Destabilisierung.

Nur die Substitution von Hyp in einer einzigen Yaa-Position durch Arg vermag die tripelhelikale Struktur nicht zu destabilisieren.⁹³ Die Erhöhung der Faltungsenthalpie dieses Wirt/Gast-Peptids wie auch die Röntgenstrukturanalyse zeigten, dass hier eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu einer Nachbarketten-Carbonylfunktion und Van der Waals-Kräfte mit dem Rückgrat zur Stabilisierung beitragen.

Aus diesen sehr umfangreichen Arbeiten konnten folgende Faktoren für eine Tripelhelix-Stabilisierung abgeleitet werden:⁹⁴

- konformationelle Eigenschaften der ungefalteten Kette gegenüber der nativen Form
- Stabilisierung der zugrundeliegenden Polyprolin-II Helix
- Interaktionen zwischen den drei α -Ketten

Eine Korrelation zwischen stabilisierenden Resten und Häufigkeit der Aminosäuren im nativen Kollagen ist ein weiteres, sehr aufschlussreiches Resultat zahlreicher Untersuchungen an Wirt/Gast-Modellen. Demgemäss findet man in der Xaa-Position nach dem am stärksten stabilisierenden Prolinrest (ca. 30 % Häufigkeit im Kollagentyp I), Glu und Ala (ca. 11-13 %). Interessanterweise kommen Tryptophane, die am stärksten destabilisierend wirken, im natürlichen Kollagen nicht vor. In der Yaa-Position befindet sich nach dem Hydroxyprolin (ca. 34%) am häufigsten das schon diskutierte stark stabilisierende Arginin (9%).

Im natürlichen Kollagen müssen neben der gewünschten Tripelhelix stabilisierenden Funktion, in der Sequenz Informationen zur Erkennung durch

interagierende Proteine sowie für die enzymatische Proteolyse eingebaut sein.^{41,43,44,95} Ebenso beinhalten interstitielle Kollagentypen zur Fibrillenbildung häufig Arg und Met in der Position Yaa und Phe, Leu und Glu in der Position Xaa.

In nicht-fibrillären Kollagentypen werden Unterbrechungen der Tripelhelix z.B. durch Glycinsubstitutionen oder Glycindeletionen, aber auch durch fehlende oder zu viele Xaa- und Yaa-Reste moduliert.^{96,97}

1.6.3. Einsatz von Templaten für Kollagenmimetika

Die α -Ketten natürlicher Kollagene sind häufig durch Disulfidbrücken in einem mehr oder wenigen starken Maße quervernetzt. Diese Quervernetzungen sorgen für eine feste Anordnung der drei Ketten in einem bestimmten Raster, so dass Kollagen-prozessierende oder -bindende Proteine räumlich definierte Erkennungsepitope in den jeweiligen Domänen vorfinden. Darüber hinaus üben die Disulfidbrücken gerade in Kollagenen geringerer Steifigkeit einen stark stabilisierenden Effekt aus.

Zur Nachahmung dieser natürlichen, interchenaren Verknüpfungen wurden verschiedene Template zur Vernetzung von Modellpeptiden eingesetzt und deren Effekte auf die Stabilität der Tripelhelix untersucht.^{46,98} Mit der Templatverknüpfung von Kollagenpeptiden durch Lys-Lys, 1,2,3-Tricarboxypropan- und Aminocaprinsäure haben Heidemann und Mitarbeiter Pionierarbeit geleistet.⁹⁹⁻¹⁰¹ Diese Methode wurde erfolgreich weiterentwickelt und unterschiedliche organische und anorganische,¹⁰² aber auch nichtkovalente Template wurden eingesetzt, die in Tabelle 1. zusammengefasst sind.¹⁰³

Neben diesen homotrimeren Modellpeptiden, mit denen natürliche Kollagene wie z. B. des Typs III nachgeahmt werden können, war es auch notwendig, Methoden zu entwickeln, die eine Synthese heterotrimerer Modellpeptide

erlaubt. Nur auf diesem Wege sind Erkennungsepitope anderer Kollagene wie die des Typs I und IV zugänglich. Dies ist im Falle des Adhäsionsmotivs des Kollagens IV im eigenen Arbeitskreis bewiesen worden.⁵⁰

Zu diesem Zwecke wurde in unserem Arbeitskreis eine der Natur sehr nahekommende Verknüpfungsmethode erarbeitet, die auf einer regioselektiven Disulfidverbrückung der einzelnen Ketten basiert und somit die Gewinnung von Heterotrimeren mit unterschiedlichen Registern der α -Ketten ermöglicht.^{42,44}

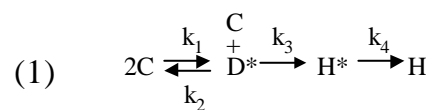
Tabelle 1. Unterschiedliche Templatsysteme erhöhen die Stabilität der Peptidmodelle.

Templatverknüpfte homotrimere Modellpeptide	T_m
Ohne Templatverknüpfung Ac-(Gly-Xaa-Yaa) _n -NH ₂	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=5 (Konz. 10 ⁻⁵ – 10 ⁻³ M) ca. 9-18 °C
(Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker (Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker-Lys-Lys-Gly (Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=6 42-58 °C mit verschiedenen, nativen Linkerdomänen ¹⁰⁴
Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Glu-Glu-Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=6 Mit unterschiedlichen Linkern 57-68 °C
CO ₂ -(Gly-Xaa-Yaa) _n CO ₂ -(Gly-Xaa-Yaa) _n CO ₂ -(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Ala, n=6 13 °C
Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n Gly-Lys-Lys-Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=5 ⁷⁸ 43.3 °C
Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker -Lys-Lys-Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker-Lys-Lys- Linker-COCH ₂ SH-Cys-(Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=5 56.4 °C ⁷⁸
Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=5 72 °C ⁷⁹ 62 °C ¹⁰⁵
Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n (Gly-Xaa-Yaa) _n -Linker Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Hyp, n=5 ¹⁰⁵ (-) -CTV 55 °C (+) -CTV 58 °C
Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n Linker-(Gly-Xaa-Yaa) _n	Xaa=Pro, Yaa=Pro, n=7 Mit Fe ³⁺ 46 °C Ohne Fe ³⁺ 33 °C ¹⁰²
(C ₁₆) ₂ -(Gly-Xaa-Yaa) _n -[IV-H1]	Xaa=Pro, Yaa=Pro, n=4 30-40 °C ¹⁰⁶

Mit dieser Strategie wurden heterotrimere Modellpeptide synthetisiert, in denen die Protease-Schnittstelle des Kollagens Typ I in nahezu naturgetreuer Form nachgebildet war. Durch NMR- und CD-Konformationsanalysen wurden die iminosäurearmen, in ihrer Tripelhelix aufgeweichten Domänen strukturell charakterisiert und somit in ihren funktionellen Eigenschaften besser verstanden. Weiterhin wurden wichtige Hinweise gewonnen, wie Integrine nichtkovalente Anordnungen von Heterotrimeren bei ihrer Anbindung erkennen.^{23,41,43-45,48-50}

In neueren Arbeiten ist es gelungen, Modellpeptide mit einem natürlichen Cystinknoten rekombinant zu gewinnen (FACID Kollagen COL1-NC1 durch Penin et al.¹⁰⁷ und Kollagen Typ III durch Boudko et al.^{108, 109}

Ein Hauptziel dieser interchenaren Vernetzungen der drei Kollagenketten ist die Erhöhung der intrinsischen Peptidkonzentration. Bei nicht verknüpften Modellpeptiden entsteht ein schnelles Gleichgewicht zwischen monomeren Ketten (C) und einem instabilen Dimer (D*), dem durch Anlagerung einer weiteren Einzelkette ein korrekt ausgerichteter trimerer Faltungskern folgt (H*). Aus diesem instabilen trimeren Assoziat faltet sich die Tripelhelix:

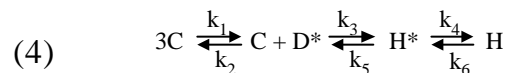


Die Kinetik für die Ausbildung des locker assoziierten Nukleus und des vollständig gefalteten Trimers wird durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$(2) \quad \frac{d[H^*]}{dt} = k_3[D^*][C] = Kk_3[C]^3 = k_a[C]^3$$

$$(3) \quad \left(\frac{d[H]}{dt}\right)_{t=0} = \left(\frac{d[H^*]}{dt}\right)_{t=0} = -1/3 (d[C]/dt)_{t=0} = k_a[C]_0^3$$

Aus diesen Gleichungen geht zumindest für die Kinetik eine direkte Abhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit von der Konzentration der Einzelketten hervor,^{108,110} welche auch experimentell bewiesen wurde. Zur Phasenumwandlung gilt für die thermodynamischen Betrachtungen folgendes Reaktionsschema:



Unter der Annahme des stationären Zustandes der Zwischenprodukte D* und H* und der Voraussetzung eines schnellen Vorgleichgewichts resultiert ein Zweiphasenübergang, in dessen Gleichung nur noch die Konzentrationen der Einzelketten und des Trimers eingehen:

$$(5) \quad K(T=\text{konst.}) = \frac{c(H)}{c(C)^3}$$

Mit c_0 als molare Gesamtpeptidkonzentration ergibt sich nach Engel et al.¹¹¹ die Gleichung:

$$(6) \quad K(T) = \exp\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT} \left(\frac{T}{T_m} - 1\right) - \ln\left(\frac{3c_0^2}{4}\right)\right)$$

Mit der Gleichgewichtskonstante und den damit zusammenhängenden Zustandsfunktionen ΔG° , ΔH° und ΔS° folgt mit $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ der einfache funktionelle Zusammenhang:

$$(7) \quad T_m(T=\text{konst.}) = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + R \ln(3c_0^2/4)}$$

Da die Faltungsstandardenthalpie (ΔH°) und Faltungsstandardentropie (ΔS°) negativ und der Betrag von ΔS° klein gegenüber ΔH° ($\Delta S^\circ \ll \Delta H^\circ$) ist, erhöht sich die Schmelztemperatur mit der Gesamtpeptidkonzentration reziprok logarithmischen. Darüber hinaus ist ersichtlich, dass es bei einer gegebenen Einzelkette eine kritische Tripelhelixkonzentration bei Raumtemperatur geben muss, was experimentell bestätigt wurde. Durch Trimerisation erhöht sich die intrinsische Konzentration der Einzelketten auf ca. 1 M, wodurch ein deutlicher Stabilitätswachstum entsteht; dabei spielt es keine Rolle, ob die Assoziation kovalenter, adhäsiver oder anderer Natur ist.^{108,109,112}

Neben diesem rein entropischen Faktor existieren aber noch weitere Effekte. Das ideale Templat richtet die zu assoziierenden Peptideinzelketten mit möglichst geringem konformationellen Freiraum im richtigen Raster für eine tripelhelikale Struktur aus. Eine sehr gute Realisierung dieses Prinzips scheint durch die Kemp'sche Tricarbonsäure gelungen zu sein, da mit diesem Templat bereits bei einer Kettenlänge von fünf (Gly-Pro-Hyp)-Triplets pro Kette und mit amidierten C-Termini ein Schmelzpunkt von 72 °C^{79,113} in Wasser erreicht wurde, während für selbstassoziierte Modellpeptide des Typs (Pro-Hyp-Gly)

eine Kettenlänge von zehn Tripletts notwendig ist, um eine ähnliche Schmelztemperatur zu erreichen.

Mit diesem Templat war es allerdings notwendig, pro Kette ein Glycin als Spacer einzubauen, um das Einrasten der Ketten zu ermöglichen. Dennoch zeigten NMR-Experimente, dass die erste Tripeptideinheit nicht vollständig in die Tripelhelix involviert ist. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Liskamp und Mitarbeitern, die die Schmelztemperatur dieses Konstrukts von 72 °C auf 62 °C korrigierten.¹⁰⁵ Momentan stellt dieses Templat aber einen empirischen oberen Vergleichsstandard dar. Selbst bei einer Vernetzung von (Gly-Pro-Hyp)₅ durch einen N- und C-terminalen Di-Lysinknoten⁷⁸ liegt der Schmelzpunkt von $T_m=56.4$ °C in PBS-Puffer deutlich unter diesem Wert.

1.6.4. Stabilitätsänderungen durch Prolinderivate

Wie bereits in 1.6.2. erwähnt, spielen Prolin und (4R)-Hydroxyprolin die wichtigste Rolle in der Kollagenstabilität. Erklärungsversuche des stark stabilisierenden Effektes der Hydroxylierung des Prolins in der Yaa-Position beschränkten sich zunächst auf interchenare Wasserbrücken zwischen den unterschiedlichen Resten.¹¹⁴ Dementsprechend wurde durch Röntgenstrukturanalyse ein stark geordnetes, zylinderförmiges Wassernetzwerk um jede Kollagen-Tripelhelix postuliert (siehe Abschnitt 1.5.), bei dem jedes Hydroxyprolin in zwei Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist.^{115,116} Diese Hypothese der Wasserhülle als einzigen Stabilisierungsfaktor ist allerdings fragwürdig, da weder durch Einbau von (4S)-Hydroxyprolin in der Yaa-Position,¹¹⁷ noch durch Einbau eines (4R)- oder (4S)-Hydroxyprolins in der Xaa-Position eine Stabilisierung beobachtet wurde.¹¹⁸ Entsprechende Peptide mit zehn Tripletts sind bei 4 °C ungefaltet. Auch müsste der Entropieverlust einer stark geordneten Wasserhülle sehr hoch sein und den enthalpischen Beitrag zur Stabilisierung weitgehend ausgleichen.^{70,111,119}

Weitere Untersuchungen mit Aminogruppen als pH-abhängigen, gleichwertigen Substituenten für die Hydroxy-Gruppen¹²⁰ liessen die Wasserhüllen-Hypothese weiter anzweifeln, da selbst in einem sehr tiefen pH-Bereich die Struktur eindeutig stabilisiert wurde, obwohl eine Beteiligung von Ammonium-Kationen an Wasserstoffbrücken auszuschließen ist. Die ausgeprägte Tripelhelix-Stabilisierung von (4*R*)-Fluorprolin in Yaa-Position, die weit über den Effekt der (4*R*)-Hydroxyproline hinausgeht, zeigte letztendlich, dass die Wasserhülle nicht der entscheidende Faktor sein kann, da organisch-gebundenes Fluor keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann.¹²¹⁻¹²³ Daraus ergeben sich nun alternative Hypothesen, um den Effekt elektronegativer Substituenten in der (4*R*)-Position des Prolin in Yaa-Position zu erklären.

Im den folgenden Abschnitten werden die bislang gewonnenen Erkenntnisse zur Kollagenstruktur und die Zusammenhänge zwischen konformationeller Freiheit und elektronischer Struktur des Prolin-Ringes diskutiert. Der Konformationsraum eines Prolins und entsprechender Derivate wird im Wesentlichen durch zwei Zustände bestimmt, die sich vor allem in der Anordnung des γ -Kohlenstoffs gegenüber der gemittelten Prolinebene unterscheiden. In der Literatur werden sie durch down- (bzw. C- γ -*endo*-) oder up- (bzw. C- γ -*exo*-) Pucker bezeichnet (Abb. 5).¹²⁴ Elektronegativ (4*R*)-substituiertes Prolin liegt vorwiegend in der C- γ -*exo*- und (4*S*)-substituiertes in der C- γ -*endo*-Konformation vor. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert die hyperkonjugative Elektronen-Delokalisation. Eine annähernd axiale Anordnung der C-F-Bindung ermöglicht eine Interaktion des σ^* -Orbitals mit dem elektronenreichen C-H σ -Orbital und führt zu einer Stabilisierung dieser Konformation (Abb. 6.). Diese in der Literatur auch als „gauche-Effekt“ bezeichnete Neigung molekularer Konformationen bedeutet, dass bei Anordnung polarer Gruppen eine größtmögliche Anzahl an gauche-Stellungen eingenommen wird.¹²⁵

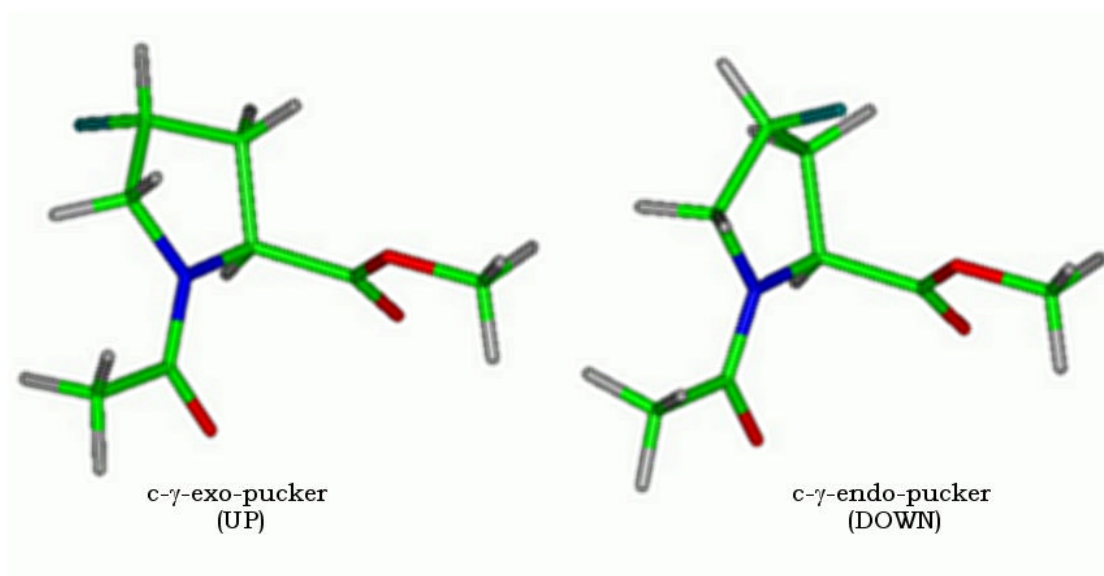


Abb. 5. Zwei stabile, häufig eingenommene Konformationen des Prolinrings in Ac-Pro-OMe, die durch elektronegative Substituenten in der C-4-Position induzierbar sind.

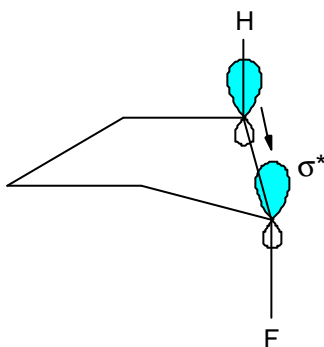


Abb. 6. Veranschaulichung des "gauche-Effektes" durch Hyperkonjugation.

NMR-Untersuchungen an fluorierten Ac-Pro-OMe-Derivaten¹²⁶ zeigen eine generelle Beschleunigung der sonst langsamen, sterisch gehinderten *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung^{127,128} durch den stark negativen induktiven Effekt und dementsprechend schwächeren π -Anteil der Amidbindung. Auch ein thermodynamischer Einfluss auf die Gleichgewichtskonstante $K_{trans/cis}$ der Peptidbindung konnte nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich eine

Verknüpfung zwischen dem Pucker des Prolin-Ringes und dieser Gleichgewichtskonstante, d.h. bei unsubstituiertem Prolin sowie dem (4*S*)-FPro und Di-Fluorprolin liegt ein C- γ -*endo*-Pucker vor, der eine *cis*-Amidbindung favorisiert. Das (4*R*)-Fluorprolin zeigt hingegen eine deutliche Präferenz für C- γ -*exo*-Pucker und damit für das *trans*-Konformer. Molekulare Modeling Rechnungen ergaben Hinweise, dass hier sterische Interaktionen eine bedeutende Rolle spielen.¹²⁹ Die Arbeitsgruppe von Raines hingegen versuchte eine Stabilisierung durch eine weitere hyperkonjugative Interaktion zu postulieren, in der die Carbonylfunktion der betrachteten Amidgruppierung als Nukleophil der Bürgi-Dunitz-Trajektorie der C-terminalen Carboxy-Funktion folgt (Abb. 7.).¹²¹

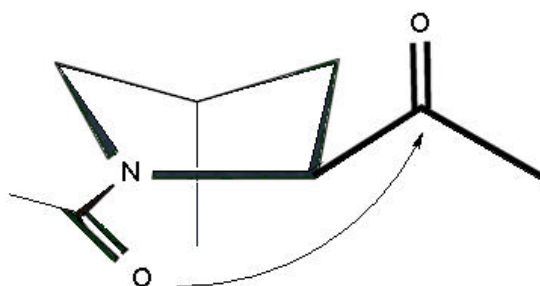


Abb. 7. *trans*-Peptidbindungsinduktion durch eine weitere Hyperkonjugation nach Bretscher et al.¹³⁰

Auch wenn die Hintergründe der *trans*-Induktion bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, wurde empirisch bestätigt, dass eine (4*R*)-Substitution eine *trans*-Amidbindung thermodynamisch begünstigt und damit einen Stabilitätsbeitrag zur Tripelhelix leistet, da hier exklusiv *trans*-Amidbindungen vorliegen.

Allerdings liefert die vorliegende Theorie keine Erklärung hinsichtlich der destabilisierenden Wirkungen von (4*S*)-Hydroxyprolin und vor allem von (4*R*)-Hydroxyprolin in der Xaa-Position. Umfassendere Begründungen, zumindest für die destabilisierende Wirkung von (4*R*)-Hydroxyprolin, wurden indessen

durch theoretische und röntgenstrukturanalytische Betrachtungen von Vitagliano et al. aufgeführt.⁷³

Tabelle 2. Dihedrale Winkel der Aminoacyl-Pro Bindungen in Kollagenstrukturen.^{52,73,81}

Position/Aminosäure	j	y
X/Pro	-69,8 ° (± 7,9 °)	162,0 ° (± 3,9 °)
Y/Pro	-60,1 ° (± 3,6 °)	152,4 ° (± 2,9 °)
Y/Hyp	-57,4 ° (± 2,0 °)	149,8 ° (± 2,9 °)
Gly	-70,4 ° (± 3,8 °)	174,9 ° (± 3,4 °)

Tabelle 3. Berechnete dihedrale Winkel von DeRider et al.¹²¹

Aminosäure	Konformer	j	y
Pro	<i>exo</i>	-58,61	143,02
(4R)-Fluorprolin	<i>exo</i>	-59,22	140,79
Pro	<i>endo</i>	-69,95	152,07
(4S)-Fluorprolin	<i>endo</i>	-76,44	171,95

Betrachtet man (Pro-Pro-Gly)_n-Modellpeptide in hoher struktureller Auflösung, erkennt man, dass der Prolinrest in den Xaa- und Yaa-Positionen unterschiedliche Torsionswinkel ϕ , ψ (Hauptkette) und χ_1 (Seitenkette, positive Werte entsprechen dem Up-, negative dem Down-Pucker) einnehmen (Tabelle 2.). Die Folge von unterschiedlichen dihedralen Winkeln ϕ und ψ scheint durch diverse Hauptketteninteraktionen entlang der Helix bedingt zu sein. Aus der starren Struktur der Iminosäuren resultiert eine enge Kopplung der Haupt- und Nebenkettenskonformationswinkel, woraus eine alternierende [C- γ -endo(down)-

Pro]-[C- γ -*exo*(up)-Pro]-Gly-Folge im Kollagen resultiert. (4*R*)-substituierte-Proline bestimmen durch den *exo*-Pucker einen ϕ -Winkel (Tabelle 3.), der sich optimal in die Helixstruktur einpasst. Auf der anderen Seite besitzen Proline in der Xaa-Position ϕ -Winkel von ca. -75° , typisch für die *endo*-Konformationen und deshalb unverträglich mit elektronegativen (4*R*)-Prolin-Substituenten. Der Analogieschluss einer (4*S*)-Hydroxysubstitution von Prolin-Resten in der Xaa-Position scheitert nach dieser Studie an einer sterischen, interchenaren Repulsion.

Modellpeptide mit 4-Fluor als isosteren Ersatz von Wasserstoff in Prolinen in Xaa-Position könnten ein weiteres experimentelles Mittel bieten, um die komplexen Zusammenhänge der Kollagenfaltung verstehen zu können.

Scheinbar spielen hydrophobe interchenare Wechselwirkungen ebenfalls eine wichtige Rolle.⁵² Diese entstehen durch die alternierende Konformationsfolge der Prolin-Reste. Da aber in anderen Arbeiten von Kramer et al.,^{55,80,131,132} das Fitten gefundener Elektronendichten auf einen einzigen *exo*-Pucker in der Xaa-Position hindeutet, ist klar, dass die vorgeschlagenen Strukturmodelle noch weitere Verfeinerungen benötigen.

1.6.5. Faltungskinetik von Kollagenpeptiden

Die Faltungskinetik nichtverknüpfter Kollagenketten wird in Abhängigkeit der Konzentration von zwei unterschiedlichen Prozessen bestimmt. Bei sehr niedrigen Konzentrationen findet man eine Reaktionsordnung dritter Ordnung, da das Zusammentreffen der drei Ketten oder genauer das Finden zweier Ketten zu einem instabilen Dimer, welches dann mit einer weiteren Kette zum Trimer assoziiert, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (siehe Abschnitt 1.6.3.).

Bei höheren Konzentrationen nimmt die Reaktionsordnung ab. Boudko et al.¹⁰⁸ beschreiben diese Abnahme anhand unterschiedlicher Konzentrationen von

Einzelketten und finden bei hohen Konzentrationen schließlich eine Reaktionsordnung erster Ordnung. Hier ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ausschließlich auf die *cis/trans*-Isomerisierungen der Aminoacyl-Prolin Bindungen während der reißverschlussartigen Faltungsfortpflanzung zurückzuführen.

Templatverknüpfte Kollagenpeptide unterliegen keiner Konzentrationsabhängigkeit. Um Faltungskinetiken von trimeren Kollagenpeptiden mit den Kinetiken von selbstassoziiierenden Einzelketten vergleichen zu können, werden hohe Konzentrationen der Einzelketten eingesetzt. Zur Auswertung werden ausschließlich die ersten Minuten der Kinetik verwendet, da durch die geringer werdende Konzentration der α -Ketten die Kinetik wiederum eine höhere Ordnungen annimmt.

Vergleichende Studien von Kollagen-Peptidmodellen bestehend aus (Pro-Pro-Gly)- und (Pro-Hyp-Gly)-Repeats zeigen eindeutig, dass die Peptide mit Hyp in Yaa-Position sich schneller falten.¹⁰⁸ Dies liegt daran, dass die Gleichgewichtskonstante $K_{trans/cis}$ von Hyp weiter auf der *trans* Seite liegt und somit entsprechend weniger Isomerisierungen zur vollständigen Faltung stattfinden müssen. Auch in anderen Proteinen spielt diese Isomerisierung der Prolin-Bindung eine wichtige geschwindigkeitsbestimmende Rolle. Die Natur erleichtert diesen Vorgang mit speziellen Isomerasen.¹³³

1.7. Synthese von Kollagenpeptiden

1.7.1. Generelle Schwierigkeiten der Peptidsynthese

Wenn in der Peptidchemie von Synthesen komplizierter Peptidketten gesprochen wird, impliziert dies häufig schwierige Peptidkupplungen aufgrund sterischer bzw. elektronischer Effekte oder Aminosäuresequenzen, die anfällig für Nebenreaktionen sind. Weitere Probleme können gerade bei längeren Peptiden durch Ausbildung von Sekundärstrukturen während der Synthese entstehen, da oft durch solche Strukturierungen oder durch Aggregationen am Harz die Zugänglichkeit der N-Termini verschlechtert wird. Dadurch werden weitere Anknüpfungen von Aminosäuren erschwert.

Bei der Acylierungsreaktion haben sich N-alkylierte oder α,α -disubstituierte Aminosäuren als besonders problematisch erwiesen. Oft bietet aber ein Wechsel zu stärker acylierenden Reaktionsbedingungen einen entsprechenden Vorteil, doch bringt die stärkere Aktivierung einer Aminosäure auch vermehrte Nebenreaktionen mit sich. So steigt die Racemisierungstendenz mit zunehmender Aktivierung durch die erhöhte C α -Azidität des Aminosäure-Derivats. Säurechloride als besonders starke Acylierungsderivate neigen darüber hinaus zur Bildung von N-Carboxyanhydriden, aus denen weitere Nebenprodukte hervorgehen, um nur einige wenige Aspekte zu erwähnen, die in der Peptidchemie berücksichtigt werden müssen. Kontinuierliche Neuentwicklungen von Kupplungsmethoden mit diversen Aktivierungsreagenzien zeigen, dass hier von Fall zu Fall entschieden und optimiert werden muss. In Tabelle 4. sind die wichtigsten Nebenreaktionen mit den dazugehörigen Massendifferenzen zusammengefasst.

Tabelle 4. Häufigste Nebenreaktionen neben den Deletionspeptiden.

Massendifferenz	Nebenreaktion
-34	Desulfurierung Cys → Dehydroalanin
-2	Disulfidbildung aus 2 Cys
-1	Amidbildung (C-Terminus)
1	Deamidierung (C-Terminus, Asn, Gln)
14	Methylierung
16	Hydroxylierung (Lys, Trp, Pro, Asp)
16	Oxidation von Met, Cys
32	Met → Sulfon
42	Acetylierung
43	Carbamylierung
56	<i>tert</i> -Butylierung
96	Trifluoracetylierung
111	Piperidin-Addukt
252	Pbf (Pentamethyl-Dihydrobenzofuransulfonyl)-Addukte
266	Pmc (2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl)-Addukte

1.7.2. Bekannte Probleme der Synthese kollagenartiger Peptide

Sakakibara und Mitarbeiter¹³⁴ verwendeten erstmals zur Synthese homogener H-(Pro-Pro-Gly)_n-OH Ketten die Festphasenchemie von Merrifield.³² Mit der Boc-Schutzgruppen-Strategie konnte die bereits bekannte sequenzbedingte leichte Abspaltung von Piperazin-2,5-dion (Diketopiperazin) aus Prolin-enthaltenden Sequenzen weitgehend vermieden werden. Zum Aufbau von H-(Pro-Hyp-Gly)_n-OH führte Sakakibara den Baustein Boc-Pro-Hyp(Bzl)-Gly-OH ein,³⁵ um vor allem Deletionen einzelner Aminosäuren zu vermeiden. Diese Synthesestrategie mit dem Tripeptidbaustein ist auch in späteren Jahren erfolgreich eingesetzt worden,^{79,113,135} obwohl für diese Prolin-reichen Kollagenpeptide auch stufenweise Aminosäurekupplungen verwendet wurden. Letztere Strategie fand auch in der Fmoc-Chemie trotz der erhöhten Diketopiperazinbildung Verwendung.⁹⁴ Im eigenen Arbeitskreis wurde die schwierige Reindarstellung der Rohprodukte aus stufenweisen Synthesen wegen der starken Mikroheterogenität sehr bald erkannt und deshalb der Einsatz von Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH^{43,44} und noch vorteilhafter von Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH⁴⁹ erprobt. Unter Verwendung von Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH anstelle von Fmoc-Gly-Pro-Hyp-OH^{104,136,137} wird die Diketopiperazin-Bildung (Abb. 8.) besser unterdrückt, da besonders N-terminale Gly-Pro-Sequenzen zu Diketopiperazin-Abspaltung neigen.^{138,139} Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Übergangszustand durch die erleichterte *cis*-Konformation der Gly-Pro-Bindung energiearm ist und die zu spaltende Pro-Pro-Bindung zu den energiereichsten Peptidbindungen zählt. Deshalb hat sich in den letzten Jahren der Einsatz von Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH weitgehend durchgesetzt.¹⁴⁰

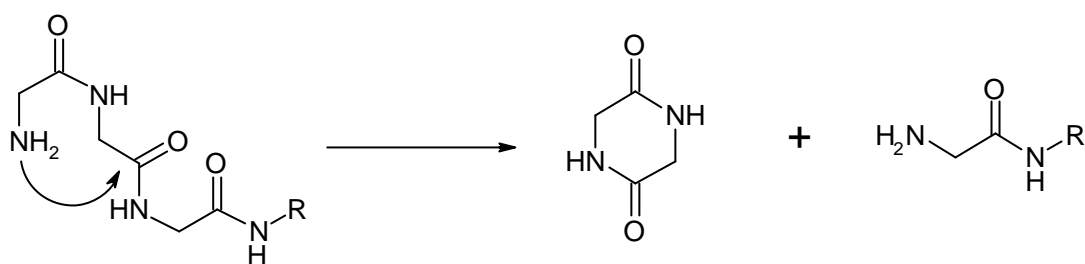


Abb. 8. Abspaltung von Diketopiperazin in basischen Lösungen als problematische Nebenreaktion in der Peptidsynthese (hier: z. B. (Gly-Gly-Peptidyl)).

Ein Nachteil der Verwendung von Tripeptid-Bausteinen ist die aufwendige Synthese dieser Synthone in Lösung und deren ineffektive Nutzung in der Festphasensynthese. Für weitgehend quantitative Acylierungen der terminalen Prolinreste sind Doppelkupplungszyklen an der festen Phase mit je vier Äquivalenten des Tripeptids pro Kupplung notwendig, was einem Verlust von sieben Äquivalenten des Synthons entspricht.

Wie bereits erwähnt, wurde eine Synthesestrategie im eigenen Arbeitskreis entwickelt, um unterschiedliche kollagenartige Peptidketten mit einem Cystinknoten in definierten Rastern zu vernetzen.^{42,44-46} Die regioselektive Verknüpfung der Peptide laut Abb. 9. basiert im Wesentlichen auf Thiol/Disulfidaustausch-Reaktionen wie sie bislang zur Synthese von unsymmetrischen Disulfid-verbrückten Heterodimeren verwendet wurden.^{141,142,143-145} Dabei wird eine energiereiche unsymmetrische Disulfidgruppierung einer Peptidkomponente mit einem freien Thiol einer zweiten Peptidkomponente bei pH 3-6 in wässriger Lösung zum Disulfid-verbrückten Heterodimer umgesetzt.

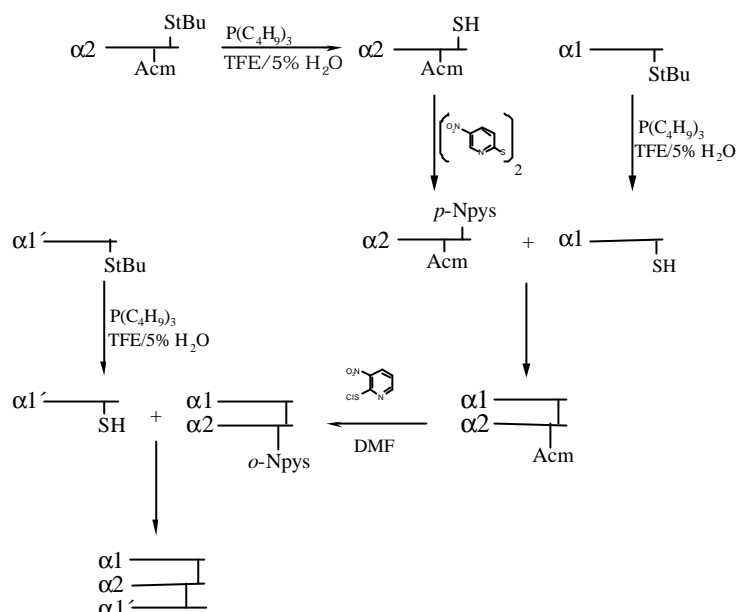


Abb. 9. Synthesestrategie zur Verknüpfung von drei α -Ketten nach Ottl et al.^{42,44}

In der Reaktionsfolge der Syntheseroute von Abb. 9. ist die aktivierende Spezies ein S-Nitropyridylsulfenyl-Cystein-Derivat; nach dem nukleophilen Angriff durch die Thiolgruppe eines Cysteinpeptids bildet die Abgangsgruppe ein stabiles Thion, wodurch diese Reaktion in Richtung Produkt quantitativ abläuft. Die aktivierten Einzelketten werden durch Reaktion des freien Cystein-Thiols mit Di-(5-nitro-2-pyridin)disulfid und das aktivierte Dimer durch Umsetzung des noch elektronenärmeren 3-Nitro-2-pyridylsulfenylchlorids mit dem S-Acm-geschützten Peptid gewonnen. Diese selektive Reaktion mit der S-Acm-Gruppe garantiert die essentielle Orthogonalität der beiden Cysteine der mittleren $\alpha2$ -Kette und verhindert dadurch einen intramolekularen Disulfidaustausch zwischen der zuvor geschaffenen Disulfidbrücke und der freien Thiolkomponente. Alle nicht Acm-geschützten Cysteine wurden als S-*tert*-Butylthio-Derivate eingesetzt.¹⁴⁶ Diese Schutzgruppe wird erst nach Aufreinigung der Einzelketten reaktiv mittels Phosphinen abgespaltet.^{147,148} Mit diesem Verfahren wurde es erstmals möglich, heterotrimere

Kollagenpeptide zu synthetisieren und mit diesen synthetischen Konstrukten biologische Fragestellungen zu untersuchen.^{23,43-45,48-50}

Aber auch bei dieser sehr gut ausgearbeiteten Synthesestrategie wurden bereits in einer vorangehenden Arbeit Probleme sichtbar.⁴⁷ Die hohe Tendenz kollagenartiger Peptide zur Selbstassoziation führt scheinbar zu schwer zugänglichen Reaktionsstellen und somit sehr leicht zum Scheitern solcher Synthesen oder zu zeitaufwendigen Optimierungsarbeiten. Deswegen ist die Herstellung kollagenartiger Peptide und vor allem vom homo- oder heterotrimeren Konstrukten weiterhin eine synthetische Herausforderung.

2. Aufgabenstellung

Basierend auf den Erfahrungen vorangehender Arbeiten zur Synthese kollagenartiger Peptide sollten zunächst die Syntheseverfahren zum Aufbau der einzelnen Ketten und dann zu deren Vernetzung über Disulfidbrücken mittels regioselektiver Cystinchemie optimiert werden, um eine generell anwendbare Strategie zu entwickeln. Diese sollte es dann erlauben, neue maßgeschneiderte Kollagenpeptide zu synthetisieren, um spezielle strukturelle Fragestellungen zu bearbeiten.

