

N-Glycoproteinsynthese und Strukturaufklärung

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Kristina Münnich

aus

Bad Homburg vor der Höhe

Frankfurt am Main

2002

(DF 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Griesinger

2. Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels

Datum der Disputation: 19.11.2002

*Tu ne quaesieris - scire nefas -, quem mihi, quem tibi
finem di dederint, Leuconoë, nec Babylonios
temptaris numeros! Ut melius, quidquid erit, pati,
seu pluris hiemes seu tribuit Iuppiter ultimam,
quae nunc oppositis debilitat pumicibus mare
Tyrrhenum: sapias! Vina liques et spatio brevi
spem longam resece! Dum loquimur, fugerit invida
aetas: carpe diem, quam minimum credula postero!*

(Horaz, Carmina, 1, 11, 8)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger in der Zeit von August 1998 bis Juli 2002 angefertigt.

- Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger danke ich für die herausfordernde Themenstellung und die sehr guten materiellen und technischen Arbeitsbedingungen.

Mein weiterer Dank gilt:

am Institut für Organische Chemie in Frankfurt a. M.

- Herrn Dr. Bernhard Geierstanger und Herrn Dr. Ulf Reimer für die Hilfestellungen und Anregungen zur Strukturuntersuchung von Peptiden;
- Frau Dr. Natalia Gaiko für die Mitarbeit an der Synthese eines Dinukleotids;
- Frau E. Stirnal für ihr Engagement bei den zahlreichen HPLC-Trennungen;
- Frau I. Prieß für die Aufnahme der ESI-Massenspektren und Frau H. Brill für die Aufnahme der MALDI-Spektren;
- Frau E. Lichte für die quantitativen Aminosäureanalysen;
- Herrn Prof. Dr. J. Engels für die Erlaubnis zur Nutzung des CD-Geräts Jasco 710;
- Herrn Prof. Dr. E. Egert für den zeitweiligen Zugang zu den Rechnern und den Zugang zur Literaturrecherche;
- dem Graduiertenkolleg „Chemische und biologische Synthese von Wirkstoffen“ für die ideelle Unterstützung;

am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen

- Frau K. Morick für die teilweise aufwendigen HPLC-Trennungen;

-
- Herrn Prof. Dr. Eibl für die zeitweilige Überlassung eines Laborplatzes;
 - der Massenspektroskopie-Abteilung des Instituts für Organische Chemie in Göttingen für die Aufnahme von ESI-Massenspektren;
 - Herrn Dr. F. Thuncke für die Aufnahme der CE-Chromatogramme an der Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft für „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle;
 - Herrn Dr. C. Albrecht von der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, für die Überlassung eines Syntheseprogramms für die Boc-Chemie (Peptidsynthesizer 433 A) und viele gerätespezifische Anregungen;
 - Herrn Dr. R. Thomas von der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, für die Sekundärstrukturberechnungen von CD-Spektren;
 - Frau Brigitte Münnich und Herrn Stephan Rühl für die Durchsicht der Arbeit;
 - dem gesamten Arbeitskreis Prof. Dr. C. Griesinger für das gute, freundschaftliche Arbeitsklima;
 - dem Fonds der Chemischen Industrie für die Gewährung eines zweijährigen Doktorandenstipendiums;
 - der Herrmann Willkomm-Stiftung für die Gewährung von Reisestipendien.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	10
3	Problemstellung	11
4	Glycoproteine	14
4.1	Biologischer Aufbau	14
4.2	Eigenschaften und Funktion	17
4.3	Das Prionen-N-Glycoprotein	20
4.3.1	Kinetische Untersuchungen zur Amyloidbildung	22
4.3.2	Die N-Glycosylierung	24
5	Chemische Reaktionen	25
5.1	Peptidsynthese	25
5.1.1	Festphasensynthese nach Merrifield	25
5.1.2	Verwendete Harze für die Peptidchemie	26
5.1.3	Aktivierungsmethoden	29
5.1.4	Der Ninhydrintest	32
5.1.5	Die Schutzgruppentechnik	33
5.1.6	Die Harzabspaltung	38
5.1.7	Probleme der Peptidreindarstellung	38
5.2	Zuckersynthese	44
5.2.1	Darstellung von Chitobiosederivaten aus Chitin	44
5.2.2	Reduktion von Zucker-Aziden	45
5.2.3	Abspaltung von Zuckerschutzgruppen	45

5.3	Klassische N-Glycopeptidsynthese	47
5.4	Chemisch-enzymatische Synthese von Glycoproteinen	49
5.4.1	<i>in vitro</i> -Translation	49
5.4.2	Darstellung einer modifizierten aminoacylierten tRNA	51
5.4.3	Darstellung von <i>pdCpA</i>	52
5.5	Glycoproteinsynthese über chemische Ligation	54
5.5.1	Methoden der chemischen Ligation von Peptiden	54
5.5.2	Das Inteinsystem	60
6	Strukturanalytische Verfahren	65
6.1	NMR-Spektroskopie	65
6.1.1	Korrelation der chemischen Verschiebung mit der Sekun- därstruktur	66
6.1.2	Sekundärstrukturen und die Spin-Spin- Kopplung $^3J_{(HN\alpha)}$	67
6.2	CD-Spektroskopie	68
6.3	Kapillarelektrophorese	72
7	Projektdurchführung und Ergebnisse	73
7.1	Synthese und Strukturuntersuchung α -helikaler Modellpeptide und zugehöriger N-Glycopeptide	73
7.1.1	N-Glycopeptidsynthese	75
7.1.2	NMR-Untersuchungen	80
7.1.3	Circulardichroismus (CD)-Untersuchungen	88
7.1.4	Kapillarelektrophorese	91
7.1.5	Resümee	92
7.2	Ansätze zur Darstellung einer N-glycosylierten aminoacylierten tRNA	93

7.2.1	Synthese von aktivierter N-glycosylierter Asparaginsäure	93
7.2.2	Ligationsversuche mit <i>pdCpA</i>	98
7.2.3	Resümee	102
7.3	Synthese und Strukturuntersuchung des Prionenglycoproteinfragments SHA PrP172-194	104
7.3.1	Synthese des nichtglycosylierten und N-glycosylierten Fragments SHA PrP172-194	104
7.3.2	Strukturuntersuchungen des nichtglycosylierten und N-glycosylierten Fragments SHA PrP172-194	106
7.3.3	Resümee	111
7.4	Darstellung eines Prionen-N-Glycoproteinfragments über chemische Ligation	112
7.4.1	Chemische Ligation von kurzen Peptid- und N-Glycopeptidfragmenten	114
7.4.2	Synthese und chemische Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231	118
7.4.3	Ligation eines Intein-Fusionsproteins mit SHA PrP179-231	123
7.4.4	Synthese des N-glycosylierten Fragments SHA PrP179-231	126
7.4.5	Synthese der Fragmente SHA PrP179-213 und SHA PrP214-231	128
7.4.6	Resümee	131
8	Zusammenfassung und Ausblick	132
9	Experimenteller Teil	135
9.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	135

9.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptid- und Glycopeptid- chemie	139
9.2.1	Harzbelegung	139
9.2.2	Abspaltung der Fmoc-Gruppe	140
9.2.3	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe	140
9.2.4	Kaiser-Test	141
9.2.5	Quantitative Bestimmung der Harzbelegung	141
9.2.6	UV-spektrometrische Kontrolle der Fmoc-Abspaltung	142
9.2.7	Manuelle Festphasensynthese	142
9.2.8	Acetylierung des N-Terminus	143
9.2.9	Allylabspaltung	143
9.2.10	Silylierung der Glasgeräte	144
9.2.11	Kontrollabspaltungen für HPLC- und ESI-MS-Analytik	144
9.2.12	Präparative Abspaltung vom Harz	144
9.2.13	Harzabspaltung vom Sulfamylbutyryl AM-Harz	145
9.2.14	N-Glycosylierungsreaktion an fester Phase	145
9.2.15	Abspaltung der Acetylschutzgruppen, Harzabspaltung	145
9.2.16	Abspaltung der Benzylschutzgruppen	146
9.3	Funktionsweise des Peptidsynthesizers 433A	147
9.4	Synthese und Strukturuntersuchung α -helikaler Modellpeptide und zugehöriger N-Glycopeptide	150
9.4.1	Peptidsynthese	150
9.4.2	Zuckersynthese	152
9.4.3	Glycopeptidsynthese	158
9.5	Ansätze zur Darstellung einer N-glycosylierten aminoacylierten tRNA	164

9.5.1	Synthese von aktivierter N-glycosylierter Asparaginsäure .	164
9.5.2	Synthese von <i>pdCpA</i>	171
9.5.3	Ligationsversuche mit <i>pdCpA</i>	177
9.6	Synthese und Strukturuntersuchung des Prionenglycoproteinfragments SHA PrP172-194	178
9.7	Darstellung eines Prionen-N-Glycoproteinfragments über chemische Ligation	181
9.7.1	Chemische Ligation von kurzen Peptid- und N-Glycopeptidfragmenten	181
9.7.2	Synthese und chemische Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231	186
9.7.3	Synthese des N-glycosylierten Fragments SHA Pr179-231	189
9.7.4	Synthese der Fragmente SHA PrP179-213 und SHA PrP214-231	190
9.8	Pulsprogramme	192

1 Abkürzungen

Gemäß den Vorschlägen der IUPAC für biochemische Nomenklatur wurden folgende Abkürzungen verwendet [1-3]:

Ala(A)	L-Alanin
Arg(R)	L-Arginin
Asn(N)	L-Asparagin
Asp(D)	L-Asparaginsäure
Cys(C)	L-Cystein
Gln(Q)	L-Glutamin
Glu(E)	L-Glutaminsäure
Gly(G)	Glycin
His(H)	L-Histidin
Ile(I)	L-Isoleucin
Leu(L)	L-Leucin
Lys(K)	L-Lysin
Met(M)	L-Methionin
Phe(F)	L-Phenylalanin
Pro(P)	L- Prolin
Ser(S)	L-Serin
Thr(T)	L-Threonin
Trp(W)	L-Tryptophan

Tyr(Y)	L-Tyrosin
Val(V)	L-Valin
A	Adenosin
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Aceton-d ₆	Deutero-Aceton
AcHmb	2-Acetoxy-4-methoxybenzyl
Acm	Acetamidomethyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
All	Allyl
ANS	1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure
aromat.	aromatisch
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert. Butyloxycarbonyl
Boc-OSu	N-tert.-Butyloxycarbonyloxysuccinimid
Bom	Benzyloxymethyl
Bu	Butyl
But	tert. Butyl

Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
BzIO	Benzyloxy
c	Konzentration
C	Cytidin
CD	Circulardichroismus
CE	Kapillarelektrophorese
2-Cl-Z	2-Chlorbenzyloxycarbonyl
CSI	chemical shift index
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Peptidsequenz
1D	1-dimensional
2D	2-dimensional
d	Dublett
<i>d</i>	desoxy
δ	chemische Verschiebung (NMR)
DBU	1,8-Diazobicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	Deutero-Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	deoxyribonucleic acid
D ₂ O	Deuteriumoxid
DTT	Dithiothreitol
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EEDQ	Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronensprayionisation
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	Fucose
g	Gramm
G	Guanin
gem	geminal
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GnHCl	Guanidiniumhydrochlorid

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grad.	Gradient
GST	Glutathion-S-Transferase
GyrA	Gyrase A
h	Stunde(n)
¹ H	Proton(en)
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertz
iPr	Isopropyl
J	skalare Kopplung
K	Kelvin
kD	Kilodalton
l	Liter

m	Multipllett
M	molar
MALDI	Matrix assisted laser induced desorption
Man	Mannose
max.	maximal
$M_{ber.}$	berechnete Masse
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MeIm	N-Methylimidazol
MeOH	Methanol
MESNA	Mercaptoethansulfonsäure
mg	Milligramm
$M_{gef.}$	gefundenene Masse
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	millimolar
Mpt-MA	Dimethylphosphinothioic mixed anhydrid
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrum
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
Mts	Mesitylen-2-sulfonyl

Neu5Ac	Acetylneuraminsäure
Nle	Norleucin
nm	Nanometer
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement (Kern-Overhauser-Verstärkung)
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy (Kern-Overhauser- und Austausch-Spektroskopie)
N-Terminus	Amino-Terminus einer Peptidsequenz
NVOC	Nitroveratryloxycarbonyl
<i>p</i>	phospho
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl
Pht	Phthaloyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl
P-P-Dol	Dolicholpyrophosphat
ppm	parts per million
PrP	Prion Protein

PrPc	Prion Protein Cellular
PrPSc	Prion Protein Scrapie-Isoform
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
rec	recombinant
R _f	Retentionsfaktor
RNA	ribonucleic acid
RP	Reversed-Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHA	Syrian Hamster
t	Triplett
T	Thymin
TBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	tert. Butyl
TCEP	Tri-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TES	Triethylsilan

TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy (Totale Korrelationspektroskopie)
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)
tRNA	transfer ribonucleic acid
Trt	Trityl, Triphenylmethyl
<i>U</i>	Uracil
UV	ultraviolett
vic	vicinal
VIS	visible
v/v	Volumen pro Volumen
Xan	Xanthyl
Z	Benzoxycarbonyl

2 Einleitung

Die Mehrzahl der Proteine ist posttranslational modifiziert, wobei als häufigste Veränderung das Anhängen von Zuckerresten an die Seitenketten von Asparagin, Serin und Threonin zu nennen ist. Die Glycanketten beeinflussen die Struktur der Proteine und regulieren ihre biologische Halbwertszeit und Aktivität [4, 5]. Glycoproteine sind an biologischen Erkennungsprozessen beteiligt, beispielsweise an der Zelladhäsion, Zelldifferenzierung und am Zellwachstum [6, 7, 8]. Parasiten nutzen stark glycosylierte membranständige Proteine, die in den extrazellulären Raum ragen, um in die Zelle hineinzugelangen [9]. Eine fehlgeordnete Glycosylierung ist verbunden mit zahlreichen Autoimmun- und Infektionskrankheiten oder Krebs. Es ist nicht verwunderlich, daß Wissenschaftler auf den Gebieten der Chemie, Biologie, Immunologie und Medizin nach Mitteln zur Diagnose und Therapie von Krankheiten, die mit Glycokonjugaten in Verbindung stehen, suchen. Ein solches interdisziplinäres Projekt benötigt daher einen großen Informationstransfer zwischen den verschiedenen Fachrichtungen.

Die Glycosylierung der Proteine hat eine enorme strukturelle Vielfalt zur Folge. Glycoproteine existieren in zahlreichen Glycoformen, die ihrerseits die biologische Aktivität aufgrund der Heterogenität regulieren. Die Isolation von gut definierten Glycoproteinen aus der Natur ist schwierig und selbst mit heutigen Techniken nicht möglich. Darüber hinaus können rekombinante Proteine, die in einer Wirtszelle in künstlichem Medium synthetisiert wurden, ein verändertes Glycosylierungsmuster aufweisen.

Es ist die Chemie, die ein solches Verfügbarkeitsproblem lösen kann. Glycoproteine sind aber aufgrund ihrer Größe durch die chemische Synthese nur begrenzt zugänglich. Es ist zwar möglich, glycosylierte Aminosäuren in der Festphasensynthese einzusetzen beziehungsweise Peptide an fester Phase nachträglich zu glycosylieren. Jedoch können auf diesem Wege nur kleine Proteine von maximal 100 Aminosäuren hergestellt werden.

Es sollen hier Aspekte der modernen Glycoproteinsynthese dargestellt werden und zugleich ein Einblick in die Möglichkeiten zur Strukturuntersuchung von Glycoproteinen gegeben werden. Die Aufklärung der Struktur trägt dazu bei, die bio-

logische Funktion eines Peptids oder Glycopeptids besser verstehen zu können.

3 Problemstellung

In dieser Doktorarbeit wurden drei verschiedene Aspekte der Glycoproteinsynthese behandelt.

Im ersten Teil sollten kurze α -helikale Modellpeptide N-glycosyliert werden, um den konformationellen Effekt der N-Glycosylierung auf das Peptidrückgrat zu untersuchen. Vorangehende Arbeiten haben gezeigt, daß das Anhängen eines Zuckerrests innerhalb einer für die natürliche Glycosylierung notwendigen Aminosäuresequenz die Bildung eines β -turns induziert [10-13]. Unter Variation der Größe und Art der angehängten Zuckerreste und Veränderung der Aminosäureabfolge in der Glycosylierungssequenz sollten die dargestellten N-Glycopeptide unter anderem bezüglich eines solchen Effekts mittels CD- und NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Die beiden folgenden Teile zeigen Wege auf, wie man mit chemischen und biochemischen Methoden größere natürliche N-Glycoproteine darstellen kann und sie der Struktur- und Funktionsaufklärung zugänglich machen kann.

Es wurde zum einen der Ansatz verfolgt, auf chemisch-enzymatischem Wege über die Neubelegung eines Stop-Codons N-glycosylierte Aminosäuren der Proteinbiosynthese *in vitro* zuzuführen [14-18].

O-glycosylierte Aminosäuren wurden in früheren Arbeiten als modifizierte Aminosäuren eingesetzt und in Proteine mit Ausbeuten von 5-10 % eingebaut [19, 20, 21]. Angesichts der größeren Stabilität der N-Glycoproteine gegenüber O-Glycoproteinen waren mit einem optimierten Proteinexpressionssystem für die Expression von N-Glycoproteinen mindestens vergleichbare Ausbeuten zu erwarten.

Der chemische Teil dieses Projekts bestand in der Darstellung eines N-glycosylierten aminoacylierten Dinukleotids *pdCpA*, das eine Vorläuferverbindung der

für die *in vitro*-Translation notwendigen Suppressor-tRNA ist. Die chemische Synthese gliederte sich weiterhin auf in die Darstellung einer aktivierten, selektiv geschützten N-glycosylierten Aminosäure und die Synthese des Dinukleotids *pdCpA* [22].

Nachteil dieser Methode der Glycoproteinsynthese ist, daß im Hinblick auf NMR-spektroskopische Untersuchungen nur eine durchgängige Isotopen-Markierung des modifizierten Proteins erzielt werden kann, was zum Beispiel in einem 2D HSQC-Spektrum die Zuordnung eines über 100 Aminosäuren enthaltenden N-Glycoproteins erschwert und zudem sehr kostenintensiv ist.

Die von Kent *et al.* in der Peptidchemie etablierte Methode der *native chemical ligation* [25, 26], der Darstellung von natürlichen Peptidstrukturen über die selektive Ligation von Peptidthioestern mit N-terminal Cystein tragenden Peptidfragmenten, wurde inzwischen auch auf die Synthese von O- und N-Glycopeptiden ausgeweitet [27, 28]. Dabei hat sich gezeigt, daß die Ligation auch in Gegenwart ungeschützter Zuckerreste ohne Nebenreaktionen verläuft.

In Arbeiten von Muir *et al.* wurden durch Modifikation eines natürlichen Protein-Splicing-Systems rekombinante Proteinabschnitte miteinander verknüpft [23, 24]. Dabei wird das N-terminale Proteinfragment C-terminal mit einem Intein ligiert. Das Intein kann mit Thiolen abgespalten werden, was einen Proteinabschnitt in Form eines Thioesters liefert, der wiederum mit einem Cystein-Protein ligiert werden kann.

Als zweiter erfolgversprechender Ansatz bot sich also die Möglichkeit, ein Fusionsprotein mit Inteinabschnitt mit einem an fester Phase synthetisierten N-Glycopeptidfragment *in vitro* zu ligieren. Eine geeignete Blockmarkierungsstrategie [29], hier die selektive Isotopen-Markierung des nicht glycosylierten Proteinabschnitts, könnte die Auswertung von 2D NMR-Spektren erleichtern und erfordert nur geringe Mengen an Isotopen-markiertem Material.

Die beiden vorgestellten chemisch/biochemischen Methoden zur N-Glycoprotein-darstellung sollten auf die Synthese von Ausschnitten eines natürlichen N-Glycoproteins angewandt werden.

Die Wahl fiel auf das Prionen-N-Glycoprotein, wobei bei der Auswahl dieses Beispiels das aktuelle Interesse an der Aufklärung der Struktur des Prionen-N-Glycoproteins im natürlichen Zustand und an der Aufklärung der biologischen Funktion sicherlich ausschlaggebend war.

Den aufwendigen chemischen und biochemischen Syntheseansätzen sollten Testsynthesen und Strukturuntersuchungen kleinerer Prionen-N-Glycoproteinfragmente vorausgehen, die im nichtglycosylierten, nativen Zustand eine geordnete Struktur aufwiesen.

4 Glycoproteine

4.1 Biologischer Aufbau

Unter Glycoproteinen versteht man Verbindungen aus Kohlenhydraten und Proteinen. Glycoproteine und Glycopeptide gehören neben den Peptidoglycanen, Glycolipiden, Oligosacchariden und Lipopolysacchariden zu den Glycokonjugaten. Die Glycoproteine sind in allen Lebensformen mit Ausnahme der Eubakterien weit verbreitet. Man findet sie sowohl in löslicher Form als auch in membrangebundener Form in allen Zellen, aber auch in der extrazellulären Matrix und in extrazellulären Flüssigkeiten. Sie enthalten kovalent gebundene Kohlenhydratanteile mit einem Gewichtsanteil von beispielsweise 10-25 % in Proteinen des Blutplasmas und bis zu 85 % bei Blutgruppen-determinierenden Glycoproteinen.

Die meisten der von eukaryontischen Zellen sezernierten Proteine sind Glycoproteine. Die zugrunde liegenden Peptidketten werden ribosomal unter genetischer Kontrolle synthetisiert. Dagegen erfolgt posttranslational die Anheftung der enzymatisch erzeugten Kohlenhydratketten ohne Beteiligung von DNA-Matrizen.

Basierend auf einer heterogenen Kohlenhydratzusammensetzung zeigen Glycoproteine Mikroheterogenität. Die Ursachen hierfür sind auf eine nicht ausreichende Konzentration der für den Aufbau der Kohlenhydratanteile notwendigen Enzyme zurückzuführen oder beruhen auf einem nachträglichen partiellen Abbau durch Glucosidasen [30].

Die Art der kovalenten Bindung zwischen den Protein- und Kohlenhydratanteilen variiert trotz der großen Vielfalt nativer Glycoproteine nur wenig. Die am häufigsten vorkommenden N-Glycoproteine zeichnen sich durch eine β -glycosidische Bindung zwischen dem Amidstickstoff der Seitenkette von Asparagin und dem anomeren Zentrum der 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose aus. Das glycosylierte Asparagin ist immer Teil einer Tripeptidsequenz, dem Sequon, das als biologische Erkennungssequenz dient. Das Sequon besteht aus einem Asparaginrest, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure außer Prolin. Abgeschlossen wird

die Sequenz durch einen Serin- oder Threoninrest. Die typische notwendige Konformation einer solchen Glycosylierungssequenz ist ein Asx-Turn, der sich durch Wasserstoffbrücken des Seitenkettenamids von Asparagin mit dem Amidproton im Abstand ($i + 2$) und der OH-Gruppe von Threonin oder Serin auszeichnet [4].

Die weniger verbreiteten O-Glycoproteine weisen eine α -glycosidische Bindung zwischen N-Acetylgalactosamin und Serin oder Threonin beziehungsweise eine β -O-glycosidische Bindung zwischen Xylose und Serin auf.

Eine dritte glycosidische Bindung ist die über Ethanolamin-Phosphat. Diese Bindung findet man in Glycosylphosphatidylinositolen, die aus einem Protein-, einem Zucker- und einem Lipidanteil sowie einer Inositoleinheit bestehen und Proteine in Zellmembranen verankern [31]. Verknüpfungsstelle zwischen dem C-Terminus des Proteins und dem GPI-Anker ist entweder Cystein, Asparagin, Asparaginsäure, Glycin, Alanin oder Serin [32].

Die N-Glycosylierung eines Proteins erfolgt durch die Oligosaccharyltransferase [33, 34], die im rauhen endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dieses Enzym erkennt die Asn-Xaa-Ser(Thr)-Sequenz als Akzeptor. Die N-Glycosylierung durch die Oligosaccharyltransferase findet nur bei Proteinen statt, die noch keine Tertiärstruktur ausgebildet haben [35]. Für die Aktivierung der Amidseitenkette wurden mehrere Modelle postuliert und mechanistische Studien durchgeführt [33, 36]. Der Oligosaccharidblock, den die Oligosaccharyltransferase überträgt, ist mit einem aktiven Carrier-Lipid verknüpft. Der Carrier ist Dolicholphosphat, ein langes Lipid, das etwa zwanzig Isopreneinheiten enthält. Auf dessen terminale Phosphatgruppe wird mit Hilfe von mehreren Glycosyltransferasen durch schrittweise Addition von Monosacchariden der Oligosaccharidvorläufer aufgebaut. Dieser Vorläufer besteht aus zwei Molekülen N-Acetylglucosamin, neun Mannose- und drei Glucoseresten. Die 14 Zuckerbausteine des Oligosaccharidvorläufers, die wie die Oligosaccharyltransferase auf der Lumenseite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, werden *en bloc* auf einen spezifischen Asparaginrest übertragen. Im endoplasmatischen Retikulum werden dann die äußeren Glucoseeinheiten und ein Mannoserest durch verschiedene Glycosidasen wieder abgespalten. Anschließend findet ein Transport der N-Glycoproteine

in den Golgi-Apparat statt, wo die peripheren Zuckereinheiten weiter modifiziert werden.

Die N-Glycoproteine enthalten eine gemeinsame Core-Region aus einer Pentasaccharideinheit, die sich aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten zusammensetzt.

In Abbildung 1 sind die wichtigsten Basisstrukturen der N-Glycoproteine aufgeführt.

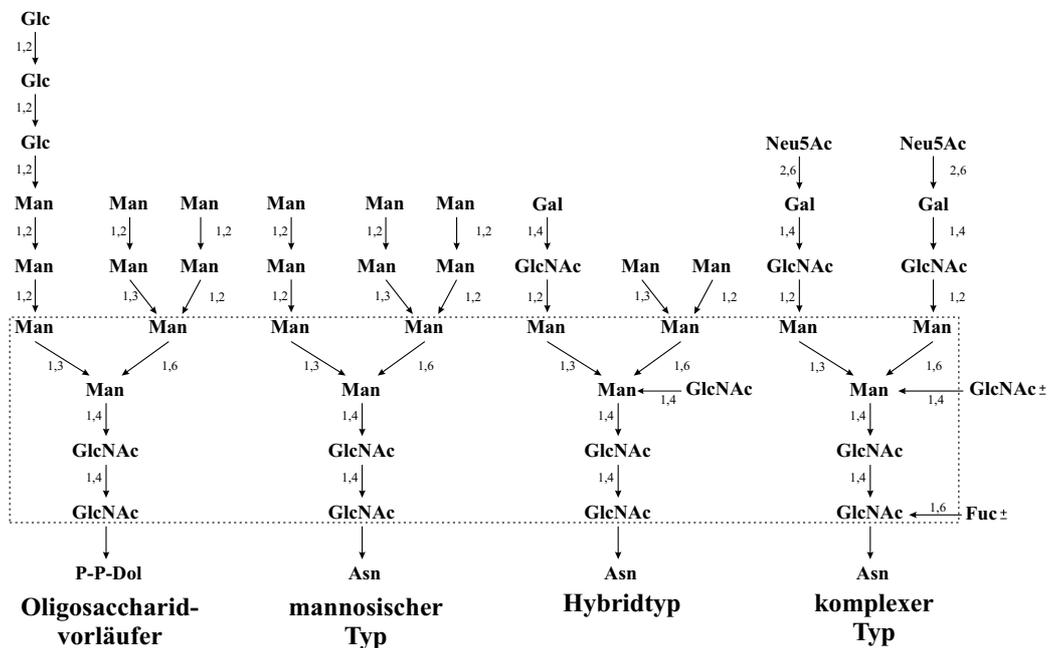


Abbildung 1: Basisstrukturen der N-Glycopeptide. Die Core-Region ist durch die gestrichelte Markierung hervorgehoben [31].

In diesem Schema erkennt man, daß in allen Typen der N-Glycoproteine die pentasaccharidische Core-Region konserviert ist. Der mannosidische Typ entsteht aus dem Oligosaccharidvorläufer durch Entfernung der drei terminalen Glucoseeinheiten. Sialylierte N-Glycane, die am häufigsten vorkommen, werden als komplexer Typ bezeichnet. Bei diesem Typ wird der Oligosaccharidvorläufer bis zum Core-Pentasaccharid abgebaut und durch zwei N-Acetylglucosamintransferasen wieder verlängert. Nach anschließender Galactosylierung folgt dann ein Transfer

von jeweils einer Sialinsäure (auch Neuraminsäure genannt). Der Hybridtyp stellt eine Mischung der beiden zuvor genannten Typen dar.

Der komplexe Typ der N-Glycoproteine kann durch Glycosylierung des Core-Pentasaccharids weiter modifiziert werden. Die Glycosylierung der zentralen Mannoseeinheit der Core-Region durch eine spezifische N-Acetylglucosamintransferase liefert N-Glycane, die als „bisecting“-Strukturen bezeichnet werden [37]. Weiterhin ist eine Core-Fucosylierung am reduzierenden Ende möglich. Der in Abbildung 1 gezeigte Grundtyp der komplexen N-Glycane ist doppelt verzweigt und wird als biantennäre Struktur bezeichnet. Zusätzliche N-Acetylglucosamintransferasen ermöglichen eine weitere Verzweigung, so daß tri-, tetra- und pentaantennäre komplexe N-Glycane gebildet werden können. Diese hochverzweigten Kohlenhydrate können jedoch nur gebildet werden, wenn keine „bisecting“-Struktur vorliegt [38]. Durch zusätzliche Modifikationen, wie Sulfatierung, Phosphorylierung oder Acetylierung ergibt sich so die Vielzahl von Oligosaccharidstrukturen.

Für eine O-Glycosylierung befinden sich die entsprechenden Glycosyltransferasen im Golgi-Apparat. Da hier die Monosaccharide schrittweise angefügt werden, existiert für O-Glycoproteine keine einheitliche Core-Region des Glycanrests [31].

4.2 Eigenschaften und Funktion

Obgleich normalerweise nur sieben oder acht Monosaccharide als Bausteine für die Glycoproteinsynthese in Säugersystemen vorkommen, bildet die Multifunktionalität dieser Monomere eine ungewöhnliche Anzahl komplexer Strukturen. Unter Berücksichtigung von Verzweigungen, der Stereochemie der glycosidischen Bindungen sowie Modifizierung von Hydroxyl- und Aminofunktionen ergeben sich bereits auf der Grundlage von Tetrasacchariden Millionen unterschiedlicher Strukturen, die eine Fülle biologischer Funktionen über einen immensen Informationscode verschlüsseln. Das Glycosylierungsmuster ändert sich mit der Struktur des Proteins, dem Zelltyp und dem jeweiligen Organismus [30].

Durch die angehefteten sehr hydrophilen Kohlenhydrate verändern sich Polarität und Löslichkeit der Proteine. Durch die sterische Abschirmung potentieller Spaltstellen und die Ladung von Oligosaccharidketten resultiert eine höhere Stabilität gegenüber dem Angriff von Proteasen.

Die Faltung eines am Ribosom entstehenden Proteins ist ein Vorgang, der noch nicht vollständig erforscht ist. Die funktionelle dreidimensionale Struktur erhält ein Glycoprotein neben der spontanen Faltung durch eine Reihe von Helferproteinen. Besonders wichtig sind Chaperone [39], die an hydrophobe Teile des nascenten Glycoproteins binden und eine Selbstaggregation verhindern. Einige dieser Chaperone, wie Calnexin und Calreticulin [40, 41, 42], haben gleichzeitig Bindungseigenschaften an die terminalen Glucosereste der sich faltenden Glycoproteine. Parallel zur Strukturausbildung der Peptidkette werden die an Asparagin gebundenen Oligosaccharideinheiten im Endoplasmatischen Retikulum prozessiert. Verschiedene Glucosidasen entfernen dabei terminale Glucoseeinheiten. Prozessierte Glycoproteine, die noch nicht vollständig gefaltet sind, werden dann reglucosyliert und von Calnexin und Calreticulin gebunden. Fehlerhaft gefaltete Glycoproteine werden so im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und korrekt gefaltet; den Oligosacchariden kommt hier also die Funktion einer Qualitätskontrolle bei der Faltung von N-Glycoproteinen zu.

In vielen Glycoproteinen sind etwa 10-30 % aller potentiellen Glycosylierungsstellen nicht mit Oligosacchariden besetzt [43]. Durch Untersuchungen der Expression von gewebespezifischem Plasminogenaktivator konnte ein Zusammenhang zwischen Disulfidbrückenbildung und dem Glycosylierungsgrad festgestellt werden [44]. Die Expression in Gegenwart des Reduktionsmittels Dithiothreitol zur Unterdrückung von kotranslationaler Disulfidbrückenbildung führt zur vollständigen Glycosylierung aller spezifischen Asparagine. Unbehandelte Zellen dagegen produzieren variabel glycosylierte Proteine.

Kohlenhydratanteile von Glycoproteinen haben spezielle Bedeutung im Bereich der Zell-Zell und Zell-Molekülerkennung. So verwenden Zellen Oligosaccharide zur Codierung von Informationen über die Art der Proteinfaltung, Lokalisation (intrazelluläres Organell, Plazierung auf der Zelloberfläche, Ausschleusung

aus der Zelle etc.) oder zur Erkennung von anderen Proteinen. Der Kohlenhydratanteil eines Proteins hat einen signifikanten Einfluß auf die Halbwertszeit eines Proteins. Während die Halbwertszeit des nativen Coeruloplasmins 54 h beträgt, reduziert sich diese durch enzymatische Abspaltung des endständigen N-Acetylneuraminsäurerests mittels Neuramidase auf 5 min [45]. Für den nunmehr schnellen Abbau in der Leber ist ein Galactose-erkennendes Rezeptorsystem (Asialoglycoprotein-Rezeptor) verantwortlich, das den nach N-Acetylneuraminsäureabspaltung resultierenden terminalen Galactoserest erkennt und einen schnellen Abbau in den Lysosomen initiiert [46]. Andererseits werden beispielsweise lysosomale Enzyme im Golgi-Komplex durch Anheftung von Mannose-6-Phosphat an die Termini der Oligosaccharidketten für den Transport in die Lysosomen gekennzeichnet. Da der Kohlenhydratanteil in Tumorzellen oftmals gegenüber nicht entarteten Zellen spezifisch verändert ist, bietet die Suche nach sogenannten tumorassoziierten Antigenen sinnvolle Ansatzpunkte für die Diagnostik und Immuntherapie in der Tumorforschung.

Die Bindung von Kohlenhydraten durch unterschiedliche Lektine spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Zellen und bei der Zell-Adhäsion. Ein intensiv bearbeitetes Gebiet ist die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [47, 48]. Viele entzündliche Erkrankungen können möglicherweise durch die Inhibierung der Zelladhäsion erfolgreich therapiert werden. Die Endothelzellen präsentieren nach einer Aktivierung durch Chemokine auf ihrer Oberfläche Selektine. Solche Zelloberflächenlektine erkennen das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x auf den Leukozyten und leiten die Adhäsionsreaktion ein. Mit hohem Einsatz sind in den letzten Jahren Synthesen des Sialyl-Lewis^x und abgewandelter Verbindungen entwickelt worden, um diesen Prozeß zu studieren und Inhibitoren zu finden [49, 50].

Die oligosaccharidvermittelte Adhäsion nutzen verschiedene Pathogene, um ihre Zielzellen zu finden und zu infizieren. Eine weitverbreitete Krankheit ist die Grippeinfektion, die immer wieder auftritt, weil der Erreger schnell seine Oberflächenantigene ändert und so die Immunabwehr überlistet. Das Grippevirus bindet mit Hilfe eines viralen Lektins, dem Hämagglutinin, an eine terminale Sialinsäure und infiziert so seinen Wirt [51].

4.3 Das Prionen-N-Glycoprotein

Der Name Prion steht für "proteinaceous infectious particle" oder "Proteinartiges infektiöses Agens ohne Nukleinsäure". Der Begriff wurde 1982 von Stanley Prusiner [52] eingeführt und soll damit diesen Erreger einer Fülle unterschiedlicher, komplexer Krankheiten von anderen Erregern, wie zum Beispiel Viren, abgrenzen.

Das zelluläre Prionen-Glycoprotein PrP^c (Prion Protein Cellular) zählt zu den Oberflächenglycoproteinen und ist über eine Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Einheit auf der Zelloberfläche verankert. Es wird von einem einzigen Gen codiert und enthält 253 Aminosäuren. In der Mitte des Proteins befinden sich zwei Asparaginreste (Asn 181 und Asn 197), die potentielle N-Glycosylierungsstellen darstellen. Weiterhin liegt eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei Cysteinen (Cys 179 und Cys 214) vor. Posttranslational wird der N-Terminus um 22 Aminosäuren und der C-Terminus um 23 Aminosäuren verkürzt, wobei gleichzeitig über die Aminosäure Serin 231 eine Anknüpfung an den GPI-Anker erfolgt [53-56]. NMR-Untersuchungen eines rekombinanten unglycosylierten, von Hamstern abgeleiteten Prionenproteins mit den Aminosäureresten 90-231 ergaben, daß das PrP^c-Fragment aus drei α -helikalen Regionen und zwei kurzen β -Faltblatt-Strängen besteht (Abbildung 2) [57]. Die Bindung von Cu(II)-Ionen an die N-terminale Region induziert die Bildung einer vierten α -helikalen Domäne.

Prionenproteine sind in Neuronen und Gliazellen im zentralen Nervensystem, aber beispielsweise auch im lymphatischen Gewebe und der Plazenta zu finden. Dementsprechend ist das Prionenprotein an so unterschiedlichen zellspezifischen Prozessen wie der neuronalen Differenzierung, der Funktion von Synapsen, der Regulation circadianer Rhythmen, der T-Zellen-Aktivierung und der embryonalen Entwicklung beteiligt [58, 59].

Verschiedene Isoformen von PrP^c, PrP^{Sc} (Prion Protein Scrapie-Isoform) genannt, zeichnen sich durch eine relativ große Proteolysestabilität gegenüber Proteinase K, Hitzebeständigkeit und Unlöslichkeit in nicht denaturierenden Detergenzien aus und sind die Ursache neurodegenerativer übertragbarer Krankhei-

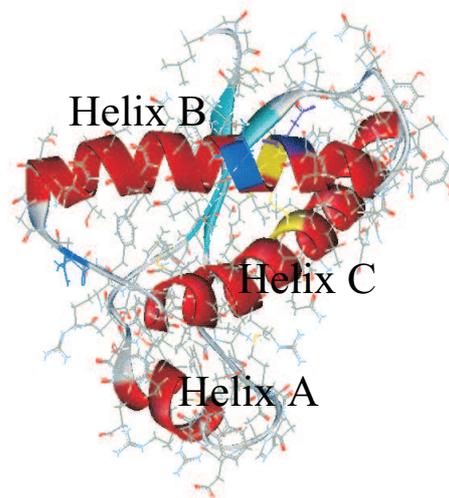


Abbildung 2: NMR-Struktur von SHA PrP90-231 [57]; Cysteine sind gelb, N-Glycosylierungsstellen sind dunkelblau dargestellt.

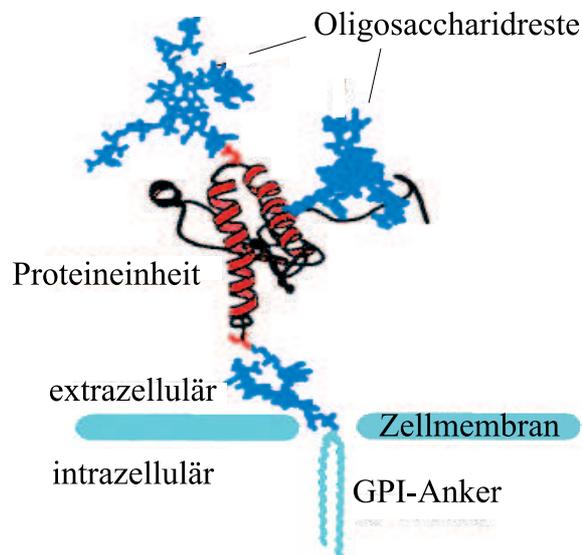


Abbildung 3: Modell eines membrangebundenen Prionen-N-Glycoproteins [63].

ten, wie BSE (bovine spongiform-Enzephalopathie), Scrapie und die beim Menschen auftretenden Phänotypen Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) und Kuru [56, 58]. Eine Infektion mit PrP^{Sc} hat eine autokatalytische konformationelle Umwandlung von PrP^c in PrP^{Sc} zur Folge [54-56, 60], wobei ein Übergang von einer überwiegend α -helikalen Struktur in eine β -Faltblatt-reiche Struktur stattfindet. Dominant vererbte neurodegenerative Krankheiten, wie das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), werden auf Mutationen des zum Prionenprotein zugehörigen Gens zurückgeführt. Die Expression dieses mutierten Gens führt zu einem Protein, das gegenüber normalem PrP^c eine geringere kinetische Barriere für die Umwandlung in das pathologische PrP^{Sc} aufweist [56, 60]. Auch andere pathologische Phänotypen, wie die Letale Familiäre Insomnie und weitere Formen der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, sind genetisch bedingt.

Das konformationell veränderte Prion wird im Körper kaum abgebaut, sondern bildet im Gehirn Ablagerungen, die sogenannten amyloiden Plaques. Obwohl der Scrapieerreger diese Plaques und die charakteristischen schwammartigen Veränderungen im Gehirn verursacht, kommt es bei den Prionenerkrankungen zu keiner Immunantwort, im Unterschied zu den meisten viralen Erkrankungen, die Immunreaktionen aufweisen.

4.3.1 Kinetische Untersuchungen zur Amyloidbildung

Die Kinetik der Amyloidbildung des Prionenproteins wurde von Baskakov *et al.* [61] mit den unglycosylierten rekombinanten Prionenproteinen recPrP 89-231 (Maus) und rec PrP 90-231 (Hamster) *in vitro* untersucht. Baskakov *et al.* fanden heraus, daß die rekombinanten Fragmente eine native α -helikale Isoform und zwei β -Faltblatt-reiche Isoformen, ein β -Oligomer beziehungsweise eine amyloide Form, ausbilden können. Zwischen der unter kinetischer Kontrolle gebildeten α -helikalen Isoform und dem β -Oligomer (überwiegend ein Oktamer) besteht hierbei ein Gleichgewicht, wobei eine Senkung des pH-Werts, denaturierende Bedingungen und eine Konzentrationserhöhung des Prionenproteins die Umwandlung in das β -Oligomer begünstigen [62]. Bei neutralem pH-Wert und niedrigen Konzentrationen denaturierender Salze beobachtete man dagegen, ausgehend von

der α -helikalen Isoform, die irreversible Bildung amyloider Strukturen. Die Bildung des β -Oligomers auf einem gesonderten Faltungsweg und dessen Redissoziation in die α -helikale Form kann gemäß Abbildung 4 als ein der Fibrillenbildung vorgelagertes Gleichgewicht angesehen werden.

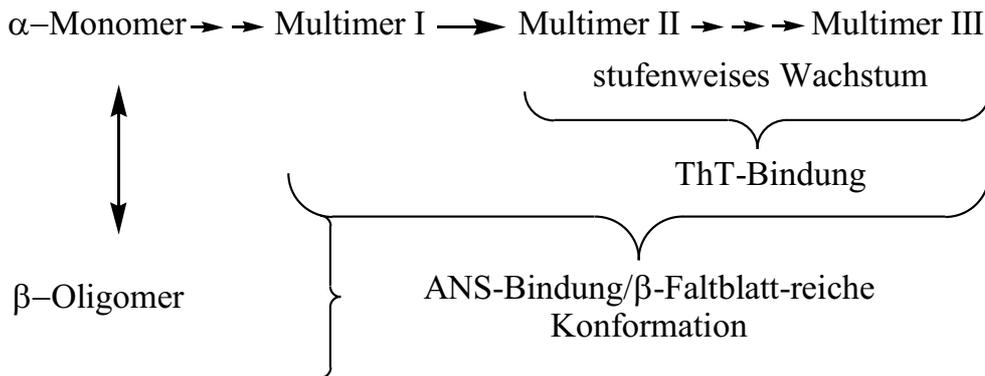


Abbildung 4: Schema der Amyloidbildung von rekombinantem PrP 89-231 (Maus) [61].

Die β -Faltblatt-reichen Isoformen weisen deutliche strukturelle Unterschiede auf. So ist eine Antikörperbindung an die Region 90-120 des β -Oligomers möglich, während diese Region in der amyloiden Form für Antikörper nicht zugänglich ist. Der Verdau mit Proteinase K liefert für das β -Oligomer ein intaktes Fragment 122-221; die amyloide Form wird dagegen von Proteinase K in mehrere kleine Fragmente aufgespalten. Bindungsstudien mit den Fluoreszenzfarbstoffen 1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure (ANS) und Thioflavin T (ThT) zeigten, daß ANS an beide β -Faltblatt-reiche Isoformen bindet. Eine Bindung an ThT wurde dagegen nur für die amyloide Isoform gefunden, wobei eine Zeitabhängigkeit in der Fluoreszenzintensität von gebundenem ThT festgestellt wurde. Das Auftreten verschieden großer Multimere bei der Ausschlußchromatographie führte zu der Schlußfolgerung, daß die Ausbildung amyloider Fibrillen mehrstufig erfolgt, wobei erst das Multimer II (Abbildung 4) einen entsprechenden amyloiden Charakter hat.

Die hier aufgezeigten Wege der Fehlfaltung rekombinanter Prionenproteine unter Bildung bestimmter β -Faltblatt-reicher Isoformen könnten die Schwierigkeiten bei den *in vitro*-Faltungsversuchen von PrPSc ohne ein geeignetes PrPSc-Templat,

aber auch die signifikanten Variationen des Erscheinungsbilds der Prionenkrankheiten erklären.

4.3.2 Die N-Glycosylierung

Prionenproteine weisen eine bemerkenswerte Heterogenität der Glycosylierung auf. Die teilweise stark verzweigten Zuckerketten können bis zu drei Sialinsäuren enthalten [63]. Dieser Kohlenhydratbaustein, der eine negative elektrische Ladung einbringt, kommt häufig auf Proteinen des zentralen Nervensystems vor. Ungewöhnlicherweise ist auch der GPI-Anker mit einer Sialinsäure modifiziert. Ein weiterer Bestandteil, 2-N-Acetyl-D-glucosamin, der als Seitenzweig der Kohlenhydratkette anhängt, ist typisch für Nervengewebe. Außerdem wurde der als Lewis^x bezeichnete Zuckertyp gefunden, der bekanntlich bei der Zell-Zell-Wechselwirkung eine Rolle spielt. Sowohl PrPc als auch die pathologischen Isoformen PrPSc setzen sich aus dem unglycosylierten Protein bzw. mono- und diglycosylierten Glycoformen zusammen. Je nach der Art des Prionenstamms, der für einen bestimmten pathologischen Phänotyp kodiert, findet man gleiche oder unterschiedliche Glycosylierungsgrade der normalen Form PrPc im Vergleich zur pathologischen Isoform PrPSc [64, 65, 66]. Die Anhäufung der pathologischen Form PrPSc und die Bildung amyloider Plaques in neuronalen Zellregionen ist abhängig von der unterschiedlichen Affinität eines infektiösen PrPSc-Prions zu PrPc, die auf zell- und ortsspezifische Unterschiede in der PrPc-Glycosylierung zurückzuführen ist [67].

Da Strukturuntersuchungen bisher nur mit nicht glycosylierten Prionenproteinen durchgeführt wurden, ist die Korrelation der Glycosylierung mit der Konformation des PrPc-Proteins unbekannt. Biologische Tests und Molekulardynamische Untersuchungen deuten darauf hin, daß die N-Glycankette die konformationelle Umwandlung zur pathologischen Form PrPSc behindert, indem PrPc durch Asparagin 197 strukturell und durch Asparagin 181 funktionell stabilisiert wird [68, 69]. Die N-Glycosylierung des Prionenproteins könnte zudem notwendig sein für die bei natürlichem, nicht jedoch bei rekombinantem PrPc beobachtete Dimerisierungsreaktion [70].

5 Chemische Reaktionen

5.1 Peptidsynthese

5.1.1 Festphasensynthese nach Merrifield

Die Grundlagen der Peptidchemie wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Emil Fischer gelegt [71]. Er entdeckte, daß Proteine aus Aminosäurebausteinen aufgebaut sind, welche ihrerseits über Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Die eindeutige Verknüpfung zweier Aminosäuren machte es erforderlich, die Carboxygruppe der einen und die Aminogruppe der anderen Aminosäure durch selektiv reversibel abspaltbare Schutzgruppen zu blockieren. Die in Lösung durchgeführten Synthesen erforderten allerdings eine sehr aufwendige Isolierung und Aufreinigung der jeweiligen Zwischenprodukte, was mit großen Ausbeuteverlusten verbunden war. Zudem waren größere Peptide in geschützter Form in den erforderlichen Lösungsmitteln oft unlöslich.

Im Jahre 1963 wurde die Peptidsynthese mit der Entwicklung der Festphasensynthese durch R. B. Merrifield [72] revolutioniert, wofür er 1985 den Nobelpreis für Chemie erhielt [73].

In der Festphasensynthese wird die C-terminale N-geschützte Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids über einen Linker mit einem festen, filtrierbaren polymeren Träger verbunden. Um das Problem der Racemisierung während der Bildung der Peptidbindung zu minimieren, wird das Peptid hier in entgegengesetzter Richtung der Proteinbiosynthese aufgebaut [74]. Zur Unterdrückung von Nebenreaktionen werden reaktive Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren ebenfalls mit Schutzgruppen blockiert. Da die Synthese in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann und eine einfache Reinigung der Zwischenprodukte durch Waschen und Filtrieren möglich ist, läßt sich dieser Prozeß auch automatisieren.

Als polymerer Träger wird ein in Form von Harzkügelchen mit 1-2 % Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol verwendet [75]. Dieses Copolymer bildet kleine Kügelchen (100-400 Mesh), die in organischen Lösungsmitteln, wie DCM

oder DMF, um das Fünf- bis Zehnfache ihres ursprünglichen Volumens quellen. Mit wachsender Peptidkette nimmt sowohl das Trocken- als auch das Quellvolumen zu, was darauf hinweist, daß die Polystyrolmatrix und das gebundene Peptid während der Reaktion stark solvatisiert und somit für diffundierende Reagenzien leicht zugänglich sind. Weiterhin zeigten Autoradiographiemessungen mit Tritium-markierten Peptiden, daß die Reaktionen nicht nur an der Oberfläche, sondern auch im Matrixinneren des Polymers stattfinden [73].

Für jede Synthese- und Schutzgruppenstrategie werden passende Linker eingesetzt; nach der Abspaltung können die Peptide dementsprechend als Carbonsäuren, Amide, Thiocarbonsäuren, Thioester oder Hydrazide vorliegen [76]. Die Abspaltung von der festen Phase kann sowohl sauer, basisch, nukleophil oder photochemisch erfolgen. Diese unterschiedlichen Methoden ermöglichen sogar die Spaltung des Peptids vom Harz unter Erhaltung der Seitenkettenschutzgruppen. Die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen unter Erhalt der Polymer-Peptid-Bindung ist ebenfalls möglich.

5.1.2 Verwendete Harze für die Peptidchemie

Fmoc-Chemie

Rink-Amid-MBHA-Harz, NovaSyn® TGR-Harz

Im Hinblick auf die Synthese α -helikaler Peptide bieten sich Harze an, die nach Abspaltung des Linkers Peptidamide liefern, denn freie terminale Carboxylatgruppen destabilisieren kleine α -helikale Peptide durch ihre negative Wechselwirkung mit dem Helixdipol [77].

Das Rink-Amid-MBHA-Harz verfügt über ausgezeichnete Quelleigenschaften; es besteht aus der herkömmlichen mit 1 % Divinylbenzol quervernetzten Polystyrolmatrix, die mit 4-Methylbenzhydrylamin derivatisiert ist. Dabei ist der Rink-Amid-Linker (4-(2',4'-Dimethoxy-phenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy-) über Norleucin an das MBHA-Harz gekuppelt [78]. Nach Entfernung der Aminoschutzgruppen mit Piperidin in DMF kann die C-terminale Aminosäure mit dem Linker verknüpft werden. Nach Aufbau der Peptidkette kann unter sauren Be-

dingungen gleichzeitig die Harzabspaltung des Peptids und die Abspaltung der verwendeten Seitenkettenschutzgruppen der einzelnen Aminosäuren erfolgen.

Alternativ wurde das NovaSyn® TGR-Harz verwendet. Es besteht aus wenig verzweigtem Polystyrol und einem Polyethylenglycol-Linker. Die PEG-Kette ist endständig mit einem Rink-Linker modifiziert. Vorteil des NovaSyn® TGR-Harzes gegenüber dem Rink-Amid-MBHA-Harz ist, daß die Aminosäure ohne vorherige Fmoc-Abspaltung direkt an die freie NH₂-Gruppe des Harzes gekuppelt werden kann [78].

Wang-Harz, NovaSyn® TGA-Harz

Die Harze für die Synthese von Peptidsäuren sind zum einen das auf PEG und Polystyrol basierende NovaSyn® TGA-Harz. Es zeichnet sich durch einen säurelabilen Hydroxymethylphenoxyessigsäure-Linker aus.

Zum anderen wurde das Wang-Harz verwendet, das sich aus einer Polystyrolmatrix und einem direkt daran gebundenen Hydroxymethylphenoxymethyl-Linker besteht. Die Anknüpfung der ersten Aminosäure gelingt beispielsweise durch MSNT/MeIm-Aktivierung; die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit 80-90 % TFA [78].

4-Sulfamylbutyryl AM-Harz

Das 4-Sulfamylbutyryl AM-Harz basiert auf Kenners Acylsulfonamid „Safety Catch“-Linker und eignet sich zur Synthese einer Reihe von Carboxylsäurederivaten [78]. Die Harzbelegung erfolgt mit PyBOP und DIEA in CHCl₃ bei minus 20°C oder DIC und MeIm in DCM. Die Peptid-Harzbindung ist stabil gegenüber basischen oder stark nukleophilen Reagenzien und kompatibel mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. Zur Abspaltung des Peptids wird zunächst das Sulfonamid mit Diazomethan, Iodacetonitril oder TMSCHN₂ aktiviert. Dann erfolgt die Spaltung vom Träger mit primären und sekundären Aminen, Thiolen oder Hydroxiden. So ist die Darstellung von Carbonsäureamiden, Thioestern oder Carbonsäuren möglich. Elektronenziehende Substituenten in der Seitenkette der ersten Aminosäure führen zu einer größeren Nukleophilie des entsprechenden Acylsulfonamids und sind bei der Verwendung dieses Harzes bevorzugt.

Boc-Chemie**MBHA-Harz**

Das Standard-Harz für die Synthese von Peptidamiden nach der Boc-Chemie ist das MBHA-Harz. Aminosäuren können nach Standardpeptidkupplungsmethoden an das Harz geknüpft werden; die Harzabspaltung der Peptidamide erfolgt mit HF oder TFMSA [78].

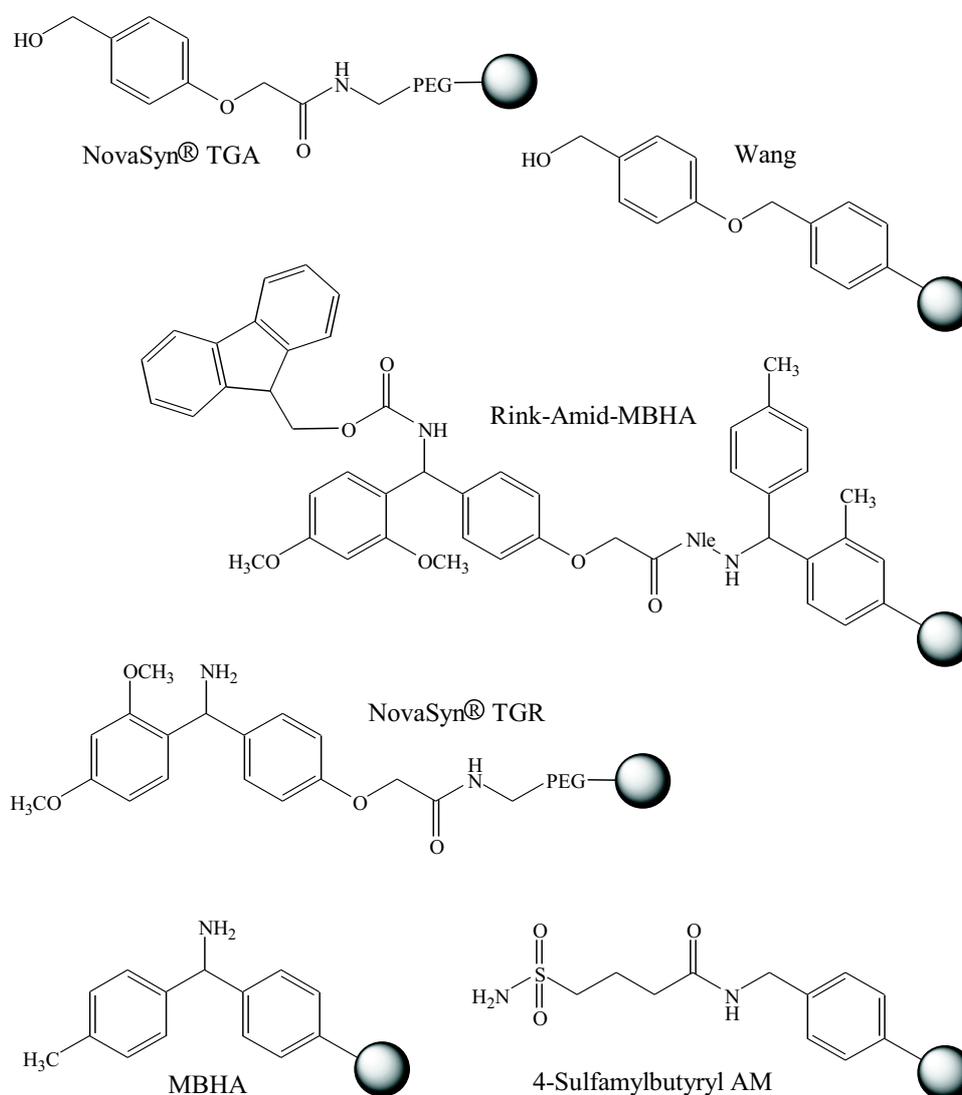


Abbildung 5: Verwendete Harze für die Peptidchemie [78].

