

Kombinatorische Synthese von niedermolekularen
RNA-Liganden

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von

Michael Baumann

aus

Düsseldorf

Frankfurt am Main
Juni 2000

(DF 1)

vom Fachbereich Chemie (14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. T. Prisner
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Griesinger
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. J. W. Engels

Tag der Disputation:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis Juni 2000 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Griesinger am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Griesinger danke ich für die Überlassung des sehr interessanten und anspruchsvollen Themas, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten, die stete Diskussionsbereitschaft und das Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie zahlreiche Anregungen.

Meinen Laborkollegen Herrn Michael Assmann, Herrn Dr. Christan Albrecht, Herrn Dierk Blechschmidt, Herrn Christian Hoffmann und Herrn Dirk Bockelmann möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit, sowie die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt den Damen von der HPLC-Abteilung: Frau Elke Stirnal für die Durchführung von vielen, anspruchsvollen Trennungen und Frau Ellen Lichte für ihren unermüdlichen und engagierten Einsatz bei der Durchführung von Aminosäureanalysen.

Für die sehr gute und ergebnisreiche Kooperation mit dem Team aus dem Georg-Speyer-Haus möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Ursula Dietrich und Herrn Christoph Koenigs.

Dank gebührt auch Dr. Klaus-Dieter Bremm, Dr. Hilmar Bischoff, Dr. Delf Schmidt und Dr. Zühlsdorf und Ihren Mitarbeitern von der Bayer AG für die CETP-Inhibierungstests.

Den Systemadministratoren Herrn Jochen Junker, Peter Gröschke, Herrn Christian Richter und Herrn Wolfgang Peti danke ich für die gute Organisation des PC/UNIX-Netzwerks und die stete Hilfsbereitschaft bei DV-Problemen aller Art.

Für die Einführung und stetige Unterstützung bei der Nutzung der im Arbeitskreis vorhandenen NMR-Spektrometern danke ich Herrn Christian Richter, Herrn Bernard Geierstanger und Herrn Wolfgang Peti.

Für die Aufnahme von Routine-NMR-Spektren danke ich Herrn Zimmermann und sowie seinen Mitarbeitern.

Meiner Familie, möchte ich für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung danken.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und dem professionellen Umfeld.

Auf dem Titelblatt sind die mit einem biotinylierten Peptid inkubierte humane Makrophagen abgebildet, welche mit einem Streptavidin/Farbstoff-Konjugat angefärbt worden sind. Die Zellen sind mit einem Immunfluoreszenzmikroskop fotografiert worden. Die Aufnahme und Anreicherung des Peptides in die Zellen ist deutlich zu erkennen.

Meinen Eltern und meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis **I**

Verwendete Abkürzungen V

1 Einleitung **1**

1.1 RNA als Targetmolekül zur Wirkstoffsuche	1
1.2 CETP und der Fettstoffwechsel	2
1.3 Δ TAR-RNA und HIV/AIDS	6
1.4 Festphasen-Peptidsynthese	11
1.4.1 Die Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield	11
1.4.1.1 Polymere Träger und Linker	14
1.4.1.2 Die Aktivierungsmethoden	16
1.4.1.3 Die Schutzgruppentechnik	19
1.4.1.4 Die Entschützungsverfahren	22
1.4.1.5 Synthesekontrolle und Syntheseschwierigkeiten	24
1.4.1.6 Optimierung der Synthesekontrollen	28
1.4.2 Automatisierung der Peptidsynthese	31
1.5 Kombinatorische Peptidchemie	33
1.6 Phage Display	37
1.7 RNA-Struktur und Synthese	44
1.8 NMR-Spektroskopie an Biomolekülen	47
1.9 Aufgabenstellung	50

2 Synthetischer Teil **51**

2.1 Synthesen der Peptide und Peptid-Bibliotheken	51
2.2 Synthesen der RNA-Oligonukleotide	52
2.2.1 Optimierung der T7-Transkriptionsreaktion	52
2.2.2 Aufreinigung der RNA für NMR-Proben	64

<i>3 Durchführung der Screening-Methoden</i>	71
3.1 Gel-shift Screening	71
3.1.2 Die Peptidbibliothek Lib1	73
3.1.2 Die Peptidbibliothek Lib2	77
3.2 Phage Display	82
<i>4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden</i>	89
4.1 CD-Messungen	89
4.2 UV-Messungen	99
4.3 Gelelektrophorese	101
4.4 NMR-Spektroskopie	106
4.4.1 Schmelzverhalten	106
4.4.2 Bindungsstudien	107
<i>5 Durchführung der "in vitro" und "in vivo"-Tests</i>	115
5.1 Zell-Internalisierungs Tests	115
5.2 HIV-1 Inhibition	119
5.3 Hemmung der CETP-Expression	121
<i>6 Zusammenfassung</i>	125
<i>7 Experimentelle Daten</i>	127
7.1 Generelle Methoden	127
7.1.1 Silylierung von Glasgeräten	127
7.1.2 Veresterung des Harzes mit der ersten Aminosäure	127
7.1.3 Bestimmung der Harzbelegung (quant. Kaiser + quant. Fmoc)	128
7.1.4 Der Kaiser-Test	129

7.1.5 Bromphenolblau als Kupplungsindikator	130
7.2 Synthesen der Peptide-Bibliotheken	131
7.2.1 Lib1	131
7.2.2 Lib2	136
7.2.3 Lib KK	140
7.2.4 Lib YK	144
7.3 Synthesen der linearen Peptide	149
7.3.1 CETP1	150
7.3.2 P-CETP1	153
7.3.3 Penetratin	156
7.3.4 TAR1	158
7.3.5 B-TAR1	161
7.3.6 B-P-TAR1	163
7.3.7 TAR2	166
7.3.8 B-TAR2	169
7.3.9 B-P-TAR2	171
7.3.10 B-Penetratin	173
7.3.11 Biotin- β A β A	176
7.3.12 Tat10	179
7.3.13 Acridin- β A-CETP1	182
7.3.14 Acridin- β A β A-CETP1	184
7.3.15 Peptide des Phage Displays	188
7.3.16 TAR3g3p	190
7.4 PEGylierung linearer Peptide	193
7.5 Synthese der RNA-Oligonukleotide	195
7.5.1 Δ TAR-RNA	195
7.5.2 CETP-RNA	197
7.5.3 5'-OH-CETP-RNA	199
7.5.4 5'- ³² P-CETP-RNA	200

<i>8 Anhang</i>	201
8.1 Akademische Lehrer	201
8.2 Verwendete Geräte und Materialien	202
8.3 Liste der synthetisierten NMR-Proben	207
8.4 Literaturverzeichnis	211
Lebenslauf	216
Eidesstattliche Versicherung	217

Verwendete Abkürzungen

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

A	Adenin
T	Thymin
U	Uracil
G	Guanin
C	Cytidin

Ac	Acetyl
ACAT	Acetyl-CoA cholesterol acyl transferase
ACN	Acetonitril

AcOH	Essigsäure
AIDS	Acquired immuno deficiency syndrome
ANP	Atrial nautreic peptide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AZT	4'-Azido-3'-desoxythymidin
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino) -phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	Rinder Serum Albumin
Buffy-coate	Zellbestandteil des Blutes (Zentrifugat)
CETP	Cholesterol ester transfer protein
CD	Circular Dichroismus
COSY	Correlated spectroscopy
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzol
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay

ESI-MS	Elektronensprayionisation-Massenspektrum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxy-carbonyl
g3p	Gen III Protein
gp	Glycoprotein
HDL	high-density-Lipoproteine
HIV	Human immunodeficiency virus
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
IDL	intermediate-density-Lipoproteine
JR	Jump-Return
KP	Kaliumphosphat
LCAT	Lecitin cholesterol acyl transferase
LDL	low-density-Lipoproteine
LTR	Long terminal repeats
MALDI-MS	Matrix assisted laser desorption ionisation-Massenspektrum
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MHC	Major histocompatibility complex
M-Mal-PEG	O-(2-Maleimidoethyl)-O'-methyl-polyethylenglycol 5000
MS	Massenspektrum
MTBE	tert-Butylmethylether
MWG	Massenwirkungsgesetz

NLe	Norleucin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP-40	Tergitol
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
OBOP	One bead one peptide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere blutmononukleare Zellen
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polyethylenglycol
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
iPr-OH	Isopropanol
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	reverse phase-high performance liquid chromatography
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
SPPS	Solid phase peptide synthesis
3TC	2'-Desoxy-3'-thiocytidin
TAR	Transactivation response
Tat	Transactivator of transcription
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure

TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
TSPA	Trimethylsilylpropionsäure
NOESY	Nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy
UV	Ultraviolett
VLDL	very-low-density-Lipoproteine

1.1 RNA als Targetmolekül

Traditionell fokussiert sich die pharmazeutisch-chemische Industrie bei der Arzneimittelentwicklung primär auf Proteine und nicht auf Nucleinsäuren sowie im Besonderen nicht auf RNA [1]. Fortschritte auf Gebieten der RNA-Synthese [2], Strukturbestimmung und Targetidentifizierung eröffnen jedoch hier neue Möglichkeiten. Verglichen mit der Anzahl struktureller Informationen von DNA-Protein Komplexen ist über RNA-Protein Komplexe zudem nur wenig bekannt. Im Gegensatz zur DNA mit ihrer relativ invariablen, sequenzabhängigen, doppelhelikalen Struktur, bietet RNA eine große Vielfalt von Tertiärstrukturen zur Proteinerkennung.

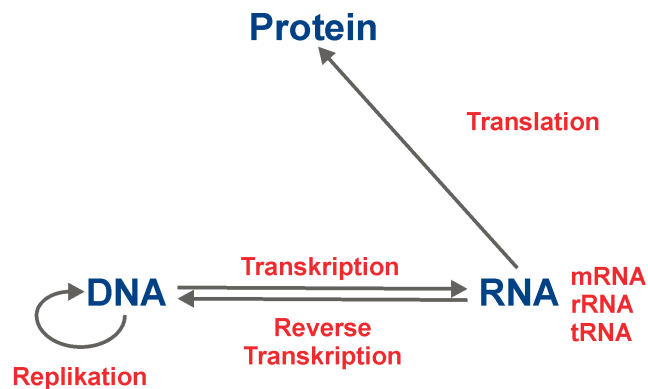


Abb. 1.1: Das zentrale Dogma der Biochemie

Die vielfältigen Eigenschaften der RNA machen sie zum attraktiven therapeutischen Targetmolekül. Sie übernimmt zahlreiche zelluläre Funktionen und eröffnet besonders als antibakterielles und antivirales Target neue Möglichkeiten. Leider sind RNA-Moleküle nur schwierig zu kristallisieren und auch die Techniken der NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von RNA sind auf relativ kurze Sequenzen beschränkt. So muß man sich bei der Strukturaufklärung und Wirkstoffsuche mit dem reduktionistischen Ansatz auf funktionell relevante RNA-Fragmente beschränken. Dennoch nimmt die Kenntnis von Struktur und Funktion der RNA weiter zu und eröffnet der mechanismus-basierenden Wirkstoffsuche neue Möglichkeiten. Der größte Teil der z.Z. zugelassenen Arzneimittel basiert auf Wechselwirkungen des Wirkstoffs mit Enzymen oder Rezeptoren. Eine ähnliche Strategie könnte auch mit Ribozymen, der katalytisch wirksamen RNA verfolgt werden. So

sind z.B. Inhibitoren der bakteriellen RNase P, einer essentiellen Endoribonuklease, eine neue potentielle Wirkstoffklasse [1]. Der Einsatz von Antisense-Oligoribonukleotiden zum Abfangen von mRNA [1a] ist bekannt. Die DNA-Tripelhelixbildung mit Anti-Gen-Oligonukleotiden zur Transkriptionsinhibierung ist beschrieben [1b]. Auch bei der reversen Transkription von RNA kann bei der Wirkstoffsuche angesetzt werden.

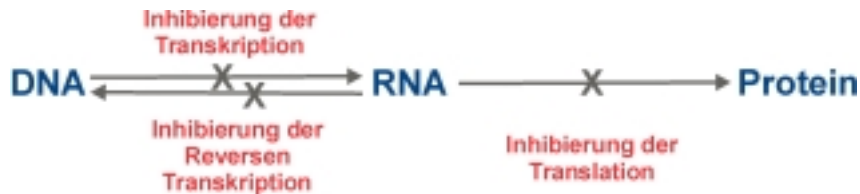


Abb. 1.2: RNA als „drug target“

In dieser Arbeit werden zwei RNA-Moleküle mit den Peptid- und Phagen-Bibliotheken gescreent. Das 23mer Oligoribonukleotid CETP-mRNA [3] und das 28mer Δ TAR-RNA [4].

1.2 Die CETP-mRNA und der Fettstoffwechsel

CETP ist das Cholesterol-Ester-Transfer-Protein. Bindungspartner der mRNA dieses Proteins stellen potentielle Inhibitoren der Translation dieses Enzyms dar und sollten dessen Expression hemmen.

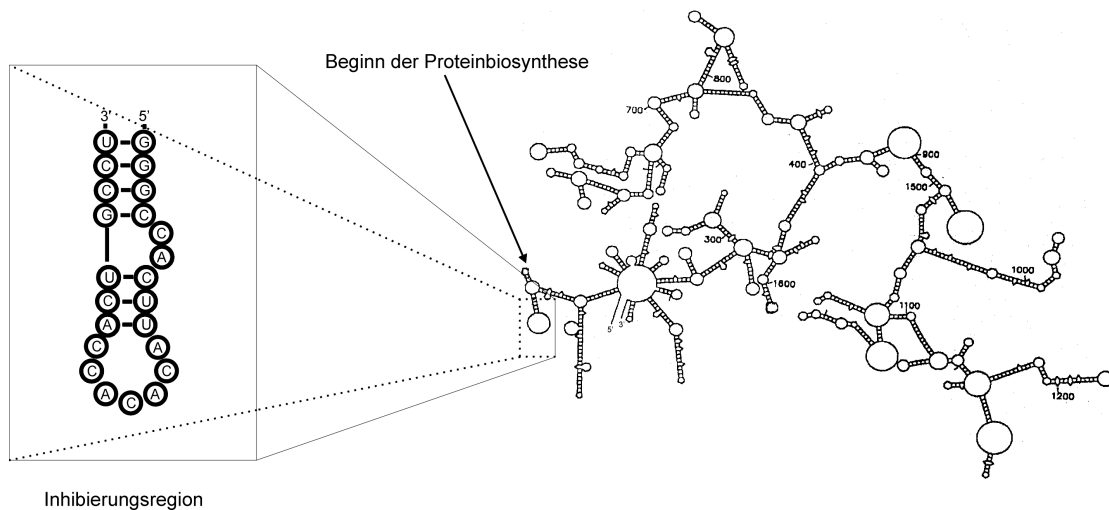


Abb. 1.3: Sekundärstrukturvorhersage der CETP-mRNA (Fa. Thomae)

23mer CETP-RNA: 5'-GGGCCACUUACACACCACUGCCU-3'

Es handelt sich bei dieser RNA-Sequenz um einen Ausschnitt der nichtcodierten 5'-Region der CETP-RNA. Im Folgenden wird dieses 23mer RNA-Oligonukleotid CETP-RNA genannt.

Hintergrund der CETP-mRNA

Ein niedriger Serumspiegel dieses Plasmaproteins hat einen verringerten Anteil der LDL/VLDL's an der Lipoprotein-Verteilung zur Folge, welches Therapiemöglichkeiten von zu hohem Cholesterinspiegel bzw. Arteriosklerose eröffnet. Ein niedriger LDL-Spiegel hat einen positiven Einfluß auf die Entstehung von Arteriosklerose. Die Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen (Hypertonie, Herzinfarkt und Schlaganfall) sind nach wie vor die Haupttodesursache der westlichen Industrieländer. Die Ursachen dieser Krankheit sind nicht vollständig bekannt, aber ein bedeutsamer Risikofaktor ist ein erhöhter Lipidblutspiegel, insbesondere ein erhöhter Cholesterinspiegel [5,6]. In den Wänden der Arterien lagern sich cholesterinreiche Materialien (Plaques) ab. Wenn diese aufbrechen, können sich Blutgerinnsel bilden, welche ein Blutgefäß verschließen können (Herzinfarkt, Schlaganfall).

Da Cholesterin, Triglyceride und andere Lipide wasserunlöslich sind, werden sie im Blutserum in der Form von Lipoproteinen transportiert. Ein Lipoprotein ist ein Partikel mit einem Kern aus hydrophoben Lipiden, welcher von einer Hülle von Apoproteinen umgeben ist. Gemäß ihrer Dichte wurden die Lipoproteine eingeteilt. Die Lipoproteine mit der geringsten Dichte, die triglycerinreichen *Chylomikronen*, bilden die größten Partikel, welche die meisten Lipide und am wenigsten Proteine beinhalten. Das andere Extremum sind die Cholesterinester-reichen *high-density-Lipoproteine (HDL)*, welche die kleinsten Partikel mit dem höchsten Anteil an Proteinen und dem kleinsten Anteil an Lipiden sind. Zwischen diesen beiden Formen lassen sich die cholesterinreichen *low-density-Lipoproteine (LDL)*, die *intermediate-density-Lipoproteine (IDL)* und die triglycerinreichen *very-low-density-Lipoproteine (VLDL)* einordnen.

1 Einleitung

	Chylomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [$\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
Durchmesser [nm]	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Protein [%]	1-2	10	18	25	33
Phospholipide [%]	7	18	22	22	29
Triglycerol [%]	83	50	31	10	8
Cholesterin und Cholestrinester [%]	8	22	29	46	30

Tab. 1.1: Einteilung der Lipoproteine [7]

Ein großer Teil der Cholesterinmenge zum Aufbau von Membranen, Hormonen und Gallensäuren wird in der Leber synthetisiert, der Rest wird mit der Nahrung aufgenommen. Von den im Darm (nach der Nahrungsaufnahme) synthetisierten Chylomikronen werden Triglyceride abgespalten. Die so entstehenden Chylomikronen-Remnants (Restpartikel) gelangen in die Leber. Das Cholesterin wird nun in Form von VLDL ins Plasma abgegeben und im ganzen Körper verteilt. Das Fett- und Muskelgewebe nimmt die durch die Lipoproteinlipase abgespaltenen Fettsäuren auf, wodurch IDL entstehen. Durch Abspaltung von Lipoprotein E geht IDL in LDL über; dieses bindet an LDL-Rezeptoren und wird von den Zellen aufgenommen [5].