Dabei sollte als Schwerpunkt der Einfluss der Kettenlänge, der Position und der Art des Cystinknotens auf die Stabilität der Kollagen-Tripelhelix solcher heterotrimeren Modellpeptide in Details mittels spektroskopischer Methoden wie Circular Dichroismus und NMR, aber speziell auch mittels Mikrokalorimetrie untersucht werden, um thermodynamische Daten zur Kollagen-Tripelhelix zu gewinnen. Von besonderem Interesse war in dieser Fragestellung ein direkter Vergleich eines einfachen, künstlichen Cystinknotens (Abb. 10 A) bestehend aus zwei regioselektiv aufgebauten Disulfidbrücken zwischen den drei Kollagenketten mit dem natürlichen Cystinknoten des Kollagens Typ III (Abb. 10 B), der über drei Disulfidbrücken die α -Ketten vernetzt (Abb. 10 C). Zwar wurde im Laufe dieser Doktorarbeit aus anderen Laboren berichtet, dass dieser Knoten in rekombinanten^{108,109} und synthetischen Kollagen-Peptidketten^{14,180} oxidativ hergestellt werden kann, aber die Konnektivität dieses Cystinknotens war noch nicht untersucht worden. Ebenso war die Selektivität der oxidativen Faltung von Kollagenpeptiden unbekannt. Während die oxidative Faltung von Cystein-Proteinen ein thermodynamisch gekoppelter Prozess darstellt, war nicht bekannt, ob dies auch bei Kollagenen der Fall ist oder ob die Ausbildung der Cystinknoten nach der Faltung erfolgt und somit nur zur Stabilität der Tripelhelix dient. Letztes Ziel dieser Arbeit war

eine Aufklärung des natürlichen Disulfidknotens des Kollagen Typ III mittels Röntgenstrukturanalyse.

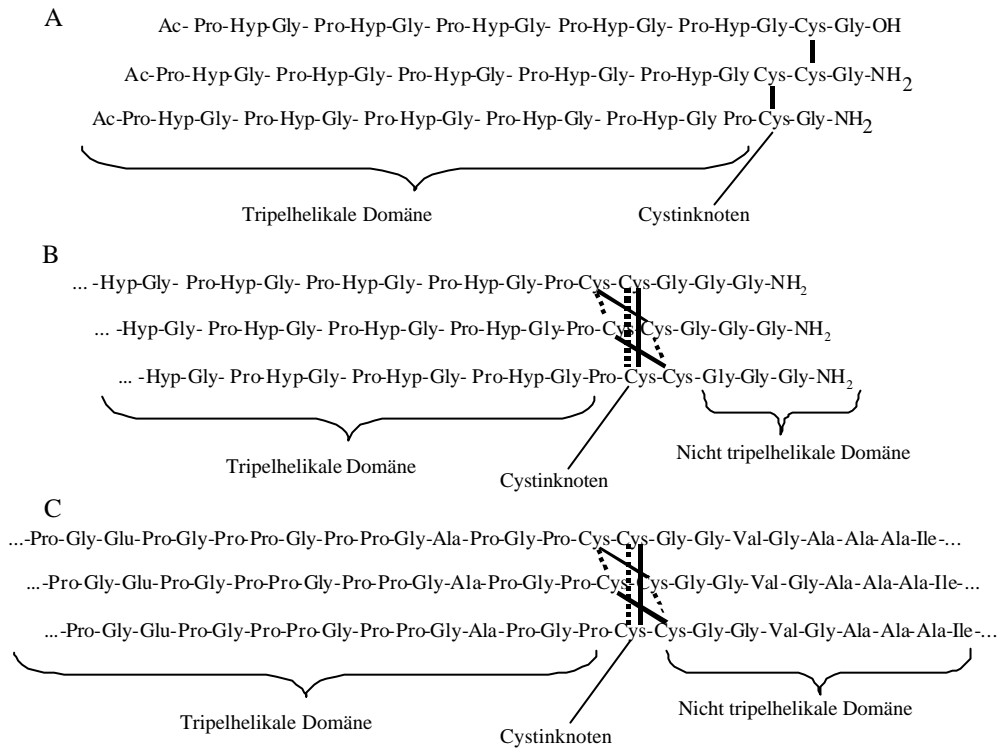


Abb. 10. Kollagenmodellpeptide mit künstlichem (A) und natürlichem Knoten (B) im Vergleich zum humanen Kollagen Typ III $\alpha 1$ -Precursor Sequenzausschnitt (1181-1205) mit postulierter Konnektivität (C).

Als zweite wichtige Fragestellung sollte mittels synthetischer, kollagenartiger Peptide mit unterschiedlichen (4)-Fluorprolin-Derivaten der Einfluss elektronegativer Substituenten des Prolinrestes in der Position Xaa der Kollagentriplets (Xaa-Yaa-Gly) bearbeitet werden, um die Arbeitshypothese des starken Einflusses des Prolin-Puckers auf die Ausbildung der Tripelhelix mit experimentellen Daten zu untersuchen.

3. Ergebnisse

3.1. Synthese von homo- und heterotrimeren Kollagenpeptiden

Erstes Ziel der Dissertation war die Übertragung der im Arbeitskreis bereits erprobten Synthesestrategie^{42,44} auf Kollagen-Modellpeptide exklusiv bestehend aus (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts und deren regioselektive Vernetzung mittels eines Cystinknotens. Dabei sollte dieser Cystinknoten sowohl C- wie N-terminal eingebaut werden, um die Tripelhelix-Faltung vom C- zum N-Terminus, wie auch von N- zum C-Terminus kinetisch und thermodynamisch zu untersuchen sowie entsprechende Suprastrukturen in ihrer Stabilität zu charakterisieren. In Abb. 11. ist als Beispiel ein solches Trimer bestehend aus (Pro-Hyp-Gly)₅-Ketten mit C-terminalem Cystinknoten dargestellt.

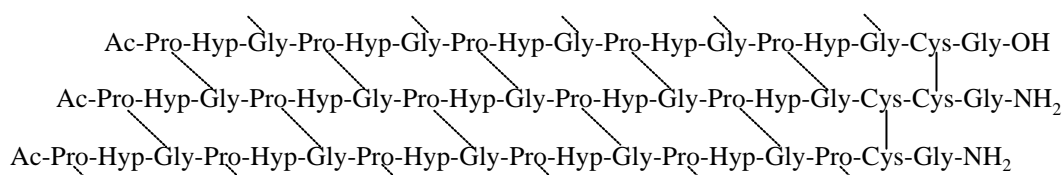


Abb. 11. Heterotrimeres Kollagenpeptid mit C-terminalem, künstlichen Cystinknoten: Durch die gestrichelten Linien sind die interchenaren Wasserstoffbrücken gekennzeichnet. Aus der Anreihung der α -Ketten ist auch das um einen Aminosäurerest versetzte Raster der Ketten ersichtlich, dass für die tripelhelikale Faltung der Kollagene essentiell ist.

3.1.1. Synthese kollagenartiger Einzelketten aus Tripeptideinheiten

Wie bereits einleitend diskutiert wurde, scheitert die Synthese von kollagenartigen Peptidketten durch sukzessive Kupplung einzelner Aminosäuren in Sequenzfolge an der starken Heterogenität der Rohprodukte, die sich wegen der Sequenzähnlichkeit kaum reinigen lassen. Deswegen hat sich in den letzten Jahren vor allem zur Festphasensynthese von Kollagenpeptiden bestehend aus repetitiven Tripeptideinheiten des Typs

(Gly-Pro-Pro) oder (Gly-Pro-Hyp) der Einsatz von Tripeptidsynthonen des Typs Gly-Hyp-Pro oder Pro-Hyp-Gly in geeignet geschützter Form sowohl in der Boc/Bzl- wie auch in der Fmoc/tBu Chemie durchgesetzt. Für letztere Strategie erwies sich das Pro-Hyp-Gly-Tripeptid zur Verminderung der Diketopiperazin-Bildung als geeigneter^{43,44} und findet nunmehr zunehmende Verwendung auch in anderen Forschungsgruppen.^{105,140}

3.1.1.1. Synthese der Tripeptidsynthone

Eine ungeschützte Seitenkette-Hydroxyfunktion der N^α-Boc oder -Fmoc geschützten Tripeptide kann in den Kupplungsschritten teilweise verestert werden. Diese Nebenreaktion ist vor allem in der Fmoc-Strategie unproblematisch, da solche Ester in den anschließenden Fmoc-Abspaltungsschritten hydrolysiert werden.⁴³ Der ungeschützte Hydroxyprolinrest darf aber nicht N-terminal positioniert sein, da es in diesem Falle bei Freilegung der N-terminalen Aminogruppe durch leicht auftretende O^γ-N-Umacylierungen zu Fehlsequenzen kommt. Um sowohl diese Nebenreaktion *a priori* zu vermeiden wie auch die leicht auftretenden Aggregationen von (Pro-Hyp-Gly)_n-Ketten am Harz unter Ausbildung tripelhelikaler Strukturen und dementsprechend schwierigen Synthesen zu vermeiden, wurde auch diese Hydroxygruppe als *tert*-Butylether geschützt.^{49,140} In der Tat erwies sich dieser zusätzliche Schutz als sehr vorteilhaft, da wie im Abschnitt 3.1.2. experimentell bewiesen, *O-tert*-Butyl geschützte (Pro-Hyp-Gly)_n-Ketten nur gering zur Ausbildung von tripelhelikalen Konformationen neigen. Zudem sollte dieser Schutz auch den Einsatz stark acylierender Reagentien zur Kupplung der Synthone erlauben.

Die Synthese des Tripeptids Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH in Lösung erfolgte nach bereits beschriebenem Verfahren,⁴⁹ das auch zur Herstellung der Fmoc-Tripeptidsynthone Fmoc-(4*S*)-FPro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH und Fmoc-(4*R*)-FPro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH diente, indem lediglich das *Z*-geschützte enantiomerenreine

Fluorprolin anstelle von ZPro-OH verwendet wurde. Der Syntheseweg ist in Abb. 12. schematisch wiedergegeben.

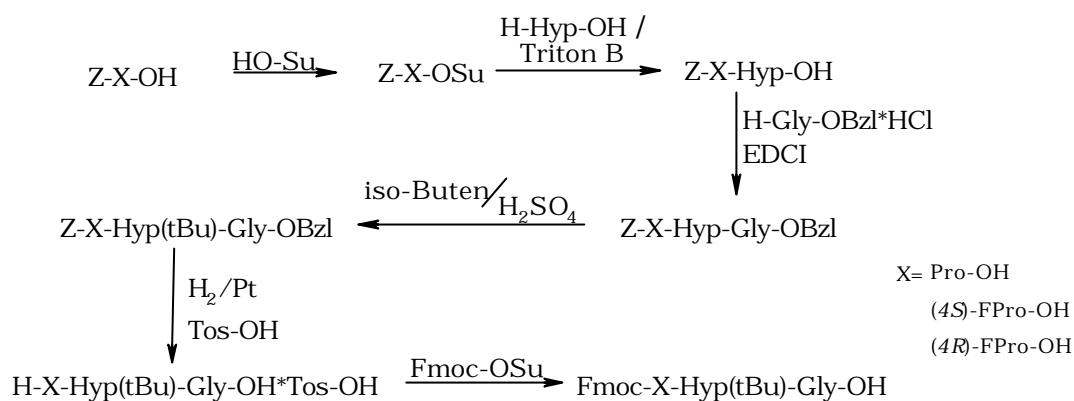


Abb. 12. Synthese der Tripeptidsynthone in geschützter Form.

4-Fluorproline sind durch Umsatz von 4-Hydroxyprolin mit DAST¹⁴⁹ in einer S_N2-Reaktion unter Inversion des stereogenen Zentrums zugänglich. Dementsprechend wurde das kommerziell verfügbare (4R)-Hydroxyprolin direkt mit DAST zum (4S)-Fluorprolin umgesetzt oder zunächst in das (4S)-Hydroxyprolin laut Abb. 13. konvertiert und anschließend nach Literaturbekanntem Verfahren in das (4R)-Fluorprolin überführt. Die so erstellten Derivate Z-(4S)-FPro-OH und Z-(4R)-FPro-OH wurden laut Abb. 13. zur Synthese der Tripeptidsynthone Fmoc-(4S)-FPro-Hyp(tBu)-Gly-OH und Fmoc-(4R)-FPro-Hyp(tBu)-Gly-OH eingesetzt.

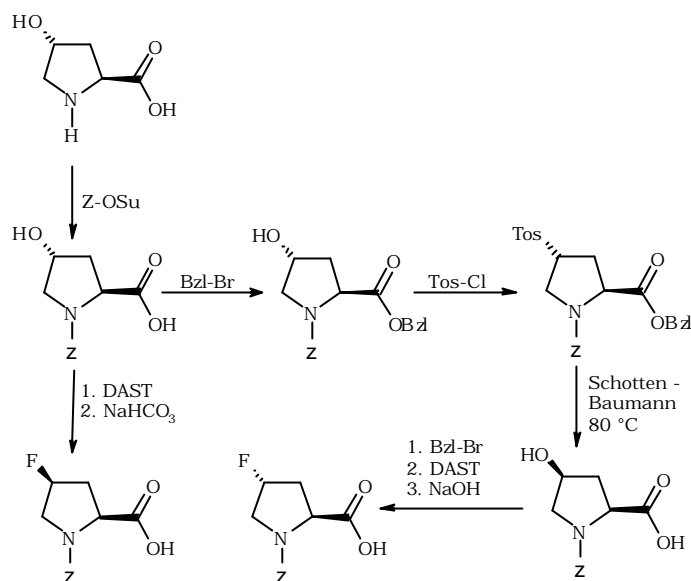


Abb. 13. Synthese von (4S)- und (4R)-Fluorprolin mit DAST.¹⁴⁹

Für die Synthese von Fmoc-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH wurde eine neue Route erarbeitet, die in Abb. 14. schematisch dargestellt ist. Der entscheidende Reaktionsschritt in dieser Synthese ist die quantitative Fluorierung der Carboxy- und Hydroxy-Funktion des Dipeptid-Derivats Z-Pro-Hyp-OH mit DAST und die anschließende Umsetzung im Eintopfverfahren mit H-Gly-OBzl. Mit dieser Reaktion gelang es erstmals mittels DAST gleichzeitig eine Hydroxy-Funktion in das Fluorderivat zu konvertieren und die Carboxy-Funktion als Säurefluorid für anschließende Acylierungsschritte zu aktivieren. Nach hydrogenolytischer Abspaltung des ZRestes und Umsetzung mit Fmoc-OSu konnte auf diesem Wege in sehr effizienter Weise das gewünschte Tripeptid-Derivat Fmoc-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH gewonnen werden.

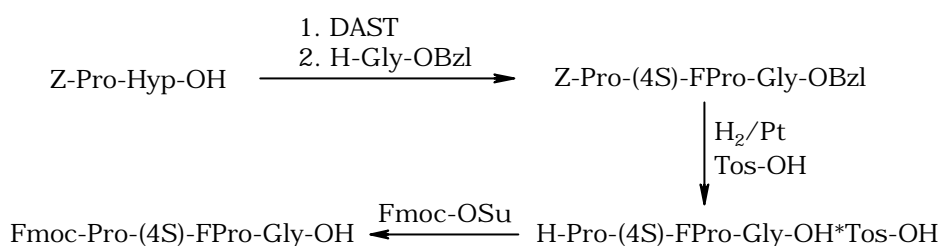


Abb. 14. Synthese des Tripeptid-Derivats *Fmoc-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH* mittels der neu entwickelten Fluorierungs/Kupplungs-Eintopfreaktion.

3.1.1.2. Synthese der Einzelketten mittels Tripeptidbausteinen

Ein wesentlicher Nachteil der repetitiven Festphasensynthese von kollagenartigen Peptiden mittels geschützter Tripeptidsynthese des Typs *Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH* oder entsprechender Analoga ist die ineffiziente Nutzung des aufwendigen Tripeptid-Derivats, da selbst bei Verwendung sonst effizienter Kupplungsreagentien wie HBTU große Überschüsse dieser Kopfkompone (2 bis 4-5 Äquivalente) wegen des N-terminalen Prolinrestes benötigt werden, um den Acylierungsschritt „quantitativ“ zu gestalten. Andererseits würden nicht quantitative Umsetzungen wegen der repetitiven Aminosäuresequenz zu sehr schwierigen Reinigungsschritten führen. Diese Überschüsse bedeuten aber erhebliche Verluste an teuren und arbeitsintensiven Synthesen, die in Lösung hergestellt werden müssen.

Bei der Synthese von Kollagenpeptiden mit (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten unter Verwendung von *Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH* und HBTU als Kupplungsreagenz⁴⁹ ist dieser Verlust noch zu rechtfertigen, da die benötigten Aminosäurederivate günstig zu erwerben sind und der Einsatz von teureren Kupplungsreagenzien oder anderen aufwendigeren Verfahren keine entscheidenden Vorteile bringt. Der Einbau von unterschiedlichen Fluorprolinen lässt den theoretischen Verlust von 87.5 % durch Doppelkupplungen mit jeweils vier Äquivalenten des Bausteins wirtschaftlich,

aber vor allem auch technisch kaum mehr zu, da die Fluorierung der Proline im großen Maßstab mit außerordentlichen Schwierigkeiten verbunden ist.

Wie schon in der Einleitung diskutiert, gibt es nach 30 Jahren Festphasen-Peptidsynthese zahlreiche Möglichkeiten die Kupplungseffizienz zu erhöhen. Einer der wichtigsten Parameter ist die Art der Carboxy-Aktivierung. Dementsprechend sind verschiedene neue Kupplungsreagenzien entwickelt worden, deren Aktivierung im wesentlichen auf unterschiedlichen Carboxy-Derivaten basiert. Neben den oft verwendeten Uronium- und Phosphoniumsalzen, die *in situ* Aktivester generieren, kommen vor allem die viel aktiveren Säurehalogenide in Betracht. Um die Kupplungsfolge zu erleichtern und eine spätere Automatisierung zu garantieren, wurden deshalb *in situ* Halogenierungsreagenzien eingeführt. Neben dem Chlorierungsreagenz BTC¹⁵⁰ wurde TFFH¹⁵¹ zur *in situ* Konvertierung von Carboxy-Gruppen in Säurefluoride erfolgreich erprobt (Abb. 15.).

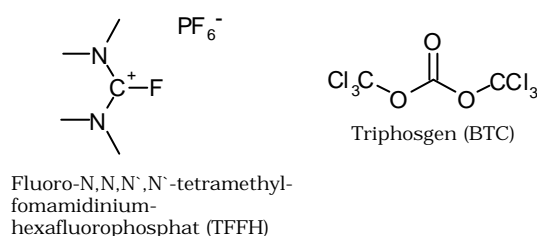


Abb. 15. Die Halogenierungsreagentien BTC und TFFH konvertieren *in situ* Carbonsäuren in Säurehalogenide.

Erste Versuche, die Tripeptidsynthese mittels BTC in die entsprechenden Chloride zu überführen, um auf diesem Wege Einzelketten am Harz aufzubauen, sind gescheitert. Es entstanden Peptidgemische mit nicht identifizierbaren Nebenprodukten, aus denen auch mittels Chromatographie keine einheitlichen Produkte isoliert werden konnten. Es ist bekannt, dass Säurechloride, die erstmals von Emil Fischer zur Synthese von Peptiden verwendet wurden, zu verschiedenen Nebenprodukten führen und deshalb als

„überaktivierte“ Kopfkompenten definiert werden. Im Vergleich dazu lieferten Doppelkupplungen mittels TFFH bei häufig nur 1.8 und 0.8 Äquivalenten nahezu homogene Rohprodukte. Beim Einsatz von insgesamt 2.6 Äquivalenten der Tripeptidsynthese pro Kupplung reduziert sich der theoretische Verlust von 87.5 % auf 61.5 %, was als eine erhebliche Verbesserung der Synthese angesehen werden kann.

Um das zusätzliche Problem der Diketopiperazin-Bildung weitgehend zu unterdrücken, wurde die Fmoc-Abspaltung in eiskalter DMF-Lösung mit 2 % DBU und 2 % Piperidin durchgeführt.¹⁰⁴ Mit diesem Verfahren konnte die Reaktionszeit von insgesamt 2+15 min. auf 30+90 sec. reduziert werden. Diese schnelle Fmoc-Abspaltung und die anschließende ebenfalls schnell verlaufende Acylierung des endständigen Prolins mittels TFFH unterdrückt praktisch quantitativ die Abspaltung von Diketopiperazin und somit die Bildung von Fehlsequenzen. Dementsprechend konnten mehrere der in Tabelle 5. aufgeführten Kollagenketten durch einfaches Umfällen in bester Reinheit gewonnen werden. Schwieriger war allerdings die quantitative Acylierung von Peptiden mit endständigem Fluorprolin. Wegen der stark elektronenziehenden Wirkung des Fluorsubstituenten am C4 des Prolinringes wird die Nukleophilie der Iminogruppe reduziert und lange Reaktionszeiten mit Mehrfachkupplungen waren notwendig (ab der zweiten Kupplung 4-fache Kupplungen mit Reaktionszeiten von 24+24+24+48 h und jeweils 1.8 eq Tripeptid-Baustein), um die entsprechende Peptidketten [Tabelle 5: $\alpha(2xStBu)(\mathbf{X})$ und $\alpha(2xStBu)(\mathbf{XI})$] nach HPLC als homogene Produkte zu isolieren.

Der Fmoc/tBu Strategie entsprechend wurden die Cysteinreste je nach Trimerisierungsverfahren (Abschnitte 1.7.2./3.1.2./3.1.3.) als *S-tert*-Butylthio, *S*-Acetamidomethyl oder *S*-Trityl Derivate geschützt. Mit den ersten zwei Schutzgruppen konnten die Peptide nach acidolytischer Abspaltung vom Harz und somit gleichzeitiger Entfernung der *tert*-Butyl-Gruppen in der *S*-geschützten Form mittels Chromatographie gereinigt werden, während im

Falle des S-Tritylschutzes nach milder Abspaltung vom Harz die vollgeschützten Peptide ohne Zwischenreinigung weiteren Reaktionsschritten zugeführt wurden. In diesem Kontext ist erwähnenswert, dass selbst bei Verwendung von MTB als Fällungsmittel überraschender Weise als Oxidationsprodukt des unsymmetrischen Disulfids der *S-tert*-Butylthio-Gruppe Sulfinsäurethioester beobachtet wurden (Abb. 16).⁴⁷

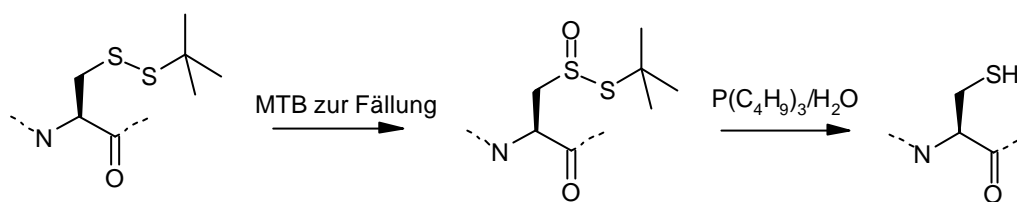


Abb. 16. Peroxidhaltiger MTB oxidiert die *S-tert*-Butylthio-Gruppe zum Sulfinsäurethioester.

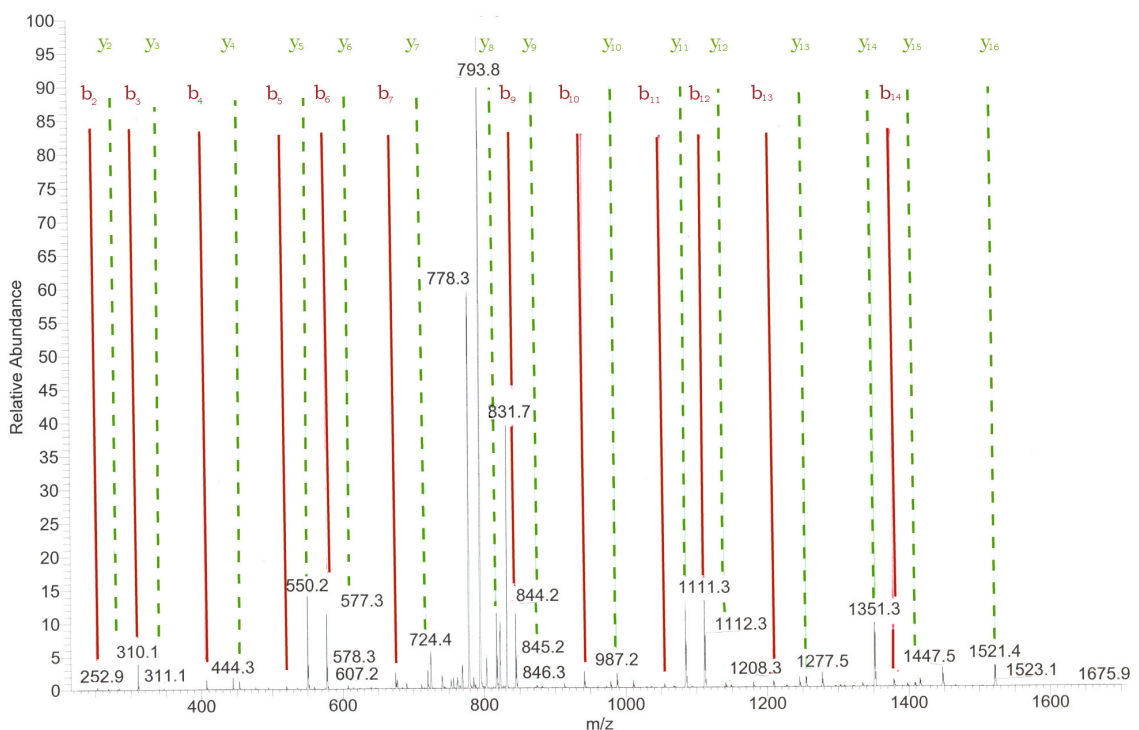


Abb. 17. ESI-IT-MS/MS des Nebenproduktes mit der theoretischen Masse 1862 amu zur Identifikation der Oxidationsposition.

Diese oxidierten Disulfide benötigen keine weitere Aufbereitung, da bei der reduktiven Abspaltung des StBu-Restes mit Phosphinen die Sulfoxide zu den ungeschützten Thiol-Cysteinresten reduziert werden. Diese Sulfoxide konnten mittels ESI-IT-MS/MS-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 17.). Das abgebildete Massenspektrum bestätigte die Position des Sulfoxids, wie sie in Abb. 16. gezeigt wird. Wäre nämlich die Masse $\Delta 16$ (im Spektrum +8) nicht am Cysteinrest, wären die entsprechenden Signale der y-Reihe verschoben.

Die Peptidketten der Tabelle 5. wurden an kommerziell erhältlichen Harzen synthetisiert, deren Linker den synthetischen Zielpeptiden angepaßt waren, d.h. als C-terminale Amide (Rink-Amid- oder XAL-Harze) oder freie Carbonsäuren (Wang-, PHB- oder Chlorotriptyl-Harze). Als sehr wichtig erwies sich bei der Synthese dieser Kollagenpeptide eine niedrige Beladung (ca. 0.25 mmol/g), um Aggregationen am Harz soweit wie möglich zu vermeiden.

In Tabelle 5. sind die synthetisierten Einzelketten aufgeführt, die anschließend zur Assemblierung der hetero- und homotrimeren Kollagenpeptide eingesetzt wurden.

Tabelle 5. Partiiell geschützte, kollagenartige Einzelketten für die Synthese der Heterotrimeren **Ia** und **Ib** (Abb. 18.) mit künstlichem Cystinknoten und der Homotrimeren **II-XI** mit natürlichem Cystinknoten (Abb. 28.).

Code	Verbindung
$\alpha 1(\text{StBu})[\mathbf{Ia}]$	Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Cys(StBu)-Gly-OH
$\alpha 2(\text{Acm,StBu})[\mathbf{Ia}]$	Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Cys(Acm)-Cys(StBu)-Gly-NH ₂
$\alpha 1'(\text{StBu})(\mathbf{Ia})$	Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys(StBu)-Gly-NH ₂
$\alpha 1(\text{tBu,Npys})[\mathbf{Ia}]$	Ac-(Pro-Hyp(tBu)-Gly) ₅ -Cys(Npys)-Gly-OH
$\alpha 2(\text{tBu,Trt,StBu})[\mathbf{Ia}]$	Ac-(Pro-Hyp(tBu)-Gly) ₅ -Cys(Trt)-Cys(StBu)-Gly-NH ₂
$\alpha 1'(\text{tBu,Npys})[\mathbf{Ia}]$	Ac-(Pro-Hyp(tBu)-Gly) ₅ -Pro-Cys(Npys)-Gly-NH ₂
$\alpha 1(\text{Npys})[\mathbf{Ib}]$	Ac-(Pro-(4S)-FPro-Gly) ₅ -Cys(Npys)-Gly-OH
$\alpha 2(\text{Trt,StBu})[\mathbf{Ib}]$	Ac-(Pro-(4S)-FPro-Gly) ₅ -Cys(Trt)-Cys(StBu)-Gly-NH ₂
$\alpha 1'(\text{Npys})(\mathbf{Ib})$	Ac-(Pro-(4S)-FPro-Gly) ₅ -Pro-Cys(Npys)-Gly-NH ₂
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{II-IV}]$	Ac-(Pro-Hyp-Gly) _n -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly ₃ -NH ₂ (n=3,5,7)
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{V}]$	Ac-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Gly ₃ -NH ₂
$\alpha(4x\text{StBu})[\mathbf{VI}]$	Ac-[Cys(StBu)] ₂ -Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly ₃ -NH ₂
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{VII,VIII}]$	H-(Pro-Hyp-Gly) _n -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-OH (n=5,7)
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{IX}]$	H-Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₇ -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly ₃ -OH
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{X}]$	Ac-((4S)-FPro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly ₃ -NH ₂
$\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{XI}]$	Ac-((4R)-FPro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly ₃ -NH ₂

3.1.2. Synthese der Heterotrimeren **Ia** und **Ib** mit artifiziellem Cystinknoten

Nach den erfolgreichen Synthesen von heterotrimeren Kollagenpeptiden mit eingebauten Sequenzteilstücken der natürlichen Kollagene des Typs I und IV wurde in ersten Versuchen eine ähnliche Route zur selektiven Assemblierung des künstlichen Knotens im Heterotrimer **Ia** (Abb. 18.) angewandt.

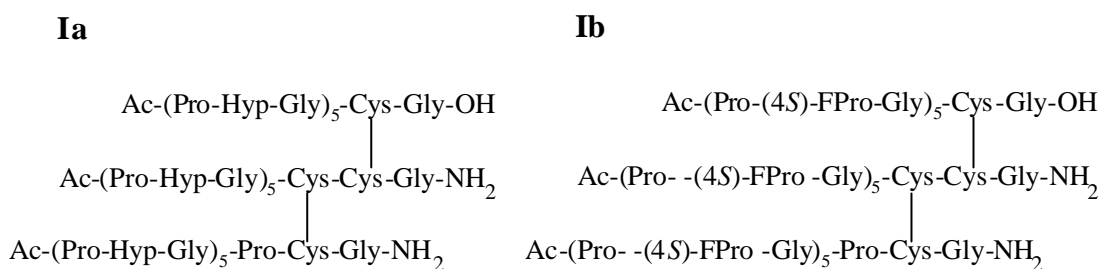


Abb. 18. Struktur des Heterotrimers Ia bestehend aus fünf (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts und des Heterotrimers Ib mit (4S)-Fluorprolin in Position Yaa der Kollagen-tripletts.

Dem Schema in Abb. 19. folgend wurde zunächst die $\alpha 2(\text{Acm,StBu})(\mathbf{Ia})$ -Kette am Cys(StBu) reaktiv entschützt. Bei der Aktivierung dieser Einzelkette zum S-Npys Derivat entstand als Nebenprodukt das entsprechende homodimere Addukt, wobei unabhängig von der Geschwindigkeit der Zugabe des Thiolpeptids $\alpha 1(\text{SH})(\mathbf{Ia})$ zu einer konzentrierten (Npys)₂ Lösung bis zu 20 % Homodimer nachgewiesen werden konnte. Das aus der Reaktion des Peptids mit ungeschütztem und aktiviertem Thiol resultierende Nebenprodukt kann nur auf eine hohe intrinsische Peptidkonzentrationen in Aggregaten zurückzuführen sein, die aufgrund der starken Tendenz dieser α -Kette zur tripelhelikalen Struktur in Lösung entstehen. Die Ausbildung der selbstassoziierten Tripelhelix in wässrigen Lösungen konnte mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden (s. Abschnitt 3.2.). Während die Umsetzung der aktivierten $\alpha 2(\text{Acm})(\mathbf{Ia})$ -Kette mit der Cystein-entschützten $\alpha 1(\mathbf{Ia})$ -Kette zum Heterodimer $\alpha 1/\alpha 2(\text{Acm})(\mathbf{Ia})$ noch einigermaßen erfolgreich abläuft, war seine anschließende Konvertierung in das aktivierte Dimer sehr schwierig. Die Reaktion des Dimers mit *o*-Npys-Cl erfolgt außergewöhnlich langsam und führt zu zahlreichen Nebenprodukten, die nur durch nukleophilen Angriff des Sulfenylchlorids auf die bereits gebildete Disulfidbrücke zu erklären war.⁴⁷ Diese bislang unbekannte Nebenreaktion konnte an Dibenzoyloxycarbonylcystin als Modellverbindung bestätigt werden (Abb. 20.).

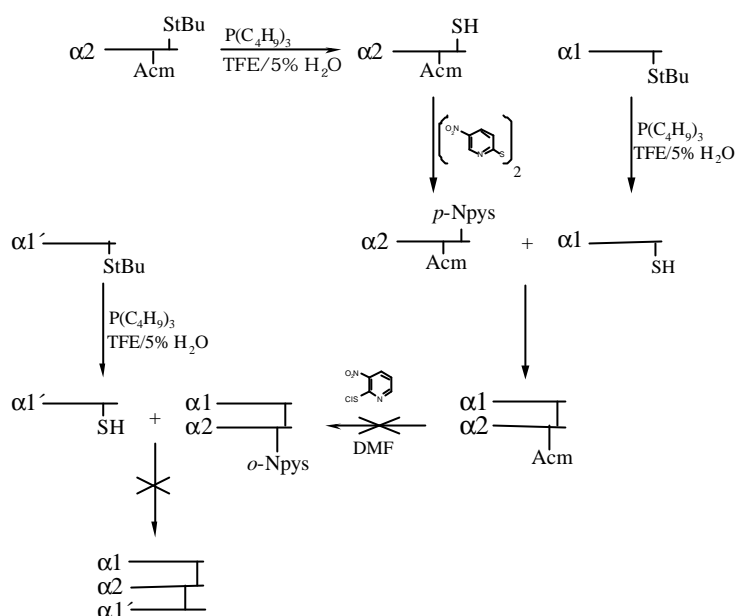


Abb. 19. Syntheseroute zur Assemblierung des Heterotrimers **Ia** nach Ottl et al.^{42,44} Die Synthese scheiterte an der sehr geringen Ausbeute des aktivierten Heterodimers, das schließlich auch in nicht befriedigenden Ausbeuten zum Trimer **Ia** umgesetzt werden konnte.

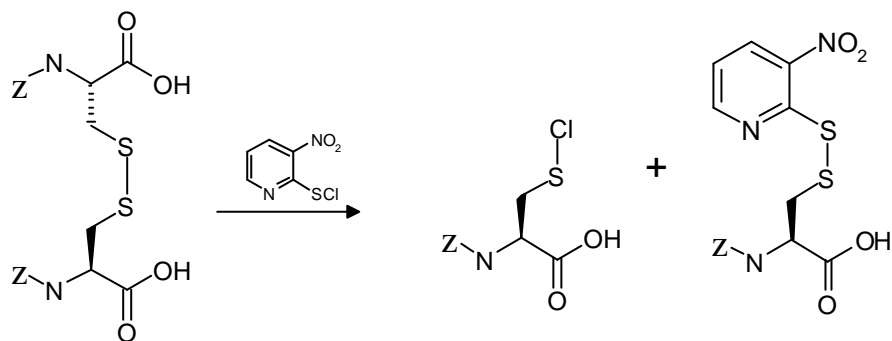


Abb. 20. Reaktion von $o\text{-Npys-Cl}$ mit $(Z\text{-Cys-OH})_2$.

Als alternatives Aktivierungsreagenz wurde $(p\text{-Npys})_2$ mit Cl_2 in Gegenwart von Iod zu $p\text{-Npys-Cl}$ umgesetzt. Dieses bedeutend reaktivere Sulfenylchlorid führte ebenfalls bei der Aktivierung des Dimers zu Nebenprodukten, auch wenn nach aufwendigen Reinigungsschritten das aktivierte Dimer $\alpha 1/\alpha 2(\text{Npys})(\mathbf{Ia})$ wenigstens in schwachen Ausbeuten isoliert werden konnte. Nur mit Nps-Cl konnten brauchbare Ergebnisse bezüglich Konvertierung des $\text{Cys}(\text{Acm})$ Restes

in das entsprechende Cys(Nps) erzielt werden. Wie an der Modellverbindung Cystein gezeigt werden konnte, erfolgt die Umsetzung von Cys(Nps) mit der freien Thiolgruppe eines Cysteins sehr langsam, jedoch ohne nachweisbare Nebenprodukte. Auch die Umsetzung von Nps-Cl mit dem Dimer $\alpha 1/\alpha 2(\text{Acm})(\mathbf{I})$ verlief problemlos, aber das resultierende Zwischenprodukt konnte nur partiell mit der $\alpha 1^{\prime}(\mathbf{I})$ -Kette bei pH 6 zur Reaktion gebracht werden. Mit der geringen Menge an aktiviertem Dimer, die isoliert werden konnte, wurden schließlich Umsetzungen mit der entschützten $\alpha 1^{\prime}(\mathbf{I})$ -Kette versucht. In wässriger Pufferlösung erfolgt die Reaktion sehr langsam und stagniert bei 50-80 % Umsatz vollkommen. Auch der Zusatz von Detergentien wie Guanidiniumhydrochlorid zur Auflösung von möglichen Aggregaten war erfolglos.