5.1.3 Aktivierungsmethoden

Seit dem Beginn der Peptidsynthese Anfang dieses Jahrhunderts wurden zahlreiche Aktivierungsmethoden zur Kupplung von Aminosäuren entwickelt. Doch alle Verfahren besitzen eine grundsätzliche Gemeinsamkeit:

Die Reaktivität der Carboxygruppe wird gegenüber der nukleophilen α -Aminogruppe der Aminokomponente durch eine elektronenziehende aktivierende Gruppe erhöht.

Während früher das Azidverfahren [79], die Säurechlorid-Methode [80], das symmetrische [81] und asymmetrische Anhydridverfahren [82] zu den gängigen Kupplungsmethoden zählten, wird heute die Bildung von Aktivestern [83] als eine äußerst effektive Kupplungsmethode angewendet. Hierzu werden in der Regel ein Carbodiimid als Wasserakzeptor [84] und ein Alkohol, beispielsweise p-Nitrophenol oder Pentafluorphenol, eingesetzt.

In der Festphasensynthese haben sich die von König und Geiger [85] eingeführten Aza-Alkohole, wie z. B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), bewährt. Aktivester dieser Alkohole zeichnen sich durch ihre geringe Neigung zur Racemisierung und ihre reaktionsbeschleunigenden Eigenschaften aus. Sie werden nach dem in Abbildung 6 dargestellten Mechanismus gebildet.

Die Aminosäure reagiert mit dem Carbodiimid zu einem O-Acylisoharnstoffderivat, das mit HOBt einen Aktivester bildet. Als Nebenprodukt entsteht ein Harnstoffderivat, das bei der Verwendung eines Carbodiimids mit Isopropylresten nach der Kupplung aufgrund seiner Löslichkeit leicht vom polymergebundenen Peptid getrennt werden kann. Im nächsten Schritt wird der Aktivester nukleophil durch den Aminoterminus der wachsenden Peptidkette angegriffen, und es entstehen das verlängerte Peptid und HOBt.

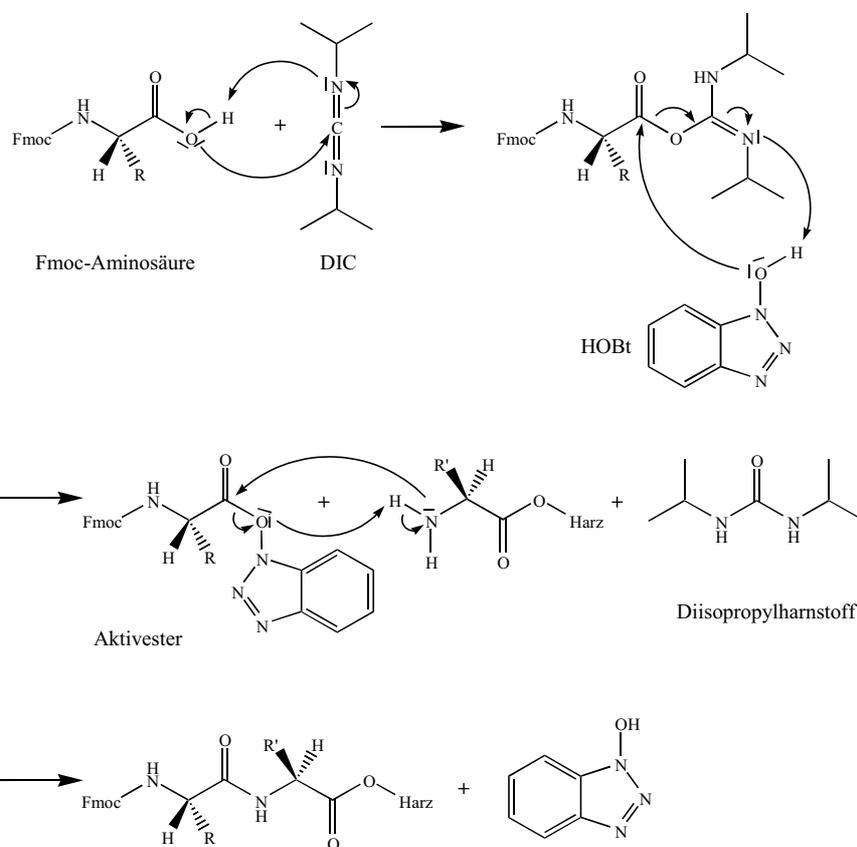


Abbildung 6: *In situ*-Kupplung zweier Aminosäuren mit DIC und HOBT.

Aufgrund verschiedener Nebenreaktionen bei der Aktivierung mit Carbodiimiden (N-Acylharnstoffbildung, Nitrilbildung und ähnliches) wurden salzartige Uroniumreagenzien, wie z. B. 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder das analoge 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), in die Peptidsynthese eingeführt [86, 87]. Bei Verwendung solcher Reagenzien sind die Reaktionszeiten in der Regel noch kürzer, und es besteht nur geringe Racemisierungsgefahr. Diese Aktivester werden nach dem in Abbildung 7 gezeigten Mechanismus dargestellt.

Die Aminosäure wird durch die Base (meist eine Hünig-Base) deprotoniert und greift dann nukleophil den Uroniumkohlenstoff von TBTU an. Wiederum entsteht ein O-Acylisoharnstoffderivat, das mit HOBT einen Aktivester bildet. Dieser bildet mit dem Aminoterminus der Peptidkette die neue Peptidbindung.

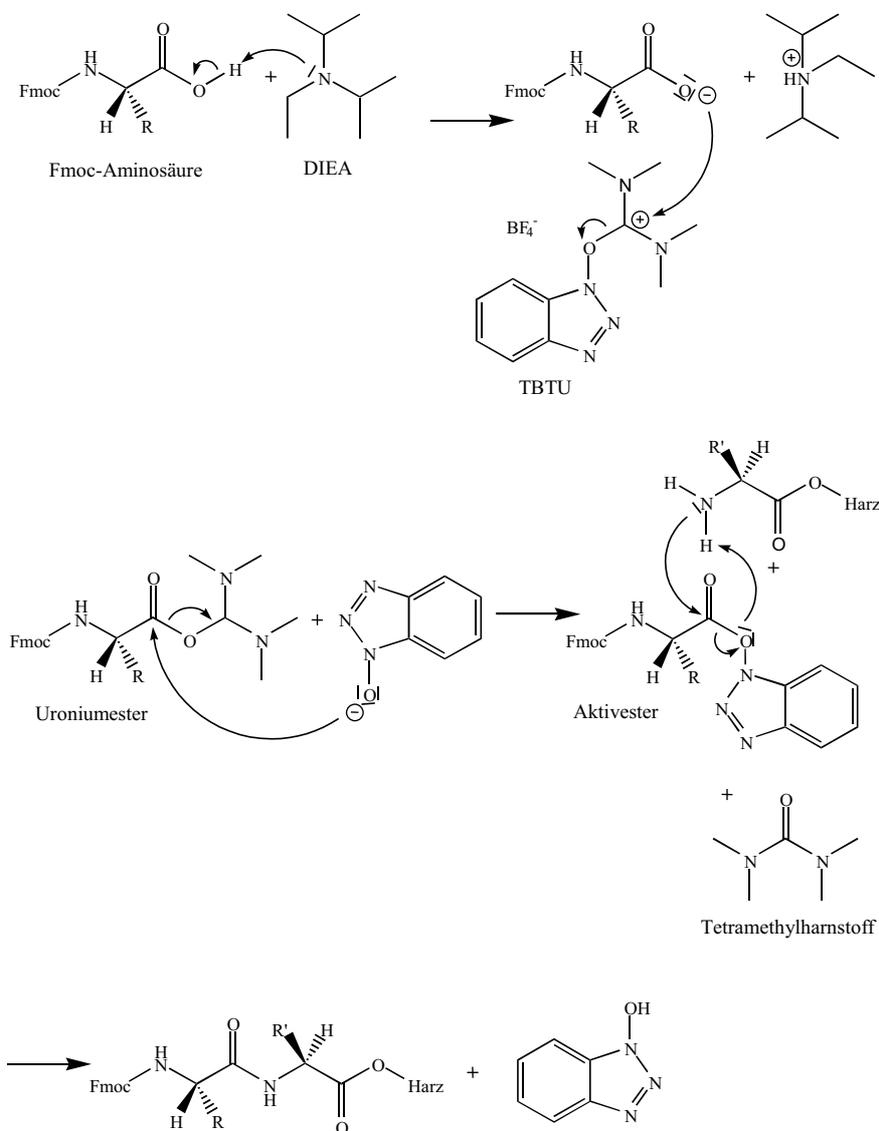


Abbildung 7: Kupplung zweier Aminosäuren mit TBTU und DIEA.

Eine weitere Verbesserung stellt das von Carpino [88] eingeführte 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) dar. Es soll die Kupplung von sterisch gehinderten Reaktionspartnern mit hohen Ausbeuten ermöglichen und die Kupplung bei noch geringerer Racemisierungsrate deutlich beschleunigen. Das analoge Uroniumsalz HATU ist mittlerweile auch kommerziell erhältlich.

Es wird angenommen, daß die Vorteile von HOAt/HATU durch den in Abbildung

8 dargestellten Nachbargruppeneffekt hervorgerufen werden. Der N-Terminus des am Harz gebundenen Peptids wird durch die dargestellten Wasserstoffbrückenbindungen in die räumliche Nähe der Carboxygruppe der zu kuppelnden Aminosäure gebracht, so daß die Bildung der Peptidbindung erleichtert wird.

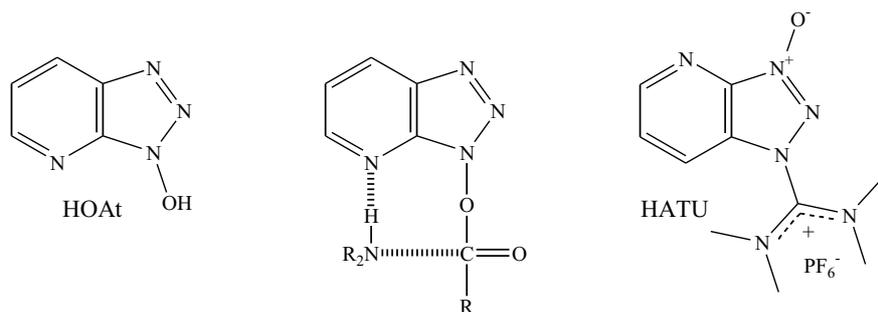


Abbildung 8: Die Kupplungsreagenzien HOAt und HATU und der Nachbargruppeneffekt [88].

5.1.4 Der Ninhydrintest

Die Festphasensynthese erfordert eine zuverlässige Kontrollmethode, um die Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen zu überprüfen. Zur Detektion wird eine durch Ninhydrin hervorgerufene Farbreaktion verwendet [89]. E. Kaiser konnte diese Reaktion durch die Zugabe weiterer Reagenzien der Festphasensynthese anpassen und die Empfindlichkeit des Nachweises deutlich steigern [90]. Mit dem nach ihm benannten Kaiser-Test ist man mit bloßem Auge in der Lage, nahezu quantitative Kupplungsausbeuten zu erkennen.

Wird Ninhydrin in Anwesenheit einer freien Aminogruppe erhitzt, so entsteht unter Transaminierung ein intensiv blaues Molekül namens Ruhemanns Purple [91]. Sowohl die Lösung als auch die Harzkügelchen färben sich dabei blau. In diesem Fall sind die Kupplungsreaktionen bis zu einem negativen Ergebnis des Kaiser-Tests fortzusetzen. Der Ninhydrin-Test kann auch UV-spektrometrisch bei 570 nm quantitativ ausgewertet werden [91].

5.1.5 Die Schutzgruppentechnik

Unter den vielen Schutzgruppentechniken der Peptidchemie hat sich neben der von Merrifield eingeführten Boc/Benzyl-Strategie die auf Caprino und Han [92] aufbauende Fmoc/t-Butyl-Strategie besonders bewährt. Hierbei sind Boc beziehungsweise Fmoc die Schutzgruppen des N-Terminus, die nach jeder Kupplung gleich wieder vom Zwischenprodukt abgespalten werden, weshalb man sie als transiente Schutzgruppen bezeichnet. Semipermanent sind Schutzgruppen vom Benzyl- beziehungsweise t-Butyl-Typ, die die Seitenkettenfunktionen trifunktionaler Aminosäuren abschirmen sollen und während der ganzen Synthese unverändert bleiben müssen.

Das orthogonale Schutzgruppensystem der Fmoc/t-Butyl-Strategie

In der Fmoc-Chemie wird ein orthogonales Schutzgruppensystem verwendet: Die Fmoc-Schutzgruppe wird unter alkalischen Bedingungen (20-40 % Piperidin in DMF) entfernt, während die Seitenkettenschutzgruppen unter sauren Bedingungen mit TFA abgespalten werden. Unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung bleiben die Seitenkettenschutzgruppen völlig stabil, wohingegen die Fmoc-Gruppe im sauren Medium intakt bleibt.

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgt gemäß Abbildung 9. Zunächst wird das Proton am C9-Atom des Fluorenylsystems aufgrund seiner Acidität durch Piperidin abstrahiert, wodurch in einer baseninduzierten β -Eliminierung Dibenzofulven und ein instabiles Carbaminsäurederivat entstehen. Letzteres lagert sich unter Decarboxylierung zum freien Amin um. Das intermediär gebildete Dibenzofulven setzt sich schließlich mit Piperidin zu einem Addukt um, das nicht mehr weiterreagiert. Das Dibenzofulven-Addukt weist eine Absorption bei etwa 300 nm auf, so daß der Deblockierungsvorgang am UV-Spektrometer verfolgt werden kann.

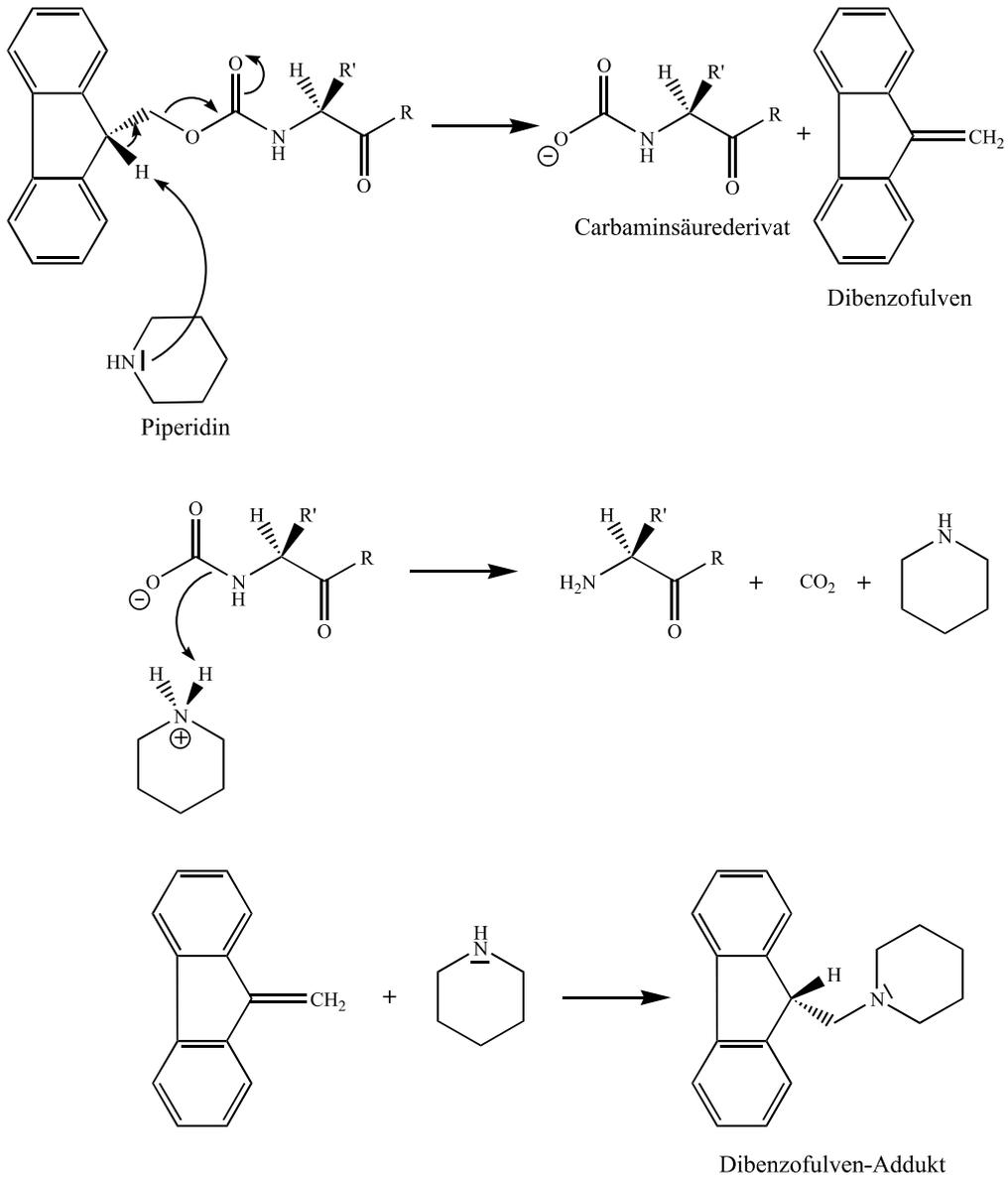


Abbildung 9: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Die Seitenkettenschutzgruppen der Fmoc-Chemie

Zu den Seitenkettenschutzgruppen der Fmoc/t-Butyl-Strategie zählen neben der für Säure- und Alkoholfunktionen verwendeten t-Butylschutzgruppe die sowohl für Amid- als auch für Alkoholfunktionen geeignete Tritylgruppe, die für Aminogruppen eingesetzte Boc-Schutzgruppe und die für die Guanidinium-Funktion von Arginin verwendete Pmc-Schutzgruppe (Abbildung 10).

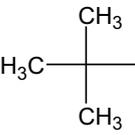
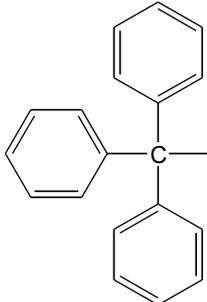
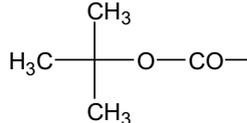
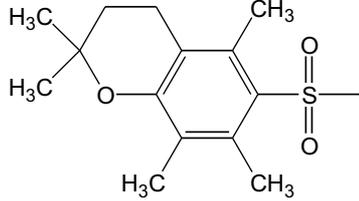
Asp Glu Ser Thr Tyr	 t-Butyl
Cys His Asn Gln	 Trityl
Lys Trp	 Boc
Arg	 Pmc

Abbildung 10: Mit TFA abspaltbare Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren in der Fmoc-Chemie.

Das dreidimensionale orthogonale Schutzgruppensystem der Fmoc-Chemie

Für die Glycopeptidsynthese ist es erforderlich, die Seitenkettenfunktion des Asparaginsäurerests innerhalb des Peptidstrangs selektiv unter Erhalt der anderen Seitenkettenschutzgruppen zu entschützen. Hierzu bietet es sich an, als Asparaginsäurebaustein ein β -Allyl-geschütztes Asparaginsäurederivat zu verwenden.

Durch die erst in den letzten Jahren in den Vordergrund gerückte Allyl-Schutzgruppe kann das orthogonale Schutzgruppensystem der Fmoc-Chemie um eine zusätzliche Dimension erweitert werden (Abbildung 11).

Die Allylschutzgruppe kann Pd-katalytisch mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) abgespalten werden und bleibt unter sauren und basischen Bedingungen stabil [93, 94, 95].

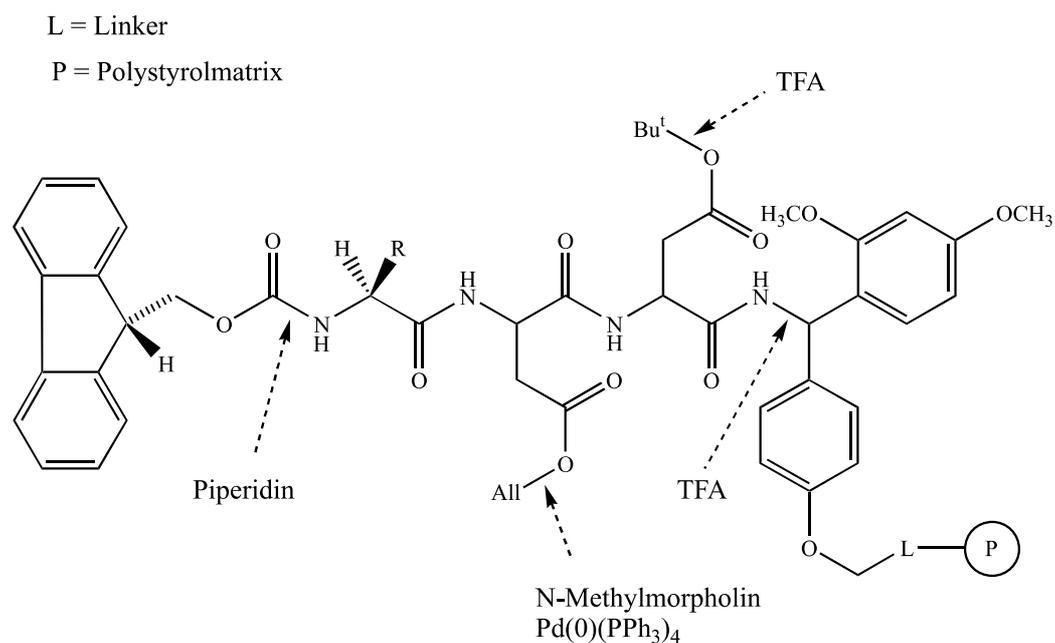


Abbildung 11: Dreidimensionales orthogonales Schutzgruppensystem der Fmoc-Chemie.

Das orthogonale Schutzgruppensystem der Boc-Strategie

Die Boc-/Benzyl-Strategie beruht auf einer abgestuften Säurelabilität von transienten und semipermanenten Schutzgruppen [75]. Hierbei wird die Boc-Gruppe mit einer 50-80%igen Lösung von TFA in DCM abgespalten, wogegen die vollständige Entschützung des synthetisierten Peptids mit wasserfreiem Fluorwasserstoff oder Trifluormethansulfonsäure erfolgt. Die Seitenkettenschutzgruppen der Boc-Chemie sind in Abbildung 12 aufgeführt.

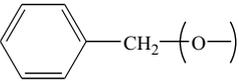
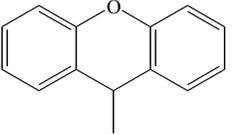
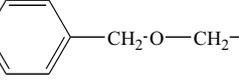
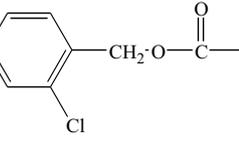
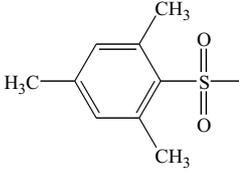
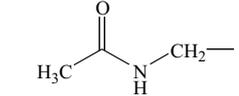
Asp Glu Ser Thr Tyr		Benzyloxy
Asn Gln		Xanthyl
His		Benzyloxymethyl
Lys		2-Chlorobenzyloxycarbonyl
Arg		Mesitylen-2-sulfonyl
Cys		Acetamidomethyl

Abbildung 12: Mit TFMSA abspaltbare Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren in der Boc-Chemie.

5.1.6 Die Harzabspaltung

Die saure Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen am Ende der Synthese kann gleichzeitig mit der Trennung des Peptids vom Harz erfolgen. In der Fmoc-Chemie wird hierzu in der Regel 95%ige TFA mit einem Zusatz ausgewählter scavenger eingesetzt, wobei für jede Peptidsequenz die Dauer der Schutzgruppen- und Harzabspaltung optimiert werden muß. Die zugesetzten scavenger sollen die bei der Abspaltung entstehenden reaktiven Spezies, wie t-Butyl- oder Tritylkationen, abfangen [96]. Somit können viele Nebenreaktionen, etwa nachträgliche Alkylierungen, verhindert werden.

Eine vielfach bewährte Reagenzmischung (Reagenz K) wurde von King *et al.* vorgestellt [97]. Sie besteht aus:

82.5 % TFA, 5 % H₂O, 5 % Thioanisol, 5 % Phenol, 2.5 % Ethandithiol (EDT).

Die Schutzgruppenabspaltung in der Boc-Chemie erfolgt entweder mit HF oder wesentlich milder mit einer Mischung aus 75 % TFA, 15 % TFMSA, 7 % Thioanisol, 3 % Ethandithiol (EDT) [96].

5.1.7 Probleme der Peptidreindarstellung

Ein Nachteil der Festphasensynthese ist die Tatsache, daß während einer vielstufigen Synthese keine Reinigung der Zwischenprodukte möglich ist, so daß alle unerwünschten Nebenprodukte bis zum Ende der Synthese am polymeren Träger verbleiben. Im günstigsten Fall müßte also jeder Reaktionsschritt eindeutig und quantitativ verlaufen.

Rumpf- und Fehlsequenzen

Die auf der Polymermatrix aufgebaute, wachsende Peptidkette ist über intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung zur Ausbildung von Sekundärstrukturen fähig.

Intermolekulare Assoziationen über sekundäre Amidbindungen des Peptidrückgrats führen hauptsächlich zur Ausbildung von β -Faltblättern.

Die Aggregation mit anderen Peptidketten oder mit dem polymeren Träger in sterisch anspruchsvollen Sequenzen bedingt eine Verminderung des Harzvolumens, eine geringere Solvatation desselben und die erschwerte Penetration der Reagenzien in das Matrixinnere. Die Folge ist eine Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Kupplungsausbeuten [98]. Die Aggregationsfähigkeit ist wiederum abhängig von der Art der verwendeten Aminosäuren, der Schutzgruppen und der Ladung des Peptids. So können Sequenzen mit einem hohen Anteil an Ala, Val, Ile, Asn, Gln sowie hydrophobe Schutzgruppen, wie die Tritylschutzgruppe, und hohe Ladungen die Aggregation begünstigen.

Unvollständige Kupplungsreaktionen sowie die unvollständige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe führen zu Rumpf- und Fehlsequenzen [74], wie sie in Abbildung 13 exemplarisch dargestellt sind.

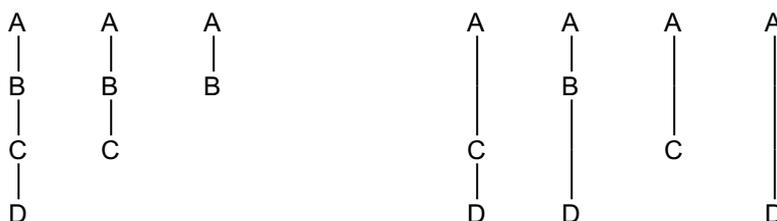


Abbildung 13: Beispiele für Rumpf- und Fehlsequenzen.

Racemisierungen

Durch die Zugabe von Basen oder Säuren zu aktivierten Acylaminosäuren kann es durch eine reversible Deprotonierung am $C\alpha$ -Atom zu Epimerisierungen kommen [99]. Hierbei genügen schon Spuren von Säuren beziehungsweise Basen als Verunreinigung der eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel für eine Racematbildung. Durch hohe Temperaturen und polare Lösungsmittel wird die Racemisierung noch begünstigt.

Im sauren Medium findet eine Protonierung des Carbonylsauerstoffs mit anschließender reversibler Enolisierung statt (Abbildung 14 a). Im basischen Medium sind mehrere Mechanismen der Racemisierung bekannt. Der einfachste denkbare Fall ist die reversible Protonierung beziehungsweise Deprotonierung der $C\alpha$ -Position (Abbildung 14 b).

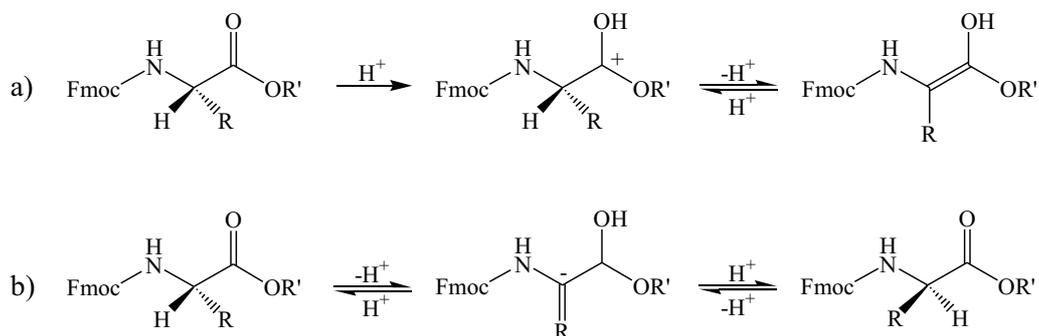


Abbildung 14: a) Racematbildung durch reversible Enolisierung eines Aminosäurerests unter Einwirkung einer Säure. b) Racematbildung durch reversible Protonierung/Deprotonierung der C α -Position eines Aminosäurerests.

Aspartimidbildung

Sowohl ungeschützte als auch geschützte Asparaginsäure geht unter basischen sowie sauren Bedingungen unerwünschte Nebenreaktionen ein, was auf ihre Neigung zur Dehydratisierung, Transpeptidierung und Epimerisierung zurückzuführen ist [100].

Die Bildung eines Aspartimids erfolgt durch basenkatalysierte Abstraktion des Aspartylamid-Protons und anschließendem nukleophilen Angriff auf die β -Carboxygruppe.

Sowohl bei der Fmoc-Abspaltung durch Piperidin als auch bei der Aktivesterbildung mit TBTU/DIEA kann eine Deprotonierung des Aspartylamid-Protons erfolgen.

Die diese Reaktion begünstigenden Faktoren sind die Größe der verwendeten β -Carboxyschutzgruppe, der C-terminale Aminosäurerest der Aspartylbindung sowie die zunehmende Länge der Peptidkette [101]. Offer *et al.* [102] haben gezeigt, daß bei (β -O-Allyl)-geschützten Asparaginsäureresten die Aspartimidbildung gegenüber (β -O-tBu)-geschützten Asparaginsäureresten durch den geringeren sterischen Anspruch begünstigt ist. Weiterhin fördern C-terminal zur Asparaginsäure benachbarte Aminosäurereste, wie Ala, Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, die Aspartimidbildung.

Unter den zur Entschützung und Abspaltung des Peptids notwendigen sauren Be-

dingungen kann das Aspartimid wieder zum ursprünglichen Peptid oder zum entsprechenden Isopeptid geöffnet werden (Abbildung 15).

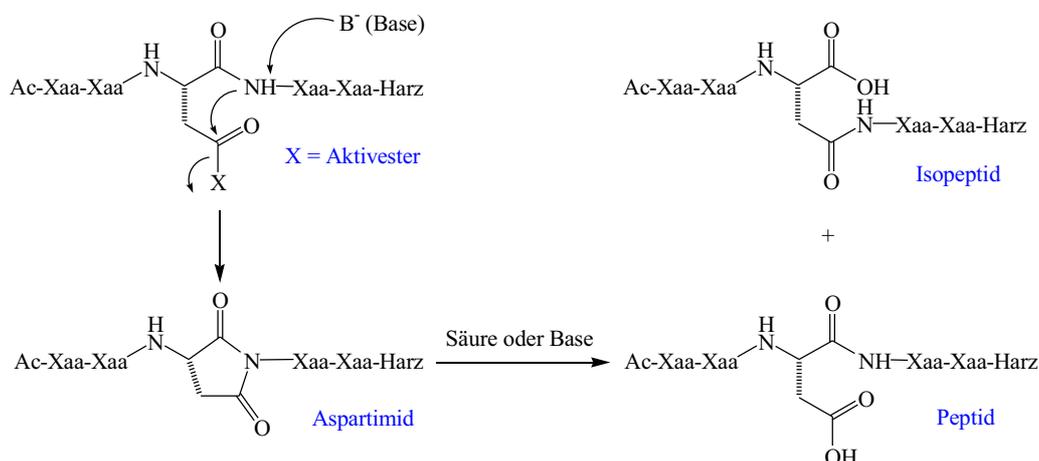


Abbildung 15: Bildung und Öffnung eines Aspartimids. Xaa steht für eine beliebige Aminosäure.

Die 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl(Hmb)-Schutzgruppe

Durch den Ersatz des zu Asparaginsäure beziehungsweise Asparagin benachbarten C-terminalen NH-Protons durch die Hmb-Schutzgruppe kann die Aspartimidbildung während der Peptid- und der anschließenden Glycopeptidsynthese verhindert werden [103, 104].

Mit der Einführung dieser Schutzgruppe wird der Initialschritt der Aspartimidbildung, die Deprotonierung des betreffenden NH, hinfällig.

Die Hmb-Schutzgruppe hat sich darüber hinaus auch bei der Synthese sterisch anspruchsvoller Peptidsequenzen bewährt [100]. Am Amidstickstoff geschützte Peptide unterdrücken effektiv intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, die durch das Peptidrückgrat ausgebildet werden und die Peptidsynthese enorm erschweren können. Auch die Reaktionsgeschwindigkeit und die Ausbeuten von Fragmentkondensationen können durch den Einbau der Hmb-Schutzgruppe erhöht werden, da, ebenfalls als Folge der reduzierten Wasserstoffbrückenbindungen, die Löslichkeit größerer Peptidfragmente gesteigert wird [98, 105].

Problematisch bei der Einführung eines Hmb-geschützten Aminosäurebausteins in der Peptidsynthese bleibt dagegen der relativ große sterische Anspruch des 2-Hydroxy-4-methoxybenzylrests. Sowohl bei der Kupplung der Hmb-geschützten Aminosäure an das vorhandene Peptid als auch bei der Ankupplung der nächsten Aminosäure sind relativ lange Reaktionszeiten zu erwarten, wobei dann Racemisierungen nicht ausgeschlossen werden können.

Zumindest die Kupplung der nächsten Aminosäure an das Hmb-geschützte Peptid wird dadurch beschleunigt, daß vorerst die phenolische Hydroxylgruppe über eine interne Basenkatalyse acyliert wird und anschließend ein intramolekularer Acyltransfer auf die freie Aminogruppe erfolgt [96]. Der Mechanismus dieser Acylierung ist in Abbildung 16 dargestellt.

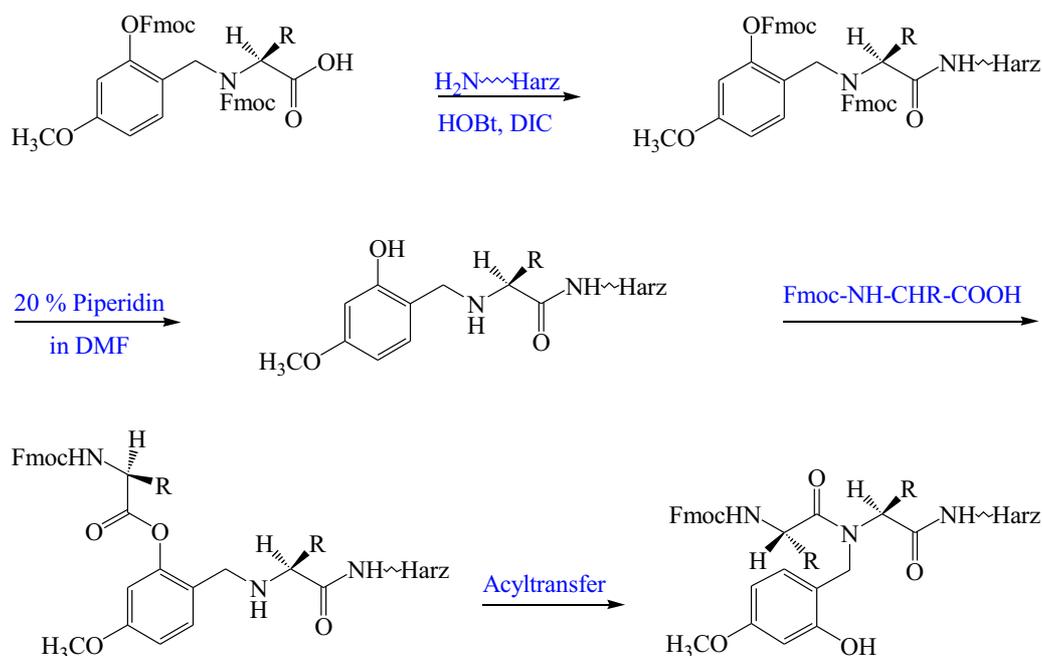


Abbildung 16: Mechanismus der Acylierung Hmb-geschützter Peptide [96].

Die Hmb-Schutzgruppe läßt sich unter den normalen sauren Abspaltbedingungen der Fmoc-Chemie entfernen. Für die Entschützung und Harzabspaltung Hmb-geschützter Peptide wird eine Abspatlösung mit 91 % TFA, 3 % H_2O , 3 % EDT und 3 % TES empfohlen [96].

Um Nebenreaktionen in der Glycopeptidsynthese zu vermeiden, bietet es sich

an, die Hmb-Schutzgruppe am fertig synthetisierten harzgebundenen Peptid zu acylieren. Dazu verwendet man in der Regel Acetanhydrid in Anwesenheit von Ethyldiisopropylamin oder Triethylamin [102].

Die Ac-Hmb-Schutzgruppe bleibt unter den oben genannten sauren Abspaltbedingungen intakt, so daß zur vollständigen Entschützung des Peptids zuvor eine Deacylierung der Ac-Hmb-Gruppe mit 5%igem Hydrazin-Monohydrat in DMF (v/v) notwendig ist [102].

5.2 Zuckersynthese

5.2.1 Darstellung von Chitobiosederivaten aus Chitin

Peracetylierte Chitobiose kann aus Poly- β -(1-4)-N-Acetyl-D-Glucosamin (Chitin), einem Polysaccharid, welches die Gerüstsubstanz der Insekten und Schalentiere bildet, gewonnen werden. Durch Acetolyse mit Acetanhydrid/Schwefelsäure bei erhöhter Temperatur entstehen aus Chitin die acetylierten Mono-, Di- und Oligomere neben einer Vielzahl von Eliminierungs- und Spaltprodukten. Bei der Produktverteilung spielen die Temperatur und die Reaktionszeit eine wichtige Rolle [106]. Es wurde mitunter festgestellt, daß bei einer Reaktionstemperatur von 55 °C das Tetramer nach 3 h, das Trimer nach 3.5 h und das Dimer nach 8-11 h ihre maximale Konzentration erreichen. Das gewünschte Disaccharid, eine peracetylierte Chitobiose, kann in 10%iger Ausbeute isoliert werden.

Mit Chlorwasserstoff in Acetylchlorid läßt sich das α -Acetat in das α -Chlorid überführen. Die acetylierten Chitobiosederivate weisen eine hohe Säurestabilität auf, so daß trotz der stark sauren Bedingungen und der langen Reaktionszeit von 2-3 Tagen keine Spaltung der interglycosidischen Bindung eintritt. Aus dem α -Chlorid entsteht unter Phasentransferbedingungen mit Natriumazid und Tri-N-caprylmethyl-ammoniumchlorid (Aliquat 336) das entsprechende β -Azid (Abbildung 17).

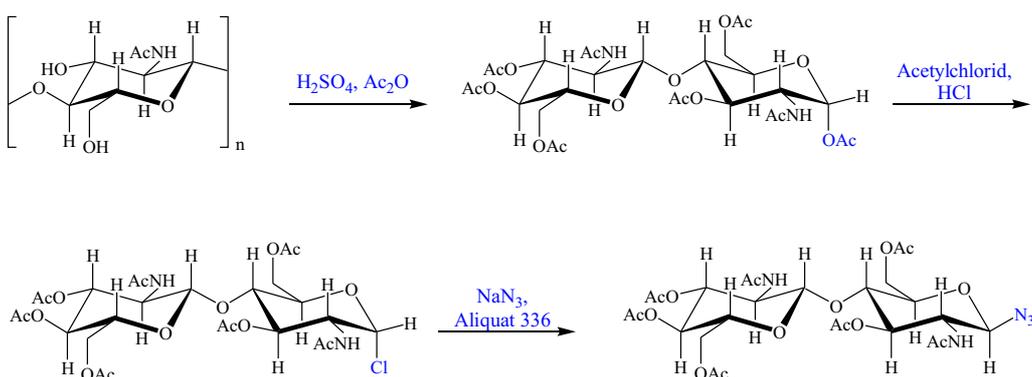


Abbildung 17: Bildung eines Chitobiosylazids aus Chitin.

5.2.2 Reduktion von Zucker-Aziden

1-Aminozucker können aus 1-Azidozuckern durch katalytische Hydrierung, etwa mit Raney-Nickel, Platinoxid oder Palladium auf Aktivkohle als Katalysatoren, erhalten werden [95, 107]. Hierzu wird aus Stabilitätsgründen empfohlen, einen Acetyl-geschützten Azidozucker zu wählen, der nach der Reduktion direkt umgesetzt werden sollte. Das gängige Lösungsmittel Methanol sollte durch das Lösungsmittelgemisch Dioxan/Ethanol 2:1 ersetzt werden, da es insbesondere für größere geschützte Zucker bessere Löslichkeits-vermittelnde Eigenschaften hat und eine unter Verwendung von Methanol beobachtete Schutzgruppenabspaltung nicht auftritt.

5.2.3 Abspaltung von Zuckerschutzgruppen

Acetylschutzgruppen

Für die Deacetylierung von Zucker-OH-Funktionen bieten sich verschiedene basische Reagenzien an. In der Festphasensynthese ist ein Gemisch von 20-30 % Hydrazin in DMF geeignet, während man in Lösung beispielsweise 100 mM NaOMe in Methanol oder 33 % Methylamin in H₂O verwendet [108].

Benzylschutzgruppen

Benzylschutzgruppen werden hydrogenolytisch mit Pd auf Aktivkohle in einem Essigsäure/Methanol-Gemisch (3:2) abgespalten. Da die Schutzgruppenabspaltung bei großen, räumlich anspruchsvollen Zuckerresten erschwert ist, treten mitunter Reaktionszeiten von bis zu 10 h und mehr auf.

Phthalimidoschutzgruppen

Die Phthalimidoschutzgruppe kann unter Verwendung von Ethylendiamin in n-Butanol bei 90 °C quantitativ abgespalten werden. Sie dient in der Glycosid-synthese als Vorläuferschutzgruppe der 2-Amidofunktion von Zuckern, die letztlich mit Pyridin und Acetanhydrid N-acetyliert werden soll [108].

Benzacetale

Benzacetale in Form von 6-gliedrigen Acetalringen werden zum Schutz von zwei OH-Funktionen, etwa in Form von 4,6-O-Benzylidenderivaten, verwendet. Sie können über katalytische Hydrierung, aber auch sauer mit TFA abgespalten werden [109].

5.3 Klassische N-Glycopeptidsynthese

Für die chemische Synthese von N-Glycopeptiden lassen sich Synthesen in Lösung und Festphasensynthesen unterscheiden.

Glycopeptidsynthesen in Lösung wurden eingehend von R. W. Jeanloz *et al.* [110] und H. Kunz [95] untersucht. Sie reduzierten 1-Azidozucker zum entsprechenden 1-Aminozucker, der dann mit einem selektiv geschützten Asparaginsäurederivat unter Peptidaktivierung zur Glycosylaminosäure umgesetzt wurde. Solche Glycosylaminosäurebausteine wurden auch mit Oligosacchariden dargestellt [10, 95, 111]. Nach Entfernung der Aminosäureschutzgruppen ist sowohl eine N- als auch eine C-terminale Verlängerung zu einem N-Glycopeptid möglich. Nachteil einer linearen Glycopeptidsynthese ist auf der einen Seite, daß die Kupplungszeiten mit der Größe des Oligosaccharids zunehmen. Auf der anderen Seite muß ein großer Überschuß eines vielleicht schwerverfügbaren Zuckers eingesetzt werden, da durch die weiteren Kupplungs- und Entschützungs-schritte die Gesamtausbeute von eingesetztem Oligosaccharid zum gewünschten Glycopeptid gering ist. Dies gilt vor allem für solche Oligosaccharide, deren O-glycosidischen Bindungen empfindlich gegenüber den sauren Abspaltbedingungen der Seitenkettenschutzgruppen sind [112].

Die Kupplung von Aminozuckern an Asparaginsäurereste, die Teil eines Peptids sind, beseitigt diese Nachteile. Bei dieser konvergenten Synthese bestehen die Schwierigkeiten dagegen in der geringen Reaktivität von Peptiden gegenüber größeren Zuckerbausteinen und der Neigung zur Aspartimidbildung [112].

Glycosylierte, selektiv geschützte Aminosäurebausteine sind nach Entfernung der C-terminalen Schutzgruppe auch für die Festphasensynthese einsetzbar. Bei einfachen und leicht erhältlichen Kohlenhydraten ist der Aufbau von Glycopeptiden aus Glycosylaminosäuren mittels Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung eine gute Alternative. Bei größer werdenden Zuckerbausteinen ergeben sich allerdings auch hier die bei der Synthese in Lösung aufgezeigten Nachteile.

Von Albericio *et al.* [113] wurde eine Methode zur konvergenten Festphasensynthese von N-Glycopeptiden entwickelt, die das oben vorgestellte dreidimensionale orthogonale Schutzgruppensystem der Festphasenpeptidsynthese ausnutzt.

Nach der Synthese eines Peptids an der festen Phase wird der Allylester eines Asparagin- oder Glutaminsäurerests selektiv Pd-katalytisch entfernt. Die entstehende freie Säurefunktion in der Seitenkette kann nun unter Peptidkupplungsbedingungen glycosyliert werden. Die anschließende Schutzgruppen- und Harzabspaltung führt zum freien Glycopeptid (Abbildung 18).

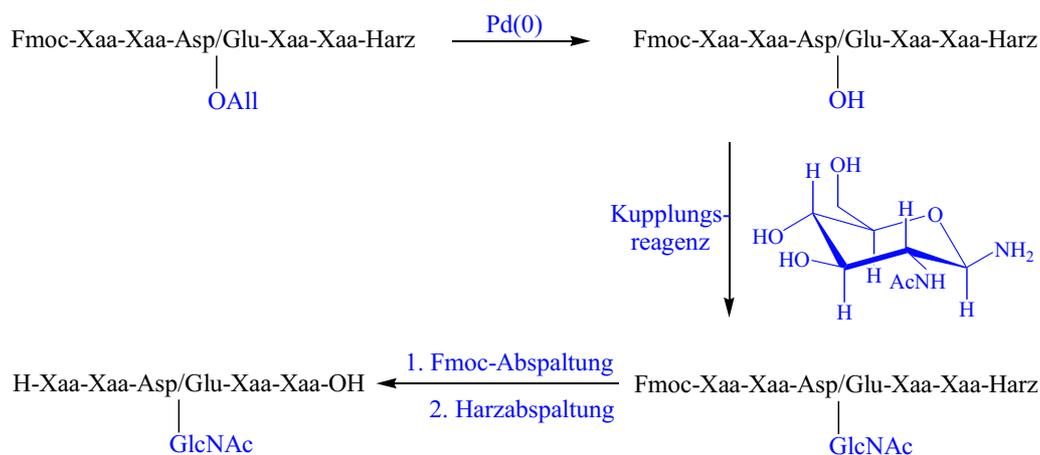


Abbildung 18: N-Glycopeptidsynthese am Harz.

Das in der Peptidfestphasensynthese sehr erfolgreiche Verfahren der *in situ*-Aktivierung mit den Uroniumsalzen TBTU bzw. HBTU und der Hünig-Base DIEA hat sich auch in der Glycopeptidsynthese bewährt [112]. Das Peptid wird in Anwesenheit der 1-Aminozuckerkomponente in den Aktivester überführt und um einen Baustein verlängert. In den Arbeiten von Lansbury *et al.* [112], in der Dissertation von A. Ratschinski [108] und in der eigenen Diplomarbeit hat sich für die N-Glycosylierungsreaktion gezeigt, daß die für optimale Glycopeptidausbeuten zu wählenden Äquivalentverhältnisse von TBTU, DIEA und der 1-Aminozuckerkomponente beziehungsweise die Äquivalentüberschüsse gegenüber dem Ausgangspeptid stark von dem eingesetzten Peptid, der Peptidlänge und der Art und Größe des verwendeten Zuckers abhängen.

5.4 Chemisch-enzymatische Synthese von Glycoproteinen

5.4.1 *in vitro*-Translation

Auf chemisch-enzymatischem Wege ist es über die Neubelegung eines Stop-Codons möglich, unnatürliche Aminosäuren der Proteinbiosynthese *in vitro* zuzuführen [14, 15, 16]. Dabei wird das Codon für die jeweilige Aminosäure durch Oligonucleotid-Mutagenese durch das Nonsense-Codon UAG ersetzt. Für dieses spezielle Codon wird eine Suppressor-tRNA hergestellt und *in vitro* chemisch mit der gewünschten unnatürlichen Aminosäure aminoacyliert. Gibt man diese aminoacylierte tRNA in ein *in vitro*-Protein-Synthesesystem, das von der mutagenisierten DNA gesteuert wird, sollte die gewünschte Aminosäure einheitlich an der angestrebten Stelle im Protein eingebaut werden (Abbildung 19). Laut Adapterhypothese [17] ist die Codon/Anticodon-Erkennung unabhängig von der Aminosäure, die die tRNA trägt, so daß eine tRNA im Prinzip mit jeder beliebigen Aminosäure, auch mit einer unnatürlichen, aminoacyliert werden kann. Für einen erfolgreichen biochemischen Einbau einer unnatürlichen Aminosäure darf die Suppressor-tRNA kein Substrat für eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase sein [18, 19], sie muß jedoch von dem Elongationsfaktor EF-Tu und der Peptidyltransferase am Ribosom als Substrat erkannt werden [15, 17, 18].

Aminosäuren und deren Analoga mit veränderten Eigenschaften bei der Wasserstoffbrückenbildung, mit veränderten strukturellen Eigenschaften und mit anderen Konformationen des Rückgrats wurden ebenso ortsspezifisch in Proteine eingebaut wie lichtaktivierbare Aminosäuren und biophysikalische Sonden [15].

Bei der Inkorporation unnatürlicher Aminosäurederivate hat sich im allgemeinen gezeigt, daß hydrophobe Aminosäurederivate und Aminosäuren mit längeren Seitenketten mit besserer Suppressionseffizienz in Proteine eingebaut werden können als kleinere, hydrophile Aminosäurebausteine [15]. Als Suppressionseffizienz definiert man das Verhältnis der Proteinmenge, die mit einem durch das Stopcodon TAG mutagenisierten Plasmid produziert wurde, zu der mit dem entsprechenden Wild-Typ-Plasmid erhaltenen Proteinmenge.

Ein Protein, in das bisher modifizierte Aminosäuren mit hoher Suppressionseffizienz eingebaut wurden, ist das Ras-Protein. Schultz *et al.* [114] führten modi-

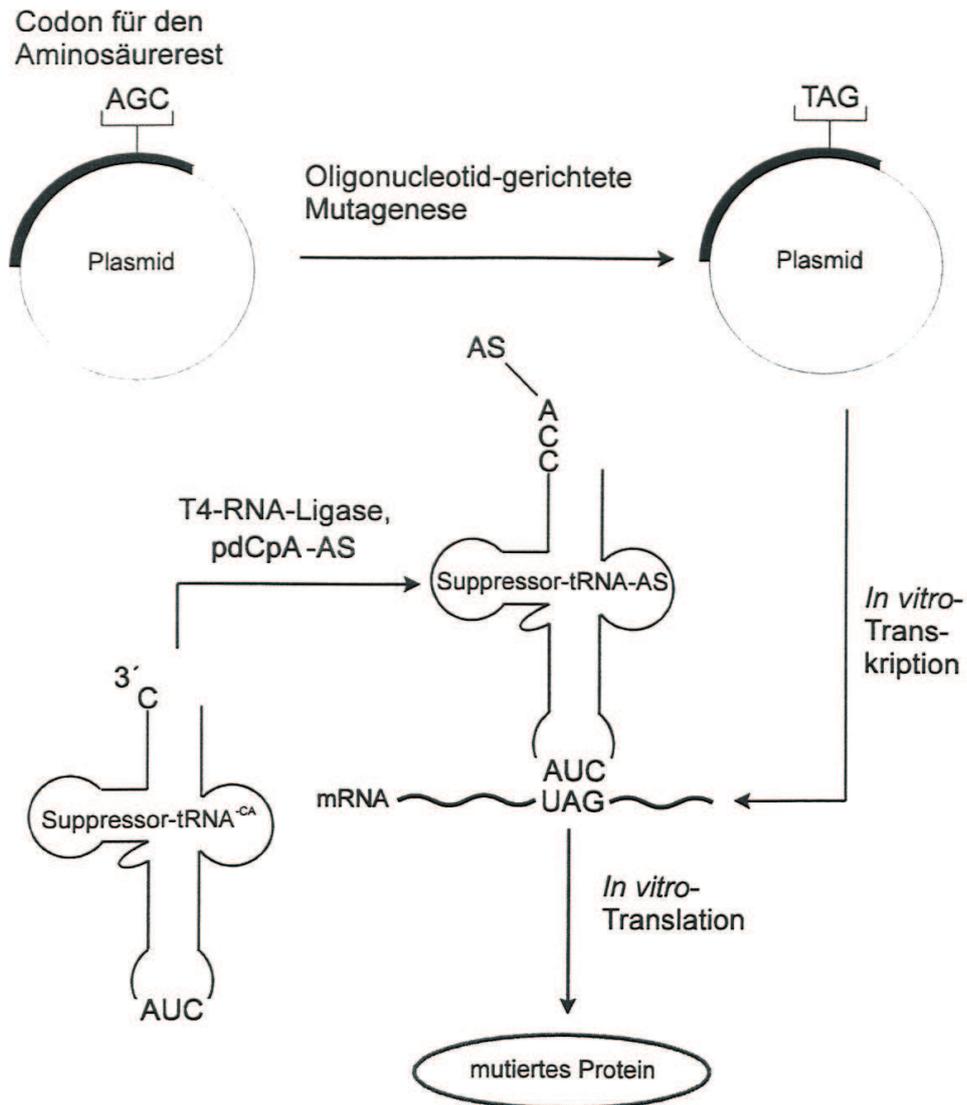


Abbildung 19: Schema der *in vitro*-Translation [15].

fizierte Asparaginsäure mit einer Suppressionseffizienz von 60 %, entsprechend einer Ausbeute von 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, in das Ras-Protein ein. Mit einem von Yokoyama *et al.* [115, 116] optimierten zellfreien *E. coli*-Transkriptions-Translationssystem konnten die ^{15}N -markierten Aminosäuren Asparaginsäure, Phenylalanin, Prolin, Serin und Threonin in das Ras-Protein mit einer Ausbeute von jeweils 0,5 mg/ml an markiertem Protein inkorporiert werden. Über die Neubelegung eines Stop-Codons gelang in neueren Arbeiten der ortsspezifische Einbau von ^{15}N -markiertem Tyrosin in das Ras-Protein im Milligrammaßstab [117].

O-glycosylierte Aminosäuren wurden inzwischen als modifizierte Aminosäuren eingesetzt und in die Proteine Luciferase bzw. T4 Lysozym inkorporiert [19, 20, 21]. Die Suppressionseffizienz lag hier, wie schon erwähnt, allerdings nicht höher als 5-10 %.

5.4.2 Darstellung einer modifizierten aminoacylierten tRNA

Zur Darstellung einer modifizierten aminoacylierten tRNA muß ein aminoacyliertes Dinukleotid hergestellt und anschließend an eine um *pCpA* verkürzte Suppressor-tRNA gebunden werden [16]. Dazu wird die derivatisierte Aminosäure an der α -Aminofunktion mit der photolabilen NVOC(Nitroveratryloxycarbonyl)-Schutzgruppe [118, 119] geschützt und über einen Cyanomethylaktivester an das ungeschützte Dinukleotid selektiv an die 2'- beziehungsweise 3'-Position von Adenosin gebunden [16] (Abbildung 20). Die Acylierung des Dinukleotids ist kritisch, da Nebenreaktionen wie Diacylierung und/oder Acylierung der exocyclischen Aminofunktionen der Basen stattfinden können. Unter Verwendung des Cyanomethylesters als äußerst milde Aktivierungsmethode wird nur die 2'- beziehungsweise 3'-Hydroxylgruppe der Ribose acyliert, so daß die Aminofunktionen der Basen ungeschützt eingesetzt werden können. Außerdem kann das 5'-terminale Cytidin durch Desoxycytidin ersetzt werden, was die Synthese des Dinukleotids enorm vereinfacht und die biologische Aktivität nicht beeinflußt [15].

Die Ligation des Dinukleotids *pdCpA* mit der am 3'-Akzeptorstamm verkürzten Suppressor-tRNA erfolgt durch die T4-RNA-Ligase bei pH 7-8, wobei die N-terminale NVOC-Schutzgruppe die zuvor gebildete Aminoacyl-Bindung stabili-

siert. Anschließend wird die photolabile Schutzgruppe *in situ* photochemisch bei 350 nm abgespalten [118, 119]. Die beladene Suppressor-tRNA kann darauf zu einem *E. coli* Zellextrakt beziehungsweise zu einem *in vitro*-Translationssystem gegeben werden, in welchem die mit dem Stop-Codon TAG modifizierte Plasmid-DNA, Nukleotidtriphosphate, bakterielle tRNAs, Phosphoenolpyruvat, Pyrophosphatase, einige Salze (Mg^{2+} , Ca^{2+}) und diverse Cofaktoren enthalten sind [119, 120, 121].

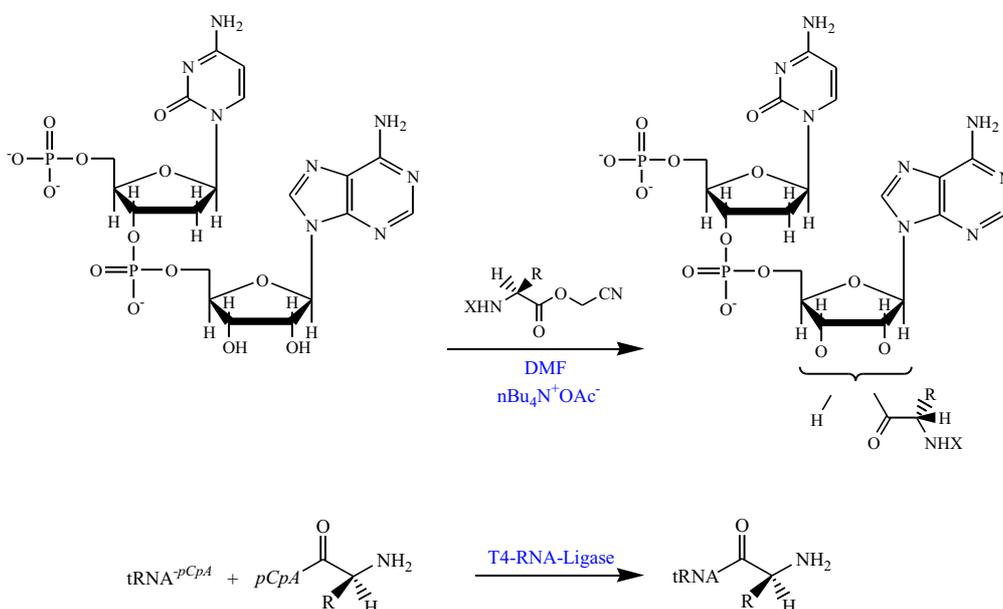


Abbildung 20: Vereinfachte Acylierung von *pdCpA* mit einem Aminosäurecyanomethylester, R = Aminosäureseitenkette, X = Schutzgruppe. Darunter: Strategie für die chemische Aminoacylierung einer tRNA.