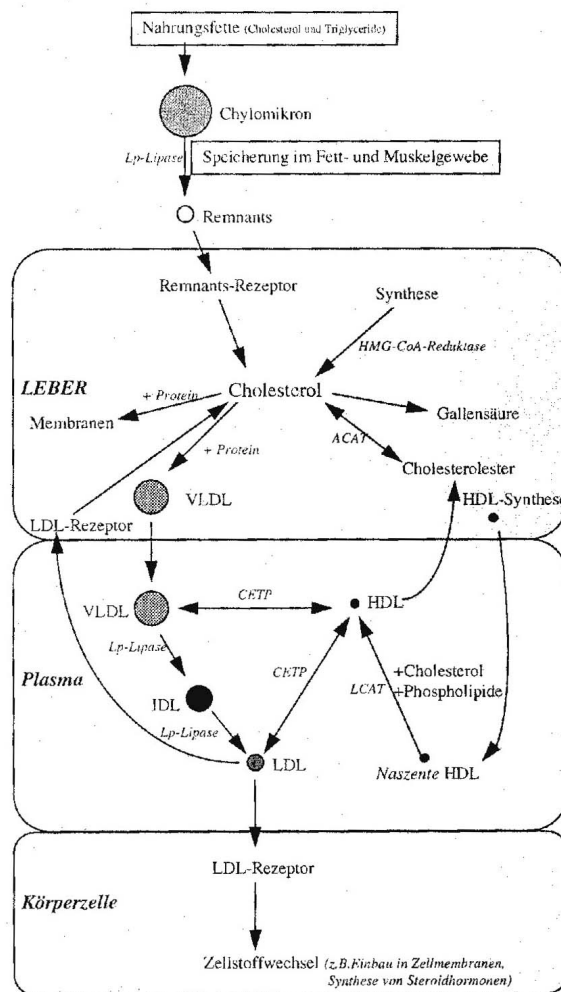


Abb. 1.4: Der Cholesterin-Stoffwechsel [7-9]

Das *Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP)* hat einen entscheidenden Einfluß auf den Metabolismus von HDL. Das HDL wird in der Leber und Darm synthetisiert; es nimmt Cholesterin auf, welches von absterbenden Zellen und abgebauten Membranen an das Blutplasma abgegeben wird; es fungiert als Cholesterinfänger. Das Cholesterin wird an der Oberfläche von HDL mittels der *Lecitin-Cholesterin-Acetyltransferase (LCAT)* verestert [7,10]. Das CETP vermittelt den Transfer von Cholesterolestern von den HDL zu den VLDL und LDL, und den Triglyceriden in der umgekehrten Richtung [9,11]. Das CETP ist ein hydrophobes Glycoprotein mit 476 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 74kD. CETP ist amphiphil; es besitzt einen hohen Gehalt (45%) an nichtpolaren Aminosäuren, ist aber trotzdem gut wasserlöslich; das bedeutet, daß die hydrophoben Gruppen nach innen

zeigen und eine hydrophobe Tasche für Cholesterolester bilden [12]. Das CETP-Gen umfaßt 16 Exons und die durch Splicen erhaltene 2.1 kbp große CETP-mRNA wird im Fettgewebe (25%), Leber (35%) und in der Milz (46%) gebildet [13]. Die CETP-mRNA ist strukturiert. Eine Hemmung des Cholesterol Ester Transfer Proteins (CETP) mit kleinen Liganden ist für die Entwicklung eines Medikaments zur Behandlung von zu hohem LDL-Spiegel sinnvoll. Eine Hemmung des Enzyms auf der RNA-Ebene, der Stufe der mRNA, würde zudem einen neuen therapeutischen Ansatz eröffnen.

1.3 Die Δ TAR-RNA und HIV/AIDS

Die basische C-terminale Region RKKRRQRRR des HIV-1 Tat, einem Regulatorproteins, bindet an einen Abschnitt (Δ TAR-RNA) der TAR-RNA mit hoher Affinität und beschränkter Spezifität [14]. Durch diese Bindung wird die HIV-Transkription stark aktiviert. Diese Aktivierung geschieht unter Zuhilfenahme von Wirtszell-Fraktoren, welche an Tat und TAR binden. Indem man die Tat/TAR-Interaktion stört, kann man eine Inhibierung der HIV-1 Replikation erreichen [15]. Somit ist die Δ TAR-RNA ein attraktives molekulares Targetmolekül.

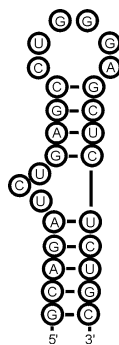


Abb. 1.5: Sekundärstruktur der Δ TAR-RNA

27mer Δ TAR-RNA: 5'-GCAGAUCUGAGCCUGGGAGCUCUCUGC-3'

Hintergrund von HIV/AIDS

Die seit Anfang der 80iger Jahre aufgetretene durch das HIV (Human-Immunschwäche-Virus) verursachte Krankheit, welche man unter dem Kürzel AIDS (Acquired immune deficiency syndrome) kennt, stellt mehr denn je eine erhebliche Bedrohung der Weltgesundheit dar. Nachdem die Krankheit erstmals in Nordamerika und Europa auftrat, befindet sich heute der größte Teil der infizierten Personen in Afrika. Im Verlauf der Krankheit wird das Immunsystem so stark geschwächt, daß der Patient z.B. an Sekundärinfektionen stirbt. In den letzten Jahren konnten durchaus Erfolge in der Therapie von AIDS erzielt werden, heilbar ist die Krankheit bisher dennoch nicht. Die entwickelte Kombinationstherapie kann die Krankheit aber stark verlangsamen. Allerdings kann aufgrund der hohen Kosten nur ein kleiner Teil der Patienten von der Therapie profitieren, z.B. in den Ländern Nordamerikas bzw. Westeuropas. In Afrika kann eine flächendeckende Therapie nicht finanziert werden, hier müssen präventive Maßnahmen ausreichen, um eine weitere Ausbreitung der Krankheit zu vermeiden.

Einen zur Bekämpfung der Pandemie unbedingt notwendigen Impfstoff hat man bis heute nicht in Aussicht, selbst ein schlüssiges Konzept zur Vakzination konnte noch nicht entwickelt werden [16]. Nach wie vor ist die einzige Möglichkeit Infizierten zu helfen, sie einer aufwendigen, teuren und nebenwirkungsreichen Therapie zu unterziehen, welche allerdings in den letzten Jahren erheblich effizienter gestaltet werden konnte. Man muß abwarten, wie sich die neuen Therapien in Langzeitstudien bewähren. Im günstigsten Fall wäre es denkbar, daß man mit einer HIV-Infektion unter permanenter Medikation ein „normal langes“ Leben leben könnte.

Die Virus-Morphologie [17-19]

Das HI-Virus ist ein kugelsymmetrisches Partikel mit einem Durchmesser von ca. 0.1 µm. Die Außenhülle besteht aus einer Doppellipidmembran. Da diese Außenhülle von infizierten Zellen stammt, trägt sie auch Proteine menschlicher Herkunft. Es sind dies die Histokompatibilitätsantigene MHC I und II, welche bei der Steuerung der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Außerdem befinden sich in der Außenhülle zahlreiche Virusproteine: das transmembrane gp41 und das Oberflächenprotein gp120 [20,21]. gp steht für Glycoprotein und bringt die Tatsache zum Ausdruck, daß Kohlenhydrate ca. 50% der Molmasse dieser Proteine ausmachen [22-25]. Die Zahlen 41 und 120 bezeichnen die

1 Einleitung

Molekulargewichte in Kilodalton. Die beiden Proteine sind nicht kovalent, sondern durch H-Brücken und hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden. Bei gp120 handelt es sich um ein globuläres, hochglykosiliertes Protein, welches aus 554 Aminosäuren aufgebaut ist und das in alternierende konservierte und variable Regionen unterteilt wird. Die dritte variable Region, meist als V3-loop bezeichnet, stellt die immunodominante Region dieses Proteins dar [26-29]. Es handelt sich beim V3-loop um ein 35 Aminosäuren langes Segment, welches N- und C-terminal durch Cysteine begrenzt ist. Die beiden Cysteine sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden.

Innerhalb des Virus-Partikels befinden sich zwei Proteinhüllen: die ebenfalls kugelsymmetrische p17-Matrix und das kegelförmige p24-Capsid. Letzteres beherbergt die wesentlichen Virusbestandteile: die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und HIV-Protease, sowie zwei RNA-Stränge. Die beiden RNA-Stränge, welche jeweils ca. 9200 Nucleotide lang sind, sind nochmals von dem p7-Nucleocapsid umhüllt. Das Genom von HIV setzt sich aus neun Genen zusammen, welche von LTRs flankiert werden. Die Tatsache, daß das genetische Material hier in Form von RNA vorliegt, klassifiziert das Virus als Retro-Virus.

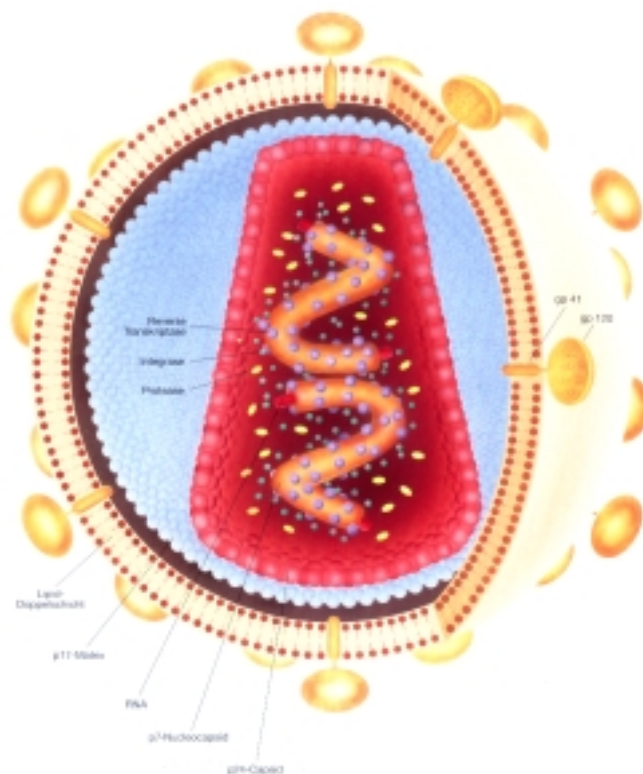


Abb. 1.6: Aufbau des Humanen Immunschwäche Virus [30].

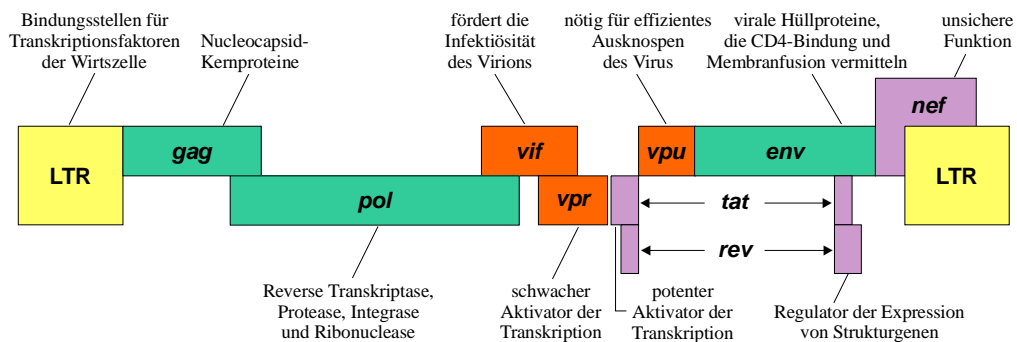


Abb. 1.7: Die Genomkarte von HIV-1 [31]

Der Virus-Replikationszyklus

Nachdem das Virus, meistens über Blut- oder Schleimhautkontakte, in den menschlichen Körper eingedrungen ist, infiziert es seine Zielzellen: $CD4^+$ T-Zellen, sogenannte T4-Helferzellen, und Makrophagen [32,33]. Um dies zu bewerkstelligen, bindet das Virus zunächst mit der C4-Domäne (vierte konstante Region) des Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor der Zielzellen. Nach dem ersten Andocken bindet eine weitere Domäne des gp120, der V3-loop, an einen Korezeptor. Hierdurch tritt eine Konformationsänderung ein, welche bewirkt, daß das transmembrane und somit hydrophobe gp41 freigesetzt wird und in die Membran der Zielzelle eindringt, was letztendlich zur Verschmelzung von Virus und Zelle führt [34, 35].

Ist das Virusmaterial auf diese Art und Weise eingedrungen, wird zunächst das in Form von RNA vorliegende Erbmaterial durch das Virus-eigene Enzym Reverse Transkriptase in einen DNA-Strang transkribiert [36]. Die RNA wird dann durch Ribonuclease abgebaut und zu dem bereits vorhandenen DNA-Strang ein komplementärer Strang gebildet. Der so entstandene DNA-Doppelstrang wird zum Zellkern transportiert und mit Hilfe des Enzyms Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert.

Wird die Zelle nun aktiviert, so entsteht durch Transkription der Virus-DNA die entsprechende Virus-mRNA, welche gespliced und zum Teil aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert wird, wo dann durch Translation in den Ribosomen der Zelle neue Virusbausteine entstehen [37]. Dabei sind die ersten Proteine die entstehen Regulatorproteine (Tat, Nef und Rev), welche an bestimmte Sequenzen der viralen RNA (z. B. TAR) binden und dadurch u. a. bewirken, daß die Transkription um das ca. 1000fache beschleunigt wird. In

einer zweiten Phase der Transkription und Translation entstehen dann die Strukturproteine und Virus-Enzyme, sowie die Virus-RNA. In dieser Phase werden auch die Membranproteine gp41 und gp120, welche von dem Vorläuferprotein gp160 abstammen, gebildet.

Nach diversen posttranslationalen Modifikationen gelangen die Virusbestandteile an den Innenrand der Zellmembran, von wo aus sie unter Mitnahme eines Teils der Zellmembran zu neuen Virionen ausknospen (Budding) [38]. Im letzten Stadium der Virusentwicklung werden dann Vorläuferproteine durch die HIV-Protease zurechtgeschnitten. Erst nach diesem „Reifungsprozess“ ist das neue Virus infektiös.

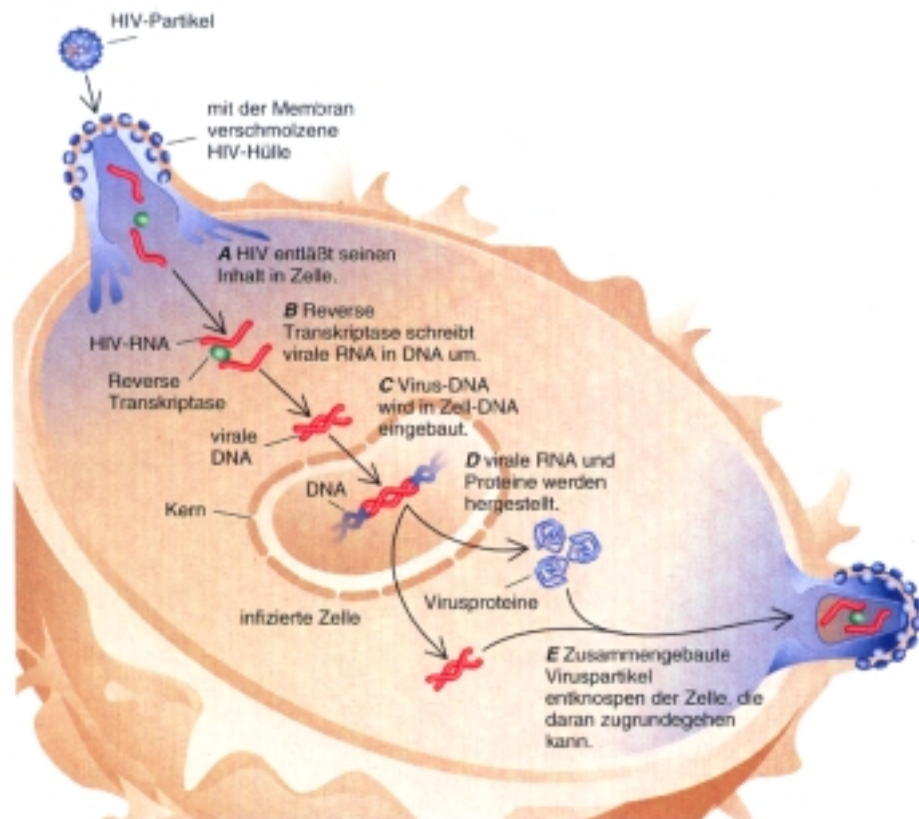


Abb. 1.8: Replikationszyklus von HIV [39]

1.4 Festphasen-Peptidsynthese

Die chemische Synthese von Peptiden wurde Anfang dieses Jahrhunderts von Emil Fischer begründet [42] und ist heute für die Untersuchung von molekularbiologischen, immunologischen und physiologischen Problemstellungen ein unentbehrliches Instrumentarium. Die Generierung von Peptiden, in denen nichtnatürliche, bzw. nicht gencodierte, aber z.B. auch Isotopen-markierte Aminosäuren vorkommen, ist mittels chemischer Peptidsynthese möglich. Ferner lassen sich maßgeschneiderte Peptidbibliotheken herstellen.

Die effizienteste, schnellste und variabelste Methode ein Peptid zu synthetisieren ist die Synthese an fester Phase.

1.4.1 Die Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield

Die konventionelle Synthese von Peptiden in Lösung birgt einen entscheidenden Nachteil in sich: Nach jedem Reaktionsschritt muß das Zwischenprodukt isoliert und aufgereinigt werden, die Ausbeuten sind selten quantitativ. Dies mag für ein Dipeptid praktikabel sein, wenn man jedoch längere Sequenzen synthetisieren möchte, so ist es ein äußerst umständliches und zeitaufwendiges Verfahren. Die Synthese von längeren Peptiden ist auf diesem Wege gar nicht möglich.