In früheren Synthesen nach dieser Route zeigten die Einzelketten wegen des Einbaus natürlicher Prolin/Hydroxyprolin-arter Sequenzen keine oder eine abgeschwächte Tendenz zur Selbstassoziation in tripelhelikale Strukturen, während die Einzelketten des Heterotrimers **Ia** relativ stabile Tripelhelices bilden wie in Abschnitt 3.2.3. aus den CD-Spektren klar hervorgeht. Diese bevorzugte Strukturierung ist sicherlich der Grund, warum die Synthese des Trimers **Ia** nach dem Schema der Abb. 19 gescheitert ist.

Daraus ergab sich als mögliche Alternative der Einsatz der Seitenketten-geschützten Ketten unter der Annahme, dass die *O-tert*-butylierten Peptide intermolekulare Wasserbrücken, die bei der Kristallisation und damit höchstwahrscheinlich auch bei der Aggregation eine beträchtliche Rolle spielen, verhindern.⁷² Sterische, intermolekulare Abstoßungen der hydrophoben *tert*-Butylgruppen konnten durch Modeling-Experimente an Tripelhelices nicht erkannt werden. Es war aber zu erwarten, dass die Lösungsmittel-exponierten *tert*-Butyl-Gruppen die hydrophobe Oberfläche der Ketten und dadurch die Gesamtentropie eines gefalteten Zustandes steigern würden.¹¹⁹ In der Tat entsprechen die CD-Spektren des vollständig *tert*-butylierten Heterotrimers **Ia**

in wässriger Lösung einem nahezu ungefalteten Zustand und bestätigten *a posteriori* die Arbeitshypothese (Abb. 21.).

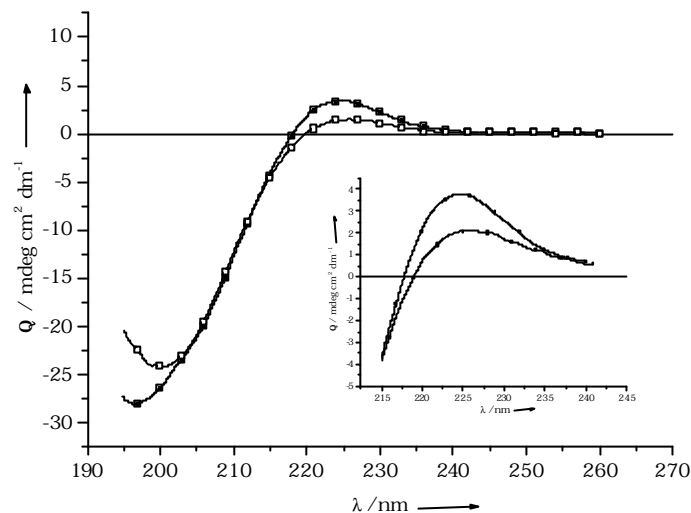


Abb. 21. Das CD-Spektrum des vollgeschützten Heterotrimers **Ia** (-□-□-□-) mit seinem stark verringerten Maximum bei 225 nm und dem bathochromen Shift der negativen Bande im Vergleich zum entschützten Trimer **Ia** (-■-■-■-) spricht für eine stark verringerte Tendenz zur tripelhelikalen Struktur.

Erste Voraussetzung für eine Assemblierung des Cystinknotens mit geschützten Peptidketten waren hocheffiziente Synthesen der Einzelketten (s. Abschnitt 3.1.1.), da nach anschließender Abspaltung der Schutzgruppen das Heterotrimer **Ia** kaum noch zusätzlich chromatographisch gereinigt werden kann. Um eine intermediäre Aktivierung des Heterodimers zu vermeiden, die zu den beschriebenen Schwierigkeiten geführt hatte (*vide supra*), war eine Umstellung in der Schutzgruppen-Kombination der Cysteine erforderlich. Ebenso sollte die Aktivierung der einzelnen Ketten am Harz erfolgen, um die im ersten Syntheseweg in Lösung beobachtete Homodimerisierung zu vermeiden. Da in der Fmoc-Synthesestrategie ein direkter Einsatz von Cys(Npys) Derivaten wegen der Basenlabilität des unsymmetrischen Disulfids nicht möglich war,

musste die S-Aktivierung, d.h. die Bildung des Cys(Npys)-Derivats postsynthetisch am Harz erfolgen.

Dazu wurden in ersten Versuchen das StBu-geschützte Cysteinderivat eingesetzt. Die reduktive Freisetzung der Thiofunktion und ihre Aktivierung am Harz scheiterten jedoch an umfangreichen Nebenprodukten. So führte die Abspaltung des StBu-Restes mit verschiedenen Reduktionsmitteln wie 1,2-Ethandithiol, threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol, Tri(n-butyl)phosphin oder Tris-(2-carboxyethyl)phosphin in unterschiedlichen Lösungsmitteln zur Desulfurierung am Cysteinrest und somit zu Dehydroalanin-Peptiden. Solche Desulfurierungs-Nebenreaktionen an Cys(StBu)-Resten wurden unter bestimmten Bedingungen auch in Lösung beobachtet.⁴⁵ Sehr überraschend war die Beobachtung, dass Umsetzungen der Cystein-entschützten Peptide mit (Npys)₂ selbst am Harz Dimerisierungen bewirkt, die selbst bei geringer Beladung (0.1 mmol/g) nicht verhindert werden konnten. Dies widerspricht der gängigen Auffassung, dass am Harz eine hohe Verdünnung simuliert wird.¹⁵² Um zu beweisen, dass diese unerwartete Dimerisierung am Harz zustande kommt und nicht nach Abspaltung vom Harz in Lösung durch Reaktion mit nicht-umgesetztem Cysteinpeptid, wurde eventuell nicht abreagiertes Cysteinpeptid am Harz mit 4-Vinylpyridin derivatisiert. Aber ein verringerter Anteil an dimeren Nebenprodukten im abgespalteten Rohprodukt wurde nicht beobachtet.

Schließlich wurden die Peptidketten $\alpha 1$ und $\alpha 1'$ am Harz mit dem Cys(Acm)-Derivat aufgebaut, das mittels Reaktion *o*-Npys-Cl an fester Phase eine problemlose Konvertierung zu den Cys(Npys) erlaubte. Wegen der bekannten Säurestabilität dieser unsymmetrischen Disulfide konnten die S-aktivierten und Seitenketten-geschützten Ketten $\alpha 1(\text{tBu}, \text{Npys})(\mathbf{Ia})$ und $\alpha 1'(\text{tBu}, \text{Npys})(\mathbf{Ia})$ durch milde acidolytische Abspaltungen vom XAL-Linker für weitere Syntheseschritte nach dem Schema der Abb. 22. gewonnen werden.

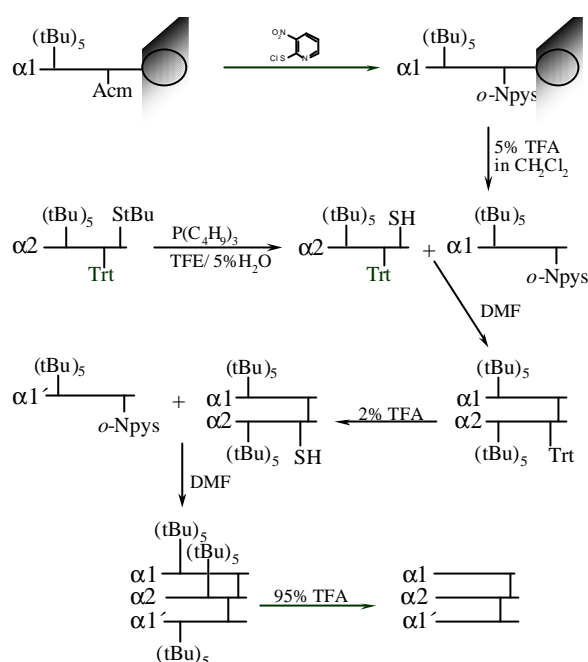


Abb. 22. Neue Syntheseroute zur regioselektiven Vernetzung der drei *O*-tert-Butyl geschützten **a**-Ketten zu den Trimeren **Ia** und **Ib**.

Erste Versuche, die selektive Dimerisierung mittels Reaktion der $\alpha 1(tBu,Npys)$ (**Ia**)-Kette mit der am Harz gebundenen $\alpha 2(tBu,Trt)$ (**Ia**)-Kette auszuführen, sind gescheitert; deswegen wurden alle folgenden Disulfidvernetzungen in DMF als Lösungsmittel durchgeführt, weil die geschützten, hydrophoben Peptidketten nicht ausreichend in wässrigen Puffersystemen gelöst werden konnten, um genügend hohe Konzentrationen für bimolekulare Reaktionen zu erreichen. Die Umsetzungen der Thiol-freien Peptide mit den *S*-Npys aktivierten Komponenten verlief viel langsamer (mehrere Tage) als in leicht sauren wässrigen Lösungen (mehrere Stunden). Um dennoch diese Reaktionen quantitativ zu gestalten, wurden die DMF-Lösungen nach 5 Tagen zu Gelen konzentriert, um diese langsame Reaktionen zu vervollständigen.

Die Abspaltung der *S*-Trityl-Gruppe vom geschützten Dimer $\alpha 1(tBu)\alpha 2(tBu,Trt)$ (**Ia**) erfolgte mit 2 % TFA in Methylenchlorid in Anwesenheit von 3 % Triethylsilan, um die Tritylkationen dem Gleichgewicht

zu entziehen, ohne dass dadurch die gebildete Disulfidbrücke reduziert wurde. Zur anschließenden Reaktion mit der $\alpha 1'(tBu,Npys)$ - Kette wurde wiederum in DMF operiert, wobei TFA-Spuren nicht durch Neutralization entfernt wurden, um eine intramolekulare Disproportionierung des thiol-entschützten Dimers $\alpha 1(tBu)/\alpha 2(tBu)$ (**Ia**) zu Homodimeren zu vermeiden.

Als kritisch erwiesen sich die Abspaltungsbedingungen zum Trimer **Ia** mittels Trifluoressigsäure. In Anwesenheit von 10 % Wasser als Scavenger verlief die Reaktion nicht quantitativ; auch mit 6M HCl konnten nach 6 Tagen Reaktionszeit neben Peptidamid-Spaltungen noch restliche *tert*-Butylether-Gruppen massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Erfolgreich war schließlich die Verwendung eines Cocktails aus TFA, Triethylsilan und Wasser (89:10:1). Dadurch konnte das Trimer **Ia** ohne zusätzliche Reinigungsschritte in praktisch quantitativer Ausbeute und hoher Reinheit gewonnen werden.

Ein endgültiger Beweis für die starken Konformationseffekte auf die Effizienz der eingesetzten regioselektiven Cysteinchemie erbrachte schließlich die Synthese des Trimers **Ib** mit (4*S*)-Fluorprolin in Yaa-Position der Tripletts. Dieses Fluorprolin verhindert bekannterweise die Ausbildung tripelhelikaler Strukturen.¹²² In der Tat konnte dieses Heterotrimer **Ib** ohne jegliche Schwierigkeiten nach Abb. 22. synthetisiert werden, wobei alle Disulfidvernetzungen in leicht sauren Puffern in bester Ausbeute durchgeführt werden konnten.

Ein Nachteil dieses neu entwickelten Syntheschemas der Abb. 22. ist die reduzierte Orthogonalität, die nur eine Disulfidverbrückung von maximal drei Peptidketten erlaubt, während die zuvor etablierte Syntheseroute (Abb. 19.) die theoretische Anzahl der verknüpfbaren Ketten nicht eingrenzt.⁴²

3.1.3. Synthese der Homotrimere II-XI mit dem natürlichen Kollagen Typ

III-Cystinknoten

Nach der erfolgreichen oxidativen Trimerisierung von exprimierten (Pro-Pro-Gly)₁₀-Peptiden mit einem C-terminalen Sequenzbereich von Kollagen Typ III durch Engel und Mitarbeitern,^{108,109} war es naheliegend, diesen natürlichen Cystinknoten an (Pro-Hyp-Gly)_n-Peptiden ebenfalls zu erproben. Solche Hydroxyprolin-enthaltende Kollagenpeptide können bislang nicht exprimiert werden. In diesem Kontext standen Fragen wie Konformationseinflüsse auf die Ausbildung des Knotens, Effekte des natürlichen Knotens auf Kinetik der Faltung und Stabilität der Tripelhelix im Vergleich zum künstlichen Knoten im Vordergrund. Um diese offenen Fragestellungen zu bearbeiten, wurde eine Serie von linearen Kollagenpeptiden synthetisiert, die C- oder N-terminal oder C- und N-terminal zwei benachbarte Cysteinreste enthalten. Diese α -Ketten (s. Tabelle 5.) sollten Oxidationsversuchen unterworfen werden, um die Homotrimere **II-XI** (s. Tabelle 6.) für strukturelle Untersuchungen zu gewinnen. Dabei wurden für den C-terminalen Knoten die Cysteine in die Yaa- und Gly-Positionen des Triplets gesetzt, während für den N-terminalen Knoten die Cysteine die Positionen Xaa und Yaa einnehmen. Es wurde die Anzahl der (Pro-Hyp-Gly)-Triplets von 3-7 erhöht und die Ketten mit gekappten oder ungekappten Amino- und Carboxy-Termini synthetisiert. Ebenso wurde zum Studium des Einflusses von Fluorprolinen in der Xaa-Position entsprechende Ketten mit (4S) und (4R)-Fluorprolinen synthetisiert.

Tabelle 6. Homotrimere Kollagenkonstrukte, deren Herstellung durch Oxidation von bis-Cysteinyl-Peptiden untersucht wurde.

Code	Homotrimere Kollagenpeptide
II	[Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₃ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
III	[Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
IV	[Ac-(Pro-Hyp-Gly) ₇ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
V	[Ac-Cys-Cys-Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
VI	[Ac-Cys-Cys-Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
VII	[H-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys-Cys-Gly-OH] ₃
VIII	[H-(Pro-Hyp-Gly) ₇ -Pro-Cys-Cys-Gly-OH] ₃
IX	[H-Gly-(Pro-Hyp-Gly) ₇ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -OH] ₃
X	[Ac-((4S)-FPro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃
XI	[Ac-((4R)-FPro-Hyp-Gly) ₅ -Pro-Cys-Cys-(Gly) ₃ -NH ₂] ₃

Die Oxidationsbedingungen wurden zunächst anhand der $\alpha(2xStBu)$ [III]-Kette optimiert, um sie dann generell zur Synthese der anderen Homotrimere einzusetzen.

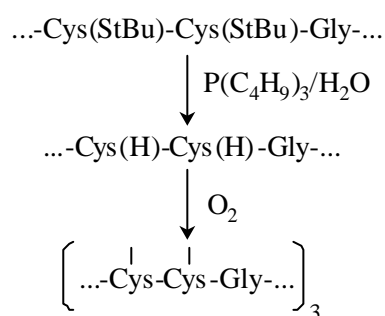


Abb. 23. Reaktionsschema für die Oxidation der linearen Kollagenpeptide zu den Homotrimeren mit natürlichen Cystinknoten.

Nach reduktiver Freisetzung der Cystein-Thiole (Abb. 23.) wurde das lineare Peptid in 10^{-3} - 10^{-4} M Lösungen 5 h unter Argon auf ca. 7 °C gekühlt, um eine

Vorfaltung der Peptidketten in bevorzugte Strukturen, d.i. in die Tripelhelix zu garantieren. Unter gleichbleibender Kühlung und Zufuhr von Luft bei unterschiedlichen pH-Werten (7-9) wurde die Oxidation mittels Massenspektrometrie und Grassetti-Test¹⁵³ verfolgt. Die Oxidation fand ohne entscheidende Unterschiede in der Produktverteilung in allen getesteten Puffersystemen statt. Ebenso konnte durch Zugabe des Redox-Puffers GSH/GSSG in einem Verhältnis von Peptid/GSH/GSSG von 1/0.9/9 die Ausbeute am korrekten Oxidationsprodukt nicht erhöht werden. In diesem Zusammenhang ist sicherlich erwähnenswert, dass glutathionylierte Zwischenprodukte mittels LC-MS nicht nachgewiesen werden konnten. Deshalb scheint ein Reshuffling nicht korrekt oxidierten Produkte nicht stattzufinden. Interessanterweise konnte eine maximale Reinheit von ca. 70 % an Homotrimer **III** und **IV** nicht überschritten werden. Mittels FT-ICR-Massenspektrometrie konnten diese Oxidationsprodukte in ihrer Einheitlichkeit charakterisiert werden. Durch die hohe Auflösung dieser Spektren werden die Isotopenmuster Basislinien-getrennt. So zeigt das Spektrum des Trimers **III** (Abb. 24.), dass der Peak bei $m/z=1121$ ausschließlich dem Trimer als $[M+5H]^{5+}$ und z. B. nicht einem $[M+10H]^{10+}$ eines Hexamers zuzuordnen ist, da er mit der berechneten Form für einen entsprechenden Peak eines fünffach protonierten Moleküls der Summenformel $C_{237}H_{342}N_{66}O_{81}S_6$ (5604.18 amu) übereinstimmt.

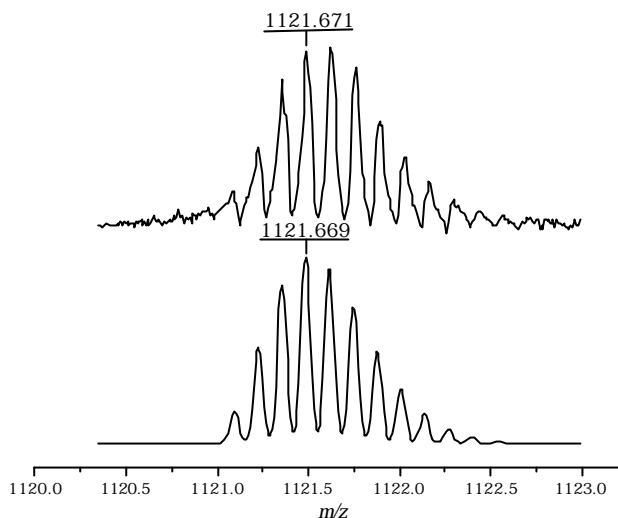


Abb. 24. Das hochaufgelöste FT-ICR-Massenspektrum des Trimers III zeigt exemplarisch durch die Äquivalenz des berechneten (unten) und empirischen Isotopenmusters (oben) die eindeutige Oxidation des linearen Bis-Cysteinylpeptids zum Homotrimer.

3.1.3.1. Mechanismus der Oxidation von Bis-Cysteinyl-Kollagenpeptiden zu Homotrimeren mit dem Kollagen Typ III-Cystinknoten

Das Oxidationsverhalten der Bis-Cysteinylpeptide zu den Homotrimeren der Tabelle 6. lieferte ein detailliertes Verständnis dieser Reaktion. Während die oxidative Faltung von Proteinen ein thermodynamisch gekoppelter Prozess darstellt,^{154,155} erfolgt die korrekte Oxidation der drei Kollagenketten erst nach Ausbildung der Tripelhelix und dient somit weitgehend nur zu deren Stabilisierung. Dies konnte bestens am Beispiel der entschützten α [III] (Tabelle 5.) gezeigt werden. Obwohl kollagenartige Peptide mit einer (Pro-Hyp-Gly)₃-Sequenz nach Quervernetzung zu Trimeren eine inzipiente Tripelhelix bilden,¹¹³ liegen sie in nicht assoziierter Form als Random Coil vor. Dies konnte mittels CD-Spektroskopie für α (2xStBu)[III] bei 1 mM Konzentration in wässrigem Puffer (pH 7.2) bestätigt werden. Dementsprechend konnte durch Luftoxidation bei dieser Konzentration kein Homotrimeres gebildet werden; ausschließlich intramolekular oxidiertes,

monomeres Peptid wurde im Reaktionsgemisch massenspektrometrisch detektiert. Das Bis-Cysteinylpeptid $\alpha(2xStBu)$ [**III**] mit seinen 5 (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts ist hingegen unter gleichen Bedingungen (pH 7.2; 4 °C und 1 mM Konzentration) tripelhelikal gefaltet. Eine Luftoxidation bei 7 °C, d.h. weit unterhalb der Schmelztemperatur der Tripelhelix (s. 3.2.6.) generiert bis zu 70 % das gewünschte Homotrimer **III**, während als Nebenprodukt hauptsächlich das intramolekular oxidierte Monomer identifiziert wurde. Die Oxidation des linearen Bis-Cysteinylpeptids α [**IV**] mit seinen sieben (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts und somit erhöhter Stabilität der Tripelhelix führt ebenfalls nach Oxidation zu maximal 70 % Homotrimer **IV** mit intramolekular oxidiertem Monomer als Nebenprodukt. Dies kann durch Oxidation der monomeren Ketten im Gleichgewicht mit dem tripelhelikal gefalteten, trimeren Assoziat interpretiert werden. Überraschend war allerdings der Befund, dass ein Reshuffling dieser Spezies mittels Glutathion nicht stattfindet. Dies ist nur mit der verhinderten Zugänglichkeit der Disulfide im tripelhelikalen Assoziat zu erklären.

Die Oxidation der α [**V**]-Einzelkette zum Homotrimer **V** mit N-terminalem Cystinknoten führte laut LC-MS zu vier Produkten, nämlich oxidiertes Monomer (80%), Dimere (10%), Homotrimer **V** (10%) und Spuren eines tetrameren Produktes. Der N-terminale Cystinknoten, wenigstens im vorliegenden Design mit den Cysteinresten in Xaa und Yaa des Triplets, scheint sich nicht so gut wie der C-terminale Cystinknoten in die tripelhelikale Struktur einzubetten, so dass keine thermodynamische bzw. kinetische Präferenz für das Homotrimer vorliegt. Negativ verlief das Experiment der gleichzeitigen Oxidation zu den N- und C-terminalen Cystinknoten, welches zu einem inhomogenen Reaktionsgemisch aus polymeren Produkten führte.

Den Oxidationsverlauf kann man sich aufgrund der Produktverteilungen folgendermaßen vorstellen. Der gelöste Luftsauerstoff oxidiert zunächst räumlich nahe, gut zugängliche Thiolgruppen, wie sie in tripelhelikalen

Strukturen vorliegen, zu Disulfiden, wodurch die trimere Struktur stabilisiert wird. Durch ein folgendes Gleichgewicht bildet sich die thermodynamisch stabilste Form des Disulfidknotens (Abb. 25.). Daraus ergibt sich die hohe Ausbeute an oxidierten Homotrimeren, wenn der Cystinknoten thermodynamisch favorisiert ist.

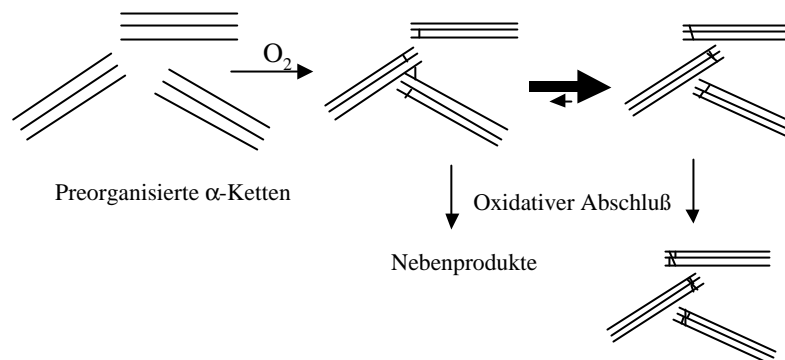


Abb. 25. Möglicher Oxidationsmechanismus tripelhelikal gefalteter Kollagenpeptide.

3.2. Konformationseigenschaften monomerer und trimerer Kollagenpeptide

Zur Charakterisierung der konformationellen Eigenschaften von natürlichen Kollagenen und deren Fragmenten sowie synthetischer kollagenartiger Peptide sind erfolgreich verschiedenste spektroskopische Methoden verwendet worden. So ermöglicht die IR-Spektroskopie¹⁵⁶ durch die Lage und Stärke der Amid-I Banden Aussagen über den jeweiligen, allgemeinen Faltungszustand. Ebenso liefern circular dichroische Parameter wertvolle Informationen über die Faltung kollagenartiger Verbindungen, während NMR-Experimente eine detailliertere Charakterisierung lokaler Strukturen erlaubt. Dies wurde an mehreren synthetischen Kollagenpeptiden gezeigt.^{59,93,127,128,157} Aber letztendlich erlaubt nur die Röntgenstrukturanalyse eine atomare Auflösung und somit im vorliegenden Falle z. B. eine strukturelle Aufklärung der bislang unbekanntenen Disulfid-Konnektivitäten des natürlichen Kollagen Typ III-Cystinknotens. Erste

Kristalle verschiedener Homotrimere konnten gewonnen werden, aber ihre Streuung ist für eine Strukturanalyse bislang ungenügend (s. Abschnitt 3.3.).

3.2.1. Circular-Dichroismus tripelhelikaler Strukturen

CD-Spektren von nativen, tripelhelikalen Kollagenen und tripelhelikal gefalteten Kollagenfragmenten oder von entsprechenden Modellpeptiden weisen in wässrigen Lösungen im Bereich von 190-250 nm eine charakteristische, schwach positive Bande bei 223-225 nm ($[\Theta]_{\max}$ von 2000 bis 6000 $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und eine stark negative Bande bei 196-200 nm ($[\Theta]_{\max}$ von -30000 bis -55000 $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) auf. Durch den Quotienten (Rpn) der Elliptizität der negativen und positiven Bande, der für tripelhelikale Strukturen bei ca. 0.1 liegt, wurde ein Richtmaß gefunden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

CD-Spektren von Peptiden in Polyprolin-II Helices sind im Vergleich zu den Tripelhelix-Spektren nur leicht verändert mit einer positiven Bande bei ca. 224-226 nm (Θ_{\max} von 500 bis 6000 $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und einer leicht rotverschobenen negativen Bande geringerer Intensität bei ca. 198-205 nm (Θ_{\max} von -10000 bis -30000 $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Deshalb können Fraktionen von „freien“ und in tripelhelikaler Form involvierten Polyprolin-II Helices nicht mehr identifiziert werden. Zusätzliche Konformationsanalysen sind zur eindeutigen Charakterisierung tripelhelikaler Strukturen unbedingt notwendig. Die thermische Entfaltung tripelhelikaler Peptide ist im Gegensatz zu einfachen Polyprolin-II Helices sehr kooperativ, da diese Suprastruktur durch repetitive Wasserstoffbrücken und nicht ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen wie im Falle der Polyprolin-II Helix stabilisiert wird.

Die Entfaltung der Tripelhelix findet in einem kleinen Temperaturbereich statt. Dies deutet auf einen Konformationsübergang vom tripelhelikalen in den ungefalteten Zustand ohne wesentliche intermediäre Zwischenstufen. Deshalb wird diese Entfaltung meistens als ein „all-or-none“ Übergang beschrieben.¹⁶²

Eine freie Polyprolin-II Helix zeigt in einer Temperaturexkursion keinen scharfen Übergang und bietet dadurch ein entscheidendes Merkmal.

Ähnliche Experimente lassen sich auch mittels der UV-Absorption durchführen.¹⁶³⁻¹⁶⁶

3.2.2. Tripelhelizität der synthetischen Modellpeptide

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe synthetischer Modellpeptide folgende Fragestellungen zur Induktion und Stabilität der Kollagencharakteristischen tripelhelikalen Struktur zu bearbeiten:

- Einfluss der Kettenlänge und Endladungen
- Unterschiedliche Cystinknoten zur Verknüpfung der Einzelketten am C- und N-Terminus
- Prolin-Derivate mit elektronegativen Substituenten und deren Einfluss auf die Ringkonformation des Xaa-Reste und somit auf tripelhelikale Strukturen

3.2.3. Einflüsse der Kettenlänge und Endladungen

Die Tendenz von kollagenartigen Peptiden des Typs (Pro-Hyp-Gly)_n sich in homotrimeren Assoziaten tripelhelikal zu falten, ist ausgiebig untersucht worden.^{117,167} Ebenso sind die Konformations-Präferenzen Templat-vernetzter Kollagenpeptide dieses Typs bekannt.

Um den Beitrag des künstlichen wie auch des natürlichen Cystinknotens zu charakterisieren, wurden sowohl die monomeren Vorläuferpeptide wie die entsprechenden Homo- und Heterotrimere mittels CD und DSC untersucht. Für die Einzelketten wurden 1 mM Lösungen eingesetzt, um die Konzentrationsabhängigkeit der Tripelhelix-Struktur zu minimieren. Die

entsprechenden CD-Spektren wurden in Wasser und in Puffern bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Rpn-Werte vom pH und Ionenstärke nur gering beeinflusst werden wie beispielhaft in Abb. 26. für $\alpha 2(\text{Acm,StBu})[\mathbf{Ia}]$ gezeigt wird. Ebenso sind die Schmelztemperaturen nur geringfügig von diesen Parametern abhängig (Tabelle 8. und 9.).

Die Schmelzkurven der Peptidketten mit 5 (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten (Abb. 27.) (z.B. $\alpha 2(\text{Acm,StBu})[\mathbf{Ia}]$) unterscheiden sich kaum von den in der Literatur beschriebenen Werten für $\text{Ac}-(\text{Pro-Hyp-Gly})_5\text{-NH}_2$.⁷⁹ Kurze, nicht tripelhelikale Sequenzen spielen demnach keine entscheidende Strukturdestabilisierende Rolle, was auch für die erfolgreiche oxidative Assemblierung der Homotrimere sicherlich entscheidend war.

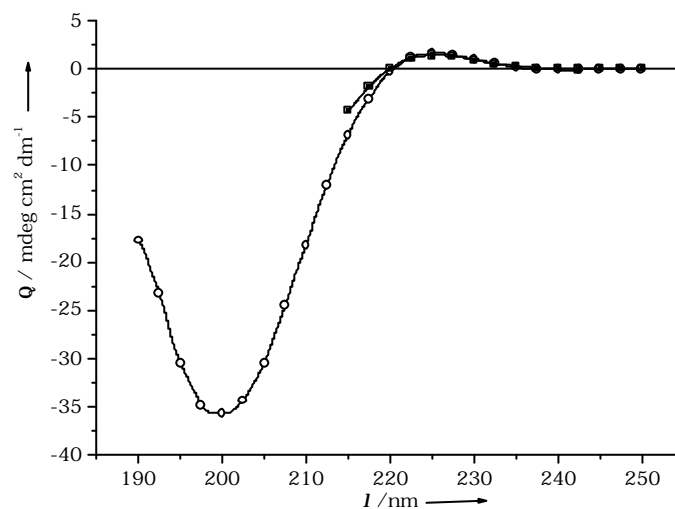


Abb. 26. Vergleich der CD-Spektren der $\alpha 2(\text{Acm,StBu})[\mathbf{Ia}]$ Kette bei 1 mM Konzentration in PBS-Puffer (20 mM PO_4 , pH 7.2, 150 mM NaCl) (-■-■-■-) und in Wasser (-○-○-○-).

Die Schmelztemperatur der selbst-assoziierten monomeren α -Ketten steigt mit zunehmender Kettenlänge. So zeigt das Peptid $\alpha(2x\text{StBu})[\mathbf{II}]$ mit 3 Triplets unter den analysierten Bedingungen keine Tripelhelizität, während die

N-acetylierten und C-amidierten Peptide mit 5 und 7 Triplets erst bei 15.5-20 °C bzw. 42 °C entfalten. Dies bestätigt wiederum die zunehmende Kooperativität der tripelhelikalen Struktur, wobei der Einfluss flexiblerer Randbereiche sowie der Endladungen mit zunehmender Anzahl an (Pro-Hyp-Gly)-Triplets abnimmt. So zeigt die $\alpha(2xStBu)$ [VII] mit fünf (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten bei 4 °C kein der Tripelhelix typisches CD-Spektrum und die entsprechende Schmelzkurve mit monotonem Elliptizitätsabfall entspricht einer Polyprolin-II Helix, während die thermische Entfaltungskurve der $\alpha(2xStBu)$ [VIII]-Kette mit sieben (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten einen für die Tripelhelix typischen Übergang mit der identischen Schmelztemperatur von ca. 42 °C wie die entsprechend gekappte $\alpha(2xStBu)$ [IV]-Kette aufweist.

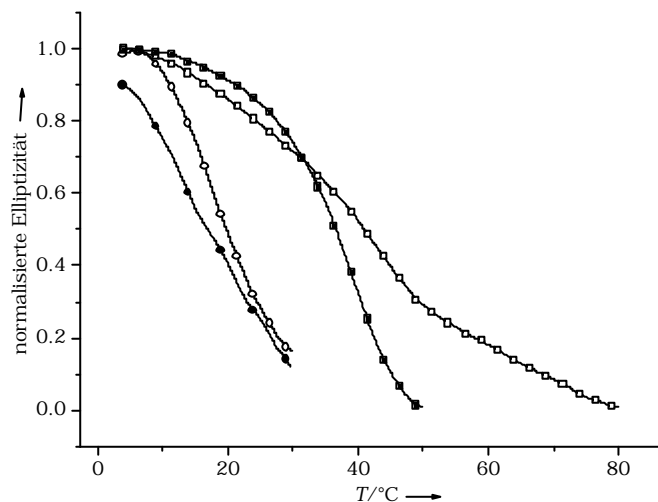


Abb. 27. Schmelzkurven verschiedener Einzelketten mit geladenen ($\alpha(2xStBu)$ [VII]: -●-●-●-; $\alpha(2xStBu)$ [VIII]:-■-■-■-) und ungeladenen Termini ($\alpha(2xStBu)$ [III]: -○-○-○-; $\alpha(2xStBu)$ [IV]:-□-□-□-) sowie unterschiedlichen Kettenlängen: Die thermischen Entfaltungen wurden mittels CD bei 225 nm bei 1 mM Peptidlösungen in Wasser aufgezeichnet.

3.2.4. Strukturelle Einflüsse der unterschiedlichen Cystinknoten

Die Homotrimere **II-IX** besitzen den Cystinknoten des Kollagen Typ III, der sich im Protein am C-Terminus einer stabähnlichen, tripelhelikalen Domäne befindet.¹⁴ Das Oxidationsverhalten der synthetischen Kollagenpeptide mit vorwiegender Ausbildung eines Homotrimers spricht für einen identischen Knoten wie im natürlichen Kollagen. Deshalb sollten diese Homotrimere im Vergleich zum Heterotrimer **Ia** mit dem vereinfachten, künstlichen Knoten eventuelle Vorteile einer natürlichen Quervernetzung aufzeigen.

In Analogie zum nativen Protein ersetzen in den Homotrimeren **II-IX** mit dem C-terminalen Cystinknoten die beiden benachbarten Cysteinreste die Aminosäuren Hyp und Gly in den Positionen Yaa und Gly des Triplets und die anschließenden drei Glycinreste wurden zum Abbruch der Tripelhelix eingebaut.

Laut Modeling-Experimenten sind von den 8 theoretisch möglichen Cystinknoten zwei besonders günstig (Abb. 28.). Das ¹H-TOCSY-Spektrum zeigt eindeutig eine tripelhelikale Struktur mit den Glycinresten der Triplets in Wasserstoffbrücken involviert, während die C-terminalen Glycinreste einer ungeordneten Struktur entsprechen. Die genauen Konnektivitäten der Cystinreste konnten nicht ermittelt werden, weshalb eine Aufklärung der Struktur des Cystinknotens nur mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgen kann.

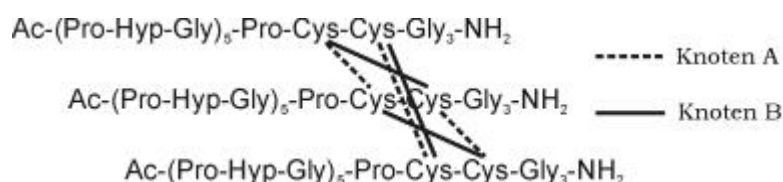


Abb. 28. Gemäß einem molekularem Modeling sind die Cystinknoten A und B am wahrscheinlichsten.

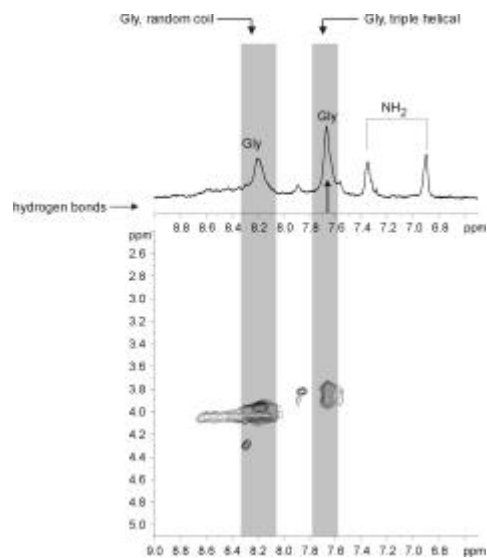
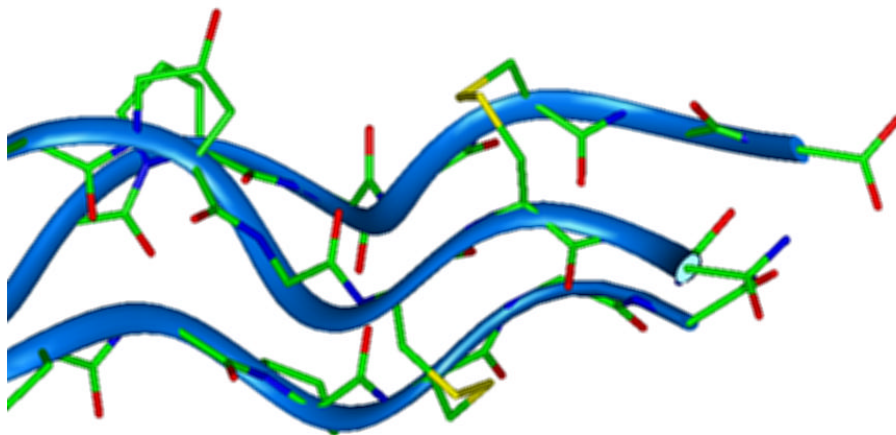


Abb. 29. ^1H -TOCSY-Spektrum des Trimers III: Die C-terminalen Glycine sind in ungeordneter Struktur, während die Glycinreste der Triplets Wasserstoffbrücken ausbilden.