5.4.3 Darstellung von *pdCpA*

Adenosin wird zunächst selektiv an der 5'-Hydroxylfunktion mit der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe geschützt und anschließend an den Positionen 6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O benzyliert. Die selektive Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe mit Toluolsulfonsäure liefert die freie 5'-OH-Funktion. Für die Kupplungsreaktion werden das geschützte Desoxynukleosid-3'-phosphoramidit und Tetrazol gleichzeitig hinzugefügt. Tetrazol ($pK_a = 4.8$) protoniert den Ami-

ditstickstoff und erzeugt eine gute Abgangsgruppe. Der nukleophile Angriff der freien 5'-Hydroxylgruppe ergibt dann die 5'-3' internukleotidische Bindung. In der Regel ist ein 10-facher Überschuß des Phosphoramidits notwendig, um quantitative Ausbeuten zu erhalten. Die neu gebildete Phosphit-Triester-Bindung ist instabil gegenüber Säuren und Basen und wird unmittelbar zu einem stabilen Phosphatriester oxidiert. Dazu wird eine Lösung aus Iod, Pyridin und Tetrahydrofuran verwendet. Es folgt die Entschützung der 5'-OH-Gruppe und eine erneute Phosphorylierung mit Di-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit. Auch hier wird anschließend mit Iod oxidiert. Schließlich werden die 2-Cyanoethylphosphatgruppen und N-Benzoylschutzgruppen in konzentrierter wäßriger Ammoniaklösung bei 55 °C abgespalten (Abbildung 21) [109].

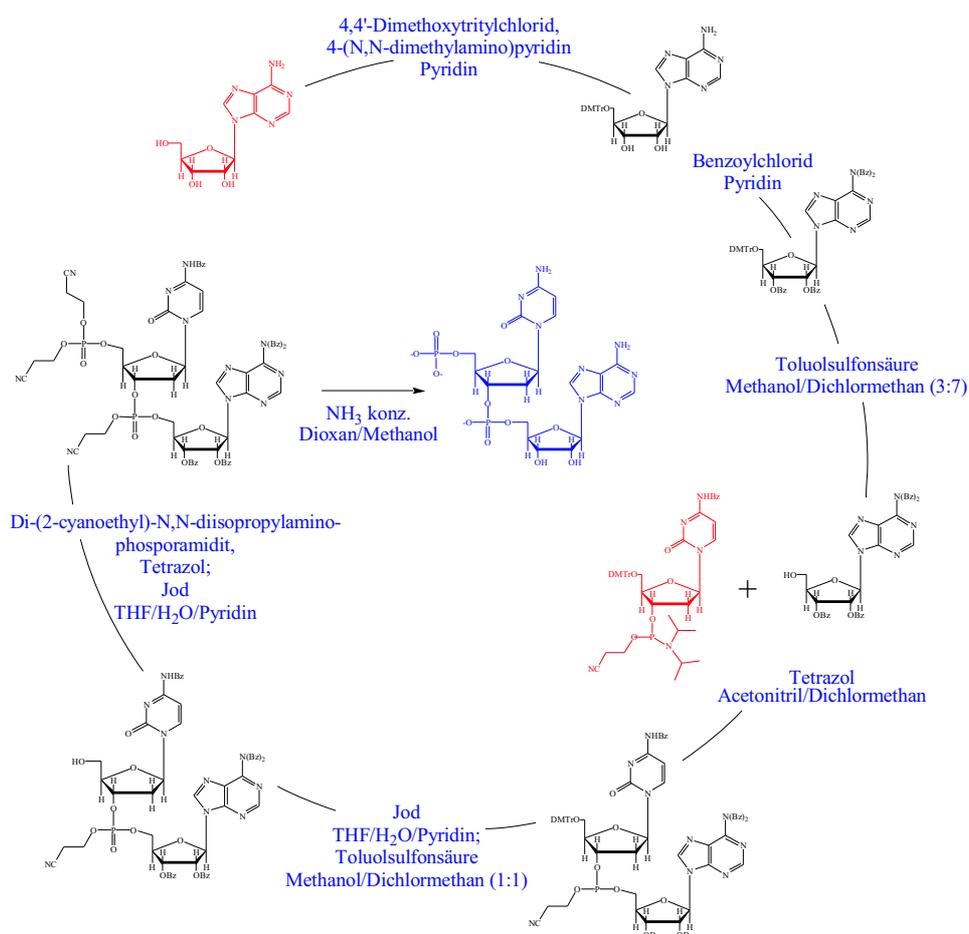


Abbildung 21: Syntheschema von *pdCpA* nach der Phosphoramiditmethode.

5.5 Glycoproteinsynthese über chemische Ligation

5.5.1 Methoden der chemischen Ligation von Peptiden

Die chemische Ligation von Peptiden wird interessant, wenn Polypeptide mit einem Molekulargewicht von bis zu 15 kD chemisch dargestellt werden sollen, was mit der herkömmlichen, linearen Festphasenpeptidsynthese kaum mehr möglich ist. Unter Verwendung der chemischen Peptidligation lassen sich im Hinblick auf die NMR-Spektroskopie aminosäurespezifisch Isotopen-markierte Proben mit voll- oder unmarkierten Fragmenten vereinigen.

Ligation über Thioester und Cystein [122]

Die erste hier vorgestellte Ligationmethode verläuft selektiv über einen C-terminalen elektrophilen Thioester und ein N-terminales nukleophiles Cystein. Im ersten Schritt findet eine Thiol-Thioester-Austauschreaktion statt; nach der Acylwanderung in einem 5-Ring-Übergangszustand wird die Thioleinheit am N-Terminus regeneriert (Abbildung 22). Die meisten Ligationen werden bei pH 7-8 in einem Phosphatpuffer durchgeführt, aber auch Synthesen im sauren Medium waren schon erfolgreich. Ligationen von größeren Peptidfragmenten werden unter denaturierenden Bedingungen, zumeist in einem Puffersystem mit 6-7 M GnHCl, durchgeführt, um Konformationseinflüsse auszuschalten. Obwohl eine Abhängigkeit der Ligationausbeute von der Sperrigkeit des C-terminalen Thioesters beobachtet wurde, ist eine Ligation auch mit sterisch anspruchsvollen Aminosäuren möglich.

Als Nebenreaktionen der hier besprochenen Ligation sind die Hydrolyse des Thioesters, die Disulfidbildung und die Bildung des bisacylierten Produkts zu nennen. Die Hydrolyse erfolgt sowohl im basischen als auch im sauren Medium, wobei die Hydrolysegeschwindigkeit Sequenz- und Konformations-abhängig ist. Ein basischer pH-Wert beschleunigt die Ligrationsreaktion und unterdrückt die Nebenreaktion. Um die Disulfidbildung und die Bildung von bisacyliertem Produkt zu verhindern, muß eine reduzierende Atmosphäre geschaffen werden. Eine Kombination eines Phosphinreagenzes (Tri-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)) mit einem

hohen Überschuß eines Alkyl- oder Aryl-Thiols (Thiophenol, 2-Mercaptoethansulfonsäure) konnte die Ausbeute an einem Modellpeptid um 20 % erhöhen [122].

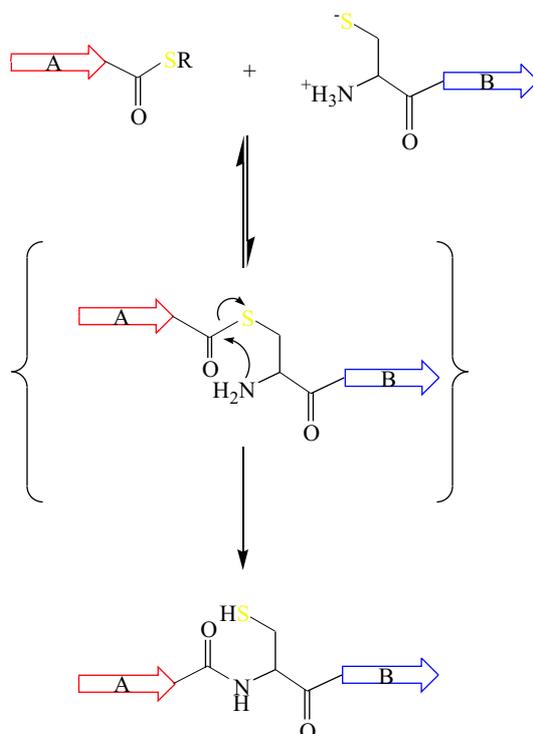


Abbildung 22: Chemische Peptidligation über Cystein.

Die Regiospezifität der Cys-Ligation ist in wässrigem Puffersystem bei pH 7-8 äußerst hoch. Es herrscht hier eine größere Selektivität der Thiolgruppe bezüglich des Thioesters, da die Thiolgruppe ein stärkeres Nukleophil als die Aminogruppe ist. Daher treten bei der Ligation keine signifikanten Nebenreaktionen mit den Aminogruppen von Lysin, der Guanidiniumgruppe von Arginin und der Imidazoleinheit von Histidin auf. Die Selektivität gegenüber einem internen Cystein wird darauf zurückgeführt, daß nur das N-terminale Cystein eine α -Aminogruppe in einem 1,2-Abstand besitzt, welche als Base für die Umesterungsreaktion fungiert. Diese katalytische Eigenschaft der N-terminalen Aminogruppe zeigt sich auch bei der Disulfidbrückenbildung, die bei der Bildung eines Homodimers 3-10mal schneller verläuft als bei der Reaktion von internen Cysteinresten. Des weiteren führt die Umesterungsreaktion mit einem N-terminalen Cystein über die Acyl-

wanderung zu einer stabilen Peptidbindung, während die Umesterung mit Thiolen interner Cysteine reversibel ist. Die Bisacylierung kann durch einen Überschuß an Thiolreagenzien unterdrückt werden [122].

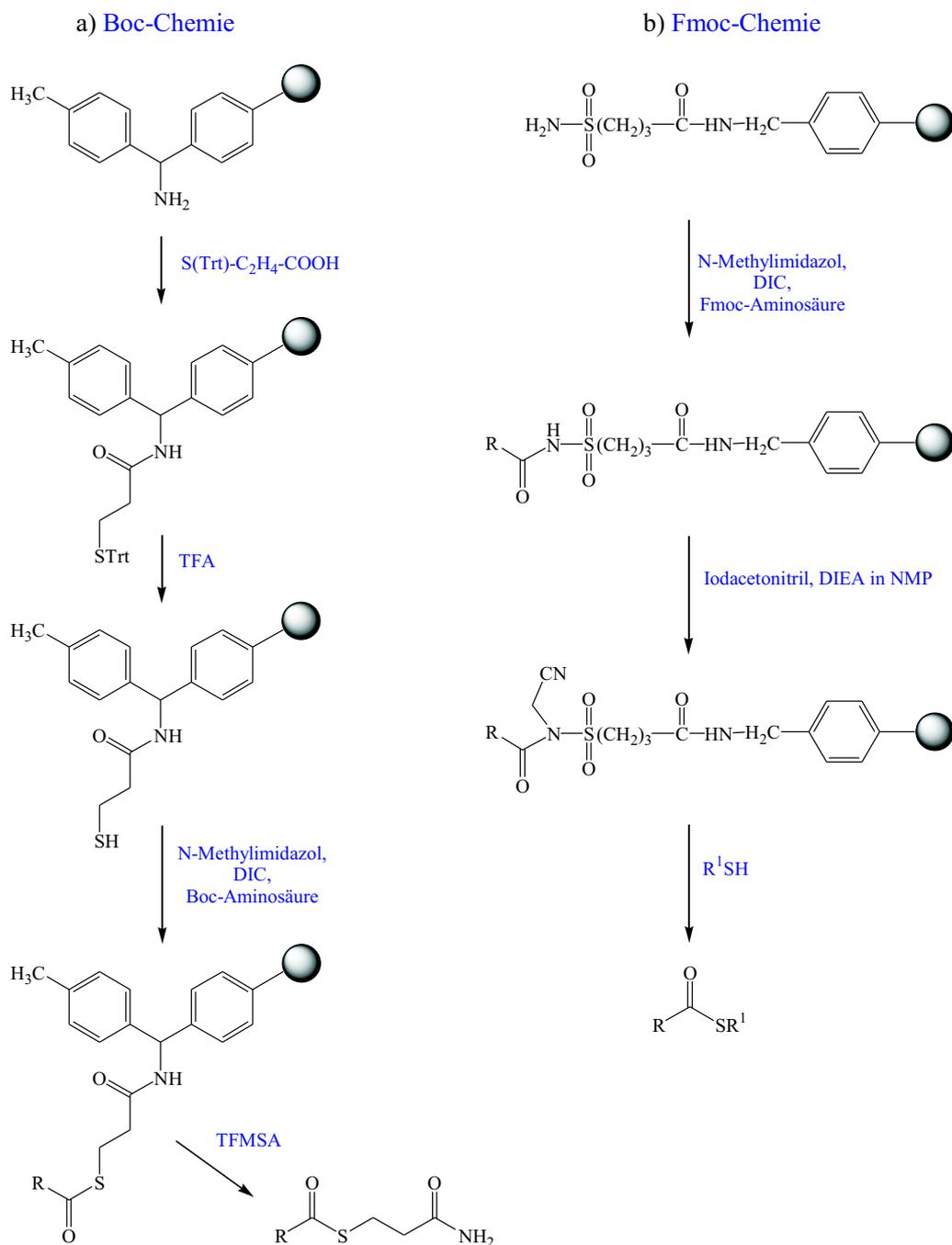
Chemische Darstellung von Thioesterfragmenten

Die klassische Methode der chemischen Thioesterdarstellung verläuft über das Anknüpfen eines Thiollinkers an ein geeignetes Peptidharz und der Kupplung der ersten Peptidaminosäure an die freie SH-Funktion dieses Linkers [123]. Zum Aufbau des Peptids bedient man sich der Boc-Chemie, da die Thioesterbindung durch die in der Fmoc-Chemie verwendeten basischen Reagenzien zur Fmoc-Abspaltung gespalten würde. Dies trifft sowohl für Piperidin zu als auch erfahrungsgemäß für weniger basische Reagenzien wie DBU oder Hexamethylenimin, die laut Li *et al.* [124] erfolgreich bei der Synthese von Thioesterpeptiden nach der Fmoc-Chemie zur Fmoc-Abspaltung verwendet wurden. In Abbildung 23 a) ist die Synthese eines Thioesterpeptids nach der Boc-Chemie dargestellt.

Mit dem sogenannten „Safety Catch“-Harz, einem Sulfonamidharz, ist Darstellung von Peptid- und Glycopeptidthioestern nach der Fmoc-Chemie möglich. Die Harzbelegung, Aktivierung und Harzabspaltung sind in Abbildung 23 b) gezeigt. Nach Angaben der Firma Novabiochem [96] ist die Aktivierung des Sulfonamids nicht kompatibel mit His(Trt) an der ersten Aminosäureposition. Auch Methionin an C-terminaler Position scheint entgegen den Angaben von Novabiochem [96] die Aktivierung durch Iodacetonitril oder Trimethylsilyldiazomethan zu unterbinden.

Eine Schutzgruppe für die sequentielle orthogonale Ligation [125]

Die AcM-Schutzgruppe ist geeignet für die reversible Blockierung von Cystein, wenn mehrere Peptidfragmente in Folge über Cystein aneinandergelinkt werden sollen. Die AcM-Gruppe ist stabil gegenüber HF und Piperidin, kann aber beispielsweise mit Silber-Trifluormethansulfonat in TFA oder diversen Quecksilbersalzen abgespalten werden. Die Peptidligation mit Ag-Salzen, HOOBt und DIEA (siehe unten) ist dennoch mit dieser Schutzgruppe möglich.



Darstellung von N-Glycopeptiden über die Ligation mit Hilfe eines Ag-Katalysators

Die Thioestermethode wurde von Aimoto *et al.* [27] auf die Synthese von mit N-Acetylglucosamin N-glycosyliertem eel Calcitonin angewandt (Abbildung 24). Zunächst wurde ein Heptapeptid mit Boc-Chemie unter Verwendung eines -SCH₂-CH₂-CO-Leu-Linkers dargestellt. An dieses Heptapeptid wurden die glycosylierte Aminosäure wie auch die folgenden Aminosäuren über die Mpt-MA-Methode [27] als Dimethylphosphinothioanhydrid angeknüpft. Als N-terminale Aminosäure wurde Fmoc-Cys(Acm)-O-P(S)(CH₃)₂ eingesetzt.

Schließlich wurde das abgespaltene, gereinigte Peptid mit Boc-OSu und DIEA an den Aminogruppen geschützt.

Das C-terminale Peptidfragment wurde an einem MBHA-Harz mit der Boc-Strategie synthetisiert. Auch hier wurde das abgespaltene, gereinigte Peptid mit Boc-OSu und DIEA an den Aminogruppen geschützt und die N-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten. Die Ligation der in den Seitenketten Boc-geschützten Fragmente erfolgte mit Hilfe von AgNO₃, HOOt und DIEA in DMSO. Schließlich wurden die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin, die Boc-Schutzgruppen mit TFA und die Cystein-Acm-Gruppe mit AgNO₃, DIEA in wässrigem DMSO wieder abgespalten.

Jede Aminosäure im C-terminalen Part kann mit dieser Methode für die Kondensation verwendet werden.

An das monosaccharidische Glycopeptid wurden im letzten Schritt mit Endo-β-N-Acetylglucosaminidase (Endo-M) natürliche Oligosaccharide angehängt.

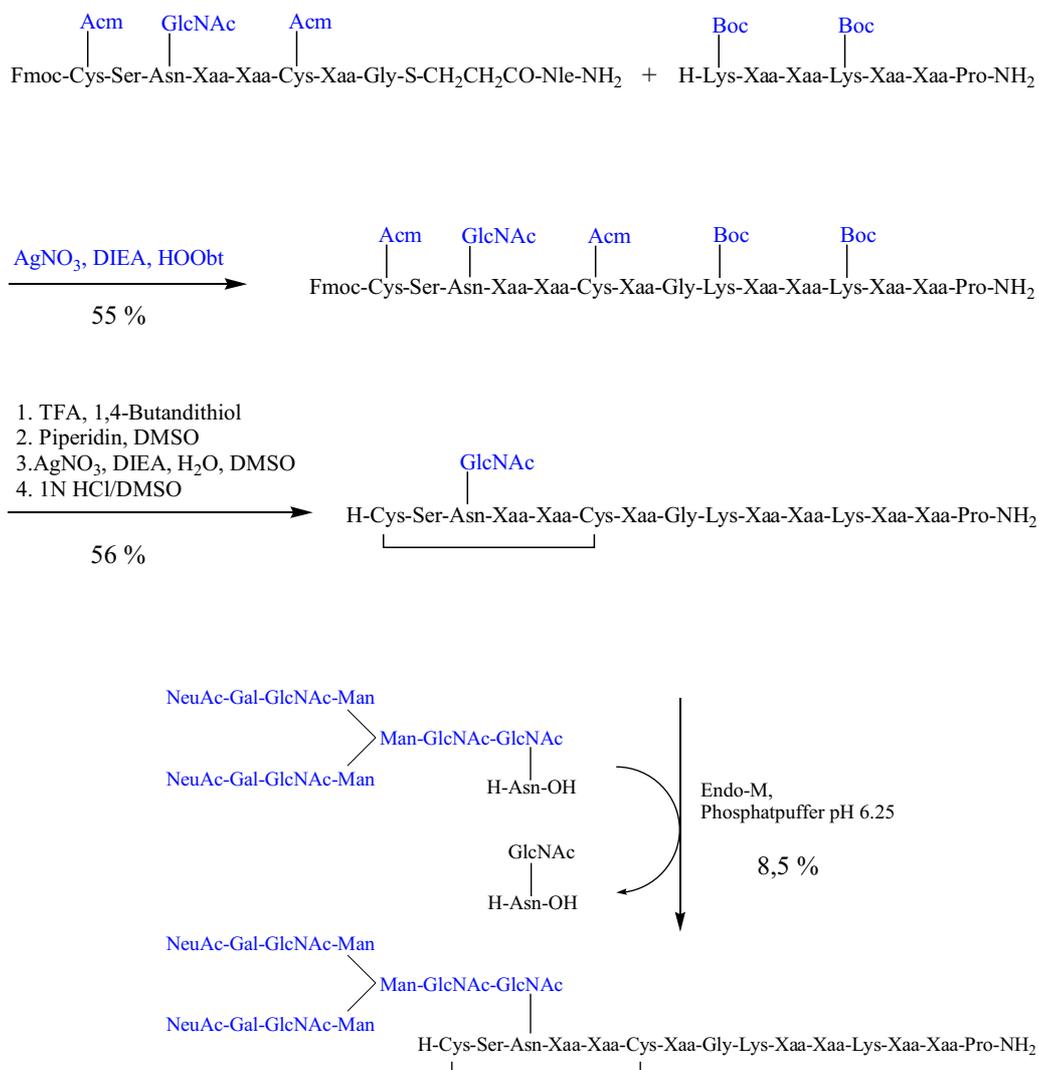


Abbildung 24: Darstellung eines Glycopeptids mit natürlichen N-verknüpften Oligosacchariden über die Peptidligation mit Ag-Katalysatoren [27]. Xaa steht für eine beliebige Aminosäure.

5.5.2 Das Inteinsystem

Das Splicing von Proteinen, das zuerst an einem Enzym der Spezies *saccharomyces cerevisiae* beobachtet wurde [126, 127], ist ein posttranslatonaler Vorgang, bei dem ein Intein (internal protein fragment) mit einer Größe von 134-600 Aminosäuren aus der ursprünglichen Aminosäuresequenz herausgeschnitten und die benachbarten Exteine (external protein fragments) ligiert werden [128]. Inteine katalysieren dabei ihr eigenes Herausschneiden aus dem Proteinvorläufer sowie die Ligation der beiden Exteine, die durch native Peptidbindung verbunden werden. Proteine, die Splicing-Eigenschaften besitzen, haben unterschiedliche Funktionalität, darunter sind DNA- und RNA-Polymerasen sowie Proteasen und ATPasen zu nennen. Sie kommen sowohl in Eukaryonten, Eubakterien und Archaeobakterien als auch in Viren und Prophagen vor.

Die meisten Inteine sind bifunktionale Proteine; neben der Fähigkeit zum Splicing besitzen viele Inteine eine Endonucleasefunktionalität. Die verschiedenen Inteinmotive kann man drei modularen Domänen zuordnen, wobei die separierende, optionale Endonuclease-Domäne die Splicing-Funktionalität der N-terminalen und der C-terminalen Domäne nicht beeinflusst. So lassen sich sogenannte Miniinteine konstruieren, die nach Herausschneiden der Endonuclease-Domäne weiterhin *in vivo* und *in vitro* Splicing-Aktivität zeigen [129]. Zum Splicing notwendig sind sowohl die N- und C-terminale Intein-Domäne, wobei sich an den Übergangsstellen zwischen Extein und Inteinmotiven einige konservierte Aminosäurereste befinden. Am N-terminalen Ende der Intein-Domäne findet man mit wenigen Ausnahmen Aminosäurereste mit Hydroxyl- oder Sulfidfunktionalitäten in der Seitenkette, beispielsweise Ser oder Cys; am C-terminalen Ende des Inteins findet man die konservierte Sequenz His-(Asn/Gln)-(Cys/Ser/Thr) (Abbildung 25).

Der Mechanismus des Protein-Splicing ist aufgeklärt [130, 131]; er besteht aus vier aufeinanderfolgenden nukleophilen Substitutionen (Abbildung 26):

Im initialen Schritt wird durch eine N-O (oder N-S) Acyl-Umlagerung ein intermediärer Ester (Thioester) in der N-terminalen Spleißregion gebildet. Die Bildung eines Hydroxyazolidin-Intermediats, das zum Ester führt, wird unter saurem

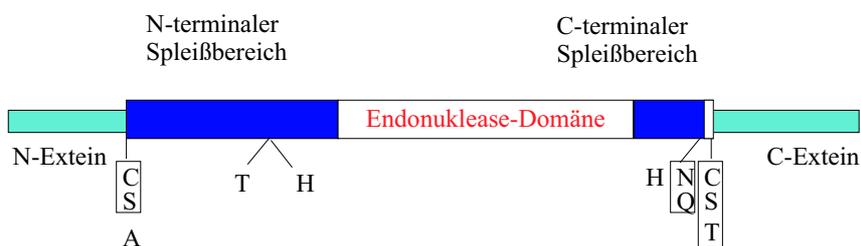


Abbildung 25: Konservierte Eigenschaften der Inteine [132].

pH-Wert begünstigt, während neutrale oder alkalische Bedingungen das Gleichgewicht auf die Seite des Amids verschieben. Unter natürlichen Bedingungen muß der zwischenzeitlich gebildete Ester eine Folgereaktion eingehen, die das ungünstige Gleichgewicht ersetzt. Im folgenden Reaktionsschritt wird der aktivierte Ester (Thioester) von der Hydroxyl- oder Sulfidgruppe des konservierten C-terminalen Exteinrests (Ser, Thr oder Cys) im Verlauf einer Umesterung angegriffen, die N-terminale Spleißstelle gespalten und ein verzweigtes Proteinintermediat mit zwei Aminotermini gebildet. Begünstigt durch die Protonendonorfunktion des vorangehenden Histidinrests, zyklisiert der C-terminale Asparaginrest unter Bildung eines Succinimids. Der dritte Reaktionsschritt macht den Vorgang des Protein-Splicing irreversibel; das ungünstige Gleichgewicht zwischen Ester- und Amidspezies reagiert unter Spaltung an der C-terminalen Spleißstelle nach Hydrolyse des Succinimids unter Freisetzung des Exteins ab. Der letzte Reaktionsschritt ist nochmals eine spontane O-N oder S-N-Umlagerung, wodurch zwischen den ligierten Exteinfragmenten eine native Peptidbindung gebildet wird.

Die aktive Splicing-Domäne, bestehend aus den N- und C-terminalen Intein-Subdomänen, wird unter bestimmten Umständen auch gebildet, wenn beide Subdomänen nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Das Phänomen des *trans*-Splicing macht es möglich, die Vorläuferfragmente getrennt zu exprimieren und später *in vitro* zusammenzufügen, wobei nach einer kooperativen Rückfaltung ein intaktes Intein mit Splicing-Aktivität gebildet wird [133].

Trans-Splicing ermöglicht die Expression extrem cytotoxischer Proteine ebenso wie die segmentweise Modifikation oder Markierung von Proteinen.

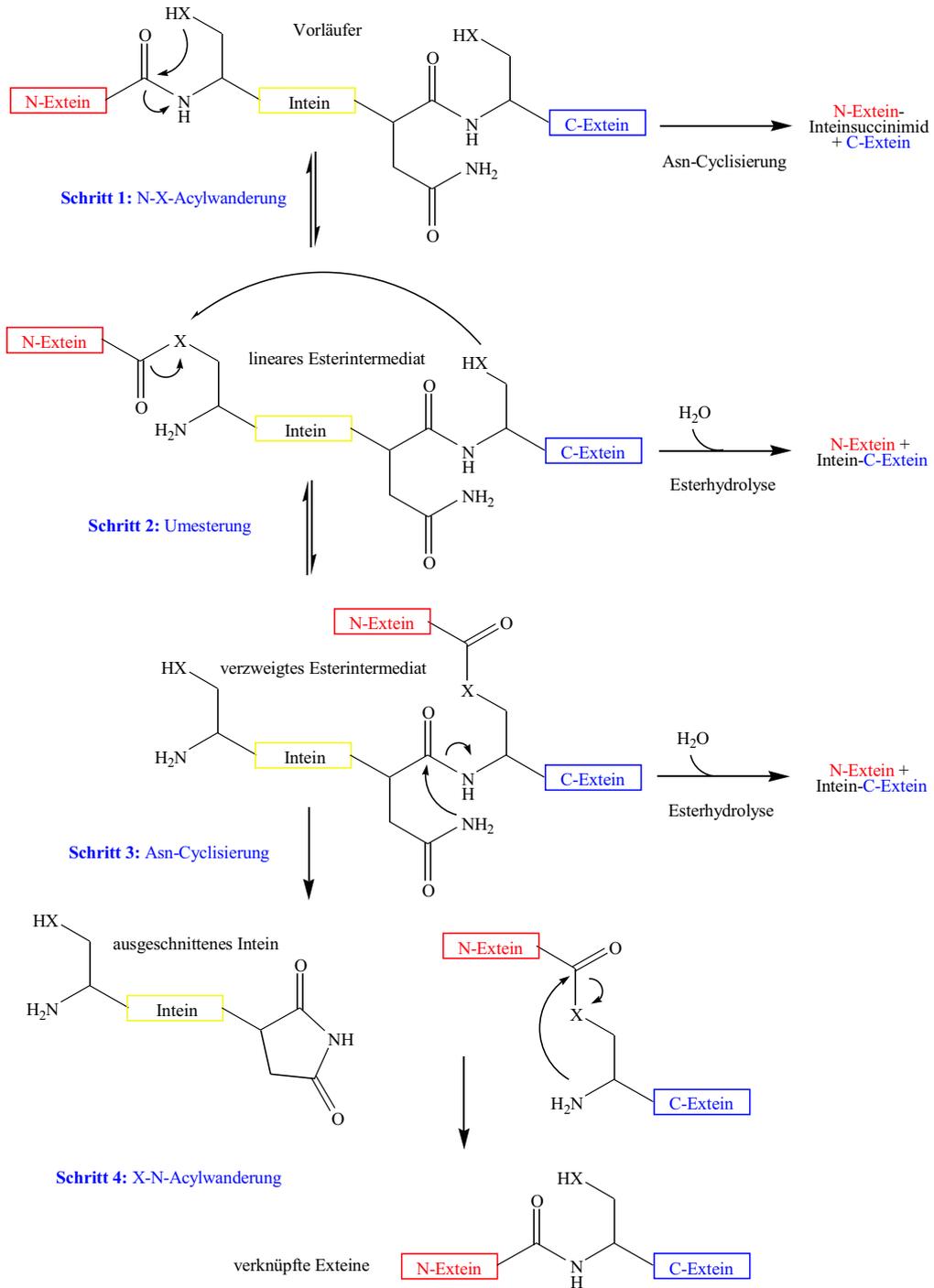


Abbildung 26: Der gegenwärtig akzeptierte Mechanismus des Protein-Splittings [132]. X = Sauerstoff oder Schwefel.

Exprimierte Protein-Ligation [134, 135]

Das IMPACTTM (Intein Mediated Purification with Affinity Chitin-binding Tag)-System von New England Biolabs [134] ist ein neuartiges Protein-Expressions- und Reinigungssystem, welches die induzierbare spezifische Autoproteolyse-Aktivität eines Inteins ausnutzt. Dieses Expressionssystem verwendet Expressionsvektoren, die die Herstellung von C-terminalen Fusionsproteinen mit einem modifizierten Intein erlauben.

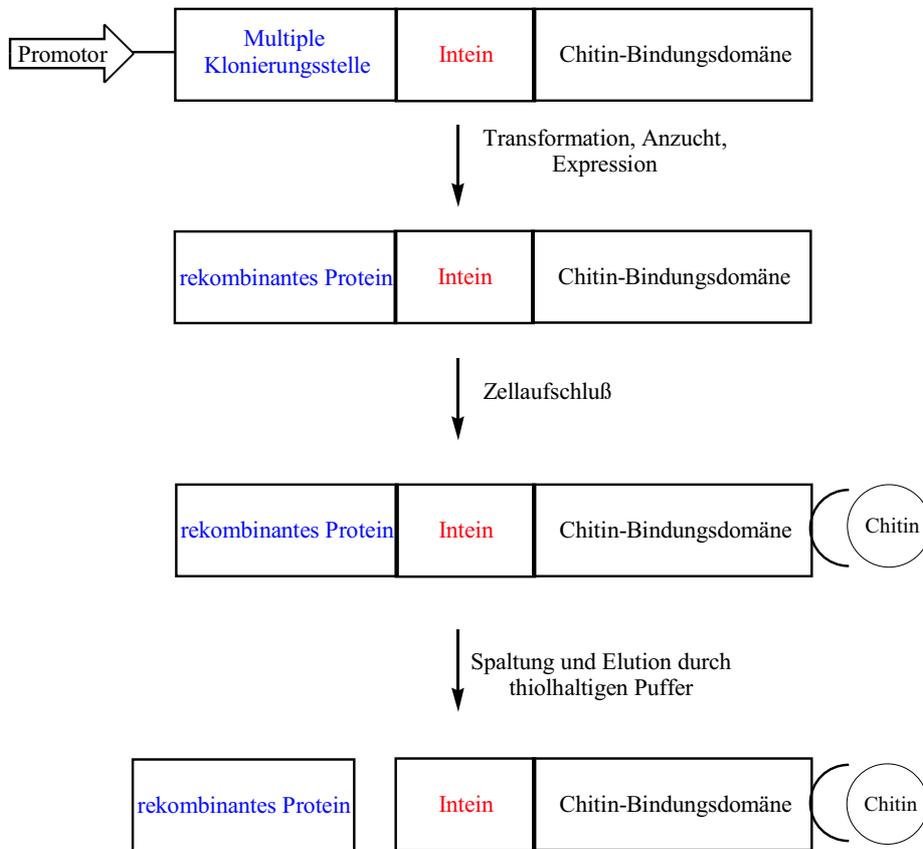


Abbildung 27: Reinigung eines Expressionsproteins über Chitin [136].

Im IMPACT-CN-Expressionssystem ist durch eine Mutation im Intein die Autokatalysefunktion gehemmt, und kann nur durch Zugabe einer Thiolverbindung ausgelöst werden, wobei die Reaktion zur Bildung eines aktivierten Thioesters führt. Die Separation des Zielproteins vom Fusionspartner durch Protein-Splicing

ermöglicht eine Reinigung nativer, rekombinanter Zielproteine durch eine one-step-Affinitätschromatographie. Hierzu wird das Zielprotein mit einem Intein und einer Chitin-bindenden Domäne fusioniert, welche die affinitätschromatographische Reinigung ermöglicht. Durch die Zugabe eines Thiols, zum Beispiel Ethanthiol oder DTT, wird die spezifische selbstspaltende Aktivität des Inteins induziert und erlaubt eine Elution des nativen Zielproteins ohne Modifikationen, während der Affinitäts-Tag auf der Säule verbleibt (Abbildung 27). Über eine Umesterung des eluierten Thioesterproteins mit Thiophenol oder MESNA können Thioaktivester generiert werden, die dann mit einem Cystein-Peptid ligiert werden können (Abbildung 28).

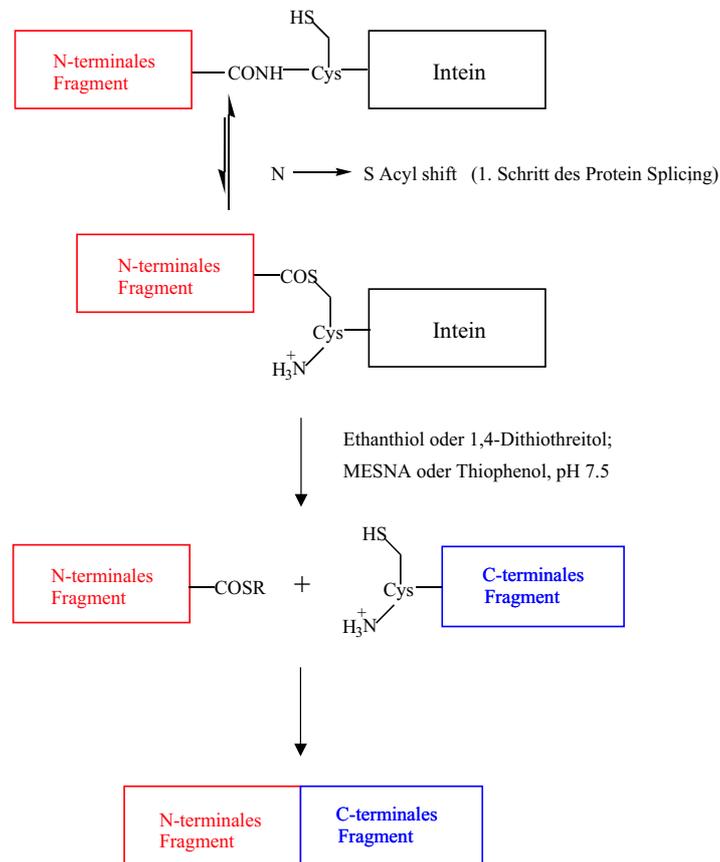


Abbildung 28: Schematische Darstellung der exprimierten Proteinligation.

6 Strukturanalytische Verfahren

6.1 NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, insbesondere der mehrdimensionalen Techniken, ist die Strukturbestimmung von Peptiden in Lösung möglich.

Die Untersuchung von Strukturparametern, wie Konstitution, Abstand durch den Raum und Winkeln, setzt bei Peptiden eine Identifizierung der Spinsysteme der Aminosäuren und ihre sequentielle Zuordnung in der Peptidkette voraus. Die Spinsysteme der einzelnen Aminosäuren können durch ein 2D ^1H TOCSY-Spektrum [137] ermittelt werden. Die Zuordnung gelingt aufgrund der charakteristischen Spinsystemmuster und den spezifischen chemischen Verschiebungen der in den Peptiden enthaltenen Aminosäuren [138].

Die sequentielle Zuordnung erreicht man durch die Auswertung von 2D ^1H NOESY-Spektren [139]. In diesem NMR-Experiment entstehen die Kreuzsignale durch dipolare Kopplung. Dadurch sind nicht nur Kreuzsignale innerhalb eines Spinsystems (*intraresidual*) möglich, sondern auch von in einer Entfernung von $\leq 5 \text{ \AA}$ räumlich benachbarten Spinsystemen (*interresidual*). Die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden spiegelt sich in den beobachteten NOE-Mustern wider. Die folgenden NOE's sind jeweils charakteristisch für in Peptiden vorliegende Sekundärstrukturen [140]. Dabei ist die NOE-Intensität näherungsweise der sechsten Potenz des Interprotonenabstands r umgekehrt proportional.

Tabelle 1: Stärke von NOE's in Sekundärstrukturen.

NOE	α -Helix	3_{10} -Helix	β -Faltblatt	β -Turns
$d_{NN}(i, i+1)$	stark/mittel	stark/mittel	schwach	stark
$d_{NN}(i, i+2)$	schwach	schwach	-	schwach/-
$d_{\alpha N}(i, i+1)$	schwach/mittel	schwach/mittel	stark	stark/mittel
$d_{\alpha N}(i, i+2)$	-	schwach	-	schwach
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	mittel	schwach	-	schwach/-
$d_{\alpha N}(i, i+4)$	schwach	-	-	-

Zur Unterdrückung des Wassersignals der meist in wäßriger Lösung aufgenommenen TOCSY- und NOESY-Spektren kann die WATERGATE-Methode [141] verwendet werden.

6.1.1 Korrelation der chemischen Verschiebung mit der Sekundärstruktur

Chemische Verschiebungen können als experimentelle Parameter zur Bestimmung der Struktur von Peptiden und Proteinen herangezogen werden. Es hat sich gezeigt, daß sich die chemische Verschiebung, insbesondere die der H_α -Protonen, sehr gut mit den Sekundärstrukturelementen α -Helix und β -Faltblatt korrelieren läßt [142]. Diese Korrelation wird auf die Gleichförmigkeit der chemischen Umgebung in einem regulären Sekundärstrukturelement zurückgeführt.

Nach einer Methode von Wishart *et al.* [143] kann man den „Chemical Shift Index (CSI)“ durch Vergleich der gemessenen chemischen Verschiebung mit einem Wert, der die unstrukturierte chemische Verschiebung darstellt, bestimmen. Ein CSI-Wert von -1 steht für α -helikale Bereiche und gilt für alle chemischen Verschiebungen, die mindestens 0.1 ppm hochfeldverschoben sind. Dagegen ist ein CSI-Wert von 1 charakteristisch für ein β -Faltblatt, entsprechend einer Tieffeldverschiebung um mindestens 0.1 ppm. Für kleinere Verschiebungen als 0.1 ppm steht der Wert 0, was für keine der beiden obigen Strukturen spricht.

Problematisch bei dieser Methode ist es, die „random coil“ chemischen Verschiebungen für die einzelnen Aminosäuren möglichst unbeeinflusst von den benachbarten Resten zu ermitteln. Dazu wurden von Merutka *et al.* [144] und Wishart *et al.* [145] NMR-Untersuchungen mit den Peptiden H-GGXGG-OH (90 % H_2O /10 % D_2O bei 277.2 K, pH 5) beziehungsweise Ac-GGXYGG-NH₂ (99 % D_2O , 1 M Harnstoff bei 298 K, pH 5) durchgeführt, wobei X beziehungsweise Y für eine der 20 natürlichen Aminosäuren stehen. Während der Einfluß benachbarter Aminosäurereste auf die H_α -chemischen Verschiebungen gering war, wurden die NH-chemischen Verschiebungen deutlich durch eine lokale Variation der Aminosäuresequenz beeinflusst. Starke Effekte traten auf, wenn es sich bei der nachfolgenden Aminosäure um Alanin oder Prolin handelte [145]. „Random coil“ chemische Verschiebungen wurden auch von Schwarzinger *et al.* [168] mit dem

Peptid Ac-GGXGG-NH₂ (10 % D₂O, 8 M Harnstoff bei 293 K, pH 2.3) untersucht. Gegenüber den von Merutka *et al.* [144] ermittelten Werten ergab sich für die NH-chemischen Verschiebungen eine Hochfeldverschiebung von 0.2-0.3 ppm, was vor allem auf Unterschiede in bezug auf das Lösungsmittel, die Temperatur und den pH-Wert zurückgeführt werden kann. Die H_α-chemischen Verschiebungen wichen dagegen nur geringfügig von den von Merutka *et al.* [144] und Wishart *et al.* [145] ermittelten Werten ab.

Periodische Einflüsse auf die NH- und H_α-chemischen Verschiebungsdifferenzen sind bekannte Effekte [145, 146, 147]. Die Periodizität einer α-Helix (3.6 Reste auf eine Drehung um 360°), spiegelt sich in diesem Verhalten wider. Eine Periodizität von 2 weist dagegen auf eine verdrehte oder gekrümmte Helix hin [148]. Allerdings sind auch Schwankungen in den NH-, H_α-chemischen Verschiebungsdifferenzen durch die Mittelung der Verschiebung zweier verschiedener Konformationen denkbar.

6.1.2 Sekundärstrukturen und die Spin-Spin- Kopplung ³J_(HNα)

Die Nutzung der vicinalen Spin-Spin-Kopplung für Konformationstudien beruht auf einer allgemeinen Beziehung zwischen der Größe der Spin-Spin-Kopplungskonstante ³J und dem dazwischen liegenden Torsionswinkel θ.

Die Abhängigkeit von ³J_(HNα) und dem Torsionswinkel θ läßt sich durch folgende Karplus-Gleichung wiedergeben:

$${}^3J_{(HN\alpha)} = A\cos^2\theta - B\cos\theta + C$$

Für die Werte $A = 6.4$, $B = 1.4$ und $C = 1.9$, die für ein typisches Protein gelten, ergaben sich aus dieser Gleichung für die Dihedralwinkel ϕ ($\theta = |\phi - 60^\circ|$) von Protein-Aminosäureresten folgende ³J_(HNα)- Kopplungskonstanten [140]:

α-Helix ($\phi = -57^\circ$), ³J_(HNα) = 3.9 Hz

³₁₀-Helix ($\phi = -60^\circ$), ³J_(HNα) = 4.2 Hz

Antiparalleles β-Faltblatt ($\phi = -139^\circ$), ³J_(HNα) = 8.9 Hz

Paralleles β-Faltblatt ($\phi = -119^\circ$), ³J_(HNα) = 9.7 Hz

6.2 CD-Spektroskopie

Das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen gelöster Peptide ist durch CD-spektroskopische Untersuchungen nachweisbar. Vorteil dieser Methode ist, daß hierfür im Gegensatz etwa zur NMR-Spektroskopie nur sehr geringe Substanzmengen benötigt werden.

Bei der CD-Messung wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten zwischen der rechts- und links-drehenden Komponente von zirkular polarisiertem Licht als Funktion der Wellenlänge aufgenommen. Sie wird als Elliptizität θ angegeben [136].

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$
$$\theta(\lambda) = \text{const.}(\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Dabei bedeuten λ die Wellenlänge, d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe.

Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge wird im CD-Spektrum aufgezeichnet.

Voraussetzung für das Vorliegen des CD ist die Existenz eines in der Regel elektronischen Übergangs. Bei Peptiden werden in erster Linie Interaktionen der vorliegenden Amid-Chromophore detektiert. Die Absorptionsbande der wichtigsten Amidchromophore liegt bei 200 nm, kann aber je nach Struktur Beiträge im Bereich von 170-250 nm liefern (Tabelle 2, Abbildung 29).

Die Beispiele zeigen, daß verschiedene Sekundärstrukturelemente charakteristische CD-Spektren ergeben [149, 150]. Bei gleichzeitigem Auftreten von mehreren unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen werden die Spektren durch Überlagerung jedoch entsprechend komplizierter. Eine eindeutige Aussage über die vorliegenden Strukturelemente ist oft nicht mehr möglich. Kleine, meist flexible Moleküle liegen als ein Ensemble mehr oder weniger schnell ineinander übergehender Konformationen vor. Das CD-Spektrum einer solchen Verbindung zeigt dann charakteristische Banden für eine Struktur mit hohem random coil-Anteil, die mit Banden anderer Sekundärstrukturelemente überlagert sind.

Tabelle 2: Charakteristische CD-Banden für einige Sekundärstrukturelemente [149, 150].

Sekundärstrukturelement	CD-Banden
α -Helix	Stark negative Elliptizität bei 208 und 222 nm, Maximum im Positiven bei 190 nm
β -Faltblatt	Positive Bande bei 190-200 nm, negative Bande bei 210-220 nm
random coil	Minimum im Negativen bei 210-220 nm, Maximum im Positiven bei 190-200 nm
Typ β_I - Turn	Negative Elliptizität bei 200-210 nm und 220 nm sowie positive Bande bei 180-195 nm
Typ β_{II} - Turn	Positive Bande bei 200 - 210 nm

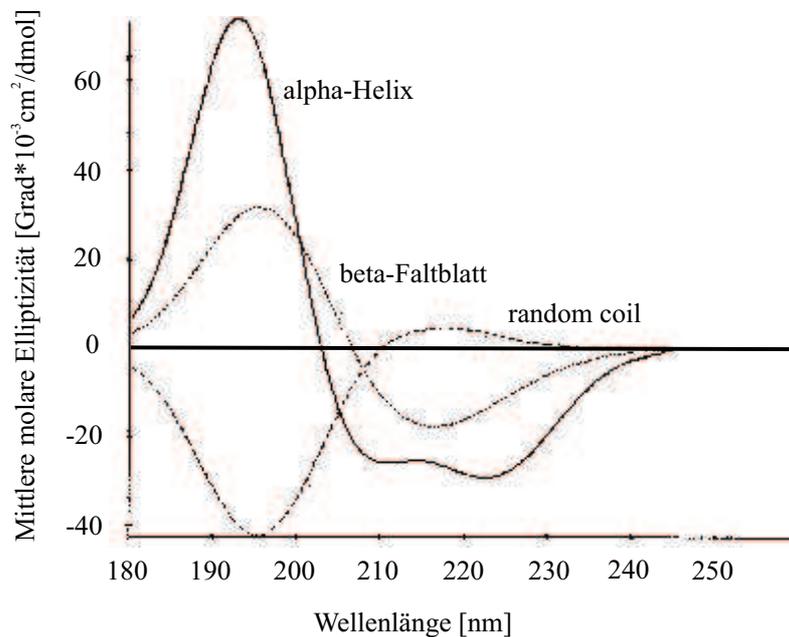


Abbildung 29: Typischer Verlauf von CD-Kurven einer α -Helix, eines β -Faltblatts und einer random coil-Struktur [151].

Der α -helikale Anteil eines Peptids läßt sich aus der mittleren molaren Elliptizität $[\Theta]MRW$ bei 222 nm errechnen [152].

Die mittlere molare Elliptizität ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$[\Theta]MRW = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MRW}{c \cdot d}$$

Θ : gemessene Elliptizität in Grad

MRW: mittlere Masse eines Aminosäurerests in $[g/mol]$

c: Proteinkonzentration $[mg/ml]$

d: Schichtdicke in cm

Der Erwartungswert der mittleren molaren Elliptizität eines vollständig α -helikalen Peptids bei 222 nm liegt laut Chen *et al.* [153] bei $-33400 \text{ Grad cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$, wobei die Werte jedoch von -28000 bis $-42000 \text{ Grad cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ schwanken können.

Änderungen in den CD-Spektren von Glycopeptiden lassen sich durch die zusätzliche Elliptizität des Kohlenhydrateils erklären. Nach L. Urge *et al.* [10] und C. A. Bush *et al.* [154] ergibt sich ein CD-Spektrum von N-Glycopeptiden aus der Addition der Elliptizitäten des N-Glycananteils und des unglycosylierten Peptids. Dies beruht auf der Annahme, daß durch die große räumliche Entfernung von Amidbindungen des Peptidrückgrats zu den Amidbindungen des Zuckers keine Interaktionen der Amidchromophore möglich sind. Von den Amidbindungen des Zuckers werden hierbei sowohl die Amidbindung an die Asparaginseitenkette als auch die der Acetamidoeinheiten in Betracht gezogen. In den in H_2O aufgenommenen CD-Spektren der isolierten Zucker lieferten diese Amidchromophore charakteristische Absorptionsbanden bei etwa 198 nm (positives Maximum) und 180 nm (negatives Minimum) (Abbildung 30).

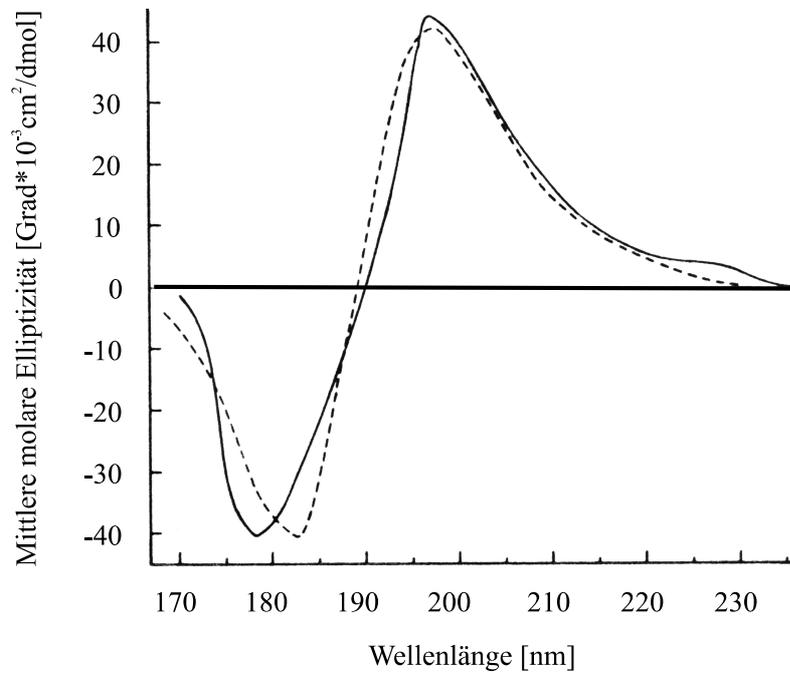


Abbildung 30: CD-Spektren von (–) 2-Acetamido-1-N-(4-L-aspartyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin und (- -) 1-N-Acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin [154].

6.3 Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese tauchen die Enden einer thermostatisierten Quarz-Kapillare (Länge 0.2-1 m, Innendurchmesser 20-150 μm) mit Elektroden in den Elektrolytbehälter. Zwischen den Enden der Kapillaren wird eine Gleichspannung von bis zu 30 kV angelegt. Die Detektion der getrennten Substanzen erfolgt noch in der Kapillare, in der Regel über UV-Absorption. In der Kapillarelektrophorese unterscheidet man verschiedene Trennverfahren. Bei der Free-Zone-Elektrophorese erfolgt die Trennung aufgrund einer Kombination von elektrophoretischer Beweglichkeit des Analyten und dem elektroosmotischen Fluß (EOF). Ein deutlicher EOF bildet sich durch Deprotonierung der Silanolgruppen der Kapillarinnenwand bei $\text{pH} > 7$ aus. Hierbei entsteht durch Anlagerung von Elektrolytkationen eine elektrische Doppelschicht. Die hydratisierten Elektrolytkationen bewegen sich in Richtung Kathode, woraus eine treibende Kraft (EOF) in diese Richtung resultiert. Mit steigendem pH-Wert erhöht sich der EOF. Da der EOF gewöhnlich größer als die elektrophoretische Mobilität ist, wandern alle Moleküle, selbst Anionen, zur Kathode, wo sich auch das Detektorfenster befindet.

Eine Variation der Meßtemperatur hat u. a. Einfluß auf die Mobilität, die Löslichkeit und auf Gleichgewichtsverschiebungen. Höhere Temperaturen führen aufgrund der niedrigeren Viskosität der Lösung zu höheren Mobilitäten und daher kürzeren Analysezeiten. Eine Absenkung der Temperatur ermöglicht das Einfrieren von „Gleichgewichtszuständen“. Dadurch lassen sich Trennungen von Enantiomeren, Isomeren oder Komplexen erzielen, die bei Raumtemperatur nicht möglich sind [136].

7 Projektdurchführung und Ergebnisse

7.1 Synthese und Strukturuntersuchung α -helikaler Modellpeptide und zugehöriger N-Glycopeptide

Die chemische Synthese strukturell einheitlicher N-Glycopeptide ist von großem Interesse, um die Eigenschaften von natürlichen N-Glycoproteinen und den konformationellen Einfluß der N-Glycanreste auf das Peptidrückgrat zu untersuchen. α -Helikale Modellpeptide wurden hier mit Oligosacchariden verschiedener Größe, die von der Core-Region der natürlichen N-verknüpften Oligosaccharidketten abgeleitet wurden, N-glycosyliert. Es folgten Strukturuntersuchungen mittels NMR- und CD-Spektroskopie, aber auch mit der Kapillarelektrophorese.

Von der Strukturuntersuchungen versprach man sich, einen konformationellen Übergang von einer α -Helix im Ausgangspeptid zu einer β -Turn-Struktur in den entsprechenden N-Glycopeptiden dektektieren zu können [10-13]. Interessant erschien hier auch der konformationelle Vergleich von N-Glycopeptiden, die eine natürliche Glycosylierungssequenz N X S/T aufwiesen, mit solchen, denen eine solche Sequenz fehlte.

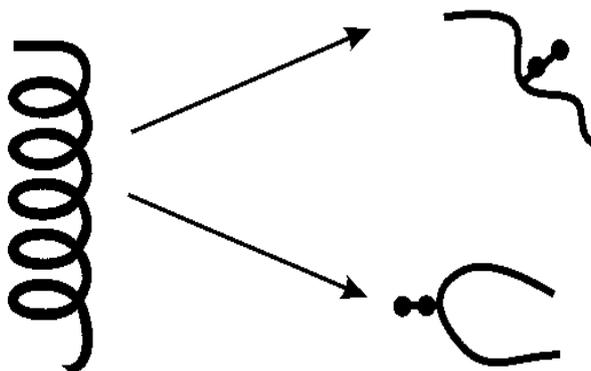


Abbildung 31: Mögliche Konformationsänderungen einer α -Helix durch N-Glycosylierung.

Das Modellpeptid

Als Modellpeptid wurde eine Alanin-reiche Peptidsequenz von Baldwin *et al.* gewählt [155]. Das Peptid hat eine Länge von 17 Aminosäuren und besitzt drei Glutamat-Lysin-Paare im Abstand von jeweils 4 Aminosäuren. Strukturuntersuchungen des Peptids ergaben, daß das Peptid eine außergewöhnliche Fähigkeit zur Ausbildung von α -Helices hatte: Gemäß den CD-Untersuchungen wies das Peptid bei pH 7 und 1 °C in 10 mM NaCl eine Helikalität von 80 % auf [155]. Es konnte jedoch ein starke Temperaturabhängigkeit des Konformerengleichgewichts zwischen α -Helix und random coil festgestellt werden. Bei 20 °C lag der Anteil der α -helikalen Population nur noch bei 54 % (Abbildung 32). Die α -Helikalität des Peptids bezieht sich hierbei auf eine mittlere molare Elliptizität von $-\Theta]_{222} = -36.000 \text{ Grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ für eine α -Helix (100 %) in TFE/H₂O-Mischungen [155].



(Modellpeptid)

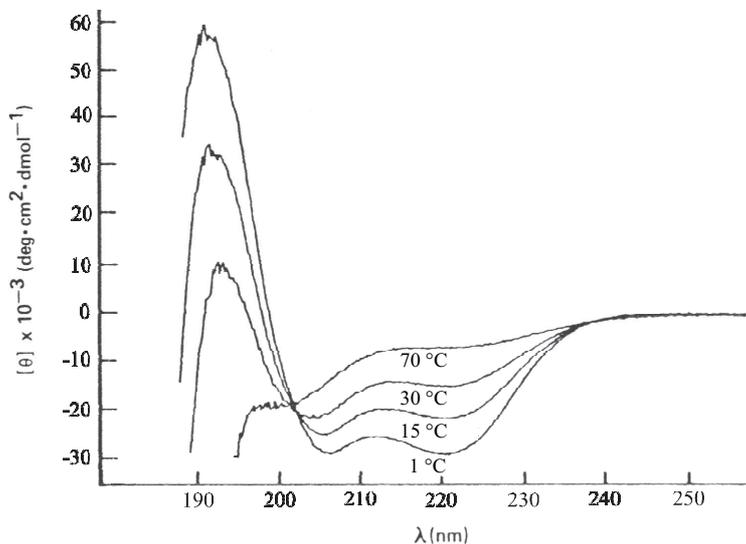


Abbildung 32: CD-Kurven des Modellpeptids bei verschiedenen Temperaturen [155].