R.B. Merrifield führte 1963 die Festphasenpeptidsynthese (SPPS = Solid phase peptide synthesis) ein [43]. Die Entwicklung dieses Verfahrens beruht auf der Notwendigkeit, daß bei der Bildung der Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren die jeweils nicht an der Reaktion beteiligte Carboxy- und Aminogruppe geschützt werden muß, damit nur die eine gewünschte Peptidbindung gebildet werden kann. Wurde dies ursprünglich durch die Derivatisierung mit niedermolekularen Schutzgruppen erreicht, so war es Merrifields Innovation, die C-terminale Schutzgruppe der einen Aminosäure durch ein makromolekulares Polymer zu ersetzen. Durch die Verbindung mit dem Polymer war es nun möglich, die Trennung von Edukten und Produkten mittels einfacher Filtration zu bewerkstelligen. Es war erstmals möglich, nahezu quantitativ verlaufende Reaktionen zu erreichen und damit zu ermöglichen, längere Peptide

1 Einleitung

und kleine Proteine chemisch zu synthetisieren. Begründet liegt diese Tatsache vor allem an zwei Faktoren:

- Es können große Reagenzüberschüsse eingesetzt werden (MWG).
- Diese Überschüsse, sowie Nebenprodukte können schnell und quantitativ durch Filtration und ohne Verlust des zu synthetisierenden Peptides von ihm abgetrennt werden.

Somit hat man zudem ein Werkzeug in der Hand, unabhängig von einem biologischen Expressionssystem, ein Peptid nach seinem Bedarf zu konstruieren (z.B. unnatürliche Aminosäuren). Außerdem war es möglich geworden, die Synthese von Peptiden und Proteinen zu automatisieren. Der Syntheszyklus der SPPS beginnt mit der Knüpfung der Carboxyl-gruppe der C-terminalen Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids an den polymeren Träger. Daraufhin wird die Aminogruppe entschützt, die Carboxygruppe der zweiten Aminosäure aktiviert und dadurch die Amidbindung hergestellt. Dieser iterative Prozeß wird solange durchgeführt, bis die N-terminale Aminosäure des Peptids/Proteins angekuppelt wurde. Abschließend wird das Peptid N-terminal entschützt und/oder vom Harz abgespalten:

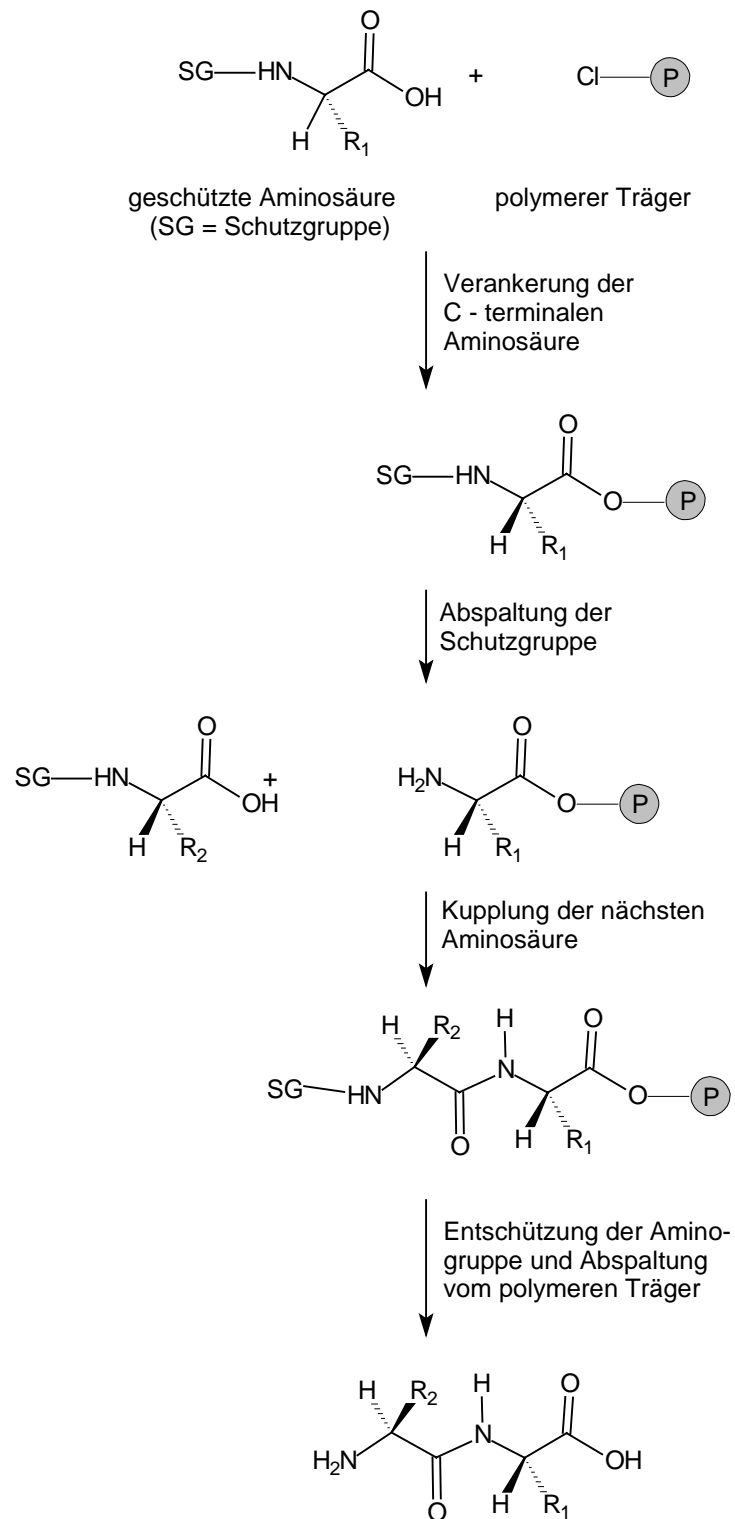


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese.

1.4.1.1 Polymere Träger und Linker

Die in der SPPS verwendeten polymeren Träger, auch als Harze bezeichnet, müssen mehreren Anforderungen gerecht werden. Sie müssen unter den Reaktionsbedingungen sowohl physikalisch, als auch chemisch resistent sein und vor allem die Diffusion von Reagenzien in ihre polymere Struktur ermöglichen. Es ist daher erforderlich, daß die Porengröße der Polymere entsprechend ist, bzw. daß sie in den Lösungsmitteln, welche für die Synthese verwendet werden, aufquellen.

Das von Merrifield entwickelte Harz erfüllt die oben genannten Bedingungen sehr gut und ist daher auch heute noch das meistverwendete. Es handelt sich um ein Kopolymer aus Polystyrol (PS), welches mit 1-2% Divinylbenzol (DVB) quervernetzt ist. Der Vernetzungsgrad wurde so gewählt, daß optimale Quellfähigkeit in Verbindung mit ausreichender Stabilität gewährleistet ist.

Weiterhin eignen sich Polyacrylamide als Trägermaterial. Sie sind etwas hydrophiler als PS. Noch hydrophiler und flexibler sind sogenannte Pfropfkopolymere: Es handelt sich dabei um einen PS-Träger, auf den Polyethylenglycol-Ketten aufgebracht sind, die im Mittel eine Masse von 3000 Da haben [44]. Dieses Harz ist sogar in Wasser quellfähig. Das kann physiologische Tests der noch am Harz gebundenen Peptide in wässriger Lösung ermöglichen (Tentagel, Fa. Rapp)

Die erste Aminosäure wird nicht direkt an den polymeren Träger geknüpft, sondern an einen auf das Harz aufzubringenden Linker (auch als spacer oder Ankergruppe bezeichnet). Dieser hat nicht nur den Zweck, das Harz zu funktionalisieren, sondern er soll die Rigidität des Harzes reduzieren und die Zugänglichkeit der wachsenden Peptidkette für Reagenzien erhöhen. Weiterhin ermöglicht der Linker eine Wahl dahingehend zu treffen, wie das C-terminale Ende des Peptids funktionalisiert werden soll: als Peptidsäure, -amid, -alkohol, -ester oder -hydrazid. Eine ebenso wichtige Eigenschaft des Linkers ist, daß durch ihn die Bedingungen, unter denen das synthetisierte Peptid abgespalten wird, bestimmt wird. So ist es z.B. möglich das Peptid mittels Trifluorethanol (TFE) oder unterschiedlich starker Säuren wie Essigsäure (AcOH), Trifluoressigsäure (TFA) oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) abzuspalten. Des Weiteren gibt es photolabile Linker und solche, bei denen die Abspaltung durch Hydrierung bewerkstelligt wird [45].

1 Einleitung

Ein oft verwendeter Linker ist der *o*-Chlortrityl-Linker [46-48]. Das Produkt wird hier als Peptidsäure abgespalten.

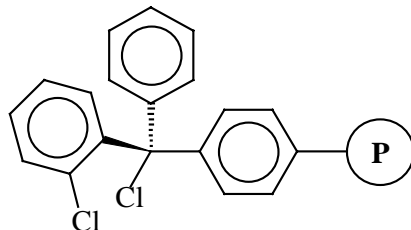


Abb. 1.10: Der *o*-Chlortrityl - Linker

Der *o*-Chlorotrityl-Linker bietet eine Reihe von günstigen Eigenschaften:

1. Es handelt sich um einen der säurelabilsten Linker, von dem sich das Peptid bereits mit AcOH/Trifluorethanol (TFE) trennen läßt. Außerdem werden die Aminosäureseitenketten durch die niedrige Acidität nicht entschützt, so daß man geschützte Fragmente erhält, welche z. B. in Fragment-Kondensationen zur Synthese von Proteinen eingesetzt werden können [49].
2. Weiterhin vermindert dieser Linker aufgrund des sterischen Anspruchs der Phenylreste die Bildung von Diketopiperazinen auf der Dipeptid-Stufe
3. Besonders vorteilhaft ist die Säurelabilität der Peptid-Linker-Bindung bei der Aufarbeitung des synthetisierten Peptids: Dadurch wird es möglich das geschützte Peptid zunächst vom Harz zu trennen und dann in einem zweiten, getrennten Schritt die Aminosäureseitenketten mittels TFA zu entschützen.
4. Das nach der Abspaltung des Peptids zurückbleibende *o*-Chlorotritylkation ist ein sehr stabiles Carbokation, welches außerdem sterisch stark abgeschirmt ist. Dies gewährleistet, daß das abgespaltene Peptid nicht durch den Linker alkyliert wird [50].
5. Der Linker ermöglicht eine racemisierungsfreie Veresterung mit der ersten Aminosäure, da die Carbonylgruppe nicht elektrophil aktiviert wird [50].

Der in diese Arbeit am meisten verwendete polymere Träger ist das Rink-Amid MBHA Harz. Um RNA-bindende Peptide zu synthetisieren ist es von Vorteil das COOH-Ende des Peptids als Amid vorliegen zu haben, was durch dieses Harz ermöglicht wird.

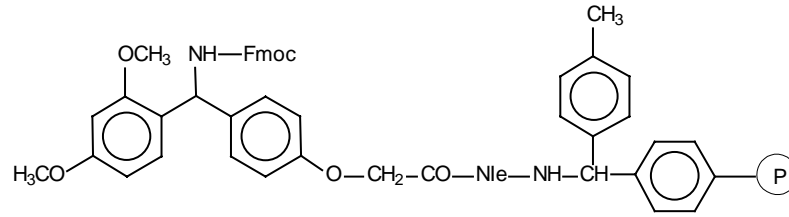


Abb. 1.11: Das Rink-Amid MBHA Harz

Vor der Synthese wird die Fmoc-Schutzgruppe des Amins abgespalten und anschließend die erste Aminosäure mit einer Peptidbindung über einen Linker an den polymeren Träger (Copolystyrol, 1% DVB) gebunden. Der Rink-Amid Linker ist über eine Norleucin-Einheit an das Aminomethyl-Polystyrol gebunden.

1.4.1.2 Die Aktivierungsmethoden

Um eine Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren zu knüpfen, muß Energie aufgewendet werden, da freie Aminosäuren, bzw. die Hydrolyse von Peptiden und Proteinen, thermodynamisch und entropisch begünstigt sind. Dementsprechend muß die Carboxylgruppe der einen Aminosäure mittels elektronenziehender Substituenten aktiviert werden, die Elektrophilie dieses Acyl-Kohlenstoffs erhöht werden. Das bei der Entstehung der Bindung frei werdende Wasser muß gebunden werden, damit das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite hin verschoben wird.

Eine der ältesten Aktivierungsmethoden von Carboxylgruppen erfolgt durch Umsetzung zum Säurechlorid, indem man z. B. eine Aminosäure mit PCl_5 oder SOCl_2 reagieren läßt. Bereits 1903 verknüpfte Emil Fischer zwei Aminosäuren anhand dieser Methode. Bedingt durch die erhebliche Überaktivierung, welche Nebenreaktionen verursacht, ist diese Methode allerdings sehr ungeeignet für die Synthese von Peptiden. Daher wurden im Laufe der Zeit eine Reihe weiterer sanfterer Möglichkeiten zur Generierung von Peptidbindungen entwickelt. Hier sind vor allem zu nennen: Die Azid-Methode nach Curtius [51], die Methode der symmetrischen [52] und gemischten Anhydride [53], die Methode der Aktivester [54], die Verwendung von Kupplungsreagenzien bzw. Carbodiimiden [55] und die enzymatische Bindungsbildung [56]. Von all diesen Methoden hat sich die Verwendung von Carbodiimiden am stärksten

1 Einleitung

durchgesetzt, da sie sehr einfach zu handhaben sind, die Reaktion *in situ* durchgeführt werden kann und die Umsetzung vergleichsweise mild verläuft, so daß sehr wenig Nebenreaktionen eintreten. Verfeinert wurde die Carbodiimid-Methode von König und Geiger, indem sie das Additiv HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol) einführten [57]. Die Aktivierung verläuft nach folgendem Reaktionschema:

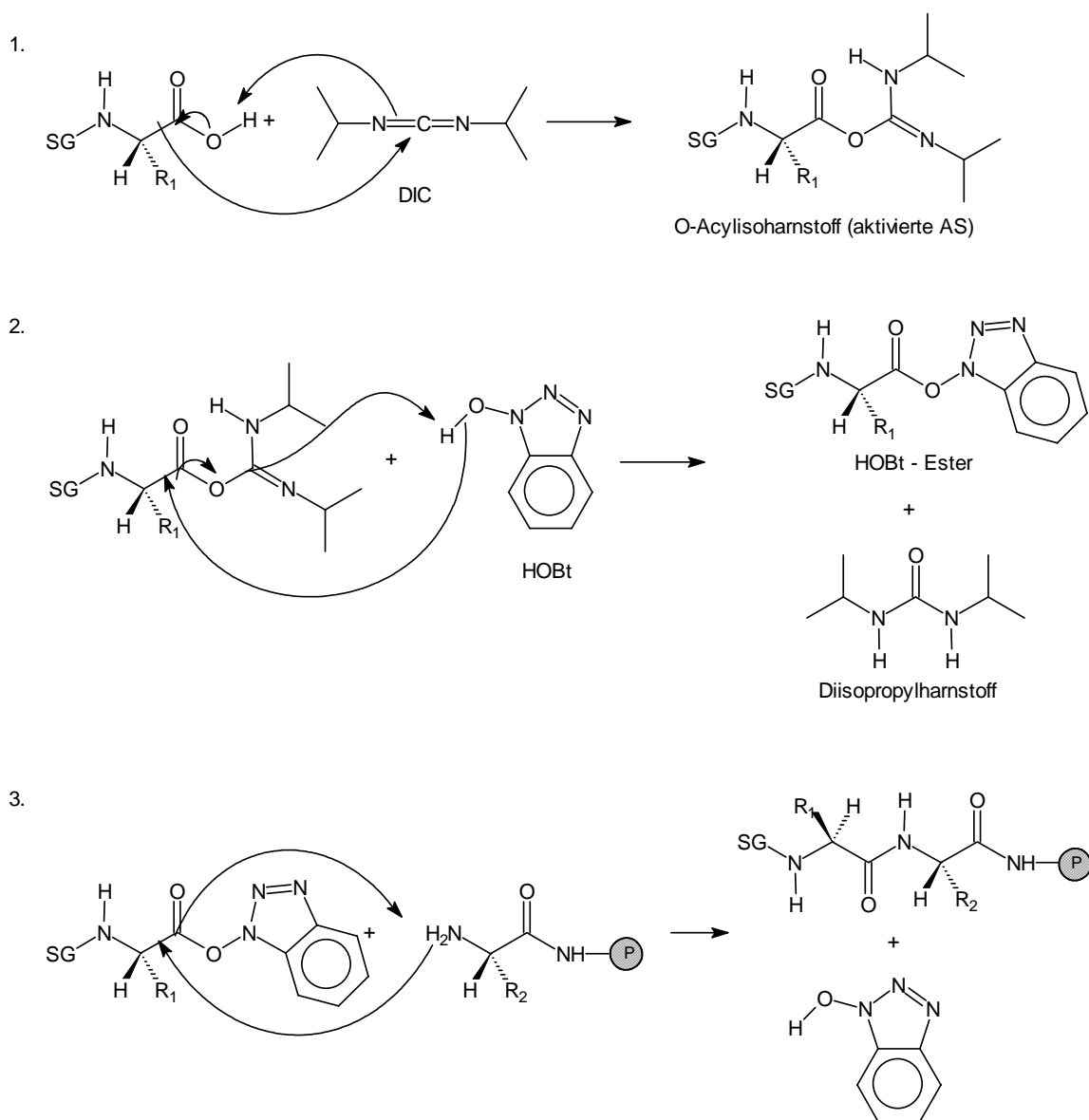


Abb. 1.12: Verknüpfung zweier Aminosäuren mittels DIC / HOBt-Aktivierung.

DIC (Diisopropylcarbodiimid) hat gegenüber DCC (Dicyclohexylcarbidiimid) vor allem den Vorteil, daß der während der Reaktion gebildete Diisopropylharnstoff in DMF (Dimethyl-

1 Einleitung

formamid) löslich ist, während Diisohexylharnstoff ausfällt und somit bei der Festphasensynthese schwer abzutrennen ist. Bei der Bildung von Peptidbindungen in Lösung ist das wiederum ein großer Vorteil, deswegen findet DCC hierbei Anwendung. Der ausfallende Dicyclohexylharnstoff schiebt das Reaktionsgleichgewicht zudem zur Produktseite.