Für den N-terminalen Cystinknoten wurden die benachbarten Cysteinreste in die Xaa- und Yaa-Positionen des Triplets gesetzt und die restliche Sequenz mit den (Pro-Hyp-Gly)-Triplets ohne zusätzliches Spacing fortgesetzt, um eine Tripelhelix-Faltung vom N-Terminus her zu induzieren. Die schwache Ausbeute in der oxidativen Ausbildung des Knotens wie auch die verringerte Tripelhelix-Stabilität (Abschnitt 3.2.6.) sprechen für eine nicht ideale Positionierung des Knotens und würden eher auf Störeffekte hinweisen.

Für das Design des künstlichen Knotens wurden Modeling-Experimente an der idealen Tripelhelix durchgeführt und die Cystinreste mit dem Minimum an sterischen Störeffekten so positioniert, dass der Cysteinrest der $\alpha 1[\mathbf{Ia}]$ -Kette Prolin und der Cysteinrest $\alpha 1'[\mathbf{Ia}]$ Kette Hyp ersetzt. Die beiden Cysteinreste der $\alpha 2[\mathbf{Ia}]$ -Kette substituieren Pro und Hyp. Verbrückt werden dadurch jeweils ein Prolin-substituierendes Cystein mit einem Hyp-substituierendem Cystein. Dadurch wird die Registrierung der Ketten abgesichert und der relativ flexible Knoten kann sich in die Tripelhelix einfügen.

Um dieses Design zu untermauern, wurden Molekulare-Dynamik-Simulationen in einer Wasserbox der Größe 8·3·3 nm mit ca. 2100 Wassermolekülen durchgeführt. Die Startkonformation stellte eine ideale tripelhelikale Konformation dar. Nach Energieminimierung folgte die Fixierung des Trimers und der Wassermoleküle in ihrer Lage zur Backbone-Äquilibrierung. Die Dynamiksimulationen wurden bei 10 K mit 40 kJ·mol⁻¹·Å⁻² Rückgratstabilisierung gestartet. Nach 10 ps wurde das System weitere 20 ps ohne Fixierung der Simulation unterworfen. Nach einem Temperaturgradient auf 100 K in 50 ps wurde die Wasserbadankopplung reduziert (5 ps Zeitkonstante) und die Temperatur auf 300 K erhöht. Nach 100 ps wurde die Temperatur auf abschließende 500 K gesetzt und das System weitere 100 ps simuliert.



*Abb. 30. Räumliche Darstellung des künstlichen, C-terminalen Cystinknotens im Trimer **Ia**.*

Abb. 30. veranschaulicht die Anpassung des artifiziellen Cysteinknotens (Trimer **Ia**) an die tripelhelikale Struktur des Trimers **Ia**. Da sich die Tripelhelix über den Knoten hinweg erstreckt, wird deutlich, dass der Knoten keine Spannungen verursacht. Die beiden C-terminalen Glycine der Ketten $\alpha 1$

und $\alpha 2$ sind sogar in korrekter Position, um als Wasserstoffbrückendonoren zu fungieren.

NMR-Konformationsanalysen haben diese Anpassung des Knotens an die Tripelhelix voll bestätigt. Aus dem ^1H -TOCSY-Spektrum ist an der chemischen Hochfeld-Verschiebung von ca. 8.0 ppm nach 7.8 ppm der N(H)-Protonen klar erkennbar, dass die Glycin-NHs in Wasserstoffbrücken involviert sind. Eines der beiden C-terminalen Glycinamide ist ebenfalls Wasserstoff-verbrückt. Dies bestätigt, dass sich die Tripelhelix über den Knoten hinweg ausdehnt. Die tripelhelikale Faltung des Trimers **Ia** wird auch durch das charakteristische CD-Spektrum bestätigt (Abb. 32.).

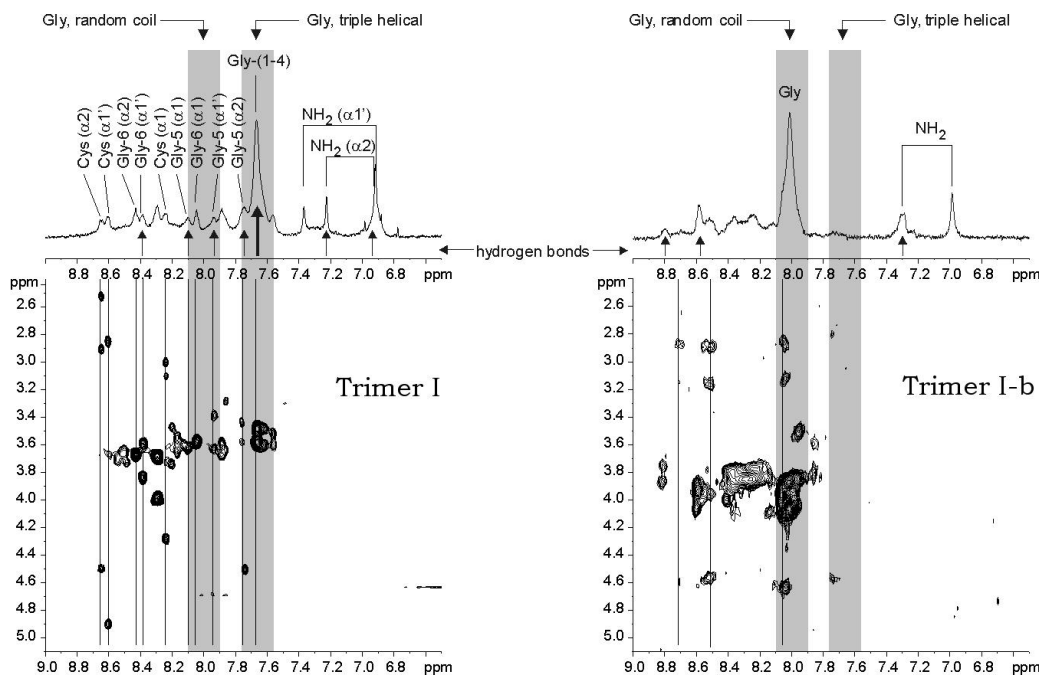


Abb. 31. ^1H -TOCSY-Spektren der Trimere **Ia** und **Ib**: Das Trimer **Ib** ist im Gegensatz zu Trimer **Ia** ungefalt.

Im Vergleich dazu zeigen die NMR-Spektren des Trimers **Ib** mit (4*S*)-FPro in den Yaa-Positionen der Triplets für Pro und (4*S*)-FPro jeweils zwei Spin-Systeme. Das Hauptspinsystem kann jeweils der *trans*-Peptid Konformation der

Peptidyl-Prolin Bindung zugeordnet werden, während das intensitätsärmere Spinsystem der entsprechenden *cis*-Peptidbindung zugeordnet wurde. Die Zuordnung erfolgte durch die charakteristischen NOEs (*trans*: Ha(i-1)-Hd(i), *cis*: Ha(i-1)-Ha(i)).

Das gleichzeitige Vorkommen von *cis*- und *trans*-Peptidamid Konformationen bestätigte die ungeordnete Struktur dieses Trimers **Ib**, wie aufgrund bereits bekannter Effekte des Fluor-Substituenten zu erwarten war und dass der Knoten mit seiner stabilisierenden Wirkung auf die Tripelhelix diese negativen Effekte nicht ausgleichen kann. Die ungeordnete Struktur dieses Trimers wurde zudem auch mittels CD bestätigt (Abb. 32.).

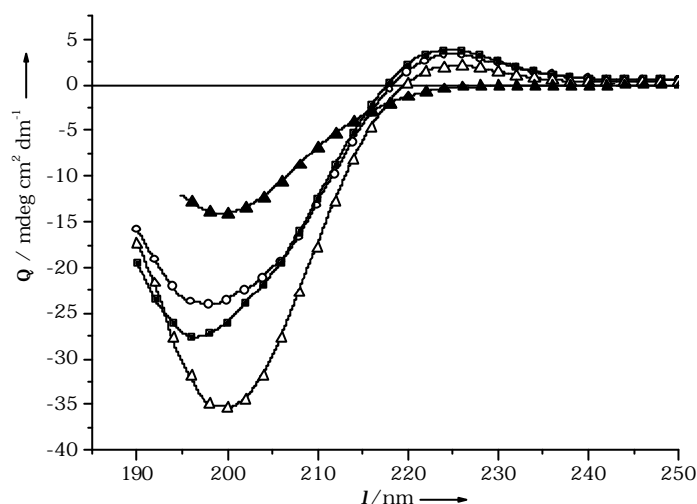


Abb. 32. CD-Spektren der Trimere **Ia** (-■-■-■-), **Ib** (-▲-▲-▲-) und **III** (-○-○-○-) bei $4 \cdot 10^{-5}$ M Konzentration und der Einzelkette **a(2xStBu)[III]** (-△-△-△-) bei einer 1 mM Konzentration in Wasser.

In Tabelle 7. sind die wichtigsten circulardichroischen Parameter nochmals für die Einzelketten und für die verschiedenen Trimere bei unterschiedlichen Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 7. CD-Daten der verschiedenen Trimere bei unterschiedlichen Bedingungen im Vergleich zu den Einzelketten. PBS: 20 mM PO₄, pH 7.2, 150 mM NaCl; pH 3.0: 20 mM PO₄, pH 3.0; NEM: 20 mM PO₄, pH 7.2, 20 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM NEM; CuCl₂: 1 mM CuCl₂, 20 mM PO₄, pH 3.0. Soweit nichts anderes angegeben, wurden bei Trimeren 4·10⁻⁵ M und bei Einzelketten 1 mM Lösungen verwendet.

Kollagenpeptid	Bedingung	l _{min} [nm]	Q _{min} [deg·cm ² ·dmol ⁻¹]	l _{max} [nm]	Q _{max} [deg cm ² dmol ⁻¹]	Rpn
α2(Trt,StBu)[Ia]	H ₂ O	n.d.	n.d.	224.9	3113	n.d.
α(2xStBu)[III]	PBS	n.d.	n.d.	225.4	1403	-
	H ₂ O	199.9	-35346	226.0	1990	0.056
α(2xStBu)[IV]	PBS	n.d.	n.d.	225.4	1403	-
	H ₂ O	200.9	-20340	226.3	1021	0.050
Trimer Ia (tBu)	H ₂ O	200.4	-16264	225.4	1407	0.086
Trimer Ia	H ₂ O ^a	198.2	-29120	225.9	4137	0.142
	H ₂ O ^b	198.8	-26499	225.0	2277	0.086
Trimer Ia	NEM	197.5	-34385	224.1	3679	0.107
	CuCl ₂	197.5	-24752	225.3	2697	0.109
	pH 3.0 ^a	198.4	-24148	224.7	3332	0.138
	pH 3.0 ^b	198.7	-26076	224.9	3564	0.137
Trimer Ib	H ₂ O	199.6	-14885	-	-	-
Trimer III	PBS 2·10 ⁻⁵ M	224.5	-27071	197.2	2962	0.109
	CuCl ₂	224.3	-13231	195.8	1427	0.108
	pH 3.0	224.8	-27729	196.5	3766	0.136
Trimer V	CuCl ₂	225.0	-14165	196.4	2282	0.161
	pH 3.0	224.5	-9638	195.8	1148	0.119
Trimer IX	pH 3.0	224.6	-39213	196.0	4258	0.109

a) vor thermischer Entfaltung; b) nach thermischer Entfaltung.

Die CD-Spektren der Disulfid-verbrückten Trimere **Ia**, **III**, **V** und **IX** mit Hyp in Yaa-Position zeigen sehr ausgeprägte Maxima und die höchsten Rpn-Werte, während das Spektrum des Trimers **Ib** mit (4*S*)-Fluorprolin in Yaa-Position eine eindeutig ungeordnete Struktur widerspiegelt. Dieses Ergebnis beweist, dass der negative Einfluss des (4*S*)-Fluorsubstituenten am Prolin auf die

Tripelhelix-Struktur¹³⁰ durch den Cystinknoten nicht aufgehoben werden kann. Wie bereits für die Einzelketten beobachtet wurde, sind pH- und Ionenstärke-Effekte auf Tripelhelix-Stabilität gering.

3.2.5. Thermische Zersetzung der Cystinknoten

Für die heterotrimeren Kollagenpeptide mit eingebauten, natürlichen Kollagensequenzen und künstlichen Cystinknoten waren vollkommen reversible thermische Entfaltungen beobachtet worden, wobei die Rückfaltung mit oder ohne kinetischer Hysterese nach Äquilibrierung des Systems bei niedrigen Temperaturen für mehrere Stunden CD-Spektren lieferte, die den Ausgangsspektren identisch waren.^{44,168} Bei diesen heterotrimeren Kollagenpeptiden wurden Schmelztemperaturen ermittelt, die jenen natürlicher Kollagene sehr ähnlich waren, d.h. bei ca 35-40 °C. Im Vergleich dazu zeigen die synthetischen Hetero- und Homotrimere dieser Arbeit, die nur aus den idealen (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts bestehen, eindeutig erhöhte Schmelztemperaturen (s. Tabellen 8. und 9.). Deshalb mussten für die thermische Entfaltungen hohe Temperaturen erreicht werden. Trotzdem war der Befund überraschend, dass nach Abkühlen und Äquilibrierung des Systems CD-Spektren registriert wurden, die nicht den Ausgangsspektren entsprechen, sondern vielmehr den Spektren der Einzelketten (s. Tabelle 7). Dementsprechend waren die Entfaltungsexperimente für diese trimeren Kollagenpeptide unter den gewählten Bedingungen nicht mehr reversibel, weshalb eine Extraktion thermodynamischer Parameter wegen des fehlenden Gleichgewichts nicht möglich war.

Es ist bekannt, dass Cystin-enthaltende Proteine bei hohen Temperaturen irreversibel denaturieren. Dieser Prozess konnte hauptsächlich auf eine Disproportionierung der Disulfide zurückgeführt werden, wobei auslösend für diese Reaktion eine β -Eliminierung katalytische Mengen an Thiolen generiert,

die in einem Thiol-Disulfidaustausch zum „Scrambling“ der nativen Disulfide führt. Deshalb wurden nach der thermischen Entfaltung die trimeren Kollagenpeptide **Ia**, **III** und **IV** massenspektrometrisch analysiert (Abb. 33). Im Fall des Heterotrimers **Ia** mit dem artifiziellen Knoten können die drei Massen 1038.3, 1070.2 und 1102.0 den dreifach geladenen $[M+3H]^{3+}$ der Dimeren $\alpha 1\alpha 1$, $\alpha 1\alpha 1'$ und $\alpha 1'\alpha 1'$ und die kleinere Masse 829.0 dem zweifach geladenen $[M+2H]^{2+}$ der oxidierten $\alpha 2$ -Kette zugeordnet werden.

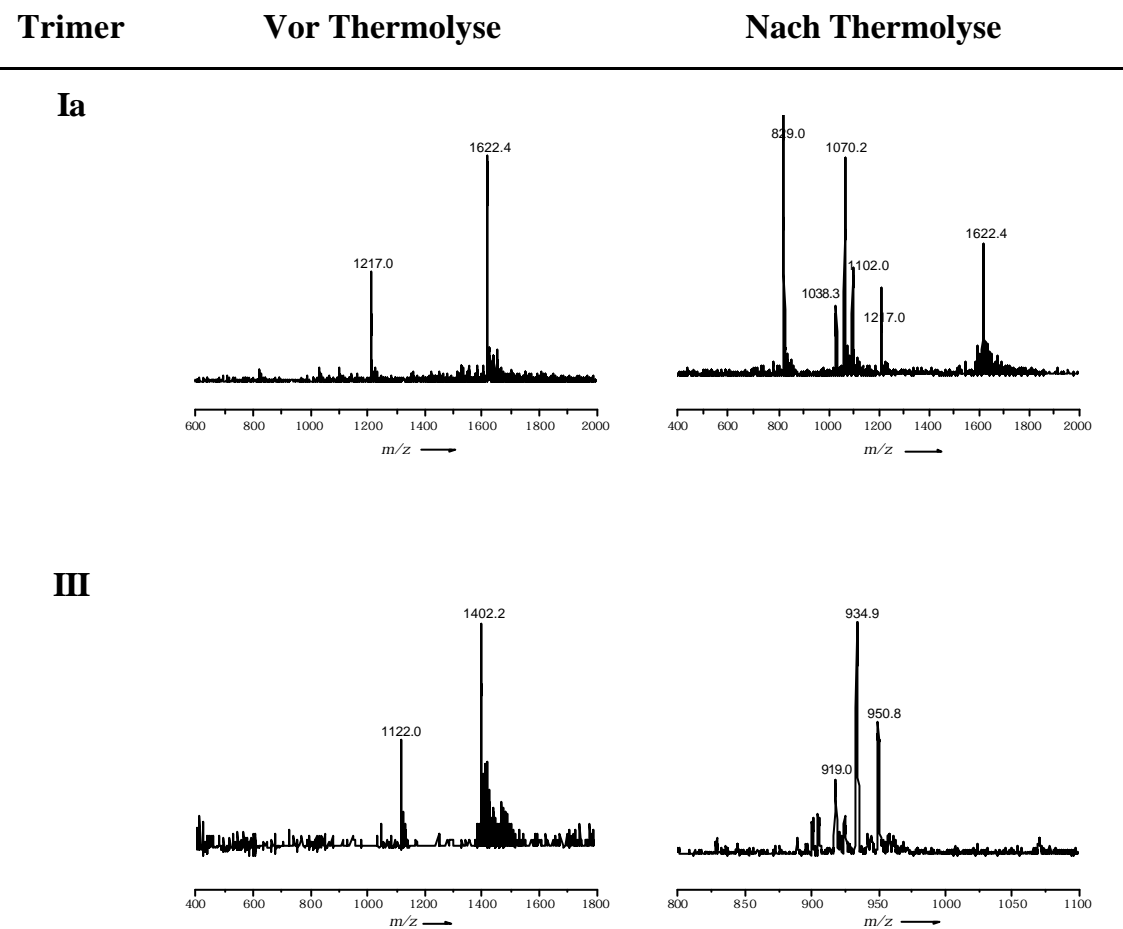


Abb. 33. Massenspektrometrische Bestimmung der Zersetzungsprodukte der beiden Trimere **Ia** und **III**: Auf der linken Seite sind die Massenspektren der intakten Trimere **Ia** (oben) und **III** (unten), rechts die Abbauprodukte, die bestimmten Spezies zugeordnet werden konnten, abgebildet.

Eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen benachbarten Cysteinresten kommt in natürlichen Peptiden und Proteinen nur selten vor, z.B. in Malformin-A.¹⁶⁹

Die Homotrimere **III** und **IV** zerfallen sichtlich in drei Hauptprodukte (Abb. 33.), d.s. die intramolekular oxidierten Monomere, die entsprechenden desulfurierten Lanthioninpeptide und das Trisulfid ($\Delta m/z = \pm 15.9$).

Gleichzeitig zu unseren Arbeiten wurde auch aus dem Arbeitskreis J. Engel¹⁰⁸ von einem thermischen Zerfall exprimierter Kollagenpeptide mit dem Kollagen Typ III-Cystinknoten berichtet. Die Autoren haben die Zerfallsprodukte strukturell nicht charakterisiert; aber es ist anzunehmen, dass diese unseren identisch sind. Durch Zusatz von Guanidiniumhydrochlorid wurde die Tripelhelix-Stabilität erniedrigt und somit die Thermolyse bei hohen Temperaturen verhindert. Dadurch ist aber ein Vergleich mit anderen literaturbekannten Modellpeptiden sowie natürlichen Kollagenen nicht mehr möglich.¹⁰⁸

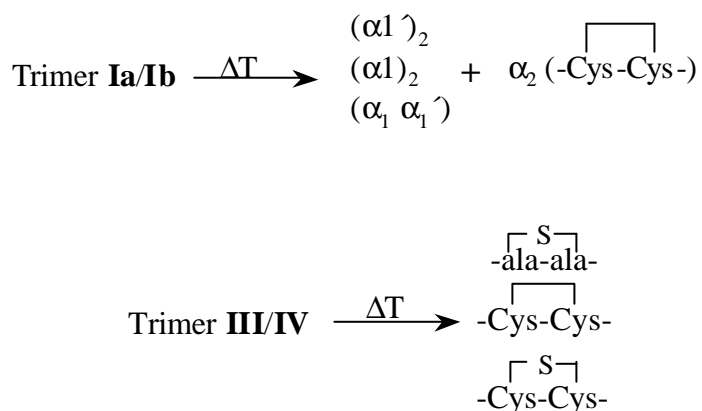


Abb. 34. Thermische Zerfallsprodukte aus dem Heterotrimer **Ia/Ib** und den Homotrimeren **III** und **IV**.

Obwohl durch Zugabe von *N*-(Ethyl)maleinimid diese Disproportionierung nicht verhindert wird, könnte der thermische Zerfall z.B. im Falle des

Heterotrimer **Ia** nach dem Mechanismus der Abb. 35. erfolgen, wobei katalytische Mengen an Thiolen den Prozess auslösen.

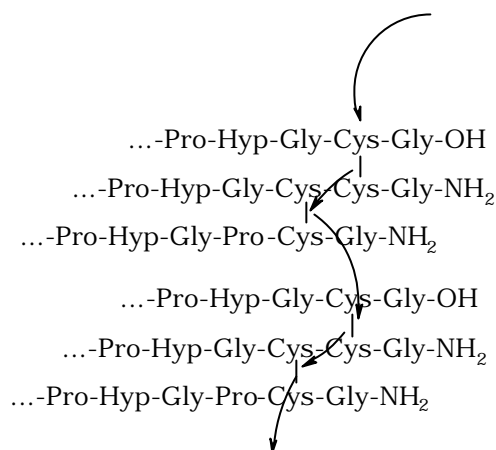


Abb. 35. Möglicher Mechanismus für die Zersetzung des Trimer **Ia**.

Um festzustellen, ob die Entfaltung der Tripelhelix mitverantwortlich für den thermischen Zerfall des Knotens ist, wurde das nicht gefaltete Heterotrimer **Ib** gleichen Temperaturen ausgesetzt. Die identischen Zerfallsprodukte wie für das Trimer **Ia** wurden massenspektrometrisch ermittelt. Dieses Ergebnis spricht für eine intrinsische Thermolabilität solcher Cystinknoten, was auch der bekannten thermischen Zersetzung von N,N'-Diacetyl-L-Cystin-dimethylamid in neutralen wässrigen Lösungen bei 125 °C bzw. in alkalischen Lösungen (pH 10.7) bei 55 °C nach 20 h entspricht.¹⁷⁰ Auch in diesem Falle entstehen Lanthionin und eine Trisulfid-Spezies. Mittels Mikrokalorimetrie von Trimer **Ib** konnte für den Zerfall kein energetischer Beitrag nachgewiesen werden. Es wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen dieser Zerfall verhindert werden kann.

Im Falle der Proteine kann durch Zugabe von CuCl₂ in neutralen Puffern die irreversible Denaturierung unterbunden werden.¹⁷¹ Unter neutralen Bedingungen kommt es zu einem starken Ausfällen des Kupferoxids, weshalb entsprechende Experimente mit dem Trimer **III** in Anwesenheit von 1 mM CuCl₂ in 20 mM Phosphatpuffer (pH 3.0) durchgeführt wurde. Die Thermolyse wurde weitgehend unterdrückt. Experimente bei pH 3.0 ohne Zusatz von CuCl₂

ergaben gleiche positive Ergebnisse, da bei saurem pH bekannterweise die Nukleophilie der Thiole sehr stark erniedrigt wird und der nukleophile Angriff auf Disulfide nicht stattfinden kann. Somit konnten Bedingungen für eine reversible Gestaltung der Entfaltungsprozesse der Kollagenpeptide gefunden werden.

3.2.6. Thermodynamische Charakterisierung der Kollagenpeptide

Aus den thermischen Entfaltungskurven der selbst-assoziierten Einzelketten und der verschiedenen homo- und heterotrimeren Kollagenpeptiden, die mittels CD und DSC ermittelt wurden, sind die thermodynamischen Parameter extrahiert worden. Diese sind in den Tabellen 8. und 9. aufgeführt. In den Abb. 36. sind vergleichend die mittels CD bei 225 nm und DSC ermittelten Entfaltungskurven gezeigt.

Tabelle 8. Die thermischen Entfaltungen der Kollagenpeptide wurde im CD bei 225 nm registriert. Aus den experimentellen Kurven wurden die Schmelztemperaturen sowie die Van't Hoff Enthalpie und Entropie extrahiert. Für die Einzelketten wurden 1 mM und für die Trimere $4 \cdot 10^{-4}$ M Konzentrationen in Wasser, in 20 mM Phosphatbuffer bei pH 7.2 (mit 150 mM NaCl) oder in Phosphatpuffer bei pH 3.0 (1 mM CuCl_2 wenn angegeben) verwendet.

Kollagenpeptide	Solvens	T_m [°C]	DH_{VH} [kJ/mol]	DS_{VH} [J/mol/K]
$[\alpha(2\text{xStBu})[\text{III}]]_3$	pH 7.2	20.6	191	651
$[\alpha(2\text{xStBu})[\text{IV}]]_3$	pH 7.2	41.6	159	506
$[[\text{a}2(\text{Acm},\text{StBu})[\text{Ia}]]_3$	H_2O	19.6	189	646
Trimer Ia	H_2O	56.7	178	540
	pH 3.0	56.3	205	624
Trimer III	pH 3.0, CuCl_2	55.0	127	389
	pH 7.2	68.1	179	525
	($2 \cdot 10^{-5}$ M)	68.1	181	529
	pH 7.2, gesättigt mit CuCl_2	68.6	155	453
	pH 3.0 CuCl_2	68.0	179	525
Trimer V	pH 3.0 CuCl_2	58.3	131	397
	pH 3.0	69.0	173	507
Trimer IV	pH 7.2	81.5	172	484
	pH 3.0	82.4	130	365

Ein Vergleich der Daten unter verschiedenen Bedingungen zeigt keine wesentliche pH- und Ionenstärke-Abhängigkeit. Unter sauren Bedingungen, d.i. in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 3.0), sind die Messreihen vollständig reproduzierbar. Ein Vergleich der Werte für die selbst-assoziierten Einzelketten und der Homo- und Heterotrimere verdeutlicht den erheblichen Stabilitätsbeitrag der Verknüpfung jeglicher Art. So liegen die Schmelztemperaturen für das Trimer **Ia** mit dem künstlichen Knoten und für

die Trimere **III** und **V** mit jeweils dem C- und N-terminalen natürlichen Knoten bei 56 °C bis 66 °C und damit ca. 40-50 °C höher als die Schmelztemperaturen der entsprechenden Einzelketten α 2(Acm,StBu)[**Ia**] (ca. 15 °C) und α (2xStBu)[**III**] (ca. 20 °C). Bei der Entfaltung ist der Entropiegewinn der vernetzten Trimere ca. 100 J/(mol·K) geringer als im Falle der selbst-assoziierten Trimere bei nahezu identischer Enthalpie. Dies unterstützt die Arbeitshypothese, dass durch Vernetzung der Ketten die intrinsische Konzentration erhöht wird, wobei die Verknüpfungsart zunächst irrelevant ist.¹⁰⁹

Durch NMR-Experimente wurde deutlich, dass die Cystinknoten die tripelhelikale Struktur nur geringfügig stören, da diese Trimere unterhalb ihrer Schmelztemperaturen vollständig gefaltet vorliegen. Der Stabilisierungseffekt der Knoten nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. So ist die Schmelztemperatur des Trimers **IV** mit (Pro-Hyp-Gly)₇ im Vergleich zum selbst-assoziierten Trimer der entsprechenden Einzelkette gerade noch 40 °C höher, während bei den (Pro-Hyp-Gly)₅-Einzelketten und Trimeren der Temperaturunterschied ca. 46 °C beträgt; dieser Befund bestätigt frühere Ergebnisse.³⁹

Das Heterotrimer **Ia** mit fünf Triplets und künstlichem Knoten entfaltet 10 °C tiefer ($T_m = 56$ °C) als das entsprechende Trimer **III** mit natürlichem Knoten ($T_m = 66$ °C), was den Einfluss unterschiedlicher Knotenformen demonstriert. Dieser Effekt, der einer Verlängerung nicht vernetzter Ketten um ca. eine (Pro-Hyp-Gly)-Einheit entspricht, wird durch die unterschiedlichen Entropiebeiträge verursacht. Ein geringerer Entropiegewinn des Trimers **III** beim Entfaltungsprozeß bewirkt den Stabilitätswachst. Aufgrund gerätebedingter Kalibrierungseigenschaften sind mit Hilfe von DSC gewonnene Daten erst nach einmaligem Durchlauf des vollständigen Temperaturgradienten exakt. Der 2. Schmelzvorgang liefert bei nahezu identischer ΔH_{cal} von ca. 202 kJ/mol eine Differenz von ca. 20 J/(mol K) für den Entropieanteil ΔS_{cal} . Auch die

thermodynamischen Werte aus den CD-Experimenten bestätigen diesen Zusammenhang. Molekular betrachtet ist diese Stabilisierung auf die zusätzliche Disulfidbindung zurückzuführen, welche eine Versteifung des Knotens verursacht, der sich im Entropiewert widerspiegelt. Die Stabilisierung durch die weitere Disulfidbrücke, welche die Freiheitsgrade des entfalteten Trimers verringert, veranschaulicht die Bedeutung quervernetzender Bindungen in Proteinstrukturen. In globulären Proteinstrukturen sollten noch größere Stabilitätsänderungen zu erwarten sein.

Tabelle 9. Thermodynamische Werte aus der Mikrokalorimetrie: DH_{cal} und DS_{cal} wurden durch Fitten der Peaks erhalten. Für die Einzelketten wurden 1 mM und für die Trimere 4×10^{-4} M Konzentrationen in Wasser, in 20 mM Phosphatbuffer bei pH 7.2 (mit 150 mM NaCl) oder in Phosphatpuffer bei pH 3.0 verwendet.

Kollagenpeptid	Solvens	T_m [°C]	DH_{cal} [kJ/mol]	DS_{cal} [J/mol/K]
[[a2(Acm,StBu)[Ia]] ₃	H ₂ O	17.4	-	-
[α(2xStBu)[III]] ₃	pH 7.2	19.4	-	-
[α(2xStBu)[IV]] ₃	pH 7.2	42.6	156	493
Trimer Ia	pH 3.0			
	(1.Entfaltung)	55.9	188	572
	(1.Rückfaltung)	54.5	-201	-612
Trimer III	(2.Entfaltung)	56.3	203	617
	H ₂ O	56.0	182	554
	pH 7.2 (2 ÜG)	$T_{m1}=59.4$	236	709
		$T_{m2}=68.5$	265	774
	pH 3.0			
	(1. Entfaltung)	66.2	197	581
	(1.Rückfaltung)	66.4	-216	-635
Trimer V	(2.Entfaltung)	65.8	203	599
	CuCl ₂	52.7	190	583

Ein Vergleich der Entfaltungskurven (Abb. 36) veranschaulicht die höhere Kooperativität des Schmelzvorganges von Trimer III gegenüber Trimer Ia. Das homotrimere, naturähnliche Modellpeptid III entfaltet in wenigen Temperatur-

einheiten, während sich das Heterotrimer **Ia** mit dem artifiziellen Knoten über einen breiteren Temperaturbereich in einer flacher verlaufenden Kurve entfaltet. Auch der größere Einfluss von CuCl_2 auf den T_m -Wert von Trimer **Ia** könnte bedeuten, dass die flexiblere Struktur des Knotens eine Einlagerung von Metallionen erleichtert.

Die zusätzliche Disulfidbrücke im natürlichen Knoten, die eigentlich keine strukturelle Funktion beinhaltet, dient nach den gewonnenen thermodynamischen Daten ausschließlich der Stabilisierung der Struktur in diesem Bereich. Der native Disulfidknoten stellt mit der Kempische Trisäure⁷⁹ das bislang stabilisierendste Templat zur Verknüpfung von Kollagenketten dar.

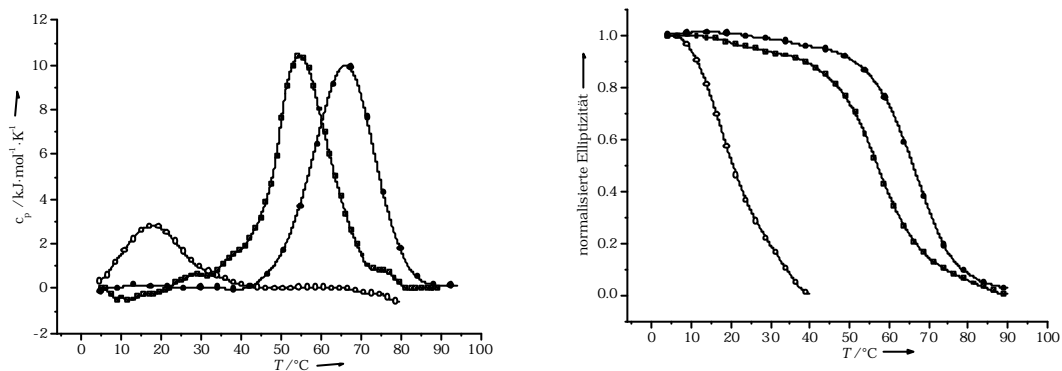


Abb. 36. DSC-(links) und CD-(rechts): Ermittelte Entfaltungskurven des Heterotrimers **Ia** (-■-■-■-), Homotrimers **III** (-●-●-●-) und des selbst-assoziierten Trimers der entsprechenden Einzelkette **a**(2xStBu)[**III**] (-○-○-○-); alle Modellpeptide bestehen aus fünf (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten pro Kette.

Die beiden Homotrimere mit N- (V) und C-terminaler (III) Vernetzung (mit jeweils fünf (Pro-Hyp-Gly)-Einheiten) zeigen ebenfalls unterschiedliche Entfaltungstemperaturen mit einer Differenz von 10 $^{\circ}\text{C}$. In Abb. 37. sind vergleichend die entsprechenden CD-Entfaltungskurven in 1 mM CuCl_2 /Phosphatpuffer (pH 3.0) gezeigt. Der N-terminale Knoten bettet sich scheinbar nicht so gut in die tripelhelikale Struktur ein wie der C-terminale Knoten. In Kollagen Typ III erfolgt nach dem Cystinknoten der Abbruch der Tripelhelix.

Wie aus den Abb. 38. und 39. ersichtlich sind bei leicht sauren pH-Werten die thermischen Entfaltungs- und Rückfaltungsprozesse der homo- und heterotrimeren Kollagenpeptide voll reversibel.

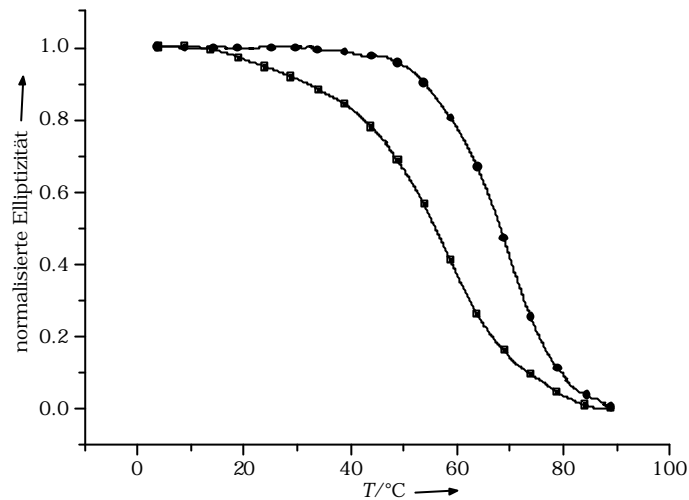


Abb. 37. CD-Schmelzkurven von Trimer III (-●-●-●-) und V (-■-■-■-) in 1 mM CuCl₂/20 mM Phosphat-Puffer, pH 3.0, bei 4·10⁻⁵ M Konzentration.

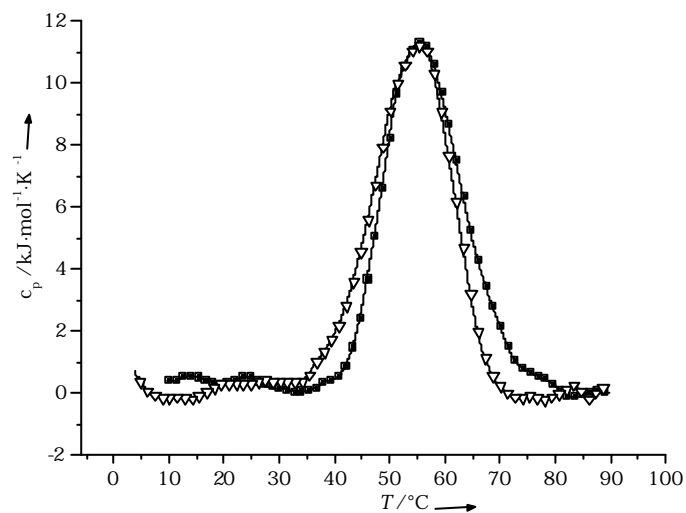


Abb. 38. DSC-Entfaltungs-(-■-■-■-) und Rückfaltungskurve (-▽-▽-▽-) des Kollagentrimers Ia mit artifiziellem Cystinknoten.