In dem oben vorgestellten Peptid wirken verschiedene helixstabilisierende Faktoren: Zum einen sind dies die im Abstand ($i + 4$) angeordneten entgegengesetzt geladenen Glutamat- und Lysinreste, die Ionenpaare und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [156, 157, 158]. Dabei winden sich die geladenen Gruppen um die Helixoberfläche und stabilisieren dadurch einen Helixturn. Weiterhin kompensieren die polaren Glutamat- und Lysinreste die Hydrophobie der Alaninreste und erhöhen somit die Löslichkeit des Peptids in Wasser. Zum anderen konnten Baldwin *et al.* [156] zeigen, daß Alanin selbst ein hohes helixstabilisierendes Potential hat. Konzentrationsabhängige Studien an der Modellhelix bestätigten, daß die Helixbildung monomolekular und nicht etwa durch eine Aggregation des Peptids erfolgte.

Das Capping des N-Terminus mit einer Acetylgruppe und das Vorliegen eines Säureamids am C-Terminus sollte eine potentielle Destabilisierung der Helix durch Wechselwirkungen des geladenen C-Terminus ($\alpha\text{-COO}^-$) beziehungsweise N-Terminus ($\alpha\text{-NH}_3^+$) mit dem Helixdipol vermeiden. Eine Interaktion der geladenen Seitenkettenfunktionen der Aminosäurereste mit dem Helixdipol führte nicht zu einer Destabilisierung der α -Helix [156].

Modifikationen des Modellpeptids

An den Aminosäurepositionen 8-10 des ursprünglichen Modellpeptids wurden Modifikationen vorgenommen, um sowohl N-Glycanreste anknüpfen zu können als auch eine natürliche N-Glycosylierungssequenz NXT/S vorliegen zu haben.



7.1.1 N-Glycopeptidsynthese

Die Peptide **(1)** und **(2)** mußten für die N-Glycopeptidsynthese an fester Phase weiter modifiziert werden. Für die Glycosylierungsreaktion wurde an Position 8 β -Allyl-geschützte Asparaginsäure und an Position 9 AcHmb(N-(2-Acetoxy-4-methoxybenzyl)-geschütztes Alanin eingebaut. Die Peptide **(3)** und **(4)** wurden

mit Fmoc/tBu-Chemie an einem Rink-Amid-MBHA-Harz dargestellt (Abbildung 33).

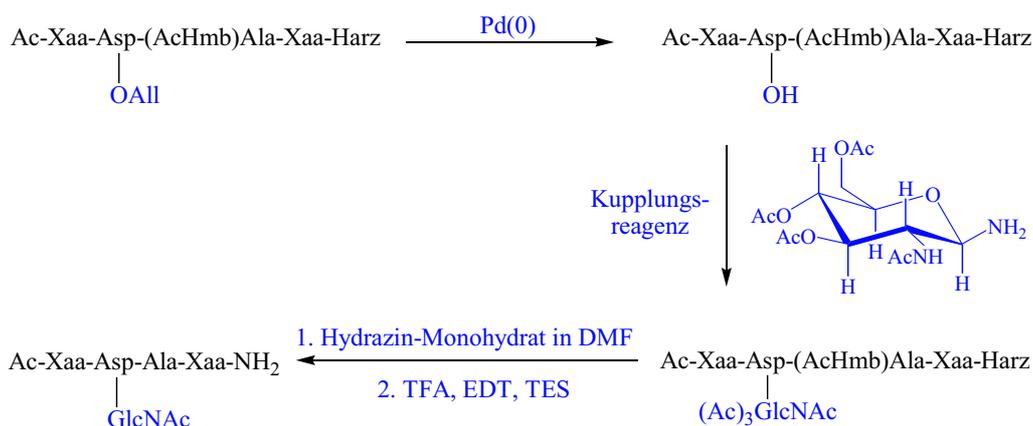


Abbildung 33: Festphasensynthese der N-Glycopeptide unter Verwendung der Allyl- und Hmb-Schutzgruppe.

Nach der selektiven Abspaltung der Allylschutzgruppe mit einem Palladiumkatalysator wurden die Peptide (3) und (4) jeweils mit einem Mono-, Di-, Tri- und Pentasaccharid (Abbildung 34) unter Aktivierung durch TBTU und DIEA glycosyliert. Nach den Ergebnissen von A. Ratschinski [108] und den Resultaten der eigenen Diplomarbeit führt eine Glycosylierung des Peptids mit 6 eq. TBTU, 4 eq. DIEA und 6 eq. des Glycosylamins beziehungsweise für teurere Glycosylamine mit 2.2 eq. TBTU, 2.5 eq. DIEA und 2 eq. des Glycosylamins zu den höchsten Glycopeptidausbeuten.

Die Zucker-Azide wurden kurz vor der Glycosylierungsreaktion mit Pd/C/H₂ zu den Zuckeraminen reduziert (Abbildung 34). Im Falle des Tri- und Pentasaccharids war eine vorangehende Modifikation des Schutzgruppenmusters notwendig, da von diesen Zuckern teilweise nur Vorstufen zur Verfügung standen.

Die Glycosylierungsausbeute betrug für das Monosaccharid mindestens 64 % und für das Pentasaccharid 21 % (Tabelle 3). Die AcHmb-Schutzgruppe des zur Asparaginsäure 8 benachbarten Alanins verhinderte erfolgreich die Aspartimidbildung sowohl beim Aufbau der Peptidkette als auch bei der anschließenden Glycosylierungsreaktion. Die Acetylschutzgruppen der Zuckerreste als auch die der Hmb-Schutzgruppe wurden in einem Schritt mit 20 % Hydrazin-Monohydrat in DMF abgespalten. Nach der Harzabspaltung wurden solche Glycopeptide, die Benzylschutzgruppen an den Zuckerresten trugen, mit Pd/C/H₂ in MeOH/Essigsäure behandelt.

Das resultierende Produktgemisch wurde mittels HPLC-Chromatographie analysiert (Abbildung 35) und aufgereinigt; jede einzelne HPLC-Fraktion wurde aufgefangen und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die prozentualen Anteile der einzelnen Produktfraktionen wurden über eine Integration des HPLC-Chromatogramms berechnet (Tabelle 3). Von den pentasaccharidischen Glycopeptiden konnten die Benzylschutzgruppen nicht vollständig abgespalten werden; die HPLC-Peaks der vollständig entschützten und teilweise Benzyl-geschützten pentasaccharidischen Glycopeptide (**11**) und (**12**) sind in Abbildung 35 gekennzeichnet. Bei der Ausbeuteberechnung wurden die einzelnen Produktfraktionen der vollständig entschützten und teilweise Benzyl-geschützten Glycopeptide (**11**) und (**12**) zusammengefaßt.

Tabelle 3: Ausbeuten für die N-Glycosylierungsreaktion mit Zuckern verschiedener Größe; Mono = Monosaccharid, Di = Disaccharid, Tri = Trisaccharid, Penta = Pentasaccharid.

Glycopeptid <i>NAA</i>	% Ausbeute	Glycopeptid <i>NAS</i>	% Ausbeute
5 (Mono)	77	6 (Mono)	64
7 (Di)	55	8 (Di)	47
9 (Tri)	51	10 (Tri)	30
11 (Penta)	45	12 (Penta)	21

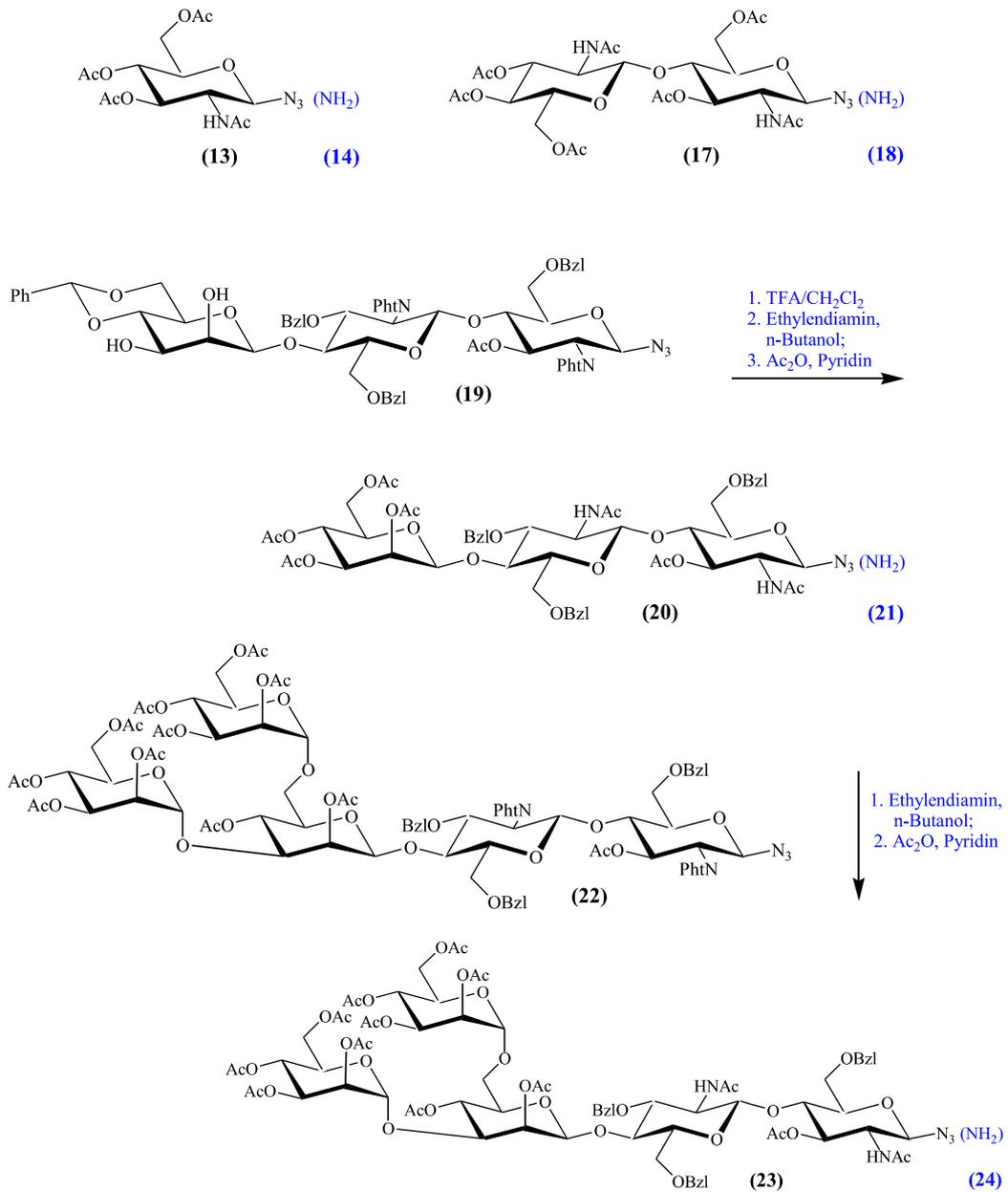


Abbildung 34: Oligosaccharide, die in der Glycopeptidsynthese eingesetzt wurden.

7 PROJEKTDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

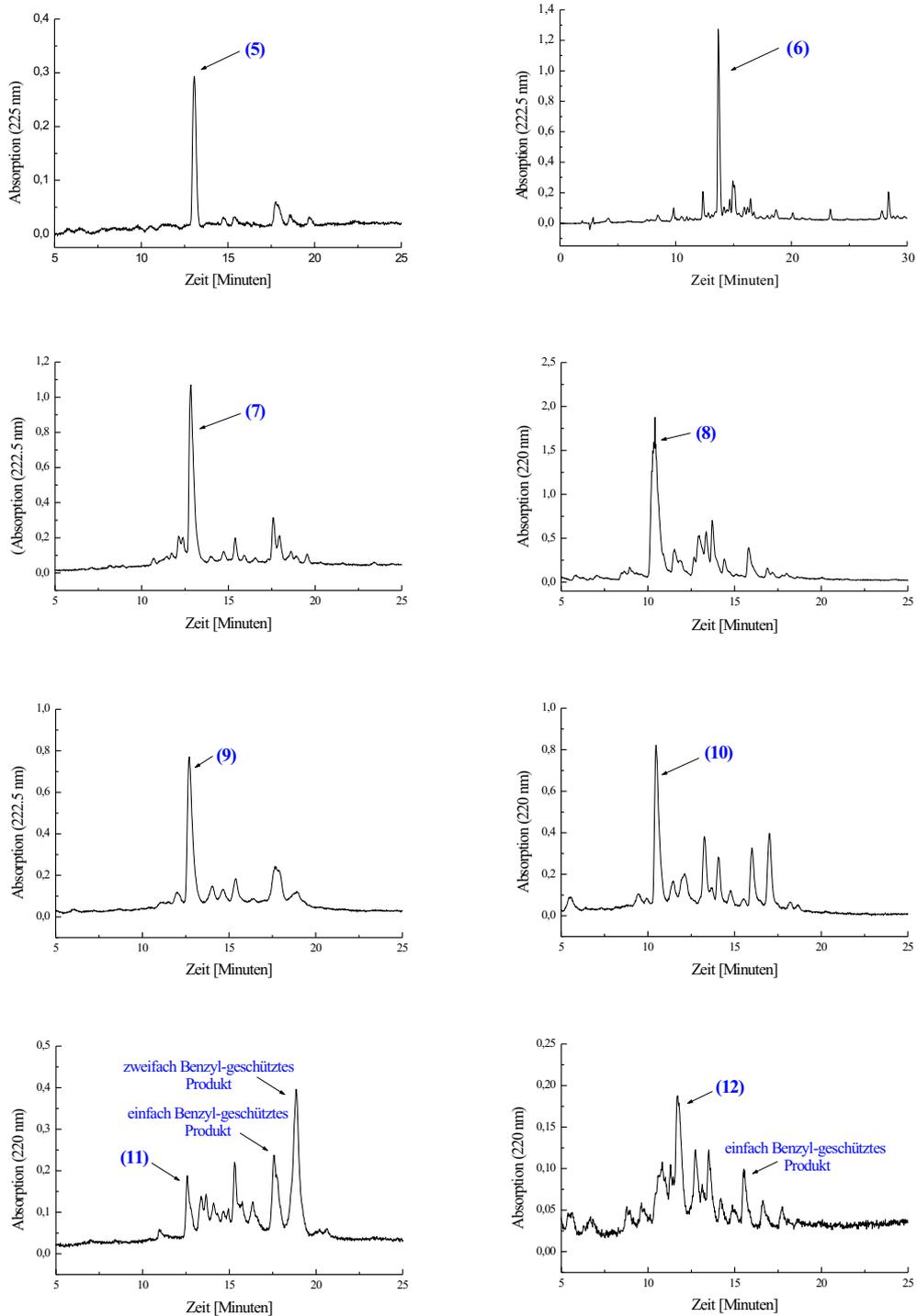


Abbildung 35: HPLC-Spektren der Glycopeptide (5-12).

7.1.2 NMR-Untersuchungen

Von den nicht modifizierten Peptiden **(1)** und **(2)** und den zugehörigen N-Glycopeptiden wurden ^1H 1D NMR-Spektren und ^1H 2D TOCSY beziehungsweise NOESY-Spektren bei 600 MHz in Phosphatpuffer, pH 5.5, aufgenommen. Die Peptide und N-Glycopeptide zeigten einen relativ hohen α -helikalen Anteil, bestimmt durch den chemical shift index [143], die $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten (Tabelle 4) und die Intensität sequentieller NOEs.

NOE-Effekte

Zum Vergleich der $H_N H_N(i, i+1)$ NOE-Intensitäten in den jeweiligen 2D NOESY-Spektren wurden Spuren durch die NH-Diagonalsignale der Aminosäuren E2 und N8 gelegt. Anhand dieser Spuren konnte keine Veränderung der NOE-Intensität durch die N-Glycosylierung festgestellt werden.

Für α -Helices, aber auch für 3_{10} -Helices oder β -Turn-Strukturen charakteristische $H_\alpha H_N(i, i+3)$ NOEs wurden bei folgenden Verbindungen gefunden:

Peptid **(1)**, mono- und disaccharidische Glycopeptide **(5)** und **(7)**: A5/N8

di- und trisaccharidische Glycopeptide **(8)** und **(10)**: S10/A13

trisaccharidisches Glycopeptid **(10)**: N8/K11

Ein für 3_{10} -Helices oder β -Turn-Strukturen typischer $H_\alpha H_N(i, i+2)$ NOE trat ausschließlich bei den Glycopeptiden **(5)** und **(10)** auf: N8/A10 bzw. N8/S10.

Nur in dem NOESY-Spektrum des trisaccharidischen N-Glycopeptids **(10)** wurden starke Wechselwirkungen der Seitenkette von Asparagin 8 mit den Zuckerresten detektiert.

Aufgrund der bei den Glycopeptiden **(5)** und **(10)** auftretenden außergewöhnlichen NOEs sind im folgenden jeweils Ausschnitte aus den NH- H_α -Bereichen der ^1H 2D NOESY-Spektren abgebildet (Abbildungen 36 und 37).

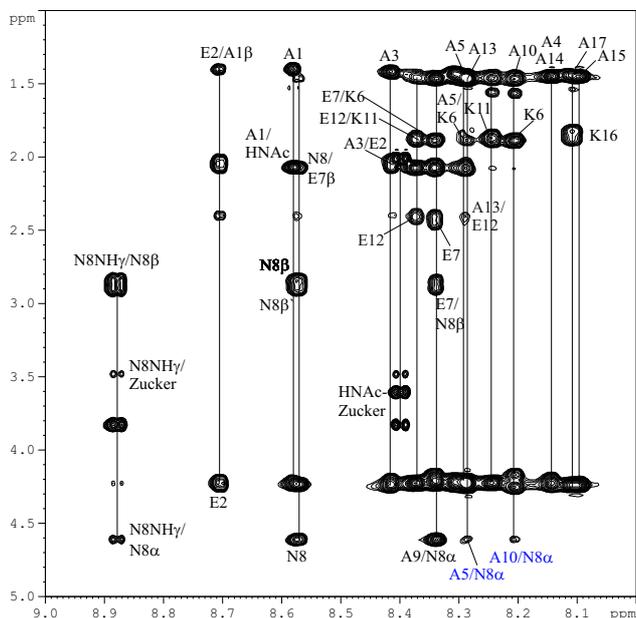


Abbildung 36: Ausschnitt eines ^1H -NOESY-Spektrums des NH-H α -Bereichs des Glycopeptids (**5**); 600 MHz, Phosphatpuffer (50 mmolar) in H $_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, pH 5.5, 276 K, 2 mmolar.

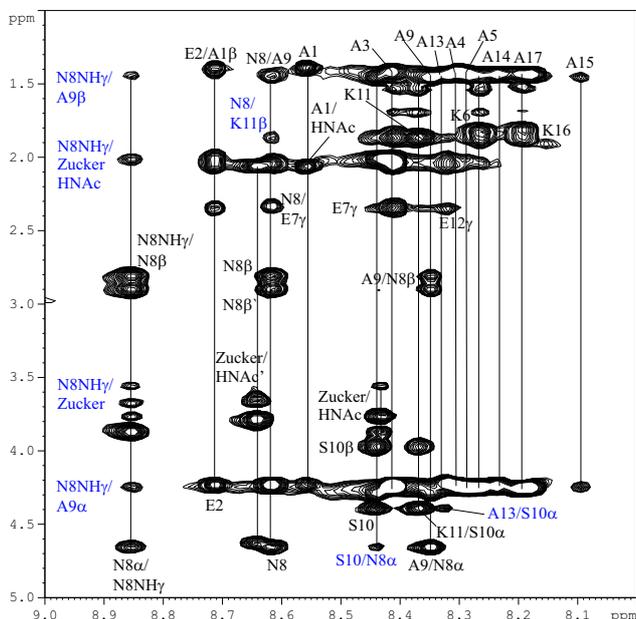


Abbildung 37: Ausschnitt eines ^1H -NOESY-Spektrums des NH-H α -Bereichs des Glycopeptids (**10**); 600 MHz, Phosphatpuffer (50 mmolar) in H $_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, pH 5.5, 276 K, 2 mmolar.

Doppelte Signalsätze

Die N-Glycopeptide, die das Pentasaccharid trugen, wiesen zwei NMR-Signalsätze für N-terminale Aminosäuren ((**11**) und (**12**)) und vereinzelte interne Aminosäuren ((**12**)) auf (Abbildungen 38 und 39). Der jeweils zweite Datensatz zeigte $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten (Tabelle 4), die einem stärker entfalteten Zustand des Glycopeptids entsprachen. Während das Intensitätsverhältnis der beiden Signalsätze für das Glycopeptid (**11**) etwa 1:3 betrug, lagen für das Glycopeptid (**12**) Signalsätze gleicher Intensität vor.

Zur Reinheitskontrolle wurden von den Glycopeptiden (**11**) und (**12**) nach den NMR-Messungen erneut Massenspektren aufgenommen, die die Vermutung unterstützten, daß in den NMR-Spektren nicht unterschiedliche Verbindungen, sondern unterschiedliche Konformationen detektiert worden waren (Abbildung 40).

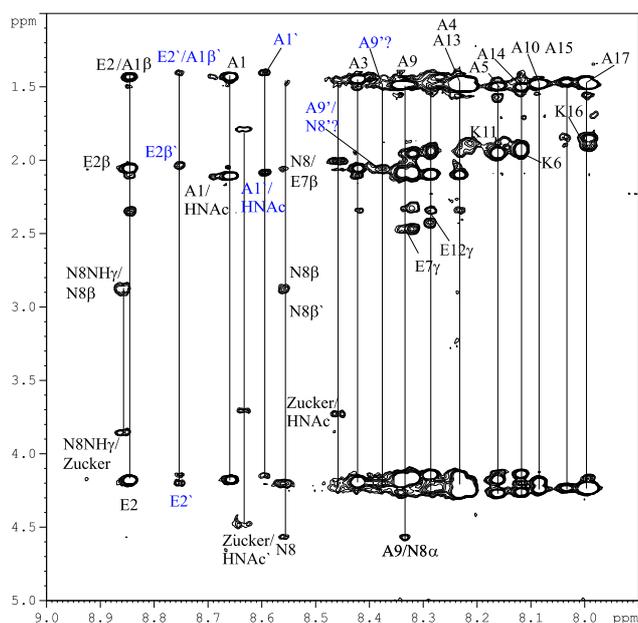


Abbildung 38: Ausschnitt eines ^1H -NOESY-Spektrums des NH-H_α -Bereichs des Glycopeptids (**11**); 600 MHz, Phosphatpuffer (50 mmolar) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, pH 5.5, 276 K, 1 mmolar.

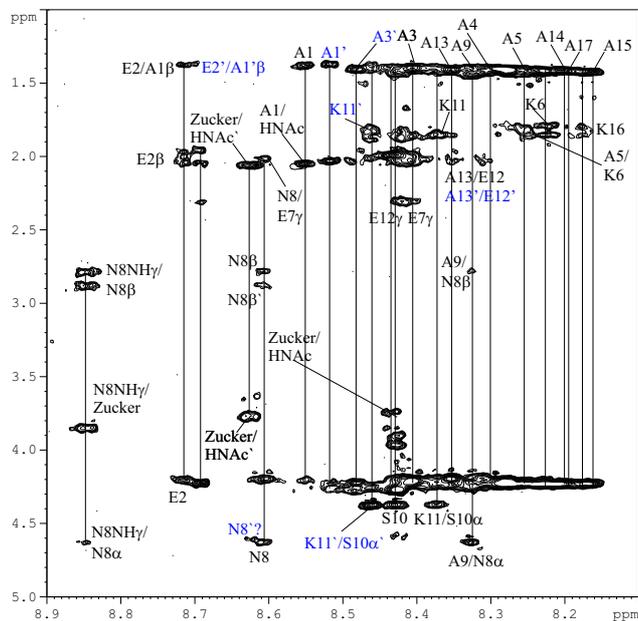


Abbildung 39: Ausschnitt eines ^1H -NOESY-Spektrums des NH-H_α -Bereichs des Glycopeptids (**12**); 600 MHz, Phosphatpuffer (50 mmolar) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, pH 5.5, 276 K, 0.5 mmolar.

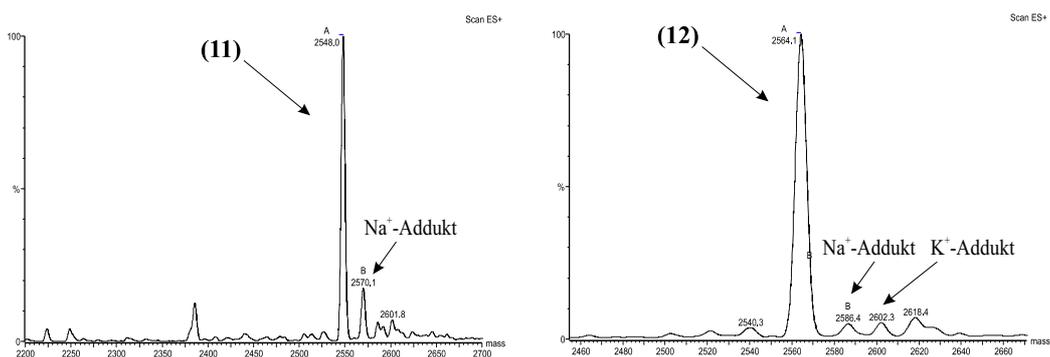


Abbildung 40: ESI-Massenspektren der Glycopeptide (**11**) und (**12**) nach den NMR-Messungen.

$^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten

Bei den N-Glycopeptiden, die nur einen Zuckerrest trugen, wurde wie bei den pentasaccharidischen N-Glycopeptiden eine Zunahme der $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in der N-terminalen Region beobachtet. In Tabelle 4 sind die eindeutig bestimmten $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten aller untersuchten Peptide und N-Glycopeptide aufgeführt. Die meisten Kopplungskonstanten konnten aufgrund der starken Signalüberlappungen nicht ermittelt werden.

Tabelle 4: $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten (1D NMR-Spektren, 600 MHz, in Phosphatpuffer, pH 5.5). (') kennzeichnet die Daten eines zweiten Signalsatzes.

NAA	1	5 (Mono)	7 (Di)	9 (Tri)	11 (Penta)	11 (Penta)'
A1	3.10	4.82	3.51	3.95	3.07	4.38
E2	5.31	5.26	4.38	3.51	3.51	5.70
N8	3.54	3.51	-	3.51	3.51	-
NAS	2	6 (Mono)	8 (Di)	10 (Tri)	12 (Penta)	12 (Penta)'
A1	3.51	4.38	3.51	3.95	-	5.70
E2	4.38	5.70	4.82	4.00	4.82	6.14
N8	3.51	4.38	3.51	3.51		5.26
S10	-	3.51	3.51	3.51		4.38
K11	-	4.38	3.51	3.51	3.07	5.70

Chemische Verschiebungsdifferenzen

Im folgenden werden die überlagerten Kurven der chemischen Verschiebungsdifferenzen des NH-Bereichs und des H_α -Bereichs nach der Methode von Wishart *et al.* [142, 143] (siehe Kapitel 6.1.1) zum einen für das Peptid (**2**) und die Glycopeptide (**6**), (**8**), (**10**) und (**12**), zum anderen für das Peptid (**1**) und die Glycopeptide (**5**), (**7**), (**9**) und (**11**) diskutiert. Dabei wurden die chemischen Verschiebungsdifferenzen für Aminosäuren, auf die Alanin folgte, korrigiert [144, 145].

Bewußt wurden hier die von Wishart *et al.* und Merutka *et al.* veröffentlichten Referenzwerte [144, 145] für die Berechnung der chemischen Verschiebungsdifferenzen herangezogen, weil die für die Ermittlung der Referenzwerte gewählten

experimentellen Bedingungen weitestgehend den Meßbedingungen der Doktorarbeit entsprachen.

Peptid (2) und Glycopeptide NAS

Im NH-Bereich zeigen die Kurven der chemischen Verschiebungsdifferenzen einen sehr ähnlichen, periodischen Verlauf, wobei die Helikalität vom N-Terminus zum C-Terminus zunimmt (Abbildung 41). Die größten Abweichungen findet man hier in einer Tieffeldverschiebung der N-Glycopeptidsignale gegenüber den Signalen des Peptids (2) an den Aminosäurepositionen 5, 7, 8, 10 und 12 und in einer relativen Hochfeldverschiebung der N-Glycopeptidsignale an den Aminosäurepositionen 1 und 2.

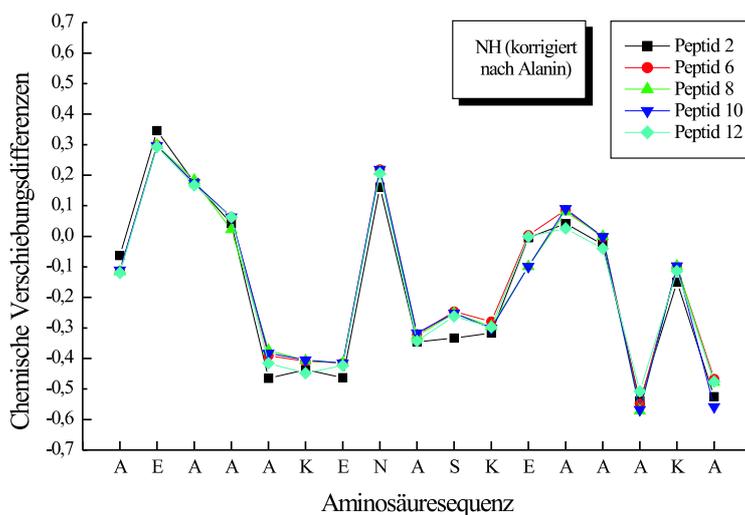


Abbildung 41: NH-chemische Verschiebungsdifferenzen für das Peptid (2) und für die Glycopeptide (6), (8), (10), (12) nach Merutka und Wishart [144, 145].

Die Kurven des H_{α} -Bereichs verlaufen unregelmäßiger. Auffällig ist die deutliche Hochfeldverschiebung der H_{α} -Protonen eines Signalsatzes des Glycopeptids (12), was nach [143] eindeutig ein Hinweis auf eine stärker α -helikale Struktur ist. Dagegen weist das Glycopeptid (6) mit nur einem Zuckerrest eine sichtbare Tieffeldverschiebung gegenüber dem nicht glycosylierten Peptid auf und somit einen geringeren α -helikalen Anteil (Abbildung 42).

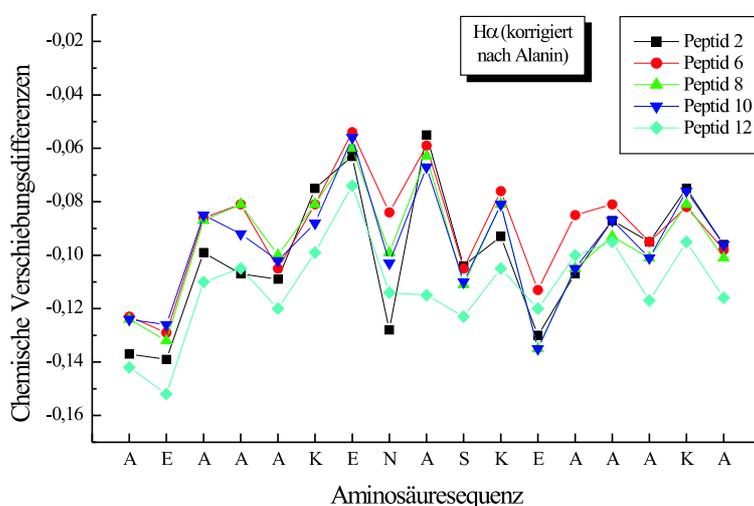


Abbildung 42: H_α-chemische Verschiebungsdifferenzen für das Peptid (2) und für die Glycopeptide (6), (8), (10), (12) nach Merutka und Wishart [144, 145].

Peptid (1) und Glycopeptide NAA

Die Kurven der chemischen Verschiebungsdifferenzen des Peptids NAA (1) und der zugehörigen N-Glycopeptide verlaufen im NH-Bereich analog den oben diskutierten (Abbildung 43); die Kurven des Peptids (1) und der Glycopeptide (5), (7), (9), (11) sind allerdings durchschnittlich um 0.1 ppm hochfeldverschoben gegenüber den chemischen Verschiebungsdifferenzen des Peptids und der Glycopeptide NAS. Dies läßt auf eine größere Helikalität des Peptids (1) und der Glycopeptide NAA gegenüber dem Peptid (2) und den zugehörigen Glycopeptiden schließen. Entgegen der tendenziellen Hochfeldverschiebung der NMR-Signale ist das Signal von Alanin 9 in der Sequenz NAA um etwa 0.4 ppm tieffeldverschoben gegenüber der Aminosäureabfolge NAS.

Die chemischen Verschiebungsdifferenzen im H_α-Bereich zeigen für die Peptid- und Glycopeptidgruppe NAA einen weniger regelmäßigen Verlauf als die der Gruppe NAS. Dennoch ist bei allen Kurven, gemäß eines größeren α -helikalen Anteils, eine Hochfeldverschiebung von etwa 0.02 ppm im Vergleich zur Gruppe NAS zu verzeichnen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind aus dem H_α-Bereich der Gruppe NAA nur die Kurven des Peptids (1) und der Glycopeptide (5), (7) und (9) gezeigt (Abbildung 44).

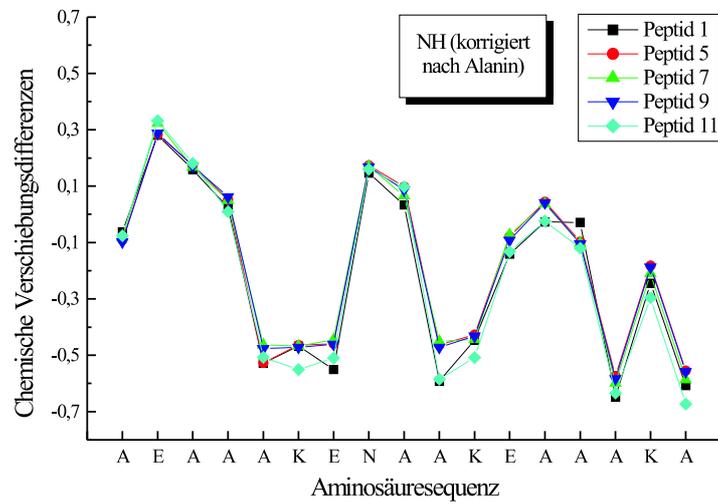


Abbildung 43: NH-chemische Verschiebungsdifferenzen für das Peptid (1) und für die Glycopeptide (5), (7), (9), (11) nach Merutka und Wishart [144, 145].

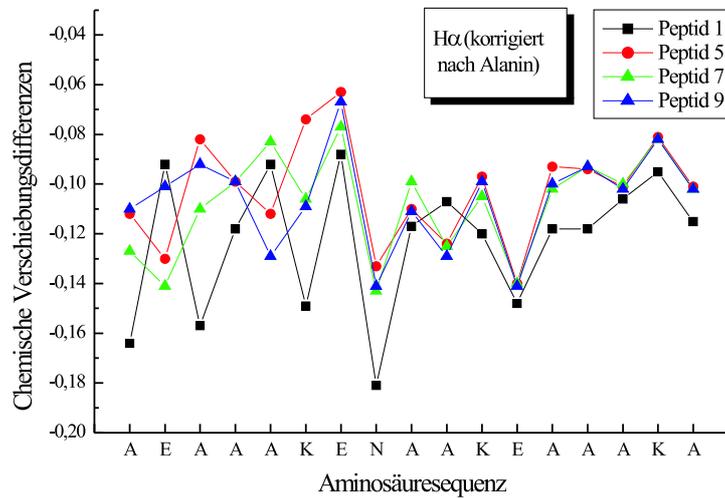


Abbildung 44: H α -chemische Verschiebungsdifferenzen für das Peptid (1) und für die Glycopeptide (5), (7), (9) nach Merutka und Wishart [144, 145].

7.1.3 Circulardichroismus (CD)-Untersuchungen

Peptid (1) und Glycopeptide NAA

Das Peptid (1) hatte bei 3 °C in H₂O einen α -helikalen Anteil von 70 %, wobei die Helikalität anhand der Elliptizität bei 222 nm berechnet wurde. Für ein 100 % α -helikales Peptid wurde eine mittlere molare Elliptizität von $-\Theta_{222} = -33.400$ Grad cm² dmol⁻¹ angenommen [153].

Die CD-Spektren der entsprechenden Glycopeptide in H₂O zeigten nur geringe Abweichungen von dem des nicht modifizierten Peptids. Dennoch wurde eine Abnahme der Helikalität von dem pentasaccharidischen Glycopeptid (11) in Richtung des Glycopeptids (5) mit nur einem Zuckerrest beobachtet (Abbildung 45). Demnach wird das Peptid (1) umso mehr durch eine N-Glycosylierung konformationell verändert, je kleiner der angehängte Zuckerrest ist.

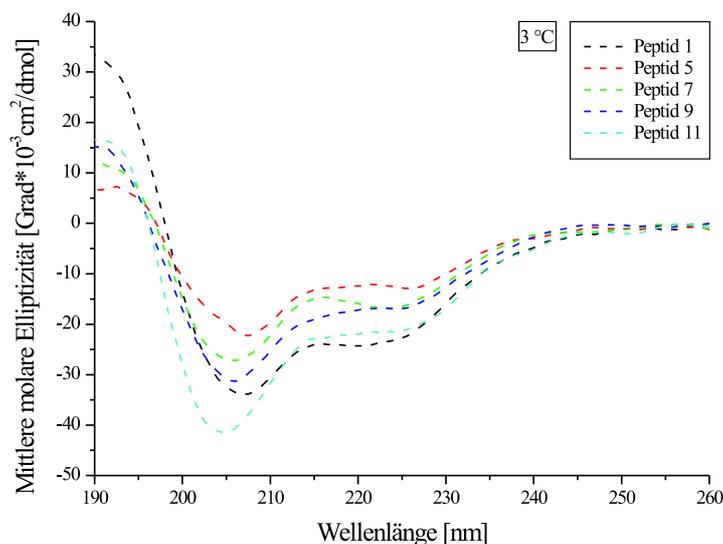


Abbildung 45: CD-Spektren des Peptids (1) und der Glycopeptide (5), (7), (9), (11), 20 μ molar, H₂O.

Es sei hier angemerkt, daß die Unterschiede in den Kurvenverläufen des nicht glycosylierten Peptids und der Glycopeptide nur in geringem Maße auf die chromophoren Einflüsse der Zuckerreste zurückzuführen sind, da sie angesichts ihrer Anzahl von Amidchromophoren nur zu kleinen Abweichungen in der mittleren

molaren Elliptizität führen (siehe 6.2). Bei dem für α -Helices charakteristischen Maximum im Positiven bei 190 nm und dem Minimum in Negativen bei 222 nm zeigt die CD-Kurve der Zucker in Abbildung 30 (6.2) fast keine Elliptizität; lediglich das für die α -Helix auftretende Minimum bei 208 nm könnte durch die N-Glycanreste beeinflusst werden, da diese bei 200 nm ein positives Maximum der Elliptizität aufweisen.

Peptid (2) und Glycopeptide NAS

Das Peptid (2) zeigte bei 3 °C in H₂O eine α -helikalen Anteil von 44 % (berechnet anhand der Elliptizität bei 222 nm [153]). Dahingehend zeigten alle entsprechenden Glycopeptide einen geringeren α -helikalen Anteil als die der Gruppe NAA bei ansonsten ähnlichen Kurvenverläufen. Allerdings konnte in dem CD-Spektrum des pentasaccharidischen Glycopeptids (12) ein hoher random coil-Anteil beziehungsweise eine Überlagerung verschiedener Konformationen festgestellt werden (Abbildung 46).

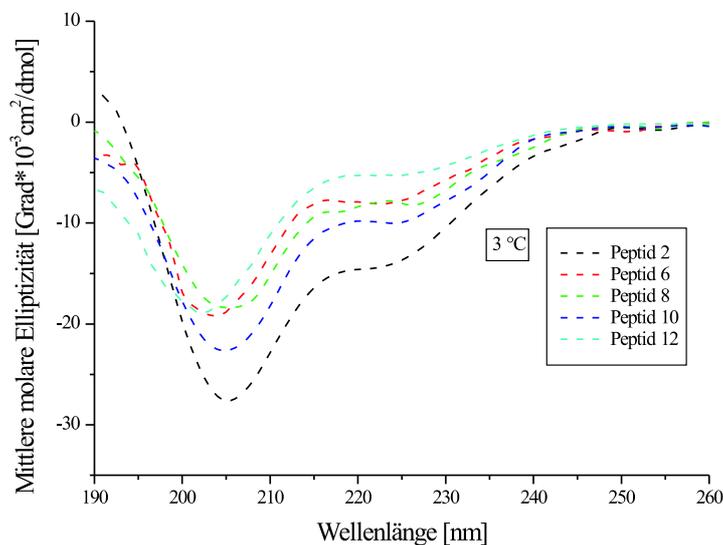


Abbildung 46: CD-Spektren des Peptids (2) und der Glycopeptide (6), (8), (10), (12), 20 μ molar, H₂O.

Da das CD-Spektrum des pentasaccharidische Glycopeptid (12) in H₂O keine ausgeprägte α -Helikalität zeigte, wurden von diesem Glycopeptid CD-Spektren in

H₂O/TFE-Gemischen aufgenommen. Mit größerem Anteil an TFE stieg hier der α -helikale Gehalt auf maximal $-20 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ bei 60 % TFE.

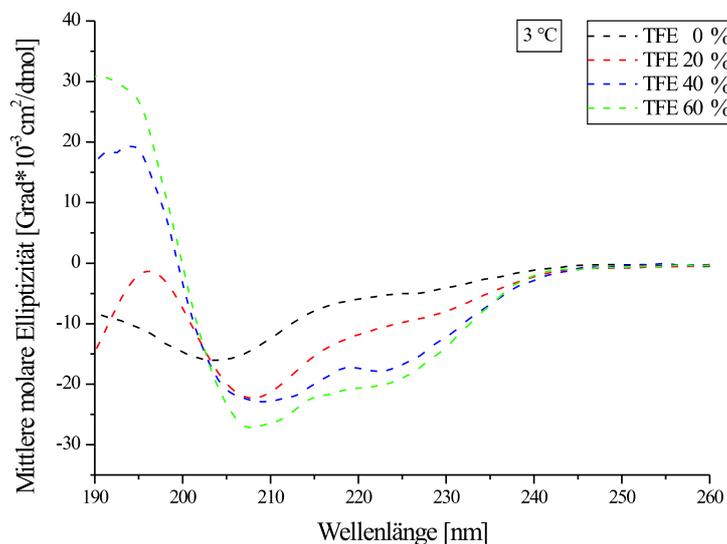


Abbildung 47: CD-Spektrum des Glycopeptids (**12**), 20 μ molar, H₂O/TFE-Gemische.

Es ist anzunehmen, daß das Glycopeptid in Form einer *nascent helix* vorlag [159]. Dies ist eine Serie von turn-ähnlichen Konformationen, die im Gleichgewicht mit ungefalteten Konformationen stehen und in H₂O/TFE-Gemischen in helikale Strukturen stabilisiert werden können. Ein isodichroistischer Punkt bei 203 nm zeigt an, daß der Konformationsübergang bei dem vorliegenden Glycopeptid nur zwischen zwei Zuständen stattgefunden hat (Abbildung 47).

7.1.4 Kapillarelektrophorese

Diejenigen N-Glycopeptide, die die größten konformationellen Änderungen gegenüber dem Ausgangspeptid aufwiesen beziehungsweise doppelte Datensätze im NMR-Spektrum zeigten, wurden mittels der Kapillarelektrophorese analysiert. Dadurch sollte die Reinheit der Proben nochmals kontrolliert werden. Zudem erhoffte man sich dadurch, auch unterschiedliche Glycopeptidkonformationen trennen zu können.

Die mono- und pentasaccharidischen Glycopeptide wurden in einem Phosphatpuffer, pH 8, analysiert. Für das pentasaccharidische Glycopeptid (**12**) traten 2 Peaks mit nahezu gleicher Retentionszeit auf, deren Peakverhältnis Temperaturabhängig war (Abbildung 48). Über die Integration der jeweiligen Peaks wurde ermittelt, daß sich das Peakverhältnis von 1.1:1 bei 10 °C auf 1.8:1 bei 60 °C verschob. Dagegen zeigten die Chromatogramme der übrigen Glycopeptide bei jeder Meßtemperatur jeweils nur einen Peak (nicht gezeigt).

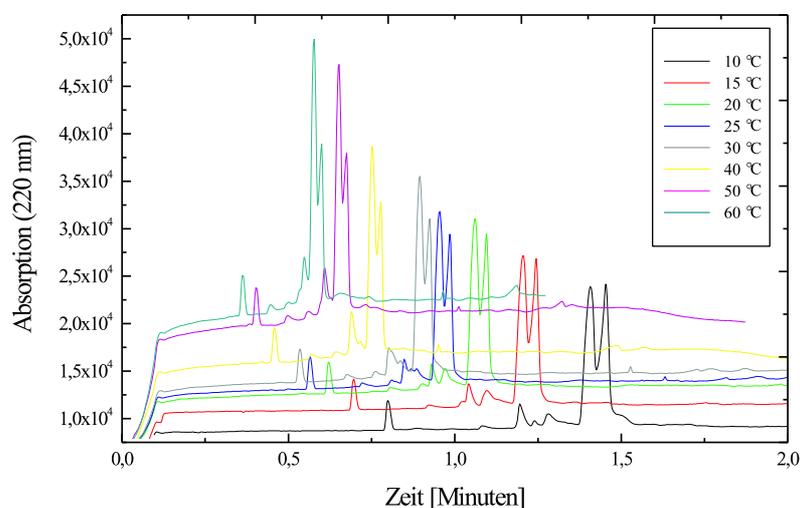


Abbildung 48: CE-Chromatogramm von (**12**) in Phosphatpuffer, pH 8, bei verschiedenen Meßtemperaturen.

7.1.5 Resümee

In diesem Themenabschnitt wurden α -helikale Modellpeptide, die eine N-Glycosylierungsstelle oder eine natürliche N-Glycosylierungssequenz aufwiesen, zum Zwecke der Konformationsuntersuchung mit Zuckerresten verschiedener Größe N-glycosyliert. Die eingesetzten Mono- Di-, Tri- und Pentasaccharide bilden Teile der Core-Region der natürlichen N-Glycane.

Für die nachträgliche Glycosylierung der Peptide wurde das Allyl/Fmoc/t-Bu-Schutzgruppensystem der Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Hmb-Schutzgruppe als reversibler Schutz des Aspartylamidstickstoffs ausgenutzt. Auch die Glycosylierungsreaktionen mit einem Pentasaccharid lieferten die für NMR-Untersuchungen benötigten Glycopeptidmengen.

CD- und NMR-Untersuchungen zeigten, daß die globale und lokale Struktur der Modell-N-Glycopeptide durch die Größe der angehängten N-Glycanreste und die Wahl der Aminosäurereste nahe der Glycosylierungsstelle beeinflussbar war. Tri- und disaccharidische N-Glycanreste schienen die α -helikale Konformation der Ausgangspeptide weniger zu destabilisieren als ein monosaccharidischer Zuckerrest. Einen Hinweis auf die Ausbildung einer 3_{10} -Helix oder einer β -Turn-Struktur durch N-Glycosylierung gab ein im NOESY-Spektrum eines monosaccharidischen Glycopeptids detektierter $H_{\alpha}H_N(i, i+2)$ NOE (N8/A10) in Verbindung mit einer CD-Kurve, in der der α -helikale Anteil gegenüber dem Ausgangspeptid deutlich abgenommen hatte.

Die Anknüpfung des Core-Pentasaccharids in Verbindung mit dem Vorliegen einer natürlichen N-Glycosylierungssequenz führte zu der deutlichsten konformationellen Änderung des Ausgangspeptids. Im NMR-Spektrum waren hier Signalsätze gleicher Intensität einer eher unstrukturierten Konformation und einer α -helikalen Konformation zu unterscheiden. Auch die CD-Untersuchungen dieses pentasaccharidischen Glycopeptids ließen auf eine Überlagerung verschiedener Konformationen schließen. Das CE-Diagramm derselben Verbindung zeigte zwei Peaks, deren Verhältnis temperaturabhängig war. Demnach könnte hier die kapillarelektrophoretische Trennung von N-Glycopeptidkonformationen gelungen sein.

7.2 Ansätze zur Darstellung einer N-glycosylierten aminoacylierten tRNA

In diesem Themenkomplex sollte eine Strategie zur chemisch-enzymatischen Synthese von N-Glycoproteinen verfolgt werden, wobei die vorrangige Aufgabe in der Synthese eines N-glycosylierten, aminoacylierten Dinukleotids lag. Das aminoacylierte Dinukleotid sollte mit einer verkürzten Suppressor-tRNA ligiert werden und die so erhaltene tRNA in ein *in vitro*-Proteinsynthesesystem eingeschleust werden. An der Stelle eines Stopcodons sollte die glycosylierte Aminosäure ortsspezifisch in ein geeignetes Protein eingebaut werden. Zu diesem Zweck stand das von der Firma *Roche Molecular Biochemicals* angebotene *in vitro*-Proteinsynthesesystem RTS 500 [120] zur Verfügung.

7.2.1 Synthese von aktivierter N-glycosylierter Asparaginsäure

Als N-glycosylierte Aminosäuren wurden gemäß des Aufbaus natürlicher N-Glycoproteine N^β -[2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin und N^β -[2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin (Chitobiosyl-Asparagin) gewählt. Im folgenden wird die Darstellung der für eine Aminoacylierung eines Dinukleotids geeigneten Glycosylaminosäurebausteine beschrieben.

Der Aminosäurebaustein sollte in der N^α -Position NVOC-geschützt vorliegen und eine Cyanomethylestergruppierung am C-Terminus tragen (Abbildung 49). Als Zuckerschutzgruppen wurden Acetylschutzgruppen gewählt, da sie die Zuckersynthese stark vereinfachen, gegenüber allen angewandten Reaktionsbedingungen stabil sind und die Hydrophobie des Zuckerrestes erhöhen. Letzteres scheint während der *in vitro*-Translation bei dem Einbau modifizierter Aminosäuren vorteilhaft zu sein [15].

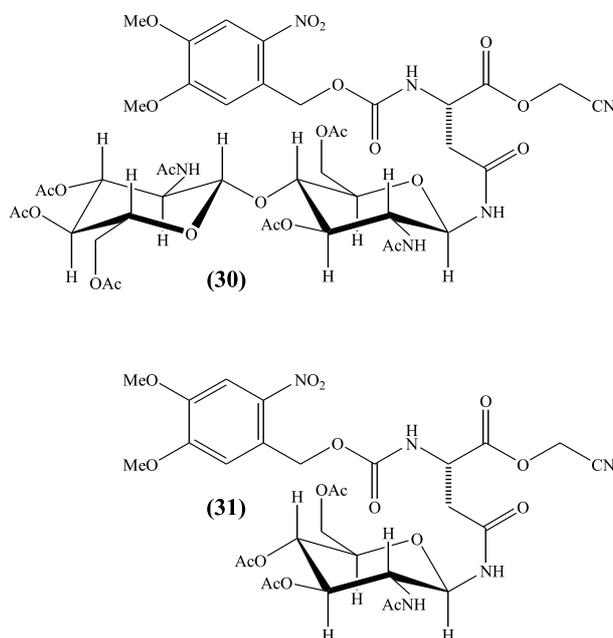


Abbildung 49: Strukturen der N^α -NVOC-geschützten N-glycosylierten Asparaginsäurecyanomethylester **(30)** und **(31)**.

Zunächst erfolgte eine Synthese der N-glycosylierten Aminosäure **(26)** in Lösung unter Einsatz von Boc-, tBu-geschützter Asparaginsäure und acetyliertem Chitobiosylamin (Abbildung 50). Dabei wurde das gängige Aktivierungsverfahren mit TBTU und DIEA verwendet, wobei die Aminosäurekomponente in einem Überschuß von 5 eq. eingesetzt wurde. Die Glycosylierung in Lösung führte zu einer Ausbeute von 60 %. Während der Aufreinigung traten Trennprobleme bei der Säulenchromatographie auf, wobei die Boc-, tBu-geschützte Asparaginsäure nur wenig unpolarer war als das Boc-, tBu-geschützte Chitobiosyl-Asparagin. Das Aufziehen der NVOC-Schutzgruppe gelang durch Abspaltung der Boc- und tBu-Schutzgruppe und anschließender Reaktion mit NVOC-Cl und NaHCO_3 in H_2O /Dioxan. Schließlich wurde aus der NVOC-geschützten glycosylierten Aminosäure **(27)** unter Zusatz von Chloracetonitril und Triethylamin in DMF der Cyanomethylaktivester **(30)** mit einer Gesamtausbeute von 14 % synthetisiert.

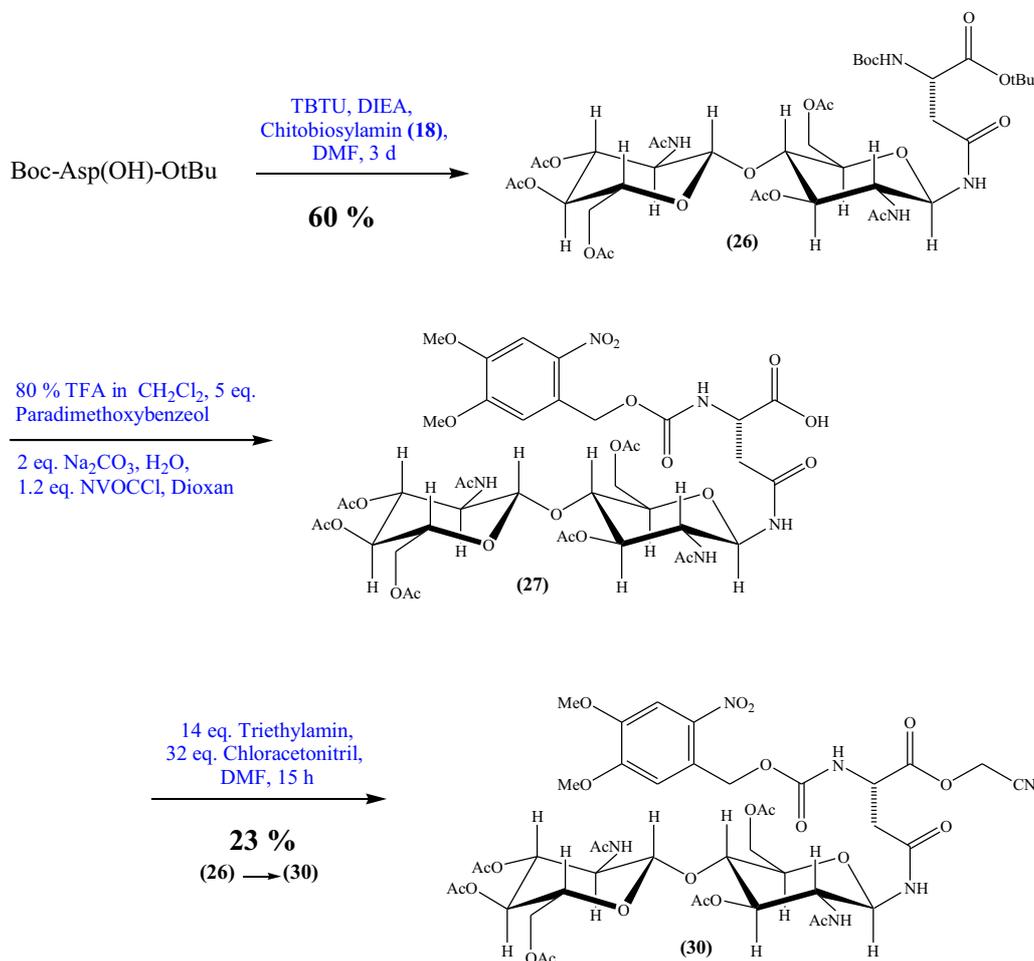


Abbildung 50: Synthese von N^{α} -NVOC-Asp(GlcNAc)₂-OCH₂CN in Lösung.

Alternativ wurde eine Synthese an einem Peptidharz entwickelt, um die chromatographischen Reinigungsschritte zu minimieren und somit höhere Ausbeuten zu erhalten. Weiterhin sollte mit der Festphasensynthese eine Verkürzung der Synthesezeit erzielt werden. Die Reaktionsschritte sind in Abbildung 51 anhand der Synthese von NVOC-geschützter N-glycosylierter Asparaginsäure (29) dargestellt.

Zunächst wurde N^{α} -Fmoc-, β -Allyl-geschützte Asparaginsäure an das gegenüber den verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln stabile und relativ preiswerte Wang-Harz unter Aktivierung mit MSNT und MeIm gebunden. Es erfolgte die Allylabsplattung und die Ankupplung von acetyliertem 1- β -2-Acetamido-

glucopyranosylamin beziehungsweise Chitobiosylamin mit TBTU/DIEA, wobei ein Reagenzüberschuß von 2 eq. des Zuckers für eine quantitative Glycosylierung ausreichte.

Nach der Fmoc-Abspaltung mit Piperidin wurde der N-Terminus mit der NVOC-Schutzgruppe geschützt, was analog der Synthese in Lösung durch die Zugabe von NVOC-Cl und NaHCO₃ in H₂O/Dioxan gelang. Der Überschuß von NVOC-Cl wurde hier allerdings auf 5 eq. erhöht. Nach der Harzabspaltung mit 80 % TFA in CH₂Cl₂ konnten die glycosylierten, NVOC-geschützten Carbonsäuren in 43-49 % Ausbeute erhalten werden.

Die Reaktionen zu den entsprechenden Cyanomethylaktivestern lieferten nun Gesamtausbeuten von 22 % (**30**) und 27 % (**31**). Während die Synthese in Lösung inklusive der Aufreinigung 8 Tage benötigte, konnten die Cyanomethylester über die Festphasensynthese in 3 Tagen synthetisiert werden.

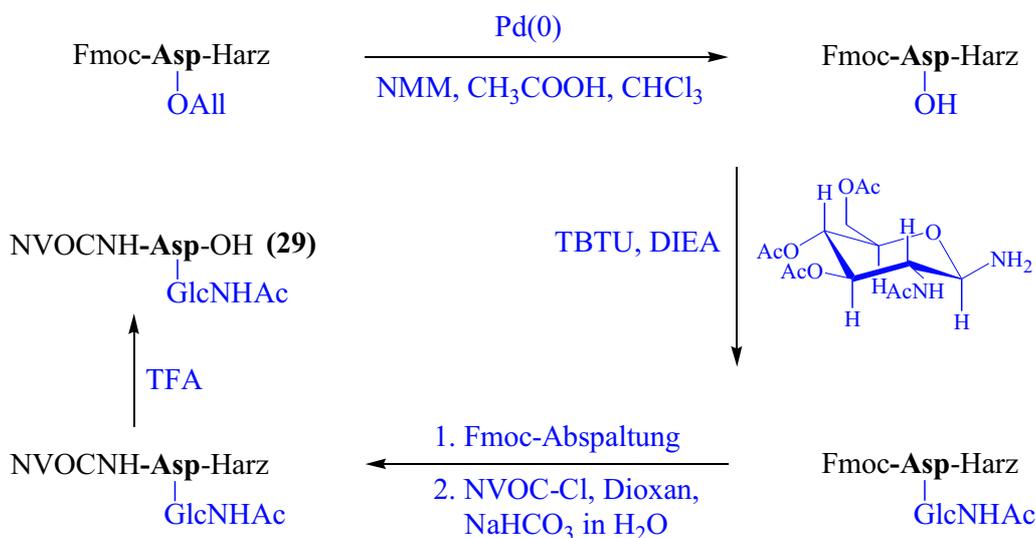


Abbildung 51: Darstellung von N^α-NVOC-geschützter N-glycosylierter Asparaginsäure (**29**) an fester Phase.