Die Tatsache, daß das bei der Bildung der Amidbindung frei werdende Wasser formal vom DIC aufgenommen wird, trägt zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und zur Erhöhung der Ausbeute bei, da das Reaktionsgleichgewicht damit zur Produktseite hin verschoben wird. Das Nucleophil HOBt liegt am Ende der Reaktion unverändert vor. Aus dem nucleophilen Angriff des HOBt auf den intermediär gebildeten O-Acylisoharnstoff resultiert ein Aktivester, welcher ideale Eigenschaften hat: Die Aminosäure wird nicht so stark aktiviert, daß Nebenreaktionen (Racemisierungen) auftreten, das reaktive Potential ist aber dennoch hoch genug, damit die Reaktion zügig und vollständig ablaufen kann. HOBt unterdrückt außerdem auch direkt, bedingt durch den schwach sauren pKs, eine Proton-Abstraktion vom α -Kohlenstoff durch das leicht basische DIC, und damit die Racemisierung. Weiterhin wird durch die Zugabe von HOBt eine intramolekulare Migration der aktivierten Aminosäure im O-Acylisoharnstoff vom C zum N unter Bildung von unreaktiven N-Acylharnstoffen verhindert, da das Additiv sehr schnell mit dem intermediär gebildeten Isoharnstoff abreagiert. Noch günstigere Eigenschaften als HOBt hat dessen Aza-Analogon HOAt [58]. Verglichen mit HOBt beschleunigt es die Kupplungsreaktion geringfügig und bewahrt noch effektiver die chirale Integrität der Aminosäure. Nach einer Annahme von Carpino [58] werden die günstigeren Reaktionseigenschaften durch den Nachbargruppeneffekt des pyridinischen Stickstoffs hervorgerufen, da dieser bei Annäherung des Aminosäure-HOBt-Esters an die harzgebundene Aminosäure eine Wasserstoffbrücke mit einem der Aminprotonen ausbilden kann. Es entsteht dann ein Übergangszustand, der die bei der Bildung der Amidbindung zu überwindende Energiebarriere stark herabsetzt.

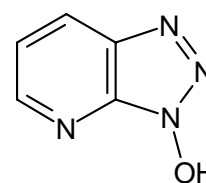


Abb. 1.13: HOAt.

Weitere für die Peptidsynthese geeignete Kupplungsreagenzien sind TBTU [59] und BOP [60]. Es handelt sich um Reagenzien, bei denen das HOBt bereits inkorporiert ist, so daß sie ebenfalls *in situ* eingesetzt werden können. Bei TBTU handelt es sich um ein Uronium-, bei BOP um ein Phosphoniumsalz:

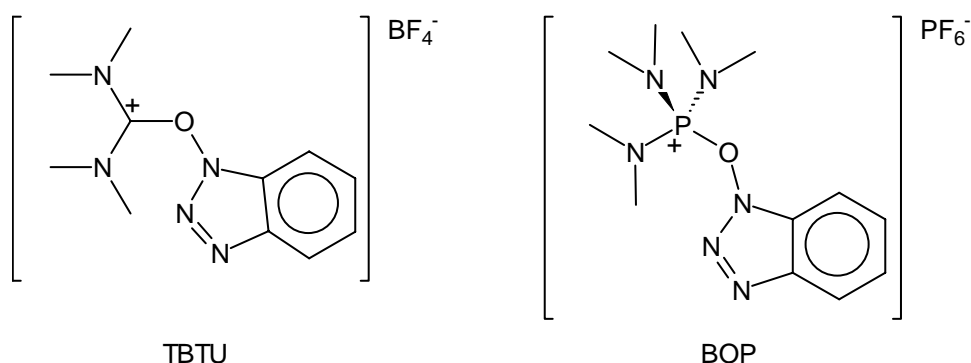


Abb. 1.14: Kupplungsreagenzien des Uronium- und Phosphoniumtyps.

Obwohl die Kinetik der Kupplungen mit TBTU und BOP günstiger als mit DIC/HOBt sind, zumal erstere auch entropisch begünstigt sind, ist ein gravierender Nachteil, daß bei der Reaktion Base (z.B. DIEA=Diisopropylethylamin) zugegeben werden muß. Generell ist die Anwesenheit von Basen, insbesondere wenn längere Kupplungszeiten erforderlich sind, ungünstig, da dadurch die Gefahr der Racemisierung erhöht wird [61].

1.4.1.3 Die Schutzgruppentechnik

Die Schwierigkeiten, die bei der Synthese von Peptiden auftreten, sind vor allem auf die Multifunktionalität der Aminosäuren zurückzuführen. Selbst die einfachste Aminosäure, Glycin, ist zumindest ein bifunktionales Molekül. Um eindeutige Synthesergebnisse zu erzielen, ist es daher unumgänglich, die jeweils nicht an der Reaktion beteiligten reaktiven Gruppen mit geeigneten Schutzgruppen zu maskieren. Dabei liegt das besondere Problem in der Peptidsynthese darin, daß alle Schutzgruppen eingeführt und nach der Synthese wieder entfernt werden müssen, ohne, daß das komplexe Peptid dabei angegriffen wird. Die Problematik verschärft sich außerdem dadurch, daß bedingt durch den Verlauf der Synthese zwei unterschiedliche Typen von Schutzgruppen eingesetzt werden müssen: transiente und semipermanente. Da die Aminosäureseitenketten zu keiner Zeit der Synthese an irgendeiner Reaktion beteiligt sind, müssen sie mit semipermanenten Schutzgruppen, welche unter allen Reaktionsbedingungen erhalten bleiben, geschützt werden. Andererseits muß die transiente

Schutzgruppe, welche die α -Aminogruppe maskiert, vor jedem Syntheseyklus erneut entfernt werden, damit die jeweils nächste Aminosäure angekuppelt werden kann.

Um diese anspruchsvolle Aufgabe zu lösen, wurden mehrere Synthesestrategien entwickelt, von denen sich jedoch nur zwei Verfahren durchgesetzt haben: Die Boc/Benzyl-Strategie [62] und die Fmoc/t-Butyl-Strategie, die von Carpino und Han entwickelt wurde [63]. Boc (tert-Butyloxycarbonyl) und Fmoc (9-Fluorenylmethoxy-carbonyl) sind transiente, die α -Aminoereinheit schützende Gruppen vom Urethan-Typ, während Benzyl und t-Butyl die Art der semipermanenten Seitenkettenschutzgruppen bezeichnen.

Der wesentliche Unterschied der beiden Strategien liegt darin, daß in der Boc/Benzyl-Strategie sowohl die transiente, als auch die semipermanenten Schutzgruppen sauer abgespalten werden, wobei die Selektivität durch eine abgestufte Säurestärke erreicht wird. Demgegenüber werden in der Fmoc/t-Butyl-Strategie nur die Seitenkettenschutzgruppen sauer abgespalten und die Fmoc-Gruppe mittels Base. Diese Methode wird daher auch als orthogonales Schutzgruppensystem bezeichnet. Ein erheblicher Vorteil der Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe ist deren UV-Absorption, was zur Synthesekontrolle ausgenutzt werden kann.

In dieser Arbeit wurde nur mit der Fmoc/t-Butyl-Strategie gearbeitet. Für die Maskierung der Seitenketten wurden vier verschiedene Schutzgruppen verwendet:

Seitenketten-Schutzgruppe	Aminosäure
t-Butyl	Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr
Tryl	Asn, Cys, Gln, His
Pmc	Arg
Boc	Lys, Trp
Ungeschützt	Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val

Tab. 1.2: Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten.

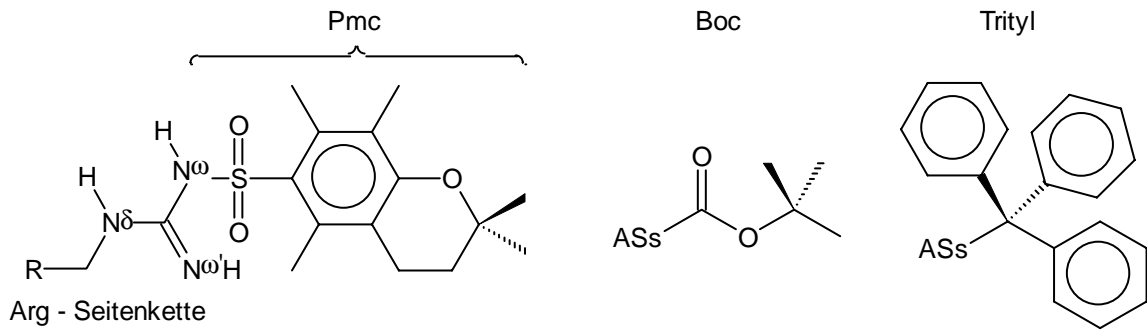


Abb. 1.15: Darstellung der Seitenkettenschutzgruppen (ASS = Aminosäureseitenkette).

Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgt mit TFA, wohingegen die Fmoc-Gruppe mittels 40% Piperidin in DMF abgespalten wird. Das Piperidin reagiert mit dem intermediär gebildeten Fulven zu einem Piperidin-Fulvenaddukt:

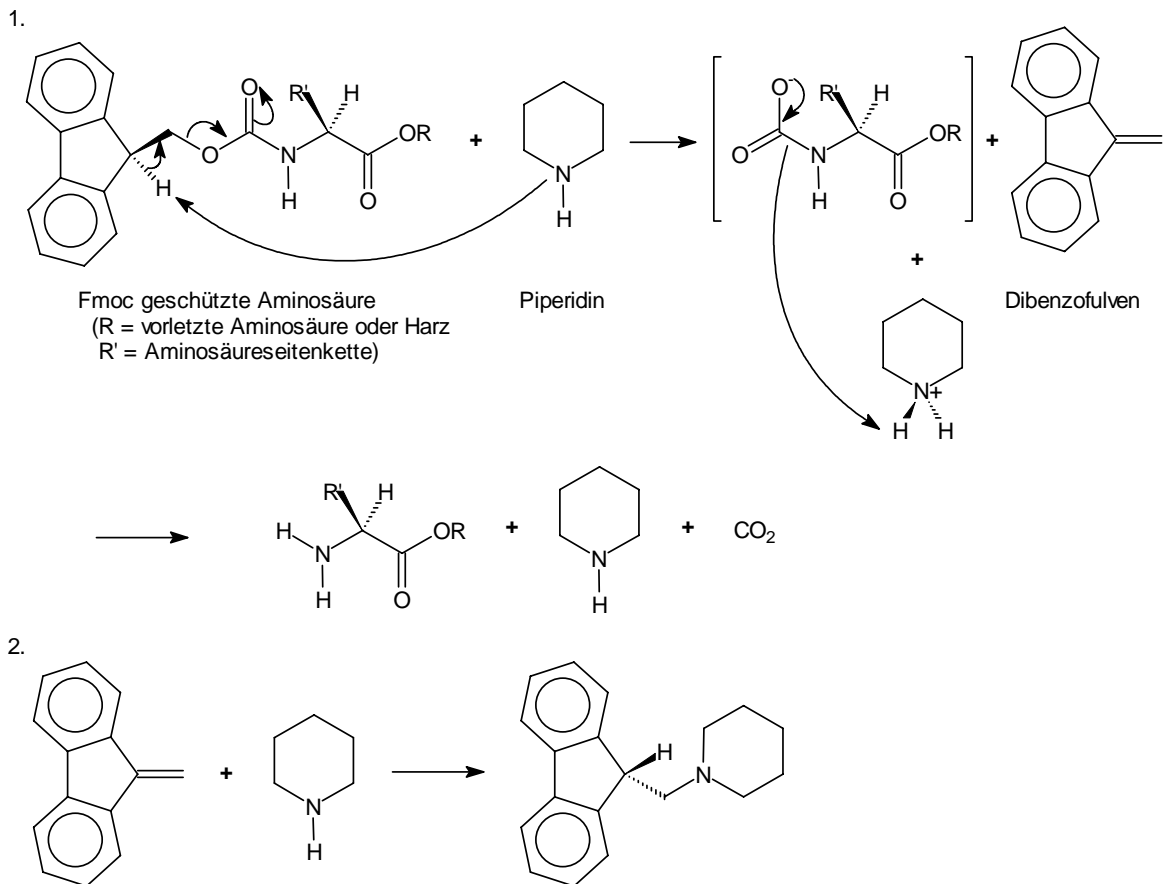


Abb. 1.16: 1. Fmoc-Abspaltung mit Piperidin. 2. Bildung des Piperidin-Fulvenaddukts.

1.4.1.4 Die Entschützungsverfahren

Das Entschützen der Aminosäureseitenketten ist einer der kritischsten Schritte der Peptidsynthese. Unter Umständen gelingt die Synthese eines Peptids und dennoch ist das Produkt nur in mäßigen Ausbeuten zu isolieren, weil die anschließende Aufarbeitung irreversible Schäden verursacht.

Es ist ein großer Vorteil der orthogonalen Fmoc/t-Butyl-Strategie, daß die Seitenkettenschutzgruppen selektiv abgespalten werden können. Daher ist es möglich Seitenkettenschutzgruppen zu wählen, die recht säurelabil sind, so daß für diesen Schritt keine erhöhte Acidität notwendig ist. Im Gegensatz zur Boc/Benzyl-Strategie werden die Schutzgruppen daher mit TFA anstelle von HF abgespalten. Die bei der Abspaltung frei werdenden Carbokationen sind dennoch sehr reaktiv und greifen das entschützte Peptid an, so daß irreversible Peptid-Modifikationen entstehen können. Zu den empfindlichsten Aminosäuren gehören Tryptophan, Tyrosin und Methionin. Trp und Tyr werden sehr leicht durch t-Butyl-Kationen und die Pmc-Gruppe des entschützten Arg modifiziert. Met kann säurekatalysiert zum Sulfoxid oxidiert werden.

Daher müssen der TFA eine Reihe von Abfangreagenzien, sogenannte Scavenger, zugesetzt werden. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei unterschiedliche Reagenz-Mischungen eingesetzt: Reagenz K [64] und Reagenz TIS:

	Reagenz K	Reagenz TIS
Abspaltreagenz	82.5% TFA	92.5% TFA
Scavenger	5% Thioanisol	2.5% Triisopropylsilan
	5% Phenol	2.5% H ₂ O
	5% H ₂ O	2.5% EDT
	2.5% EDT	

Tab. 1.3: Zusammensetzung der verwendeten Entschützungsreagenzien.

Die verschiedenen Scavenger haben unterschiedliche Funktionen:

- Ethandithiol (EDT) ist einer der wirkungsvollsten Scavenger, da es über zwei sehr gute Schwefel-Nucleophile verfügt. Es fängt sehr effizient t-Butyl-trifluoracetat, Pmc und Trityl-Kationen ab.

1 Einleitung

- Der nucleophile Sauerstoff des H₂O eliminiert t-Butyl-Kationen. H₂O ist essentiell, wenn in der Sequenz neben Arg(Pmc) auch Trp und Tyr vorhanden sind.
- Thioanisol wirkt durch nucleophilen Angriff des Schwefels und elektrophile Substitution in o- und p-Stellung. Es schützt Met vor Oxidation zum Sulfoxid, fängt ebenfalls t-Butyl-trifluoracetat ab und beschleunigt die Entschützung von Arg(Pmc).
- Phenol wird auch in o- und p-Stellung substituiert und fängt so t-Butyl-trifluoracetat und t-Butyl-Kationen ab.
- m-Kresol erfüllt dieselbe Funktion wie Phenol.
- Triisopropylsilan fängt hochstabilisierte Kationen ab, welche bei der Spaltung von Tritylgruppen oder des Rink Amid Linkers entstehen.

Mit Reagenz K werden die Peptide bei RT ca. 4-9 h behandelt, während Reagenz TIS zwischen 3-6 h ebenfalls bei RT verwendet wird.

Für die meisten Peptide wurde das Reagenz „TIS“ gewählt. Es zeichnet sich durch eine sehr große Effektivität der „Scavenger“ aus. Zudem wird das Harz, optisch betrachtet, nicht sehr beansprucht, die erhaltene Peptid-Lösung ist klar und hell. Bei Anwendung des Reagenz „K“ ist die Peptid-Lösung oft stark mit Schwebstoffen belastet, welche wahrscheinlich von einer beginnenden Zersetzung des polymeren Trägers herrühren. Da das Peptid anschließend durch Fällung mit MTBE isoliert wird, würden diese, sehr feinen Schwebstoffe stören. Mit dem Reagenz „TIS“ lässt sich das Peptid oft als Rohprodukt mit über 90%iger Reinheit darstellen. Da jedes Peptid eine individuelle Anzahl und Kombination von Schutzgruppen aufweist, müssen vor jeder quantitativen Entschützung Abspaltoptimierungen durchgeführt werden: Mehrere Peptid-Harzproben von 3-5 mg werden entnommen und mit unterschiedlichen Abspaltreagenzien versetzt. Die einzelnen Proben werden dann in geeigneten Zeitintervallen (3 h) aufgearbeitet und mittels analytischer RP-HPLC die Qualität des Rohprodukts ermittelt. Mit dem optimalen Abspaltreagenz, sowie der optimalen Abspaltzeit kann anschließend eine präparative Abspaltung (Scale up Faktor ca. 20-100) vorgenommen werden.

1.4.1.5 Synthesekontrolle und Syntheseschwierigkeiten

Ein Problem der SPPS ist, daß die während der Synthese entstehenden Nebenprodukte (Fehl- oder Abbruchsequenzen) nicht sofort, sondern erst am Ende, nachdem das Peptid vom Harz abgespalten wurde, abgetrennt werden können. Da sich der Ausbeuteverlust pro Syntheszyklus aufgrund des iterativen Vorgehens bei der SPPS multiplikativ auswirkt, sinkt die Gesamtausbeute der Zielverbindung mit jeder Nebenreaktion dramatisch: Selbst wenn bei jedem Syntheseschritt eine Ausbeute von 95% erreicht wird, so würde die Gesamtausbeute bei einem Peptid mit 20 Aminosäuren lediglich $0,95^{20} \times 100 = 35,8\%$ betragen. Problematisch ist allerdings nicht nur der Ausbeuteverlust, sondern auch die Tatsache, daß die kumulierten Nebenprodukte sich oft nur geringfügig in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden und daher äußerst schwierig voneinander zu trennen sind.