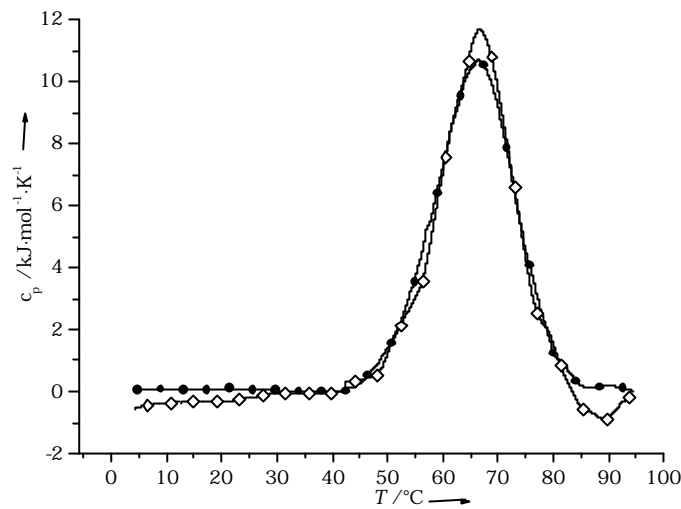


Abb. 39. DSC-Entfaltungs- (-◇-◇-◇-) und Rückfaltungskurve (-●-●-●-) des Kollagentrimers **III** mit natürlichem Cystinknoten.

3.2.7. Faltungskinetiken der Kollagenpeptide

Neben der thermodynamischen Charakterisierung der tripelhelikalen Struktur der unterschiedlichen Kollagenpeptide wurden Faltungskinetiken ermittelt, um den Einfluss der Cystinknoten in der Nukleation dieser Suprastruktur zu untersuchen.

Um sicherzustellen, dass die unterschiedlichen Peptide vor der Rückfaltung vollständig denaturiert vorliegen, wurden entsprechende Lösungen (1 mM des selbst-assoziiierenden monomeren Peptids $\alpha(2\text{xtBu})[\text{III}]$ und $4\cdot 10^{-5}$ M bei den Trimeren **Ia** und **III**) nach Äquilibrieren bei 4 $^\circ\text{C}$ auf 90 $^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach wenigen Minuten waren im CD keine trimeren Strukturen mehr nachweisbar.

Die Rückfaltung wird durch einen Temperatursprung eingeleitet. Für diese Experimente wurden jeweils 20 μl einer 10-fach konzentrierten Peptidlösung in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 3.0 (10 mM für die monomere Kette bzw. $4\cdot 10^{-4}$ M für die Trimere) auf 90 $^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach 15 min erfolgt der Temperatursprung, indem die Lösung in eine vorgekühlte Pufferlösung (180 μl)

in die Küvette gespritzt wird, wobei die Totzeit 10 s beträgt. Die Rückfaltung wird mittels CD bei 225 nm verfolgt bis konstante Elliptizitäten erreicht werden. Zur Ermittlung der Aktivierungsenergie mittels Arrhenius-Plots wurden die Rückfaltungen bei jeweils drei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, und zwar bei 4, 20 und 40 °C für die Trimere **Ia** und **III** und bei 4, 8 und 12 °C für die monomere Kette $\alpha(2xtBu)$ [**III**].

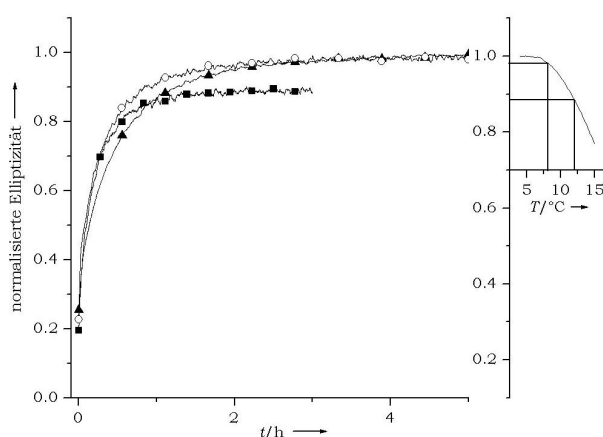


Abb. 40. Kinetiken der Rückfaltung des monomeren Kollagenpeptids $\alpha(2xStBu)$ [**III**] bei 1 mM Konzentration in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 3.0) nach einem Temperatursprung von 90 °C auf 4 °C (\blacktriangle - \blacktriangle - \blacktriangle -), 8 °C (\circ - \circ - \circ -) und 12 °C (\blacksquare - \blacksquare - \blacksquare -). Bei 12 °C wird die quantitative Rückfaltung nicht erreicht, weil die entsprechende Tripelhelix eine Schmelztemperatur von ca 20 °C besitzt (s. Tabelle 8.).

Zunächst wurde versucht, die Rückfaltungskurven des monomeren Kollagenpeptids $\alpha(2xStBu)$ [**III**] der Abb. 40. mit Reaktionskinetiken dritter Ordnung zu beschreiben und dementsprechend der folgenden Gleichung zu fitten:

$$(8) \quad A(t) = \frac{1}{\sqrt{2kt + \frac{1}{A_0^2}}} \quad \text{aus:} \quad \frac{dA(t)}{dt} = -kA(t)^3$$

Mit dieser Gleichung lassen sich allerdings die experimentellen Messdaten nur sehr ungenau anpassen. Geeigneter erwies sich ein exponentieller Ansatz für eine Reaktion erster Ordnung. Das würde bedeuten, dass bei den hohen Konzentrationen (1 mM) nicht die Kettenfindung, sondern die Isomerisierung der Prolyl-Bindungen geschwindigkeitsbestimmend ist.¹⁰⁸

Die Rückfaltungsraten erster Ordnung wurden aus den Plots von $\ln[\text{Fraktion ungefaltete}]$ gegen T erhalten, wobei die Anfangskinetik bestimmt wurde, da bei Einzelketten mit Abnahme der Konzentration ungefalteter Ketten die Reaktionsordnung zunimmt (s. Abschnitt 1.6.5.). Die ermittelten Werte sind in Tabelle 10. aufgeführt.

Aus der Abb. 40.-43. ist die schnellere Faltung der Trimere **Ia** und **III** gegenüber der Einzelkette $\alpha(2x\text{StBu})[\text{III}]$ deutlich sichtbar. Ein Grund dafür könnte eine Reaktionsordnung höher als eins sein; dies würde bedeuten, dass trotz der hohen Konzentration (1 mM) im Falle der Einzelketten das Finden der Ketten eine geschwindigkeitsbestimmende Rolle spielt.

Mit einer Kinetik 2. Ordnung, die den Betrachtungen von Boudko et al.¹⁰⁸ mit Ordnungen zwischen 1.5 und 2.5 entspricht, erhält man aus dem Plot von $1/c[\text{ungefaltetes Peptid}]$ vs Zeit (t) eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung von ca. $1 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Diffusionskontrollierte Reaktionen werden von Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, die $10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ betragen. Allerdings sollte man dabei berücksichtigen, dass es sich hier um Modelle für einen Zweierstoß von kugelförmigen Molekülen handelt; doch kann man davon ausgehen, dass aufgrund der verschiedenen Größenordnungen die Bildung eines dimeren Assoziats nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein kann. Die Anlagerung der dritten Einzelkette an ein sehr instabiles Dimer ($\text{pK}_{\text{Zerfall}} > 8$) könnte den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen.

Die in in Tabelle 11. aufgeführten Halbwertszeiten bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen eine ca. 2.5-fache Halbwertszeit für die Einzelkette im Vergleich zu den beiden trimeren Kollagenpeptiden. In der Kollagenliteratur

findet man häufig den Begriff des Faltungskerns.^{24,108,162,172,173} Bei diesem Faltungsmodell ist der Raster der Ketten meist C-terminal durch kovalente Vernetzung fixiert, die auch die Nukleation der tripelhelikalen Faltung im reißverschlussähnlichen Modus initiiert. Deshalb ist eine beschleunigte Ausbildung der Struktur bei den kovalent vernetzten Trimeren nicht überraschend.

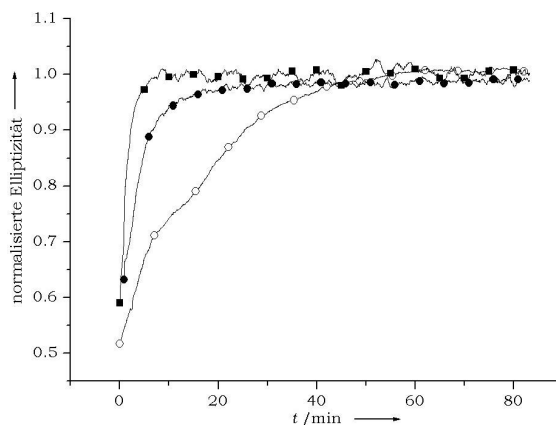


Abb. 41. Kinetiken der Rückfaltung des Kollagenpeptids **Ia** bei $4 \cdot 10^{-4}$ M Konzentration in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 3.0) nach einem Temperatursprung von 90 °C auf 4 °C (-o-o-o-), 20 °C (-●-●-●-) und 40 °C (-■-■-■-).

Beim Vergleich der abgeleiteten Aktivierungsenergien (Tabelle 10.) wird klar ersichtlich, dass die Aktivierungsenergie für die tripelhelikale Faltung der Einzelkette $\alpha(2xStBu)[\text{III}]$ und damit die Temperaturabhängigkeit der Faltungsrate größer als bei den Trimeren **Ia** und **III** ist. Die Ketten müssen sich ohne vorgegebenen Faltungskern finden und richtig anordnen, was durch thermische Bewegung verhindert wird.

Frühere Studien an Prolin-Derivaten ergaben für die *cis/trans*-Isomerisierung eine Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger von ca. 90 kJ/mol und eine Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger von ca. 9 J/(mol K).¹²⁶ In einem vollständig

entfalteten Trimer mit (Pro-Hyp-Gly)₅/α-Kette befinden sich 15 Prolin- und 15 Hydroxyprolinreste pro Tripelhelix, von denen im Gleichgewicht ca. 17-18 % in *cis*-Konformation vorliegen. Demnach müssen ca. 5 *cis*-Peptidyl-Prolin-Bindungen isomerisiert werden, was einer Gesamtaktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger_{Ges} von ca. 450 kJ/mol und einer Gesamtaktivierungsentropie ΔS^\ddagger_{Ges} von ca. 45 J/(mol K) entspricht. Müssten alle Prolinreste für den Übergangszustand gleichzeitig isomerisiert werden, hätte man eine hypothetische freie Aktivierungsentropie ΔG^\ddagger_{Ges} von ca. 440 kJ/mol mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca. 10^{-64} s^{-1} bei 300 K und somit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von ca. 10^{56} Jahren.

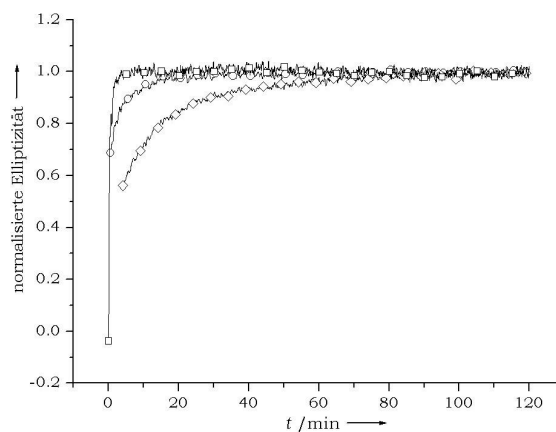


Abb. 42. Kinetiken der Rückfaltung des Kollagenpeptids **III** bei $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Konzentration in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 3.0) nach einem Temperatursprung von 90 °C auf 4 °C (-◇-◇-◇-), 20 °C (-○-○-○-) und 40 °C(-□-□-□-).

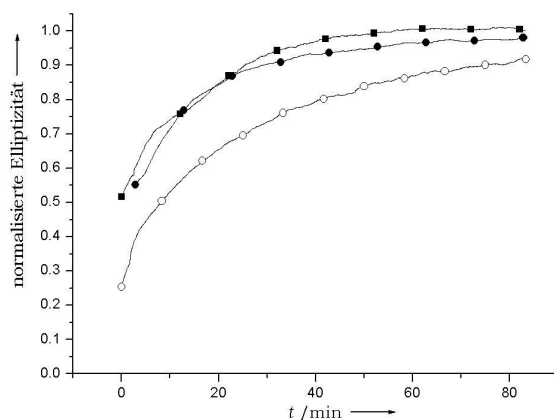


Abb. 43. Vergleich der initialen Faltungskinetiken der Einzelkette $\alpha(2xStBu)[III]$ (-○-○-○-) und der Trimere **Ia** (-■-■-■-) und **III** (-●-●-●-) nach einem Temperatursprung von 90 °C auf 4 °C.

Tabelle 10. Faltungsraten der Kollagenpeptide bei unterschiedlichen Temperaturen und die daraus ermittelten Aktivierungsenergien E_a .

Kollagenpeptid	$k[10^{-3} s^{-1}]$					$E_a [kJ \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$
	4 °C	8 °C	12 °C	20 °C	40 °C	
$\alpha(2xStBu)[III]$	0.43	0.65	0.79	-	-	50
Ia	1.1	-	-	3.8	9.4	44
III	1.3	-	-	4.0	11.5	44

Tabelle 11. Halbwertszeiten für die tripelhelikale Faltung der Kollagenpeptide bei unterschiedlichen Temperaturen.

Kollagenpeptid	$t_{1/2} [min]$				
	4 °C	8 °C	12 °C	20 °C	40 °C
$\alpha(2xStBu)[III]$	39	26	21	-	-
Ia	16	-	-	4.4	1.8
IIa	13	-	-	4.2	1.5

Tabelle 12. Mit Hilfe von Eyring-Plots gewonnene Aktivierungsenthalpien (ΔH^\ddagger) und -entropien (ΔS^\ddagger).

Kollagenpeptid	ΔH^\ddagger [kJ/mol]	ΔS^\ddagger [J/mol K]	ΔG^\ddagger [kJ/mol]
$\alpha(2xStBu)[III]$	47.8	-135.7	88.5
Ia	41.1	-152.2	86.8
IIa	41.7	-149.0	86.4

Die in Tabelle 12. gezeigten kinetischen Zustandsvariablen aus den Eyring-Plots ergeben einige Hinweise auf den Übergangszustand. Aus der sehr großen Übergangszustandsentropie, die nahezu den gleichen Betrag bei 300 K liefert wie die Enthalpie, ist zu entnehmen, dass der aktivierte Komplex stark geordnet ist und die drei α -Ketten schon korrekt angeordnet sind. Aus dem niedrigen Betrag der Übergangsenthalpie kann man entnehmen, dass die *cis/trans*-Isomerisierungen sukzessiv bei gleichzeitiger Ausbildung von Attraktionswechselwirkungen stattfinden. Man kann einen reissverschlussartigen, aber auch einen nicht vektoriellen, sukzessiven Faltungsvorgang vermuten. Eine Aggregation der Ketten und ein Fortschreiten der Strukturausbildung an mehreren Faltungskernen widerspricht aber der erheblich schnelleren Faltung der verknüpften Ketten mit ihrer geringeren Aktivierungsenergie. Diese Betrachtung unterstützt somit die Bedeutung des Nukleus und lässt auf die für Kollagene vorgeschlagene reissverschlußartige Faltung schließen.

3.2.8. Einfluss von (4S)- und (4R)-Fluorprolin auf Ausbildung und Stabilität der Tripelhelix

Wie bereits in der Einleitung diskutiert (Abschnitt 1.6.4.), gibt es verschiedene Zusammenhänge zwischen der Prolinkonformation und der Kollagenstruktur.

Essentiell für die Ausbildung der Polyprolin-II Helix und somit der Tripelhelix sind *all-trans*-Peptidbindungen. In der Tripelhelix werden die Prolin-Ringe in zwei unterschiedlichen Konformeren, auch als Pucker bezeichnet, vorgefunden. Hierbei unterscheiden sich die Positionen durch einen C- γ -*endo*-Pucker in Position Xaa und C- γ -*exo*-Pucker in Position Yaa der Triplets. Durch eine Substitution an der C γ -Position des Prolinrestes mit einer elektronegativen Gruppe (OH, F) werden diese Konformationen des Ringes induziert, und zwar der γ -*endo*-Pucker durch (4*S*)- und der γ -*exo*-Pucker durch (4*R*)-substituierte Proline. Dies könnte auch erklären, warum an der Yaa-Position (4*R*)-substituierte Proline stabilisierend wirken. Der substituierte Ring nimmt auch ohne Einbettung in die Struktur diese bevorzugte Konformation ein, wodurch beim Entfaltungsvorgang weniger Konformationsentropie frei wird.

Eine weitere mögliche Ursache für die Stabilisierung der Tripelhelix ist eine Bevorzugung der *trans*-Peptidbindungen durch elektronegativ (4*R*)-substituierte Proline.^{52,121,125,126,129,130,174}

In der Xaa-Position wird nach Röntgenstrukturanalysen¹³² Prolin mit C- γ -*endo*-Pucker vorgefunden. Da diese Konformation durch elektronegative (4*S*)-Substituenten induziert wird, sollte der Einbau solcher Prolinderivate in Kollagenpeptide Informationen über die Bedeutung der korrekten Ringkonformation liefern. Sakakibara und Mitarbeiter^{117,118} haben Kollagenpeptide mit (4*S*)- und (4*R*)-Hydroxyprolin an der Xaa-Position synthetisiert, die selbst bei tiefen Temperaturen ungefaltet blieben. Aminosäurereste der Xaa-Position sind laut Röntgenstrukturanalysen Lösungsmittel-exponiert, allerdings weniger als die Reste der Yaa-Position (s. Abb. 4.). Zudem könnten die voluminösen Hydroxy-Gruppen die sensible Wasserstoffbrückenstruktur des Kollagens stören oder Wasser in die sehr eng gepackte Struktur interkalieren.

Da Fluor als C4-Substituent durch seinen kleineren und mit Wasserstoff vergleichbaren Van-der-Waals Radius tiefere Einblicke in diese

Fragestellungen bieten kann, wurden Kollagenpeptide mit (4*S*)- und (4*R*)-Fluorprolin in Xaa-Position synthetisiert und konformationell charakterisiert.

In Abb. 44. sind die CD-Spektren der Peptide $\alpha(2xStBu)[\mathbf{X}]$ und $\alpha(2xStBu)[\mathbf{XI}]$ mit jeweils (4*S*)- und (4*R*)-Prolin in Position Xaa der Ketten bei 4 °C im Vergleich zu Kette $\alpha(2xStBu)[\mathbf{III}]$ in 80 % MeOH, abgebildet. Eine tripelhelikale Struktur kann zumindest bei dem Peptid $\alpha(2xStBu)[\mathbf{X}]$ mit (4*S*)-Fluorprolin in Xaa-Position ausgeschlossen werden. Aus dem ¹H-TOCSY-Spektrum des (4*S*)-Fluorprolin-Peptid $\alpha(2xStBu)[\mathbf{X}]$ (Abb 45.) wird ersichtlich, dass die Prolin-Derivate in Xaa-Position teilweise in *cis*-Peptidbindungen involviert sind, weshalb für dieses analoge Kollagenpeptid selbst eine Polyprolin-II Helix nicht vorliegt.

Im Gegensatz dazu entspricht das CD-Spektrum des Kollagenpeptids $\alpha(2xStBu)[\mathbf{XI}]$ mit (4*R*)-Fluorprolin in Xaa-Position (Abb. 44.) in allen verwendeten Lösungsmitteln einer Polyprolin-II Helix, was auf die starke Präferenz dieses Prolinderivats für eine *trans*-Peptidbindung zurückzuführen ist. Trotzdem faltet sich dieses Peptid bei 4 °C auch nicht in eine Tripelhelix. Der langsame H/D-Austausch (Abb. 46.) im NMR deutet jedoch auf eine Strukturierung hin, welche bislang nicht aufgeklärt werden konnte. Versuche, die Tripelhelix mittels Zugabe von Alkoholen (20 % bis 85 % Methanol) in leicht sauren Medium (0.1 M bzw. 1 M Essigsäure) zu stabilisieren, sind ebenfalls gescheitert, obwohl unter diesen Bedingungen Kollagenpeptide mit (4*R*)-Hydroxyprolin in Xaa-Positionen scheinbar tripelhelikal gefaltet sind.¹⁴⁰ Die entsprechenden CD-Spektren und thermische Entfaltungen bestätigten lediglich das Vorliegen einer Polyprolin-II artigen Struktur (Abb. 47.). Nur das monomere Kollagenpeptid $\alpha(2xStBu)[\mathbf{III}]$, das als Vergleich unter diesen Bedingungen untersucht wurde, zeigte in 80 % MeOH eine deutliche Erhöhung der Schmelztemperatur auf 30 °C, was wiederum die bekannte stabilisierende Wirkung von Alkoholen bestätigte.⁷⁴⁻⁷⁷

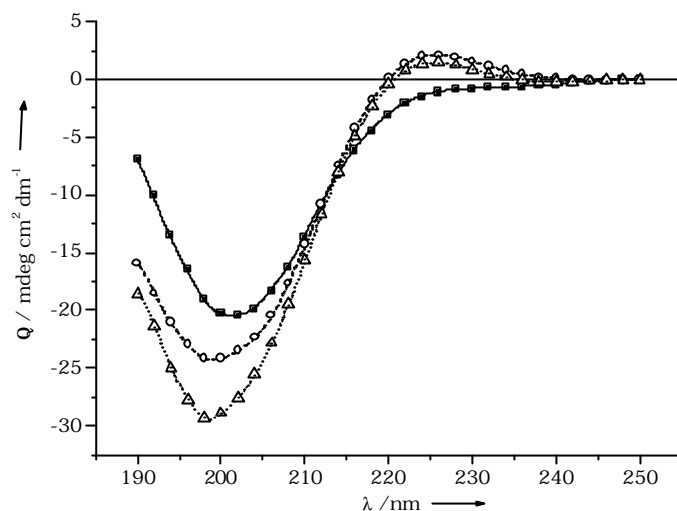


Abb. 44. CD-Spektren der Einzelketten **a(2xStBu)[III]**(-○-○-○-), **a(2xStBu)[X]**(-■-■-■-) und **a(2xStBu)[XI]**(-△-△-△-) in 80 % MeOH in 1N HOAc im Vergleich.

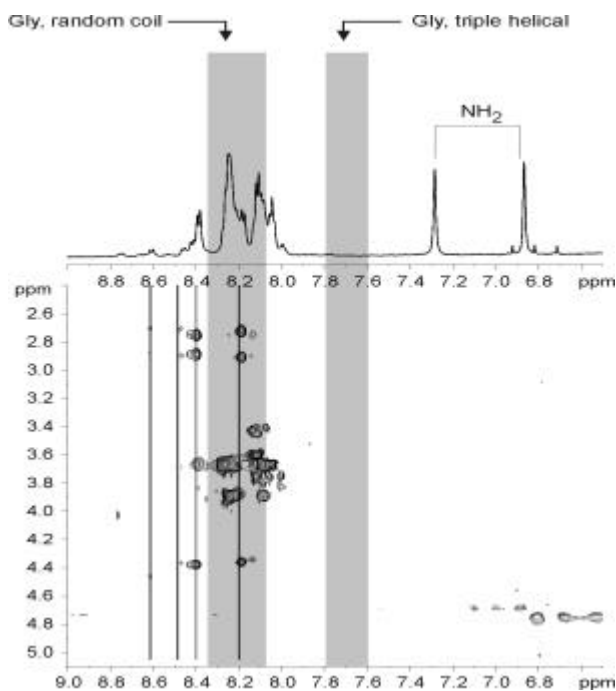


Abb. 45. ¹H-TOCSY-Spektrum des Peptides **a(2xStBu)[X]** mit (4S)-FPro in Xaa-Position: Die Glycinreste sind eindeutig nicht in tripelhelikale Strukturen involviert.

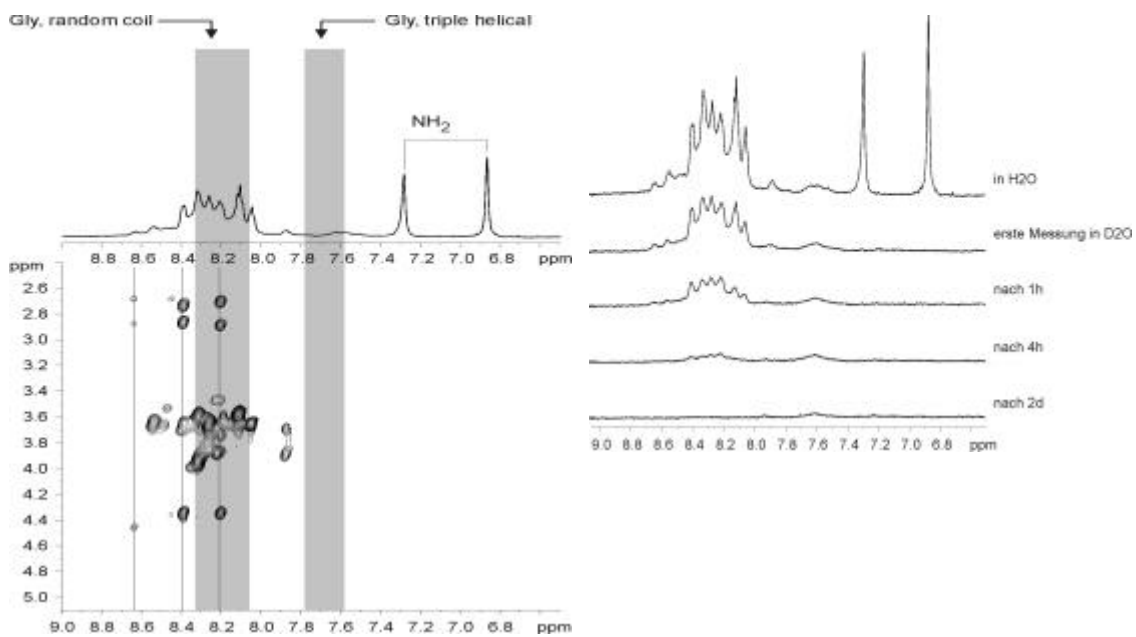


Abb. 46. Das ^1H TOCSY-Spektrum (links) des Peptids **a**(2xStBu)[XI] mit fünf ((4R)-FPro-Hyp-Gly)-Repeats zeigt eindeutig, dass die Glycinreste nicht in tripelhelikale Strukturen involviert sind. Der sehr langsame H/D Austausch suggeriert eine Strukturierung, die aber nicht aufgeklärt werden konnte.

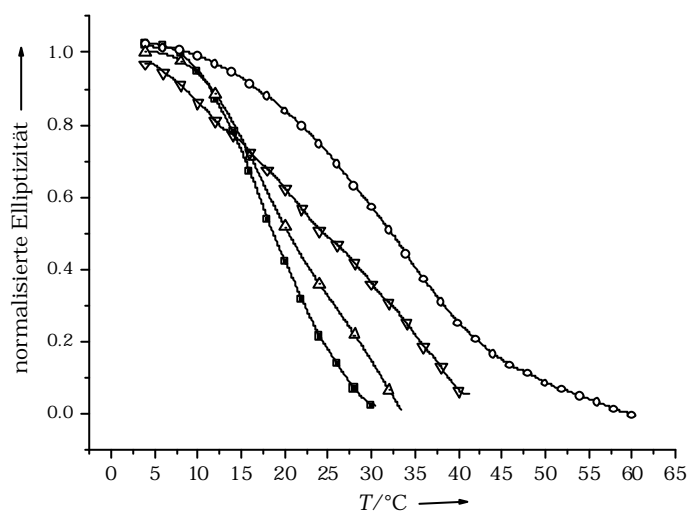


Abb. 47. Die Verfolgung des Maximum bei 225 nm im Temperaturgradienten der Einzelkette **a**(2xStBu)[XI] in MeOH (80%) (∇ - ∇ - ∇ -) und Wasser (Δ - Δ - Δ -) im Vergleich zu **a**(2xStBu)[III] in MeOH (80%) (\circ - \circ - \circ -) und Wasser (\blacksquare - \blacksquare - \blacksquare -) zeigt, dass es sich bei der Struktur der (4R)-Fluorprolinkette nicht um eine kooperative Entfaltung und damit nicht um eine tripelhelikale Struktur handelt (jeweils 1 mM).

Zum Verständnis dieser Ergebnisse ist es sicherlich erwähnenswert, dass Fluor in seinen elektronischen und sterischen Eigenschaften nicht identisch wie Wasserstoff ist. Sterische Repulsionen könnten deshalb vielleicht doch größere Probleme bereiten, als bei dem entsprechenden Proteindesign angenommen wurde. Berechnete Kollagenmodelle zeigen, dass ausreichend Raum für eine Substitution des Wasserstoffs vorhanden ist. Während das (4*S*)-Fluorprolin sich durch seine konformationellen Eigenschaften nahezu optimal in die Tripelhelix einbetten sollte, induziert das (4*R*)-Derivat eine der Tripelhelix optimale Voraussetzung, nämlich eine Polyprolin-II Helix. Beide Konfigurationsisomere haben jedoch äußerst rigide Ringstrukturen, die scheinbar den Faltungsvorgang erschweren.

Die Untersuchungen zeigen, dass elektronegative Substitutionen des γ -Kohlenstoffs von Prolinen in Xaa-Position die Ausbildung von Kollagenstrukturen verhindern. Dies sollte auch ein Grund für die hohe Selektivität der (4*R*)-Prolin-Hydroxylase für Pro-Reste in der Yaa-Position sein, wodurch die Tripelhelix stark stabilisiert wird. In nativem Gewebe findet man in Xaa-Position (3)-Hydroxylierungen, deren Funktion aber bislang unbekannt ist. Modellpeptide mit entsprechenden Funktionalitäten könnten vielleicht Aufschluß über diese Zusammenhänge geben.

3.3. Kristallisationsversuche

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, sind die Konnektivitäten der Cysteine im Kollagen Typ III-Knoten bislang nicht bekannt. Auch NMR-Untersuchungen am Homotrimer **III** ergaben keine eindeutigen Hinweise. Es konnte lediglich bestätigt werden, dass sich ausschließlich ein Cystinknoten ausbildet, der aufgrund von Modeling Experimenten mit größter Wahrscheinlichkeit dem Knoten B der Abb. 28. entspricht. Dennoch wäre eine eindeutige Aufklärung dieses Cystinknotens mittels Röntgenstrukturanalyse von größter Bedeutung.

Kristallisationsexperimente mit dem Homotrimer **III** lieferten stabähnliche, nichtreflektierende Kristalle, während das Homotrimer **IV** im wesentlichen Fibrillen bildete (Abb. 48.). Diese bevorzugte Fibrillenbildung des Trimers **IV** entspricht auch anderen Beobachtungen für dieses Modellpeptid, da in allen spektroskopischen Experimenten eine außerordentlich stark ausgeprägte Tendenz zur Aggregation beobachtet wurde. Dies erschwerte zudem die biophysikalische Charakterisierung dieser Verbindung.

Das unterschiedliche Verhalten der Homotrimere **III** und **IV**, die unter den Kristallisationsbedingungen sicherlich tripelhelikal gefaltet sind (4 °C, T_m ca. 68 °C für **III** und ca. 82 °C für **IV**), könnte auf eine kritische Peptidlänge für die Fibrillenbildung hindeuten, die in diesem Fall zwischen fünf (**III**) und sieben (**IV**) (Pro-Hyp-Gly)-Triplets liegt.

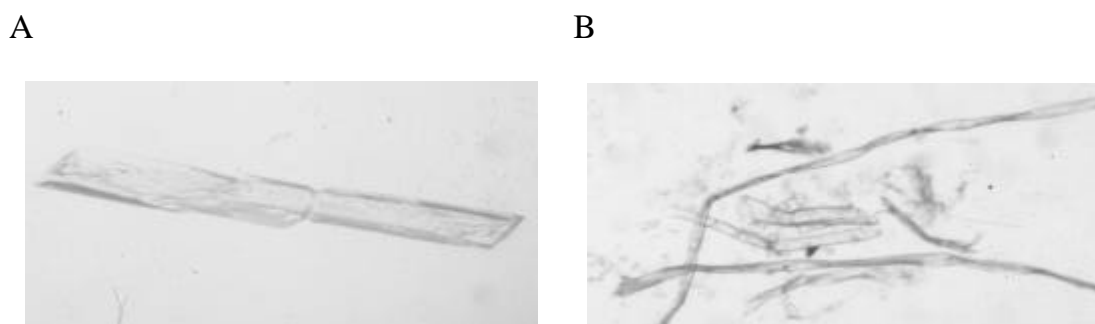


Abb. 48. Längliche Kristalle wurden für das Homotrimer **III** (A) und fast ausschließlich Fibrillen für das Homotrimer **IV** (B) gewonnen.

Die höhere Auflösung bei H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH Kristallen, die durch Mikrogravitationsexperimente gewonnen wurden,^{72,81} erlaubte die Ausmessung der Einheitszellen und lieferte erstmals ein Packungsmodell für Kollagenpeptide im Kristall, welches elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen N- und C-Termini beinhaltet. Mit großer Wahrscheinlichkeit erfolgt eine ähnliche Organisation der Kollagenpeptide

auch unter normalen Kristallisationsbedingungen, wodurch eine Fibrillenbildung unterdrückt wird.

Aus diesem Grund wurde die Peptide $\alpha(2xStBu)$ [VII] und $\alpha(2xStBu)$ [VIII] (s. Tabelle 6.) synthetisiert, die sowohl N- wie C-terminal ungekappt waren. Das Peptid $\alpha(2xStBu)$ [VII] mit seinen fünf (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts zeigte laut CD-Spektren bei 4 °C keine eindeutigen tripelhelikalen Strukturmerkmale, was im Vergleich zur tripelhelikalen Struktur des N-acetylierten und C-amidierten $\alpha(2xStBu)$ [III]-Peptids nur auf die geladenen Termini und somit auf elektrostatische Abstoßungen zurückzuführen ist. Da sich ungefaltete, monomere Ketten laut den Ergebnissen des Abschnitts 3.1.2. nicht korrekt zu Homotrimeren oxidieren lassen, wurde das Peptid $\alpha(2xStBu)$ [VIII] den Oxidationsexperimenten zugeführt. Obwohl die Einzelkette einen nahezu identischen Schmelzpunkt wie die ungeladene Kette $\alpha(2xStBu)$ [IV] besitzt, konnte nach einer Woche kein Disulfid-verknüpftes Trimer nachgewiesen werden. Statt dessen lag vorwiegend die intramolekular oxidierte, monomere Kette vor. Dies konnte nur durch elektrostatische Abstoßungen vor allem am C-Terminus erklärt werden. Zudem wurde Diketopiperazin-Abspaltung am N-Terminus beobachtet. Da aber diese Reaktion überraschender Weise nach einmaliger Abspaltung von (Pro-Hyp) stagniert, wurde das Peptid $\alpha(2xStBu)$ [IX] mit einem zusätzlichen N-terminalen Glycinrest und mit drei Glycinresten C-terminal zu den Cysteinen synthetisiert, um eine Abstoßung vom Cystinknoten zu entfernen. Die Oxidation zum Homotrimer IX verlief wie erwartet gut. Mit diesem Homotrimer IX wurden neue Kristalle gezüchtet.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Untersuchung von Einflüssen der Knotenposition in Kollagenmodellen sollte laut Aufgabenstellung im Rahmen dieser Arbeit die Synthese von heterotrimeren Kollagenmodellpeptiden mit C und N-terminaler, spezifischer Cystinvernetzung erfolgen. Aufgrund der auftretenden außerordentlichen Syntheseschwierigkeiten dieser exklusiv aus (Pro-Hyp-Gly)-Repeats bestehenden Kollagenmodelle wurde nach Etablierung einer reproduzierbaren, aber sehr aufwendigen Synthesestrategie auf die Darstellung von entsprechenden Modellen mit N-terminalem Knoten verzichtet.

Dieser Einfluss wurde anhand der besser zugänglichen Knotenform des natürlichen Kollagen Typ III untersucht. Aus diversen Oxidationsexperimenten von unterschiedlichen Dicysteinpeptiden konnten somit N- und C-terminal vernetzte Kollagenmodellpeptide gewonnen und deren biophysikalische Eigenschaften untersucht werden. Darüber hinaus ermöglichte dies einen Vergleich der biophysikalischen Daten zwischen diesen Kollagenmodellen und demjenigen mit einer stabilisierenden Disulfidbrücke weniger, dem artifiziellen, C-terminalen Cystinknoten. Hervorzuheben ist hier die überdurchschnittlich strukturstabilisierende Funktion des natürlichen C-terminalen Kollagenknotens. Die einfache Zugänglichkeit solcher disulfidvernetzten Kollagenmodellpeptide macht diese als Biomaterialien äußerst attraktiv. Die biophysikalischen Eigenschaften eines Kollagenmodells mit einer ähnlichen, N-terminalen Vernetzung zeigte hingegen, dass der Knoten an dieser Seite die Tripelhelix weniger stabilisiert als C-terminal.

Der artifizielle Cystinknoten läßt bei der Synthese entscheidende Parameter wie das Raster der α -Ketten, die Position des Knotens und die Aminosäuresequenz offen und gestattet damit den Einbau natürlicher Sequenzen sowie die Darstellung von Heterotrimeren. Die universelle Synthese ermöglicht die kovalente Verknüpfung von Peptidketten, welche selbst bei entsprechend tiefen

Temperaturen nicht selbstassoziiieren, wodurch Kollagenmodelle zugänglich sind, die auch in ihren thermodynamischen Stabilitäten den natürlichen Makromolekülen entsprechen. Im Gegensatz zu dem natürlichen Knoten wurde in NMR-Experimenten bewiesen, dass sich diese Form der Vernetzung nicht zuletzt aufgrund ihrer größeren Flexibilität vollständig in die Tripelhelix einpasst. Somit sollten auch unterschiedliche Positionen der Vernetzung in der Primärsequenz der α -Ketten die thermodynamischen Eigenschaften nur sehr gering beeinflussen.

Die kinetischen Untersuchungen der Modelle zeigten, dass beide C-terminale Cystinvernetzungen die Bildung eines Faltungsnukleus im gleichen Maße unterstützen. So wird die Rückfaltung der beiden unterschiedlich templatverknüpften Peptide gegenüber dem nichtverknüpften Analogon um etwa einen Faktor 2.5 beschleunigt. Mit diesen Ergebnissen konnte die in der Literatur postulierte Bedeutung des Faltungskerns bestätigt werden.