Im folgenden sind die ¹H-NMR-Spektren der NVOC-geschützten N-glycosylierten Cyanomethylaktivester (**30**) und (**31**) abgebildet.

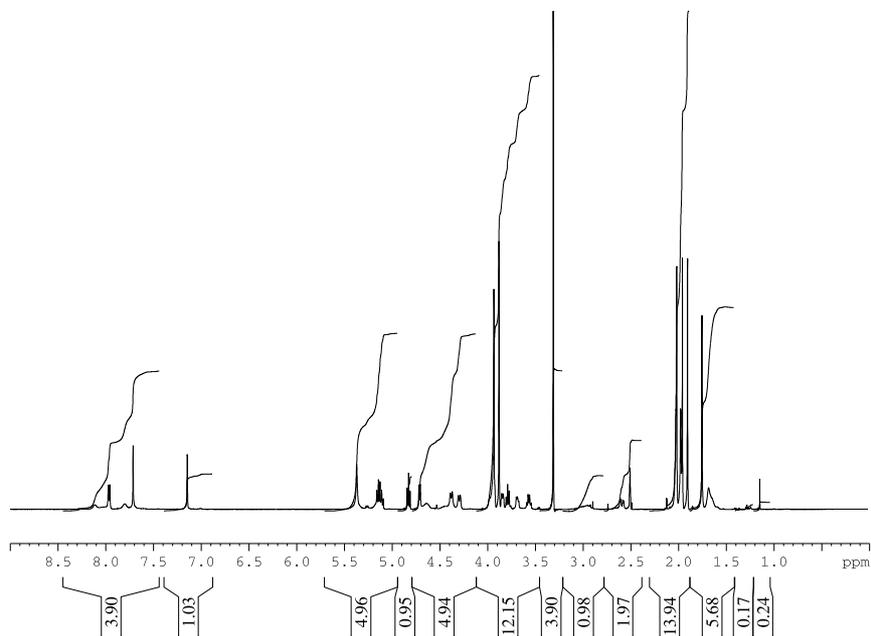


Abbildung 52: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **(30)**, DMSO-d_6 , 600 MHz.

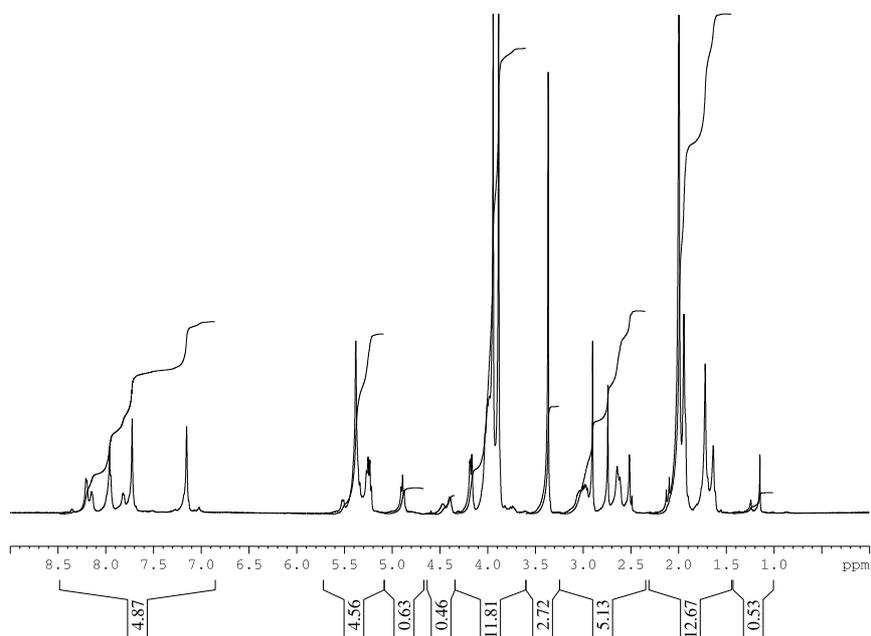


Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **(31)**, DMSO-d_6 , 600 MHz.

7.2.2 Ligationsversuche mit *pdCpA*

Synthese von *pdCpA*

Die Darstellung von 5'-Phospho-2-desoxyribocytidylylriboadenosin (*pdCpA*) erfolgte nach der Vorschrift von Robertson *et al.* [22] und ist in Kapitel 5.4.3 beschrieben. Die Dinukleotidsynthese erbrachte mit Robertson *et al.* [22] vergleichbare Produktausbeuten. Das vollständig entschützte Dinukleotid wurde mit HPLC-Chromatographie aufgereinigt; ein entsprechendes ^1H -NMR-Spektrum von *pdCpA* (**38**) ist in Abbildung 54 zu sehen.

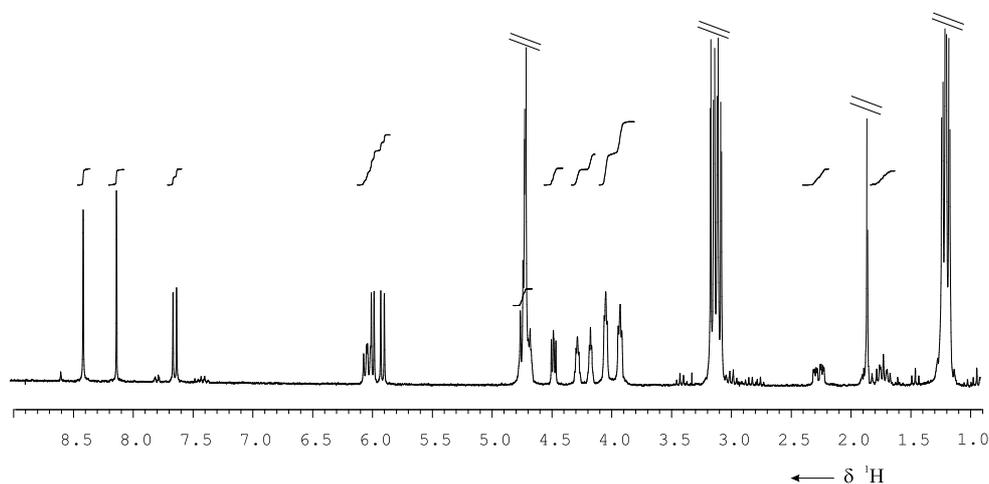


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum von (**38**), D_2O , 250 MHz.

Ligationsversuche

Für die in DMF durchgeführten Ligationsversuche des Dinukleotids *pdCpA* (**38**) mit den Cyanomethylaktivestern mußte das Dinukleotid in das Tetrabutylammoniumsalz umgesalzt werden, um eine gute Löslichkeit in DMF zu erreichen. Ein Überschuß von 0.2 eq. von Tetrabutylammoniumhydroxid sollte die Ligationsreaktion (Abbildung 55) katalysieren [119].

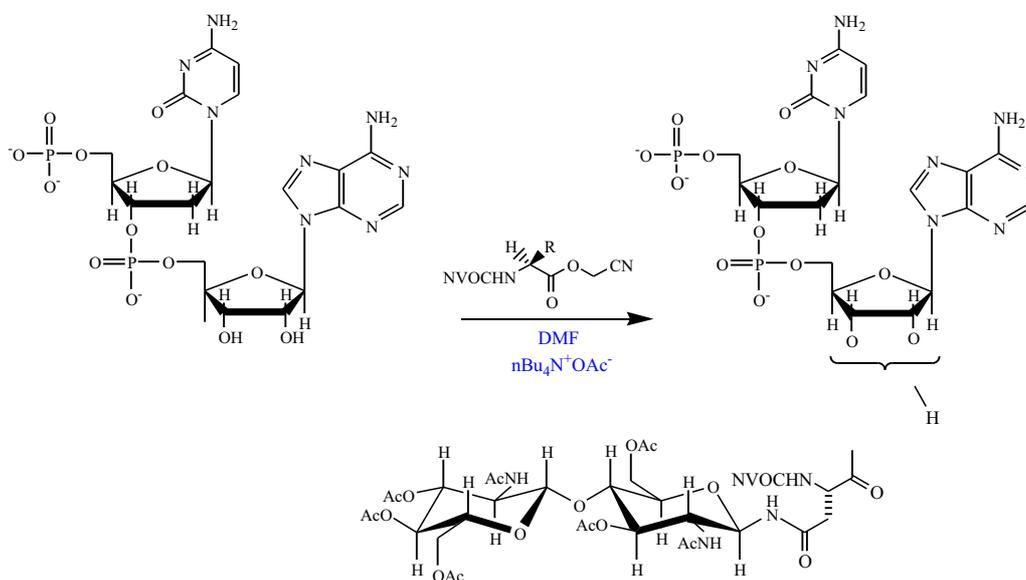


Abbildung 55: Ligrationsreaktion zu einem glycosylierten aminoacylierten Dinukleotid.

In den Ligrationsversuchen wurden die Äquivalentverhältnisse und die Reaktionszeiten gemäß Tabelle 5 variiert.

Tabelle 5: Ligrationsversuche von *pdCpA* (**38**) mit den Cyanomethylaktivestern (**30**) und (**31**) unter Variation der Äquivalentverhältnisse.

Zeit [min]	Konzentration (1 eq.)	eq. <i>pdCpA</i> (38)	eq. (30)	eq. (31)
60	24 mmolar	1	1	-
60	24 mmolar	1	-	1
10, 20, 30, 40	24 mmolar	1	5	-
10, 20, 30, 40	24 mmolar	1	-	5
10, 20, 30, 40	4.8 mmolar	5	1	-
10, 20, 30, 40	4.8 mmolar	5	-	1

Eine Reaktionskontrolle erfolgte alle 10 min durch DC und HPLC. Dazu wurde eine kleine Menge der Reaktionsmischung entnommen und mit Acetonitril/50 mM NH_4Ac in H_2O 2:1 (pH 4.5) gequentscht. Bei pH 4.5 ist die zu bildende Aminoacylbindung zwischen der Aminosäure- und der Nukleotidkomponente am stabilsten.

Zur UV-Detektion wurde die Absorption des Dinukleotids bei 260 nm und die Absorption der NVOC-Schutzgruppe bei 260 und 280 nm herangezogen. Die NVOC-Gruppe des Cyanomethylesters war auch auf der DC-Platte durch selektive violette Färbung mit einem Cer IV-Reagenz gut zu erkennen.

Bei der DC-Kontrolle trat bei der Wahl eines Überschusses von 5 eq. des Dinukleotids gegenüber dem Cyanomethylester und Reaktionszeiten von 20 und 30 min die charakteristische Farbreaktion gleicher Intensität an einem Produktfleck auf, der einen deutlicher geringeren R_f -Wert als der NVOC-geschützte Cyanomethylester aufwies. Nach einer Reaktionszeit von 45 min konnte dieses Produkt über DC nicht mehr nachgewiesen werden.

R_f -Wert (Acetonitril) Dinukleotid: 0

R_f -Wert (Acetonitril) Cyanomethylester: 0.6

R_f -Wert (Acetonitril) unbekanntes Produkt: 0.1

In einem HPLC-Spektrum des oben über DC analysierten Produktgemischs (5 eq. *pdCpA* (**38**), 1 eq. Cyanomethylester (**30**)) konnte allerdings bei keiner der gewählten Reaktionszeiten ein Peak detektiert werden, der die erwartete Absorption des Produkts bei 260 und 280 nm hatte.

In Abbildung 56 sind die HPLC-Spektren der Edukte (**30**) und (**38**) und das HPLC-Spektrum der Reaktionsmischung, die nach 30 min Reaktionszeit gequentscht worden war, dargestellt. Hier erkennt man, daß als Nebenreaktion des Ligationsversuchs eine Isomerisierung des Edukts (**30**) stattgefunden haben muß, da ein Doppelpeak bei etwa 37.5 min auftrat, der nur eine Masse aufwies. Ein solcher Doppelpeak trat in den HPLC-Spektren aller Ligationsansätze auf.

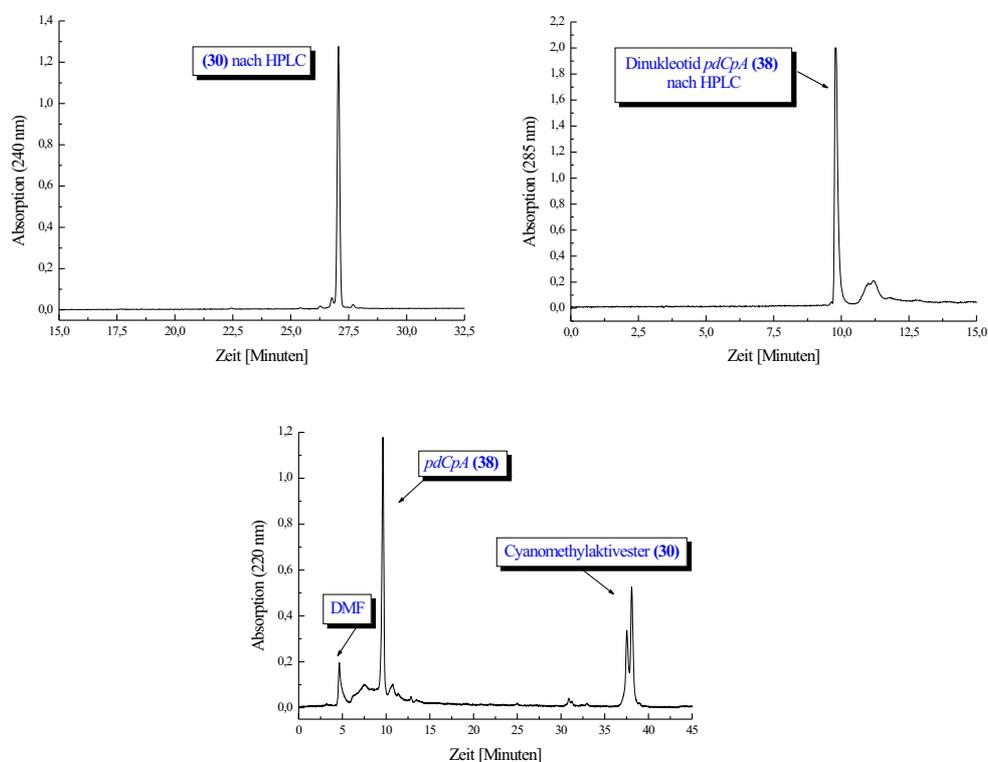


Abbildung 56: HPLC-Spektren der Edukte (30) und (38) und HPLC-Spektrum des Reaktionsgemisches.

Mit der hier angewandten Kupplungsmethode konnte kein aminoacyliertes Dinukleotid erhalten werden, da die Reaktion entweder wegen der Sperrigkeit der acetylierten Zuckerreste nicht stattgefunden hatte oder die Aminoacyl-Bindung so instabil war, daß der gebildete Ester nach kurzer Zeit wieder zerfiel und nicht isoliert werden konnte. In Arbeiten von Robertson *et al.* gelang die Aminoacylierung von *pdCpA* mit N^α -NVOC-L-Asparaginsäure- α -cyanomethyl- β -6-nitroveratryldiester mit einer Reaktionszeit von 2.5 h und einer Ausbeute von 87 % [119]. Auf eine Wiederholung der Arbeiten von Robertson *et al.* zur Überprüfung der in der Doktorarbeit angewandten Ligationsbedingungen wurde aus zeitlichen Gründen verzichtet, da der Schwerpunkt der Doktorarbeit nun auf die im folgenden beschriebene N-Glycoproteindarstellung über chemische Ligation gesetzt wurde.

In vorherigen Arbeiten, in denen Ligationen von O-glycosylierten [20, 21] und C-

glycosylierten [121] Aminosäuren mit *pdCpA* durchgeführt wurden, variierten die Reaktionszeiten von 2 min, über 1 h bis zu 3 h (Abbildung 57). Eine Abschätzung der benötigten Reaktionszeit war auch durch den Vergleich mit diesen Ergebnissen schlecht möglich.

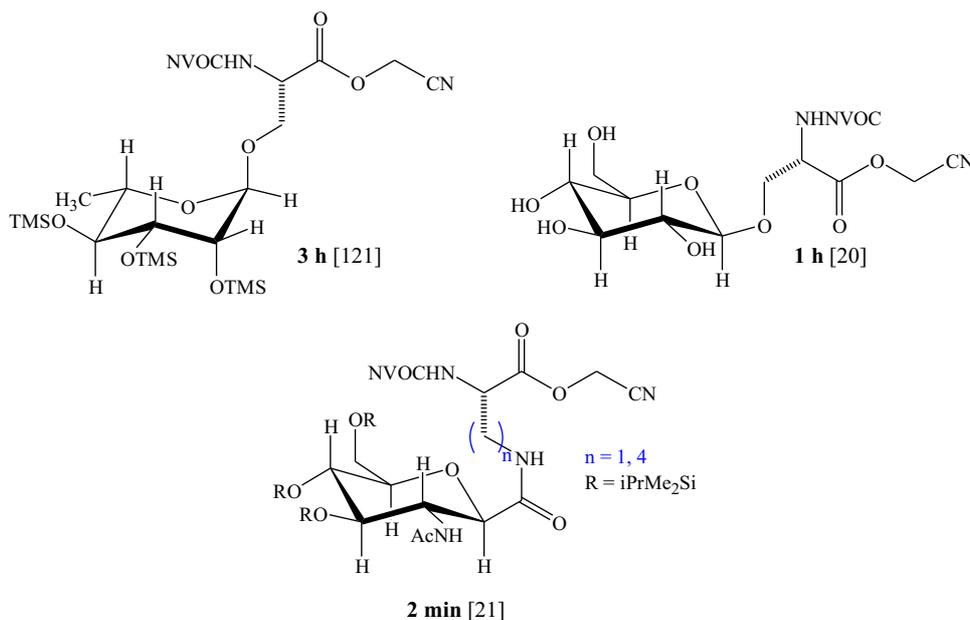


Abbildung 57: Für die erfolgreiche Aminoacylierung von *pdCpA* eingesetzte glycosylierte Aminosäure-Cyanomethylaktivester und die jeweiligen Reaktionszeiten der Ligation.

7.2.3 Resümee

Im Rahmen der Darstellung eines N-glycosylierten aminoacylierten Dinukleotids wurde hier eine Festphasensynthese für NVOC-geschützte glycosylierte Aminosäureaktivester entwickelt, die sich durch wenige notwendige Reinigungsschritte, bessere Produktausbeuten und eine Zeitersparnis gegenüber der Synthese in Lösung auszeichnete. Die Ligrationsreaktionen des glycosylierten Aminosäureaktivester mit dem ebenfalls synthetisierten Dinukleotid *pdCpA* führten nicht zur gewünschten Aminoacylierung des Dinukleotids. Die Gründe dafür könnten in der Instabilität der zu bildenden Aminoacylbindung oder in der Sperrigkeit der

gewählten Zuckerreste liegen. Eine erfolgreiche Ligation erfordert weitere Testreaktionen in Verbindung mit einer aufwendigen HPLC-Analytik, um die optimalen Reaktionszeiten ermitteln zu können und das Produkt isolieren zu können.

Es könnten zudem die Zucker-Acetylschutzgruppen gegen die von K. Michael [21] und M. Hoffmann [121] verwendeten Trimethylsilyl- oder Isopropyl-dimethylsilylschutzgruppen ausgetauscht werden, was allerdings die Zuckeraminosäuresynthese erschweren würde. Durch die Wahl alternativer Zuckerschutzgruppen könnte die bei den acetylierten Zuckeraminosäureaktivestern aufgetretene Isomerisierungsreaktion unterbunden oder abgeschwächt werden.

7.3 Synthese und Strukturuntersuchung des Prionenglycoproteinfragments SHA PrP172-194

Die Synthese und Strukturuntersuchung von kleinen Prionenglycoproteinfragmenten erfolgte als Vorarbeit zur Synthese eines N-glycosylierten Prionenproteinausschnitts des Hamsterprionenproteins SHA PrP. Dadurch sollten die Glycosylierungsreaktion innerhalb der Prionenproteinsequenz optimiert werden und eventuelle Struktureinflüsse der N-Glycosylierung auf das Peptidrückgrat detektiert werden. Für diese Untersuchungen wurde die im natürlichen Protein vorliegende α -helikale Region SHA PrP172-194 (Helix B) gewählt, die an Aminosäureposition 181 eine N-Glycosylierungsstelle aufweist. Das Peptid SHA PrP172-194 wurde in nichtglycosylierter und glycosylierter Form dargestellt. An die Aminosäure Asparagin 181 wurde zum einen ein monosaccharidischer, zum anderen ein disaccharidischer Zuckerrest angehängt. Es folgten Strukturuntersuchungen mit CD- und NMR-Spektroskopie.

7.3.1 Synthese des nichtglycosylierten und N-glycosylierten Fragments SHA PrP172-194

Ac-QNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTK-NH₂ (**40**)

Ac-QNNFVHDCVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-NH₂ (**41**)

Ac-QNNFVHDCVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-NH₂ (**42**)

Die Synthese des nichtglycosylierten und N-glycosylierten Fragments SHA PrP-172-194 erfolgte mit dem Peptidsynthesizer 433 A (Applied Biosystems) an einem NovaSyn® TGR-Harz.

Da die Darstellung von N-Glycopeptiden mit der Sequenz SHA PrP172-194 innerhalb der Festphasenpeptidsynthese nicht über die Glycosylierung eines selektiv geschützten Asparaginsäurerests gelang (siehe Kapitel 7.4.1), wurden Fmoc-geschützte glycosylierte Aminosäuren für die Glycopeptidsynthese eingesetzt. Der monosaccharidische Aminosäurebaustein (Fmoc-Asn(1- β -Ac₃GlcNAc)-OH) wird von Novabiochem angeboten, der disaccharidische Aminosäurebaustein (Fmoc-Asn(1- β -Ac₂GlcNAc-1,4- β -Ac₃GlcNAc)-OH) wurde nach der in Kapitel 7.2.1

7 PROJEKTDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

beschriebenen Methode synthetisiert, wobei schon das Fmoc-geschützte Asparaginsäurederivat (**28**) vom Harz abgespalten und HPLC-chromatographisch aufgereinigt wurde. Die Glycopeptide konnte nach der HPLC-chromatographischen Reinigung mit 15 % (**41**) und 13 % (**42**) Ausbeute erhalten werden (Abbildung 58).

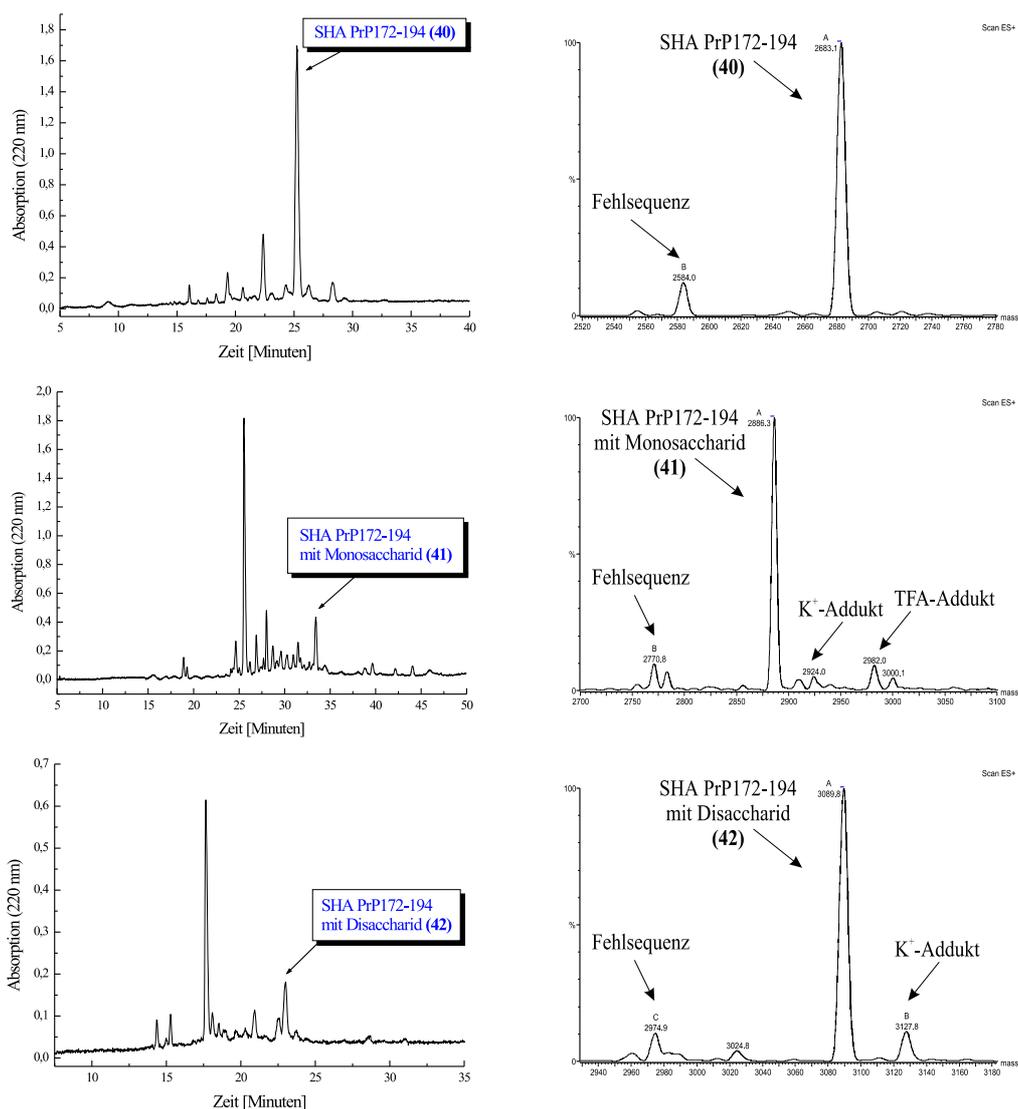


Abbildung 58: HPLC- und ESI-MS-Spektren des Peptids SHA PrP172-194 (**40**) und der Glycopeptide (**41**) und (**42**).

7.3.2 Strukturuntersuchungen des nichtglycosylierten und N-glycosylierten Fragments SHA PrP172-194

CD-Untersuchungen

Die CD-Messungen des Peptids (**40**) und der N-Glycopeptide (**41**) und (**42**) wurden bei pH 5, pH 7.5 und pH 9 in Phosphatpuffer (0.1 mmolar) durchgeführt.

Eine halbquantitative Auswertung der Sekundärstrukturelemente in den CD-Spektren nach einer Methode von Greenfield und Fasman [151, 160] ergab für das nichtglycosylierte Peptid und die Glycopeptide jeweils unterschiedliche Anteile einer α -helikalen, β -Faltblatt- oder random coil-Struktur. Für die Auswertung wurden die Elliptizitäten bei 208 nm und 222 nm, den negativen Extrema einer α -Helix, und die Elliptizität bei 217 nm, dem negativen Extremum für eine β -Faltblatt-Struktur, herangezogen und mit berechneten CD-Kurven von Poly-L-Lysin, die jeweils unterschiedliche α -helikale, β -Faltblatt- und random coil-Anteile aufwiesen, verglichen.

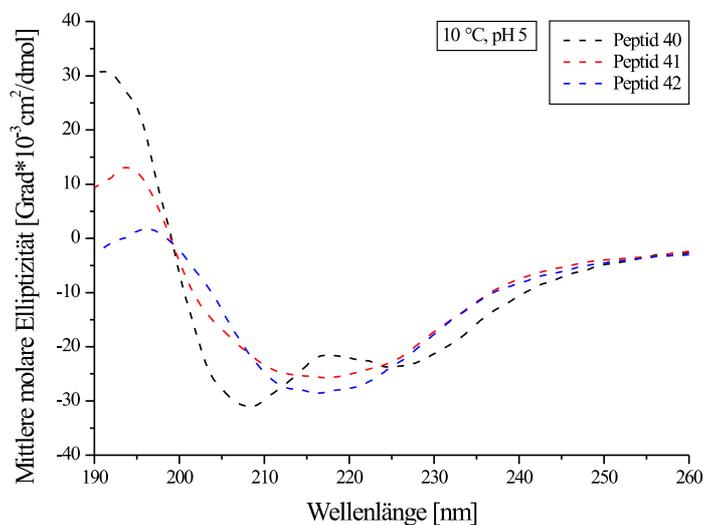


Abbildung 59: CD-Spektren des Peptids (**40**) und der Glycopeptide (**41**) und (**42**), 20 μ molar, pH 5, Phosphatpuffer.

Gemäß dieser halbquantitativen Auswertung wurde bei pH 5 für das Peptid (**40**) neben einem random coil-Anteil ein dominanter α -helikaler Anteil detektiert. Für

die Glycopeptide **(41)** und **(42)** wurden die Sekundärstrukturelemente random coil, α -Helix und β -Faltblatt gefunden. Das disaccharidische Glycopeptid **(42)** hatte bei vergleichbarem random coil-Anteil einen größeren β -Faltblatt-Anteil als das monosaccharidische Glycopeptid **(41)** (Abbildung 59).

Gegenüber den CD-Messungen bei pH 5 erhöhte sich bei pH 7.5 für alle Proben der random coil-Anteil. Für das Peptid **(40)** konnte wiederum ein großer α -helikaler Anteil festgestellt werden. Bei den Glycopeptiden **(41)** und **(42)** erhöhte sich gegenüber den CD-Messungen bei pH 5 der α -helikale Anteil und verminderte sich der β -Faltblatt-Anteil, wobei das disaccharidische Glycopeptid **(42)** nun einen größeren Anteil einer α -helikalen Struktur zeigte als das monosaccharidische Glycopeptid **(41)** (Abbildung 60).

Auffallend bei der CD-Kurve des nichtglycosylierten Peptids (pH 5) ist die ungewöhnlich breite negative Bande im Bereich von 225-245 nm, die auf Lichtstreuung oder Aggregation der Probe zurückgeführt werden könnte. Eine Aggregationsneigung des Peptids **(40)** und, in abgeschwächter Form, des Glycopeptids **(41)** wurde auch bei den späteren NMR-Messungen beobachtet. Aufgrund der hier beobachteten Aggregationseffekte wurde auf eine quantitative, Computer-gestützte Auswertung der diskutierten CD-Spektren verzichtet.

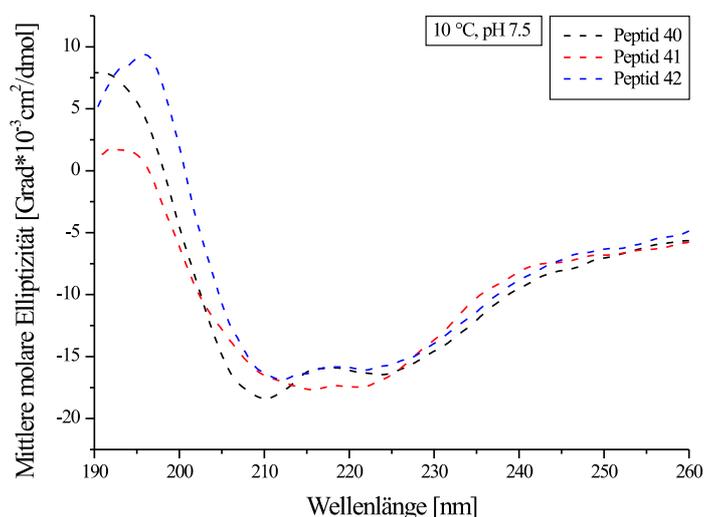


Abbildung 60: CD-Spektren des Peptids **(40)** und der Glycopeptide **(41)** und **(42)**, 20 μ molar, pH 7.5, Phosphatpuffer.

Bei pH 9 wiesen alle Peptide eine dominante β -Faltblatt-Struktur auf (Abbildung 61). Allerdings wird die Disulfidbildung bei hohem pH-Wert begünstigt. Daher kann für pH 9 keine eindeutige Interpretation der Spektren vorgenommen werden, da eventuell auch ein Anteil dimerisierter Peptide detektiert wurde. Darüber hinaus neigt ein solches Prionfragment bei hohem pH-Wert in starkem Ausmaß zur Bildung von Fibrillen, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen des Prionenpeptids PrP175-195 der Maus ergaben [166].

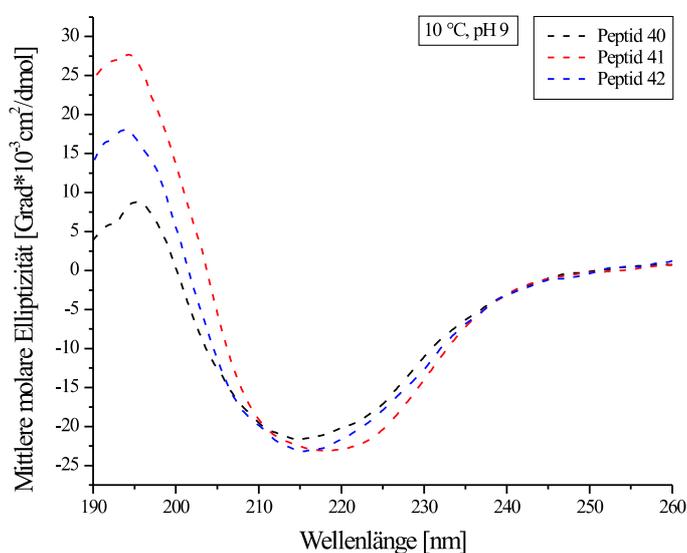


Abbildung 61: CD-Spektren des Peptids (**40**) und der Glycopeptide (**41**) und (**42**), 20 μ molar, pH 9, Phosphatpuffer.

Es sei auch hier angemerkt, daß die Unterschiede in den Kurvenverläufen des nichtglycosylierten Peptids und der Glycopeptide nur in geringem Maße auf die chromophoren Einflüsse der Zuckerreste zurückzuführen sind, da auch bei diesem 23 Aminosäuren langen Glycopeptid die N-Glycanreste anteilmäßig nur zu kleinen Abweichungen in der mittleren molaren Elliptizität führen können.

NMR-Untersuchungen

Von den Verbindungen **(40)**, **(41)** und **(42)** wurden ^1H 1D-NMR-Spektren, ^1H 2D TOCSY- und ^1H 2D NOESY-Spektren aufgenommen. Es wurde eine Peptidkonzentration von 2 mmolar in einem Phosphatpuffer, 0.1 mmolar, pH 5.5, und eine Meßtemperatur von 10 °C gewählt. Den Proben wurde deuteriertes DTT (10 mmolar) zugesetzt, um die Oxidation der Cystein-haltigen Peptide bei längerem Stehen zu verhindern.

Die ^1H 1D NMR-Spektren ergaben $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten von 6.1-7.7 Hz, entsprechend einer random coil-Struktur [140]. Auch die Bestimmung der chemischen Verschiebungsdifferenzen ergab Werte, die auf große random coil-Anteile hindeuteten [143, 144]. Während in den NOESY-Spektren der Peptide und Glycopeptide $\text{H}_\alpha\text{H}_N(i, i+1)$ NOEs in gleichem Ausmaß auftraten, wurden zahlreiche $\text{H}_N\text{H}_N(i, i+1)$ NOEs nur für das nichtglycosylierte Peptid gefunden.

In den ^1H 1D NMR-Spektren der Glycopeptide wurde eine Zunahme der $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten gegenüber dem nichtglycosylierten Peptid im C-terminalen Bereich detektiert.

Für den NH-NH-Bereich sind in Abbildung 62 die überlagerten Kurven der chemischen Verschiebungsdifferenzen der Verbindungen **(40)**, **(41)** und **(42)** dargestellt. Fehlende Datenpunkte sind auf Schwierigkeiten bei der Signalzuordnung zurückzuführen.

Eine Aggregation des unglycosylierten Peptids **(40)** erschwerte die NMR-Messungen. Die Zuckerreste der N-Glycopeptide wirkten vermutlich Löslichkeits-vermittelnd, so daß das monosaccharidische Glycopeptid **(41)** nur noch geringfügig aggregierte, das disaccharidische Glycopeptid **(42)** dagegen vollständig gelöst blieb.

Um Konzentrationseffekte auf die Peptid- und Glycopeptidkonformationen zu untersuchen, wurden auch ^1H 1D NMR-Spektren von 0.1 mmolaren Proben mit einer entsprechend hohen Scanzahl aufgenommen, um eine Annäherung an die Konzentration der CD-Messungen (20 μmolar) zu erreichen.

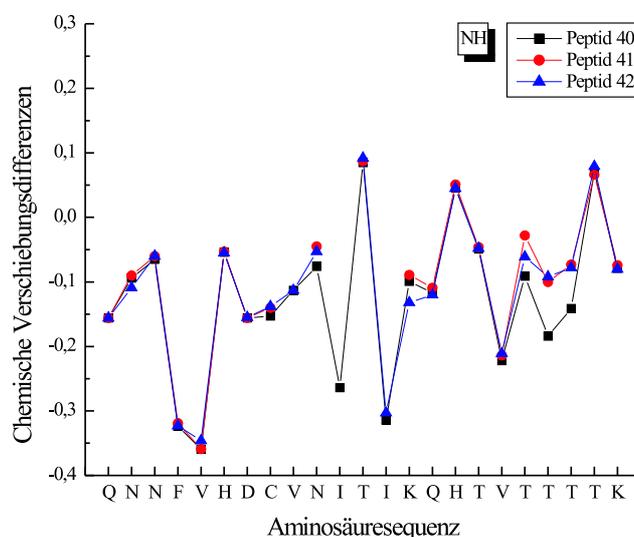


Abbildung 62: NH-chemische Verschiebungsdifferenzen für das Peptid (**40**) und die Glycopeptide (**41**) und (**42**) nach Wishart *et al.* [143] und Merutka *et al.* [144].

Die Überlagerung der Spektren mit einer Probenkonzentration von 2 mmolar und einer Probenkonzentration von 0.1 mmolar ergab hier weder Unterschiede in der chemischen Verschiebung noch in den $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten. Auch bei der 0.1 mmolaren NMR-Probe des unglycosylierten Peptids trat nach längerem Stehen Peptidaggregation auf.

Nach den oben dargestellten Ergebnissen können die in den CD- und NMR-Untersuchungen festgestellten unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Peptid- und Glycopeptidkonformationen nicht auf Konzentrationsunterschiede der Proben zurückgeführt werden.

Wahrscheinlicher erscheint hier, daß sich die gelösten Peptid- und Glycopeptidproben bei längerem Stehen etwa durch Aggregation konformationell verändert haben und daß zudem das unvermeidbar den NMR-Proben zugesetzte DTT mit den Thiolgruppen der Cysteine reagiert hat und die Peptide und Glycopeptide destabilisiert hat.

7.3.3 Resümee

In Kapitel 7.3 wurde die Synthese eines nichtglycosylierten und N-glycosylierten Prionenproteinfragments SHA PrP172-194 mit anschließender Strukturuntersuchung vorgestellt. Als N-Glycanreste wurden ein monosaccharidischer und ein disaccharidischer Zuckerbaustein gewählt.

Die Optimierung der N-Glycopeptidsynthese ergab, daß innerhalb der Festphasenpeptidsynthese der Einbau glycosylierter Aminosäuren in das wachsende Peptid der nachträglichen N-Glycosylierung der Peptidkette vorzuziehen war.

Durch den Vergleich der CD-Spektren des nichtglycosylierten Peptids und der N-Glycopeptide konnte bei pH 5 und pH 7.5 ein Einfluß der N-Glycosylierung auf die α -Helikalität der Ausgangsverbindung festgestellt werden. Während das Peptid (**40**) bei pH 5 und pH 7.5 hauptsächlich random coil- und α -helikale Anteile aufwies, wurden bei den Glycopeptiden (**41**) und (**42**) zusätzlich β -Faltblattstrukturen detektiert. Die Anteile an α -Helix und β -Faltblatt in den CD-Spektren der Glycopeptide variierten dabei mit der Größe des angehängten Zuckerrests und dem gewählten pH Wert.

Die Daten der NMR-spektroskopischen Untersuchungen korrelierten nur bedingt mit den CD-Ergebnissen. Im Vergleich zu dem Peptid (**40**) deuteten fehlende sequentielle NOEs in den NOESY-Spektren der Glycopeptide und größere Werte für die $^3J_{(HN\alpha)}$ -Kopplungskonstanten auf eine Destabilisierung des Ausgangspeptids durch die N-Glycosylierung hin.

Eine starke Aggregationsneigung für das unglycosylierte Peptid (**40**) war sowohl durch das Auftreten einer dafür charakteristischen breiten CD-Bande als auch durch Niederschlagsbildung in den NMR-Proben festzustellen. Das Anhängen der Zuckerreste an das Peptid (**40**) schien die Aggregationsneigung abzuschwächen.

7.4 Darstellung eines Prionen-N-Glycoproteinfragments über chemische Ligation

In diesem Abschnitt der Doktorarbeit wurde eine Strategie zur Synthese des Prionen-N-Glycoproteins SHA PrP121-231 verfolgt, in der ein Expressionsprotein mit Inteinabschnitt mit einem chemisch dargestellten Cystein-N-Glycopeptidfragment *in vitro* ligiert werden sollte. Die entwickelte Methode sollte die Darstellung eines selektiv Isotopen-markierten Prionenproteinabschnitts ermöglichen.

Das Fragment SHA PrP121-231 enthält die beiden N-Glycosylierungsstellen 181 und 197 sowie die Cysteine 179 und 214 des Prionenproteins, die sich als potentielle Ligationsschnittstellen anboten.

Das entwickelte Synthesekonzept bestand darin, das Fragment SHA PrP121-178 als Fusionsprotein mit Intein Isotopen-markiert zu exprimieren und durch induzierte Inteinspaltung daraus ein Thioesterpeptid zu generieren. Daran sollte das unmarkierte 53 Aminosäuren lange N-Glycoproteinfragment SHA PrP179-231, das an Position 181 N-glycosyliert war, angeknüpft werden (Abbildung 63). Die Ligationsschnittstelle Asparaginsäure 178/Cystein 179 befindet sich in einem komplett α -helikalen Bereich des Prionenproteins.

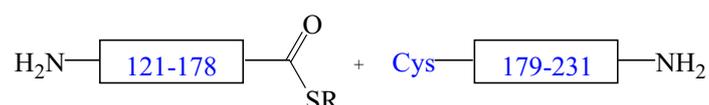


Abbildung 63: Cystein-Schnittstelle 179 für die Peptidligation in einem α -helikalen Bereich des Prionenproteins SHA PrP121-231.

Alternativ zur Synthese eines Thioesterfragments SHA PrP121-178 über die Expression eines Intein-Fusionsproteins sollte die rein chemische Synthese desselben Fragments verfolgt werden, um die Ligation mit dem Peptidfragment SHA PrP179-231 vor den Ligationsversuchen mit dem aufwendiger herzustellenden Expressionsprotein zu optimieren. Zudem sollten Informationen über das Löslichkeitsverhalten und die Neigung zur Sekundärstrukturbildung der zu ligierenden Proteinabschnitte erhalten werden. Informationen über die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Ligationsfragmente sind wichtig, um zu entscheiden, ob ein

denaturierendes Puffersystem für die chemische Ligation und die anschließende Aufreinigung benötigt wird oder ob sogar Ligationen von nichtentfalteten Peptiden möglich sind [23, 24].

Da man mit der oben vorgestellten Peptidligation ein relativ großes selektiv unmarkiertes N-Glycopeptidfragment erhält, wurden Überlegungen angestellt, den selektiv unmarkierten N-Glycopeptidabschnitt zu verkürzen und die Cysteinposition 214 als eine zweite potentielle Ligationsstelle zu nutzen. Dies erforderte die Entwicklung einer Synthesestrategie für einen Peptidthioester SHA PrP179-213, der, selektiv an der Thiolfunktion von Cystein 179 geschützt, an das Cystein-Peptid SHA PrP214-231 geknüpft werden konnte.

Die geplante sequentielle Ligationsmethode zur Darstellung eines im Aminosäurenabschnitt 179-213 selektiv unmarkierten Prionen-N-Glycoproteinfragments ist in Abbildung 64 veranschaulicht.

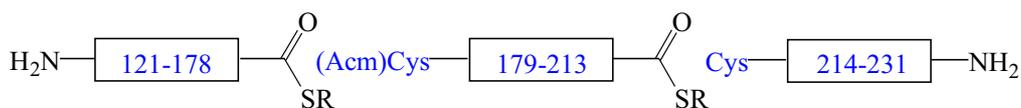


Abbildung 64: Cystein-Schnittstellen 179 und 214 im Prionenprotein SHA PrP121-231 für die sequentielle chemische Peptidligation.

Bewußt wurde die Ligationsstrategie auf die Peptidverknüpfung über Cysteine eingeschränkt, weil man mit natürlichen Peptidsequenzen ligieren mußte und ein natürliches Prionen-N-Glycoprotein ohne Modifikationen hergestellt werden sollte.

7.4.1 Chemische Ligation von kurzen Peptid- und N-Glycopeptidfragmenten

In Vorarbeiten auf die Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231 wurde die Verknüpfung der kurzen Prionenproteinfragmente SHA PrP169-178 und SHA PrP179-194 getestet (Abbildung 65).

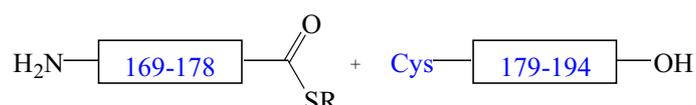


Abbildung 65: Ligationsschnittstelle im Prionenprotein SHA PrP169-194.

Das Peptidfragment SHA PrP179-194 mit einem N-terminalen Cystein wurde in nichtglycosylierter und N-glycosylierter Form mit Fmoc-Chemie dargestellt.

NH₂-CVNITIKQHTVTTTTTK-OH (**43**)

NH₂-CVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-OH (**44**)

NH₂-CVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-OH (**45**)

Zur Darstellung der mono- und disaccharidischen N-Glycopeptide wurde zunächst die in Kapitel 7.1.1 beschriebene Methode der nachträglichen N-Glycosylierung des Peptids an fester Phase gewählt. Die Glycosylierungsreaktion lieferte neben der Aspartimidbildung eine Fülle nicht weiter untersuchter Nebenprodukte. Die Einführung der die Aspartimidbildung verhindernden Hmb-Schutzgruppe war an dem C-terminal benachbarten Isoleucin nicht angebracht, da die Glycosylierungsreaktion wegen des zu großen sterischen Anspruchs des Hmb-geschützten Isoleucins stark gehindert worden wäre.

Schließlich konnten die Zuckerreste über die glycosylierten Aminosäuren (Fmoc-Asn(1-β-Ac₃GlcNAc)-OH) und (Fmoc-Asn(1-β-Ac₂GlcNAc-1,4-β-Ac₃GlcNAc)-OH) mit Glycopeptidausbeuten von 52-55 % inkorporiert werden. Da die Peptidligationen mit ungeschützten Zuckerresten durchgeführt werden sollten, wurden die Acetyl-Schutzgruppen vor der Harzabspaltung der N-Glycopeptide mit Hydrazin-Monohydrat in DMF entfernt.

Die Synthese des Thioesterfragments SHA PrP169-178 (**47**) erfolgte nach der Boc-Chemie an einem MBHA-Harz. Als Thiollinker diente hierbei 3-Mercaptopropionsäure.

NH₂-YNNQNNFVHD-S((CH)₂)₂CONH₂ (**47**)

Im folgenden werden die Ligationsversuche mit dem Thioesterpeptid (**47**) und dem nichtglycosylierten Cysteinpeptid (**43**) beschrieben. Die Ligation der beiden Peptidfragmente wurde mit dem in der Literatur am häufigsten verwendeten Puffersystem, 6 M GnHCl, 0.1 M Na₃PO₄, pH 7.5, unter Zusatz verschiedener Thiolreagenzien getestet. Ziel der Variation der zugesetzten Thiole war es, das geruchsbelästigende Thiophenol durch andere aromatische Thiolverbindungen, mit denen erfolgreich Peptidligationen durchgeführt werden konnten [123], zu ersetzen.

Für die Testligationen wurde eine Reaktionszeit von 24 h gewählt. Die Peptide wurden im Äquivalentverhältnis 1:1 mit Peptidkonzentrationen von 1 µmol/ml, die Thiolreagenzien in Konzentrationen von 3-5 % (v/v) eingesetzt. Alle Testreaktionen fanden unter Schutzgas statt.

Die eingesetzten Thiole p-Methoxybenzylthiol und p-Methoxythiophenol führten nicht zu einer vollständigen Umesterung zum Aktivthioester (nur 30 % Aktivester); auch der Zusatz von nur 3 % Thiophenol reichte für eine vollständige Umesterung nicht aus. Schließlich gelang die Ligation der Testpeptide (**43**) und (**47**) zu dem 26 Aminosäuren umfassenden Peptidfragment SHA PrP179-194 (**48**) unter Zusatz von 5 % Thiophenol mit einer Ausbeute von 40 %, wobei das trotz der reduzierenden Reaktionsbedingungen entstandene Disulfid von (**48**) bei der Ausbeutebestimmung mit einberechnet wurde. Die HPLC-Chromatogramme und ESI-Massenspektren der Ausgangsverbindungen und des Ligationsprodukts (**48**) sind in Abbildung 66 gezeigt.

NH₂-YNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTK-OH (**48**)

NH₂-YNNQNNFVHDCVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-OH (**49**)

NH₂-YNNQNNFVHDCVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-OH (**50**)

7 PROJEKTDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

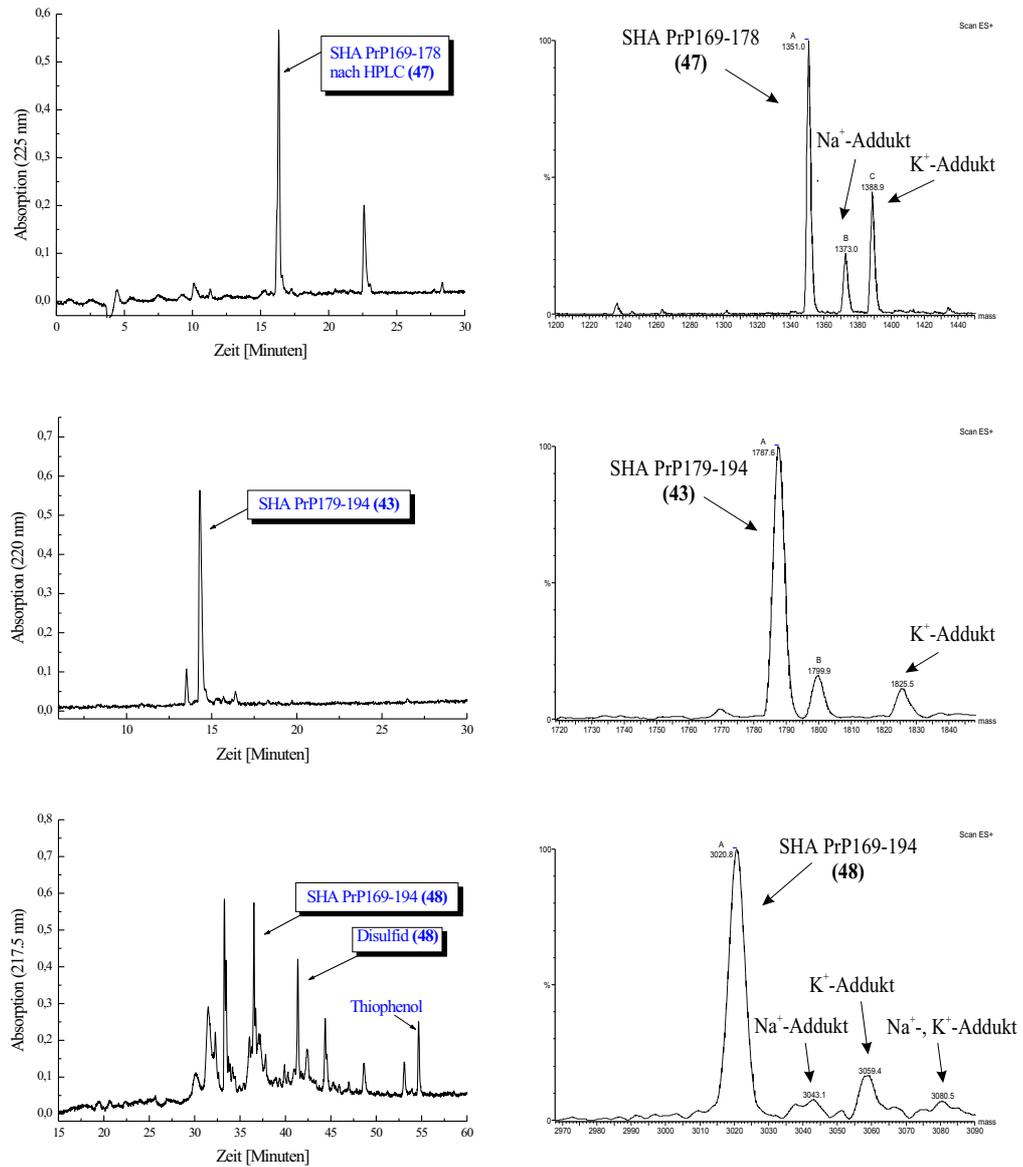


Abbildung 66: HPLC- und ESI-Massenspektren der Ligation von (43) und (47) zu (48).

Anschließend wurden auch Ligationen des Peptids (**47**) mit den N-Glycopeptiden (**44**) und (**45**) durchgeführt. Die N-Glycosylierung an Position 181 erniedrigte die Ligationsausbeuten um etwa 10 %. So gelang die Synthese des monosaccharidischen Glycopeptids (**49**) mit 33 % (reduzierte + oxidierte Form). Das disaccharidische N-Glycopeptid (**50**) wurde mit einer Ausbeute von 29 % (reduzierte + oxidierte Form) erhalten (Abbildung 67).

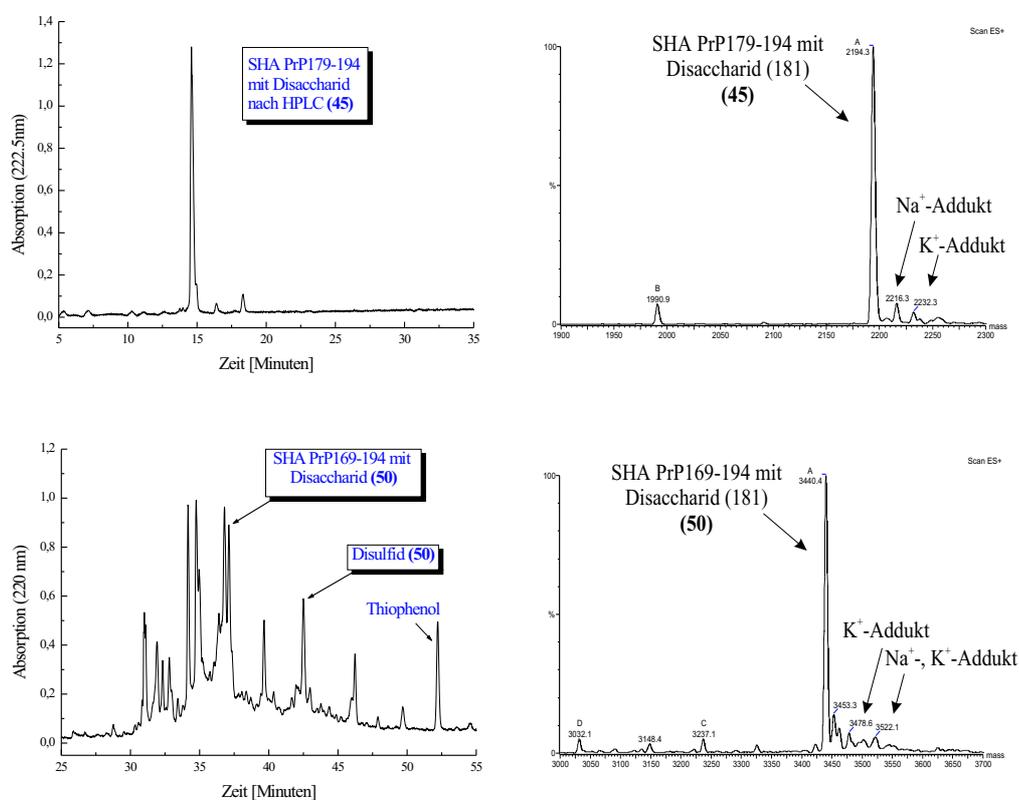


Abbildung 67: HPLC- und ESI-Massenspektren der Ligation von (**45**) und (**46**) zu (**50**).

7.4.2 Synthese und chemische Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231

Synthese von SHA PrP121-178

NH_2 -VVGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRPNQVYY-
RPVDQYNNQNNFVHD-OS(CH₂)₂COOCH₂CH₃ (**51**)

Das Thioesterfragment SHA PrP121-178 (**51**) wurde an einem mit Asparaginsäure belegten Sulfamylbutyryl AM-Harz (Novabiochem) nach der Fmoc-Chemie mit dem Peptidsynthesizer 433 A (Applied Biosystems) dargestellt. Dabei wurde die Harzbelegung mit 0.25 mmol/g bewußt niedrig gewählt. Das 58 Aminosäuren lange Peptid konnte mit der Standardaktivierungsmethode durch HBTU und DIEA und einer Doppelkupplungsstrategie ab Aminosäure Tryptophan 145 mit einer HPLC-Ausbeute von 23 % synthetisiert werden (Abbildung 68).