Es ist daher von entscheidender Bedeutung die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden. Abbruchsequenzen können entstehen, wenn rigide Sekundärstrukturen, wie z. B. β -Faltblätter, am Harz ausgebildet werden, die Reaktionszeit zu kurz ist oder das N-terminale Ende des harzgebundenen Peptids unzugänglich ist. Die Synthese bricht dann an dieser Stelle ab und ein Abbruchpeptid bleibt zurück. Fehlsequenzen entstehen, wenn zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese eine Abbruchsequenz doch noch weiter reagiert, weil sich die Bedingungen geändert haben. Dann fehlen in der Sequenz Aminosäuren, weshalb das Fehlsequenzpeptid unbrauchbar ist.

Um diese Komplikationen zu vermeiden, ist es notwendig sicherzustellen, daß zum einen die jeweilige Kupplung vollständig verlaufen ist und zum anderen die transiente Fmoc-Gruppe quantitativ abgespalten wurde. Die Kontrolle der Kupplungsausbeute erfolgt z.B. durch den Kaiser-Test [65]. Bei diesem Test reagiert Ninhydrin mit eventuell noch vorhandenen freien N^α -Aminogruppen unter Bildung eines blauen Farbstoffes. Dieser Test ist sehr empfindlich, so daß bei einem negativen Testergebnis, erkennbar an der unverändert gelben Färbung des Reagenzes, davon ausgegangen werden kann, daß die Kupplung zu über 99% vollständig verlaufen ist. Ist die Kupplung laut Kaiser-Test unvollständig, so wird die Dauer der Reaktion, evtl. unter Zugabe weiterer Reagenzien z.B. „magic mixture“ (siehe Anhang), verlängert, bis der Test negativ ausfällt (Nachkupplung).

In manchen Fällen ist es trotz mehrfacher Nachkupplungen nicht möglich, eine Vollständigkeit der Kupplung zu erreichen (Kaiser-Test bleibt grünlich-blau). In diesen Fällen

werden die nicht abreagierten Sequenzen z.B. mittels Essigsäureanhydrid terminiert (Capping), so daß leichter abtrennbare, kürzere Nebenprodukte zurückbleiben.

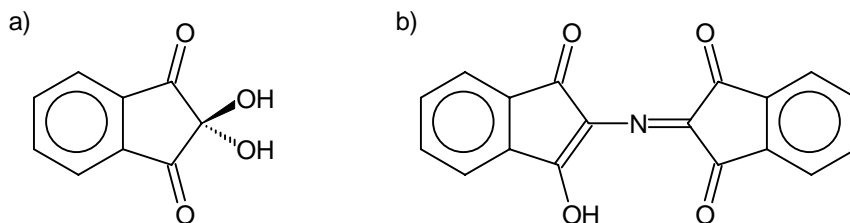


Abb. 1.17: a) Das im Kaiser-Test verwendete Ninhydrin. b) Der bei der Reaktion mit einem Amin entstehende blaue Farbstoff [66].

Die Kontrolle der Fmoc-Abspaltung kann mittels UV-Spektroskopie durchgeführt werden, da die Fmoc-Schutzgruppe ein starkes UV-Absorptionsmaximum bei 301 nm in 40% Piperidin/DMF besitzt. Sobald in der Abspalllösung keine Absorptionsmaximum in diesem Wellenlängenbereich zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, daß die Fmoc-Schutzgruppenabspaltung vollständig verlaufen ist.

Die Produktreinheit und die Ausbeute, wird nicht nur durch die Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen, sondern auch in hohem Maße durch zahlreiche und vielfältige Nebenreaktionen vermindert. Die bereits erwähnte Bildung von Diketopiperazinen tritt u.U. ein, wenn auf der Dipeptidstufe die N-terminale Schutzgruppe entfernt wird. Besonders wenn eine der beiden Aminosäuren Glycin oder Prolin ist, bildet sich sehr leicht, unter Abspaltung vom Harz, die Diketopiperazin-Sechsringstruktur aus:

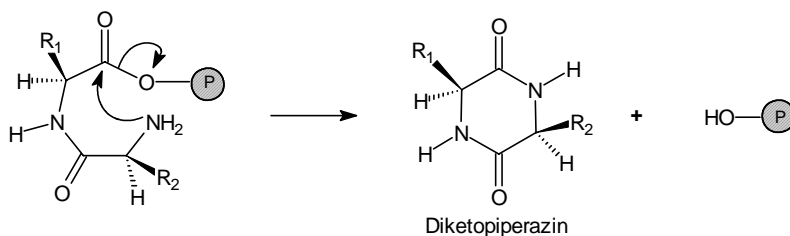


Abb. 1.18: Die Bildung von Diketopiperazinen.

Die chirale Integrität eines Peptids oder Proteins ist von essentieller Bedeutung für alle relevanten Applikationen. Racemisierungen und Epimerisierungen gehören daher zu den unerfreulichsten Nebenreaktionen, zumal Epimere extrem schwer zu erkennen und vom Hauptprodukt abzutrennen sind. Für das Zustandekommen von chiralen Inhomogenitäten werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Säurekatalysierte Enolisierung und direkte Protonenabstraktion mittels Basen sind zwei in Frage kommende Mechanismen. Besonders wenn die Carboxylgruppe der zu kuppelnden Aminosäure mit stark elektronenziehenden Gruppen in polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie z. B. DMF aktiviert wird, und zudem noch eine Base anwesend ist, ist eine Racemisierung denkbar. Beispielsweise kann die Aktivierung mit DIC zur intramolekular katalysierten Racemisierung führen:

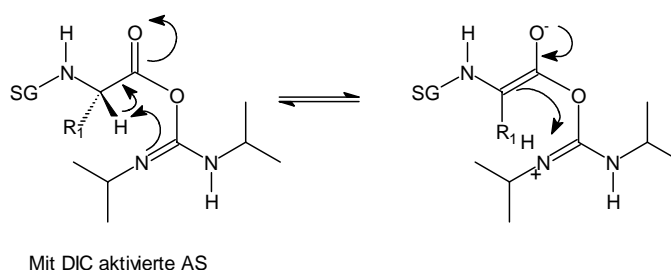


Abb. 1.19: Racemisierung durch DIC katalysierte Enolisierung.

Eine Gefährdung der Chiralität am $^{\alpha}\text{C}$ ist gleichfalls durch Histidin in der Sequenz gegeben: Auch hier kann bei der Aktivierung eine intramolekulare $^{\alpha}\text{H}$ -Abstraktion, verursacht durch den Imidazol- $^{\text{T}}\text{N}$, erfolgen. His ist daher die racemisierungsanfälligste Aminosäure [67]. Dies unterstreicht um so mehr die Notwendigkeit der Verwendung von HOBt als Additiv, da es aufgrund seiner leichten Acidität und der schnellen Umsetzung mit dem DIC-Zwischenprodukt die Racemisierung wirksam unterdrückt.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Racemisierung am $^{\alpha}\text{C}$ führt, ist die Bildung von Oxazolonen (genauer: 5(4H)-Oxazolone) [68]. Die Bildung dieser Fünfring-Strukturen begünstigt die Konversion des chiralen Zentrums dadurch, daß die Acidität des $^{\alpha}\text{H}$ erhöht wird, weil die nach einer Abstraktion zurückbleibende negative Ladung im Oxazolone delokalisiert werden kann, so daß ein resonanzstabilisiertes $^{\alpha}\text{C}$ Carbanion resultiert. Dieser Racemisierungsmechanismus wird durch die Fmoc-Gruppe wirksam unterdrückt.

1 Einleitung

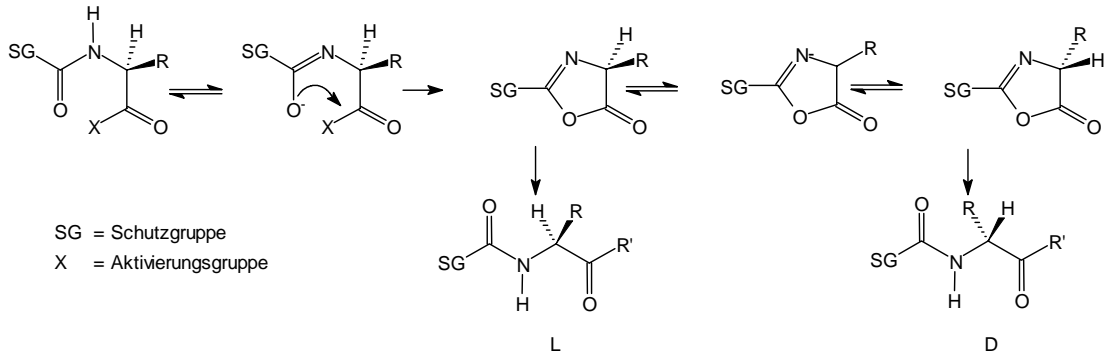


Abb. 1.20: Bildung von Oxazolonen (unter basischen Bedingungen).

Weitere Nebenreaktionen, die es zu verhindern gilt, sind [66,69]: die Bildung von Nitril aus Asp,

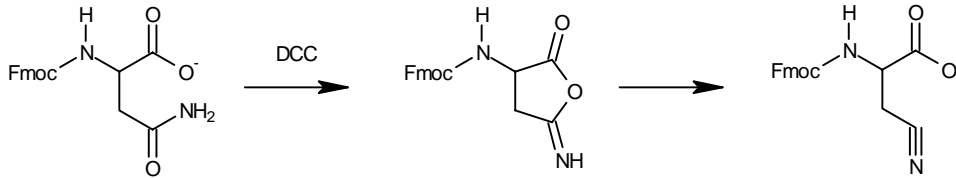


Abb. 1.21: Weitere wichtige Nebenreaktionen 5.

sowie Succinimidbildung aus Asp (Dehydratation),

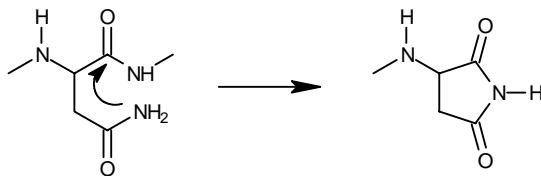


Abb. 1.22: Weitere wichtige Nebenreaktionen 5.

oder Isomerisierung:

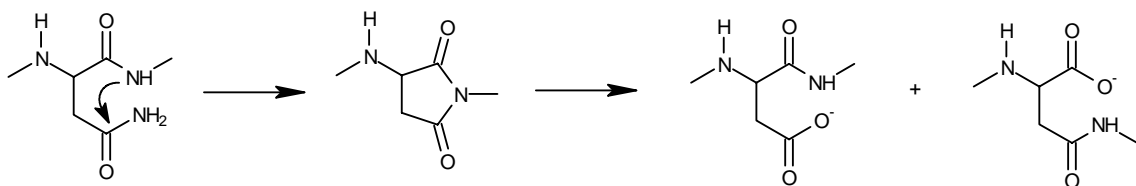


Abb. 1.23: Weitere wichtige Nebenreaktionen 5.

1 Einleitung

Bei Glu und Gln, ist die δ -Lactambildung

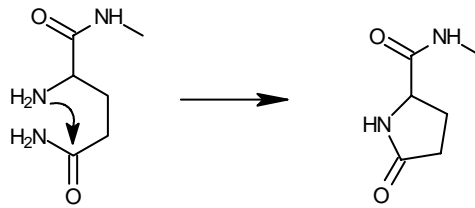


Abb. 1.24: Weitere wichtige Nebenreaktionen 5.

und bei Arg und intramolekulare Bildung von Pyroglutamin zu beachten:

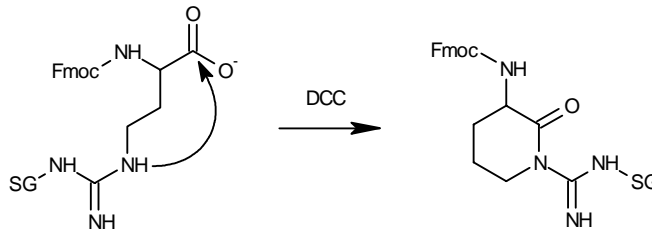


Abb. 1.25: Weitere wichtige Nebenreaktionen 5.

1.4.1.6 Optimierung der Synthesekontrollen

Die Kontrolle der Synthesequalität erfolgt standardmäßig durch den Kaiser-Test nach jeder Kupplung und die UV-spektroskopische Verfolgung der Fmoc-Abspaltung. Besonders die erste Methode hat allerdings Nachteile:

Für den Kaiser-Test muß nach jeder Kupplungsreaktion eine kleine Harzprobe von 1-3 mg entnommen, gewaschen, getrocknet und nach dem Versetzen mit den Kaiser-Test-Reagenzien 5min auf 100°C erhitzt werden. Dieses Verfahren ist aufwendig und bringt Substanzverluste mit sich. Weiterhin erhält man nicht bei allen Aminosäuren die gewünschte Färbung: Das sekundäre Amin Prolin ergibt eine braune Färbung, welche keine eindeutige Aussage ermöglicht. Der entscheidende Nachteil ist allerdings, daß der Test mit zunehmender Peptidlänge bei allen Aminosäuren immer unzuverlässiger wird: Schon bereits ab der siebten

1 Einleitung

bis achten Aminosäure ist die gelbe Färbung, welche das Indiz einer vollständigen Kupplung ist, u.U. nicht mehr eindeutig. Man erhält statt dessen eine grünliche- bis gräuliche trübe Lösung.

Alternativ kann Bromphenolblau als Indikator für die Kontrolle der Kupplungseffizienz eingesetzt werden.

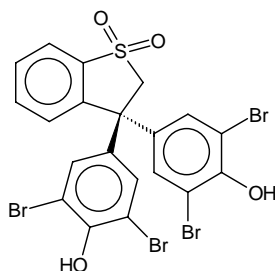


Abb. 1.26: Indikatoren für die Kupplungskontrolle.

Bromphenolblau schlägt in einem Bereich von pH 3,0 bis pH 4,6 von blau nach gelb um. Der Farbstoff ist in DMF gut löslich und geht keine Reaktion mit irgendeinem der zugesetzten Reagenzien ein, ist also unter den Reaktionsbedingungen inert. Am Ende der Reaktion läßt sich der Indikator leicht mit einer verdünnten Lösung von Piperidin oder DIEA (Diisopropylethylamin) in DMF aus dem Harz auswaschen. Da für diesen Test keine Harzprobe entnommen werden muß, kommt es auch nicht zu Substanzverlusten. Diese Synthesekontrolle ist zudem weniger umständlich. Der Indikator funktioniert nach dem Schema eines pH-Indikators:

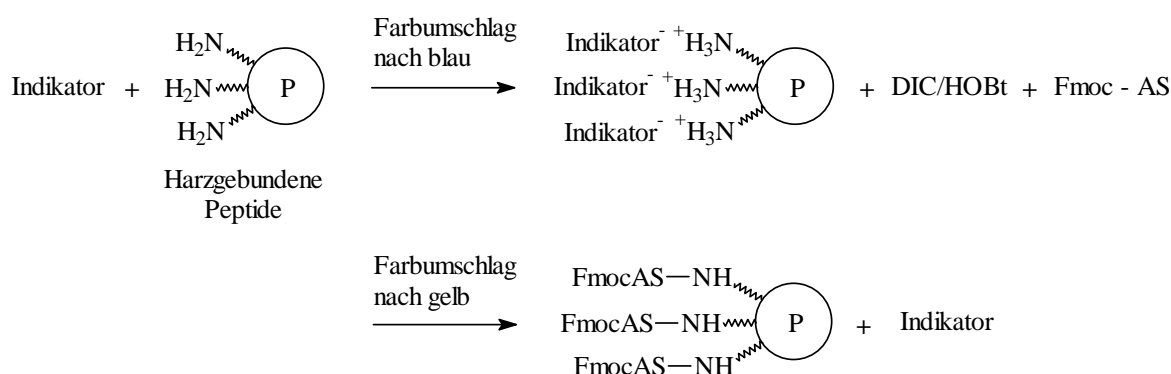


Abb. 1.27: Funktionsweise des Bromphenolblau Indikators

1 Einleitung

Die Tatsache, daß dieser Test keinen Substanzverlust mit sich bringt, ist besonders für die kombinatorische Peptidsynthese wichtig. Bromphenolblau zeigt die Vollständigkeit der Kupplung durch eine gelbe Färbung an. Sind noch nicht nahezu alle Aminoenden der wachsenden Peptidketten abgesättigt, zeigt sich eine bläulich/grüne Färbung der Reaktionslösung, sowie der Harzkugeln. Allerdings wird auch dieser Test bei zunehmender Kettenlänge immer unzuverlässiger, da sich immer seltener eine reine hellgelbe Färbung einstellt. Immer wieder erreicht man nur ein Gelbgrün. Daher sollte man die Farbkonstanz als Entscheidungshilfe für das Beenden der Kupplungsreaktion heranziehen.

Um die Vollständigkeit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen Aminogruppe zu verfolgen, kann man die UV-Absorption der Fmoc-Schutzgruppe (Piperidin-Fulven-Addukt) in der Reaktionslösung ausnutzen. Ist die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vollständig verlaufen, so sollte diese nicht mehr in die Reaktionslösung abgegeben und UV-spektroskopisch detektiert werden. Das würde aber nichts darüber aussagen, ob auch wirklich alle Fmoc-Schutzgruppen abgespalten worden sind. Diese Test geschieht also indirekt, es allerdings treten keine Substanzverluste auf.

Ist in der Fmoc-Abspaltung noch ein Absorptionsmaximum bei 300 nm zu erkennen, so war vor diesem Abspaltschritt die Fmoc-Schutzgruppe noch nicht quantitativ entfernt worden, da diese nun in der Abspaltung gefunden ist.