Im Zusammenhang der angesprochenen Biomaterialien wurde der Einfluss von Fluorprolin in der Xaa-Position auf die Tripelhelix untersucht. Würde man eine geeignete, identische Substitution der beiden Proline in der (Pro-Pro-Gly)-Sequenz durch Fluorproline finden, wären mittels SPI die Expression von kurzen, stabilen α -Ketten als Mikroproteine mit interessanten Eigenschaften möglich.

Ausblick

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit unterschiedlichen Fluorprolinen in Xaa-Position zeigen, dass durch die Substitution von Prolin eine Destabilisierung der Tripelhelix bewirkt wird. Erst ein Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften von Kollagenmodellpeptiden aus ((4R)-FPro-(4R)-FPro-Gly)-Bausteinen und (Pro-Pro-Gly)-Einheiten wird zeigen, ob durch vollständige Fluorierung der Proline die Tripelhelix stabilisiert wird. In

natürlichen Kollagenen wird Prolin in Xaa-Position teilweise posttranslational zu 3-Hydroxyprolin modifiziert, dessen Einfluss immer noch unklar ist. Erst analoge Modellpeptide mit verschiedenen Prolinderivaten in dieser Position werden die biologische Bedeutung aufdecken können.

Letztendlich werden weitere Untersuchungen mit Cystinvernetzungen in unterschiedlichen Positionen einer Kollagendomäne Aufschlüsse über geeignete Faltungskerne geben und damit Fragen der dynamischen Proteinfaltung beantworten. Artificielle Cystinknoten bieten hier durch ihre Flexibilität und besondere Einbettung in tripelhelikale Strukturen die geeignete Voraussetzung.

5. Experimenteller Teil

5.1. Materialien und Methoden

5.1.1. Lösungsmittel und Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Aldrich, Baker, Fluka und Merck in entsprechenden Qualitäten bezogen. TFA, NMP sowie DMF wurde darüber hinaus unter Ultrahochvakuumbedingungen destilliert, wobei bei der DMF – Destillation Ninhydrin zum Abfangen der entstehenden Amine zugesetzt wurde. Für die analytische sowie präparative HPLC wurde LiChrosolv Acetonitril von Merck verwendet. Die Fluorierungsmittel TFFH und DAST wie das zur Thiolaktivierung verwendete *o*-Npys-Cl wurden von Aldrich bezogen. Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren stammen von der Firma Alexis. Andere Chemikalien, wie ungeschützte oder *Z*-geschützte Prolin-Derivate wurden von Fluka erworben. Die in der Festphasensynthese verwendeten Harze wurden von der Firma Novabiochem (Läufingen, CH) bezogen. Zur Hydrogenolyse wurde der Katalysator E10 E/W 10 % Pd auf Aktivkohle der Firma Degussa verwendet. Alle weiteren Chemikalien stammen von Aldrich, Fluka oder Merck.

5.1.2. Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-60-Fertigplatten der Firma Merck je nach Anwendung mit oder ohne Fluoreszenzindikator verwendet. Die eingesetzten Laufmittelsysteme werden bei den einzelnen Syntheseprotokollen angegeben. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Absorption bei 250 nm, durch Chor / *o*-Tolidin (1.5 g *o*-Tolidin und 4.2 g KI in 60 ml Eisessig und 940 ml H₂O). In allen anderen Fällen wurde mit KMnO₄ oxidiert. Freie

Thiole wurden mit Ellmann's Reagenz (A: 0.1 M NaHCO₃, B: 0.1 % 5,5'-Dithionitrobenzoesäure in EtOH) angefärbt.

5.1.3. Analytische und präparative HPLC

Die analytische HPLC-Trennung wurden mit einer Anlage der Firma Waters (Eschborn) bestehend aus zwei Chromatographiepumpen des Modells 515, einem 717plus Autosampler, einem Datamodul und einem 996 Photodiode Array Detektor durchgeführt. Das System wurde von der Millennium⁽³²⁾ Software gesteuert. Alle analytischen Trennungen wurden mit dem folgenden Gradienten gefahren :

Linearer Gradient von 2 % Phosphorsäure/Acetonitril von 95/5 zu 2 % Phosphorsäure/Acetonitril von 20/80 (**B**) in 15 min bei einer Flussrate von 1.5 ml/min auf einer ET 125/4 Nucleosil 100/5 C18 (Macherey&Nagel, Düren).

Präparative HPLC-Trennungen wurden auf einer Anlage der Firma Abimed (Langenfeld), Modell 116 durchgeführt. Als Eluenten wurden die Puffer A (0.1 % TFA in H₂O) und B (0.08 % in AcCN) verwendet. Je nach Hydrophilie wurde der Gradient den optimalen Bedingungen angepasst. Dementsprechend wurden für vollgeschützte Peptidketten Gradienten mit Anfangsbedingungen zwischen 25-35 % B bis Endbedingungen von 70-80 % B bevorzugt. Für hydrophilere Peptide kamen Gradienten von 10 – 70 % B zum Einsatz. Allgemein wurden Laufzeiten von 50 min auf einer von Macherey&Nagel gefertigten Säule (VP 250/21 Nucleosil 500-5 C18 PPN) benutzt.

5.1.4. Gelchromatographie

Präparative gelchromatographische Trennungen wurden auf zwei unterschiedlichen Säulen vorgenommen. Sie werden in den entsprechenden Beschreibungen durch Buchstabenkürzen A oder B gekennzeichnet :

A: 145/1.25 Fraktogel HSK HW-40 S Säule (145cm×1.25 cm) mit zwei unterschiedlichen Puffersystemen; 1 % AcHO für freie Peptide und eine Mischung aus 0.5 M AcOH/*n*-BuOH/2-Propanol (7:2:1) als Eluenten.

B: Hiload Superdex pg 30 XK 26/60 – Säule von Amersham Biosciences Europe (Freiburg); der Fluss betrug bei den unterschiedlichen Trennungen 2.6 ml/min. Als Eluenten wurden zunächst 50 mM Phosphat-Puffer mit 150 mM NaCl benutzt, der später durch 1 %ige HOAc ersetzt wurde.

Die Systeme wurden durch eine Beckmann – Pumpe 10 A, einen Superfrac Fraktionssammler von Pharmacia und einen Holochrom-UV-Detektor von Abimed/Gilson ergänzt.

5.1.5. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden an einer Büchi Schmelzapparatur 510 gemessen. Die Werte sind nicht korrigiert.

5.1.6. Aminosäureanalysen

Die Hydrolyse erfolgte in 1 ml 6 M HCl bei 110 °C in 48 h. Dabei wurden etwa 50-100 nMol Peptid eingesetzt. Die Aminosäurenverhältnisse wurden am Aminosäureanalysator Biotronic LC6001 durch Ionenaustauschchromatographie bestimmt.

5.1.7. Massenspektrometrie

Single Quadrupol ESI-MS-Spektren wurden an einem Perkin Elmer SCIEX API 196 aufgenommen. HPLC-MS wurden hierbei in einem 15 min Gradienten von 5 – 80 % ACN/H₂O bei einem Fluss von 250 µl mit 1 % TFA durchgeführt. Das Perkin Elmer online HPLC-System besteht aus einem 140 Microgradient Pumpensystem, einem series 200 Autosampler und einem 785 A UV/VIS Detektor. Als Trennsäule kam eine Macheray & Nagel 125/2 Nucleosil 100-5 C-8 HD-Säule zum Einsatz. Nach dem UV-Detektor teilt ein Kapillar-Flussplitsystem ca. 1/10 des Flusses ab, der zur Aufnahme der massenspektroskopischen Aufnahmen verwendet wird.

Die ESI-FT-ICR-massenspektroskopische Aufnahme wurde in Tübingen mit Hilfe eines 4.7 T APEX II (Bruker) gefertigt.

Die ESI-IT-Fragmentierungsexperimente erfolgen mit Hilfe eines Spektrometers von der Firma Thermofinigan LC-Q *classic*.

5.1.8. NMR- Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren wurden an einem AM 400 bzw. AMX 500 Spektrometer der Fa. Bruker aufgenommen. Konformationsanalysen der Peptide wurden bei einer Protonenfrequenz von 500.13 MHz zwischen 10° C and 75 °C mit Hilfe eines Bruker DRX 500 Spektrometers aufgenommen. Die Konzentrationen der assoziierten Kollagenmodellpeptide lagen zwischen 1 und 2 mM. Für das Trimer I konnten die Resonanzen größten Teils nach der Methode von Wüthrich mit Hilfe von 2D-DQF-COSY-,^[39] 2D-TOCSY-^[40] und 2D-NOESY-^[41] Experimenten zugeordnet werden. Die Trimere wurden in einer Mischung aus H₂O/D₂O (9:1) vermessen, wobei die WATERGATE-Wasserunterdrückungsmethode Verwendung fand.^[42] Mit Trimer Ib wurden 2D-DQF-COSY, 2D-TOCSY und 2D-NOESY Experimente zusätzlich in 100 % D₂O durchgeführt. Temperatur-Shift Koeffizienten für die Amid

Protonen wurden durch 1D Spektren erhalten, die zwischen 10 und 20 °C aufgenommen wurden. Höhere Temperaturen verfälschten die Messungen durch beginnende Schmelzvorgänge der Tripelhelizes. H/D Austausch-Experimente wurden bei 10 °C durchgeführt. D₂O wurde Eisgekühlt zu einer aus H₂O lyophilisierten Probe gegeben, wobei erste 1D Messungen 10 min nach D₂O Zugabe aufgenommen wurden, die einen vollständigen Austausch bestätigten.

5.1.9. UV-Spektroskopie

UV-Absorptionen bzw. Spektren wurden an einem UV/VIS Spektrometer Lambda 19 der Da. Perkin Elmer aufgenommen. Als Software diente das zugehörige UV WinLab Version 2.0. Die Schichtdicke der Quarzglasküvette betrug 1 cm.

5.1.10. CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem Jasco J715 Spektropolarimeter mit Power Supply PS-150J und Peltier – Element PFD-350S gemessen. Als Software diente das zugehörige Programm J-700 for Windows. Gemessen wurde in spektral vermessenen Quarzglasküvetten einer Schichtdicke von 1 nm. Alle Einzelketten, soweit nicht anders beschrieben, wurden in 1 mM 5 h auf 4 °C vorgekühlten Lösungen vermessen. Bei templatassoziierten Kollagenketten wurde hingegen eine Konzentration von 4×10^{-5} M bevorzugt. Die Puffer wurden vor Gebrauch entgast und mittels einer 0.22 µm – Filtereinheit filtriert.

Alle Spektren wurden in einem Bereich von 190-250 nm aufgenommen, wobei vier gemittelt wurden, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Sie wurden zur Vergleichbarkeit in Einheiten pro mol und Aminosäurerest dargestellt ($[T]_R$). Die Konzentrationen wurden mittels des Einwaagegewichtes

und des Aminosäuregehaltes (wenn vorhanden) bestimmt. Thermische Entfaltungskurven wurden mit identischen Peptidkonzentrationen und Lösungssystemen durchgeführt. Dabei wurde das für trimere Strukturen typische Maximum bei 225 nm als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Der Temperaturgradient war bei allen Versuchen 12 °C/h.

5.1.11. Molecular modeling

Molecular modeling-Experimente wurden auf Silicon Graphics O2 R5000 Computer (Silicon Graphics Inc., Mountain View, CA) mit dem INSIGHTII Programm-Paket (Accelrys, San Diego, CA) und dem CVFF Kraft Feld durchgeführt.

5.1.12. Mikrokolorimetrische Messungen

Die Temperaturabhängigkeit der partialen Wärmekapazität der unterschiedlichen Peptidlösungen wurde mittels eines VP-DSC Mikrokolorimeters, mit jeweils einer Mess - und Referenzzelle (ca. 0.5 ml) verfolgt (MicroCal, Northampton, USA). Dabei wurde die Messzelle nach dem ersten Zyklus (Up- und Down- Scan) mit Proteinlösung befüllt. Die entsprechenden Peptidlösungen waren in Konzentration und Zusammensetzung equivalent mit den für die CD-Experimente angesetzten Lösungen, also soweit nicht anders beschrieben $1 \cdot 10^{-3}$ M für nicht assoziierte und $4 \cdot 10^{-4}$ M für kovalent assoziierte Modellpeptide. Die vermessenen Proben wurden mindestens 5 h vorgekühlt und mit großer Sorgfalt entgast.

Die thermische Denaturierung erfolgte im Temperaturbereich von 4 bis 90 °C (30-115 °C für Trimer II-c) mit einem Wärmegradienten von 12 °C/h. Die Datenanalyse erfolgte mit der Origin Software (MicroCal, Northampton, USA),

die speziell für DSC-Methoden zugeschnitten wurde, mittels dem non-two-state model, um eine Van-Hoff-Enthalpie zu erhalten.

5.1.13. Kristallisationsexperimente

Kristallisation der Trimere **III** und **IV** wurde bei 4 °C mittels dem hanging-drop Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Die Präzipitierungsmittel PEG 200 und PEG 400 wurden in Konzentrationen von 15 bis 25 % in 10 % wässrige AcOH eingesetzt. Die Anfangskonzentration war 5 mg/ml Peptid.

5.2. Synthese

Synthese der Hydroxy-Prolin ungeschützten α -Ketten

Zur Festphasensynthese der ungeschützten α -Peptidketten zur Assemblierung von Trimer **Ia** nach dem Schema in Abb.9. kam je nach Kette TentaGel-S-PHB oder TentaGel-S-RAM sowie Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH zum Einsatz. Sie wurden nach B. Sacca et al.⁴⁹ synthetisiert, abgespalten und mit präoperativen HPLC aufgereinigt.

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Cys(StBu)-Gly-OH, a1(StBu)[Ia]

Die Festphasensynthese erfolgte an dem TentaGel-S-PHB-Harz (0.224 mmol Fmoc-Gly/g; 1.25 g); Ausbeute: 162 mg (35 %); HPLC: $t_R = 7.4$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 823.0$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r =$ theor. 1644.86 für $C_{71}H_{105}N_{17}O_{24}S_2$.

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Cys(Acm)-Cys(StBu)-Gly-NH₂, a2(Acm,StBu)[Ia]

Als Festphasenträger wurde TentaGel-S-Ram-Harz (0.25 mmol/g; 1 g) eingesetzt; Ausbeute: 145 mg (32 %); HPLC: $t_R = 7.9$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 910.0$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r =$ theoretisch 1818.09 für $C_{77}H_{116}N_{20}O_{25}S_3$;

Aminosäureanalyse: Hyp 4.99 (5), Pro 5.01 (5), Gly 6.16 (6), Cys 1,87 (2);
Peptidgehalt: 91.3 %.

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Pro-Cys(StBu)-Gly-NH₂, a 1'(StBu)[Ia]

Die Synthese erfolgte an TentaGel-S-Ram-Harz (0.25 mmol/g; 1 g); Ausbeute:
135 mg (46 %); HPLC: $t_R = 8.103$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 871.4$
[M+2H]²⁺; M_r = theoretisch. 1741.01 für C₇₆H₁₁₃N₁₉O₂₄S₂.

Synthese der vollgeschützten Peptide auf dem XAL-Harz

Fmoc-geschütztes XAL-Harz (Beladung: 0.62 mmol/g) wurde zunächst mit
20 % Piperidine in DMF (1×15 min. 1×5 min) behandelt und mit DMF
(3×1min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min)
gewaschen. Die Kupplung der ersten Aminosäure (Fmoc-Gly-OH) wurde
zweifach mit 5 Äquivalenten Fmoc-Gly-OH/HBTU/HOBt/DIEA (1:1:1:2) in
DMF (2×1h) durchgeführt und anschließend mit DMF (3×1 min), MeOH
(3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min), MeOH (3×1 min) und DMF (3×1 min)
gewaschen. Freie Linkergruppen wurden mit Ac₂O (4 equiv)/DIEA (4 equiv)
und DMAP (0.1 equiv) in DMF (2×30 min) geschützt. Die effektive Beladung
mit der Fmoc-Aminosäure wurde abschließend durch die spektroskopische
Quantifizierung mittels UV des Fulvene/Piperidine Adduktes bei 301 nm
($\epsilon=7800$) nach Fmoc - Entfernung mit 20 % Piperidin in DMF (1 ml) und
Verdünnung nach 1 h auf 10 ml mit MeOH bestimmt.

Kettenverlängerung mit Fmoc- Aminosäuren erfolgte durch Doppelkupplungen
mit 4 Äquivalenten Fmoc-Aminosäure/HBTU/HOBt/DIEA (1:1:1:2) in DMF

(2×1 h) mit Ausnahme von S-geschützten Fmoc-Cys-OH, bei welchen die DIPEA Konzentration vermindert wurde. Nach jedem Kupplungsschritt wurde die Festphase mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min) gewaschen. Kupplung mit Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly)-OH wurden ebenfalls mit Doppelkupplungen (2 h) mit 1.8 und 0.8 Äquivalenten Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly)-OH/TFFH/DIPEA (1:1:2) durchgeführt, die ersten drei Kupplungen in DMF und die folgenden in NMP/CH₂Cl₂. Anschließend wurde der Träger mit DMF (3×1 min) gewaschen, mit (Boc)₂O (10 equiv) in DMF (20 min) acyliert und schließlich mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) and MeOH (3×1 min) Überschüsse entfernt. Die Vollständigkeit wurde mittels des Kaiser- Tests¹⁷⁵ bzw. für N-terminales Prolin mittels des Chloraniltests überprüft.¹⁷⁶ Fmoc-Abspaltung von Fmoc-Pro-Peptid-Harzen wurden mit 2 % Piperidin und 2 % DBU in DMF (0 °C, 1×60 sec, 1×30 sec) durchgeführt und anschließend mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1min) gewaschen.

N-terminale Acetylatierung der Peptide an fester Phase erfolgte mit 4 Äquivalenten Ac₂O/DIPEA (1:1) in DMF (2×30 min) gefolgt von Waschsritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min).

Synthese des vollgeschützten Peptide auf dem Trt(Cl)-Harz

Die Peptide wurden auf dem Fmoc-Gly-Trt(Cl)-Harz (Beladung: 0.57 mmol/g), den Ausarbeitungen der Synthesen auf dem XAL-Harz folgend, aufgebaut.

Synthese des Heterotrimers Ia

Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Cys(*o*-Npys)-Gly-OH, a1(tBu,*o*-Npys)[Ia]

Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Cys(Acm)-Gly-Trt(Cl)-Harz wurde ausgehend von Fmoc-Gly-Trt(Cl)-resin (435 mg, Beladung: 0.57 mmol/g) dargestellt und mit *o*-Npys-Cl (2 equiv) in DMF bei RT für 5 h umgesetzt. Das Harz wurde abfiltriert, mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und Et₂O (3×1 min) gewaschen, und unter Vakuumbedingungen getrocknet. Die Harzabspaltung erfolgte mit 2 % TFA, 2 % (Et)₃SiH and 2 % H₂O in CH₂Cl₂ (1×15 min, 2×40 min). Das Harz wurde einmal mit CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und unter Vakuumbedingungen getrocknet. Das Rohprodukt wurde in MeOH aufgenommen und mittels präperative RP-HPLC gereinigt. Fraktionen mit homogenem Produkt wurden vereinigt, konzentriert and lyophilisiert; Ausbeute: 55 mg (11 %) gelbes Pulver; HPLC: $t_R = 11.1$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 996.6$ [M+2H]²⁺; M_r = theoretisch 1991.37 für C₉₂H₁₃₉N₁₉O₂₆S₂; Aminosäureanalyse: Hyp 5.19 (5), Pro 5.02 (5), Gly 6.00 (6), Cys 0.99 (1); Peptidgehalt : 76.1 %.

Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Cys(Trt)-Cys(StBu)-Gly-NH₂, a2(tBu,Trt,StBu)[Ia]

Die Synthese wurde auf dem XAL-Harz (400 mg, Beladung: 0.62 mmol/g) nach der Methode in den generellen Methoden durchgeführt. Die saure Abspaltung des Peptids von dem Festphasenträger erfolgte dreifach (1×5 min, 1×40 min, 1×90 min) mit 2 % TFA, 2 % (Et)₃SiH, 2 % H₂O in CH₂Cl₂. Der Festphasenträger wurde abschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen und die Filtrate sofort mit DMF verdünnt, vereinigt und unter Hochvakuumbedingungen getrocknet. Das Rohprodukt wurde in MeOH aufgenommen und mittels präperativer RP-HPLC gereinigt. Fraktionen mit homogenen Produkten wurden vereinigt, aufkonzentriert und aus tert-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert ; Ausbeute:

90 mg (16 %); HPLC: $t_R = 14.3$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 1135.8$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r = 2269.88$ theoretisch für $C_{113}H_{165}N_{19}O_{24}S_3$.

Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Cys(Trt)-Cys-Gly-NH₂, a₂(tBu,Trt)[Ia]

Zu Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Cys(Trt)-Cys(StBu)-Gly-NH₂, a₂(tBu,Trt,StBu)[Ia] (90 mg, 39.7 μ mol) wurde in TFE/H₂O (95:5, 100 mL) Tributylphosphin (10 equiv, 98 μ L, 0.4 mmol) gegeben und für 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde entfernt und der Rückstand aus *tert*-BuOH/H₂O (4:1) lyophilisiert. Ausbeute: 86 %; HPLC: $t_R = 13.3$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 1091.4$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r = 2181.71$ theoretisch für $C_{109}H_{157}N_{19}O_{24}S_2$; Aminosäureanalyse: Hyp 5.04 (5), Pro 4.90 (5), Gly 6.00 (6), Cys 2.20 (2); Peptidgehalt: 73.2 %.

Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Pro-Cys(*o*-Npys)-Gly-NH₂, a₁'(tBu,*o*-Npys)[Ia]

Ac-(Pro-Hyp(tBu)-Gly)₅-Pro-Cys(Acm)-Gly-XAL-Harz wurde ausgehend vom XAL-Harz (400 mg, Beladung: 0.62 mmol/g) wie unter den generellen Methoden beschrieben synthetisiert. Die Umwandlung des S-Acm Derivats mit *o*-Npys-Cl in das S-*o*-Npys Derivat und die azidolytische Festphasenabspaltung wurde wie für a₁(tBu,*o*-Npys) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde in MeOH aufgenommen und mittels präoperativer RP-HPLC gereinigt. Fraktionen mit dem gewünschten Produkten wurden vereinigt, aufkonzentriert und aus *tert*-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert; Ausbeute: 124 mg (24 %) gelbes Pulver; HPLC: $t_R = 12.05$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 1044.2$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r = 2087.51$ theoretisch für $C_{97}H_{147}N_{21}O_{26}S_2$; Aminosäureanalyse: Hyp 5.05 (5), Pro 6.03 (6), Gly 6.00 (6), Cys 1.02 (1); Peptidgehalt: 82.4 %.

Assemblierung von dem Dimer $\alpha 1\alpha 2(\text{tBu}, \text{Trt})[\text{Ia}]$

Eine Lösung von $\alpha 2(\text{tBu}, \text{Trt})[\text{Ia}]$ (17.64 mg; 5.92 μmol) und $\alpha 1(\text{tBu}, o\text{-Npys})[\text{Ia}]$ (15.5 mg; 5.92 μmol) in DMF (0.5 mL) wurde 5 Tage bei RT unter Argon gerührt. Die Disulfid Bildung wurde mit analytischer RP-HPLC verfolgt. Die Reaktionsmischung wurde zum gelartigen Zustand aufkonzentriert und die Reaktion für weitere 2 Tage unter Ausschluss von Sauerstoff fortgesetzt. Die Mischung wurde mit *tert*-BuOH/H₂O (4/1) verdünnt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels Größenausschlußchromatographie mit 0.5 M AcOH/*n*-BuOH/2-propanol (7:2:1) als Eluent auf Säule A aufgereinigt. Fraktionen mit dem gewünschten Produkt (HPLC) wurden vereinigt und lyophilisiert; Ausbeute: 14.7 mg (62 %); HPLC: $t_{\text{R}} = 12.3$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 2009.2$ [M+2H]²⁺ and 1339.8 [M+3H]³⁺; $M_{\text{r}} = 4016.94$ theoretisch für C₁₉₆H₂₉₄N₃₆O₄₈S₃.

S-Entschützung von Dimer $\alpha 1\alpha 2(\text{tBu}, \text{Trt})[\text{Ia}]$

Eine Lösung des Heterodimers $\alpha 1\alpha 2(\text{tBu}, \text{Trt})[\text{Ia}]$ (14.7 mg, 3.67 μmol) wurde in 3 % TFA und 3 % (Et)₃SiH in CH₂Cl₂ (20 mL) bei RT für 15 min gerührt, mit DMF verdünnt und unter Hochvakuumbedingungen getrocknet. Der Rückstand wurde in *tert*-BuOH/H₂O (4:1) aufgenommen und lyophilisiert; Ausbeute: 13.85 mg (100 %); HPLC: $t_{\text{R}} = 10.3$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 1888.2$ [M+2H]²⁺ und 1259.0 [M+3H]³⁺; $M_{\text{r}} = 3774.6$ theoretisch für C₁₁₇H₂₇₈N₃₆O₄₈S₃.

Assemblierung des vollgeschützten Heterotrimeres $\alpha 1\alpha 2\alpha 1'(\text{tBu})[\text{Ia}]$

Das S-entschützte Heterodimer $\alpha 1\alpha 2(\text{tBu})[\text{Ia}]$ (13.8 mg; 3.67 μmol) und $\alpha 1'(\text{tBu}, o\text{-Npys})[\text{Ia}]$ (11.2 mg; 4.41 μmol) wurden in argongesättigtem DMF (0.5 mL) gelöst und unter Argon für 5 Tage bei RT gerührt. Die

Reaktionsmischung wurde zum gelartigen Zustand aufkonzentriert und weitere 2 Tage wurde der Disulfidaustausch in der erhöhten Konzentration bei RT zugelassen. Die Mischung wurde mit *tert*-BuOH/H₂O (4/1) verdünnt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels Größenausschlußchromatographie mit 0.5 M AcOH/*n*-BuOH/2-propanol (7:2:1) als Eluent auf Säule A aufgereinigt. Fraktionen mit dem gewünschten Produkt (ESI-MS) wurden vereinigt und lyophilisiert Ausbeute: 8.5 mg (41 %); HPLC: $t_R = 12.6$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 1903.0$ [M+3H]³⁺, 1427.4 [M+4H]⁴⁺ and 1142.0 [M+5H]⁵⁺; $M_r = 5704.97$ theoretisch für C₂₆₉H₄₂₁N₅₅O₇₂S₄.

Heterotrimer Ia

Das *t*Bu-geschützte Heterotrimer a1a2a1'(tBu)[I] (8.5 mg; 1.49 μ mol) wurde in eisgekühlter TFA/(Et)₃SiH/H₂O (89:10:1; 3 ml) für 5 min gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und lyophilisiert; Ausbeute: 7.2 mg (100 %); HPLC: $t_R = 7.3$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 1622.4$ [M+3H]³⁺ und 1216.8 [M+4H]⁴⁺; $M_r = 4864.34$ theoretisch für C₂₀₉H₃₀₅N₅₅O₇₂S₄; Aminosäureanalyse: Hyp 14.9 (15), Pro 15.92 (16), Gly 18.17 (18), Cys 3.93 (4); Peptidgehalt: 79.0 %.

Synthese der Bausteine für die Einzelketten mit Fluorprolinen in Yaa-Position

Synthese von Fmoc-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH

Z-Pro-(4S)-FPro-Gly-OBzl

Zu einer eiskalten Suspension von Z-Pro-(4R)-Hyp-OH⁴³ (5 g, 12.6 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) wurde DAST (7.23 mL, 50.4 mmol) zugegeben und die Mischung für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H-Gly-OBzl·TosOH (5.26 g, 15.1 mmol) und DIPEA (5.2 ml, 30.2 mmol) zugeführt und die Lösung für weitere 6 h bei Raumtemperatur reagieren lassen. Die Lösung wurde auf Eis

gegeben und die organische Phase mit 5 % NaHCO₃, 5 % KHSO₄ und H₂O extrahiert. Nach Trocknung über MgSO₄, wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der dunkle ölige Rückstand wurde mittels Kieselgelchromatographie mit beginnender Elution mit CHCl₃ gefolgt von 0.2 % AcOH in 5-15 % MeOH in CHCl₃ aufgereinigt. Fraktionen mit homogenem Produkt (TLC) wurden vereinigt und getrocknet; Ausbeute: 4 g (62 %); TLC: R_f = 0.36 (AcOH/MeOH/CH₂Cl₂, 0.5:5:94.5); HPLC: t_R = 12.2 min (> 95 %); ESI-MS: m/z = 512.4 [M+H]⁺; M_r = 511.56 theoretisch für C₂₇H₃₀N₃O₆F.

H-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH·TosOH

Z-Pro-(4S)-FPro-Gly-OBzl (4 g, 7.8 mmol) wurde mit 10 % Pd/C und TosOH (1.48 g, 7.8 mmol) in MeOH/H₂O (9:1) hydriert. Nach 12 h wurde der Katalysator abfiltriert und die Lösung getrocknet. Der ölige Rückstand wurde von *tert*-BuOH/water (4:1) lyophilisiert; Ausbeute: 2.3 g (100 %) farbloses Öl; TLC: R_f = 0.05 (AcOH/MeOH/CH₂Cl₂, 0.5:5:94.5); HPLC: t_R = 1.2 min (>98 %); ESI-MS: m/z = 288.2 [M+H]⁺; M_r = 287.3 theoretisch für C₁₂H₁₈N₃O₄F.

Fmoc-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH

Zu H-Pro-(4S)-FPro-Gly-OH·TosOH (2.2 g, 7.8 mmol) in H₂O/Dioxane (2:1) mit NaHCO₃ (1.64 g, 19.5 mmol), wurde Fmoc-OSu (3.16 g, 9.36 mmol) gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt, die Mischung neutralisiert und das Lösungsmittelgemisch unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 5 % NaHCO₃ gelöst und der Überschuss von Fmoc-OSu mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Lösung wurde mit 5 % KHSO₄ angesäuert und das Produkt mit EtOAc (3x) extrahiert. Die kombinierten Extrakte wurden mit gesättigter NaCl – Lösung gewaschen, über MgSO₄

getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuumbedingungen entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Silikagelchromatographie mittels CHCl_3 , und 0.2 % AcOH ind 5-15 % MeOH in CHCl_3 als Eluenten aufgereinigt; Ausbeute: 2.47 g (62 %); TLC: $R_f = 0.46$ (AcOH/MeOH/ CH_2Cl_2 , 0.5:5:94.5); HPLC: $t_R = 10.9$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 510.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M_r = 509.54$ theoretisch für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6\text{F}$.

Synthese des Heterotrimers Ib

Ac-[Pro-(4*S*)-FPro-Gly]₅-Cys(*o*-Npys)-Gly-OH, a1(Npys)[Ib]

Wang-Harz (1.1 mmol/g, 280 mg) wurde mit (Fmoc-Gly)₂O und DMAP als Katalysator zu einem Grad von 0.32 mmol/g belegt und die restlichen freien Hydroxy-Gruppen mit einem großen Überschuss (10 equiv) von (Ac)₂O/DIEA (1:2) in Gegenwart von DMAP nach Standardprotokollen gecapped. Das Peptid wurde mit den Bausteinen Fmoc-Cys(Acm)-OH und Fmoc-Pro-(4*S*)-FPro-Gly-OH (5x) sowie TFFH als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base synthetisiert, die Fmoc Spaltungen und die letzte Acetylierung wurde wie in dem obigen generellen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Das *S*-Acm geschützte Peptid wurde an fester Phase durch Umsatz mit *o*-Npys-Cl zum *S*-*o*-Npys Derivat umgewandelt wie für a1(tBu,Npys)[Ia] beschrieben. Das aktivierte Peptid wurde von fester Phase mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O (96:2:2) (1×5 min, 1×30 min, 1×60 min) gespalten. Die kombinierten Filtrate unter reduziertem Druck eingengt, in MeOH aufgenommen und mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Fraktionen mit dem gewünschten Produkt wurden vereinigt konzentriert und lyophilisiert; Ausbeute: 35.6 mg (23 %) gelbes Pulver; HPLC: $t_R = 9.0$ min (98 %); ESI-MS: $m/z = 860.4$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; $M_r = 1720.79$ theoretisch für $\text{C}_{72}\text{H}_{94}\text{N}_{19}\text{O}_{21}\text{F}_5\text{S}_2$.

Ac-[Pro-(4*S*)-FPro-Gly]₅-Cys(Trt)-Cys(StBu)-Gly-NH₂, a₂(Trt,StBu)[**Ib**]

Die Peptidkette wurde am XAL-Harz (277 mg, 0.62 mmol/g) synthetisiert und aufgearbeitet wie für a₂(tBu,Trt,StBu)[**Ia**] beschrieben. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mit präparativer RP-HPLC aufgearbeitet. Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung isoliert; Ausbeute: 37.6 mg (11 %); HPLC: t_R = 9.2 min (98 %); ESI-MS: $m/z = 1000.4 [M+2H]^{2+}$; Mr = 1999.29 theoretisch für C₉₃H₁₂₀N₁₉O₁₉F₅S₃.

Ac-[Pro-(4*S*)-FPro-Gly]₅-Cys(Trt)-Cys-Gly-NH₂, a₂(Trt)[**Ib**]

Die StBu - Schutzgruppen wurden wie für a₂(tBu,Trt)[**Ia**] beschrieben reaktiv entfernt; Ausbeute: 23.6 mg (84 %); HPLC: t_R = 11.3 min (98 %); ESI-MS: $m/z = 956.2 [M+2H]^{2+}$; Mr = 1911.12 theoretisch für C₈₉H₁₁₂N₁₉O₁₉F₅S₂.

Ac-[Pro-(4*S*)-FPro-Gly]₅-Pro-Cys(*o*-Npys)-Gly-NH₂, a₁(Npys)[**Ib**]

Die Titelverbindung wurde am Rink-Harz (138.5 mg, Beladung: 0.65 mmol/g) als S-Acm geschütztes Derivat wie oben beschrieben synthetisiert. Die Umwandlung des Peptides in das *S-o*-Npys Derivat erfolgte mit *o*-Npys-Cl an fester Phase wie für a₁(tBu,*o*-Npys) beschrieben. Harzabspaltung erfolgte mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O, 96:2:2 (1×5 min, 1×30 min, 1×60 min). Die Filtrate wurden vereinigt und das Lösungsmittelgemisch unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt; Ausbeute: 47.5 mg (29 %) nach Gefriertrocknung; HPLC: t_R = 10.7 min (98 %); ESI-MS: $m/z = 909.6 [M+2H]^{2+}$; Mr = 1816.92 theoretisch für C₇₇H₁₀₂N₂₁O₂₁F₅S₂.

Assemblierung von Heterodimer α₁α₂(Trt)[**Ib**]

Die α₂(Trt)[**Ib**] (23.6 mg, 12.3 μmol) und α₁(Npys)[**Ib**] Kette (21.3 mg, 12.3 μmol) wurden in Argon gesättigtem H₂O (0.5 mL) für 6 h bei RT gerührt.

Die Lösung wurde mit *tert*-BuOH/H₂O (4:1) verdünnt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels Größenausschlusschromatographie mit 1 M AcOH als Eluenten aufgereinigt (Säule A). Fraktionen mit dem gewünschten Produkt wurden gepoolt und lyophilisiert; Ausbeute: 10.3 mg (24 %); HPLC: $t_R = 10.4$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 1159.4$ [M+2H]²⁺; $M_r = 3473.79$ theoretisch für C₁₅₆H₂₀₄N₃₆O₃₈F₁₀S₃.

S-Deprotection of the Heterodimer $\alpha 1\alpha 2$ [Ib]

Das Heterodimer $\alpha 1\alpha 2$ (Trt)[Ib] (10.3 mg, 2.97 μ mol) wurde in TFA/(Et)₃SiH/H₂O (94:3:3; 5 mL) für 5 min bei RT gerührt. Die Mischung wurde unter Ultrahochvakuumbedingungen zu einem Öl konzentriert welches anschließend aus *tert*-BuOH/H₂O (4:1) lyophilisiert wurde; Ausbeute: 9.6 mg (100 %); HPLC: $t_R = 7.9$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 1617.8$ [M+2H]²⁺, 1078.6 [M+3H]³⁺; $M_r = 3233.44$ theoretisch für C₁₃₇H₂₀₀N₃₆O₃₈F₁₀S₃.

Heterotrimer Ib

Eine Lösung vom S ungeschütztem Heterodimer $\alpha 1\alpha 2$ [Ib] (8.9 mg, 2.75 μ mol) und $\alpha 1'$ (Npys)[Ib] (6.0 mg, 3.3 μ mol) wurde in Argon gesättigtem H₂O (0.5 mL) unter Schutzgasbedingungen für 6 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit *tert*-BuOH/H₂O (4:1) verdünnt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels Gelchromatographie mit 1 % AcOH als Eluent (Säule A) aufgereinigt. Das Heterotrimer Ib wurde durch Gefriertrocknung vom Eluenten abgetrennt; Ausbeute: 3.9 mg (29 %); HPLC: $t_R = 8.2$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 1632.0$ [M+3H]³⁺ and 1224.0 [M+4H]⁴⁺; $M_r = 4894.11$ theoretisch für C₂₀₉H₃₀₀N₅₅O₅₇F₁₅S₄.

Synthese der Homotrimere II-VI - Generelle Methoden

Das Fmoc-geschütztes Rink-MBHA Harz (Beladung: 0.72 mmol/g) wurde dem XAL-Harz entsprechend behandelt. Dementsprechend wurde es zunächst mit 20 % Piperidin in DMF (1×15 min, 1×5 min) zur Fmoc- Abspaltung digeriert. Nach dem Waschen mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min) wurde mit Fmoc-Gly-OH/HBTU/HOBt/DIPEA (0.9 equiv, 1:1:1:2) in DMF (2 h), gefolgt von entsprechenden Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min), MeOH (3×1 min) und DMF (3×1 min) vorbelegt. Freie Aminogruppen wurden mit Ac₂O/DIPEA (4 equiv, 1:1) und DMAP (0.1 equiv) in DMF (2×30 min) gecapped. Die Harzbeladung wurde mittels der Quantifizierung des Fulven/Piperidin Adduktes bei 301nm ($\epsilon=7800$) nach Fmoc Abspaltung ermittelt.