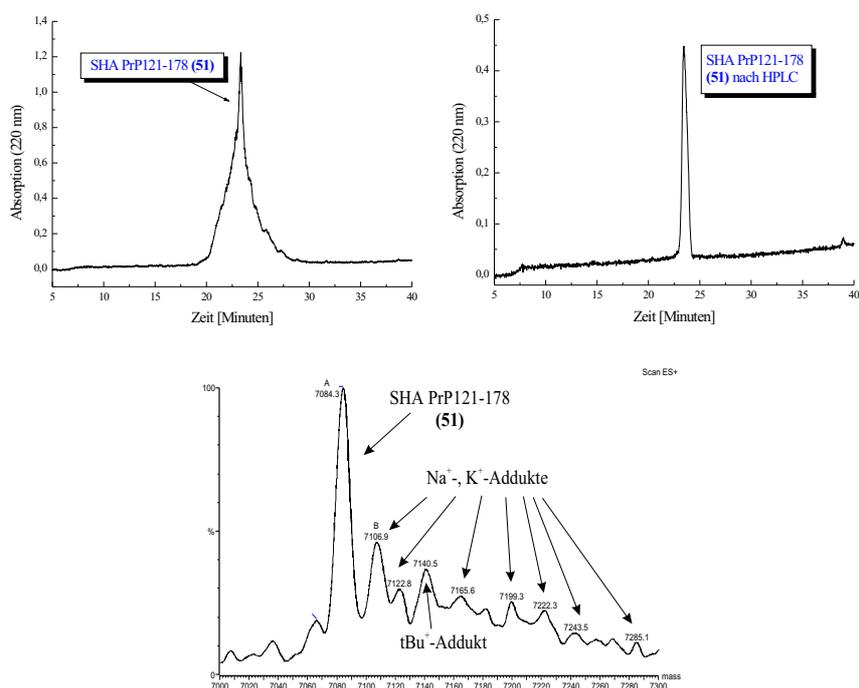


Abbildung 68: HPLC- und ESI-Massenspektren von SHA PrP121-178 (**51**).

Die letzte Aminosäure, Valin 121, wurde mit einer Boc-Schutzgruppe eingeführt. Eine Schützung des N-Terminus vor der Harzabspaltung (siehe Kapitel 5.1.6) ist notwendig, da eine freie Aminogruppe des Peptids die Aktivierung des Sulfonamids bei der Harzabspaltung stört und eine am N-Terminus des Peptids beibehaltene Fmoc-Schutzgruppe nach der Harzabspaltung mit basischen, den gebildeten Thioester zerstörenden Reagenzien entfernt werden müßte.

Synthese von SHA PrP179-231

NH₂-CVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQA-YYDGRRS-CONH₂ (**52**)

Das 53 Aminosäuren lange Peptid SHA PrP179-231 (**52**) konnte mit der Standardaktivierungsmethode durch HBTU und DIEA an einem NovaSyn® TGR-Harz (Novabiochem) mit einer HPLC-Ausbeute von 26 % erhalten werden (Abbildung 69).

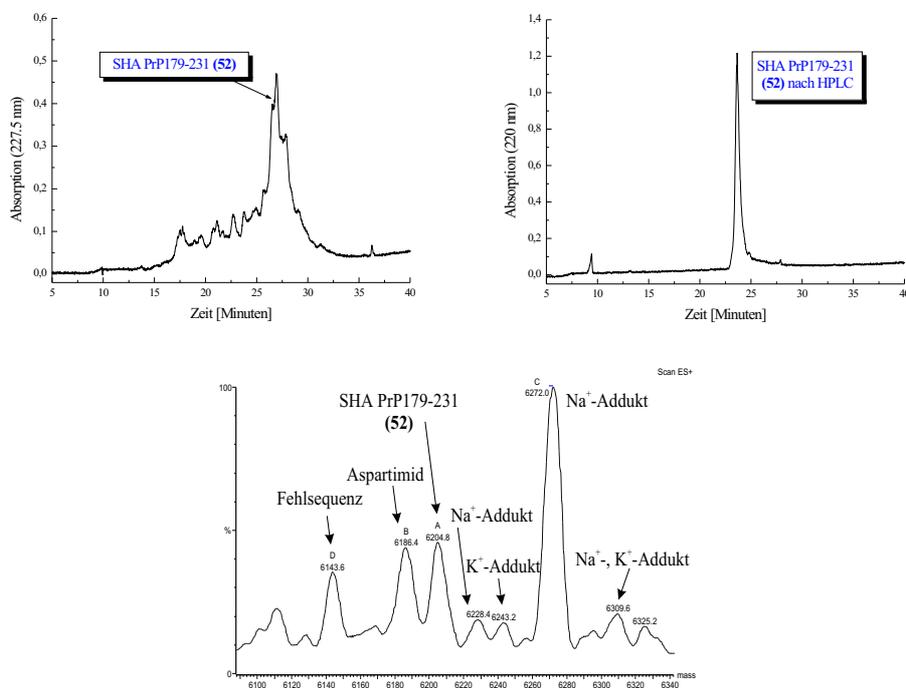


Abbildung 69: HPLC- und ESI-Massenspektren von SHA PrP179-231 (**52**).

Das 18 Aminosäuren lange Peptid SHA PrP214-231 wurde mit Einfachkupplung und einer verlängerten Kupplungszeit (135 min) synthetisiert; ab Aminosäure Methionin 213 wurde eine Doppelkupplungsstrategie (Kupplungszeit 2 x 50 min) angewandt.

Das interne Cystein 214 wurde nicht selektiv geschützt, weil davon ausgegangen wurde, daß Cystein 214 nur geringfügig mit dem N-terminalen Cystein 179 um die Reaktion mit einem Thioester konkurriert und man die Nebenreaktion der Bisacylierung unterdrücken kann (siehe Kapitel 5.5.1).

Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 (**51**) und SHA PrP179-231 (**52**)

Für die Ligrationsreaktion der wasserlöslichen Fragmente (**51**) und (**52**) wurden folgende variierende Reaktionsbedingungen gewählt:

- Probenkonzentration: 0.5 mg Peptid/100 μ l;
- 5facher Überschuß von C-terminalem Peptid;
- 5 % Thiophenol (v/v) oder 5 % MESNA (w/v);
- Temperatur: 37 °C;
- Reaktionszeit: 2 Tage;
- Zusatz von 20 eq. TCEP (2 eq. pro Cystein);
- Puffer A: 6 M GnHCl-Puffer, 0.1 M Na₃PO₄, pH 7.5;
- Puffer B: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 7.5.

Puffersystem A ist mit dem in Kapitel 7.4.1 vorgestellten Puffersystem identisch; Puffersystem B und das Thioladditiv Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) wurden von Dr. S. Becker in der weiter unten beschriebenen Proteinligation mit einem Intein-Fusionprotein verwendet. MESNA hat gegenüber Thiophenol den Vorteil, daß es vollständig wasserlöslich und geruchsneutral ist.

Da bei den Testligationen in 7.4.1 Disulfidbildung der Edukte und Produkte aufgetreten war, wurde bei den Ligationen der Fragmente SHA PrP121-178 (**51**) und SHA PrP179-231 (**52**) das Reduktionsmittel TCEP hinzugesetzt.

Die Ligrationsreaktionen wurden angesichts der Größe der nun ligierten Peptidfragmente über SDS-PAGE analysiert. Es wurden Ligrationsreaktionen mit vier verschiedenen Puffer-/Thiolsystemen durchgeführt; die entsalzten Produktgemische wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen (Abbildung 70). Als Referenzproben wurden auch die Edukte SHA PrP179-231 (**52**) (ca. 6 kD) und SHA PrP121-178 (**51**) (ca. 7 kD) aufgetragen.

Auf dem unten dargestellten Gel erkennt man bei jeder durchgeführten Ligationsreaktion (Linien 1, 2, 4, 5) bei ungefähr 15 kD eine Produktbande, die je nach gewähltem Puffersystem unterschiedlich stark ist. Die stärkste Bande wurde bei der Wahl des Puffers A unter Zusatz von Thiophenol (Linie 2) erhalten. Auch eine zweite Produktbande bei 21 kD ist für jede durchgeführte Ligationsreaktion zu erkennen, die vermutlich das Bisacylierungsprodukt der Reaktion des Thioesters mit der internen Cysteinfunktion ist. Obwohl der Reaktionsmischung 20 eq. TCEP (2 eq. pro Cystein) zugesetzt wurden, konnte hiernach die Bisacylierungsreaktion durch TCEP nicht vollständig unterdrückt werden.

Eine Detektion von durch Cysteinoxidation entstandenen Dimeren (12 kD) und Trimeren (18 kD) des Edukts (**52**) ist nahezu auszuschließen, da unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde und die Proben vor der gelelektrophoretischen Trennung in einem SDS-Puffer mit 5 % frisch zum Probenpuffer zugesetztes β -Mercaptoethanol bei 90 °C denaturiert wurden. Weiterhin sind auch über der Referenzbande des Edukts (**52**) (Linie 6) keine Banden größerer Molekülmasse zu detektieren.

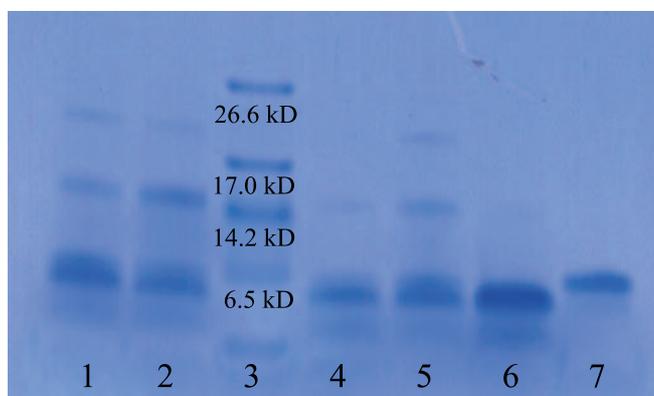


Abbildung 70: SDS-PAGE der chemischen Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 (**51**) und SHA PrP179-231 (**52**); Linie 1: Puffer B, Thiophenol; Linie 2: Puffer A, Thiophenol; Linie 3: Molekulargewichtsmarker Ultra Low-Range; Linie 4: Puffer A, MESNA; Linie 5: Puffer B, MESNA; Linie 6: Fragment 179-231; Linie 7: Fragment 121-178.

7.4.3 Ligation eines Intein-Fusionsproteins mit SHA PrP179-231

In diesem Projektteil sollte eine Prionenproteinsynthese durchgeführt werden, in der das Fragment SHA PrP121-178 des Prionenproteins als Intein-Fusionsprotein mit C-terminalem Inteinabschnitt mit dem chemisch dargestellten Peptidfragment SHA PrP179-231 (**52**) *in vitro* ligiert werden sollte. Das C-terminale Prionenproteinfragment sollte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen IMPACT-CN-Expressionssystems (New England Biolabs) hergestellt werden [161]. Für das Einklonieren des Fragments SHA PrP121-178 sollte der Expressionsvektor TXB1 (New England Biolabs) verwendet werden, der geeignet war, ein N-terminales Fusionsprotein mit dem Mini-Intein GyrA herzustellen. Damit sollte bei Einklonierung in die Restriktionsschnittstelle SapI eine direkte Fusion des Fragments mit dem Intein ohne Einführung weiterer Aminosäuren erreicht werden. Das gewählte Expressionssystem enthält den starken T7-Promotor und versprach die Expression großer Proteinmengen.

Angesichts der schon aufwendigen Durchführung der chemischen Peptid- und N-Glycopeptidsynthesen wurde dieser Projektteil von Dr. S. Becker am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen geplant und durchgeführt. Für die Projektplanung [162] waren folgende Literaturinformationen vorhanden:

Das Fragment SHA PrP121-231 wurde bereits erfolgreich von Glockshuber *et al.* in *E. coli* exprimiert [163, 164]. Völkel *et al.* [165] ist es weiterhin gelungen, große Mengen eines Glutathion-S-Transferase (GST)-SHA-Prionenprotein-Fusionsproteins in *E. coli* in unlöslicher Form zu exprimieren. Daraus konnten nach Rückfaltung und Abspaltung des GST-Proteins große Mengen von gefaltetem Prionenprotein gewonnen werden. Die Fusion mit GST war hierbei essentiell, um große Proteinmengen zu erhalten.

In Anlehnung an diese Arbeit war beabsichtigt, ein C-terminales Intein-Fusionsprotein des Hamster-Prionenproteinfragments SHA PrP121-178 herzustellen, an dessen N-Terminus ebenfalls GST fusioniert war. Da nach Völkel *et al.* [165] in einem ersten Schritt denaturierend aufgereinigt werden sollte, sollte das Ex-

pressionskonstrukt zwischen der GST-Sequenz und der Sequenz SHA PrP121-178 zusätzlich ein Histidin₆-Tag enthalten. Das Konstrukt für die Expression des Intein-Fusionsproteins ist in Abbildung 71 schematisch dargestellt.

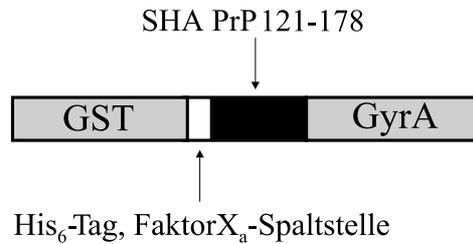


Abbildung 71: Expressionskonstrukt mit dem Mini-Intein GyrA.

Chemische Ligation des rekombinanten Fragments SHA PrP121-178 mit dem synthetischen Proteinabschnitt SHA PrP179-231

Abspaltung des Inteins

Das aufgereinigte Intein-Fusionsprotein wurde in 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 7.5, 50 mM Dithiothreitol (oder 50 mM MESNA) überführt und 24 h bei Raumtemperatur unter langsamem Rühren inkubiert. Mittels SDS-PAGE konnte der Fortgang der Spaltungsreaktion überprüft werden. Da das Intein im pTXB1-Vektor als Fusion mit einer Chitin-bindenden Domäne kodiert war, konnte restliches Intein-Fusionsprotein mittels einer Chitin-Säule abgetrennt werden [161].

Ligation mit dem C-terminalen Peptid SHA PrP179-231

Die Ligation fand mit Konzentrationen von 4-8 mg Peptid/ml in 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 7.5, unter Zusatz von 4 % (w/v) MESNA statt. Die Ausbeute an Ligationsprodukt wurde mittels SDS-PAGE ermittelt. Die Aufreinigung des Ligationsprodukts erfolgte nach Abtrennung der Thiole mittels Entsalzungssäule über eine Nickel-Agarosesäule unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff).

Folgendes Ergebnis wurde für die Expression des Intein-Fusionsproteins und für die Ligation desselben mit dem C-terminalen Fragment SHA PrP179-231 erzielt (Abbildung 72):

Das GST-SHA PrP121-178-GyrA-Protein konnte in löslicher Form exprimiert werden (60 kD-Bande). Als Nebenreaktion trat zu 50 % die Selbstspaltung des zu Asparaginsäure 178 benachbarten Inteins auf (35 kD-Bande). Die Inteinspaltung ist nach Informationen von New England Biolabs [161] bei C-terminaler Asparaginsäure begünstigt und läuft beim Maltose-Binding-Protein sogar zu 100 % ab.

Die Ligation zu dem Vollängenprotein SHA PrP121-231 fand gemäß SDS-PAGE zu 50 % statt (40 kD-Bande). Für eine erfolgreiche Ligation wurden allerdings große Überschüsse des C-terminalen Fragments (10-100 eq.) benötigt.

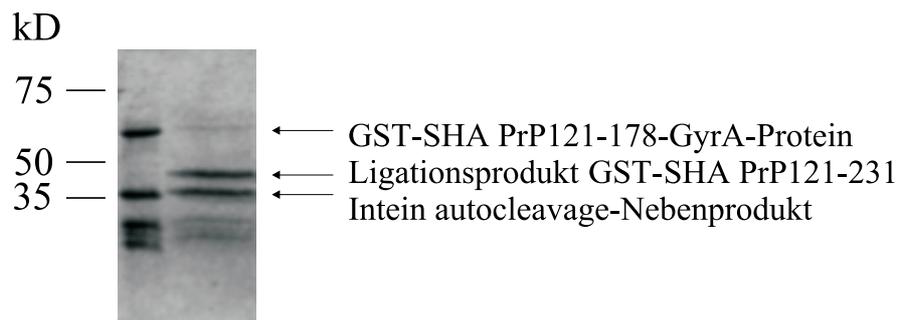


Abbildung 72: SDS-PAGE der Ligation von GST-SHA PrP121-178 mit SHA PrP179-231, mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Becker, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen.

7.4.4 Synthese des N-glycosylierten Fragments SHA PrP179-231

NH₂-CVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQY-
QKESQAYYDGRRS-CONH₂ (**53**)

Die Synthese des N-glycosylierten Thioesterfragments SHA PrP179-231 (**53**) entsprach im wesentlichen der des Peptids SHA PrP179-231 (**52**). Allerdings wurde hier die Kupplungsreaktion unter Aktivierung durch HBTU nur bis zur Aminosäureposition Phenylalanin 198 durchgeführt. Ab der Aminosäure Asparagin 197 wurde das effektivere, aber wesentlich teurere Aktivierungsreagenz HATU eingesetzt.

Zunächst wurde eine Testsynthese des Glycopeptids (**53**) im 20 μ mol-Maßstab durchgeführt. Die glycosylierte Aminosäure wurde als (Fmoc-Asn(1- β -Ac₃GlcNAc)-OH) (Novabiochem) über eine Einfachkupplung mit verlängerter Kupplungszeit ebenfalls unter Aktivierung durch HATU angeknüpft. Während das an den Zucker-Hydroxylgruppen acetylierte Glycopeptid (**53**) mit guter Ausbeute (45 %) erhalten werden konnte, ließ sich das durch Reaktion mit Hydrazin-Monohydrat desacetylierte Produkt nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung nur mit 5 % Ausbeute (0.1 mmol-Maßstab) isolieren (Abbildung 73).

Die Acetylgruppenabspaltung mit Hydrazin-Monohydrat in DMF mußte am Harz erfolgen, da die Abspaltung in Lösung unter stark basischen Bedingungen zwangsläufig zu einer Oxidation der Cysteine geführt hätte. Die Verwendung von Natriummethanolat in Methanol war dagegen für die Acetylgruppenabspaltung am Peptidharz nicht geeignet, da Peptidharze in Methanol schlechte Quelleigenschaften besitzen.

Im Hinblick auf eine bessere Entschützung der Zucker-OH-Funktionen könnte die *tert*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Gruppe als alternative Zuckerschutzgruppe eingesetzt werden, da sie mit TFA während der Harzabspaltung entfernt werden kann [166] und auch die Kupplung der glycosylierten Aminosäure an das Peptid erleichtern soll.

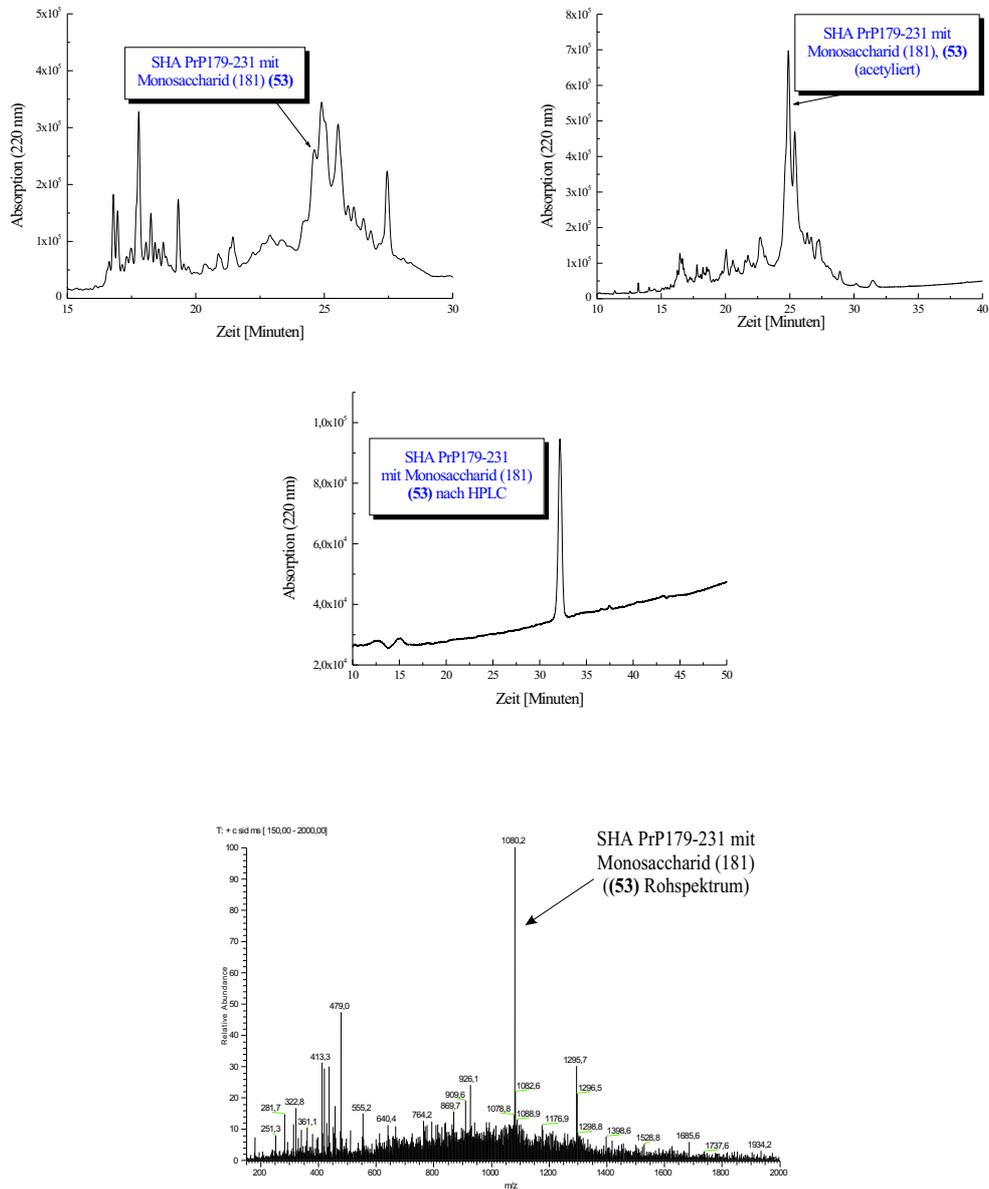


Abbildung 73: HPLC-Spektren und ESI-Massenspektrum (Rohspektrum) von glycosyliertem SHA PrP179-231 (53).

7.4.5 Synthese der Fragmente SHA PrP179-213 und SHA PrP214-231

Der Einbau eines N-glycosylierten Prionenproteinfragments in die zwei potentiell markierten Prionenfragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP214-231 erforderte die Synthese eines N-glycosylierten Thioesterpeptids SHA PrP179-213, das an der Thiolfunktion von Cystein geschützt war, und die Darstellung des Cystein-peptids SHA PrP214-231.

Synthese des Fragments SHA PrP214-231

$\text{NH}_2\text{-CTTQYQKESQAYYDGRRS-CONH}_2$ (**54**)

Das Fragment SHA PrP214-231 besteht aus den ersten 18 Aminosäuren des Peptids SHA PrP179-231 (**52**). Die Synthese dieses Fragments wurde an dem Peptidsynthesizer 9050 von Perkin Elmer mit den Kupplungsreagenzien HOBt und DIC durchgeführt und lieferte ein Produkt, das ohne HPLC-chromatographische Aufreinigung direkt in einer Ligationsreaktion eingesetzt werden kann (Abbildung 74).

Synthese des Fragments SHA PrP179-213

$\text{NH}_2\text{-C(Acm)VNITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQM-OS((CH}_2)_2\text{CONH}_2$ (**55**)

Das Fragment SHA PrP179-213 mußte eine Thioesterfunktion am C-Terminus als auch ein selektiv Thiol-geschütztes Cystein am N-Terminus aufweisen. Als Cystein-Schutzgruppe wurde die mit Ag- und Hg-Salzen abspaltbare Acetamidomethyl(Acm)-Schutzgruppe gewählt. Es wird im folgenden die Syntheseoptimierung des nichtglycosylierten Fragments SHA PrP179-213 beschrieben.

Das Fragment SHA PrP179-213 wurde vorerst mit Fmoc-Chemie an einem Sulfonylbutyryl AM-Harz synthetisiert. Hierbei zeigte sich, daß die C-terminale Aminosäure Methionin die Aktivierung des Sulfonamids durch Iodacetonitril bei der Harzabspaltungsreaktion störte. Der Einbau von Methioninsulfoxid hätte die

nachträgliche Reduktion von Met(O) durch Thiolreagenzien erfordert, was den gebildeten Thioester zerstört hätte. Somit war eine Synthese des Fragments SHA PrP179-213 mit der Fmoc-Strategie nicht möglich.

Es wurde darauf eine Peptidsynthese an einem MBHA-Harz mit Boc-Chemie entwickelt, die auch zum gewünschten Produkt führte. Dazu wurde für den Peptidsynthesizer 433 A ein Syntheseprogramm für die Boc-Chemie geschrieben, das sich unter anderem durch die Möglichkeit zur Doppelkupplung und eine milde Methode der TFA-Neutralisation nach der Boc-Abspaltung auszeichnete. Im Verlauf der Peptidsynthese wurde festgestellt, daß kürzere Peptidfragmente, die zur Synthesekontrolle analysiert wurden, extrem hydrophob waren und sich nur in Acetonitril bzw. Dioxan/Methanol-Gemischen lösten. Das Vollängenpeptid konnte jedoch in H₂O/Acetonitril 1:1 gelöst werden. Innerhalb der Syntheseoptimierung konnte eine signifikante Erhöhung der Produktausbeute durch eine Verringerung der Harzbelegung von 0.6 mmol/g bis 0.13 mmol/g Harz erzielt werden.

Während der Peptidsynthese oder der Harzabspaltung trat, angesichts der teilweise extrem sauren Synthesebedingungen, Aspartimidbildung in hohem Maße auf. Dennoch konnte das unglycosylierte Peptid SHA PrP179-213 gemäß der Integration des HPLC-Chromatogramms mit 17 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 74).

Sollte man die Synthese eines entsprechenden N-Glycopeptidfragments mit der Boc-Chemie weiter verfolgen, so ist für den Einbau des Zuckers die in Kapitel 5.5.1 von Aimoto *et al.* vorgestellte Mpt-Methode, mit der die Zuckerreste ungeschützt eingesetzt werden können und die wenigen folgenden Aminosäuren auch als Mpt-Derivate angekuppelt werden können, vielversprechend [27].

Möchte man sich nicht nur auf die Peptidligation über Cystein beschränken, bietet sich die Peptidligation über die in Kapitel 5.5.1 vorgestellte Methode mit Hilfe von Ag-Katalysatoren an. Das Prionenprotein SHA PrP121-231 könnte dann nahe der Glycosylierungsstelle an einer beliebigen Position geschnitten werden.

Die Methode ist auch erweiterbar auf die Ligation mit exprimierten C-terminalen Fragmenten, die mit Boc selektiv an den Seitenketten-NH₂-Funktionen geschützt sind, dagegen aber eine freie N-terminale NH₂-Funktion tragen [167]. Nachteil

7 PROJEKTDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

dieser Ligationsmethode ist natürlich, daß durch notwendige Schutzungs- und Entschützungschritte der NH_2 -Funktionen Ausbeuteverluste auftreten können.

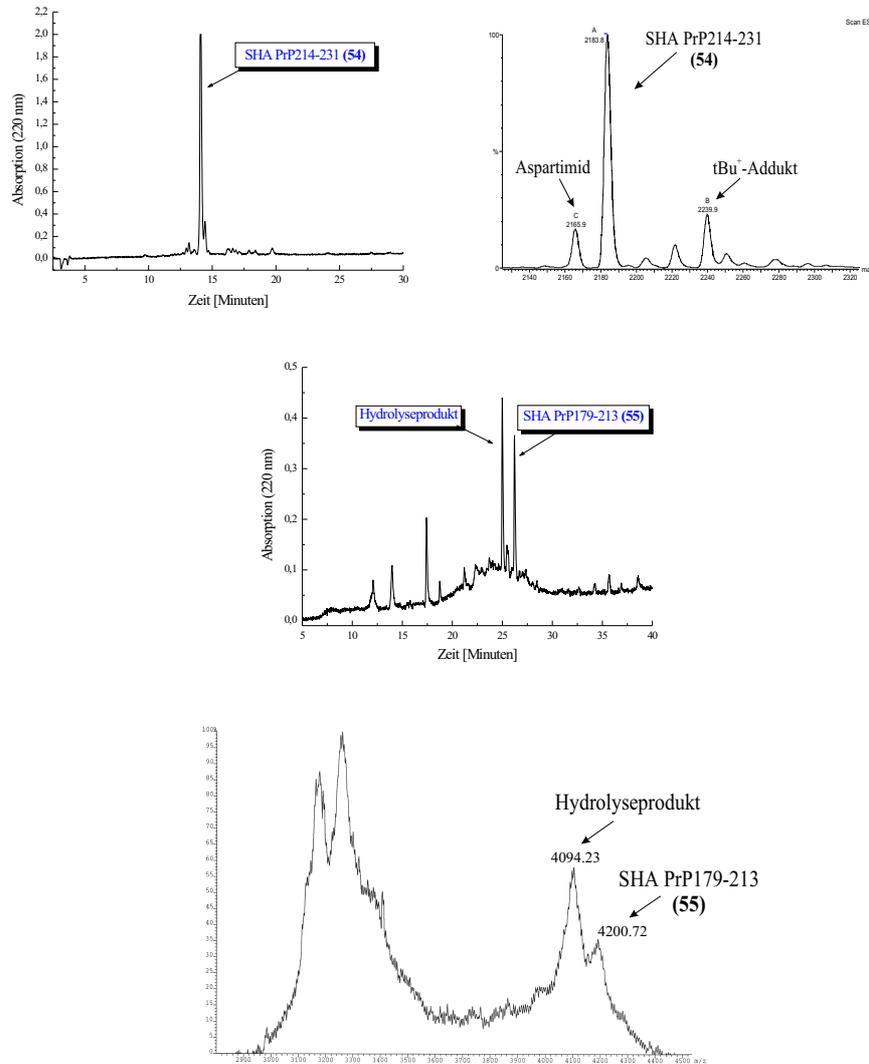


Abbildung 74: HPLC-Spektren der Peptide (54) und (55); ESI-Massenspektrum des Peptids (54) und MALDI-Spektrum des Rohprodukts (55).

7.4.6 Resümee

Im Hinblick auf die Ligation von Proteinfragmenten zur Darstellung eines Blockmarkierten Prionen-N-Glycoproteins SHA PrP121-231 wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Es wurden erfolgreich Testligationen von kurzen Prionen-N-Glycoproteinfragmenten SHA PrP169-178 und SHA PrP179-194 durchgeführt, wobei eine N-Glycosylierung nahe der Ligationsstelle die Ligationsausbeuten leicht erniedrigte.

Die Synthese des Prionenproteins SHA PrP121-231 gelang über die chemische Ligation des Thioesterfragments SHA PrP121-178 und des Fragments SHA PrP179-231, das N-terminal ein Cystein trägt. Dabei wurde das Fragment SHA PrP121-178 zu einem chemisch, zum anderen über ein GST-Intein-Fusionsprotein hergestellt. Die chemische Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231 war mit fünffachem Überschuß des C-terminalen Peptids in einem GnHCl-Puffersystem, pH 7.5, möglich. Die biochemische Ligation benötigte für sichtbare Ergebnisse ein anderes Puffersystem und höhere Überschüsse des C-terminalen Fragments.

Es sind weitere Optimierungen der Expression des GST-Intein-Fusionsproteins beziehungsweise der Intein-vermittelten Proteinligation notwendig, um auch Ligationen mit dem in der Doktorarbeit dargestellten monosaccharidischen N-Glycoproteinabschnitt SHA PrP179-231 durchführen zu können.

Erst wenn die biochemischen Ligationsversuche optimiert worden sind, sollen die Ligationen mit einem ^{13}C oder ^{15}N -markierten Peptidfragment SHA PrP121-178 wiederholt werden. Die geplante NMR-spektroskopische Untersuchung ist erfolgversprechend, da die konformationelle Untersuchung kleiner natürlicher Prionen-N-Glycopeptidfragmente (SHA PrP172-194) einen strukturellen Effekt der Glycosylierung auf das Peptidrückgrat zeigte (Kapitel 7.3.2).

8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden drei voneinander unabhängige Teilprojekte vorgestellt, deren Gemeinsamkeit ist, die Möglichkeiten der N-Glycoproteinsynthese zu erweitern. Während synthetische Aspekte meist im Vordergrund standen, waren die Motive von strukturanalytischer, biochemischer oder strukturbioologischer Relevanz.

Im ersten Abschnitt wurden kurze α -helikale Modellpeptide mit Oligosacchariden, die Teile der Core-Region der N-Glycane bilden, N-glycosyliert, um den konformationellen Effekt der N-Glycosylierung auf das Peptidrückgrat zu untersuchen. Die Induzierung eines β -Turns durch eine N-Glycosylierung ist beispielsweise ein solcher bekannter Effekt.

Das Projekt richtete sich zum einen auf die Optimierung der N-Glycopeptidsynthese an fester Phase, womit auch pentasaccharidische N-Glycopeptide mit den für die Strukturuntersuchungen benötigten Mengen hergestellt werden konnten. Zum anderen wurde mit verschiedenen strukturanalytischen Verfahren die globale und lokale Struktur der Modellpeptide und N-Glycopeptide ermittelt. CD- und NMR-Untersuchungen ergaben, daß die Konformation der N-Glycopeptide durch die Größe der angehängten N-Glycanreste und die Wahl der Aminosäurereste nahe der Glycosylierungsstelle beeinflußbar war. Die signifikantesten konformationellen Änderungen ergaben die N-Glycosylierung mit einem Monosaccharid beziehungsweise einem Pentasaccharid. Für ein monosaccharidisches Glycopeptid wurden gemäß NMR Ansätze der Ausbildung einer 3_{10} -Helix oder einer β -Turn-Struktur gefunden. Das pentasaccharidische N-Glycopeptid, das zudem eine natürliche N-Glycosylierungssequenz aufwies, zeigte in den NMR-Untersuchungen zwei gleich stark populierter Konformationen, von denen die eine große α -helikale Anteile, die andere Anteile einer random coil-Struktur aufwies. Im CD-Spektrum zeigte sich dies durch eine für die Überlagerung mehrerer Konformationen charakteristische Kurve. Bemerkenswert war, daß das Vorliegen zweier Konformationen auch mit der Kapillarelektrophorese durch das Auftreten zweier, im Verhältnis Temperatur-abhängiger Peaks im Elektropherogramm bestätigt werden konnte.

Die Kombination von organischer Synthese mit biologischen Methoden ermöglicht es heute, neben den 20 natürlichen Aminosäuren, auch unnatürliche Aminosäuren ortsspezifisch in Proteine einzubauen. Dabei wird das Codon für die jeweilige Aminosäure durch Oligonucleotid-Mutagenese durch das Nonsense-Codon UAG ersetzt. Für dieses spezielle Codon wird eine Suppressor-tRNA hergestellt und *in vitro* chemisch mit der gewünschten unnatürlichen Aminosäure aminoacyliert. Gibt man diese aminoacylierte tRNA in ein *in vitro*-Protein-Synthesesystem, das von der mutagenisierten DNA gesteuert wird, sollte die gewünschte Aminosäure einheitlich an der angestrebten Stelle im Protein eingebaut werden.

Mit dem späteren Ziel einer *in vitro*-N-Glycoproteinsynthese wurde hier die Darstellung von N-glycosylierten Aminosäuren und der Versuch der Anknüpfung an ein Dinukleotid *pdCpA* beschrieben. Die für die Aminoacylierung des Dinukleotids geeigneten Zuckeraminosäuren trugen N-terminal die photochemisch abspaltbare NVOC-Schutzgruppe, Acetylgruppen an den Zucker-OH-Funktionen und eine Cyanomethylaktivesterfunktion am C-Terminus. Für die Zuckeraminosäuren wurde eine effiziente Synthese an fester Phase entwickelt. Die Aminoacylierungsreaktionen führten nicht zu dem gewünschten N-Glycosylaminoacyldinukleotid. Insbesondere durch die Wahl anderer Zuckerschutzgruppen sollte es dennoch gelingen, das Dinukleotid *pdCpA* mit einer N-glycosylierten Aminosäure zu acylieren und anschließend in eine um *pCpA* verkürzte Suppressor-tRNA zu überführen.

Der dritte Teil der Doktorarbeit beinhaltet die Synthese eines Prionen-N-Glycoproteins über chemische Ligation eines Thioesters mit einem Cystein-Peptid. Die chemische Ligation eignet sich zum einen, Proteine mit 100-150 Aminosäuren Länge darzustellen, was mit der klassischen Festphasenpeptidsynthese nur schwer möglich ist. Weiterhin erlaubt die Verknüpfung von Peptidfragmenten die selektive Isotopen-Markierung, was die Strukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie enorm vereinfacht.

Die Funktion der Glycosylierung des Prionenproteins scheint in wenigen Aspekten geklärt zu sein. Unklar ist, ob die N-Glycosylierung auch die Konformation des Prionenproteins verändern kann. Da die *in vitro*-Expression des Prionenproteins in Prokaryonten nur nichtglycosyliertes Prionenprotein, die Expression in Eu-

karyonten hingegen bestenfalls heterogen glycosyliertes Material liefert, ist man auf chemische Methoden der Glycoproteinsynthese angewiesen. Nur so erhält man chemisch eindeutig charakterisierte Glycoformen, die dann bezüglich ihrer Struktur analysiert werden können.

Ein kurzes Prionen-N-Glycopeptidfragment SHA PrP172-194 aus der Helix B des Prionenproteins wurde der Strukturanalyse unterzogen, wobei ein Effekt der N-Glycosylierung auf die Konformation des Peptidrückgrats verzeichnet werden konnte. Die N-Glycosylierung beeinflusste auch das Aggregationsverhalten der Prionenproteinfragmente.

Motiviert durch diese Ergebnisse wurden in der Doktorarbeit das Prionenproteinfragment SHA PrP121-178 als N-terminales Thioesterfragment und das Fragment SHA PrP179-231 als C-terminales Cystein-Peptid mit Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Mit diesen wasserlöslichen Proteinfragmenten wurde erfolgreich eine chemische Ligation unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Da man selektiv Isotopen-markierte Proteine herstellen wollte, war man auf die biochemische Expression des N-terminalen Thioesterfragments SHA PrP121-178 angewiesen. Dr. S. Becker (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) gelang die Expression eines unmarkierten Prionen-Inteinfusionsproteins, aus dem durch Thiol-vermittelte Inteinspaltung ein Thioester generiert werden konnte. Mit großen Überschüssen des Fragments SHA PrP179-231 konnte auch hier ein Ligationsprodukt SHA PrP121-231 erhalten werden. Mit einer Reduzierung der benötigten Äquivalente des C-terminalen Fragments sollte auch eine Ligation mit einem N-glycosylierten Abschnitt SHA PrP179-231 möglich sein.

Ein solches N-glycosyliertes Prionenfragment wurde in der vorliegenden Doktorarbeit in Form eines an Aminosäureposition 181 mit N-Acetylglucosamin glycosylierten Peptids SHA PrP179-231 dargestellt.

In einer weiteren Projektphase müßten das Inteinfusionsprotein Isotopen-markiert exprimiert werden und die Ligationsversuche mit dem N-glycosylierten Fragment wiederholt werden. In 1-2 Jahren könnten dann NMR-spektroskopische Untersuchungen eines selektiv markierten, N-glycosylierten Prionenfragments durchgeführt werden.

9 Experimenteller Teil

9.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Für die Durchführung der Synthesen und die Isolierung sowie Charakterisierung der Produkte wurden folgende Geräte und Chemikalien verwendet:

Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien entsprachen der Qualität "pro analysis" und wurden von den Firmen Acros, Fluka, ICN Biomedicals, Merck, Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich bezogen. Die Aminosäurederivate sowie die Peptid-Harze wurden von den Firmen Calbiochem-Novabiochem und Neosystem geliefert.

Circulardichroismusmessungen (CD)

Die CD-Messungen wurden an einem Gerät der Marke JASCO 710 aufgenommen. Es wurde eine Küvette mit einem Volumen von 313 μl und einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die Messungen wurden mit Konzentrationen von 20 μM durchgeführt. Dazu wurden jeweils Stammlösungen der einzelnen Verbindungen von 1 mg/ 250 μl angesetzt, deren Gehalt durch quantitative Aminosäureanalyse ermittelt worden war. Die CD-Spektren wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: Speed 50nm/min; Response 1 sec; band width 1 nm; step resolution 0.5 nm; accumulation 10; sensitivity 20 mdeg; wavelength 190-260 nm.

Gefriertrocknungsanlage

Das Lyophilisieren der HPLC-gereinigten Verbindungen wurde an einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Firma Christ, welche mit einer RC 4-Pumpe der Firma Vacuumbrand betrieben wurde, durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die analytischen HPLC-Trennungen der Peptidproben erfolgten an einer Merck-Hitachi Pumpe L-6200 mit einem Dioden-Array-Detektor L-3000.

Präparative Trennungen wurden an den Anlagen Bruker 3-Kolbenpumpe mit einem Gynkotek 160/2 UV-Detektor und Bruker HPLC-Pumpe LC 22 mit Gradientenformer LC 22 sowie einem Merck-Hitachi L-4000 UV-Detektor durchgeführt. Folgende Säulen wurden eingesetzt:

a) analytisch:

Säule A: Eurospher RP18 100 Å 4x250 mm 5 µm;

Säule B: Eurospher C-18 100 Å 4x250 mm 5 µm.

Die Flußrate betrug jeweils 1 ml/min.

b) präparativ:

Säule C: Eurospher C-18 100 Å 16x250 mm 7 µm.

Die Flußrate betrug 4-10 ml/min.

Gradient 1: 10-50 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 1 % pro min.

Gradient 2: 0-40 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 1 % pro min.

Gradient 3: 0-100 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 1 % pro min.

Gradient 4: 100 % H₂O 5 min; 0-60 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 1 % pro min.

Gradient 5: 0-20 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 5 % pro min;
20-60 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 1 % pro min; 60-100 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 5 % pro min.

Gradient 6: 0-100 % ACN/H₂O (+ 0,1 % TFA); 2 % pro min.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Messungen wurden an den Geräten AM 250, AMX 600 und DMX 600 der Firma Bruker durchgeführt. Als Lösungsmittel dienten deuteriertes Aceton, Acetonitril, Chloroform, Deuteriumoxid, Dimethylsulfoxid bzw. H₂O/D₂O (9:1).

Die chemischen Verschiebungen für ^1H -Spektren beziehen sich auf Tetramethylsilan (0.00 ppm) und für ^{13}C -Spektren auf Chloroform (77.0 ppm). Die Multiplizität der Signale wird mit s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, m = Multiplett angegeben.

Die TOCSY- und NOESY-Spektren der in Wasser gelösten Peptide und Glycopeptide wurden im phasensensitiven Modus unter Aufnahme von 2048 Datenpunkten in t2 (Detektionszeit) und 1024 Experimenten in t1 (Evolutionszeit) aufgenommen und prozessiert (2048 Datenpunkte in t1-Richtung; 4096 Punkte in t2-Richtung). Die Unterscheidung positiver und negativer Frequenzen in der F1-Dimension erfolgte durch die States-TPPI-Methode [169]. Die Wasserunterdrückung wurde durch die WATERGATE-Methode erreicht [141].

Die Kalibrierung der in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) aufgenommenen Spektren erfolgte durch folgende Eichgerade [108]:

$$d(\text{H}_2\text{O}[\text{ppm}]) = -0.01102 \cdot \text{Temperatur}[\text{K}] + 8.0982$$

Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert bzw. nach gängigen Verfahren getrocknet. Dichlormethan wurde durch Destillation über CaH_2 von Wasser befreit. Diethylether wurde durch Destillation über Natrium getrocknet. Methanol wurde von Magnesium, Ethanol und Isopropanol wurden von Calciumoxid abdestilliert. DMF wurde durch Destillation über eine 1-m-Füllkörperkolonne gereinigt und anschließend über eine mit Silicagel und ICN Alumina N-Super I gefüllte Säule absolutiert. Alle Lösungsmittel wurden über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

Massenspektroskopie (MS)

Die Massenspektren wurden mit Geräten der Firma Fisons aufgenommen. ESI: VG Plattform II, MALDI: VG ToFSpee, Matrix: Sinapinsäure.

Quantitative Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse erfolgte nach der OPA-Methode auf einer Anlage der Firma Eppendorf Biotronic 9200 mit Autosampler BT 9100E und Fluoreszenzdetektor BT 9600 und Grom OPA-Säule.

Reinst-Wasser

Zur Herstellung von HPLC-reinem, bidestilliertem Wasser wurde eine Seralpur PRO 90 CN-Anlage der Firma Seral verwendet.

Rotationsverdampfer

Zum Einengen von Flüssigkeiten wurde ein Rotationsverdampfer der Marke CVC 24 der Firma Vacuumbrand benutzt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur der Firma Gallenkamp nach Dr. Tottoli bestimmt.

UV/VIS-Spektrometer

Die Bestimmung der Harzbelegung und die Kontrolle der Fmoc-Abspaltung erfolgten an einem UV/VIS-Spektrometer Lambda 16 der Firma Perkin Elmer.

Waagen

Es wurde eine Analysenwaage der Firma Mettler H20T verwendet.

Zentrifugation

Für analytische Maßstäbe wurde eine Heraeus Sepatech Biofuge 13, für präparative Trennungen eine Hettich Universalzentrifuge benutzt.

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptid- und Glycopeptidchemie

Als Reaktionsgefäße dienen Einmalspritzen aus PE, die mit einer Membran aus PE verschlossen werden. Dadurch kann das Harz durch einfaches Aufsaugen von Lösungsmitteln gewaschen und durch Ausdrücken der Spritzen filtriert werden. Auch die Kupplungsreagenzien können einfach und verlustfrei durch eine Kanüle aufgezogen werden.

9.2.1 Harzbelegung

Rink-Amid-MBHA-Harz

Das Harz wird in DMF vorgequollen und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (siehe 9.2.2). Dann erfolgt die Zugabe von 1 eq. Aminosäure, 1.5 eq. HOBT und 1.1. eq. DIC in DMF (5-10 ml/g Harz) je nach gewünschter Harzbelegung. Nach einer Kupplungszeit von 1 h wird das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Anschließend werden die freien Linkerfunktionen des Harzes mit 5 eq. DIEA und 10 eq. Acetanhydrid in DMF gecappt. Die Vollständigkeit der Blockierung wird mit Hilfe des Kaiser-Tests (siehe 9.2.4) überprüft. Es folgt das Auswaschen und Trocknen des Harzes mit DMF, DCM und Diethylether. In dieser Form ist das Harz bei -20 °C gut lagerbar.

Wang-Harz

Das Harz wird in DMF vorgequollen und 15 h mit einer Lösung von 2 eq. AS, 2 eq. MSNT und 1.5 eq. NMI geschüttelt. Die Bestimmung der Harzbelegung erfolgt mit einer kleinen Harzmenge über die quantitative Überprüfung der Fmoc-Abspaltung (siehe 9.2.6).

MBHA-Harz

An das in DMF vorgequollene Harz wird S-(Triphenylmethyl)-3-thio-propionsäure (**46**) unter Einsatz von 4 eq. (**46**), 3.6 eq. TBTU, 10 eq. DIEA in DMF gekup-

pelt. Die freien Aminofunktionen werden mit 50 eq. Ac_2O /10 eq. DIEA in DMF gecappt. Danach erfolgt die Tritylabspaltung mit TFA/TIS/DCM (50:5:45). Nach der Neutralisation mit 0.5 % DIEA in DMF wird die erste Aminosäure an die Thiolfunktion mit 4 eq. AS, 4.4 eq. DIC, 6 eq. NMI in DCM gekuppelt. Die freien Thiolfunktionen werden anschließend mit 50 eq. Ac_2O /10 eq. DIEA in DMF gecappt. Das vorbelegte Harz wird mit DMF und DCM gewaschen und mit Diethylether getrocknet.

Sulfamylbutyryl AM-Harz

Das Harz wird in DCM vorgequollen. Die Ankupplung der ersten Aminosäure erfolgt mit 4 eq. AS, 4 eq. MeIm in DCM/DMF (4:1) und 4 eq. DIC in 18 h. Das Harz wird anschließend mit DMF und DCM gewaschen und mit Diethylether getrocknet.

9.2.2 Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Das Harz wird mit 20-40 % Piperidin in DMF (10 ml/g Harz) versetzt, 20 min geschüttelt und zweimal mit DMF für jeweils 5 Minuten gewaschen. Diesen Vorgang wiederholt man solange, bis die UV-spektrometrische Kontrolle der Fmoc-Abspaltung nach 9.2.6 die Vollständigkeit der Abspaltung anzeigt. Anschließend wird das Harz zweimal mit DMF, viermal mit DCM und zweimal mit DMF jeweils für 5 Minuten gewaschen.

9.2.3 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Das Harz wird mit 50-80 % TFA in CH_2Cl_2 (10 ml/g Harz) versetzt, 15 min geschüttelt und zweimal mit CH_2Cl_2 für jeweils 5 Minuten gewaschen. Diesen Vorgang wiederholt man dreimal. Anschließend wird das Harz mit 0.5 % DIEA in DMF neutralisiert und zweimal mit DMF, zweimal mit DCM und zweimal mit DMF jeweils für 5 Minuten gewaschen.

9.2.4 Kaiser-Test

Es werden folgende Lösungen angesetzt:

A: 80 g (0.85 mol) Phenol in 20 ml abs. Ethanol

B: 0.5 g (2.8 mmol) Ninhydrin in 10 ml abs. Ethanol

C: 33 mg (0.5 mmol) KCN in 50 ml Wasser;

hiervon 2 ml mit Pyridin auf 100 ml auffüllen.

In einem Eppendorfgefäß werden ca. 3 mg Harz mit jeweils 2 Tropfen der obigen Lösungen vermischt und 5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Der Test ist negativ, wenn das Harz farblos und die Lösung gelb gefärbt ist. Bei einem positiven Test ist das Harz, je nach der Menge der freien Aminogruppen, leicht bläulich bis stark blau und die Lösung grünlich bis tiefblau gefärbt.

9.2.5 Quantitative Bestimmung der Harzbelegung

Die Belegung des Harzes mit der ersten Aminosäure wird mit Hilfe des quantitativen Kaiser-Tests bestimmt. Hierbei wird die durch die Ninhydrin-Reaktion hervorgerufene Blaufärbung UV-spektrometrisch quantitativ ausgewertet. Dazu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe entfernt, das Harz mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet. Eine genau abgewogene Harzmenge wird nun in einem Eppendorfgefäß mit jeweils 4 Tropfen der Lösungen A und B und 8 Tropfen der Lösung C versetzt und in einem Wasserbad 7 Minuten auf 100 °C erhitzt. Danach wird die Probe sofort mit 60 % Ethanol in Wasser verdünnt und je nach Farbkonzentration mit dem gleichen Lösungsmittel in einen 25 ml-, 50 ml- oder 100 ml-Meßkolben überführt und aufgefüllt. Mit Hilfe eines mit 60%iger Ethanol-Lösung kalibrierten UV/VIS-Spektrometers wird die molare Extinktion der Lösung bei ihrem Absorptionsmaximum bei 570 nm gemessen. Die Harzbelegung kann nun gemäß der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Harzbelegung}[\mu\text{mol/g}] = \frac{\text{Extinktion} \cdot \text{Verduennung}[\text{ml}] \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \text{Einwaage}[\text{mg}]}$$

Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{570 \text{ nm}}$ beträgt für Glycin $10.000 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$, für alle anderen Aminosäuren $15.000 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$.

9.2.6 UV-spektrometrische Kontrolle der Fmoc-Abspaltung

Nach Entfernen der Abspatlösung wird das Harz zweimal mit DMF, viermal mit DCM und zweimal mit DMF für jeweils 5 Minuten gewaschen. Dann gibt man erneut 20-40 % Piperidin in DMF zu, schüttelt 10 Minuten und fängt die Abspatlösung auf. Anschließend wird die Absorption bei 300 nm kontrolliert. Das bei der Abspaltung entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt hat bei dieser Wellenlänge eine charakteristische Absorption; fehlt diese, so ist die Fmoc-Schutzgruppe vollständig abgespalten worden. Um eindeutige Meßergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Waschschritte sehr sorgfältig durchzuführen, da sonst Reste des Addukts detektiert werden, die im Harz von der letzten Abspaltung zurückgeblieben sind.

Quantitative Bestimmung der Harzbelegung

Die Fraktionen der Fmoc-Abspaltung sowie die Waschlösungen werden in einem 50 ml Meßkolben vereinigt, welcher sodann bis zur Eichmarke aufgefüllt und gut geschüttelt wird. Man entnimmt $30 \mu\text{l}$ dieser Lösung und verdünnt mit 1 ml DMF. Die der gemessenen UV-Absorption entsprechende Harzbelegung kann anhand einer Eichgeraden abgelesen werden.

9.2.7 Manuelle Festphasensynthese

Kupplung

Zu dem in DMF gequollenen Harz gibt man 3 beziehungsweise 5 eq. Aminosäurederivat, 1.5 eq. HOBt (bezogen auf 1 eq. AS) und löst die Reagenzien in DMF (5-10 ml/g Harz). Nach 5 Minuten gibt man 1.1 eq. DIC (bezogen auf 1 eq. AS) zu und schüttelt die Mischung, bis der Kaiser-Test die Vollständigkeit der Kupplung anzeigt.

Kaiser-Test

Eine kleine Menge Harz wird aus dem Reaktionsgefäß entnommen und je viermal mit DMF und Isopropanol in einer Minifritte gewaschen. Anschließend wird der Kaiser-Test nach 9.2.4 durchgeführt. Zeigt der Test noch freie Aminofunktionen an, wird die Kupplungszeit verlängert oder man wiederholt die Kupplung. Bei der Verwendung von Thioesterharzen kann der Kaiser-Test nicht angewandt werden.

Fmoc/Boc-Abspaltung

siehe 9.2.2, 9.2.3.

Der Syntheszyklus wird solange durchlaufen, bis das Peptid der gewünschten Länge aufgebaut ist.

9.2.8 Acetylierung des N-Terminus

Das Harz wird zweimal 30 min mit je 50 eq. Acetanhydrid und 5 eq. Triethylamin in DMF (10 ml/g Harz) geschüttelt. Die Vollständigkeit der Acetylierung wird mit Hilfe des Kaiser-Tests überprüft. Anschließend wird das Harz dreimal mit DMF, dreimal mit DCM und dreimal mit Isopropanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.2.9 Allylabspaltung

In einen ausgeheizten Schlenkkolben gibt man unter Schutzgas 6.12 ml Chloroform, 0.612 ml Essigsäure und 0.41 ml N-Methylmorpholin und leitet durch diese Lösung 1 h einen Argonstrom. In einem Schüttelgefäß werden unter Schutzgas 150.8 mg Pd(PPh₃)₄ (0.13 mmol) zu 300 mg Harz (0.13 mmol Peptid), welches im Vakuum getrocknet wurde, gegeben.

Die obige Lösung wird in einer mit Argon gespülten Spritze in das Schüttelgefäß überführt. Das Gefäß wird mit einem Septum verschlossen und 15 h mit aufgesetztem Argonballon geschüttelt. Die Festphase wird zweimal mit DMF, dreimal

mit einer Natriumdithiocarbamat/DIEA-Lösung (0.5 %/0.5 % in DMF), dreimal mit DCM und dreimal mit Isopropanol jeweils für 5 Minuten gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.2.10 Silylierung der Glasgeräte

Die zur Allylabsplaltung verwendeten Glasgeräte werden vor Gebrauch silyliert, damit das Harz nicht an den Glaswänden haften bleibt. Dazu werden die trockenen Gefäße randvoll mit einer 10%igen Lösung von Dimethyldichlorsilan in Toluol gefüllt und mindestens 1 h geschüttelt. Danach wäscht man mehrmals mit abs. Toluol, abs. Methanol und abs. Aceton und trocknet die Glasgeräte im Trockenschrank.

9.2.11 Kontrollabsplaltungen für HPLC- und ESI-MS-Analytik

Eine kleine Menge Harz (5-10 mg) wird in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml des entsprechenden Abspaltreagenzes versetzt und 1-4 h geschüttelt. Die Lösung wird dann auf 3 Eppendorfgefäße verteilt, mit gekühltem (0 °C) Diethylether auf ca. 1.5 ml verdünnt und zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Peptid noch dreimal mit Diethylether aufgeschlämmt und zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird das Peptid in H₂O gelöst und lyophilisiert.

9.2.12 Präparative Abspaltung vom Harz

Das an das Harz gebundene geschützte Peptid wird in einer Einmalspritze bei RT mit dem entsprechenden Abspaltreagenz (1 ml/50 mg Harz) versetzt und 1-4 h geschüttelt. Die Lösung wird anschließend in ein Zentrifugenglas gegeben, in dem sich gekühlter (0 °C) Diethylether befindet, und zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, und das ausgefallene Peptid wird noch dreimal mit Diethylether aufgeschlämmt und wieder zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird das Peptid in H₂O gelöst und lyophilisiert. Cysteinhaltige Peptide werden nach der Ausfällung in Diethylether im Argonstrom getrocknet, in mit Argon gesättigter 10%iger wäßriger AcOH aufgenommen und lyophilisiert.

9.2.13 Harzabspaltung vom Sulfamylbutyryl AM-Harz

Aktivierung

Das Harz (1mmol) wird 1 h in DCM gequollen und anschließend mit NMP gewaschen. Iodacetonitril (2.5 mmol) und DIEA (1 mmol) werden in 4 ml NMP gelöst und durch Alumina B (basisch) gefiltert. Die Lösung gibt man zum Harz und schüttelt 18 h. Das Harz wird mit NMP, THF, DCM gewaschen und getrocknet.

Thioesterspaltung

Das Harz wird 1 h in DMF gequollen. Man gibt 50 eq. Ethyl-3-Mercaptopropionat und 0.5 eq. Thiophenol hinzu und rührt 24 h unter Schutzgas. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit DMF gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden eingeeengt (N_2 -Rotationsverdampfer); der Rückstand wird in Diethylether aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und der N-terminalen Boc-Schutzgruppe behandelt man das Peptid 2 h mit TFA/ H_2O /TIS (90:5:5). Das Peptid wird mit Diethylether ausgefällt und lyophilisiert.

9.2.14 N-Glycosylierungsreaktion an fester Phase

Man gibt 100 mg Harz (0.027 mmol) in eine 2 ml-Einmalspritze und läßt es 5 Minuten in DMF quellen. Die Kupplungsreagenzien werden in 1.5 ml DMF gelöst und durch eine Kanüle aufgenommen. Die Kanüle wird noch mit ca. 0.1 ml DMF nachgespült, worauf die Mischung 15 Stunden geschüttelt wird. Danach werden die Reagenzien entfernt und das Harz mit DMF und Diethylether je viermal gewaschen.