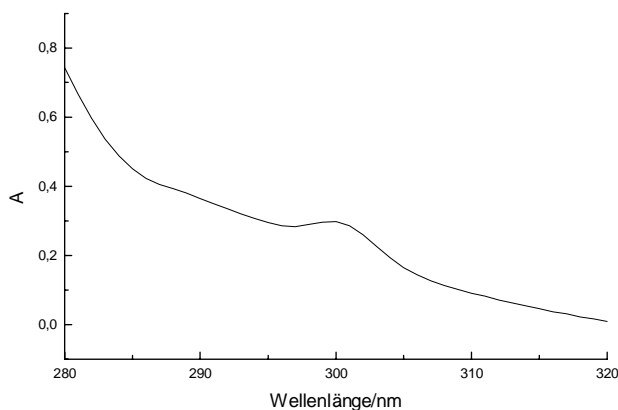


Abb. 1.28: positiver Test, es ist noch Piperidin-Fulvenaddukts in der Lösung enthalten

Wären vor dem letzten Abspaltschritt schon alle Fmoc-Schutzgruppen entfernt, so sollte sich bei 300nm kein Absorptionsmaximum zu finden sein.

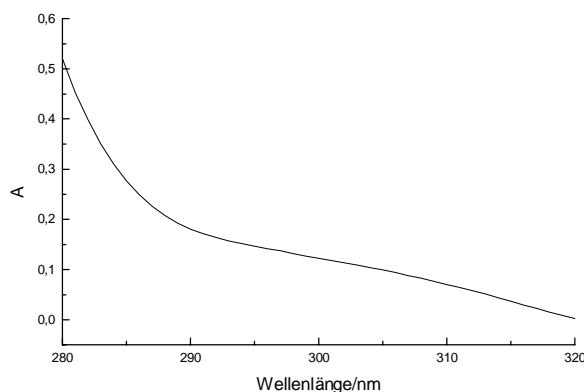


Abb. 1.29: negativer Test, kein Absorptionsmaximum bei 300nm

Mit der Quantifizierung des Fmoc-Abspaltung ist man zudem in der Lage, den quantitativen Kaiser-Test zur Bestimmung der Harzbelegung zu ersetzen. Dies sollte den Vorteil haben, daß damit alle Aminosäuren detektierbar wären. Im Gegensatz zum quantitativen Kaiser-Test hat man so auch die Option, nach jedem Syntheszyklus eine quantitative Bestimmung durchzuführen und somit Rückschlüsse auf den Syntheseverlauf zu ziehen.

1.4.2 Automatisierung der Peptidsynthese

Die nahezu perfekt ausgearbeitete und zuverlässige Chemie der Festphasen-Peptid-Synthese läßt sich hervorragend automatisieren. Voraussetzung hierfür ist, daß die jeweiligen Reaktionen berechenbar hohe Ausbeuten liefern und keine einzelne Optimierung der Reaktionsbedingungen, unabhängig von der Sequenz, mehr nötig ist.

Für die standardmäßige Synthese von linearen Peptiden stand in dieser Arbeit der Peptid Synthetisier-Automat „9050 Plus PepSynthesizer“ der Firma Millipore zur Verfügung. Dieser Synthesizer arbeitet nach dem Durchflußprinzip, wobei das Harz in eine Säule eingebettet ist und von den Reagenzien innerhalb eines Schlaufenreaktors durchflossen wird. Das Reaktionssystem steht während der Reaktion unter einem Druck von 5-50 psi. Die Synthese erfolgt, wie bei der manuellen Synthese, nach der Fmoc/t-Butyl-Strategie. Die Aminosäuren werden automatisch mit DIC/HOBt aktiviert. Fmoc-Abspaltung erfolgt mit 40% Piperidin in DMF. Es können die meisten Harze der manuellen Festphasen-Synthese als polymerer Träger

eingesetzt werde (z.B. o-Chlortrityl oder Rink-Amid MBHA). Eine genaue Kenntnis der Harzbelegung ist notwendig, um die Ansatzgrößen richtig zu berechnen und den Synthesizer mit der richtigen Menge an Reagenzien zu bestücken. Besonders einfach ist es, schon mit der entsprechenden Aminosäure vorbelegte Harze zu kaufen. Somit entfällt die, weiterhin manuelle, Erstbelegung des Harzes. Die Harzbelegung der jeweiligen Charge wird von Hersteller angegeben.

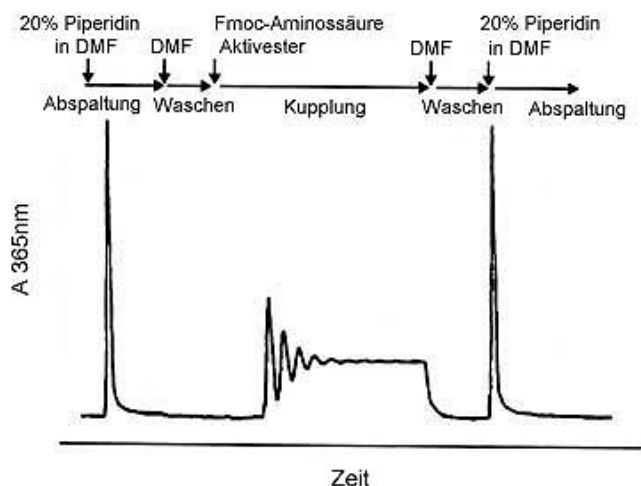


Abb. 1.30: Reaktionskontrolle der Peptidreaktionen

Ein großer Vorteil dieses Synthesizers ist die Möglichkeit der Synthesekontrolle während der Reaktion durch einen in den Zyklus eingebauten UV-Detektor, welcher die Absorption der Reaktionslösung bei 365 nm mißt.

Die Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung wird über die Abgabe des Piperidin-Fulven-Adduktes in die Reaktionslösung erfaßt. Hierbei wird die harzgefüllte Säule mit 40% Piperidin in DMF durchspült und die UV-Absorption der Reaktionslösung am Säulenende gemessen. Kurz nach der Zugabe der Abspalllösung steigt die UV-Absorption aufgrund des Freiwerdens des Piperidin-Fulven-Addukt am Ausfluß der Säule stark an, um dann wieder auf den Ursprungswert zu sinken. Ist es geschehen, sollte die Fmoc-Abspaltung vollständig verlaufen sein und kein Piperidin-Fulven-Addukt wird mehr freigesetzt. Bei der Fmoc-Abspaltung wird die Säule, im Gegensatz zur Kupplungsreaktion, lediglich durchspült.

Zu Kupplung der nächsten Aminosäure wird das Harz mit DMF gewaschen, die Fmoc-Aminosäureaktivester-Lösung in den Säulenkreislauf eingeführt und im Zyklus gefahren. Da die Aminosäurederivate ebenfalls UV-aktiv sind, steigt die Absorption zunächst an. Da während der gesamten Reaktion keine vollständige Rückvermischung eintritt, fällt die

Absorption schnell wieder ab, da nun nur noch DMF nachströmt. Immer wenn die Aminosäurederivatlösung an der UV-Detektor vorbeiströmt, steigt die Absorption, wobei sie nie ganz den vorherigen Wert erreicht, da die Reagenzien zunehmend am Harz abreagieren. Die Absorption der Aminosäurederivate wird aber nie Null, da diese im Überschuß eingesetzt werden. Wird ein sich nicht mehr verändernder Endwert erreicht, sollte die Kupplung vollständig verlaufen sein, da nichts mehr mit dem Harz abreagiert.

Nun kann das Harz wieder mit DMF gewaschen. Dabei werden die Reagenzien aus dem System gespült und die Absorption fällt wieder auf Null, der Synthesecyclus kann anschließend erneut beginnen.

Dieses System arbeitet sehr effektiv und zuverlässig. Die automatisierte Peptidsynthese ist der manuellen Synthese in Qualität und Geschwindigkeit weit überlegen. Es läßt sich z.B. innerhalb eines Tages ein 20mer Peptid mit über 90% Reinheit des Rohproduktes gewinnen. Mit manueller Synthese wären mehrere Wochen mit unsicherem Synthesergebnis und aufwendiger HPLC-Aufreinigung notwendig.

1.5 Kombinatorische Peptidchemie

Bei der Untersuchung von molekularbiologischen Zusammenhängen und Fragestellungen steht man häufig vor dem Problem, daß man nach einer Leitverbindung bzw. Leitstruktur oder einem passenden Liganden zu z. B. Antikörpern, Rezeptoren, Enzymen oder Transkriptionsfaktoren sucht, und die Anzahl der dafür in Frage kommenden Verbindungen sehr groß bis gigantisch ist. Würde man beispielsweise bei einem Hexapeptid die sechs Positionen mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren durchpermutieren, so käme man auf $20^6=64$ Millionen Verbindungen.

Seit der Einführung von molekularen Testsystemen wie z. B. Enzym- oder Rezeptorbindungstests kann eine große Anzahl von Substanzen in sehr kurzer Zeit im sog. Hoch Durchsatz Screening getestet werden, so daß der limitierende Faktor bei der Auffindung von aktiven Leitverbindungen die Synthese der einzelnen in Frage kommenden Verbindungen ist. Um z.B. Epitop- und Konformationskartierungen durchführen zu können, wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, eine Vielzahl von Peptiden in kurzer Zeit und niedrigem Aufwand zu

synthetisieren. Es wurde daher die kombinatorische Peptidsynthese entwickelt. Sie kann definiert werden als die repetitive kovalente Verbindung von Synthesebausteinen unterschiedlicher Struktur, um eine Bibliothek von unterschiedlich strukturierten Substanzen zu generieren. Eine Reihe von multiplen Peptidsynthesen (MPS) sind bereits erfolgreich eingesetzt worden [70-72]: Die Tea-bag-Methode, die Pin-Methode, die Spot-Methode und die biotechnologische Phage Display-Methode [73], um nur die Wichtigsten zu nennen. In letzter Zeit wird die kombinatorische Synthese immer mehr von der reinen Peptidsynthese auf die organische Synthese ausgeweitet.

Die verschiedenen Ansätze unterscheiden sich grundsätzlich durch die eingesetzten polymeren Träger, die Anzahl der möglichen Peptide und die Menge der erhaltenen Produkte. Der Vorteil der genannten Methoden ist vor allem, daß man genau definierbare und lokalisierbare Verbindungen in ausreichenden Mengen (≥ 1 mg) erhält (mit Ausnahme der letztgenannten Methode). Nachteilig ist allerdings, daß man bei der Anzahl der maximal synthetisierbaren Verbindungen relativ begrenzt ist: Es können „nur“ zwischen 10^2 - 10^4 Verbindungen synthetisiert werden.

Um die Begrenztheit bezüglich der Anzahl an Verbindungen zu überwinden, wurde die „One-bead-one-peptide“ (OBOP)-Methode entwickelt [74-76].

Die „One-bead-one-peptide“-Methode

Bei dieser Methode geht man von einer gegebenen Harzmenge aus, die im ersten Schritt in n gleiche Portionen aufgeteilt wird. Die Anzahl der Portionen ist abhängig von der Varianz der Aminosäuren an der nächsten Position der Peptidsequenz: Möchte man z. B. alle 20 natürlichen Aminosäuren an der jeweiligen Position variieren, so wird das Harz in 20 gleiche Portionen aufgeteilt. Nach der Kupplung der jeweiligen Aminosäure in der jeweiligen Fraktion, werden die Portionen wieder vereinigt und das Harz gründlich gemischt. Nach Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe wird dann das Harz entsprechend der Varianz der nächsten Position des Peptids erneut aufgeteilt, die Aminosäuren gekuppelt und die Portionen anschließend vereinigt. Das Ergebnis ist eine Peptidbibliothek von harzgebundenen Peptiden, bei der auf jeder Harzkugel (engl. bead) nur einheitliche, identische Sequenzen vorhanden sind. Die Anzahl der harzgebundenen Peptide ergibt sich aus der Zahl der Aminosäurepositionen multipliziert mit den jeweiligen Varianzen.

1 Einleitung

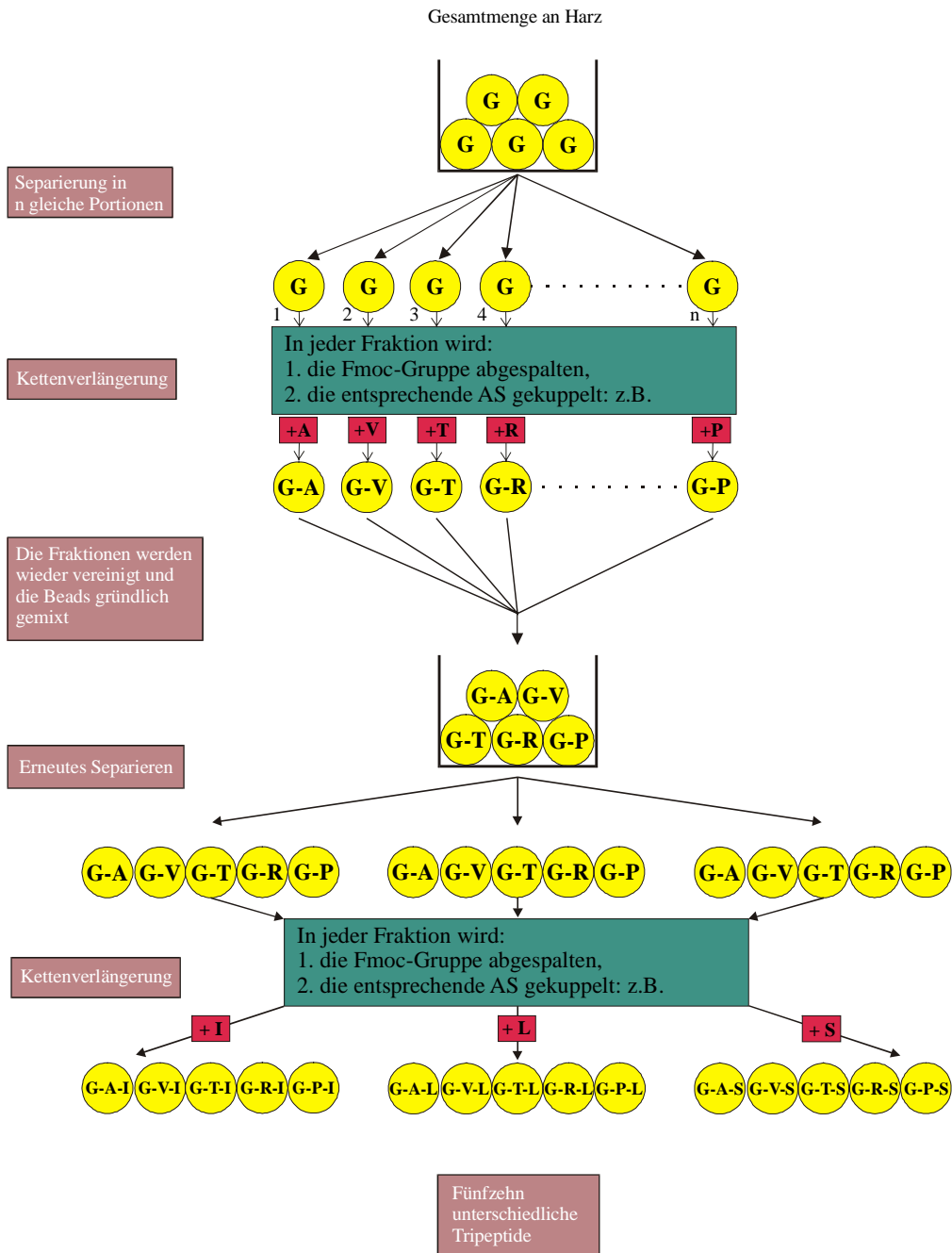


Abb. 1.31: "One Bead One Peptide"-Methode

Nach der Fertigstellung des Peptids müssen die Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden. Je nach Wahl des Linkers werden die Peptide bei diesem Vorgang nicht vom Harz abgespalten, so daß man sie in harzgebundener Form einem Test unterziehen kann. Dies ist die notwendige Voraussetzung dafür, daß aktive Verbindungen nach dem Test isoliert werden können.

Mit der OBOP-Methode läßt sich in kurzer Zeit, und bedingt durch die geringe Ausdehnung der Harzkugeln (Durchmesser = 40-80 μm), eine enorm große Zahl von Peptiden synthetisieren: Ein Gramm Harz hat gequollen ein Volumen von ca. 10 cm^3 und besteht aus ungefähr 3 Mio. Harzkugeln!

Der Nachteil dieser Methode ist, daß man nicht weiß, welche Verbindung auf welcher Harzkugel ist, bzw. entsprechend nach dem Test, welche Verbindung Aktivität zeigt. Unter Umständen ist eine aufwendige Analytik notwendig.

Die Synthesechemie muß sehr ausgereift sein, da Synthesekontrollen bei einer so großen Zahl von Substanzen im Gemisch kaum möglich ist. Es sollten Ausbeuten von deutlich über 90% zu erzielen sein. Das trifft für die Peptidchemie meistens zu. Bei anderen organisch-chemischen Reaktionen müssen u.U. erst die Reaktionen optimiert werden, bevor man mit der Synthese einer Substanzbibliothek beginnen kann.

In dieser Doktorarbeit wurde eine Kombination aus kombinatorischer Peptidsynthese und divergenter Synthese verwendet, um sich eine Analytik der Harzkugeln zu sparen. Die Sequenz war durch den gegebenen Syntheseweg bekannt, die Peptide wurden jeweils vom Harz abgespalten, die Schutzgruppen entfernt und in freier gelöster Form dem Screening unterworfen. Allerdings waren die Peptidbibliotheken mit 625 verschiedenen Peptiden daher auch recht klein.

1.6 Phage Display

Phage Display bietet eine effektive Methode, um aus großen Peptid-Bibliotheken neue Peptidliganden für z.B. Rezeptoren oder Proteine zu isolieren und deren Sequenz aufzuklären. Gerade für die Suche nach kleinen, peptidischen Liganden, welche als Leitstrukturen für potentielle Arzneimittel dienen können, ist Phage Display geeignet. Da RNA ein biologisch interessantes und vielseitiges Molekül ist, wäre es von Nutzen, Phage Display auch hierauf anzuwenden. Um spezifische Bindung kleiner Moleküle an eine pharmakologisch interessante RNA-Zielsequenz zu finden, ist es ausreichend, synthetisch leicht zugängliche, relativ kleine RNA-Oligonukleotide als Drug Target einzusetzen. Dazu müssen diese RNA-Oligonukleotide auf einem festen Träger immobilisiert werden, um während repetetiver Affinitätschritte für die Selektion der Liganden auf Bindungsfähigkeit in adäquater Form zur Verfügung zu stehen.