Kettenverlängerung mit der entsprechenden Fmoc- Aminosäure wurde mit Doppelkupplungen mit 4 Equiv Fmoc-Xaa-OH/HBTU/HOBt/DIEA (1:1:1:2) in DMF (2×1 h) gefolgt von entsprechenden Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min) durchgeführt. Kettenverlängerungen mit Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH wurden mit Doppelkupplungen (2 h) mit jeweils 1.8/0.8 eq. Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH/TFFH/DIPEA (1:1:2) in DMF (bei den ersten drei Kupplungsschritten) und NMP/CH₂Cl₂ (in den weiteren Schritten) gefolgt von Waschschritten mit DMF (3×1 min), Acetylierung mit (Boc)₂O (10 equiv) in DMF (20 min) und abschließenden Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min). Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde mit dem Kaiser test,¹⁷⁵ ausgenommen der Schritte mit N-terminalen Iminosäuren bei denen der Chloraniltest¹⁷⁶ hinzugezogen wurde, verfolgt.

Fmoc- Abspaltung von Fmoc-Pro-Peptid-Harzen wurde mit 2 % Piperidine und 2 % DBU in DMF (0 °C, 1×60 sec, 1×30 sec) durchgeführt. Waschschrritte mit

DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min) entfernten überschüssige Reagenzien und das entstehende Fulven.

N-terminale Acetylierung der Peptid erfolgte an fester Phase mit 4 equiv Ac₂O/DIPEA (1:2) in DMF (2×30 min) gefolgt von Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min).

Synthese von monomeren Peptidamiden mit Pro-Hyp-Gly-Sequenzen

Die Festphasensynthese wurde, wie unter den generellen Synthesevorschriften beschrieben, an Fmoc-Gly-Rink-MBHA-Harz (0.4 mmol/g, 1 g) durchgeführt. Nach dem 3., 5. und 7. Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH - Kupplungsschritt wurde das Harz mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und Et₂O (3×1 min) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Für die N-terminale Peptid Acetylierung, wie unter den generellen Methoden beschrieben, wurden Aliquote des Harzes entnommen und das entsprechende festphasengebundene Peptid wie in den folgenden Abschnitten beschrieben weiterverarbeitet.

Ac-[Pro-Hyp-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂, α(2xStBu)[III]

Um die Titelverbindung in reiner Form zu gewinnen wurde Ac-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-Harz (462 mg) mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O (96:2:2; 1×15 min, 2×40 min, 1×60 min) behandelt, das Harz abfiltriert und abschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden aufkonzentriert und das Rohprodukt aus TFE mit Et₂O gefällt, mit Zentrifugation abgetrennt und aus *tert*-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert; Ausbeute: 170 mg (83 %) HPLC: t_R = 11.4 min (>85 %); ESI-MS: m/z = 756.4 [M+2H]²⁺ und 1511.6 [M+H]⁺; M_r = 1511.84 berechnet für C₆₃H₉₈N₁₆O₁₉S₄. Für spektroskopische Messungen wurde ein Teil des gewonnenen Materialien

mittels präparativer HPLC wie unter Materialien und Methoden beschrieben aufgereinigt (HPLC: >98 %).

Ac-[Pro-Hyp-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂

α(2xStBu)[III]

Entschützung/Abspaltung von Fmoc-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-Harz (520 mg) wurde wie für Verbindung Ac-[Pro-Hyp-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ (α(2xStBu)[II]) beschrieben durchgeführt. Das Produkt wurde aus TFE mit Et₂O gefällt und lyophilisiert aus *tert*-BuOH:H₂O (4:1); Ausbeute: 215 mg (79 %). HPLC: $t_R = 9.5$ min (>85 %); ESI-MS: $m/z = 1023.4$ [M+2H]²⁺; $M_r = 2046.41$ berechnet für C₈₇H₁₃₂N₂₂O₂₇S₄. Für spektroskopische Messungen wurde ein Teil des Materials, wie unter Materialien und Methoden beschrieben mittels präparativer HPLC, aufgereinigt (HPLC: >98 %).

Ac-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂

α(2xStBu)[IV]

Die Entschützung und Abspaltung des Peptides von dem Festphasenträger (310 mg) wurde wie für Verbindung Ac-[Pro-Hyp-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ (α(2xStBu)[II]) beschrieben durchgeführt. Das Rohpeptid wurde aus der Abspaltungsmischung mit Et₂O gefällt, in *tert*-BuOH:H₂O (4:1) gelöst und lyophilisiert. Das feste Pulver wurde in MeOH gelöst und mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Fraktionen, welche homogenes Produkt beinhalteten, wurden vereinigt, aufkonzentriert und lyophilisiert; Ausbeute: 50 mg (14.5 %); HPLC: $t_R = 9.4$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 1291.6$ [M+2H]²⁺; $M_r = 2580.98$ berechnet für C₁₁₁H₁₆₆N₂₈O₃₅S₄.

Ac-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₅-Gly-Gly-Gly-NH₂
α(2xStBu)[V]

Peptid Synthese wurde auf Fmoc-Gly-MBHA-Harz (275 mg; 0.4 mmol/g), wie unter den generellen Methoden beschrieben, durchgeführt. Das Peptid wurde von dem Festphasenträger wie für Verbindung Ac-[Pro-Hyp-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ (α(2xStBu)[II]) beschrieben abgespalten, entschützt und isoliert. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mit präoperativer RP-HPLC aufgereinigt. Fraktionen die homogenes Produkt beinhaltenen, wurden vereinigt, konzentriert und aus *tert*-BuOH/H₂O (4:1) lyophilisiert; Ausbeute: 133 mg (60 %); HPLC: $t_R = 10.2$ min (61.3 %); ESI-MS: $m/z = 1003.6$ [M+2H]²⁺; $M_r = 2006.34$ berechnet. für C₈₄H₁₂₈N₂₂O₂₇S₄. Für spektroskopische Messungen wurde ein Teil des Materials mittels präoperativer HPLC weiter aufgereinigt (>95 %).

Ac-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂
α(4xStBu)[VI]

Das Titelpeptid wurde auf dem Fmoc-Gly-MBHA-Harz (275 mg; 0.4 mmol/g) wie unter den generellen Methoden beschrieben, aufgebaut; abgespalten/entschützt und isoliert wie Verbindung Ac-[Pro-Hyp-Gly]₃-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ (α(2xStBu)[II]); Ausbeute: 153 mg (56 %); HPLC: $t_R = 11.6$ min (36 %); ESI-MS: $m/z = 1243.6$ [M+2H]²⁺; $M_r = 2486.09$ berechnet. für C₁₀₃H₁₆₁N₂₅O₃₀S₈. Homogenes Material (HPLC >95 %) wurde mit präoperativer HPLC gewonnen.

Synthese des Homotrimers III

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ α[III]

Zu Peptid Ac-[Pro-Hyp-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ α(2xStBu)[III] (100 mg, 49 μmol) in TFE/H₂O (95:5, 100 mL) wurde

Tributylphosphin (0.98 mmol, 0.24 ml) gegeben und die Lösung für 5 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde im Vakuum aufkonzentriert und das Peptid mit kaltem Et₂O gefällt. Der Rückstand wurde aus *tert*-BuOH/H₂O (4:1) lyophilisiert; Ausbeute: 81.5 mg (89 %); HPLC: $t_R = 7.3$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 936.6$ [M+2H]²⁺; $M_r = 1870.06$ berechnet für C₇₉H₁₁₆N₂₂O₂₇S₂.

Homotrimers III

Eine Argon gesättigte Lösung von Peptid Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ α[III] (15 mg, 8.02 μmol) in 25 mM NH₄Ac, pH 7-9 (15 mL) wurde für 5-7 h auf 7 °C vorgekühlt. Danach wurde es für 5-7 d bei 7 °C unter Luftsauerstoff gerührt. Das Fortschreiten des oxidativen Prozesses wurde mittels ESI-MS und Grasseti test beobachtet.¹⁵³ Nach Abschluß der Reaktion, wurde die Lösung lyophilisiert und das Produkt mittels Gelchromatographie aufgereinigt (Säule B, Eluent: 1% HOAc); Ausbeute: 3.4 mg (22.7 %); HPLC: $t_R = 7.2$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 1869.4$ [M+3H]³⁺, 1402.2 [M+4H]⁴⁺, 1122.0 [M+5H]⁵⁺ $M_r = 5604.18$ berechnet für C₂₃₇H₃₄₂N₆₆O₈₁S₆.

Synthesis von the Homotrimer IV

Ac-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ α[IV]

Verbindung Ac-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂ α(2xStBu)[IV] (30 mg, 11.6 μmol) wurde in TFE/H₂O (95:5, 30 mL) mit Tributylphosphin (233 μmol, 57 μL) bei RT für 5 h reduziert und das Produkt wurde wie für Verbindung Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ beschrieben isoliert; Ausbeute: 24.3 mg (87 %); HPLC: $t_R = 7.2$ min (>87 %); ESI-MS: $m/z = 1203.2$ [M+2H]²⁺, 802.4 [M+3H]³⁺ $M_r = 2404.64$ berechnet für C₁₀₃H₁₅₀N₂₈O₃₅S₂.

Homotrimer IV

Eine Argon gesättigte Lösung von Ac-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ (24 mg, 10 μmol) in 25 mM NH₄Ac, pH 7-9 (24 mL) wurde für 7 h bei 7 °C vorgekühlt und anschließend unter Luftsauerstoff für 7 d bei 7 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde wie für trimer II-b beschrieben aufgearbeitet und das Rohprodukt mit Größenausschlusschromatographie aufgereinigt (Säule B, Eluent: 1% HOAc); Ausbeute: 8.7 mg (36 %); HPLC: t_R = 6.95 min (>95 %); ESI-MS: m/z = 1803.2 [M+4H]⁴⁺, 1442.6 [M+5H]⁵⁺, M_r = 7207.92 berechnet für C₃₀₉H₄₄₄N₈₄O₁₀₅S₆.

Synthesis von the Homotrimer V

Ac-Cys-Cys-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Gly-Gly-Gly-NH₂ α[V]

Verbindung Ac-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Gly-Gly-Gly-NH₂ α(2xStBu)[V] (25 mg, 12.5 μmol) wurde in TFE/H₂O (95:5, 25 mL) mit Tributylphosphin (250 μmol, 61 μL) bei RT für 5 h gerührt und das Produkt wurde wie für Ac-(Pro-Hyp-Gly)₅-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-NH₂ beschrieben isoliert; Ausbeute: 21 mg (91 %); HPLC: t_R = 6.35 min (>85 %); ESI-MS: m/z = 916.2 [M+2H]²⁺; M_r = 1830.00 berechnet für C₇₆H₁₁₂N₂₂O₂₇S₂.

Homotrimer V

Die Titelverbindung wurde durch Luftoxidation wie Peptid Ac-Cys-Cys-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Gly-Gly-Gly-NH₂ (21 mg, 11.4 μmol) in 25 mM NH₄Ac, pH 7-9 (21 mL) Puffer nach Equilibration über Nacht und 7d Luftoxidation gewonnen. Das Produkt wurde durch Gelchromatographie (Säule B; Eluent 1% HOAc) isoliert; Ausbeute: 273 μg (1.3 %); HPLC: t_R = 6.26 min (>98 %); ESI-MS: m/z = 1372.2 [M+2H]⁴⁺; M_r = 5484.00 berechnet für C₂₂₈H₃₃₀N₆₆O₈₁S₆.

Synthese von monomeren Peptidsäuren mit (Pro-Hyp-Gly)-Sequenzen $\alpha(2xStBu)$ [VII-IX]

Die Festphasensynthese wurde, wie unter den generellen Synthesevorschriften beschrieben, an Wang-Harz (500 mg, 1.3 mmol/g) durchgeführt. Zunächst wurde es nach der unten beschriebenen Methode mit 0.13 mmol/g Fmoc-Gly-OH belegt. Der Aufbau der entsprechenden Peptide $\alpha(2xStBu)$ [VII-IX] erfolgte wie in dem Abschnitt *Synthese von monomeren Peptidamiden mit Pro-Hyp-Gly-Sequenzen* beschrieben. Bei der Synthese der Ketten $\alpha(2xStBu)$ [VII/VIII] wurde nach dem 5. und 7. Fmoc-Abspaltungsschritt wurde das Harz mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und Et₂O (3×1 min) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden entsprechende Aliquote des Harzes entnommen und das entsprechende festphasengebundene Peptid wie in den folgenden Abschnitten beschrieben weiterverarbeitet.

Belegung des Wang-Harzes mit 0.13 mmol/g Fmoc-Gly-OH

Zu 6.875 ml eisgekühlter Lösung von 118.8 mg Fmoc-Gly-OH (0.4 mmol) in CH₂Cl₂:DMF (1:10) wurden 41.2 mg DCC (0.2 mmol) in 375 μ l DMF gegeben und für 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wird einrotiert und in 3 ml DMF aufgenommen. Der unlösliche Harnstoff wird abfiltriert und die Lösung nach Zugabe von 10 mg DMAP zu 500 mg in DMF vorgequollenem Wang-Harz gegeben. Nach 5h wird das Harz abfiltriert und mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und Et₂O (3×1 min) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Nach der beschriebenen Beladungsmessung (*Synthese der Homotrimere II-VI-Generelle Methoden*) wurde der Vorgang bei unzureichender Beladung wiederholt. Anschließend wurde mit 614 μ l Ac₂O (0.65 mmol, 10 eq), 2.221 ml DIPEA (13 mmol, 20 eq) und 10 mg DMAP in 3 ml DMF gelöst und zum Harz gegeben. Nach 2 h wird das Harz abfiltriert und

mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und Et₂O (3×1 min) gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

H-[Pro-Hyp-Gly]_n-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-OH (n=5: α(2xStBu)[VII];
n=7: α(2xStBu)[VIII])

Um die Titelverbindung α(2xStBu)[VII] in freier Form zu gewinnen wurde 100 mg H-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Harz (100 mg) mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O (96:2:2; 1×15 min, 2×40 min, 1×60 min) behandelt, das Harz abfiltriert und abschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden aufkonzentriert und das Rohprodukt aus TFE mit Et₂O gefällt, mit Zentrifugation abgetrennt und aus *tert*-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert; Ausbeute: 20 mg (83 %) HPLC: t_R = 9.7 min (>20 %); ESI-MS: m/z = 946.6 [M+2H]²⁺; M_r = 1891.25 berechnet für C₈₁H₁₂₃N₁₉O₂₅S₄. Für spektroskopische Messungen wurde ein Teil des gewonnenen Materialien mittels präoperativer HPLC wie unter Materialien und Methoden beschrieben aufgereinigt (HPLC: >98 %).

Das restliche Harzaliquote wurde bis zur entsprechenden festphasenimmobilisierten α(2xStBu)[VIII] Verbindung (H-[Pro-Hyp(tBu)-Gly]₇-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Harz) aufgebaut. Um das freie Peptid zu erhalten wurde wie oben beschrieben vorgegangen; Ausbeute: 100 mg (79 %) HPLC: t_R = 9.3 min (>60 %); ESI-MS: m/z = 1213.8 [M+2H]²⁺; M_r = 2425.83 berechnet für C₁₀₅H₁₅₇N₂₅O₃₃S₄. Für spektroskopische Messungen und weitere Umsetzungen wurde ein Teil des gewonnenen Materialien mittels präoperativer HPLC wie unter Materialien und Methoden beschrieben aufgereinigt (HPLC: >98 %).

Synthese des Homotrimers IX

H-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-OH $\alpha(2xStBu)$ [IX]

Die Titelverbindung wurde wie in *Synthese von monomeren Peptidsäuren mit Pro-Hyp-Gly – Sequenzen $\alpha(2xStBu)$ [VII-IX]* beschrieben an 500 mg Wang Harz (Belegung: 0.24 mmol/g) aufgebaut. Um das freie Peptid zu erhalten wurde wie oben beschrieben vorgegangen; Ausbeute: 392 mg (63 %) HPLC: $t_R = 9.3$ min (>90 %); ESI-MS: $m/z = 1299.2$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r = 2596.98$ berechnet für $C_{111}H_{166}N_{28}O_{36}S_4$.

H-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-OH α [IX]

Zu Peptid H-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-OH $\alpha(2xStBu)$ [IX] (100 mg, 39 μ mol) in TFE/H₂O (95:5, 20 mL) wurde Tributylphosphin (780 μ mol, 192 μ l) gegeben und die Lösung für 5 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde im Vakuum aufkonzentriert und das Peptid mit kaltem Et₂O gefällt. Der Rückstand wurde aus *tert*-BuOH/H₂O (4:1) lyophilisiert; Ausbeute: 76 mg (80 %); HPLC: $t_R = 7.2$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 1210.4$ $[M+2H]^{2+}$; $M_r = 2420.64$ berechnet für $C_{103}H_{150}N_{28}O_{36}S_2$.

Homotrimers IX

Eine Argon gesättigte Lösung von Peptid H-Gly-[Pro-Hyp-Gly]₇-Pro-Cys-Cys-Gly-Gly-Gly-OH α [IX] (76 mg, 31 μ mol) in 25 mM NH₄Ac, pH 7-9 (15 mL) wurde für 5-7 h auf 7 °C vorgekühlt. Danach wurde es für 5-7 d bei 7 °C unter Luftsauerstoff gerührt. Das Fortschreiten des oxidativen Prozesses wurde mittels ESI-MS und Grassetti test beobachtet.¹⁵³ Nach Abschluß der Reaktion, wurde die Lösung lyophilisiert und das Produkt mittels Gelchromatographie aufgereinigt (Säule B, Eluent: 1% HOAc); Ausbeute: 18 mg (8 %); HPLC:

$t_R = 7.1$ min (>99 %); ESI-MS: $m/z = 1816.0$ $[M+4H]^{4+}$, 1452.0 $[M+5H]^{5+}$
 $M_r = 7255.92$ berechnet für $C_{309}H_{444}N_{84}O_{108}S_6$.

Synthese der Bausteine für die Einzelketten mit Fluorprolinen in Xaa-Position

Synthese von Fmoc-(4S)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH

Darstellung von Z-(4S)-FPro-OH

Zu einer Eisgekühlten Suspension von 4.7 g Z-(4R)-Hyp-OH (17.8 mmol) in CH_2Cl_2 wurde 4 Äquivalente DAST (71.2 mmol; 9.3 ml) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 h wurde die Lösung auf Eis geschüttet. Nach Entfernen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum wurde der tiefrote Rückstand zwischen EtOAc und einer $NaHCO_3$ (5%) verteilt, die organische Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert und mit 1N HCl angesäuert. Die wässrige Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 3.4 g (12.67 mmol, 71.2 %); HPLC: $t_R = 9.5$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 268.2$ $[M+H]^+$; $M_r = 267.26$ berechnet für $C_{13}H_{14}NO_4F$.

Darstellung von Z-(4S)-FPro-OSu

Zu einer Lösung von 3.4 g Z-(4S)-FPro-OH (12.67 mmol) in 45 ml EtOAc/Dioxan (1:2) wurden 1.5 eq HOSu (19 mmol, 2.19 g) gegeben. Bei 0°C wurden 1.5 eq DCC (19 mmol, 3.92 g) in 6.3 ml EtOAc hinzugefügt. Nach 14 h Rühren bei RT wurde der Niederschlag abfiltriert und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit wässrigen 5% $KHSO_4$, 5% $NaHCO_3$ und gesättigter NaCl -Lösungen extrahiert mit $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 4.6 g (12.67 mmol; 100 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 11.0$ min (>96.7 %); ESI-MS: $m/z = 365.0$ $[M+H]^+$; $M_r = 364.33$ berechnet für $C_{17}H_{17}N_2O_6F$.

Darstellung von Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-OH

2.49 g H-(4R)-Hyp-OH (1.5 eq, 19 mmol) wurde in 8.5 ml 40 % iger methanolischer Triton B-Lösung vorgelöst. Das Gemisch wurde einrotiert, in 50 ml DMF aufgenommen und mit 4.6 g Z-(4S)-FPro-OSu (12.67 mmol) über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc/NaHCO₃ (5% in Wasser) aufgenommen und die wässrige Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert. Nach Einstellen des pHs mit 1N HCl auf ca. 1.5 wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die Lösungen vereinigt, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 1.8 g (4.73 mmol, 37 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 7.5$ min (>85 %); ESI-MS: $m/z = 381.0$ [M+H]⁺; $M_r = 380.38$ berechnet für C₁₈H₂₁N₂O₆F.

Darstellung von Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl

1.8 g Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-OH (4.73 mmol) wurde mit 1.2 eq H-Gly-OBzl* HO-Tos (1.92 g, 5.58 mmol), 1.1 eq EDCI*HCl (5.2 mmol, 1 g), 1 eq HOBt (4.73 mmol; 639 mg) und 2.4 eq DIPEA (9.46 mmol, 1.9 ml) über Nacht bei RT in 50 ml DMF gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit wässrigen 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ und gesättigter NaCl -Lösungen extrahiert mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 1.3 g (2.48 mmol, 52 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 10.9$ min (>90 %); ESI-MS: $m/z = 528.2$ [M+H]⁺; $M_r = 527.55$ berechnet für C₂₇H₃₀N₃O₇F.

tert.-Butylierung von Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl

1.3 g Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl wurde in 25 ml CH₂Cl₂ gelöst, 25 ml Isobuten einkondensiert (-72 °C) und H₂SO₄ (48 µl) als Katalysator zugegeben. Nach Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde es nach 7-10 Tage bei RT unter Kühlung (-72 °C) geöffnet und auf 100 ml 5 % NaHCO₃ Lösung gegeben

und unter starkem mehrstündigem Rühren Isobutenreste und der Katalysator entfernt. Abschließend wurde die organische Phase mehrmals mit weiterem 5% NaHCO₃ extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit Wasser extrahiert, getrocknet mit MgSO₄ und im Vakuum vom Lösungsmittel abgetrennt. Ausbeute: 1.45 g (2.48 mmol, >99 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 13.3$ min (>90 %); ESI-MS: $m/z = 584.2$ [M+H]⁺; $M_r = 583.67$ berechnet für C₃₁H₃₈N₃O₇F.

Darstellung von H-(4S)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH * HO-Tos

1.45 g Z-(4S)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl wurde in ein N₂ gesättigte 120 ml MeOH:H₂O (9:1) Mischung gelöst und 488.9 mg *p*-Toluolsulfonsäure*H₂O (1 eq, 2.48 mmol) zugegeben. 140 mg Katalysator (Pd/C) wurde in wenig H₂O suspendiert zugefügt und nach Sauerstoffausschluß H₂ eingeleitet. Nach 14 h wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt; Ausbeute: 1.2 g (2.18 mmol, 88 %) farbloser Feststoff; HPLC: Einspritzpeak; ESI-MS: $m/z = 360.2$ [M+H]⁺; $M_r = 359.40$ berechnet für C₁₆H₂₆N₃O₅F.

Darstellung von Fmoc-(4S)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH

1.2 g H-(4S)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH * HO-Tos (2.18 mmol) wurde in 60 ml Lösungsmittelgemisch aus H₂O:Dioxan (2:1) gelöst und 2.5 eq NaHCO₃ (5.45 mmol; 457.9 mg) zugegeben. 1.2 eq Fmoc-OSu (2.62 mmol; 883.1 mg) wurde vorgelöst in 20 ml Dioxan zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Nach Neutralisation der Lösung mit 1 N HCl wurde das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt. Der Rückstand in 5 % NaHCO₃ aufgenommen und überschüssiges Fmoc-OSu mit EtOAc extrahiert. Mit einer 5 % KHSO₄ Lösung wurde der pH auf ca. 2 erniedrigt und das Produkt mittels EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in TFE:MeOH aufgenommen und 0.5 g Kieselgel zugegeben. Nach Entfernen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum wurde das mit dem Produkt beladene Kieselgel auf eine gepackte Kieselgelsäule gegeben (5×17 cm) und zunächst mit CH₂Cl₂:MeOH:HOAc (95:5:0.1) gespült. Anschließend wurde das Produkt mit CH₂Cl₂:MeOH:HOAc (85:15:0.1) eluiert. Das aufgereinigte Produkt wurde in EtOAc aufgenommen und mit H₂O gelöstes Kieselgel extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 600 mg (1.03 mmol, 47.3 %) weißes Pulver; HPLC: $t_R = 12.2$ min (>98 %); $R_f = 0.3$ (AcOH/MeOH/CH₂Cl₂, 0.5:5:94.5); ESI-MS: $m/z = 582.2$ [M+H]⁺; $M_r = 581.65$ berechnet für C₃₁H₃₆N₃O₇F.

¹H-NMR (d₄-MeOH): Fmoc: 7.83-7.30; (4S)-FPro: γ_t : 5.21; α_t : 4.45; γ_c : 5.23; α_c : 4.65; δ : 3.74; β : 2.57, 2.44; Hyp: α , γ : 4.49; δ : 3.71, 3.18; β : 2.23, 2.09; Hyp^o: α , γ : 4.59; δ : 3.79, 3.48; β : 2.18, 2.06; Gly: α_1 , α_2 : 4.45, 4.38; tBu: 1.22, 1.20, 1.16.

Synthese von Fmoc-(4S)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH

Darstellung von Z-(4R)-Hyp-OBzl

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 100 mmol Z-(4S)-Hyp-OH (26.4 g) in 120 ml THF wurden 100 mmol TEA (14 ml) und 100 mmol Benzylbromid (12 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Nach Extraktion mit H₂O, 5% KHSO₄ – Lsg., 5% NaHCO₃ – Lsg., und einer gesättigten NaCl – Lsg. wurde im Vakuum das organische Lösungsmittel entfernt; Ausbeute: 23 g (64.7 mmol, 69 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 12.21$ min (>98 %); ESI-MS: $m/z = 356.0$ [M+H]⁺; $M_r = 355.39$ berechnet für C₂₀H₂₁NO₅.

Darstellung von Z-(4R)-Hyp(Tos)-OBzl

64.7 mmol Z-(4R)-Hyp-OBzl (23 g) und 71.2 mmol Tosylchlorid (1.1 eq, 13.57 g) wurden in 120 ml Pyridin (0 °C) zusammengegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Eis/EtOAc aufgenommen und die organische Phase separiert. Die organische Phase mit H₂O und 5% NaHCO₃ gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Abschließend wurde das organische Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet; Ausbeute: 27.5 g (54 mmol, 84.4 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 12.10$ min (>99 %); ESI-MS: $m/z = 510.4$ [M+H]⁺; $M_r = 509.6$ berechnet für C₂₇H₂₇NO₇S.

Darstellung von Z-(4S)-Hyp-OH

27.5 g Z-(4R)-Hyp(Tos)-OBzl (54 mmol) wurden in 162 ml Dioxan und 162 ml 1N NaOH (3 eq) gelöst und 4 h auf 80 °C erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc/5 % NaHCO₃ aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mehrmals mit EtOAc extrahiert und mit 1 N HCl auf pH 2.5 eingestellt. Das Produkt wurde mit EtOAc extrahiert, die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft; Ausbeute: 14.1 g (53.2 mmol, 98.4 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 7.49$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 266.2$ [M+H]⁺; $M_r = 265.27$ berechnet für C₁₃H₁₅NO₅.

Darstellung von Z-(4S)-Hyp-OBzl

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 19 mmol Z-(4S)-Hyp-OH (5 g) in 25 ml THF wurden 19 mmol TEA (2.66 ml) und 19 mmol Benzylbromid (2.28 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Nach Extraktion mit H₂O, 5 % KHSO₄ – Lsg., 5 % NaHCO₃ – Lsg., und einer gesättigten NaCl – Lsg. wurde im Vakuum das organische

Lösungsmittel entfernt; Ausbeute: 5.48 g (15.4 mmol, 81.4 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 11.60$ min (>99 %); ESI-MS: $m/z = 356.0$ $[M+H]^+$; $M_r = 355.39$ berechnet für $C_{20}H_{21}NO_5$.

Darstellung von Z-(4R)-FPro-OH

Zu einer eisgekühlten Lösung von 5.48 g Z(4R)-Hyp-OBzl (15.4 mmol) in 50 ml CH_2Cl_2 wurde 2 Äquivalente DAST (30.8 mmol; 4.1 ml) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 h wurde die Lösung auf Eis geschüttet und 10 eq NaOH 1N (30.8 mmol; 30.8 mmol) sowie 100 ml Dioxan zugegeben und weitere 5 h gerührt. Nach Neutralisation mit 1 N HCl und Entfernen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum wurde der tiefrote Rückstand zwischen EtOAc und einer $NaHCO_3$ (5%) verteilt, die organische Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert und mit 1N HCl angesäuert. Die wässrige Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 4.1 g (14.8 mmol, 96 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 8.68$ min (>95 %); ESI-MS: $m/z = 268.2$ $[M+H]^+$; $M_r = 267.26$ berechnet für $C_{13}H_{14}NO_4F$.

Darstellung von Z-(4R)-FPro-OSu

Zu einer Lösung von 4.1 g Z-(4R)-FPro-OH (14.8 mmol) in 70 ml EtOAc/Dioxan (1:2) wurden 1.5 eq HOSu (22.2 mmol; 2.66 g) gegeben. Bei 0°C wurden 1.5 eq DCC (22.2 mmol, 4.77 g) in 23.3 ml EtOAc hinzugefügt. Nach 14 h Rühren bei RT wurde der Niederschlag abfiltriert und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit wässrigen 5% $KHSO_4$, 5% $NaHCO_3$ und gesättigter NaCl -Lösungen extrahiert mit $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Zur Entfernung des übergebliebenen Harnstoffes wurde der Rückstand mit erwärmten Diisopropylether digeriert; Ausbeute: 5.2 g (14.28 mmol; 92.7 %) farbloses Öl;

HPLC: $t_R = 11.18$ min (>85 %); ESI-MS: $m/z = 365.0$ $[M+H]^+$; $M_r = 364.33$ berechnet für $C_{17}H_{17}N_2O_6F$.

Darstellung von Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-OH

2.8 g H-(4R)-Hyp-OH (1.5 eq, 21.4 mmol) wurde in 8.5 ml 40 % iger methanolischer Triton B-Lösung vorgelöst. Das Gemisch wurde einrotiert und in 50 ml DMF aufgenommen und mit 5.2 g Z-(4R)-FPro-OSu (14.28 mmol) über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc/NaHCO₃ (5% in Wasser) aufgenommen und die wässrige Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert. Nach Ansäuern auf pH 1.5 mit 1N HCl wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die Lösungen vereinigt mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 3.7 g (9.74 mmol, 68 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 8.48$ min (>76.5 %); ESI-MS: $m/z = 381.0$ $[M+H]^+$; $M_r = 380.38$ berechnet für $C_{18}H_{21}N_2O_6F$.

Darstellung von Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl

3.7 g Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-OH (9.74 mmol) wurde mit 1.2 eq H-Gly-OBzl * HO-Ts (11.69 mmol; 3.94 g), 1.1 eq EDCI*HCl (10.71 mmol; 2.1 g), 1 eq HOBt (9.74 mmol; 1.315 mg) und 2.4 eq DIPEA (19.48 mmol, 4 ml) über Nacht bei RT in 100 ml DMF gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit und mit wässrigen 5% KHSO₄, NaHCO₃ und gesättigter NaCl -Lösungen extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt; Ausbeute: 3.5 g (6.64 mmol, 68 %) farbloses Öl; HPLC: $t_R = 11.05$ min (>90 %); ESI-MS: $m/z = 528.4$ $[M+H]^+$; $M_r = 527.55$ berechnet für $C_{27}H_{30}N_3O_7F$.

tert.-Butylierung von Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl

3.5 g Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl wurden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst, 50 ml Isobuten einkondensiert (-72 °C) und H₂SO₄ (100 µl) als Katalysator zugegeben. Nach Verschließen des Reaktionsgefäßes wurde es nach 7-10 Tage bei RT, unter Kühlung (-72 °C) geöffnet, auf 200 ml 5 % NaHCO₃ Lösung gegeben und unter starkem mehrstündigem Rühren Isobutenreste entfernt. Abschließend wurde die organische Phase mehrmals mit weiterem 5 % NaHCO₃ extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit Wasser extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel abgetrennt Ausbeute: 3.3 g (5.65 mmol, 85 %) farbloses Öl; HPLC: t_R = 13.35 min (>70 %); ESI-MS: m/z = 584.4 [M+H]⁺; M_r = 583.67 berechnet für C₃₁H₃₈N₃O₇F.

Darstellung von H-(4R)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH * HO-Tos

3.3 g Z-(4R)-FPro-(4R)-Hyp-Gly-OBzl wurden in eine N₂ gesättigte 250 ml MeOH:H₂O (9:1) Mischung gelöst und 1.07 g p-Toluolsulfonsäure*H₂O (1 eq, 5.65 mmol) zugegeben. 280 mg Katalysator (Pd/C) wurde in wenig H₂O suspendiert zugefügt und nach Sauerstoffausschluß H₂ eingeleitet. Nach 14 h wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt; Ausbeute: 2.6 g (4.73 mmol, 83.7 %) farbloser Feststoff; HPLC: Einspritzpeak; ESI-MS: m/z = 360.2 [M+H]⁺⁺; M_r = 359.40 berechnet für C₁₆H₂₆N₃O₅F.

Darstellung von Fmoc-(4R)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH

2.6 g H-(4R)-FPro-(4R)-Hyp(tBu)-Gly-OH * HO-Ts (4.73 mmol) wurde in 140 ml Lösungsmittelgemisch aus H₂O:Dioxan (2:1) gelöst und 2.5 eq NaHCO₃ (11.83 mmol; 992.7 mg) zugegeben. 1.2 eq Fmoc-OSu (5.68 mmol; 1.91 mg) wurde vorgelöst in 70 ml Dioxan zugetropft und über Nacht bei RT

gerührt. Nach Neutralisation der Lösung mit 1 N HCl wurde das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt. Der Rückstand in 5 % NaHCO₃ aufgenommen und überschüssiges Fmoc-OSu mit EtOAc extrahiert. Mit einer 5 % KHSO₄ Lösung wurde der pH auf ca. 2 erniedrigt und das Produkt mittels EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in TFE:MeOH aufgenommen und 0.5 g Kieselgel zugegeben. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das mit dem Produkt beladene Kieselgel auf eine gepackte Kieselgelsäule gegeben (5×17 cm) und zunächst mit CH₂Cl₂:MeOH:HOAc (95:5:0.1) gespült. Anschließend wurde das Produkt mit CH₂Cl₂:MeOH:HOAc (85:15:0.1) eluiert. Das aufgereinigte Produkt wurde in EtOAc aufgenommen und mit H₂O gelöstes Kieselgel extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 931 mg (1.6 mmol, 34 %) weißes Pulver; HPLC: t_R = 12.8 min (>90 %); DC : R_f = 0.3 (AcOH/MeOH/CH₂Cl₂, 0.5:5:94.5); ESI-MS: m/z = 582.2 [M+H]⁺; M_r = 581.65 berechnet für C₃₁H₃₆N₃O₇F.

¹H-NMR (d₄-MeOH): Fmoc: 7.83-7.30; (4R)-FPro: γ: 5.27; α: 4.67; δ: 3.63; β: 2.68, 2.18; Hyp: γ: 4.52; α: 4.60; δ: 3.84, 3.60; β: 2.12, 2.22; Hyp` : γ: 4.45; α: 4.45; δ: 3.75, 3.35; β: 2.18, 2.06; Gly: α₁, α₂: 4.40, 4.49; tBu: 1.22, 1.06.

Synthese von den monomeren Peptidamiden mit (4S/4R)-FPro-Hyp-Gly-Sequenzen a(2StBu)[X/XI]

Die Festphasensynthese wurde, wie unter den generellen Synthesevorschriften beschrieben, an Fmoc-Gly-Rink-MBHA-Harz (0.4 mmol/g) durchgeführt. Die Kupplung auf die Fluorprolinreste erfolgte, wie auch die Aufarbeitung der gewonnen festphasengebundenen Peptide wie in den speziellen Teilen unten beschrieben.

Ac-[(4S)-FPro-Hyp-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂
α(2xStBu)[X]

Als Festphase kam 106 mg des oben genannten Harzes zum Einsatz (42.3 mmol). Die Kupplungen auf die (4S)-Fluorprolinreste mit erfolgte mit 1.8/0.8/0.8 Equiv Fmoc-(4S)-FPro-Hyp(tBu)-Gly-OH/TFFH/DIPEA (1:1:2) in DMF (bei den ersten drei Kupplungsschritten) und NMP/CH₂Cl₂ (in den weiteren Schritten) 3 h gefolgt von Waschschritten mit DMF (3×1 min), Acetylierung mit (Boc)₂O (10 equiv) in DMF (20 min) und abschließenden Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min). Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde mit dem Kaisertest,¹⁷⁵ ausgenommen der Schritte mit N-terminalen Iminosäuren bei denen der Chloraniltest¹⁷⁶ hinzugezogen wurde, verfolgt. Fmoc- Abspaltung von Fmoc-Pro-Peptid-Harzen wurde mit 2 % Piperidine und 2 % DBU in DMF (0 °C, 1×60 sec, 1×30 sec) durchgeführt. Waschschriffe mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1min) entfernten überschüssige Reagenzien und das entstehende Fulven. N-terminale Acetylierung der Peptid erfolgte an fester Phase mit 4 equiv Ac₂O/DIPEA (1:2) in DMF (2×30 min) gefolgt von Waschschritten mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min). Um das Peptid in reiner Form zu gewinnen wurde Ac-[(4S)-FPro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-Harz (462 mg) mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O (96:2:2; 1×15 min, 2×40 min, 1×60 min) behandelt, das Harz abfiltriert und abschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden aufkonzentriert und das Rohprodukt aus TFE mit Et₂O gefällt, mit Zentrifugation abgetrennt und aus *tert*-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert; Ausbeute: 75 mg (83 %) HPLC: t_R = 9.24 min (>48); ESI-MS: m/z = 1069.2 [M+2H]²⁺ M_r = 2136.36 berechnet für C₈₇H₁₂₇N₂₂O₂₇S₄F₅. Für spektroskopische Messungen wurde ein Teil des gewonnenen Materialien mittels präparativer

HPLC wie unter Materialien und Methoden beschrieben aufgereinigt (HPLC: >98 %).