9.2.15 Abspaltung der Acetylschutzgruppen, Harzabspaltung

Das harzgebundene Glycopeptid wird mit 2 ml 20-40 % (v,v) Hydrazin-Monohydrat in DMF versetzt und 2-3 h geschüttelt. Nachdem das Harz je viermal mit

DMF und Diethylether gewaschen beziehungsweise getrocknet worden ist, erfolgt die Harzabspaltung nach 9.2.11 oder 9.2.12. Das mit Diethylether ausgefällte Glycopeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

9.2.16 Abspaltung der Benzylschutzgruppen

Das lyophilisierte Glycopeptid wird in Methanol/Essigsäure (3:2) gelöst und in einen Schlenkkolben überführt. Unter Argon werden 50 mg Pd (10 % auf Aktivkohle) hinzugegeben und ein Wasserstoffballon aufgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h (pentasaccharidische Glycopeptide: 15 h) wird der Katalysator abzentrifugiert und dreimal mit Methanol/Essigsäure (3:2) aufgeschlämmt. Die vereinigten Überstände werden mit H₂O verdünnt und lyophilisiert.

9.3 Funktionsweise des Peptidsynthesizers 433A

In Abbildung 75 wird anhand eines Flußdiagramms das Basic und Conditional Monitoring des Peptidsynthesizers 433 A (Applied Biosystems) verdeutlicht:

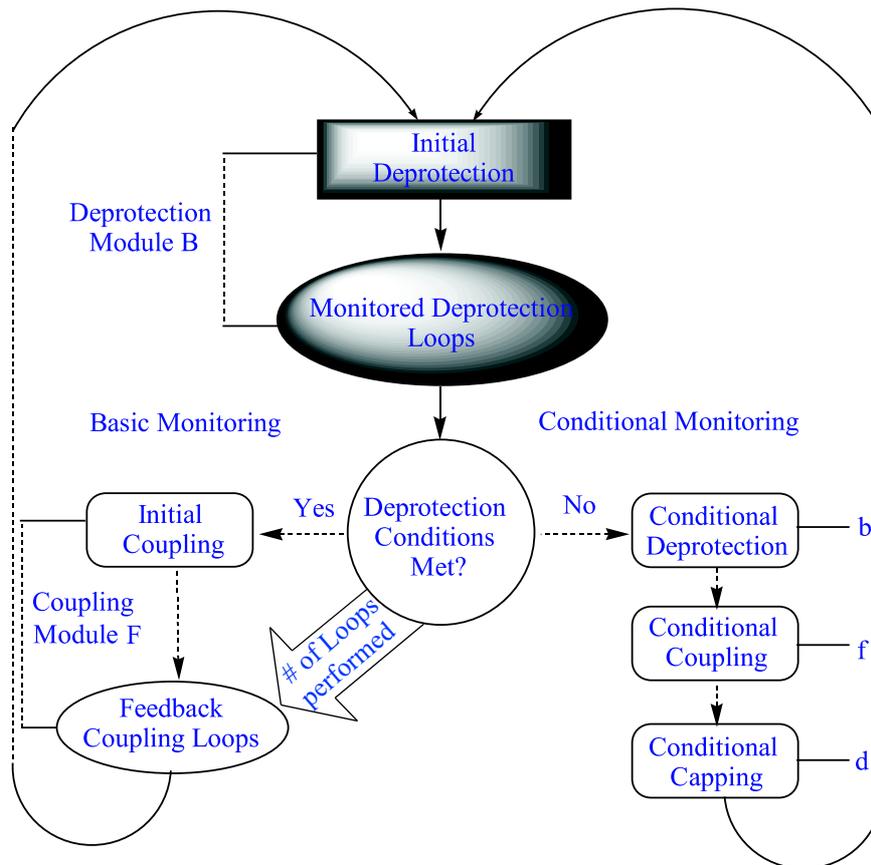


Abbildung 75: Flußdiagramm des Basic und Conditional Monitoring des Peptidsynthesizers 433 A (Applied Biosystems).

Durch die Feedback-Kontrolle wird eine Modifizierung der Syntheseyklen in bezug auf die Kupplungszeiten, die Dauer der Fmoc-Abspaltung und die Capping-Schritte während der Synthese möglich. Folgende Syntheseyklen wurden für die Peptidsynthese in der Fmoc- beziehungsweise Boc-Chemie verwendet:

Tabelle 6: Syntheseyklen für den Peptidsynthesizer 433 A für Fmoc- und Boc-Chemie.

Fmoc-Chemie	Modul
Wash	ecD
Single Couple (long)	BbADEFfIIICd
Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
Final Deprotection	BbIDc
Boc-Chemie	Modul
Wash	Dc
Double Couple/Cap	<i>bcd</i> ADEIADEFCD
Final Deprotection	<i>bcdc</i>

A	Activation
B	Fmoc-Deprotection
C	Capping with Ac ₂ O
D	Wash with NMP
E	Transfer
F	Coupling
I	Wait (10 min)
a	Conditional Activation/Transfer
b/b	Conditional Deprotection (30 min)/TFA Deprotection (3x15 min)
c	DCM wash
d/d	Conditional Capping with Ac ₂ O/DIEA Neutralisation/NMP Wash
e	MeOH wash
f	Conditional Coupling (50 min)
i	Eject cartridge, advance second

Die Kupplungen erfolgten jeweils mit 10 eq. Aminosäure, 11 eq. DIEA und 9 eq. HBTU/HATU. Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit 20 % Piperidin in DMF, die Boc-Abspaltung mit 80 % TFA in CH₂Cl₂. Durch den Einsatz entsprechender Reaktionsgefäße und Syntheseprogramme konnte zwischen einem 0.1 mmol- und einem 20 μmol-Reaktionsansatz gewählt werden.

9.4 Synthese und Strukturuntersuchung α -helikaler Modellpeptide und zugehöriger N-Glycopeptide

9.4.1 Peptidsynthese

Fmoc-KEAAAKA-Harz (25)

Tabelle 7: Synthesedaten für das Peptid (25).

Harz	Harzmenge/ -belegung	Kupplung	Fmoc-Abspaltung
Rink-Amid-MBHA	1 g 0.27 mmol/g	3 eq. AS 3.3 eq. DIC 4.5 eq. HOBt	40 % Piperidin in DMF
Aminosäure	Menge [mg]	Kupplungsdauer	Abspaltungszeit
Fmoc-Ala	212	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Lys(Boc)	380	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Ala	252	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Ala	252	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Ala	252	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Glu(OtBu)	345	2 h	4 x 20 min
Fmoc-Lys(Boc)	380	2 h	4 x 20 min

Harzabspaltung: Reagenz K (1h)

Tabelle 8: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (25).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(25)	Säule A, Grad. 1: 25.63 min	$C_{44}H_{64}N_{10}O_{11}$	$M_{ber.}: 909.1$ $M_{gef.}: 909.6$	HPLC: 99 %

Die Peptide (1) und (2) wurden von A. Ratschinski [108] beziehungsweise in der eigenen Diplomarbeit synthetisiert.

Ac-AEAAAKENAAKEAAAKA-Harz (1)

Summenformel: $C_{69}H_{117}N_{21}O_{26}$

ESI-MS: $M_{ber.}: 1655.9$ $M_{gef.}: 1655.4$

Ac-AEAAAKENASKEAAKA-Harz (2)

Summenformel: C₆₉H₁₁₇N₂₁O₂₇**ESI-MS:** M_{ber.}: 1671.8 M_{gef.}: 1672.0

Ac-AEAAAKED(O-Allyl)(AcHmb)AAKEAAKA-Harz (3)

Ac-AEAAAKED(O-Allyl)(AcHmb)ASKEAAKA-Harz (4)

Tabelle 9: Synthesedaten für die Peptide (3) und (4).

Harzmenge/ -belegung	Kupplung	Fmoc-Abspaltung	Acetylierung
0.5 g Peptid (25) (0.27 mmol/g)	5 eq. AS 5.5 eq. DIC 7.5 eq. HOBt	20 % Piperidin in DMF	681 µl Ac ₂ O 110 µl Et ₃ N in 3 ml DMF
Aminosäure	Menge [mg]	Kupplungsdauer	Abspaltungszeit
9. Fmoc-Ala	210	2 h	5 x 20 min
9. Fmoc-Ser(tBu)	289	2 h	5 x 20 min
Fmoc(FmocHmb)-Ala	452	48 h	5 x 20 min
Fmoc-Asp(All)	267	48 h	6 x 20 min
Fmoc-Glu(OtBu)	287	48 h	6 x 20 min
Fmoc-Lys(Boc)	316	48 h	7 x 20 min
Fmoc-Ala	210	48 h	7 x 20 min
Fmoc-Ala	210	48 h	7 x 20 min
Fmoc-Ala	210	48 h	8 x 20 min
Fmoc-Glu(OtBu)	287	48 h	8 x 20 min
Fmoc-Ala	210	48 h	8 x 20 min

Harzabspaltung: 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TES (2 h)

Tabelle 10: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik nach der Allylabspaltung für die Peptide (3) und (4).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(3)	Säule A, Grad. 1: 16.77 min	C ₇₉ H ₁₂₈ N ₂₁ O ₂₉	M _{ber.} : 1834.8 M _{gef.} : 1834.6	HPLC: 86.1 %
(4)	Säule A, Grad. 1: 15.20 min	C ₇₉ H ₁₂₈ N ₂₁ O ₃₀	M _{ber.} : 1850.8 M _{gef.} : 1850.6	HPLC: 72.6 %

9.4.2 Zuckersynthese

2-Acetamido-1,2-di-desoxyglucopyranosyldiamin (14)

100 mg 2-Acetamido-1,2-di-desoxyglucopyranosylazid (**13**) wurden in 10 ml Di-oxan/Ethanol (5:1, v/v) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 20 mg Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt. Anschließend wurde durch die Lösung Wasserstoff geleitet. Die Reaktion war nach 3 h vollständig abgelaufen. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel bei max. 20 °C im Vakuum entfernt. Das weiße kristalline Produkt wurde unmittelbar für die Glycopeptidsynthese eingesetzt.

Ausbeute: 95 mg (95 %)

R_f (Isopropanol/NH₄Ac (1 M) 4:1) Azid: 0.65

R_f (Isopropanol/NH₄Ac (1 M) 4:1) Amin: 0.31

Summenformel: C₈H₁₆N₂O₅

ESI-MS: M_{ber.}: 220.22 M_{gef.}: 221.0

Aufreinigung von Chitin

100 g Chitinpulver (Sigma) wurden 2 d in 1 l 2N HCl gerührt und anschließend gründlich mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden 500 ml 5%ige NaOH (w/v) hinzugegeben und 20 h Rückfluß gekocht. Nach mehrfachem Waschen mit H₂O wurde das Chitin im Trockenschrank bei 90 °C getrocknet und zu einem feinen Pulver gemörsert.

Ausbeute: 64 g (64 %)

2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose**(β -Ac₃GlcNAc- α -Ac₃GlcNAc) (15)**

Zu 400 ml Essigsäureanhydrid wurden bei 0 °C unter Rühren 52 ml konz. Schwefelsäure getropft, 64 g Chitinpulver portionsweise hinzugegeben und nach Entfernen des Kühlbades 72 h bei RT gerührt. Dann wurde der Ansatz 11 h auf 55 °C erwärmt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung auf 2 l Eiswasser, das 120 g Natriumacetat enthielt, gegossen und über Nacht gerührt.

Die Lösung wurde vom unlöslichen Rückstand abfiltriert und mit Na₂CO₃ neutralisiert. Das Filtrat wurde dreimal mit je 250 ml CHCl₃ extrahiert; die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mit Diethylether versetzt. Das ausfallende Produkt wurde nach 15 h abgesaugt; aus der Mutterlauge konnte noch Produkt isoliert werden. Man erhielt schneeweiße Kristalle, die eventuell nochmals aus MeOH/Diethylether umkristallisiert werden mußten.

Ausbeute: 5.3 g (8.3 %), Literatur: 6.9 % [106], 9.5 % [170]

Schmelzpunkt: 299 °C, Literatur: 286-288 °C [106], 298 °C [170]

R_f (CHCl₃/EtOH 9:1): 0.5

Summenformel: C₂₈H₄₀N₂O₁₇

ESI-MS: M_{ber.}: 676.7 M_{gef.}: 676.6

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm]:

7.93 (d, 1H, NH', J_{NH',2'} = 9.2 Hz), 7.85 (d, 1H, NH, J_{NH,2} = 9.3 Hz); 5.83 (d, 1H, H1, J_{1,2} = 3.6 Hz), 5.18-5.03 (m, 2H, H3', H3), 4.86-4.78 (dd, 1H, H4', J_{3',4'} = 9.6 Hz, J_{4',5'} = 9.9 Hz), 4.70-4.66 (d, 1H, H1', J_{1',2'} = 8.4 Hz), 4.40-4.22 (m, 2H, H6_b, H6_{a'}), 4.20-4.10 (m, 1H, H2), 4.07-3.89 (m, 2H, H6_a, H6_{b'}), 3.87-3.75 (m, 3H, H4, H5, H5'), 3.65-3.53 (m, 1H, H2'); 2.15-1.75 (8s, 24H, OAc, OAc', NAc, NAc').

2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid**(β -Ac₃GlcNAc- α -Ac₂GlcNAc-Cl) (16)**

5 g (7.4 mmol) Octaacetylchitobiose (**15**) wurden 48 h in 50 ml einer frisch hergestellten, mit HCl kaltgesättigten Acetylchloridlösung bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand zweimal mit CHCl₃ codestilliert und aus Aceton/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 4.2 g (87.3 %), Literatur: 88 % [111, 170]**Schmelzpunkt:** 198 °C, Literatur: 202-203 °C [171]**R_f** (CHCl₃/EtOH 9:1): 0.59**Summenformel:** C₂₆H₃₇N₂O₁₅Cl**ESI-MS:** M_{ber.}: 653.1 M_{gef.}: 653.0¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]:

8.02 (d, 1H, NH', J_{NH',2'} = 9.3 Hz), 7.78 (d, 1H, NH, J_{NH,2} = 9.3 Hz); 6.23 (d, 1H, H1, J_{1,2} = 3.4 Hz), 5.18-5.03 (m, 2H, H3', H3), 4.87-4.76 (m, 1H, H4'), 4.62 (d, 1H, H1', J_{1',2'} = 8.6 Hz), 4.42-4.22 (m, 3H, H6_b, H6_{a'}, H2), 4.12-3.77 (m, 5H, H6_a, H6_{b'}, H4, H5, H5'), 3.70-3.60 (m, 1H, H2'); 2.04-1.71 (7s, 21H, OAc, OAc', NAc, NAc').

2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid**(β -Ac₃GlcNAc- β -Ac₂GlcNAc-N₃) (17)**

4 g (6.35 mmol) des Chlorids **16** wurden in 83 ml Chloroform gelöst und mit 1.58 g (24.3 mmol) NaN₃ in 20 ml H₂O und 2.83 ml (6.1 mmol) Tricapryl-methylammoniumchlorid (Aliquat 336) 4 d bei RT gerührt.

Die organische Phase wurde abgetrennt, zehnmal mit Wasser extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit Diethylether digeriert und abfiltriert. Man kristallisierte aus Methanol/Diethylether um.

Ausbeute: 2.8 g (74.1 %), Literatur: 75 % [170, 171]

Schmelzpunkt: 199 °C, Literatur: 198-199 °C [170], 195 °C [171]

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 9:1): 0.44

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{15}$

ESI-MS: $M_{\text{ber.}}$: 659.6 $M_{\text{gef.}}$: 659.6

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6):

δ [ppm]:

7.92 (d, 2H, NH, NH', $J_{\text{NH},2} = J_{\text{NH}',2'} = 9.2$ Hz); 5.12 (dd, 1H, H3', $J_{2',3'} = 10.1$ Hz, $J_{3',4'} = 9.8$ Hz), 4.98 (dd, 1H, H3, $J_{2,3} = 8.5$ Hz, $J_{3,4} = 8.6$ Hz), 4.81 (m, 1H, H4'), 4.76 (d, 1H, H1, $J_{1,2} = 9.4$ Hz), 4.66 (d, 1H, H1', $J_{1',2'} = 8.4$ Hz), 4.39 (d, 1H, H6_b, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz), 4.26 (dd, 1H, H6_{a'}, $J_{5',6a'} = 4$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz), 4.07 (dd, 1H, H6_a, $J_{6a,5} = 2.5$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz), 3.91 (dd, 1H, H6_{b'}, $J_{5,6b'} = 2.2$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz), 3.81-3.68 (m, 4H, H5', H5, H4, H2), 3.60-3.53 (m, 1H, H2'); 2.06-1.75 (7s, 21H, OAc, OAc', NAc, NAc').

2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-desoxy- β -D-gluco-pyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-gluco-pyranosylamin

(β -Ac₃GlcNAc- β -Ac₂GlcNAc-NH₂) (**18**)

0.5 g (0.76 mmol) **17** wurden in 25 ml Dioxan/Ethanol (5:1, v/v) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 100 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt. Anschließend wurde durch die Lösung Wasserstoff geleitet. Die Reaktion war nach 4 h vollständig abgelaufen. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel bei max. 20 °C im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde direkt für die Folgereaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 0.45 g (90.5 %)

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 7:1) Azid: 0.56

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 7:1) Amin: 0.18

Summenformel: C₂₆H₃₉N₃O₁₅

ESI-MS: M_{ber.}: 633.61 M_{gef.}: 634.4

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm]:

7.78-7.65 (m, 4H, NH, NH', NH₂); 5.09 (m, 1H, H3'), 4.97 (m, 1H, H3), 4.83 (m, 1H, H4'), 4.80 (d, 1H, H1), 4.69 (d, 1H, H1'), 4.31 (d, 1H, H6_b), 4.28 (d, 1H), 4.10 (d, 1H, H6_a), 3.99 (d, 1H, H6_{b'}), 3.83-3.39 (m, 5H, H5', H5, H4, H2, H2'); 2.00-1.74 (7s, 21H, OAc, OAc', NAc, NAc').

2-Acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-4-O-[2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-O-acetyl-β-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosid]-β-D-glucopyranosylazid (20) aus

3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-4-O-[3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-4-O-(4,6-O-benzyliden-β-mannopyranosyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosid]-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid (19)

200 mg (168 μmol) Trisaccharid (**19**) wurden mit 4 ml TFA/CH₂Cl₂ 1:1 versetzt und 5 min gerührt. Dann wurde 1 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung hinzugegeben und mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ und H₂O verdünnt; die organische Phase wurde mit H₂O ausgewaschen, eingengt und mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Zum Rückstand wurden 2.6 ml Ethylendiamin und 6 ml n-Butanol gegeben und 10 h auf 90 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde durch mehrfaches Kodestillieren mit Toluol entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Zwischenprodukt wurde in 8 ml Pyridin gelöst, bei 0 °C mit 4 ml Ac₂O versetzt und 10 h bei RT gerührt. Es wurde eingengt, mit Toluol kodestilliert und chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

Ausbeute: 166 mg (90.5 %)

R_f (EE/Aceton 1:2): 0.63

Summenformel: C₅₃H₆₅N₅O₂₀

ESI-MS: M_{ber.}: 1092.1 M_{gef.}: 1092.8

2-Acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-4-O-[2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-O-acetyl-β-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosid]-β-D-glucopyranosylamin (21)

150 mg Azid (0.14 mmol) (**20**) wurden in 15 ml Dioxan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 30 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt. Anschließend wurde durch die Lösung Wasserstoff geleitet. Die Reaktion war nach 3 h beendet. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel bei 20 °C im Vakuum entfernt. Das weiße kristalline Produkt wurde unmittelbar für die Glycopeptidsynthese eingesetzt.

Ausbeute: 142 mg (94.6 %)

R_f (EE/Aceton 1:2) Amin: 0.05

Summenformel: C₅₃H₆₇N₃O₂₀

ESI-MS: M_{ber.}: 1066.12 M_{gef.}: 1066.7

2-Acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-4-O-[2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-4-O-(2,4-di-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-β-D-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosid]-β-D-glucopyranosylazid (23)

45 mg (25 μmol) Pentasaccharid **22** wurden in 15 ml n-Butanol und 2 ml Ethylen-diamin versetzt und 12 h auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und von dem erhaltenen viskosen Öl mehrmals Toluol abdestilliert. Der trockene Rückstand wurde in 10 ml Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 5 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wurde langsam auf RT erwärmt und 15 h

gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Feststoff mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (EE/Aceton 15:1) gereinigt.

Ausbeute: 44 mg (97.8 %)

R_f (EE/Aceton 15:1): 0.19

Summenformel: C₇₇H₉₇N₅O₃₆

ESI-MS: M_{ber.}: 1668.63 M_{gef.}: 1669.2 + 1691.1 (M + Na⁺)

2-Acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-4-O-[2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-4-O-(2,4-di-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)- β -D-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosid]- β -D-glucopyranosylamin (24)

44 mg Azid (26 μ mol) (**23**) wurden in 10 ml Dioxan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 15 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt. Anschließend wurde durch die Lösung Wasserstoff geleitet. Die Reaktion war nach 3 h vollständig abgelaufen. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel bei max. 20 °C im Vakuum entfernt. Das weiße kristalline Produkt wurde unmittelbar für die Glycopeptidsynthese eingesetzt.

Ausbeute: 41 mg (93.2 %)

R_f (EE/Aceton 15:1) Azid: 0.19

R_f (EE/Aceton 15:1) Amin: 0.00

Summenformel: C₇₇H₉₉N₃O₃₆

ESI-MS: M_{ber.}: 1642.63 M_{gef.}: 1643.1

9.4.3 Glycopeptidsynthese

Die N-Glycopeptide wurden gemäß der Arbeitsvorschrift 9.2.14 synthetisiert. Es wurden jeweils 50 mg der Peptidharze von (**3**) oder (**4**) mit einer Harzbelegung

von 0.27 mmol/g eingesetzt. Das Monosaccharid (**14**) und das Disaccharid (**18**) wurden mit 6 eq. des jeweiligen Zuckers, mit 6 eq. TBTU und mit 4 eq. DIEA angekuppelt. Für das Trisaccharid (**21**) und das Pentasaccharid (**24**) wurden Äquivalentverhältnisse von 2 eq. des Zuckers, 2.2 eq. TBTU und 2.5 eq. DIEA gewählt. Die Abspaltung der Acetylgruppen erfolgte nach der Arbeitsvorschrift 9.2.15, die Entfernung der Benzylgruppen im Anschluß an die Harzabspaltung nach der Arbeitsvorschrift 9.2.16.

Harzabspaltung: 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TES (2 h)

Tabelle 11: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für die Glycopeptide **NAA**.

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(5)	Säule A, Grad. 1: 13.00 min	C ₇₇ H ₁₃₁ N ₂₃ O ₃₀	M _{ber.} : 1859.0 M _{gef.} : 1858.5	HPLC: 77 %
(7)	Säule A, Grad. 1: 13.09 min	C ₈₅ H ₁₄₄ N ₂₄ O ₃₅	M _{ber.} : 2062.2 M _{gef.} : 2062.0	HPLC: 55 %
(9)	Säule A, Grad. 1: 12.84 min	C ₉₁ H ₁₅₄ N ₂₄ O ₄₀	M _{ber.} : 2224.3 M _{gef.} : 2224.4	HPLC: 51 %
(11)	Säule A, Grad. 1: 12.03 min	C ₁₀₃ H ₁₇₄ N ₂₄ O ₅₀	M _{ber.} : 2548.6 M _{gef.} : 2548.0	HPLC: 45 %

Tabelle 12: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für die Glycopeptide **NAS**.

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(6)	Säule A, Grad. 1: 13.00 min	C ₇₇ H ₁₃₁ N ₂₃ O ₃₁	M _{ber.} : 1875.0 M _{gef.} : 1874.5	HPLC: 59 %
(8)	Säule A, Grad. 1: 10.45 min	C ₈₅ H ₁₄₄ N ₂₄ O ₃₆	M _{ber.} : 2077.3 M _{gef.} : 2077.5	HPLC: 47 %
(10)	Säule A, Grad. 1: 10.20 min	C ₉₁ H ₁₅₄ N ₂₄ O ₄₁	M _{ber.} : 2239.7 M _{gef.} : 2240.1	HPLC: 30 %
(12)	Säule A, Grad. 1: 12.03 min	C ₁₀₃ H ₁₇₄ N ₂₄ O ₅₁	M _{ber.} : 2564.6 M _{gef.} : 2564.3	HPLC: 21 %

NMR-Daten:

¹H-NMR (600 MHz, H₂O, 276 K):

δ [ppm]:

Peptid (**1**) Ac-AEAAAKENAAKEAAKA-NH₂:

8.608, 8.399, 8.273, 8.264, 8.213, 8.211, 8.142, 8.078, 8.062, 8.022 (NH, Ala, 10H, d); 8.700, 8.279 (NH, Glu, 3H, d); 8.224, 8.203, 8.046 (NH, Lys, 3H, d); 8.546 (NH, Asn, 1H, d); 7.636 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.244/7.481 (CONH₂, Ala, 2H, d); 7.776/7.059 (γNH₂, Asn, 2H, d); 4.248, 4.234, 4.233, 4.225, 4.203, 4.202, 4.176, 4.171, 4.163 (αH, Ala, 10H, m); 4.258, 4.202 (αH, Glu, 3H, m); 4.23, 4.200, 4.171 (αH, Lys, 3H, m); 4.559 (αH, Asn, 1H, m); 2.848 (βCH₂, Asn, 2H, m); 2.559/2.497, 2.491 (γCH₂, Glu, 6H, m); 2.123, 2.079 (βCH₂, Glu, 6H, m); 2.076 (Ac, 3H, s); 1.924, 1.901, 1.880/1.828 (βCH₂, Lys, 6H, m); 1.605, 1.578, 1.520 (γCH₂, Lys, 6H, m); 1.59, 1.492, 1.490, 1.462, 1.461, 1.460, 1.432, 1.425, 1.410 (βCH₂, Ala, 30H, d).

Glycopeptid (**5**):

8.580, 8.415, 8.338, 8.291, 8.285, 8.206, 8.143, 8.116, 8.097 (NH, Ala, 10H, d); 8.703, 8.371, 8.341 (NH, Glu, 3H, d); 8.243, 8.206, 8.108 (NH, Lys, 3H, d); 8.573 (NH, Asn, 1H, d); 8.876 (γNH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.400 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.650 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.515/7.237 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.239, 4.238, 4.228, 4.227, 4.226, 4.221, 4.216, 4.210 (αH, Ala, 10H, m); 4.227, 4.220, 4.210 (αH, Glu, 3H, m); 4.246, 4.239, 4.223 (αH, Lys, 3H, m); 4.607 (αH, Asn, 1H, m); 2.869 (βCH₂, Asn, 2H, m); 2.415, 2.414, 2.405 (γCH₂, Glu, 6H, m); 2.082, 2.081, 2.057 (βCH₂, Glu, 6H, m); 2.076 (Ac, 3H, s); 1.895, 1.878, 1.862 (βCH₂, Lys, 6H, m); 1.573, 1.566, 1.546 (γCH₂, Lys, 6H, m); 1.475, 1.473, 1.472, 1.462, 1.457, 1.456, 1.428, 1.410 (βCH₂, Ala, 30H, d).

Glycopeptid (**7**):

8.588, 8.407, 8.306, 8.289, 8.277, 8.220, 8.207, 8.138, 8.083, 8.071 (NH, Ala, 10H, d); 8.743, 8.385, 8.348 (NH, Glu, 3H, d); 8.226, 8.203, 8.080 (NH, Lys, 3H, d); 8.571 (NH, Asn, 1H, d); 8.852 (γNH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.592 (GlcNHAc'', 1H, d, J = 9 Hz); 8.455 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.654 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.494/7.234 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.257, 4.240, 4.238, 4.227, 4.221, 4.218,

4.215, 4.213, 4.210 (α H, Ala, 10H, m); 4.213, 4.210, 4.209 (α H, Glu, 3H, m); 4.238, 4.215, 4.214 (α H, Lys, 3H, m); 4.597 (α H, Asn, 1H, m); 2.901/2.848 (β CH₂, Asn, 2H, m); 2.392/2.331, 2.370/2.321, 2.346 (γ CH₂, Glu, 6H, m); 2.071, 2.065, 2.045 (β CH₂, Glu, 6H, m); 2.083 (Ac, 3H, s); 1.901, 1.894/1.836, 1.889 (β CH₂, Lys, 6H, m); 1.585, 1.574, 1.554 (γ CH₂, Lys, 6H, m); 1.475, 1.474, 1.469, 1.466, 1.463, 1.462, 1.457, 1.433, 1.410 (β CH₂, Ala, 30H, d).

Glycopeptid (9):

8.572, 8.412, 8.326, 8.302, 8.281, 8.198, 8.194, 8.135, 8.112, 8.087 (NH, Ala, 10H, d); 8.708, 8.369, 8.328 (NH, Glu, 3H, d); 8.238, 8.198, 8.103 (NH, Lys, 3H, d); 8.568 (NH, Asn, 1H, d); 8.845 (γ NH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.636 (GlcNHAc'', 1H, d, J = 8.7 Hz); 8.423 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.652 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.515/7.240 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.238, 4.230, 4.228, 4.227, 4.221, 4.220, 4.211 (α H, Ala, 10H, m); 4.249, 4.223, 4.209 (α H, Glu, 3H, m); 4.238, 4.221, 4.211 (α H, Lys, 3H, m); 4.599 (α H, Asn, 1H, m); 2.865 (β CH₂, Asn, 2H, m); 2.430, 2.402, 2.400 (γ CH₂, Glu, 6H, m); 2.083, 2.082, 2.064 (β CH₂, Glu, 6H, m); 2.076 (Ac, 3H, s); 1.897, 1.890, 1.865 (β CH₂, Lys, 6H, m); 1.579, 1.574, 1.560 (γ CH₂, Lys, 6H, m); 1.477, 1.473, 1.467, 1.461, 1.450, 1.448, 1.407 (β CH₂, Ala, 30H, d).

Glycopeptid (11):

8.657, (8.594), 8.421, 8.337, 8.231, 8.216, 8.163, 8.120, 8.085, 8.036, 7.997 (NH, Ala, 10H, d); 8.844, (8.752), 8.320, 8.287 (NH, Glu, 3H, d); 8.162, 8.119, 7.994 (NH, Lys, 3H, d); 8.560 (NH, Asn, 1H, d); 8.859 (γ NH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.632 (GlcNHAc'', 1H, d, J = 9 Hz); 8.451 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.609 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.445/7.257 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.268, 4.257, 4.242, 4.239, 4.233, 4.232, 4.230, 4.192, 4.174, 4.170 (4.140), (α H, Ala, 10H, m); 4.180, 4.162, 4.142 (α H, Glu, 3H, m); 4.230, 4.175, 4.139 (α H, Lys, 3H, m); 4.567 (α H, Asn, 1H, m); 2.880 (β CH₂, Asn, 2H, m); 2.345, 2.316, 2.322 (γ CH₂, Glu, 6H, m); 2.100, 2.089, 2.054 (β CH₂, Glu, 6H, m); 2.108 (Ac, 3H, s); 1.951, 1.923, 1.903/1.856 (β CH₂, Lys, 6H, m); 1.564, 1.552, 1.544 (γ CH₂, Lys, 6H, m); 1.501, 1.495, 1.494, 1.481, 1.480, 1.475, 1.469, 1.448, 1.430 (β CH₂, Ala, 30H, d).

Peptid (**2**) Ac-AEAAAKENASKEAAKA-NH₂:

8.607, 8.416, 8.324, 8.282, 8.213, 8.205, 8.145, 8.130 (NH, Ala, 9H, d); 8.766, 8.415, 8.367 (NH, Glu, 3H, d); 8.353, 8.233, 8.140 (NH, Lys, 3H, d); 8.561 (NH, Asn, 1H, d); 8.357 (NH, Ser, 1H, d); 7.66 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.533/7.242 (CONH₂, Ala, 2H, d); 7.790/7.099 (γNH₂, Asn, 2H, d); 4.285, 4.245, 4.244, 4.233, 4.231, 4.227, 4.221, 4.213, 4.203 (αH, Ala, 9H, m); 4.227, 4.220, 4.211 (αH, Glu, 3H, m); 4.425, 4.227 (αH, Lys, 3H, m); 4.612 (αH, Asn, 1H, m); 4.386 (αH, Ser, 1H, m); 3.988 (βCH₂, Ser, 2H, m) 2.859 (βCH₂, Asn, 2H, m); 2.387, 2.363 (γCH₂, Glu, 6H, m); 2.083, 2.066, 2.055 (βCH₂, Glu, 6H, m); 2.088 (Ac, 3H, s); 1.915, 1.896, 1.833 (βCH₂, Lys, 6H, m); 1.587, 1.569, 1.533 (γCH₂, Lys, 6H, m); 1.493, 1.462, 1.459, 1.457, 1.456, 1.451, 1.450, 1.439, 1.416 (βCH₂, Ala, 27H, d).

Glycopeptid (**6**):

8.556, 8.414, 8.349, 8.326, 8.303, 8.279, 8.237, 8.203, 8.122 (NH, Ala, 9H, d); 8.718, 8.415, 8.424 (NH, Glu, 3H, d); 8.391, 8.261, 8.190 (NH, Lys, 3H, d); 8.619 (NH, Asn, 1H, d); 8.444 (NH, Ser, 1H, d); 8.887/8.873 (γNH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.424, (8.409) (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.655 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.564/7.219 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.281, 4.245, 4.244, 4.242, 4.239, 4.238, 4.234, 4.217 (αH, Ala, 9H, m); 4.237, 4.236, 4.221 (αH, Glu, 3H, m); 4.244, 4.239, 4.238 (αH, Lys, 3H, m); 4.656 (αH, Asn, 1H, m); 4.385 (αH, Ser, 1H, m); 3.969 (βCH₂, Ser, 2H, m) 2.908/2.821 (βCH₂, Asn, 2H, m); 2.339 (γCH₂, Glu, 4H, m); 2.029, 2.026 (βCH₂, Glu, 6H, m); 2.066 (Ac, 3H, s); 1.877, 1.856, 1.819 (βCH₂, Lys, 6H, m); 1.541, 1.536 (γCH₂, Lys, 4H, m); 1.457, 1.449, 1.445, 1.443, 1.442, 1.431, 1.422, 1.399 (βCH₂, Ala, 27H, d).

Glycopeptid (**8**):

8.554, 8.424, 8.344, 8.320, 8.297, 8.262, 8.240, 8.192, 8.098 (NH, Ala, 9H, d); 8.718, 8.415, 8.321 (NH, Glu, 3H, d); 8.375, 8.263, 8.193 (NH, Lys, 3H, d); 8.612 (NH, Asn, 1H, d); 8.438 (NH, Ser, 1H, d); 8.852 (γNH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.595 (GlcNHAc'', 1H, d, J = 9 Hz); 8.438 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz); 7.653 (NH₃⁺, Lys, 3H, bs); 7.568/7.226 (CONH₂, Ala, 2H, d); 4.277, 4.240, 4.239, 4.233, 4.227, 4.216, 4.215 (αH, Ala, 9H, m); 4.230, 4.218, 4.215 (αH, Glu, 3H, m); 4.239 (αH, Lys, 3H, m); 4.641 (αH, Asn, 1H, m); 4.379 (αH, Ser, 1H, m);

3.963 (βCH_2 , Ser, 2H, m) 2.905/2.813 (βCH_2 , Asn, 2H, m); 2.346, 2.337 (γCH_2 , Glu, 6H, m); 2.043, 2.033, 2.031 (βCH_2 , Glu, 6H, m); 2.064 (Ac, 3H, s); 1.879, 1.852, 1.831 (βCH_2 , Lys, 6H, m); 1.547, 1.542, 1.533 (γCH_2 , Lys, 6H, m); 1.468, 1.458, 1.455, 1.451, 1.447, 1.445, 1.437, 1.433, 1.402 (βCH_2 , Ala, 27H, d).

Glycopeptid (10):

8.559, 8.415, 8.353, 8.330, 8.303, 8.287, 8.239, 8.217, 8.102 (NH, Ala, 9H, d); 8.716, 8.415, 8.321 (NH, Glu, 3H, d); 8.369, 8.265, 8.193 (NH, Lys, 3H, d); 8.619 (NH, Asn, 1H, d); 8.438 (NH, Ser, 1H, d); 8.855 (γNH , Asn, 1H, d, $J = 8$ Hz); 8.643 (GlcNHAc'', 1H, d, $J = 9$ Hz); 8.439 (GlcNHAc', 1H, d, $J = 9$ Hz); 7.656 (NH_3^+ , Lys, 3H, bs); 7.573/7.226 (CONH_2 , Ala, 2H, d); 4.273, 4.244, 4.239, 4.238, 4.235, 4.233, 4.228, 4.216, 4.215 (αH , Ala, 9H, m); 4.234, 4.224, 4.215 (αH , Glu, 3H, m); 4.244, 4.239, 4.232 (αH , Lys, 3H, m); 4.637 (αH , Asn, 1H, m); 4.380 (αH , Ser, 1H, m); 3.960/3.865 (βCH_2 , Ser, 2H, m) 2.903/2.816 (βCH_2 , Asn, 2H, m); 2.350, 2.349 (γCH_2 , Glu, 6H, m); 2.045, 2.042, 2.033 (βCH_2 , Glu, 6H, m); 2.066 (Ac, 3H, s); 1.881, 1.858, 1.848 (βCH_2 , Lys, 6H, m); 1.547, 1.545, 1.529 (γCH_2 , Lys, 6H, m); 1.461, 1.452, 1.450, 1.449, 1.447, 1.441, 1.428, 1.401 (βCH_2 , Ala, 27H, d).

Glycopeptid (12):

8.550, (8.517, 8.482), 8.407, 8.353, 8.327, (8.314), 8.303, 8.254, 8.200, 8.194, 8.163 (NH, Ala, 9H, d); 8.713, (8.691), 8.419, 8.407 (NH, Glu, 3H, d); (8.462), 8.373, 8.222, 8.176 (NH, Lys, 3H, d); 8.606 (NH, Asn, 1H, d); 8.428 (NH, Ser, 1H, d); 8.845 (γNH , Asn, 1H, d, $J = 8$ Hz); 8.625 (GlcNHAc'', 1H, d, $J = 9$ Hz); 8.433 (GlcNHAc', 1H, d, $J = 9$ Hz); 7.640 (NH_3^+ , Lys, 3H, bs); 7.545/7.210 (CONH_2 , Ala, 2H, d); 4.225, 4.224, 4.223, 4.220, 4.215, (4.215), 4.210, 4.198, 4.192 (αH , Ala, 9H, m); 4.230, (4.221), 4.216, 4.198 (αH , Glu, 3H, m); 4.225, 4.221, 4.215 (αH , Lys, 3H, m); 4.626 (αH , Asn, 1H, m); 4.367 (αH , Ser, 1H, m); 3.960/3.890 (βCH_2 , Ser, 2H, m) 2.878/2.787 (βCH_2 , Asn, 2H, m); 2.316, 2.306, 2.305 (γCH_2 , Glu, 6H, m); (2.047/1.959), 2.042/1.971, 2.037/2.002, 2.008 (βCH_2 , Glu, 6H, m); 2.058 (Ac, 3H, s); 1.860, 1.858/1.797, 1.854/1.795 (βCH_2 , Lys, 6H, m); 1.534, 1.50 (γCH_2 , Lys, 4H, m); 1.427, 1.424, 1.423, 1.421, 1.419, 1.415, 1.413, 1.405, 1.382 (βCH_2 , Ala, 27H, d).

9.5 Ansätze zur Darstellung einer N-glycosylierten aminoacylierten tRNA

9.5.1 Synthese von aktivierter N-glycosylierter Asparaginsäure

N^β -[2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]- N^α -(t-butyloxy-carbonyl)-L-asparagin -O-t-butylester

(Boc-Asn(1- β -Ac₂GlcNAc-1,4- β -Ac₃GlcNAc)-O-tBu) (26)

1.25 g (4.31 mmol) Boc-Asp-O-tBu wurden in 20 ml DMF gelöst, mit 2.28 g (7.11 mmol) TBTU und 0.95 ml (5.39 mmol) DIEA versetzt und 15 min gerührt. Anschließend wurden 0.68 g (1.08 mmol) des Aminozuckers (**18**) zugegeben und 3 Tage gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels durch Kodestillation mit Toluol wurde der Rückstand durch Flash-Chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) gereinigt. Man erhielt das Produkt (**26**) als weißen Feststoff.

Ausbeute: 0.58 g (59.5 %)

R_f (CHCl₃/EtOH 5:1): 0.6

Summenformel: C₃₉H₆₀N₄O₂₀

ESI-MS: M_{ber.}: 904.9 M_{gef.}: 905.6

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.49 (d, 1H, γ -NH Asn), J_{1,NH} = 9.2 Hz); 7.97 (d, 1H, NHAc', J_{2',NH'} = 9 Hz), 7.82 (d, 1H, NHAc, J_{2,NH} = 9.4 Hz); 6.86 (d, 1H, NH Urethan, J = 9.3 Hz); 5.14 (dd, 1H, H3', J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.8 Hz), 5.04 (m, 1H, H1), 4.94 (dd, 1H, H3, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4 Hz), 4.81 (dd, 1H, H4', J_{3',4'} = J_{4',5'} = 9.3 Hz), 4.67 (d, 1H, H1', J_{1',2'} = 8.4 Hz), 4.31-4.26 (m, 2H, H6_a, H6_{a'}); 4.16 (m, 1H, α -CH Asn); 3.97-3.87 (m, 2H, H6_b, H6_{b'}), 3.83-3.73 (m, 2H, H2, H5'), 3.67 (dd, 1H, H4, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4 Hz), 3.60-3.53 (m, 1H, H2') 3.57-3.49 (m, 2H, H5, H2'); 2.51 (dd, 1H, β -CH_a Asn, J_{vic} = 5.1 Hz, J_{gem} = 16 Hz); 2.50 (dd, 1H, β -CH_b Asn, J_{vic} = 7.5 Hz); 2.04,

2.01, 1.95, 1.94, 1.90 (5s, 15H, OAc); 1.74 (s, 3H, NAc), 1.72 (s, 3H, NHAc'); 1.37 (s, 9H, tBu Urethan), 1.36 (s, 9H, tBu Ester).

N^α-(6-Nitroveratryloxycarbonyl)-N^β-[2-acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-asparagin

(N^α-NVOC-Asn(1-β-Ac₂GlcNAc-1,4-β-Ac₃GlcNAc)-OH) (27)

Alternative 1: 0.5 g (0.55 mmol) (**26**) wurden in 5 ml einer 80%igen Lösung von TFA in CH₂Cl₂ mit 5 eq. p-Dimethoxybenzol gelöst und 5 h bei RT gerührt. Man engte die Lösung im Vakuum ein und kodestillierte noch zweimal mit Toluol. Der trockene Rückstand wurde in 3 ml Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 230 mg (2.75 mmol) NaHCO₃ in 1 ml H₂O versetzt. Nach der Zugabe von 455 mg (1.65 mmol) NVOC-Cl in Dioxan wurde die gelbe Lösung 10 h gerührt. Die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt, mit 1 N wäßriger NaHSO₄-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Der Rückstand wurde über Flash-Chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 180 mg (47 %)

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 7:1): 0.1

Summenformel: C₄₀H₅₃N₅O₂₄

ESI-MS: M_{ber.}: 987.9 M_{gef.}: 988.6

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.49 (d, 1H, γ-NH Asn, J_{1,NH} = 9.0 Hz); 7.97 (d, 1H, NH Urethan, J_{NH,α} = 9.1 Hz); 7.81 (d, 1H, NHAc, J_{2,NH} = 9.3 Hz), 7.69 (d, 1H, NHAc'); 7.71, 7.18 (2s, 2H, arom. H); 5.37, 5.32 (s, 2H, CH₂ (NVOC)); 5.43-4.92 (m, 4H, H3', H1, H3, H4'), 4.81 (t, 1H, H2), 4.66 (d, 1H, H1'); 4.38 (m, 1H, α-CH Asn); 4.36 (m, 1H, H6_a), 4.28 (m, 1H, H6_{a'}), 3.98 (m, 1H, H6_b); 3.92, 3.87 (2s, 6H, 2 OCH₃); 3.87

(m, 1H, H_{6'}), 3.84 (m, 1 H, H5'), 3.78 (m, 1H, H4), 3.70 (m, 1 H, H5), 3.53 (m, 1 H, H2'); 2.63 (dd, 2H, β -CH₂ Asn); 2.04-1.90 (5s, 15H, OAc); 1.74, 1.69 (2s, 6H, NHAc).

N ^{β} -[2-Acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-N ^{α} -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-asparagin

(Fmoc-Asn(1- β -Ac₂GlcNAc-1,4- β -Ac₃GlcNAc)-OH) (28)

1 g Peptidharz (Wangharz: Harzbelegung 0.883 mmol/g) wurden in DMF gequollen und mit einer Lösung von 2 eq. Fmoc-Asp(OAll)-OH, 2 eq. MSNT und 1.5 eq. NMI in 15 h geschüttelt. Mit einer kleinen Harzmenge wurde die Harzbelegung über die quantitative Bestimmung der Fmoc-Abspaltung bestimmt. Anschließend erfolgte die Allylabspaltung gemäß der Arbeitsvorschrift 9.2.9.

Die Glycosylierungsreaktion erfolgte mit 0.5 g (0.45 mmol) mit Fmoc-Asp(OH)-belegtem Wang-Harz unter Einsatz von 2 eq. Glycosylsamin (**18**), 2.2 eq. TBTU und 2.5 eq. DIEA. Die Harzabspaltung von 0.1 g Harz ergab nach der HPLC-Aufreinigung eine Ausbeute von 56.4 % (**28**) (48.4 mg).

Für die Reaktion zu (**27**) und (**29**) blieb die glycosylierte Aminosäure (**28**) am Harz gebunden.

HPLC: 27.57 min, Gradient 1

Summenformel: C₄₅H₅₄N₄O₂₀

ESI-MS: M_{ber.}: 970.9 M_{gef.}: 971.4

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

12.62 (s, 1H, OH); 8.46 (d, 1H, γ -NH Asn, J_{1,NH} = 9.2 Hz); 7.90 (d, 2H, aromat. Fmoc); 7.87 (d, 1H, NHAc', J_{2',NH'} = 7.6 Hz), 7.72 (d, 1H, NHAc, J_{2,NH} = 9.2 Hz); 7.70 (d, 2H, aromat. Fmoc); 7.45-7.28 (m, 5H, NH Urethan, aromat. Fmoc);

5.17-4.92 (m, 3H, H3', H1, H3), 4.85-4.77 (m, 1H, H4'), 4.67 (d, 1H, H1'); 4.39-4.15 (m, 6H, α -CH Asn; H6_{a'}, H6_b, CH-CH₂-Fmoc), 4.02-3.77 (m, 4H, H5', H6_a, H6_{b'}, H2), 3.73-3.67 (m, 1H, H4), 3.68-3.47 (m, 2H, H2', H5); 2.68-2.59 (m, 2H, β -CH₂ Asn); 2.05-1.70 (7s, 21H, OAc, OAc', NHAc, NHAc').

N ^{α} -(6-Nitroveratryloxcarbonyl)-N ^{β} -[2-acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl] -L-asparagin

(N ^{α} -NVOC-Asn(1- β -Ac₂GlcNAc-1,4- β -Ac₃GlcNAc)-OH) (27)

Alternative 2: Unter Erhalt der Acetylschutzgruppen am Zucker wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe des harzgebundenen Produkts (**28**) mit 40 % Piperidin in DMF abgespalten. 0.2 g (0.18 mmol) Harz wurden mehrmals mit DMF gewaschen, mit Diethylether getrocknet und für 15 h in einem Gemisch von 1.5 mmol NaHCO₃ in 1 ml H₂O und 0.9 mmol NVOC-Cl in 3 ml Dioxan geschüttelt. Die Harzabspaltung mit 80 % TFA in CH₂Cl₂ lieferte die NVOC-geschützte N-glycosylierte Aminosäure (**27**) mit 43 % Ausbeute (76.5 mg).

N ^{α} -(6-Nitroveratryloxcarbonyl)-N ^{β} -[2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl] -L-asparagin

(N ^{α} -NVOC-Asn(1- β -Ac₃GlcNAc)-OH) (29)

Die Glycosylierung von 0.2 g (0.18 mmol) mit Fmoc-Asp(OH)-belegtem Wang-Harz wurde mit 2 eq. Glycosylamin (**14**), 2.2 eq. TBTU und 2.5 eq. DIEA durchgeführt. Unter Erhalt der Acetylschutzgruppen am Zucker wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe mit 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Das Harz wurde mehrmals mit DMF gewaschen, mit Diethylether getrocknet und für 15 h in einem Gemisch von 1.5 mmol NaHCO₃ in 1 ml H₂O und 0.9 mmol NVOC-Cl in 3 ml Dioxan geschüttelt. Schließlich erfolgte die Harzabspaltung mit 80 % TFA in CH₂Cl₂.

Ausbeute: 61.8 mg (49 %)

R_f (Aceton): 0.05

Summenformel: C₂₈H₃₆N₄O₁₇

ESI-MS: M_{ber.}: 700.6 M_{gef.}: 701.4

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.60 (d, 1H, γ-NH Asn, J_{1,NH} = 9.2 Hz); 7.98 (d, 1H, NH Urethan); 7.90 (d, 1H, NHAc, J_{2,NH} = 9.2 Hz); 7.71, 7.15 (2s, 2H, aromat. H); 5.38, 5.33 (s, 2H, CH₂ (NVOC)); 5.38 (m, 1H, H1), 5.17 (m, 1H, H3), 5.10 (m, 1H, H4), 4.81 (t, 1H, H2); 4.40 (m, 1H, α-CH Asn); 4.18 (d, 1H, H6_a, J_{vic} = 4.4 Hz, J_{gem} = 12.3 Hz), 3.96-3.81 (m, 2H, H6_b, H5); 3.92, 3.87 (2s, 6H, 2 OCH₃); 2.89 (dd, 1H, β-CH_a Asn, J_{vic} = 6.1 Hz, J_{gem} = 18 Hz); 2.73 (dd, 1H, β-CH_b Asn, J_{vic} = 6.1 Hz, J_{gem} = 18 Hz); 1.98-1.93 (3s, 9H, OAc); 1.70 (s, 3H, NHAc).

N^α-(6-Nitroveratryloxycarbonyl)-N^β-[2-acetamido-4-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-asparagincyanomethylester

(N^α-NVOC-Asn(1-β-Ac₂GlcNAc-1,4-β-Ac₃GlcNAc)-OCH₂CN) (30)

120 mg (0.12 mmol) des Produkts (**27**) wurden in 4 ml DMF gelöst und mit 14 eq. Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden langsam 32 eq. Chloracetonitril hinzugegossen; anschließend rührte man bei RT über Nacht. Die Lösung wurde eingeengt und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgte über Flashchromatographie mit dem Laufmittelgemisch EE/Aceton 3:1 (Säuren und Alkohole dürfen nicht verwendet werden!).

Ausbeute: 61.7 mg (50.1 %)

R_f (EE/Aceton 3:1): 0.27

Schmelzpunkt: 146-147 °C

Summenformel: C₄₂H₅₄N₆O₂₄

ESI-MS: $M_{ber.}$: 1026.9 $M_{gef.}$: 1026.4

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6 , 300 K):

δ [ppm]:

8.18 (d, 1H, NH Urethan, $J_{NH,\alpha} = 6.4$ Hz); 7.97 (d, 2H, NHAc, NHAc', $J_{2,NH} = J_{2',NH'} = 8.7$ Hz); 7.86 (d, 1H, γ -NH Asn, $J_{1,NH} = 8.0$ Hz); 7.72, 7.15 (2s, 2H, aromat. H); 5.38 (s, 2H, CH₂ (NVOC)); 5.19 (d, 2H, CH₂CN, $J_{gem} = 15.8$ Hz); 5.15 (m, 1H, H3'), 5.13 (m, 2H, H1, H3), 4.84 (dd, 1 H, H4'), 4.72 (d, 1H, H1'), 4.65 (m, 1H, H2); 4.42 (m, 1H, α -CH Asn); 4.39 (d, 1H, H6_a, $J_{vic} = 4.5$ Hz, $J_{gem} = 11$ Hz), 4.31 (d, 1H, H6_{a'}, $J_{gem} = 10.8$ Hz), 3.98 (d, 1H, H6_b, $J_{vic} = 4.5$ Hz, $J_{gem} = 11$ Hz), 3.95 (d, 1H, H6_{b'}, $J_{gem} = 10.8$ Hz); 3.94, 3.89 (2s, 6H, 2 OCH₃); 3.86 (m, 1 H, H5'), 3.79 (m, 1H, H4), 3.70 (m, 1 H, H5), 3.57 (m, 1 H, H2'); 2.60 (dd, 2H, β -CH₂ Asn, $J_{vic} = 4.4$ Hz, $J_{gem} = 17.7$ Hz); 2.01 (5s, 15H, OAc); 1.76 (2s, 6H, NHAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 300 K):

δ [ppm]:

169.89, 168.09 (Carbonyl (C-3, C-6, C-3', C-4', C-6')); 162.31 (Carbonyl C-2, C-2'); 161.80 (Carbonyl (Urethan, C γ)); 151.86, 146.21, 137.61, 125.67 (C-1, C-3, C-4, C-6, aromat. C); 110.32, 108.10 (C-2, C-5, aromat. C); 100.03 (C-1'), 78.90 (CH₂CN), 75.25 (C-4), 74.48 (C-5), 72.83 (C-1, C-3), 72.32 (C-3'), 72.26 (C-3), 70.47 (C-5'), 68.15 (C-4'), 62.76 (CH₂-NVOC), 62.21 (C-6); 61.55 (C-6'), 56.13, 56.06 (2 OCH₃); 53.26 (C-2'), 48.89 (C-2); 48.81 (C α); 34.49 (β CH₂); 22.57 (NHAc); 20.45 (OAc).

IR-Daten (KBr-Preßling):

3370.89, 2925.48, 2854.13, 1729.83, 1670.05, 1525.67, 1441.53, 1371.93, 1330.64, 1280.48, 1225.54, 1071.26, 1046.19, 916.02, 798.46.

N^α-(6-Nitroveratryloxcarbonyl)-N^β-[(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)]-L-asparagincyanomethylester**(N^α-NVOC-Asn(1-β-Ac₃GlcNAc)-OCH₂CN) (31)**

60 mg (0.086 mmol) des Produkts (**29**) wurden in 2 ml DMF gelöst und mit 14 eq. Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden langsam 32 eq. Chloracetonitril hinzugegossen; anschließend rührte man bei RT über Nacht. Die Lösung wurde eingeeengt und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgte über Flashchromatographie mit dem Laufmittelgemisch EE/Aceton 3:1 (Säuren und Alkohole dürfen nicht verwendet werden!).

Ausbeute: 35.5 mg (56 %)

R_f (Aceton): 0.66

Schmelzpunkt: 111-112 °C

Summenformel: C₃₀H₃₇N₅O₁₇

ESI-MS: M_{ber.}: 739.6 M_{gef.}: 739.4

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.18 (d, 1H, NH Urethan, J_{NH,α} = 6.8 Hz); 7.95 (d, 1H, NHAc, J_{2,NH} = 8.9 Hz); 7.81 (d, 1H, γ-NH Asn), J_{1,NH} = 8.0 Hz); 7.73, 7.17 (2s, 2H, arom. H); 5.39 (s, 2H, CH₂ (NVOC)); 5.37 (d, 2H, CH₂CN, J_{gem} = 15.6 Hz); 5.28 (m, 1H, H1), 5.26 (m, 1H, H3), 4.90 (m, 1H, H4), 4.73 (m, 1H, H2); 4.40 (m, 1H, α-CH Asn); 4.17 (d, 1H, H6_a, J_{vic} = 4.4 Hz, J_{gem} = 12.7 Hz), 4.03 (d, 1H, H6_b, J_{vic} = 4.4 Hz, J_{gem} = 12.7 Hz), 3.98 (m, 1H, H5); 3.95, 3.90 (2s, 6H, 2 OCH₃); 2.65 (dd, 1H, β-CH_a Asn, J_{vic} = 5.7 Hz, J_{gem} = 17.8 Hz), 2.62 (dd, 1H, β-CH_b Asn, J_{vic} = 5.6 Hz); 2.00, 2.00, 1.95 (3s, 9H, OAc); 1.71 (s, 3H, NHAc).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

169.60, 169.04, 168.88 (Carbonyl (C-3, C-4, C-6)); 162.31 (Carbonyl C-2); 162.14 (Carbonyl (Urethan, Cγ)); 153.16, 147.63, 139.02, 127.16 (C-1, C-3, C-4, C-6,

aromat. C); 110.26, 108.05 (C-2, C-5, aromat. C); 78.89 (C-1); 78.02 (CH₂CN); 73.03 (C-5), 72.26 (C-3), 68.02 (C-4); 62.79 (CH₂-NVOC); 61.46 (C-6); 56.06, 55.98 (2 OCH₃); 48.81 (C α); 48.61 (C-2); 34.45 (β CH₂); 22.37 (NHAc); 20.31, 20.21 (OAc).

IR-Daten (KBr-Preßling):

3376.91, 2943.80, 2853.42, 1726.94, 1667.17, 1581.34, 1523.49, 1439.60, 1377.89, 1331.61, 1278.57, 1223.61, 1073.25, 1048.12, 984.48, 910.24, 874.56, 796.46.

9.5.2 Synthese von *pdCpA*

6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O-Tetrabenzoyladenosen (34)

In einem 250 ml Zweihalsrundkolben wurden 6 g (22.5 mmol) Adenosin, welches zuvor in einem Exsikkator über P₂O₅ getrocknet wurde, und 137 mg (1.12 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (Katalysator) eingewogen. Anschließend wurden 67 ml Pyridin und 9.15 g (27 mmol) Dimethoxytritylchlorid unter Schutzgas hinzugegeben. Die Reaktionsmischung färbte sich sofort bräunlich. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und zeigte zum Reaktionsende eine klare rotbraune Färbung.

Die Lösung wurde mit 5 ml Methanol versetzt und mit Toluol einrotiert, wodurch überschüssiges Pyridin aus der Lösung entfernt wurde. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst, mit NaHCO₃ ausgeschüttelt und mit NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde in Chloroform/Methanol aufgenommen und über Flash-Chromatographie (Laufmittel: CHCl₃/Methanol/Triethylamin 90:9:1) aufgereinigt.

DMTr-geschütztes Adenosin (32):

Ausbeute: 11.5 g (89.7 %)

R_f (CHCl₃/EtOH 2 %): 0.16

Summenformel: C₃₁H₃₁N₅O₆

Benzoylierung

11.5 g (20.2 mmol) DMTr-geschütztes Adenosin (**32**) wurden in 50 ml Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden in 1 h 22.7 ml (0.2 mol) Benzoylchlorid unter Schutzgas getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt; danach war ein weißer Niederschlag zu beobachten. Die Reaktionsmischung wurde in gekühlte NaHCO₃-Lösung gegossen, um überschüssiges Benzoylchlorid und das Pyridinhydrochlorid zu entfernen. Anschließend wurde mit Essigester extrahiert; die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Der Rückstand wurde mit Toluol einrotiert, um überschüssiges Pyridin zu entfernen. Es resultierte ein gelber Feststoff.