Gerade in den letzten Jahren hat die Phage Display Technologie in vielen Anwendungsbereichen eine explosive Entwicklung genommen. Phage Display wurde entwickelt [77,78], um den Phenotyp der an der Oberfläche dargestellten Peptide mit dem dieses Peptid codierende Genotyp im selben Viruspartikel (Phagen) zu verknüpfen. Dadurch ist es möglich, die Sequenz eines Peptides einer z.T. sehr großen Bibliothek nach einem Bindungsscreening durch Amplifizierung und Sequenzierung zu analysieren, was in der chemischen Kombinatorik u.U. große Probleme bereitet.

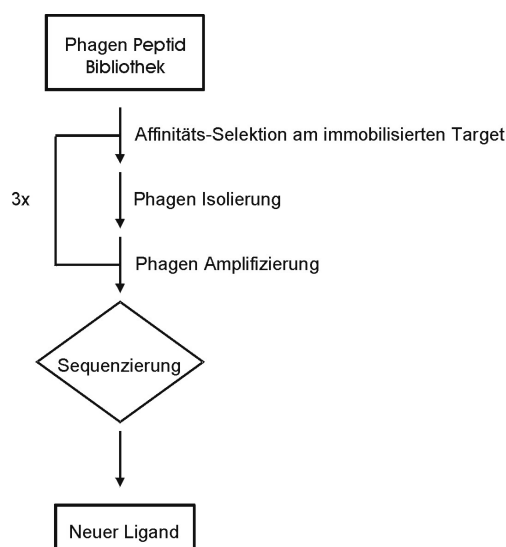


Abb. 1.32: Schematische Darstellung des Phage Displays

Dafür wurden Peptid-Bibliotheken durch ortsspezifische Mutationen im Genom der Phagen eingeführt, um diese Peptide in bestimmte Oberflächenproteinen darzustellen und deren Bindungsfähigkeit an z.B. Antikörper zu untersuchen [78-80]. Mit dieser molekularbiologischen Methode besteht nun die Möglichkeit, konventionelle Leitstruktursuchen deutlich zu beschleunigen. Dazu wird ein Pool verschiedener Phagen durch wiederholende Affinitäts-/Reinigungs- und Amplifizierungsschritte an einem immobilisierten Targetmolekül selektiert, bis ein bestimmter Phagentyp mit dem jeweils optimal bindendem Peptid an seiner Oberfläche übrigbleibt. Diese Primärstruktur (Konsensussequenz) ist nach erneuter Amplifizierung durch Sequenzierung zugänglich.

Als Vektor für das Phage Display werden meist *E.coli* Bacteriophagen des Typs fd oder M13 verwendet. Diese haben ein einzelsträngiges cyclisches DNA-Genom, welches in Partikel (ca. 65x1) mit Strukturproteinen gepackt ist [81]. Eines davon ist das g3p (Gen III Protein), welches zur Infektion von *E.coli* notwendig ist. Es ist ca. 3-5 mal auf dem Phagen vorhanden. Mit über 2000 mal pro Virus ist das g8p (Gen VIII Protein) das Haupthüllprotein. g3p, wie auch g8p besitzen exponierte N-Termini, welche zur Präsentation von Peptiden an der Phagenoberfläche geeignet sind. Je nach Problemstellung empfiehlt es sich, eine der beiden Methoden auszuwählen. Die Funktion des g3p, die Infektion der *E.coli*, wird durch die eingefügte Peptid-Sequenz in der Regel nicht beeinflusst. Der glycinreiche N-Terminus dient als natürlicher Spacer/Linker zwischen Peptid und g3p. Ferner besteht die Möglichkeit, teilweise g3p/g8p-Wildtyp und g3p/g8p-Fusionsprotein auf einem Phagen darzustellen [82,83].

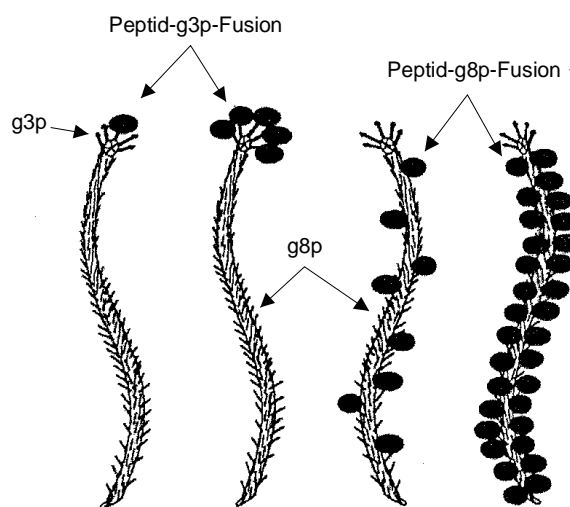


Abb. 1.33: verschiedene Virus-Partikel

1 Einleitung

Um auf 1:1-Bindungspartner zu screenen, bietet es sich an, das g3p-Protein zum Phage Display auszuwählen (monovalent), da so Mehrfachbindung oder Chelatisierungseffekte des Phagen mit dem Target vermieden werden sollten. Dieses ist aufgrund der großen Anzahl der auf der Phagenoberfläche vorhandenen g8p-Moleküle nicht auszuschließen (polyvalent). Andererseits bietet sich so via g8p die Möglichkeit auch schwächer bindende Partner zu finden, welche im g3p-Screening nicht aufgefallen wären. Um die Vorteile beider Systeme zu vereinigen, kann man erst mit polyvalentem Display auf Bindungsfähigkeit screenen und dann die so erhaltenen Ergebnisse mit monovalentem Display optimieren [84]. Erfahrungsgemäß sind durch polyvalenten Display Affinitäten von bis zu $K_d \approx 100 \mu\text{M}$ [81] zugänglich, mit monovalenten Display K_d -Werte von bis zu 1-10 μM [85].

Bisherige Anwendungen der Phage Display Technik lagen oft bei der Aufklärung von Bindungs-Stellen von Proteinen, Antikörpern [86,87] oder diversen Rezeptoren [88-90]. Die Anwendung der gefundenen Seitenketten-Gruppen der jeweiligen Aminosäuresequenz auf das Design von nicht-peptidischen organischen Molekülen, eröffnet die Möglichkeit zur Wirkstoffsynthese. Eine kleine Auswahl bisher erhaltener Ergebnisse sei nachfolgend aufgeführt:

Target-Molekül	Gefundene Peptide ^{a)}	Aktivität [μM] ^{b)}	Lit.
Streptavidin	HPQF (Konsensus-Sequenz)	-	[80]
Concanavalin A	DVFY <u>PYPY</u> ASGS	46	[91]
Erythropoietin Rezeptor	GG <u>CRIGPITW</u> VCGG cyc.	10	[88]
Urokinase Rezeptor	AEPMPHSLN <u>F</u> SQYLWYT	0.01	[90]

^{a)} Funktionell wichtige Aminosäuren sind unterstrichen

^{b)} K_d bei Peptiden und IC_{50} bei Konsensus-Sequenzen

Tabelle 1.4: Repräsentative Peptide, dem Phage Display entnommen

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die optimale Präsentation des molekularen Targets während der Screenings-Prozedur. Die Bandbreite reicht von einfacher, unspezifischer Adsorption des

Target-Moleküls auf einem polymeren Träger (z.B. Petrischalen, Mikrotiterplatten, Röhrchen) bis zum kovalenten und spezifischen Kuppeln an die feste Phase. Spezifische Immobilisierung kann durch Einfügen eines undimerisierten Cystein in das Target Protein erreicht werden, welches dann mit einem entsprechend derivatisiertem polymeren Träger reagieren kann.

Um Konglomeration während des Screenings zu vermeiden, kann man z.B. die Dichte des Targets auf der Polymer-Oberfläche ändern (meistens Verringern), um während des Bindungs-Testes 1:1-Bindung zu bevorzugen.

Die Größe der dargestellten Peptid-Bibliothek ist limitiert durch die Anzahl der transfizierten *E.coli*, welche erwartet werden können. Da Peptid-Bibliotheken sehr schnell, sehr groß werden können, darf man diesen Punkt nicht vernachlässigen. Die praktikable Grenze liegt bei 10^7 - 10^9 unabhängige Formen. Das bedeutet, daß die Größe der Bibliothek, bei der alle möglichen Peptidsequenzen mit 99%igen Wahrscheinlichkeit auf dem Phagen dargestellt werden, bei $n=6-8$ [92] liegt.

Dabei sei zu erwähnen, daß auch nicht vollständige Peptid-Bibliotheken beim Screening Konsensus-Sequenzen liefern können. Eine Strategie wäre es auch, erst Teilbereiche eines größeren Peptides vollständig zu randomisieren, Konsensus-Sequenzen zu finden, und dann das gleiche mit den bisher fixierten Bereichen zu tun.

Um möglichst nur Wechselwirkungen zwischen Target-Molekül und dem fusioniertem Peptid zu beleuchten, bietet es sich ggf. an, Blindproben mit nicht-Target immobilisierten Platten durchzuführen.

So konnten schon Tyr/Trp-reiche Konsensussequenzen identifiziert werden, welche spezifisch an bestimmte Typen von Kunststoffplatten binden [93]. Ferner kann das Bindungs-Screening-Experiment auch mit dem Phagen-Wildtyp kontrolliert werden, um Bindung mit anderen Phagen-Oberflächen-Bestandteilen auszuschließen.

Zuerst wurden Bibliotheken linearer Peptide ($n = 6-10$) hergestellt. Diese sind leicht zugänglich und mittlerweile sogar kommerziell erhältlich. Durch ein Paar relativ nahe beieinanderliegenden Cysteine lassen sich unter milden oxidierenden Bedingungen einfach Disulfid-Brücken ausbilden. Durch diese verringerte konformelle Flexibilität lassen sich oft erhöhte Bindungsaffinitäten erreichen. So zeigt der peptidische Streptavidin Ligand FSHPQNT ein $K_d = 130 \mu\text{M}$, wobei die cyclische variante CHPQFC mit $K_d = 0.27 \mu\text{M}$ einen deutlich besseren Wert aufweist [94-96]. Um solche Liganden zu finden, bietet sich eine

Bibliothek der Form CX_nC an, wobei $n > 10$ sein sollte, um verlässlich Disulfid-Brücken-Bildung zu erreichen.

Ein anderer Ansatz verfolgt die Strategie, ein pharmakologisch relevantes Bindungspaar (Protein, Rezeptor o.Ä.) zu nehmen und den natürlichen Liganden mit Phage Display durch Verkürzung und gezielte Variation, wenn möglich, zu minimieren, und die Bindungseigenschaften zu verbessern. Idealerweise sollte das so gefundene Molekül nur die für die Bindung essentiellen funktionellen Gruppen beinhalten und die für diese Funktion nicht notwendigen verloren haben. So könnte z.B. ein Antagonist für einen Rezeptor gefunden werden, welcher den natürlichen Liganden aus seiner Bindungstasche verdrängt und diese blockiert. Tatsächlich wurde das natürliche Hormon ANP (atrial natriuretic peptide), ein 28mer cyclisches disulfidverbrücktes Hormon mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 0.8 \text{ nM}$ zu einem Rezeptor mit einer Serie von Phage Display minimiert. Man erhielt so ein ebenfalls cyclisches 15mer Peptid mit einer $K_d = 5.9 \text{ nM}$ [97].

Ein anderer Weg ist, mit einer unbekanntes Bibliothek ein lohnenswertes Target zu screenen. So kann man in einen beliebigen biologischen Mechanismus an einer bestimmten Stelle eingreifen, zu der es keine bekannten (niedermolekularen) Bindungspartner gibt (de novo Konstruktion von Epitopen). So wurde mit Phage Display für das Cytokin IL-1 ein Antagonist, das Peptid RLVYWQPYSVWQR gefunden. Dieses Peptid mit einem IC_{50} -Wert von $59 \mu\text{M}$ verhindert die Bindung von IL-1 an seinen Rezeptor[84].

Meist werden Antikörper oder Proteine unspezifisch durch Adsorption an der Polymer-Oberfläche immobilisiert. Diese Vorgehensweise ist für so kleine Oligonukleotide nicht sinnvoll, da hier größere Gefahr besteht, daß durch die Adsorption keine einheitliche (immobilisierte) RNA-Sekundärstruktur erreicht werden kann. Um also RNA/polymerer Träger Wechselwirkungen möglichst zu unterdrücken, wird vorgeschlagen, das 3'-Ende der RNA zu biotinylieren und zwischen RNA und Biotin einen längeren flexiblen Spacer einzuführen. Um dies zu erreichen, kann auf die bekannte chemische Festphasensynthese zurückgegriffen werden. Die biotinylierte RNA kann nun an adsorptiv gebundenem Streptavidin fixiert werden; ihre Sekundärstruktur sollte quasi in Lösung erhalten bleiben.

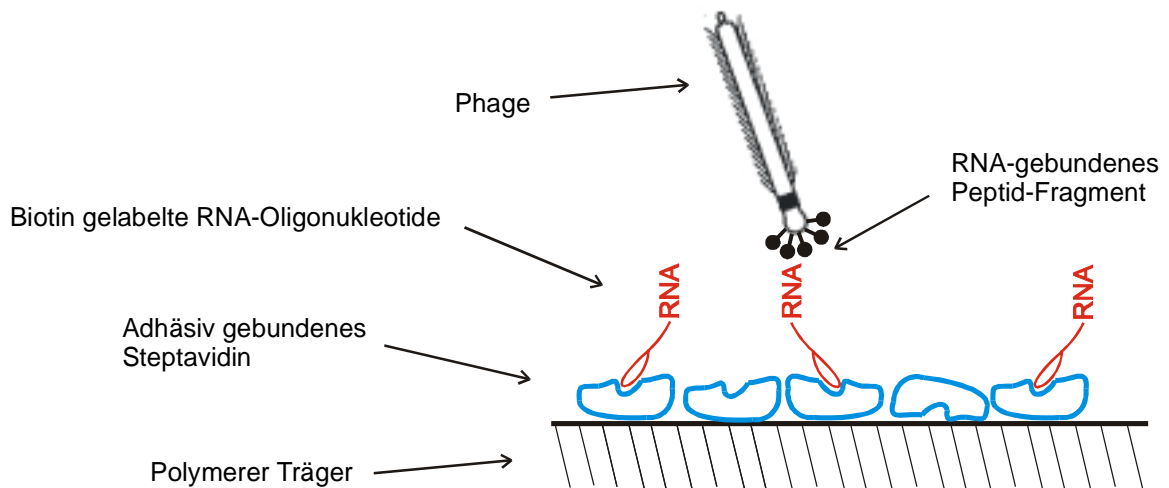


Abb. 1.34: Selektion der Phagen-Peptidbibliothek an der immobilisierten RNA

Um die Peptid-Bibliothek auf der Phagenoberfläche darzustellen, müssen die jeweiligen DNA-Sequenzen in das Genom der Phagen an der entsprechenden Stelle inkloniert werden. Als Fusionsprotein wird das g3p verwendet, um 1:1-Bindung zu bevorzugen und gezielt nach Liganden mit kleinem K_d zu suchen. Alle dem Screening extrahierten Peptid-Sequenzen sollen chemisch nachsynthetisiert werden und ihre offensichtliche Bindungsaffinität der RNA gegenüber durch NMR-Spektroskopie überprüft werden.

Zur Darstellung einer Peptid-Bibliothek eignet sich z.B. der Bakteriophage M13. Ein geeigneter Vektor ist der nachfolgend dargestellte, M13KE, ein M13-Derivat mit gentechnisch eingeführten Clonierungs-Stellen für N-terminale g3p-Fusion. Die ACC65 I und Eag I Schnittstellen sind schematisch dargestellt [98].

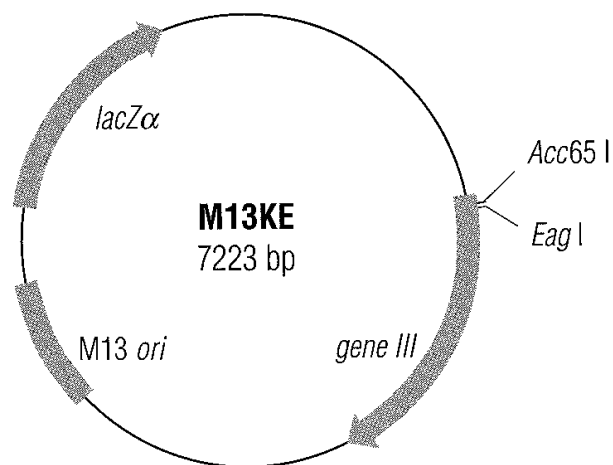


Abb. 1.35: Gen-Karte von M13KE

1 Einleitung

So lassen sich Peptide mit 20-30 AA darstellen, ohne die Funktion des g3p zu beeinträchtigen. Die Phagen-Bibliotheken mit z.B. Heptabibliotheken sind kommerziell erhältlich [98].

Die Konstruktion einer Peptid-Bibliothek geschieht folgendermaßen. Der Vektor wird durch entsprechende Restriktionsenzyme gespalten und durch Ligation ein degeneriertes Fragment eingeführt. Dieses beinhaltet nun z.B. Heptapeptid-Bibliothek, sowie einen Spacer (Gly, Gly, Gly) um das dargestellte Peptid zusätzlich vom g3p zu isolieren. Das veränderte Fragment mit der DNA-Bibliothek (N = G/A/T/C, K = G/T, M = C/A) wird chemisch synthetisiert. Der fertige Vektor ist nun bereit, um in *E.coli* ER2537 transformiert zu werden [99]. Die so veränderten *E.coli*-Bakterien können nun die mit den rekombinanten g3p versehenen Phagen exprimieren.