Ac-[(4R)-FPro-Hyp-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH₂

α(2xStBu)[XI]

Als Festphase kam 105 mg des oben genannten Harzes zum Einsatz (42 mmol). Die Kupplungen auf die (4R)-Fluorprolinreste mit erfolgte mit 2/1/1/1 Equiv Fmoc-(4R)-FPro-Hyp(tBu)-Gly-OH/TFFH/DIPEA (1:1:2) in DMF (bei den ersten drei Kupplungsschritten) und NMP/CH₂Cl₂ (in den weiteren Schritten) 12h/24h/24h/24h gefolgt von Waschschrinen mit DMF (3×1 min), Acetylierung mit (Boc)₂O (10 equiv) in DMF (20 min) und abschließenden Waschschrinen mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min). Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde mit dem Kaisertest,¹⁷⁵ ausgenommen der Schritte mit N-terminalen Iminosäuren bei denen der Chloraniltest¹⁷⁵ hinzugezogen wurde, verfolgt. Teilweise wurden Harzproben aus der Reaktionsmischung entnommen und die Reaktionszeiten dementsprechend bis zur nahezuen Vollständigkeit verlängert. Fmoc-Abspaltung von Fmoc-Pro-Peptid-Harzen wurde mit 2 % Piperidine und 2 % DBU in DMF (0 °C, 1×60 sec, 1×30 sec) durchgeführt. Waschschrine mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1min) entfernten überschüssige Reagenzien und das entstehende Fulven. N-terminale Acetylierung der Peptid erfolgte an fester Phase mit 4 equiv Ac₂O/DIPEA (1:2) in DMF (2×30 min) gefolgt von Waschschrinen mit DMF (3×1 min), MeOH (3×1 min), CH₂Cl₂ (3×1 min) und MeOH (3×1 min). Um das Peptid in reiner Form zu gewinnen wurde Ac-[(4R)-FPro-Hyp(tBu)-Gly]₅-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-Harz (462 mg) mit TFA/(Et)₃SiH/H₂O (96:2:2; 1×15 min, 2×40 min, 1×60 min) behandelt, das Harz abfiltriert und abschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden

aufkonzentriert und das Rohprodukt aus TFE mit Et₂O gefällt, mit Zentrifugation abgetrennt und aus *tert*-BuOH:H₂O (5:1) lyophilisiert; Ausbeute: 54 mg (60.2 %) HPLC: t_R = 9.842 min (>90); ESI-MS: $m/z = 1068.8$ [M+2H]²⁺ M_r = 2136.36 berechnet für C₈₇H₁₂₇N₂₂O₂₇S₄F₅.

6. Literatur

1. Dolz, R.; Engel, J.; Kuhn, K. Folding of collagen IV. *Eur. J. Biochem.* **178**, 357-366 (1988).
2. Timpl, R.; Oberbaumer, I.; von der Mark, H.; Bode, W.; Wick, G.; Weber, S.; Engel, J. Structure and biology of the globular domain of basement membrane type IV collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **460**, 58-72 (1985).
3. Timpl, R.; Fujiwara, S.; Dziadek, M.; Aumailley, M.; Weber, S.; Engel, J. Laminin, proteoglycan, nidogen and collagen IV: structural models and molecular interactions. *Ciba. F. Symp.* **108**, 25-43 (1984).
4. Weber, S.; Engel, J.; Wiedemann, H.; Glanville, R.W.; Timpl, R. Subunit structure and assembly of the globular domain of basement-membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* **139**, 401-410 (1984).
5. Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk D.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Darnell, J. Vielseitige Organismen: Wechselwirkungen zwischen den Zellen sowie zwischen Zellen und Matrix. *Molekulare Zellbiologie* 1151-1229 (1996).
6. Woessner, J.F. Matrix Metallaproteinases and their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *FASEB J.* **5**, 2145-2154 (1991).
7. Mielewczyk, S.S.; Breslauer, K.J.; Anachi, R.B.; Brodsky, B. Binding studies of a triple-helical peptide model of macrophage scavenger receptor to tetraplex nucleic acids. *Biochemistry* **35**, 11396-11402 (1996).
8. Ramachandran, G.N. Treatise on Collagen. Ramachandran, G.N. (ed.), pp. 103-183 (Academic Press, New York, 1967).
9. von Hippel, P.H. Treatise on Collagen. Academic Press, New York (1967).
10. Ramachandran, G. N. Stereochemistry of collagen. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **31**, 1-16 (1988).
11. Engel, J.; Prockop, D.J. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* **20**, 137-152 (1991).
12. Engel, J. Collagen as a Food., pp. 145-161 (AVI Book, New York, 1987).
13. Bächinger, H. P.; Bruckner, P.; Timpl, R.; Engel, J. The role of cis-trans isomerization of peptide bonds in the coil triple helix conversion of collagen. *Eur. J. Biochem.* **90**, 605-613 (1978).

14. Bächinger, H. P.; Bruckner, P.; Timpl, R.; Prockop, D.J.; Engel, J. Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *Eur. J. Biochem.* **106**, 619-632 (1980).
15. Davis, J.M.; Boswell, B.A.; Bachinger, H.P. Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase on the folding of the triple helix. *J. Biol. Chem.* **264**, 8956-8962 (1989).
16. Tandon, M.; Wu, M.; Begley, T.P.; Myllyharju, J.; Pirskanen, A.; Kivirikko, K. Substrate specificity of human prolyl-4-hydroxylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1139-1144 (1998).
17. Gelman, R.A.; Blackwell, J.; Kefalides, N.A.; Tomichak, E. Thermal stability of basement membrane collagen. *Biochem. Biophys. Acta* **427**, 492-496 (1976).
18. Wenstrup, R.J.; Hunter, A.G.; Byers, P.H. Osteogenesis imperfecta type IV: Evidence of abnormal triple helical structure of type I collagen. *Hum. Genet.* **74**, 47-53 (1986).
19. Knauper, V.; LopezOtin, C.; Smith, B.; Knight, G.; Murphy, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* **271**, 1544-1550 (1996).
20. Aimes, R.T.; Quigley, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase - inhibitor - free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type-I collagen generating the specific 3/4-length and 1/4-length fragments. *J. Biol. Chem.* **270**, 5872-5876 (1995).
21. Hasty, K.A.; Jeffrey, J.J.; Hibbs, M.S.; Welgus, H.G. The collagen substrate-specificity of human neutrophil collagenase. *J. Biol. Chem.* **262**, 10048-10052 (1987).
22. Nagase, H.; Fields, G.B. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers* **40**, 399-416 (1996).
23. Ottl, J.; Gabriel, D.; Murphy, G.; Knauper, V.; Tominaga, Y.; Nagase, H.; Kroger, M.; Tschesche, H.; Bode, W.; Moroder, L. Recognition and catabolism of synthetic heterotrimeric collagen peptides by matrix metalloproteinases. *Chem. Biol.* **7**, 119-132 (2000).
24. Beier, G.; Engel, J. The renaturation of soluble collagen. Products formed at different temperatures. *Biochemistry* **5**, 2744-2755 (1966).
25. Rossi, A.; Zuccarello, L.V.; Zanaboni, G.; Monzani, E.; Dyne, K.M.; Cetta, G.; Tenni, R. Type I collagen CNBr peptides: Species and behavior in solution. *Biochemistry* **35**, 6048-6057 (1996).
26. Rossi, A.; Zanaboni, G.; Cetta, G.; Tenni, R. Stability of type I collagen CNBr peptide trimers. *J. Mol. Biol.* **269**, 488-493 (1997).

27. Highberger, J.H.; Corbett, C.; Gross, J. Isolation and characterization of a peptide containing the site of cleavage of the chick skin collagen- α -1[I] chain by animal collagenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 202-208 (1979).
28. Saygin, O.; Heidemann, E.; Klump, H. Triple helix-coil transition of cyanogen-bromide peptides of α -1-chain peptides of calf-skin collagen. *Biopolymers* **17**, 511-522 (1978).
29. Piez, K.A.; Shermann, M.R. Equilibrium and kinetic studies of helix-coil transition in α 1-CB2, a small peptide from collagen. *Biochemistry* **9**, 4134-4140 (1970).
30. Piez, K. A.; Shermann, M.R. Charakterization of Product Formed Renaturation of α 1-CB2, A Small Peptide From Collagen. *Biochemistry* **9**, 4129-4133 (1970).
31. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. 1. Synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154 (1963).
32. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. 3. Improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* **3**, 1385-1390 (1964).
33. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. 2. Synthesis of bradykinin. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 304-305 (1964).
34. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. 4. Synthesis of methionyl-lysyl-bradykinin. *J. Org. Chem.* **29**, 3100-3102 (1964).
35. Sakakibara, S.; Inouye, K.; Shudo, K.; Kishida, Y.; Kobayashi, Y.; Prockop, D.J. Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular weights. Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline. *Biochem. Biophys. Acta* **303**, 198-202 (1973).
36. Sakakibara, S.; Kishida, Y.; Okuyama, K.; Tanaka, N.; Ashida, T.; Kakudo, M. Single crystals of (Pro-Pro-Gly)₁₀, a synthetic polypeptide model of collagen. *J. Mol. Biol.* **65**, 371-373 (1972).
37. Okuyama, K.; Tanaka, N.; Ashida, T.; Kakudo, M.; Sakakibara, S. An x-ray study of the synthetic polypeptide (Pro-Pro-Gly)₁₀. *J. Mol. Biol.* **72**, 571-576 (1972).
38. Bhatnagar, R. S.; Rapaka, R.S. Polypeptide models of collagen-properties of (Pro-Pro-beta-Ala)_n. *Biopolymers* **14**, 597-603 (1975).
39. Fields, G.B.; Prockop, D.J. Perspectives on the synthesis and application of triple-helical, collagen-model peptides. *Biopolymers* **40**, 345-357 (1996).

40. Hongo, C.; Nagarajan, V.; Noguchi, K.; Kamitori, S.; Okuyama, K.; Tanaka, Y.; Nishino, N Average crystal structure of (Pro-Pro-Gly)₉ at 1.0 angstrom resolution. *Polym. J.* **33**, 812-818 (2001).
41. Ottl, J.; Battistuta, R.; Pieper, M.; Tschesche, H.; Bode, W.; Kuhn, K.; Moroder, L Design and synthesis of heterotrimeric collagen peptides with a built-in cystine-knot - models for collagen catabolism by matrix-metalloproteases. *FEBS Lett.* **398**, 31-36 (1996).
42. Ottl, J.; Moroder, L. A new strategy for regioselective interstrand disulfide bridging of multiple cysteine peptides. *Tetrahedron Lett.* **40**, 1487-1490 (1999).
43. Ottl, J.; Musiol, H.J.; Moroder, L. Heterotrimeric collagen peptides containing functional epitopes, synthesis of single-stranded collagen type I peptides related to the collagenase cleavage site. *J. Pept. Sci.* **5**, 103-110 (1999).
44. Ottl, J.; Moroder, L. Disulfide-bridged heterotrimeric collagen peptides containing the collagenase cleavage site of collagen type I. Synthesis and conformational properties. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 653-661 (1999).
45. Müller, J.C.; Ottl, J.; Moroder, L. Heterotrimeric collagen peptides as fluorogenic collagenase substrates: synthesis, conformational properties, and enzymatic digestion. *Biochemistry* **39**, 5111-5116 (2000).
46. Moroder, L., Fiori, S., Friedrich, R., Müller, J.C.D.; Ottl, J. ACS Sym. Ser. Khan, I.M. (ed.), pp. 103-116 (Clark Atlanta University, 2002).
47. Saccà, B.; Barth, D.; Musiol, H.J.; Moroder, L. Conformation-dependent side reactions in interstrand-disulfide bridging of trimeric collagenous peptides by regioselective cysteine chemistry. *J. Pept. Sci.* **8**, 205-210 (2002).
48. Fiori, S.; Saccà, B.; Moroder, L. Structural properties of a collagenous heterotrimer that mimics the collagenase cleavage site of collagen type I. *J. Mol. Biol.* **319**, 1235-1242 (2002).
49. Saccà, B.; Moroder, L. Synthesis of heterotrimeric collagen peptides containing the alpha 1 beta 1 integrin recognition site of collagen type IV. *J. Pept. Sci.* **8**, 192-204 (2002).
50. Saccà, B.; Sinner, E.K.; Kaiser, J.; Lubken, C.; Eble, J.A.; Moroder, L. Binding and docking of synthetic heterotrimeric collagen type IV peptides with alpha 1 beta 1 integrin. *Chem. Biochem.* **3**, 904-907 (2002).
51. Hulmes, D.J.S.; Wess, T.J.; Prockop, D.J.; Fratzl, P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils. *Biophys. J.* **68**, 1661-1670 (1995).

52. Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Crystal structure of the collagen triple helix model. *Protein Sci.* **11**, 262-270 (2002).
53. Gough, C.A.; Anderson, R.W.; Bhatnagar, R.S. The role of bound water in the stability of the triple-helical conformation of (Pro-Pro-Gly)(10). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **15**, 1029-1037 (1998).
54. Gough, C.A.; Bhatnagar, R.S. Differential stability of the triple helix of (Pro-Pro-Gly)(10) in H₂O and D₂O: Thermodynamic and structural explanations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, 481-491 (1999).
55. Kramer, R.Z.; Bella, J.; Brodsky, B.; Berman, H.M. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. *J. Mol. Biol.* **311**, 131-147 (2001).
56. Liu, X.; Siegel, D.L.; Fan, P.; Brodsky, B.; Baum, J. Direct NMR measurement of folding kinetics of a trimeric peptide. *Biochemistry* **35**, 4306-4313 (1996).
57. Liu, X.; Kim, S.; Dai, Q.H.; Brodsky, B.; Baum, J. Nuclear magnetic resonance shows asymmetric loss of triple helix in peptides modeling a collagen mutation in brittle bind disease. *Biochemistry* **37**, 15528-15533 (1998).
58. Mayo, K.H. NMR and Xray studies of collagen model peptides. *Biopolymers* **40**, 359-370 (1996).
59. Melacini, G.; Goodman, M. Improved method for the stereospecific ¹H-NMR assignment in collagen-like triple-helices. *Chirality* **10**, 28-34 (1998).
60. Melacini, G.; Bonvin, A.M.; Goodman, M.; Boelens, R.; Kaptein, R. Hydration dynamics of the collagen triple helix by NMR. *J. Mol. Biol.* **300**, 1041-1049 (2000).
61. Persikov, A.V.; Ramshaw, J.A.M.; Brodsky, B. Collagen model peptides: Sequence dependence of triple-helix stability. *Biopolymers* **55**, 436-450 (2000).
62. Ramachandran, G.N. Structure of the collagen group of proteins. *Acta Crystallogr.* **7**, 655-655 (1954).
63. Traub, W.; Yonath, A.; Segal, D.M. On molecular structure of collagen. *Nature* **221**, 914-917 (1969).
64. Segal, D.M.; Traub, W.; Yonath, A. Polymers of tripeptides as collagen models 8.X-ray studies of 4 polyhexapeptides. *J. Mol. Biol.* **43**, 519-527 (1969).
65. Fraser, R.D.B.; MacRae, T.P.; Suzuki, E. Chain conformation in the collagen molecule. *J. Mol. Biol.* **129**, 463-481 (1979).

66. Fraser, R.D.; MacRae, T.P. The crystalline structure of collagen fibrils in tendon. *J. Mol. Biol.* **127**, 129-133 (1979).
67. Rich, A.; Crick, F.H.C. The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* **3**, 483-506 (1961).
68. Okuyama, K.; Nagarajan, V.; Kamitori, S. 7/2-Helical model for collagen - Evidence from model peptides. *Proc. Ind. Ac. Sci.-Chem. Sci.* **111**, 19-34 (1999).
69. Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H.M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75-81 (1994).
70. Engel, J.; Prockop, D.J. Does bound water contribute to the stability of collagen? *Matrix Biol.* **17**, 679-680 (1998).
71. Brodsky, B.; Ramshaw, J.A.M. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* **15**, 545-554 (1997).
72. Carotenuto, L.; Castagnolo, D.; Piccolo, C.; Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Biomolecule crystallisation in microgravity. *Proc. I. Int. Sym. Micrograv. Res. Appl. Phy. Sci. Biotec.* **1**, 437-443 (2001).
73. Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers* **58**, 459-464 (2001).
74. Harrap, B.S. The effect of aliphatic alcohols on the thermal stability of tropocollagen under acidic conditions. *Int. J. Prot. Res.* **1**, 245-252 (1969).
75. Hart, G.J.; Russell, A.E.; Cooper, D.R. The effects of certain glycols, substituted glycols and related organic solvents on the thermal stability of soluble collagen. *Biochem. J.* **125**, 599-604 (1971).
76. Herbage, D.; Hanus, A.; Vallet, G. Thermal stability of acid-soluble collagen in water-organic solvent mixtures. *Biochem. Biophys. Acta* **168**, 544-554 (1968).
77. Miles, C. A.; Burjanadze, T.V. Thermal stability of collagen fibers in ethylene glycol. *Biophys. J.* **80**, 1480-1486 (2001).
78. Tanaka, Y.; Suzuki, K.; Tanaka, T. Synthesis and stabilization of amino an carboxy terminal constrained collagenous peptides. *J. Pept. Res.* **51**, 413-419 (1998).
79. Goodman, M.; Feng, Y.; Melacini, G.; Taulane, J.P. A template-induced incipient collagen-like triple-helical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5156-5157 (1996).

80. Kramer, R.Z.; Venugopal, M.G.; Bella, J.; Mayville, P.; Brodsky, B.; Berman, H.M. Staggered molecular packing in crystals of a collagen-like peptide with a single charged pair. *J. Mol. Biol.* **301**, 1191-1205 (2000).
81. Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Crystal structure of a collagen-like polypeptide with repeating sequence Pro-Hyp-Gly at 1.4 Å resolution: Implications for collagen hydration. *Biopolymers* **56**, 8-13 (2001).
82. Blaber, M.; Zhang, X.J.; Matthews, B.W. Structural basis of amino-acid alpha-helix propensity. *Science* **260**, 1637-1640 (1993).
83. Kim, C. W. A.; Berg, J.M. Thermodynamic beta-sheet propensities measured using zinc-finger host peptide. *Nature* **362**, 267-270 (1993).
84. O'Neil, K.T.; Degrado, W.F. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino-acids. *Science* **250**, 646-651 (1990).
85. Persikov, A.V.; Ramshaw, J.A.M. Amino acid propensities of the collagen triple-helix. *Biochemistry* **39**, 14960-14967 (2000).
86. Yang, W.; Chan, V.C.; Kirkpatrick, A.; Ramshaw, J.A.M.; Brodsky, B. Gly-Pro-Arg confers stability similar to Gly-Pro-Hyp in the collagen triple-helix of host-guest peptides. *Journal of Biol. Chem.* **272**, 28837-28840 (1997).
87. Shah, N.K.; Ramshaw, J.A.M.; Kirkpatrick, A.; Shah, C.; Brodsky, B. A host-guest set of triple-helical peptides - stability of Gly-X-Y triplets containing common nonpolar residues. *Biochemistry* **35**, 10262-10268 (1996).
88. Chan, V.C.; Ramshaw, J.A.M.; Kirkpatrick, A.; Beck, K.; Brodsky, B. Positional preferences of ionizable residues in Gly-X-Y triplets of the collagen triple-helix. *J. Biol. Chem.* **272**, 31441-31446 (1997).
89. Ramshaw, J.A.M.; Shah, N.K.; Brodsky, B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol.* **122**, 86-91 (1998).
90. Beck, K.; Brodsky, B. Supercoiled protein motifs - the collagen triple-helix and the α -helical coiled coil. *J. Struct. Biol.* **122**, 17-29 (1998).
91. Ackerman, M.S.; Bhate, M.; Shenoy, N.; Beck, K.; Ramshaw, J.A.M.; Brodsky, B. Sequence dependence of the folding of collagen-like peptides - Single amino acids affect the rate of triple-helix nucleation. *J. Biol. Chem.* **274**, 7668-7673 (1999).

92. Shah, N.K.; Brodsky, B.; Kirkpatrick, A.; Ramshaw, J.A.M. Structural consequences of D-amino acids in collagen triple-helical peptides. *Biopolymers* **49**, 297-302 (1999).
93. Consonni, R.; Santomo, L.; Tenni, R.; Longhi, R.; Zetta, L. Conformational study of a collagen peptide by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy-observation of the $^{14}\text{N-}^1\text{H}$ spin-spin coupling of the arg guanidinium moiety in the triple-helix. *FEBS Letters* **436**, 243-246 (1998).
94. Persikov, A.V.; Ramshaw, J.A.M.; Kirkpatrick, A.; Brodsky, B. Amino acid propensities for the collagen triple-helix. *Biochemistry* **39**, 14960-14967 (2000).
95. Bulleid, N.J.; Wilson, R.R.; Lad, U. A cautionary note when using pepsin as a probe for the formation of a collagen triple helix. *Matrix Biol.* **17**, 233-236 (1998).
96. Bhate, M.; Wang, X.; Baum, J.; Brodsky, B. Folding and conformational consequences of glycine to alanine replacements at different positions in a collagen model peptide. *Biochemistry* **41**, 6539-6547 (2002).
97. Long, C.G.; Thomas, M.; Brodsky, B. Atypical Gly-X-Y sequences surround interruptions in the repeating tripeptide pattern of basement membrane collagen. *Biopolymers* **35**, 621-628 (1995).
98. Goodman, M.; Kwak, J. Design, synthesis and conformations of novel triple helical collagen mimetic structures. *Pr. Indian Acad.* **111**, 35-49 (1999).
99. Heidemann, E.; Roth, W. Synthesis and investigation of collagen model peptides. *Adv. Polymer Sci.* **43**, 143-203 (1982).
100. Roth, W.; Heidemann, E. Triple helix-coil transition of covalently bridged collagen-like peptides. *Biopolymers* **19**, 1909-1917 (1980).
101. Roth, W.; Heppenheimer, K.; Heidemann, E.R. Structure of collagen-like homopolytripeptides and heteropolytripeptides 4. polytripeptides by repetitive peptide-synthesis and bridging of oligopeptides. *Makromol. Chem. Phys.* **180**, 905-917 (1979).
102. Koide, T.; Yuguchi, M.; Kawakita, M.; Konno, H. Metal-assisted stabilization and probing of collagenous triple helices. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9388-9389 (2002).
103. Mechling, D.E.; Bachinger, H.P. The collagen-like peptide (GER)(15)GPCCG forms pH-dependent covalently linked triple helical trimers. *J. Biol. Chem.* **275**, 14532-14536 (2000).
104. Fields, C.G.; Lovdahl, C.M.; Miles, A.J.; Hagen, V.L.; Fields, G.B. Solid-phase synthesis and stability of triple-helical peptides incorporating native collagen sequences. *Biopolymers* **33**, 1695-1707 (1993).

105. Rump, E.T.; Rijkers, D.T.S.; Hilbers, H.W.; de Groot, P.G.; Liskamp, R.M.J. Cyclotrimeratrylene (CTV) as a new chiral triacid scaffold capable of inducing triple helix formation of collagen peptides containing either a native sequence or Pro-Hyp-Gly repeats. *Chem.- Eur. J.* **8**, 4613-4621 (2002).
106. Yu, Y.C.; Roontga, V.; Daragan, V.A.; Mayo, K.H.; Tirrell, M.; Fields, G.B. Structure and dynamics of peptide-amphiphiles incorporating triple-helical protein-like molecular architecture. *Biochemistry* **38**, 1659-1668 (1999).
107. Lesage, A.; Penin, F.; Geourjon, C.; Marion, D.; Vanderrest, M. Trimeric assembly and three-dimensional structure model of the facit collagen COL1-NC1 junction from CD and NMR analysis. *Biochemistry* **35**, 9647-9660 (1996).
108. Boudko, S.; Frank, S.; Kammerer, R.A.; Stetefeld, J.; Schulthess, T.; Landwehr, R.; Lustig, A.; Bachinger, H.P.; Engel, J. Nucleation and propagation of the collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: Transition from third to first order kinetics. *J. Mol. Biol.* **317**, 459-470 (2002).
109. Frank, S.; Kammerer, R.A.; Mechling, D.; Schulthess, T.; Landwehr, R.; Bann, J.; Guo, Y.; Lustig, A.; Bachinger, H.P.; Engel, J. Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J. Mol. Biol.* (2001).
110. Bruckner, P.; Eikenberry, E.F.; Prockop, D.J. Formation of the triple helix of type I procollagen in cellulose. A kinetic model based on cis-trans isomerization of peptide bonds. *Eur. J. Biochem.* **118**, 607-613 (1981).
111. Engel, J.; Chen, H.T.; Prockop, D.J.; Klump, H. The triple helix in equilibrium with coil conversion of collagen-like polytripeptides in aqueous and nonaqueous solvents. Comparison of the thermodynamic parameters and the binding of water to (L-Pro-L-Pro-Gly)_n and (L-Pro-L-Hyp-Gly)_n. *Biopolymers* **16**, 601-622 (1977).
112. Bachinger, H.P.; Engel, J. Thermodynamic vs. kinetic stability of collagen triple helices. *Matrix Biol.* **20**, 267-269 (2001).
113. Feng, Y.; Melacini, G.; Taulane, J.P.; Goodman, M. Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. I. Synthesis and conformational analysis by circular dichroism, ultraviolet, absorbance, and optical rotation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10351-10358 (1996).
114. Berg, R.A.; Prockop, D.J. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 115-120 (1973).

115. Burjanadze, T.V.; Kisiriya, E.L. Dependence of thermal stability on the number of hydrogen bonds in water-bridged collagen structure. *Biopolymers* **21**, 1695-1701 (1982).
116. Cooper, A. Thermal stability of tropocollagens-are hydrogen bonds really important? *J. Mol. Biol.* **55**, 123-127 (1971).
117. Inouye, K.; Sakakibara, S.; Prockop, D.J. Effects of the stereo-configuration of the hydroxyl-group in 4-hydroxyproline on the triple-helical structures formed by homogeneous peptides resembling collagen. *Biochim. Biophys. Acta* **420**, 133-141 (1976).
118. Inouye, K.; Kobayashi, Y.; Kyogoku, Y.; Kishida, Y.; Sakakibara, S.; Prockop, D.J. Synthesis and physical properties of (Hydroxyproline-Proline-Glycine)₁₀: Hydroxyproline in the X-position decreases the melting temperature of the collagen triple helix. *Arch. Biochem.* **219**, 198-203 (1982).
119. Jänicke, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**, 715-728 (1991).
120. Babu, I.R.; Ganesh, K.N. Enhanced triple helix stability of collagen peptides with 4R-aminopropyl (Amp) residues: Relative roles of electrostatic and hydrogen bonding effects. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2079-2080 (2001).
121. DeRider, M.L.; Wilkens, S.J.; Waddell, M.J.; Bretscher, L.E.; Weinhold, F.; Raines, R.T.; Markley, J.L. Collagen stability: Insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2497-2505 (2002).
122. Holmgren, S.K.; Bretscher, L.E.; Taylor, K.M.; Raines, R.T. A hyperstable collagen mimic. *Chem. Biol.* **6**, 63-70 (1999).
123. Malkar, N.B.; Lauer-Fields, J.L.; Borgia, J.A.; Fields, G.B. Modulation of triple-helical stability and subsequent melanoma cellular responses by single-site substitution of fluoroproline derivatives. *Biochemistry* **41**, 6054-6064 (2002).
124. Mooney, S. D.; Kollman, P.A.; Klein, T.E. Conformational preferences of substituted prolines in the collagen triple helix. *Biopolymers* **64**, 63-71 (2002).
125. Eberhardt, E.S.; Panasik, N.; Raines, R.T. Inductive effects on the energetics of prolyl peptide bond isomerization - implications for collagen folding and stability. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12261-12266 (1996).

126. Renner, C.; Alefelder, S.; Bae, J.H.; Budisa, N.; Huber, R.; Moroder, L. Fluoroproline als Werkzeuge für gezieltes Proteindesign. *Angew. Chem.* **113**, 949-951 (2001).
127. Buevich, A.V.; Dai, Q.H.; Liu, X.Y.; Brodsky, B.; Baum, J. Site-specific NMR monitoring of cis-trans isomerization in the folding of the proline-rich collagen triple helix. *Biochemistry* **39**, 4299-4308 (2000).
128. Buevich, A.; Baum, J. Nuclear magnetic resonance characterization of peptide models of collagen-folding diseases. *Biochemistry* **356**, 159-168 (2001).
129. Improta, R.; Benzi, C.; Barone, V. Understanding the role of stereoelectronic effects in determining collagen stability. 1. A quantum mechanical study of proline, hydroxyproline, and fluoroproline dipeptide analogues in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12568-12577 (2001).
130. Bretscher, L.E.; Jenkins, C.L.; Taylor, K.M.; DeRider, M.L.; Raines, R.T. Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 777-778 (2001).
131. Kramer, R.Z.; Vitagliano, L.; Bella, J.; Berisio, R.; Mazzarella, L.; Brodsky, B.; Zagari, A.; Berman, H.M. X-ray crystallographic determination of a collagen-like peptide with the repeating sequence (Pro-Pro-Gly). *J. Mol. Biol.* **280**, 623-638 (1998).
132. Kramer, R.Z.; Bella, J.; Mayville, P.; Brodsky, B.; Berman, H.M. Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure. *Nature Struct. Biol.* **6**, 454-457 (1999).
133. Reimer, U.; Scherer, G.; Drewello, M.; Kruber, S.; Schutkowski, M.; Fischer, G. Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J. Mol. Biol.* **279**, 449-460 (1998).
134. Sakakibara, S.; Kishida, Y.; Kikuchi, Y.; Sakai, R.; Kakiuchi, K. Synthesis of poly-(L-prolyl-L-prolylglycyl) of defined molecular weights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 1273-1280 (1968).
135. Melacini, G.; Feng, Y.; Goodman, M. Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. II. Conformational analysis by ¹H-NMR and molecular modeling studies. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10359-10364 (1996).
136. Fields, C.G.; Grab, B.; Lauer, J.L.; Fields, G.B. Purification and analysis of synthetic, triple-helical "minicollagens" by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **231**, 57-64 (1995).
137. Fields, C.G.; Grab, B.; Lauer, J.L.; Miles, A.J.; Yu, Y.-C.; Fields, G.B. Solid-phase synthesis of triple-helical collagen-model peptides. *Lett. Pept. Sci.* **3**, 3-16 (1996).

138. Lunkenhe, W.; Zahn, H. Peptides 79. Merrifield-synthesis of symmetrical cystine peptides. *Ann. Chem.* **740**, 1-14 (1970).
139. Gisin, B. F.; Merrifield R. B. Synthesis of a hydrophobic potassium binding peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 6165-6183 (1972).
140. Henkel, W.; Vogl, T.; Echner, H.; Voelter, W.; Urbanke, C.; Schleuder, D.; Rauterberg, J. Synthesis and folding of native collagen III model peptides. *Biochemistry* **38**, 13610-13622 (1999).
141. Matsueda, R.; Walter, R. 3-Nitro-2-pyridinesulfonyl (Npys) group - a novel selective protecting group which can be activated for peptide-bond formation. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **16**, 392-401 (1980).
142. Matsueda, R.; Aiba, K. Stable pyridinesulfonyl halide. *Chem. Lett.* 951-952 (1978).
143. Rosen, O.; Rubinraut, S.; Fridkin, M. Thiolysis of the 3-nitro-2-pyridinesulfonyl(Npys) protecting group - an approach towards a general deprotection scheme in peptide-synthesis. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **35**, 545-549 (1990).
144. Albericio, F.; Andreu, D.; Giralte, E.; Navalpotro, C.; Pedroso, E.; Ponsati, B.; Ruizgayo, M. Use of the Npys thiol protection in solid-phase peptide-synthesis -application to direct peptide-protein conjugation through cysteine residues. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **34**, 124-128 (1989).
145. Pugh, K.C.; Gera, L.; Stewart, J. Synthesis and stability of 3-nitro-2-pyridinesulfonyl chloride (NpysCl). *Int. J. Pept. Prot. Res.* **42**, 159-164 (1993).
146. Wünsch, E. Peptides proceedings of the 5. european symposium 1962. ed. Young, Pergamon Press Oxford, G. T. 89-91 (1963).
147. Wünsch, E.; Moroder, L.; Gemeiner, M.; Jaeger, E.; Ribet, A.; Pradayrol, L.; Vaysse, N. Total synthesis of somatostatin-28 (big somatostatin). *Z. Naturforsch. Sect. B* **35**, 911-919 (1980).
148. Moroder, L.; Gemeiner, M.; Goehring, W.; Jaeger, E.; Thamm, P.; Wünsch, E. New synthesis of somatostatin according to the S-tert-butylthiocysteine procedure. *Biopolymers* **20**, 17-37 (1981).
149. Hudlický, M. Fluorinating agent: reaction with alcohols and carbonyl compounds. *Org. Reactions* **35**, 513-637 (1988).
150. Kocz, R.; Roestamadji, J.; Mobashery, S.A. Convenient triphosgene-mediated synthesis of symmetrical carboxylic-acid anhydrides. *J. Org. Chem.* **59**, 2913-2914 (1994).

151. Carpino, L. A.; Elfaham, A. Tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate - a rapid - acting peptide coupling reagent for solution and solid-phase peptide-synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5401-5402 (1995).
152. Früchtel, J.S.; Jung, G. Organic chemistry on solid supports. *Angew. Chem. Int. Edit.* **35**, 17-42 (1996).
153. Grasseti, D.R.; Murray, J.F. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem.* **119**, 41-49 (1967).
154. Creighton, T.E. Disulfide bond formation in proteins. *Meth Enzym* **107**, 305-329 (1984).
155. Creighton, T.E. Protein folding. *W. H. Freeman*, New York (1992).
156. Middendorf, H.D.; Hayward, R.L.; Parker, S.F.; Bradshaw, J.; Miller, A. Vibrational neutron spectroscopy of collagen and model polypeptides. *Biophys. J.* **69**, 660-673 (1995).
157. Mayo, K.H. NMR and X-ray studies of collagen model peptides. *Biopolymers* **40**, 359-370 (1996).
158. Brown, F.R.; Di Corato, A.; Lorenzi, G.P.; Blout, E.R. Synthesis and structural studies of two collagen analogues: poly(L-prolyl-L-seryl-glycyl) and poly(L-prolyl-L-alanyl-glycyl). *J. Mol. Biol.* **63**, 85-99 (1972).
159. Jenness, D.D.; Sprecher, C.; Johnson, W.C. Circular dichroism of collagen, gelatin and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet. *Biopolymers* **15**, 513-521 (1976).
160. Bansal, M.; Brahmachari, S.K.; Sasisekharan, V. Structural investigations on poly(4-hydroxy-L-proline). 1. Theoretical studies. *Macromolecules* **12**, 19-23 (1979).
161. Brahmachari, S.K.; Bansal, M.; Ananthanarayanan, V.S.; Sasisekharan, V. Structural investigations on poly(4-hydroxy-L-proline). 2. Physicochemical studies. *Macromolecules* **12**, 23-28 (1979).
162. Engel, J.; Kurtz, J.; Katchalski, E.; Berger, A. Polymers of tripeptides as collagen models. II. Conformational changes of poly(L-prolyl-glycyl-L-prolyl) in solution. *J. Mol. Biol.* **17**, 255-272 (1966).
163. Danielsen, C.C. Precision method to determine denaturation temperature of collagen using ultraviolet difference spectroscopy. *Coll. Rel. Res.* **2**, 143-150 (1982).
164. Sionkowska, A.; Kaminska, A. Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 337-340 (1999).

165. Sionkowska, A. Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. *Polym. Degrad. Stabil.* **68**, 147-151 (2000).
166. Miles, C.A.; Sionkowska, A.; Hulin, S.L.; Sims, T.J.; Avery, N.C.; Bailey, A.J. Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light. *J. Biol. Chem.* **275**, 33014-33020 (2000).
167. Okuyama, K.; Nagarajan, V.; Kamitori, S.; Noguchi, K. Crystallisation of (Pro-Hyp-Gly)(10) and its triple-helical structure deduced from cylindrical patterson map. *Chem. Lett.* **5**, 385-386 (1998).
168. Saccà, B.; Renner, C.; Moroder, L. The chain register in heterotrimeric collagen peptides affects triple helix stability and folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **324**, 309-318 (2002).
169. Bodansky, M.; Stahl, G.L. Structure and synthesis of malformin-A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 2791-2794 (1974).
170. Ghadimi, M.; Hill, R.R. Facile trisulfide formation in the thermolysis of N,N'-diacetyl-L-cystine bismethylamide, an excellent model for protein-bound cystine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **13**, 903-904 (1991).
171. Zale, S.E.; Klibanov, A.M. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high-temperatures. *Biochemistry* **25**, 5432-5444 (1986).
172. Watanabe, K.; Nakagawa, J.; Ebihara, T.; Okamoto, Y. Structural effects of cross-linking reagents on triple-helix reformation of intramolecularly cross-linked collagen. *Polymer* **37**, 1285-1288 (1996).
173. Watanabe, K.; Tezuka, Y.; Ishii, T. Configuration between re-formed collagen triple helices and artifically intraduced cross-links in gelatin gels. *Macromolecules* **30**, 7910-7913 (1997).
174. Jenkins, C. L.; Raines, R.T. Insights on the conformational stability of collagen. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 49-59 (2002).
175. Kaiser, E.; Colecott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595-598 (1970).
176. Kaiser, E.; Bossinger, C.D.; Colecott, R.L.; Olsen, D.B. Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Chim. Acta* **118**, 149-151 (1980).
180. Mann, K.; Mechling, D.E.; Bächinger, H.P.; Eckerskorn, C.; Gaill, F.; Timpl, R. Glycosylated Threonine but not 4-Hydroxyproline Dominates the Triple Helix Stabilizing Positions in the Sequence of a Hydrothermal Vent Worm Cuticle Collagen. *J. Mol. Biol.* **261**, 255-266 (1996).