DMTr-geschütztes, benzoyliertes Adenosin (**33**):

Ausbeute: 22.2 g (Rohprodukt)

R_f (CHCl₃/EtOH 2 %): 0.61

Summenformel: C₆₂H₅₉N₅O₁₀

Das Zwischenprodukt (**33**) wurde in 50 ml Methanol/Dichlormethan (3:7) gelöst und auf 0°C gekühlt. In 100 ml Methanol/Dichlormethan (3:7) gelöste Toluol-sulfonsäure (0.1 mmol, 19.02 g) wurde dieser Lösung hinzugefügt. Nach 1 h erfolgte eine Reaktionskontrolle mittels DC (LM: Chloroform/Ethanol 2 %). Die Reaktionsmischung färbte sich aufgrund der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe zunehmend orange. Zur Aufarbeitung des Rohprodukts wurde die Lösung in kalte gesättigte NaHCO₃-Lösung gegossen und anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Schließlich wurde über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einrotieren lag eine hochviskose, bräunliche Substanz vor. Das erhaltene Rohprodukt wurde in Chloroform gelöst und auf eine Kieselgelsäule, die zuvor mit 400 ml Chloroform/Ethanol 1 % equilibriert worden war, aufgetragen. Nach der chromatographischen Reinigung wurde das Produkt (**33**) in wenig Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 11.1 g (81 %)

R_f (CHCl₃/EtOH 2 %): 0.52

Summenformel: C₃₈H₃₀N₅O₈

ESI-MS: M_{ber.}: 684.7 M_{gef.}: 684.5

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.92 (s, 1H, H8 Adenin); 8.73 (s, 1H, H2 Adenin); 7.37-8.04 (m, 20 H, Benzyl); 6.62 (d, 1H, H1 Ribose, J = 7.9 Hz); 6.31 (t, 1H, H2 Ribose, J = 7.9 Hz), 5.96 (dt, 1H, H4 Ribose, J = 5.5, 1.4 Hz), 4.56 (dd, 1H, H3 Ribose, J = 5.5 Hz), 3.82 (m, 2H, H5 Ribose).

4-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidylyl(3'-5')-P (2-cyanoethyl)-6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O-tetrabenzoyladenosen (35)

1.01 g (1.47 mmol) 6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O-Tetrabenzoyladenosen (**34**) wurde in 3.36 mmol (7.47 ml) Tetrazol (schwach saures Aktivierungsreagenz) und 4 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. 2.4 g (2.94 mmol) 4-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidinyl-3'[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit wurden in 1.5 ml Acetonitril gelöst und der obigen Lösung hinzugefügt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Dünnschichtchromatographie (Hexan/Aceton 1:1). Nach 2.5 h wurde die Reaktionsmischung mit 15 ml Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, bevor über Na₂SO₄ getrocknet wurde. Die Lösung wurde einrotiert, wobei ein hellgelber Schaum zurückblieb. Das Rohprodukt wurde in wenig Aceton gelöst und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen, die zuvor mit 200 ml Hexan/Aceton 70:30 + 0.25 % Triethylamin equilibriert wurde. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Hexan/Aceton mit einem Gradienten von 30-70 % Aceton in Hexan + 0.25 % Triethylamin verwendet.

Ausbeute: 0.8 g (38.4 %)

R_f (Hexan/Aceton 1:1): 0.27

Summenformel: C₇₈H₆₆N₉O₁₆P

ESI-MS: M_{ber.}: 1416.4 M_{gef.}: 1416.8

¹H-NMR (250 MHz, Aceton-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.91 (s, 1H, H8 Adenin); 8.69 (d, 1H, H6 Cytosin, J = 8 Hz); 8.25 (m, 1H); 7.96-7.73 (m, 11H, H2 Adenin, DMTr); 7.59-7.09 (m, 28H, Benzyl, DMTr); 6.81 (d, 2H, J = 9.1 Hz); 6.57 (m, 1H), 6.36-6.13 (m, 3H), 5.15, 5.06 (m, 4H), 4.71 (m, 2H), 4.58 (m, 2H); 4.35-4.16 (m, 4H, -POCH₂); 3.79 (s, 6H, OCH₃); 2.77 (m, 3 H, H_{2a} Desoxyribose, CH₂CN); 2.39 (m, 1H, H_{2b} Desoxyribose).

4-N-Benzoyl-2'-desoxycytidylyl(3'-5')-6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O-tetrabenzoyladenosin (35)

0.8 g (0.56 mmol) des Produkts (**34**) wurden in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst; dazu wurde eine Lösung von 0.18 g Jod in THF/H₂O/Pyridin 2:1:0.1 (1.2 ml) hinzugefügt. Nach 1 h wurde die Reaktionsmischung einrotiert, die Mischung wieder in Chloroform gelöst und mit 0.2%iger Na₂S₂O₅-Lösung extrahiert. Die wäßrige Phase wurde anschließend noch einmal mit Chloroform gewaschen; die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde in Methanol/Dichlormethan 3:7 aufgenommen und mit 180 mg (1.2 mmol) Toluolsulfonsäure, gelöst in Methanol/Dichlormethan 1:1, versetzt. Zu der Reaktionsmischung wurde nach 1 h kalte NaHCO₃-Lösung hinzugegeben; die organische Phase wurde anschließend mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einrotieren lag ein heller Schaum vor, der zur Aufreinigung über Säulenchromatographie (Laufmittel: 40-75 % Aceton in Hexan) wieder in Aceton gelöst wurde.

Ausbeute: 305 mg (48.2 %)

R_f (EE/Hexan 1:1): 0.34

Summenformel: C₅₇H₆₄N₉O₁₄P

ESI-MS: M_{ber.}: 1130.2 M_{gef.}: 1130.7

¹H-NMR (250 MHz, Aceton-d₆, 300 K):

δ [ppm]:

8.71 (d, 1H, J = 8.1 Hz); 8.49 (d, 1H, J = 4.9 Hz); 8.20 (m, 1H); 8.00-7.78 (m, 8H); 7.64-7.28 (m, 18H); 6.57 (m, 1H); 6.18-6.37 (m, 3H), 5.04, 5.15 (m, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.59 (m, 2H), 4.20 (m, 2H); 3.78 (m, 2H, -POCH₂-); 2.79 (m, 2H, CH₂CN); 2.42 (m, 2 H, H_{2a,b} Desoxyribose).

Di-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit (36)

3.55 g (0.05 mmol) 3-Hydroxypropionitril wurden in 20 ml THF gelöst, mit 13 ml DIEA versetzt und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 5 g (0.025 mmol) Dichloro-N,N-diisopropylphosphoramidit langsam über eine Spritze hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei RT wurde die Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester verdünnt und mit Phosphatpuffer (pH 7) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Die Substanz wurde in einem Laufmittelgemisch von Aceton/Hexan/Triethylamin 30:70:0.2 chromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 5.4 g (79.3 %)

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 15:1): 0.7

Summenformel: C₁₂H₂₂N₃O₂P

ESI-MS: M_{ber.}: 271.3 M_{gef.}: 272.2

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN, 300 K):

δ [ppm]:

3.84 (m, 4H, OCH₂); 3.63 (m, 2H, CH(CH₃)₂); 2.64 (t, 4H, CH₂CN, J = 2.8 Hz); 1.21 (s, 6H, CH₃), 1.19 (s, 6H, CH₃).

4-N-Benzoyl-5'-(di-2-cyanoethylphosphat)-2'-desoxycytidylyl(3'-5'-cyanoethyl-phosphat)-6-N, 6'-N, 2'-O, 3'-O-tetrabenzoyladenosen (37)

0.1 g (0.09 mmol) des Produkts (**35**) wurden in 0.4 ml Tetrazol (0.18 mmol) und 0.7 ml Dichlormethan gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. 31.8 µg (0.12 mmol) Di-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit (**36**) wurden in Acetonitril gelöst und der obigen Lösung zugefügt. Nach 1 h wurde eine Lösung von 0.1 g Jod in 2 ml THF/H₂O/Pyridin (2:1:0.08) hinzugegeben. Die Lösung wurde einrotiert; der Rückstand war bräunlich gefärbt. Er wurde in Chloroform gelöst und mit 0.05%iger Na₂S₂O₅-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet.

Ausbeute: 98.3 mg (83 %)

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 15:1): 0.15

Summenformel: C₆₃H₅₅N₁₁O₁₈P₂

ESI-MS: M_{ber.}: 1316.14 M_{gef.}: 1332.75 (M + NH₄⁺)

5'-Phospho-2'-desoxycytidylyl(3'-5')adenosin (38)

98 mg (0.074 mmol) des Produkts (**37**) wurden zur Entschützung in Dioxan/Methanol gelöst; dazu wurde eine konzentrierte NH₃-Lösung hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde danach auf 55 °C erhitzt und 24 h gerührt. Die Lösung wurde eingengt und der Rückstand mittels HPLC (0-50 % Acetonitril in 25 mM wässriger NH₄OAc-Lösung, pH 5) aufgereinigt.

Ausbeute: 37.3 mg (79.5 %)

R_f (Acetonitril/50 mM NH₄Ac (pH 4.5) 4:1): 0.56

Summenformel: C₁₉H₂₃N₈O₁₃P₂³⁻

ESI-MS: M_{ber.}: 633.38 M_{gef.}: 633.14

¹H-NMR (250 MHz, D₂O, 300 K):

δ [ppm]:

8.24 (s, 1H, H8 Adenin); 7.99 (s, 1H, H2 Adenin); 7.53 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H6 Cytosin); 5.92 (m, 2H, H1 Desoxyribose, H1 Ribose, $J = 5.6$ Hz); 5.79 (d, 1H, H5 Cytosin, $J = 8.0$ Hz); 4.60 (m, 2H, H3, H2 Ribose); 4.39 (t, 1H, H3 Desoxyribose, $J = 4.8$ Hz); 4.19 (m, 1H, H4 Ribose); 4.08 (m, 1H, H4 Desoxyribose), 3.96 (m, 2H, H5 Desoxyribose); 3.81 (m, 2H, H5 Ribose); 2.18 (m, 1H, H2_a Desoxyribose), 1.62 (m, 1H, H2_b Desoxyribose).

9.5.3 Ligationsversuche mit *pdCpA*

Zur Umsalzung von 5'-Phospho-2'-desoxycytidylyl(3'-5')adenosin in das Tetra-butylammoniumsalz (**39**) wurde *pdCpA* (**38**) mit 2.2 eq. $n\text{Bu}_4\text{NOH}$ in H_2O versetzt. Die Lösung wurde auf pH 7 eingestellt und mit DMF mehrmals koevaporiert. Das anschließend aufgenommene NMR-Spektrum zeigte, dass die Umsalzung vollständig verlaufen war. Von 50 mg des Dinukleotids (**39**) wurde eine Stammlösung in 2 ml trockenem DMF ($\text{H}_2\text{O} < 0.005\%$) angesetzt.

In einen ausgeheizten Kolben wurden unter Schutzgas 100 μl der Stammlösung von *pdCpA* (3.9 μmol) gegeben. Dazu wurde der im Ölpumpenvakuum vorge-trocknete Cyanomethylaktivester (**30**) oder (**31**) in 62.5 μl DMF hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 mM Ammoniumacetat (pH 4.5)/Acetonitril 1:1 gestoppt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC (10-70 % Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetat (pH 4.5), Absorption bei 260 nm (*pdCpA*, NVOC), 280 nm (NVOC)).

9.6 Synthese und Strukturuntersuchung des Prionenglycoproteinfragments SHA PrP172-194

Ac-QNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTK-NH₂ (**40**)

Ac-QNNFVHDCVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-NH₂ (**41**)

Ac-QNNFVHDCVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-NH₂ (**42**)

Tabelle 13: Synthesedaten für das Peptid (**40**) und die Glycopeptide (**41**) und (**42**).

Harz	Harzmenge/ -belegung	Synthesizer 433 A	manuelle Kupplung der glycosylierten AS
NovaSyn® TGR	435 mg 0.23 mmol/g	Single Couple 0.1 mmol	3 eq. Aminosäure 3.3 eq. DIC 4.5 eq. HOBt

Eingesetzte glycosylierte Aminosäuren:

Fmoc-Asn(1-β-Ac₃GlcNAc)-OH (Novabiochem)

Fmoc-Asn(1-β-Ac₂GlcNAc-1,4-β-Ac₃GlcNAc)-OH (**28**)

Abspaltung der Acetylgruppen: siehe 9.2.15

Harzabspaltung: 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TIS (2 h)

Tabelle 14: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**40**) und die Glycopeptide (**41**) und (**42**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(40)	Säule A, Grad. 1: 23.81 min	C ₁₁₅ H ₁₈₈ N ₃₆ O ₃₆ S	M _{ber.} : 2683.0 M _{gef.} : 2683.1	HPLC: 42.8 %
(41)	Säule A, Grad. 2: 33.48 min	C ₁₂₃ H ₂₀₁ N ₃₇ O ₄₁ S	M _{ber.} : 2886.2 M _{gef.} : 2886.3	HPLC: 15.2 %
(42)	Säule A, Grad. 1: 23.05 min	C ₁₃₁ H ₂₁₄ N ₃₈ O ₄₆ S	M _{ber.} : 3089.4 M _{gef.} : 3089.6	HPLC: 13.1 %

NMR-Daten:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, H_2O , 283 K):

δ [ppm]:

(40)

8.629, 8.618, 8.600 (NH, Asn, 3H, d); 8.517, 8.478 (NH, Gln, 2H, d); 8.220 (NH, Phe, 1H, d); 8.331, 8.315, 8.085 (NH, Val, 3H, d); 8.770, 8.670 (NH, His, 2H, d); 8.388 (NH, Asp, 1H, d); 8.531 (NH, Cys, 1H, d); 8.322, 8.272 (NH, Ile, 2H, d); 8.539, 8.524, 8.405, 8.363, 8.313, 8.270 (NH, Thr, 6H, d); 8.525, 8.505 (NH, Lys, 2H, d); 4.746, 4.688, 4.663 (αH , Asn, 3H, m); 4.286 (αH , Gln, 2H, m); 4.651 (αH , Phe, 1H, m); 4.236, 4.095, 3.985 (αH , Val, 3H, m); 4.762, 4.690 (αH , His, 2H, m); 4.662 (αH , Asp, 1H, m); 4.685 (αH , Cys, 1H, m); 4.128, 4.092 (αH , Ile, 2H, m); 4.288, 4.256, 4.248, 4.238, 4.231, 4.212 (αH , Thr, 6H, m); 4.287 (αH , Lys, 2H, m); 2.796/2.735 (βCH_2 , Asn, 6H, m); 2.106/2.042, 1.950 (βCH_2 , Gln, 4H, m); 3.150/3.103 (βCH_2 , Phe, 2H, m); 2.074, 1.975, 1.909 (βCH , Val, 3H, m); 3.256/3.165, 3.266/3.212 (βCH_2 , His, 4H, m); 2.725/2.644 (βCH_2 , Asp, 2H, m); 2.918 (βCH_2 , Cys, 2H, m); 1.848 (βCH_2 , Ile, 2H, m); 1.196 (βCH_2 , Thr17, 2H, m); 1.831/1.737 (βCH_2 , Lys, 4H, m); 2.360 (γCH_2 , Gln, 4H, m); 0.926, 0.925, 0.878 (γCH_3 , Val, 18H, m); 1.468, 1.191 (γCH_2 , Ile, 2H, m); 1.445/1.483 (γCH_2 , Lys, 4H, m); 0.889 (δCH_3 , Ile, 3H, m); 2.091 (Ac, 3H, s).

(41)

8.760 (γNH , Asn, 1H, d, $J = 8$ Hz); 8.649, 8.634, 8.604 (NH, Asn, 3H, d); 8.309 (GlcNHAc', 1H, d, $J = 9$ Hz); 8.525, 8.478 (NH, Gln, 2H, d); 8.225 (NH, Phe, 1H, d); 8.317, 8.085 (NH, Val, 2H, d); 8.775, 8.671 (NH, His, 2H, d); 8.388 (NH, Asp, 1H, d); 8.544 (NH, Cys, 1H, d); 8.541, 8.520, 8.426, 8.408, 8.381, 8.354 (NH, Thr, 6H, d); 8.530, 8.515 (NH, Lys, 2H, d); 4.772, 4.700, 4.665 (αH , Asn, 3H, m); 4.232, 4.230 (αH , Gln, 2H, m); 4.660 (αH , Phe, 1H, m); 4.131, 3.993 (αH , Val, 2H, m); 4.769, 4.712 (αH , His, 2H, m); 4.662 (αH , Asp, 1H, m); 4.683 (αH , Cys, 1H, m); 4.232 (αH , Lys, 2H, m); 2.881/2.735, 2.869/2.764 (βCH_2 , Asn, 6H, m); 2.068/1.969, 2.045/1.969 (βCH_2 , Gln, 4H, m); 3.156/3.027 (βCH_2 , Phe, 2H, m); 2.033, 1.986 (βCH , Val, 2H, m); 3.278/3.208, 3.273/3.185 (βCH_2 , His, 4H, m); 2.735/2.653 (βCH_2 , Asp, 2H, m); 2.928 (βCH_2 , Cys, 2H, m); 1.203

(β CH₂, Thr, 8H, m); 1.852/1.752 (β CH₂, Lys, 4H, m); 0.922, 0.910 (γ CH₃, Val, 12H, m); 1.489, 1.197 (γ CH₂, Ile, 2H, m); 1.442 (γ CH₂, Lys, 4H, m); 2.053 (Ac, 3H, s).

(42)

8.740 (γ NH, Asn, 1H, d, J = 8 Hz); 8.641, 8.634, 8.585 (NH, Asn, 3H, d); 8.525 (GlcNHAc', 1H, d, J = 9 Hz), 8.340 (GlcNHAc'', 1H, d, J = 9 Hz); 8.514, 8.478 (NH, Gln, 2H, d); 8.221 (NH, Phe, 1H, d); 8.331, 8.098 (NH, Val, 2H, d); 8.769, 8.669 (NH, His, 2H, d); 8.389 (NH, Asp, 1H, d); 8.546 (NH, Cys, 1H, d); 8.283, 8.212 (NH, Ile, 2H, d); 8.546, 8.533, 8.406, 8.393, 8.376, 8.362 (NH, Thr, 6H, d); 8.524, 8.497 (NH, Lys, 2H, d); 4.763, 4.703, 4.664 (α H, Asn, 3H, m); 4.292, 4.291 (α H, Gln, 2H, m); 4.662 (α H, Phe, 1H, m); 4.092, 3.990 (α H, Val, 2H, m); 4.766, 4.699 (α H, His, 2H, m); 4.662 (α H, Asp, 1H, m); 4.660 (α H, Cys, 1H, m); 4.463, 4.353 (α H, Thr, 2H, m); 4.291 (α H, Lys, 2H, m); 2.865/2.729, 2.807/2.734 (β CH₂, Asn, 6H, m); 2.066/1.969, 2.052/1.979 (β CH₂, Gln, 4H, m); 3.138/3.028 (β CH₂, Phe, 2H, m); 2.013, 1.979 (β CH, Val, 2H, m); 3.266/3.201, 3.263/3.215 (β CH₂, His, 4H, m); 2.739/2.672 (β CH₂, Asp, 2H, m); 2.918 (β CH₂, Cys, 2H, m); 1.202 (β CH₂, Thr19, 2H, m); 1.834/1.751 (β CH₂, Lys, 2H, m); 0.937 (γ CH₃, Val9, 6H, m); 1.468, 1.191 (γ CH₂, Ile, 2H, m); 1.445/1.483 (γ CH₂, Lys, 4H, m); 2.040 (Ac, 3H, s).

9.7 Darstellung eines Prionen-N-Glycoproteinfragments über chemische Ligation

9.7.1 Chemische Ligation von kurzen Peptid- und N-Glycopeptidfragmenten

NH₂-CVNITIKQHTVTTTTTK-OH (**43**)

NH₂-CVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-OH (**44**)

NH₂-CVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTTK-OH (**45**)

Tabelle 15: Synthesedaten für das Peptid (**43**) und die Glycopeptide (**44**) und (**45**).

Harz	Harzmenge/ -belegung	Kupplung	Fmoc-Abspaltung
NovaSyn® TGA belegt mit Fmoc-Lys(Boc)	1 g 0.13 mmol/g	3 eq. Aminosäure 3.3 eq. DIC 4.5 eq. HOBt	40 % Piperidin in DMF
Aminosäure	Menge [mg]	Kupplungsdauer	Abspaltungszeit
Fmoc-Lys(Boc)	-	-	4 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	4 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	4 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	4 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	4 x 20 min
Fmoc-Val	220	15 h	5 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	4 x 20 min
Fmoc-His(Trt)	402	15 h	5 x 20 min
Fmoc-Gln(Trt)	396	15 h	5 x 20 min
Fmoc-Lys(Boc)	304	15 h	5 x 20 min
Fmoc-Ile	229	15 h	6 x 20 min
Fmoc-Thr(tBu)	258	15 h	6 x 20 min
Fmoc-Ile	229	15 h	6 x 20 min

Tabelle 16: Synthesedaten für das Peptid **(43)** und die Glycopeptide **(44)** und **(45)**, Fortsetzung.Teilen der Harzmenge in 3 x 43 μmol :

Aminosäure	Menge [mg]	Kupplungsdauer	Abspaltungszeit
14. Fmoc-Asn(Trt)	129	15 h	7 x 20 min
14. Fmoc-Asn(Ac ₃ GlcNAc)	89	15 h	7 x 20 min
14. (28)	126	15 h	7 x 20 min
Fmoc-Val	73	15 h	7 x 20 min
Fmoc-Cys(Trt)	127	15 h	7 x 20 min

Eingesetzte glycosylierte Aminosäuren:Fmoc-Asn(1- β -Ac₃GlcNAc)-OH (Novabiochem)Fmoc-Asn(1- β -Ac₂GlcNAc-1,4- β -Ac₃GlcNAc)-OH **(28)****Abspaltung der Acetylgruppen:** siehe 9.2.15**Harzabspaltung:** 94.5 % TFA, 2.5 % EDT, 2.5 % H₂O, 1 % TIS (1 h)Tabelle 17: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid **(43)** und die Glycopeptide **(44)** und **(45)**.

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(43)	Säule A, Grad. 1: 14.33 min	C ₇₆ H ₁₃₅ N ₂₃ O ₂₄ S	M _{ber.} : 1787.1 M _{gef.} : 1787.4	HPLC: 93.8 %
(44)	Säule A, Grad. 1: 14.77 min	C ₈₄ H ₁₄₇ N ₂₃ O ₃₀ S	M _{ber.} : 1991.3 M _{gef.} : 1990.9	HPLC: 52.2 %
(45)	Säule A, Grad. 1: 14.62 min	C ₉₂ H ₁₆₀ N ₂₄ O ₃₅ S	M _{ber.} : 2194.8 M _{gef.} : 2194.3	HPLC: 54.9 %

S-(Triphenylmethyl)-3-thio-propionsäure (46)

3.73 ml (42.8 mmol) 3-Mercaptopropionsäure und 11.1 g (42.8 mmol) Triphenylmethanol wurden in 10 ml DCM und 20 ml TFA gelöst. Die dunkle Lösung wurde 1 h gerührt. Danach wurden 300 ml DCM hinzugefügt und die verdünnte Lösung mit NaHCO₃ gewaschen. Es wurde über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Man erhielt einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 11.1 g (80 %), Literatur: 95 % [123]

Summenformel: C₂₂H₂₀O₂S

ESI-MS: M_{ber.}: 324.44 M_{gef.}: 347.2 (+ Na⁺)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 300 K, TMS):

δ [ppm]:

7.35-7.22 (m, 15H, Trityl), 3.34 (s, 1H, OH), 2.32-2.26 (t, 2H, -CH₂CO-), 2.19-2.13 (t, 2H, -SCH₂-).

NH₂-YNNQNNFVHD-S((CH)₂)CONH₂ (**47**)Tabelle 18: Synthesedaten für das Peptid (**47**).

Harz	Harzmenge/ -belegung	Kupplung	Boc-Abspaltung
MBHA belegt mit (46)	0.2 g 1 mmol/g	3 eq. Aminosäure 3.3 eq. DIC 4.5 eq. HOBt	80 % TFA in CH ₂ Cl ₂
Aminosäure	Menge [mg]	Kupplungsdauer	Abspaltungszeit
Boc-Asp(OBzl)	194	15 h	5 x 15 min
Boc-His(Bom)	225	15 h	5 x 15 min
Boc-Val	130	15 h	5 x 15 min
Boc-Phe	159	15 h	5 x 15 min
Boc-Asn(Xan)	247	15 h	5 x 15 min
Boc-Asn(Xan)	247	15 h	5 x 15 min
Boc-Gln(Xan)	255	15 h	5 x 15 min
Boc-Asn(Xan)	247	15 h	5 x 15 min
Boc-Asn(Xan)	247	15 h	5 x 15 min
Boc-Tyr(OBzl)	222	15 h	5 x 15 min

Harzabspaltung: 80 % TFA, 10 % TFMSA, 5 % EDT, 5 % Thioanisol (2 h)Tabelle 19: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**47**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(47)	Säule A, Grad. 2: 27.62 min	C ₅₇ H ₇₈ N ₁₈ O ₁₉ S	M _{ber.} : 1351.4 M _{gef.} : 1351.0	HPLC: 28.3 %

NH₂-YNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTK-OH (**48**)

NH₂-YNNQNNFVHDCVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-OH (**49**)

NH₂-YNNQNNFVHDCVN(GlcNAc-1→4-GlcNAc)ITIKQHTVTTTTK-OH (**50**)

Ligationsreaktion

Je 0.5 μ mol des Peptids (**47**) und der Peptide (**43**), (**44**) bzw. (**45**) wurden in 0.5 ml mit Argon entgastem Ligationspuffer, bestehend aus 6 M GnHCl, 0.1 M Na₃PO₄ und 5 % (v/v) Thiophenol, pH 7.5, gelöst und 24 h bei RT unter Schutzgas gerührt. Die Lösung wurde mit 0.1 % TFA in H₂O gequentscht und lyophilisiert.

Tabelle 20: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**48**) und die Glycopeptide (**49**) und (**50**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(48)	Säule A, Grad. 4: 37.39 min	C ₁₃₀ H ₂₀₆ N ₄₀ O ₄₂ S	M _{ber.} : 3020.4 M _{gef.} : 3020.6	HPLC: 40 %
(49)	Säule A, Grad. 4: 34.89 min	C ₁₃₈ H ₂₁₉ N ₄₁ O ₄₇ S	M _{ber.} : 3236.6 M _{gef.} : 3241.9	HPLC: 33 %
(50)	Säule A, Grad. 4: 35.04 min	C ₁₄₆ H ₂₃₂ N ₄₂ O ₅₂ S	M _{ber.} : 3439.8 M _{gef.} : 3440.4	HPLC: 29 %

9.7.2 Synthese und chemische Ligation der Fragmente SHA PrP121-178 und SHA PrP179-231

NH₂-VVGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRPNQVYY-
RPVDQYNNQNNFVHD-OS(CH₂)₂COOCH₂CH₃ (**51**)

Harz: Sulfamylbutyryl AM belegt mit Fmoc-Asp(O-tBu)

Harzmenge: 0.4 g

Harzbelegung: 0.25 mmol/g

Tabelle 21: Synthesedaten für das Peptid (**51**).

Cycle	Aminosäure	Chemie	Modul
1	-	Wash	cD
2-33	His 177-Glu 146	Single Couple	BbADEFfCd
34-58	Trp 145-Val 122	Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
59	Boc-Val 121	Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
60	-	Final Deprotection	BbIDc

Harzabspaltung (51**):** siehe 9.2.13

Tabelle 22: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**51**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(51)	Säule A, Grad. 3: 23.37 min	C ₃₁₀ H ₄₄₇ N ₈₉ O ₉₂ S ₆	M _{ber.} : 7084.9 M _{gef.} : 7084.4	HPLC: 22.9 %

NH₂-CVNITIKQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQA-
YYDGRRS-CONH₂ (**52**)

Harz: NovaSyn® TGR, 0.1 mmol

Harzmenge: 435 mg

Harzbelegung: 0.23 mmol/g

Tabelle 23: Synthesedaten für das Peptid (**52**).

Cycle	Aminosäure	Chemie	Modul
1	-	Wash	ecD
2	Ser 231	Single Couple (long)	ADEFfIIICd
3-19	Arg 230-Cys 214	Single Couple (long)	BbADEFfIIICd
20-54	Met 213-Cys 179	Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
55	-	Final Deprotection	BbIDc

Harzabspaltung (52**):** 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TIS (3 h)

Tabelle 24: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**52**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(52)	Säule A, Grad. 3: 23.41 min	C ₂₆₃ H ₄₂₆ N ₇₆ O ₈₉ S ₄	M _{ber.} : 6205.0 M _{gef.} : 6204.9	HPLC: 26.4 %

Ligationsreaktion

0.02 μ mol des Peptids (**51**) und 0.1 μ mol des Peptids (**52**) wurden in einem Eppendorf-Cap in 100 μ l mit Argon entgastem Ligationspuffer A (6 M GnHCl-Puffer, 0.1 M Na₃PO₄, pH 7.5) oder B (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 7.5) gelöst und mit 5 % Thiophenol (v/v) bzw. 5 % MESNA (w/v) sowie mit 0.4 μ mol TCEP versetzt. Die Reaktionsansätze wurden 1 h geschüttelt (Emulsifikation von Thiophenol, Aktivesterbildung) und anschließend 2 d unter gelegentlichem Schütteln der Proben mit einem Heizblock auf 37 °C erwärmt. Die Lösung wurde mit 0.1 % TFA in H₂O gequentscht und lyophilisiert. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit Centricon YM-3-Röhrchen (3000 Nominal Molecular Weight Limit, MILLIPORE) entsalzt und erneut lyophilisiert.

SDS-Polyacrylamidgele

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach einer Vorschrift von Schägger und von Jagow [172] in Form von Minigelen (70 mm x 80 mm, Dicke 1.5 mm) folgendermaßen hergestellt:

Tabelle 25: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow [172].

Lösungen	Trenngel	Spacer-Gel	Sammelgel
48 % (w/v) Acrylamid	6.1 ml	3.1 ml	1 ml
1.5 % (w/v) Bisacrylamid			
Gelpuffer	10 ml	5 ml	3.1 ml
Glycerin	4 g	-	-
Auffüllen mit H ₂ O auf:	30 ml	15 ml	12.5 ml
10 % Ammoniumperoxo- disulfat	150 μ l	75 μ l	75 μ l
N,N,N',N'-Tetramethylen- diamin	15 μ l	7.5 μ l	7.5 μ l

Die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid in H₂O entsprechen einer Gesamtkonzentration **T** beider Monomere von 49.5 % und einer Konzentration **C** des Crosslinkers im Verhältnis zur Gesamtkonzentration von 3 %. Das Trenngel und Spacer-Gel setzen sich demnach aus 10 % T und 3 % C, das Sammelgel aus 4 % T und 3 % C zusammen.

Als Anodenpuffer wurde eine aus 0.2 M Tris-HCl, pH 8.9, bestehende Lösung, als Kathodenpuffer eine Lösung aus 0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 0.1 % SDS (w/v), pH 8.25, und als Gelpuffer eine Lösung aus 3 M Tris-HCl, 0.3 % SDS (w/v), pH 8.45, verwendet. Von den Proteinproben (1 μ g/ μ l) wurden 1 bis 5 μ l auf 20 μ l mit H₂O aufgefüllt und mit 10 μ l Probenpuffer (4 % SDS (w/v), 12 % Glycerol (w/v), 50 mM Tris, 2 % Mercaptoethanol (v/v), 0.01 % Serva Blue G, pH 6.8, versetzt. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 90 °C wurden die Proben zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Stromstärke betrug für das Sammelgel 20-30 mA und für das Trenngel 40-60 mA. Die Gele wurden 1 h in 0.25 % Coomassie Blue G250-Lösung in 50 % Methanol, 7.5 % Essigsäure und 42.25 % Wasser angefärbt und über Nacht in 20 % Methanol, 7.5 % Essigsäure und 72.5 % Wasser entfärbt.

9.7.3 Synthese des N-glycosylierten Fragments SHA Pr179-231

NH₂-CVN(GlcNAc)ITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQY-
QKESQAYYDGRRS-CONH₂ (**53**)

Harz: NovaSyn® TGR, 0.1 mmol/20 μ mol

Harzmenge: 435 mg/87 mg

Harzbelegung: 0.23 mmol/g

Kupplungsreagenzien: AS 231-198 HBTU, AS 197-179 HATU

Tabelle 26: Synthesedaten für das Glycopeptid (**53**).

Cycle	Aminosäure	Chemie	Modul
1	-	Wash	ecD
2	Ser 231	Single Couple (long)	ADEFfIIICd
3-19	Arg 230-Cys 214	Single Couple (long)	BbADEFfIIICd
20-51	Met 213-Ile 182	Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
52	Asn 181	Single Couple (long)	BbADEFfIIICd
53-54	Val 180-Cys 179	Cond Double Couple/Cap	BbADEFfiafCd
55	-	Final Deprotection	BbIDc

Harzabspaltung: 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TIS (3 h)

Tabelle 27: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Glycopeptid (**53**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(53)	Säule A, Grad. 5: 32.11 min	C ₂₇₁ H ₄₃₉ N ₇₇ O ₉₄ S ₄	M _{ber.} : 6408.2 M _{gef.} : 6474.0 (+ 3 Na ⁺)	HPLC: 5.2 %
(53) [*]	Säule A, Grad. 3: 24.69 min	C ₂₇₇ H ₄₄₅ N ₇₇ O ₉₇ S ₄ -acetyliert-	M _{ber.} : 6534.3 M _{gef.} : 6603.3 (+ 3 Na ⁺)	HPLC: 44.8 %

9.7.4 Synthese der Fragmente SHA PrP179-213 und SHA PrP214-231

NH₂-CTTQYQKESQAYYDGRRS-CONH₂ (**54**)

Tabelle 28: Synthesedaten für das Peptid (**54**).

Harz	Harzmenge/ -belegung	Synthesizer 9050 (Perkin Elmer)	Fmoc-Abspaltung
NovaSyn® TGR	435 mg 0.23 mmol/g	10 eq. Aminosäure 11 eq. DIC 15 eq. HOBt	20 % Piperidin in DMF

Harzabspaltung (54): 91 % TFA, 3 % EDT, 3 % H₂O, 3 % TIS (3 h)

Tabelle 29: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**54**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(54)	Säule A, Grad. 1: 14.06 min	C ₉₁ H ₁₃₈ N ₂₈ O ₃₃ S	M _{ber.} : 2184.3 M _{gef.} : 2183.8	HPLC: 98 %

NH₂-C(Acm)VNITIKQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQM-
OS((CH)₂)₂CONH₂ (**55**)

Harz: MBHA belegt mit Boc-Met

Harzmenge: 0.4 g

Harzbelegung: 0.25 mmol/g

Tabelle 30: Synthesedaten für das Peptid (**55**).

Cycle	Aminosäure	Chemie	Modul
1	-	Wash	Dc
2-36	Met 213-Cys 179	Double Couple/Cap	<i>bcd</i> ADEIADEFCD
37	-	Final Deprotection	<i>bcdc</i>

Harzabspaltung (55**):** 80 % TFA, 10 % TFMSA , 5 % Thioanisol, 5 % EDT
(2 h)

Tabelle 31: HPLC- und ESI-/MALDI-MS-Analytik für das Peptid (**55**).

	Retentionszeit (HPLC)	Summenformel	MS	Ausbeute
(55)	Säule A, Grad. 3: 26.24 min	C ₁₇₈ H ₂₉₉ N ₄₉ O ₅₉ S ₄	M _{ber.} : 4197.9 M _{gef.} : 4200.9	HPLC: 17 %

9.8 Pulsprogramme

a) NOESY mit WATERGATE-Unterdrückung

```
;mirkoh2onoesy
```

```
;aus noesyfrsstw
```

```
;phase sensitive using States-TPPI method
```

```
;water suppression using watergate sequence
```

```
;using flip-back pulse
```

```
;with radiation damping suppression using gradients in t1
```

```
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2,
```

```
;661-666 (1992)
```

```
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson. A102,
```

```
241-245 (1993)
```

```
;G. Lippens, C. Dhalluin & J.-M. Wieruszski, J. Biomol. NMR 5,
```

```
;327-331 (1995)
```

```
;V. Sklenar, J. Magn. Reson. A114, 132-135 (1995)
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
;d0=27.6u'
```

```
'' d0=39.55u''
```

```
'' d11=30m''
```

```
'' d12=20u''
```

```
'' d19=95u''
```

```
'' d8=300m''
```

```
;Delta=d8-p19-d16-p9-d12-54u''
```

```
'' Delta=d8-p19-d16-d12-54u''
```

```
'' 13=(td1/2)''
```

```
1 ze
```

2 d1
3m
3 d11
4 d12 p11:f1
p1 ph1
2 u:nggrad
d0
2 u:nggrad
p1 ph2
Delta
50u UNBLKGRAD
GRADIENT2 (cnst22)
d16 p10:f1
; (p27:sp11 ph3):f1
; (p9 ph3):f1
4u
d12 p11:f1
p1 ph4
50u
GRADIENT(cnst23)
d16 p118:f1
p28*0.231 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*1.462 ph6
d19*2

p28*0.692 ph6
d19*2
p0*0.231 ph6
46u
GRADIENT(const23)
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 zd
3m ip1
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=2 2 0 0 1 1 3 3
ph4=0 0 2 2 3 3 1 1
ph5=0
ph6=2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
;p10: 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 90 degree
;sp11: f1 channel - shaped pulse 90 degree
;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse

;p27: f1 channel - 90 degree shaped pulse
;d0: incremented delay (2D) [3 usec]
;d1: relaxation delay; 1-5 * T1
;d8: mixing time
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: $1/(2 * SW) = DW$
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;use gradient programm (GRDPROG): Noesyfprs
;use gradient ratio: cnst21: cnst22 : cnst23
 2 : 50 : 30

b) TOCSY mit WATERGATE-Unterdrückung

;mirkoh2otocsy
;aus noesyfprsstwg
;phase sensitive using States-TPPI method
;water suppression using watergate sequence
;with radiation damping suppression using gradients in t1
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2,
;661-666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek , J. Magn. Reson. A102,
241-245 (1993)
;V. Sklenar, j. Magn. Reson. A114, 132-135 (1995)

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
;d0=27.6u´´
´´ d0=39.55u´´
´´ d11=30m´´
´´ d12=20u´´
´´ d19=95u´´
´´ 13=(td1/2)´´
1ze
2 d1
3m
3 d11
4 d12 p11:f1
p1 ph1
2u:ngrad
d0
2u:ngrad
d0
2u:ngrad
p1 ph2
50u UNBLKGRAD
GRADIENT2 (cnst22)
d16 p110:f1
5p6*3.556 ph23
4u
p6*4.556 ph25
4u
p6*3.222 ph23
```

4u

p6*3.167 ph25

4u

p6*0.333 ph23

4u

p6*2.722 ph25

4u

p6*4.167 ph23

4u

p6*2.944 ph25

4u

p6*4.111 ph23

4u

p6*3.556 ph25

4u

p6*4.556 ph23

4u

p6*3.222 ph25

4u

p6*3.167 ph23

4u

p6* 0.333 ph25

4u

p6*2.722 ph23

4u

p6*4.167 ph25

4u

p6*2.944 ph23

4u

p6*4.111 ph25

4u

p6*3.556 ph25

4u

p6*4.556 ph25

4u

p6*3.222 ph25

4u

p6*3.167 ph23

4u

p6*0.333 ph25

4u

p6*2.722 ph23

4u

p6*4.167 ph25

4u

p6*2.944 ph23

4u

p6*4.111 ph25

4u

p6*3.556 ph23

4u

p6*4.556 ph25

4u

p6*3.222 ph23

4u

p6*3.167 ph25

4u

p6*0.333 ph23

4u

p6*2.722 ph25

4u

p6*4.167 ph23

4u

p6*2.944 ph25

4u

p6*4.111 ph23

4u

lo to 5 times 11 ;((p6*115.112+144u) * 11) = mixing time

50u

GRADIENT3 (cnst23)

d16 p11:f1

p1 ph4

50u

GRADIENT (cnst24)

d16 p118:f1

p28*0.231 ph5

d19*2

p28*0.692 ph5

d19*2

p28*1.462 ph5

d19*2

p28*1.462 ph6

d19*2

p28*0.692 ph6

d19*2

p0*0.231 ph6

46u

GRADIENT(const24)
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 zd
3m ip1
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0 0 2 2 3 3 1 1
ph5=0
ph6=2
ph23=3
ph25=1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
;p10: 120dB
;p11: f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree
;sp11: f1 channel - shaped pulse 90 degree
;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree shaped pulse
;d0: incremented delay (2D) [3 usec]

```
;d1: relaxation delay; 1-5 * T1
;d8: mixing time
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l1: loop for DIPSI cycle:((p6*115.112) * 11) = mixing time
;l13: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: 13 = td1/2
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;use gradient programm (GRDPROG) :Noesyfprs
;use gradient ratio: cnst21 : cnst22 : cnst23
                2 :    50 :    30
```

Literatur

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Europ. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37
- [2] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 977
- [3] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry* **1970**, 9, 3471
- [4] O. Seitz, *CHEMBIOCHEM* **2000**, 1, 214-246
- [5] P. M. Rudd, R. J. Woods, M. R. Wormald, G. Opdenakker, A. K. Downing, I. D. Campbell, R. A. Dwek, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1248, 1-10
- [6] R.A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720
- [7] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1-27
- [8] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130
- [9] K.-A. Karlsson, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 265-272
- [10] L. Urge, D. C. Jackson, L. Gorbics, K. Wroblewski, G. Graczyk, L. Otvos, Jr., *Tetrahedron* **1994**, 50, 2373-2390
- [11] S. E. O' Connor, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2295-2296
- [12] S. E. O' Connor, B. Imperiali, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 427-437
- [13] D. H. Live, R. A. Kumar, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 12759-12761
- [14] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1992**, Vol. 25, No. 12, 545-552
- [15] P. G. Schultz, V. W. Cornish, D. Mendel, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 677-690
- [16] J. E. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods in Enzymology* **1991**, 202, 301-336

- [17] S. Chladek, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 377-398
- [18] R. C. Payne, B. P. Nicholy, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1987**, 26, 3197-3205
- [19] T. Arslan, S. V. Mamaev, N. V. Mamaeva, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10877-10887
- [20] S. V. Mamaev, A. L. Laikhter, T. Arslan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7243-7244
- [21] Dissertation K. Michael, Technische Universität München **1996**
- [22] S. A. Robertson, C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acid Research* **1989**, 17, 23, 9649-9660
- [23] R. Xu, B. Ayers, D. Cowburn, T. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 388-393
- [24] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chemistry and Biology* **1999**, 6, 247-256
- [25] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779
- [26] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 19, 4325-4329
- [27] M. Mizuno, K. Haneda, R. Iguchi, I. Muramoto, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Yamamoto, T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 284-290
- [28] Y. Sin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11684-11689
- [29] B. Elshorst, M. Hennig, H. Försterling, A. Diener, M. Maurer, P. Schulte, H. Schwalbe, C. Griesinger, J. Krebs, H. Schmid, T. Vorherr, E. Carafoli, *Biochemistry* **1999**, 38, 12320-12332
- [30] H.-D. Jakubke, Peptide, Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**

- [31] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim **2000**
- [32] R. A. Dwek, *Biochem. Soc. Trans.* **1994**, 23, 1
- [33] B. Imperiali, T. L. Hendrickson, *Bioorganic & Medical Chemistry* **1995**, 3(12), 1565-1578
- [34] E. Bause, W. Breuner, S. Peter, *Biochem. J.* **1995**, 331, 639-644
- [35] D. D. Pless, W. J. Lennarz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, 74, 134-138
- [36] J. Lee, J. K. Coward, *Biochemistry* **1993**, 32, 6794-6801
- [37] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631-664
- [38] S. Narasimhan, *J. Biolog. Chem.* **1982**, 257, 10235-10242
- [39] J. Frydmann, F. U. Hartl, *Science* **1996**, 272, 1497-1502
- [40] W. J. Ou, P. H. Cameron, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, *Nature* **1993**, 364, 771-776
- [41] C. Hammond, I. Braakman, A. Helenius, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 913-917
- [42] J. R. Peterson, A. Ora, P. N. Van, A. Helenius, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 1173-84
- [43] Y. Gavel, G. von Heijne, *Protein Eng.* **1990**, 3, 339-348
- [44] S. Allen, H. Y. Naim, N. J. Bulleid, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4797-4804
- [45] G. Ashwell, A. G. Morell, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1974**, 41, 99-128
- [46] W. E. Pricer, R. L. Hudgin, G. Ashwell, R. J. Stockert, A. G. Morell, *Methods Enzymol.* **1974**, 34, 688-691
- [47] L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964-969

- [48] A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 188-191
- [49] Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Baer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9283-9298
- [50] U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 359-362
- [51] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1762-1764
- [52] S. B. Prusiner, *Science* **1982**, 216, 136-144
- [53] S. B. Prusiner, *TIBS* **1998**, 13, 197-198
- [54] S. G. Chen, D. B. Teplow, P. Parchi, J. K. Teller, P. Gambetti, L. Autilio-Gambetti, *J. of Biological Chemistry* **1995**, 270, 32, 19173-19180
- [55] S. B. Prusiner, *Science* **1997**, 278, Oct, 245-251
- [56] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. **1995**, 1116-1118
- [57] H. Liu, S. Farr-Jones, N. B. Ulyanov, M. Llinas, S. Marqusee, D. Groth, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, T. L. James, *Biochemistry* **1999**, 38, 5362-5377
- [58] T. Pillot, L. Lins, M. Goethals, B. Vanloo, J. Baert, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, R. Brasseur, *Journal of Molecular Biology* **1997**, 274, 3, 381-393
- [59] N. A. Mabbott, K. L. Brown, J. Manson, M. E. Bruce, *Immunology* **1997**, 92, 2, 161-165
- [60] F. E. Cohen, K.-M. Pan, Y. Huang, M. Baldwin, R. J. Flettrick, S. B. Prusiner, *Science* **1994**, 264, 531-532
- [61] I. V. Baskakov, G. Legname, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *J. of Biological Chemistry* **2002**, 277, 21140-21148
- [62] I. V. Baskakov, G. Legname, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *J. of Biological Chemistry* **2001**, 276, 24, 19687-19690

- [63] P. M. Rudd, M. R. Wormald, D. R. Wing, S. B. Prusiner, R. A. Dwek, *Biochemistry* **2001**, 40, 3759-3766
- [64] T. W. Rademacher, *Current Opinion in Biotechnology* **1998**, 9, 74-79
- [65] V. C. Dodelet, N. R. Cashman, *Blood* **1998**, 91, 5, 1556-1561
- [66] G. S. Jackson, L. L. P. Hosszu, A. Power, A. F. Hill, J. Kenne, H. Saibil, C. J. Craven, J. P. Waltho, A. R. Clarke, J. Collinge, *Science* **1999**, 283, 1935-1937
- [67] S. J. Dearmond, Y. Qui, H. Sánchez, P. R. Spilman, A. Ninchak-Casey, D. Alosno, V. Daggett, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **1999**, 58, 9, 1000-1009
- [68] S. Lehmann, D. A. Harris, *J. Biol. Chem.* **1997**, 34, 21479-21487
- [69] J. Zuegg, J. E. Gready, *Glycobiology* **2000**, 10, 959-974
- [70] R. K. Meyer, A. Lustig, B. Oesch, R. Fatzer, A. Zurbriggen, M. Vandeveld, *J. Biol. Chem.* **2000**, 48, 38081-38087
- [71] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, 530-610
- [72] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149
- [73] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801-813
- [74] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117-133
- [75] K.-H. Altmann, M. Mutter, *Chemie in unserer Zeit* **1993**, 6, 274-286
- [76] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 161-214
- [77] K. R. Shoemaker, P. S. Kim, D. N. Brems, S. Marqusee, E. J. York, I. M. Chaiken, J. M. Stuart, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, 82, 2349-2353
- [78] Novabiochem, Catalog **2002/3**, 187-248
- [79] T. Curtius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 3226-3241

- [80] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, 36, 2094-2115
- [81] E. Wunsch, G. Wendeleberger, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 160-172
- [82] J. Meierhofer, *The Peptides* Vol. 1, 263-314; Academic Press, New York **1979**
- [83] M. Bodanzky, *The Peptides* Vol. 1, 105-196; Academic Press, New York **1979**
- [84] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068
- [85] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798
- [86] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (15), 1927-1930
- [87] K. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269
- [88] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398
- [89] S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **1948**, 176, 367-388
- [90] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 43, 595
- [91] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.* **1981**, 117, 147-57
- [92] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409
- [93] S. A. Kates, B. G. de la Torre, R. Eritja, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (7), 1033-1034
- [94] P. Lloyd-Williams, G. Jou, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (33), 4207-4210
- [95] H. Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 297-311
- [96] Novabiochem, Catalog **2002/3**, 3.1-3.38

- [97] D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 36, 255-266
- [98] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2019-2024
- [99] K. Barlos, D. Papaioannou, S. Patrianakou, T. Tsegenidis, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 1950-1955
- [100] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (14), 2237-2238
- [101] R. Dölling, M. Beyermann, J. Haenel, F. Kernchen, E. Krause, P. Franke, M. Brudel, M. Bienert, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 853-854
- [102] J. Offer, M. Quibell, T. Johnson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 175-182
- [103] L. C. Packman, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (41), 7523-7526
- [104] M. Quibell, D. Owen, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2343-2344
- [105] M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11656-11668
- [106] S. A. Barker, A. B. Foster, M. Stacey, J. M. Webber, *J. Chem. Soc.* **1958**, 2218-2227
- [107] J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 78-80
- [108] Dissertation A. Ratschinski, Fachbereich Chemie, Frankfurt/Main **1998**
- [109] J. Fuhrhop, G. Penzlin, *Organic Synthesis, Concepts, Methods, Starting Materials*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, **1994**
- [110] P. W. Jeanloz, H. Garg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 135
- [111] Dissertation C. Unverzagt, Fachbereich Chemie, Mainz **1988**

- [112] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10531-10537
- [113] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (15), 2279-2282
- [114] S. K. Pollitt, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 15, 2252-2253
- [115] T. Kigawa, Y. Muto, S. Yokoyama, *Journal of Biomolecular NMR* **1995**, 6, 129-134
- [116] T. Kigawa, T. Yabuki, K. Kodoma, E. Yamaguchi, M. Kainosho, S. Yokoyama, XVIIIth ICMRBS **1998**, Tokio Metropolitan University, Abstracts, Seite 5
- [117] D.-M. Kim, T. Kigawa, C.-Y. Choi, S. Yokoyama, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 881-886
- [118] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6333-6335
- [119] S. A. Robertson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2722-2729
- [120] http://biochem.roche.com/rts/literature_main.htm
- [121] Dissertation Matthias Hoffmann, Technische Universität München **1996**
- [122] J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, Vol. 51, 311-332
- [123] Dissertation S. W. Vetter, ETH Zürich **1998**
- [124] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8669-8672
- [125] S. Aimoto, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, Vol. 51, 247-265
- [126] P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevens, *Science* **1990**, 250, 651

- [127] R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 6726
- [128] F. B. Perler, *Cell* **1998**, 92, 1
- [129] V. Derbyshire, D. W. Wood, W. Wu, J. T. Dansereau, J. Z. Daalgard, M. Belfort, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94, 11466
- [130] T. Klabunde, S. Sharma, A. Telenti, W. R. Jacobs, J. C. Sachettini, *Nature Struct. Biol.* **1998**, 5, 31
- [131] Y. Shao, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 187
- [132] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458
- [133] M. W. Southworth, E. Adam, D. Panne, R. Byer, R. Kautz, F. B. Perler, *EMBO J.* **1998**, 17, 918
- [134] T. C. Evans, Jr., M.-Q. Xu, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, Vol. 51, 333-342
- [135] B. Ayers, U. K. Blaschke, J. A. Camarero, G. J. Cotton, M. Holford, T. W. Muir, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, Vol. 51, 343-354
- [136] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag **1998**, 959-977
- [137] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528
- [138] Diplomarbeit B. Baumann, Fachhochschule Bayreuth, **1995**
- [139] J. Jeener, B. H. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553
- [140] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, **1986**
- [141] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson., Series A* **1993**, 102, 241-248

- [142] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 311-333
- [143] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, 31, 1647-1651
- [144] G. Merutka, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. of Biomolecular NMR* **1995**, 5, 14-24
- [145] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R.S. Hodges, B.S. Sykes, *J. of Biomolecular NMR* **1995**, 5, 67-81
- [146] M. A. Jimenez, F. B. Blanco, M. Rico, J. Santoro, J. Herranz, J. Nieto, *Europ. J. Biochem.* **1992**, 207, 39-49
- [147] I. D. Kuntz, P. A. Kosen, E. C. Craig, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1406-1408
- [148] F. J. Blanco, J. Herranz, C. Gonzalez, M. A. Jimenez, M. Rico, J. Santoro, J. L. Nieto, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9676-9677
- [149] R. W. Woody, *The Peptides* Vol. 7, 16-104, Academic Press, New York, **1985**
- [150] W. C. Johnson, Jr., *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1990**, 7, 205-214
- [151] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, **1996**
- [152] T. E. Creighton, *Protein Structure, A Practical Approach*, Oxford University Press, **1988**
- [153] Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry* **1974**, 13, 3350-3359
- [154] C. A. Bush, A. Duben, S. Ralapati, *Biochemistry* **1980**, 19, 501-504
- [155] S. Marqusee, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 8898-902

- [156] S. Marqusee, V. H. Robbins, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86, 5286-5290
- [157] C. A. Rohl, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1994**, 33, 7760-7767
- [158] B. M. Huyghues-Despointes, T. M. Klingler, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1995**, 34, 13267-13271
- [159] H. J. Dyson, M. Rance, R. A. Houghten, P. E. Wright, R. A. Lerner, *J. Mol. Biol.* **1988**, 201, 201
- [160] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, 8, 4108-4116
- [161] <http://circuit.neb.com/neb/faqs/impact2.htm>
- [162] Antrag von Dr. S. Becker an die Bezirksregierung Braunschweig zur "Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit einem Prionprotein", **08/2000**
- [163] S. Hornemann, R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.* **1996**, 262, 614-619
- [164] S. Liemann, R. Glockshuber, *Biochemistry* **1999**, 38, 3258-3267
- [165] D. Völkel, W. Blankenfeldt, D. Schomburg, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 251, 462-471
- [166] C. J. Bosques, V. W.-F. Tai, B. Imperiali, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7207-10
- [167] T. Kawakami, K. Hasegawa, K. Teruya, K. Akaji, M. Horiuchi, F. Inagaki, Y. Kurihara, S. Uesugi, S. Aimoto, *Journal of Peptide Science* **2001**, 7, 474-487
- [168] S. Schwarzingler, G. J. A. Kroon, T. R. Foss, P. E. Wright, H. J. Dyson, *J. Biomol. NMR* **2000**, 18, 43-48
- [169] A. Bax, M. Ikera, L. E. Kay, G. Zhu, *J. Magn. Reson.* **1991**, 91, 174-178
- [170] Diplomarbeit D. Belik, Fachbereich Chemie, Frankfurt/Main **1993**
- [171] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 4158
- [172] H. Schägger, G. von Jagow, *Analytical Biochemistry* **1987**, 166, 368-379

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bock, Prof. Dr. B. Brutschy, Prof. Dr. F. J. Comes, Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J. W. Engels, Prof. Dr. H. Fasold, Prof. Dr. K. H. Gericke, Prof. Dr. S. Glaser, Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. W. Grill, Prof. Dr. A. S. K. Hashmi, Prof. Dr. K. Hensen, Prof. Dr. C. Jochum, Prof. Dr. M. Karas, Prof. Dr. G. Kohlmaier, Prof. Dr. B. Kolbesen, Prof. Dr. G. Lambrecht, Prof. Dr. B. Lüthi, Prof. Dr. W. Martiensen, Prof. Dr. W. E. Müller, Prof. Dr. J. Mulzer, Prof. Dr. E. Mutschler, Prof. Dr. M. Reggelin, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. E. A. Reinsch, Prof. Dr. R. Schlögl, Prof. Dr. G. Schmalzing, Prof. Dr. H. Schmidt-Böcking, Prof. Dr. F. Schüth, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. M. Trömel.

Persönliche Daten

Name	Kristina Münnich
Wohnort	Wallstr. 76 61440 Oberursel
Email	kristina.muennich@gmx.de
Geburtsdatum	04.08.1974
Geburtsort	Bad Homburg v. d. H.
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schule und Studium

08/1986 – 06/1993	Christian–Wirth–Schule, Gymnasium in Usingen, Abitur sehr gut (1.4)
10/1993 – 06/1998	Chemiestudium an der Johann Wolfgang Goethe–Universität in Frankfurt am Main
10/1993 – 10/1995	Grundstudium (Vordiplom sehr gut (1.0))
10/1995 – 10/1997	Hauptstudium
11/1997 – 06/1998	Diplomarbeit bei Prof. Dr. C. Griesinger „Beiträge zur Synthese von N-Glycoproteinen“ Note sehr gut (1.0) Diplom sehr gut (1.1)

Promotion

- Seit 08/1998 Promotion an der Johann Wolfgang Goethe–Universität
in Frankfurt am Main bei Prof. Dr. C. Griesinger
„Glycoproteinsynthese und Strukturaufklärung“
- 10/1998 – 03/2000 Graduiertenkolleg „Chemische und biologische Syn-
these von Wirkstoffen“
- 01/1999 – 12/2000 Finanzielle Unterstützung als Stipendiatin des Fonds
der Chemischen Industrie
- Seit 10/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut
für Biophysikalische Chemie in Göttingen

Praktikum

- 02/1997 – 04/1997 Praktikum bei der Hoechst Aktiengesellschaft, Abtei-
lung Synthetika Nord, Thema: „Analytisches Arbei-
ten mit der Kapillarelektrophorese“

Konferenzen

- 08/2000 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg
- 09/2000 26th European Peptide Symposium, Montpellier, Frank-
reich
- 06/2001 2nd International Peptide Symposium, San Diego, USA

Die vorliegende Arbeit wurde nach den vor der Rechtschreibreform (01.08.1998) geltenden Richtlinien zur Rechtschreibung erstellt. Anstelle des Dezimalkommas wurde in der Arbeit der Punkt verwendet.

Der Satz der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung des Makropakets $\text{\LaTeX}2\text{e}$ mit \TeX Version 3.14159 erstellt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Frankfurt, den.....

.....