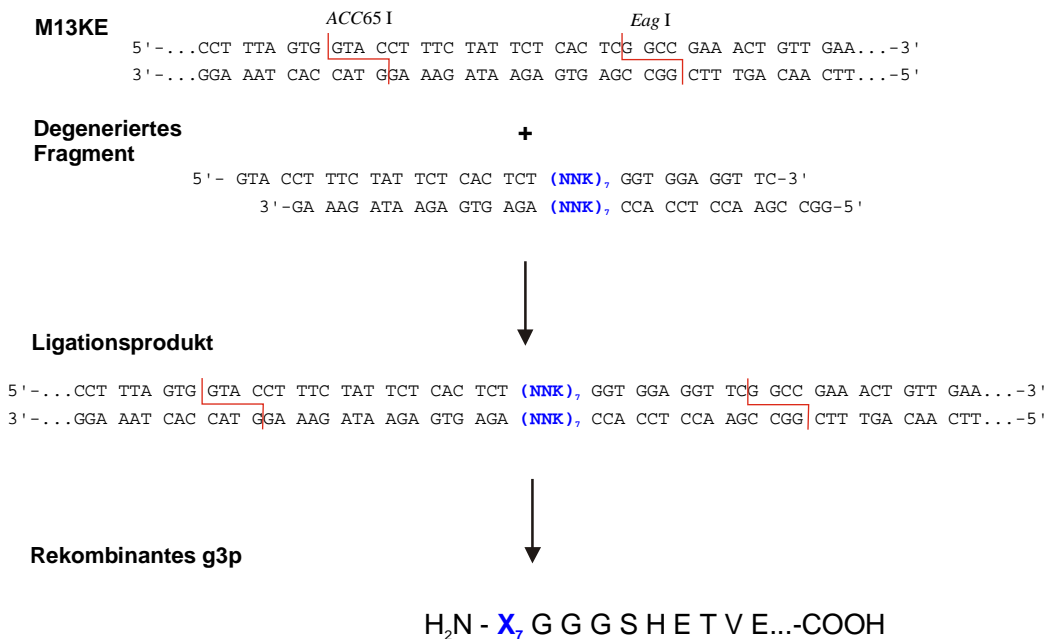


Abb. 1.36: Konstruktion einer Peptid-Bibliothek

1.7 RNA-Synthese und Struktur

Die Zahl der Studien an Oligonukleotiden, insbesondere an RNA-Oligonukleotiden, ist viel kleiner als die an Proteinen. Eine Ursache ist die schwierigere präparative Zugänglichkeit dieser Biomakromoleküle. Seit der Entwicklung der Oligonukleotid-Festphasensynthese und der biochemischen RNA-Synthese über die templatgesteuerte Polymerisation hat sich die Situation verbessert. DNA-Moleküle sind mit der chemischen Festphasensynthese bis zu einer Länge von 50-70 Basen nahezu problemlos zugänglich und kommerziell erhältlich. Bei RNA bietet diese Methode allerdings nur bis zu einer Länge von ca. 20 Basen zufriedenstellende Ergebnisse. Besonders bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist man auf ein einheitliches und von Verunreinigungen freies Produkt angewiesen. Hier gelangt man also schnell an die Grenzen der Möglichkeiten, welche die der chemischen Festphasensynthese bietet. Allerdings lassen sich mittels der chemischen Festphasensynthese gezielt isotoopenmarkierte (^{15}N , ^{13}C) Nukleotide an bestimmte Stellen der Nukleinsäuresequenz einbauen.

Als Alternative existiert die biochemische RNA-Synthese über die DNA-templatgesteuerte Polymerisation [2,100,101,102]. DNA ist einfacher mittels chemischer Festphasensynthese zugänglich als RNA. So besteht die Möglichkeit mittels z.B. der T7 RNA Polymerase die chemisch synthetisierte DNA in RNA zu transkribieren. Zudem findet, da jeder DNA-Strang mehrfach transkribiert wird, eine Amplifizierung statt. Da bei dieser Methode allerdings auch kürzere Abbruchsequenzen und auch lange Fehlsequenzen entstehen, nämlich meist neben der gewünschten Sequenz auch diese plus 1 Nukleotid, steht man nach der Synthese vor einem z.T. unlösbaren Reinigungsproblem. Mittels der biochemischen RNA-Synthese über die DNA-templatgesteuerte Polymerisation läßt sich die gesamte Zielsequenz auf einfache Weise isotoopenmarkieren, indem man nur die isotoopenmarkierten NTP's in der Transkriptionsreaktion einsetzt. Eine gezielte Isotoopenmarkierung einzelner Nukleotide ist so nicht möglich. Die hierfür erforderlichen Ligationstechniken [103] arbeiten nicht sehr zuverlässig und nur mit schlechter Ausbeute.

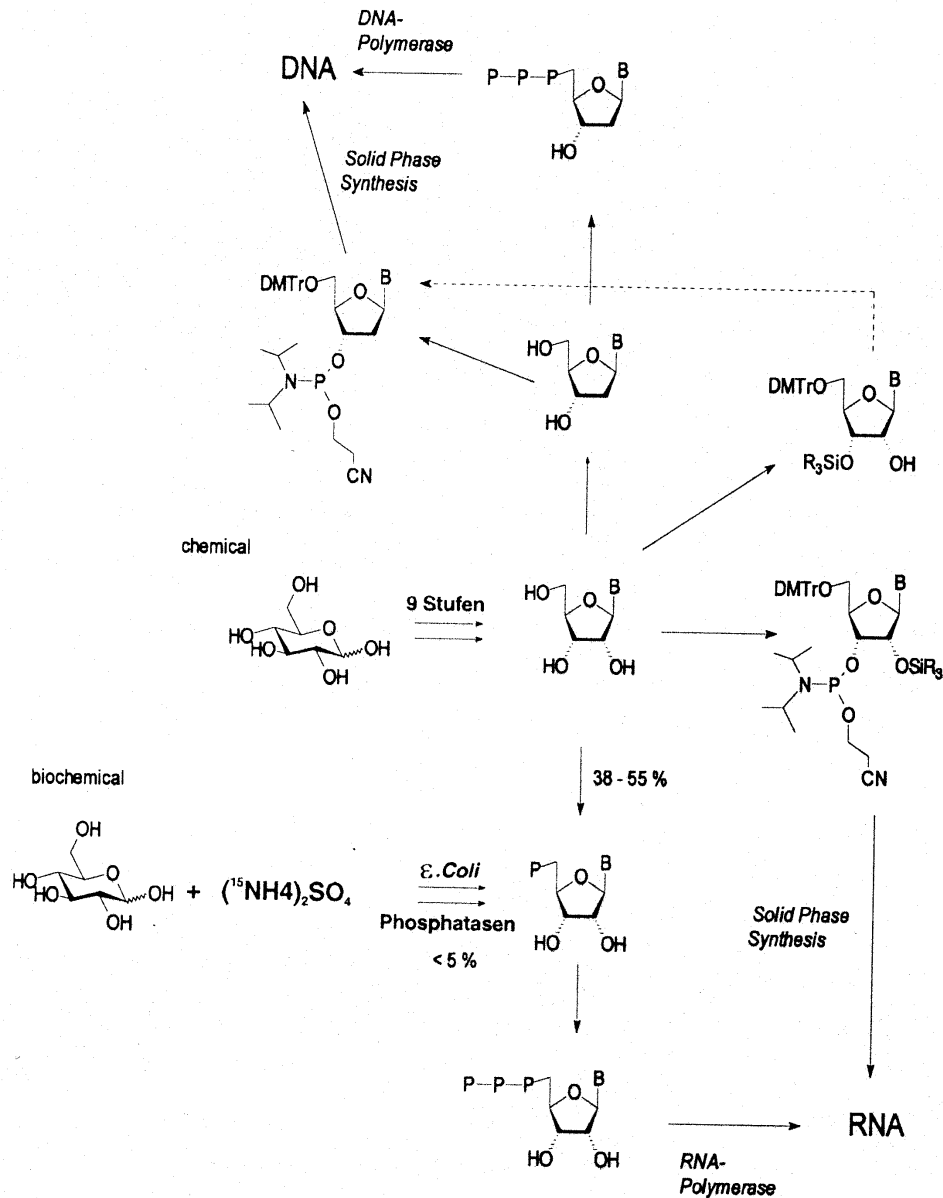


Abb. 1.37: Chemische und biochemische Oligonukleotidsynthese

Stärker als DNA-Oligonukleotide sind RNA-Nukeotid in der Lage, eine Vielzahl von Strukturen wie Hairpins, Duplexe, Loops, Junctions, Bulges oder einzelsträngige Bereiche auszubilden [104].

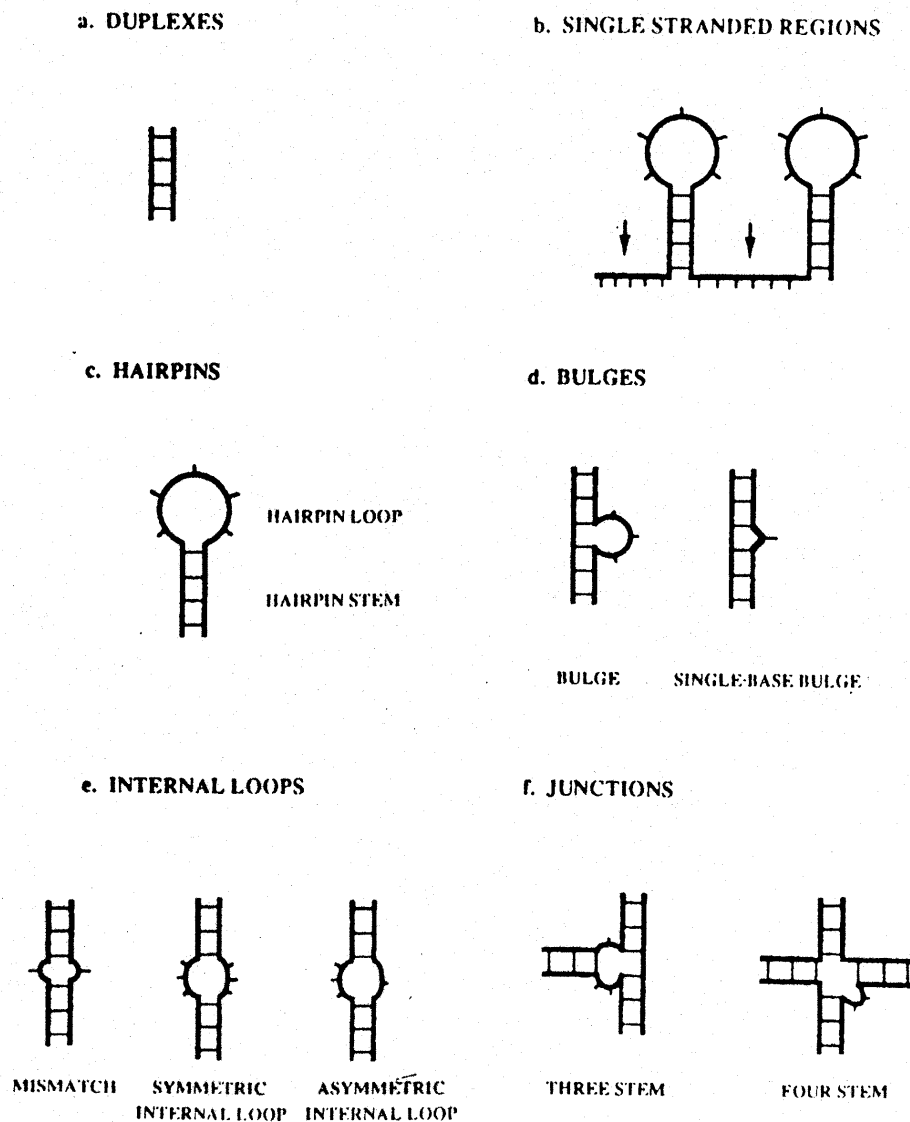


Abb. 1.38: Strukturmöglichkeiten von RNA

Eine Ursache für diese Strukturvariabilität ist die Möglichkeit, verschiedene Basenpaarungen zu bilden. Die stabilsten, und damit auch die häufigsten Basenpaarungen, sind die Watson-Crick-Basenpaarungen AU und CG.

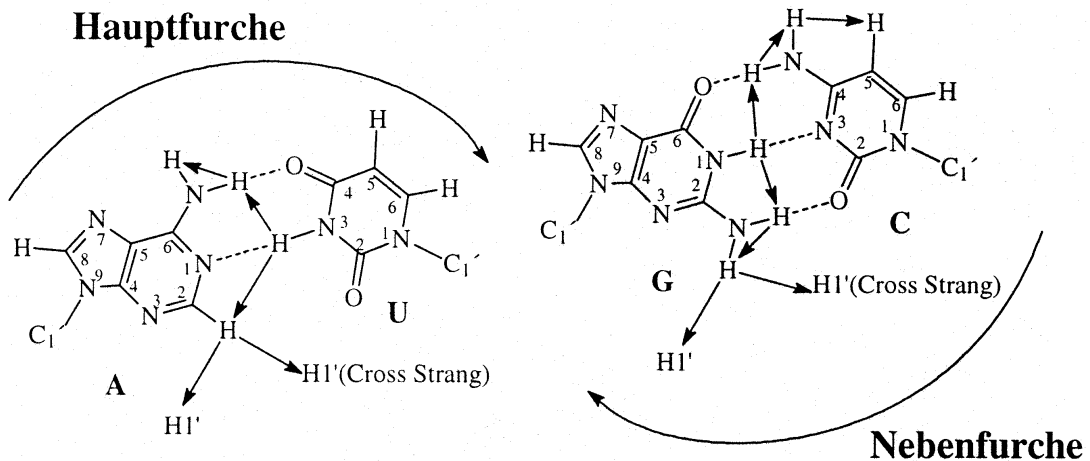


Abb. 1.39: Darstellung der Watson-Crick-Basenpaarung AU und CG

Nach den Untersuchungen von Turner [105-106] lassen sich die nicht-kanonischen Basenpaare nach abnehmender Stabilität ordnen.



Aufgrund der Vielzahl von Strukturmöglichkeiten bei RNA-Oligonukleotiden liegen mehrere Formen häufig nebeneinander, z.T. im Gleichgewicht, vor. Diese konformationelle Inhomogenität einiger RNA-Sequenzen kann eine Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie aufgrund von Überlagerungen unmöglich machen.

1.8 NMR-Spektroskopie an Biomolekülen

Der erste Schritt einer NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung ist eine vollständige Zuordnung der Protonenresonanzen. Bei RNA-Oligonukleotiden ist die Nukleotideinheit mit dem Phosphodiesterückgrat und den Basen die strukturelle Einheit.

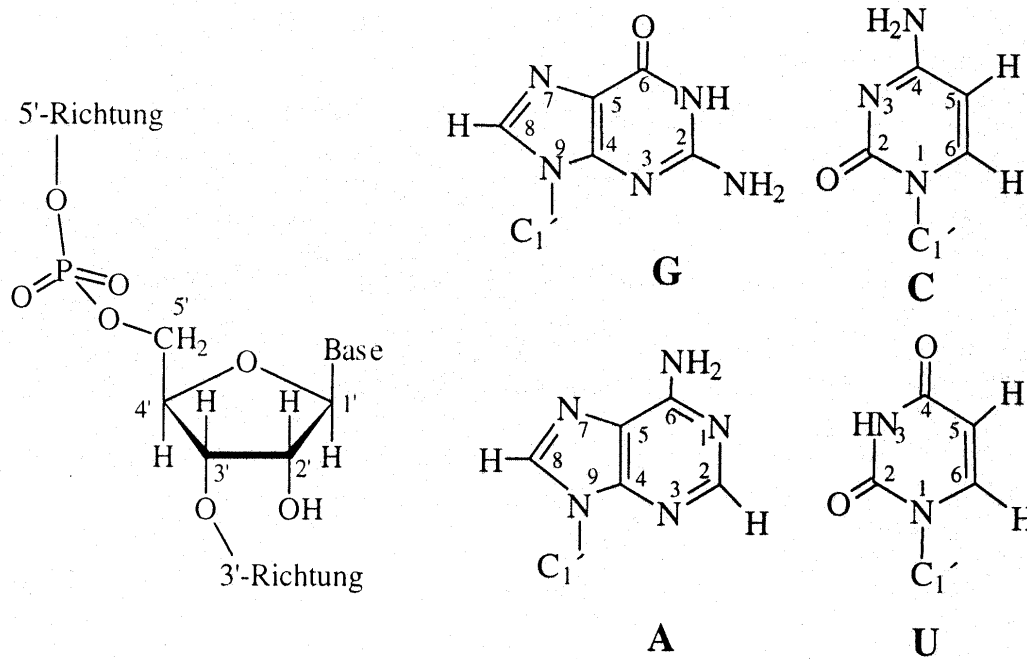


Abb. 1.40: Konstitution von RNA-Nukleotiden: Guanin (G), Cytosin (C), Adenin (A), Uracil (U) und der Ribosering

In RNA ist die Zuordnung der Protonen aufgrund folgender Verhältnisse besonders schwierig:

- Die Protonen der Basen und des Riboseringes sind nicht skalar gekoppelt. Die einzelnen Nukleotide bilden keine zusammenhängenden Protonen-Spinsysteme, wie die Aminosäuren in Proteinen.
- Die ^3J -Kopplungen zwischen den Protonen des Riboseringes sind konformationsabhängig (C_2' oder C_3' -endo). In der Hauptkonformation ist die Größe der skalaren Kopplung ungünstig, so daß die auf skalare Kopplungen beruhenden homonuklearen NMR-Experimente, COSY und TOCSY, für die Zuordnung im Ribosering wenig nützlich sind. Bei der in RNA üblicherweise vorliegende C_3' -endo-Konformation steht das H_2' zum anomeren H_1' in einem Winkel von fast 90° und die $^3\text{J}_{\text{H}_1'/\text{H}_2'}$ -Kopplungskonstante beträgt 1-2Hz, so daß homonukleare Techniken der Korrelation von H_1' zum Rest der Protonen der Riboseinheit scheitern
- Die Unterscheidung zwischen Purin und Pyrimidin ist einfach, weil für C und U jeweils der vicinale H_5/H_6 -Kreuzpeak im COSY und im NOESY zu beobachten ist. Das H_8 der Purine hat dagegen keinen Kopplungspartner. Die Unterscheidung von G und A sowie C

1 Einleitung

und U aufgrund der chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen ist nur über die Sequenz zu treffen.

- Generell ist die Dispersion der chemischen Verschiebungen bei RNA nur sehr klein. Alle Riboseprotonen in RNA-Oligonukleotiden, mit Ausnahme von H_{1'}, kommen zwischen 4 und 5 ppm, die Aromaten- und Aminoprotonen zwischen 7 und 9 ppm zur Resonanz.

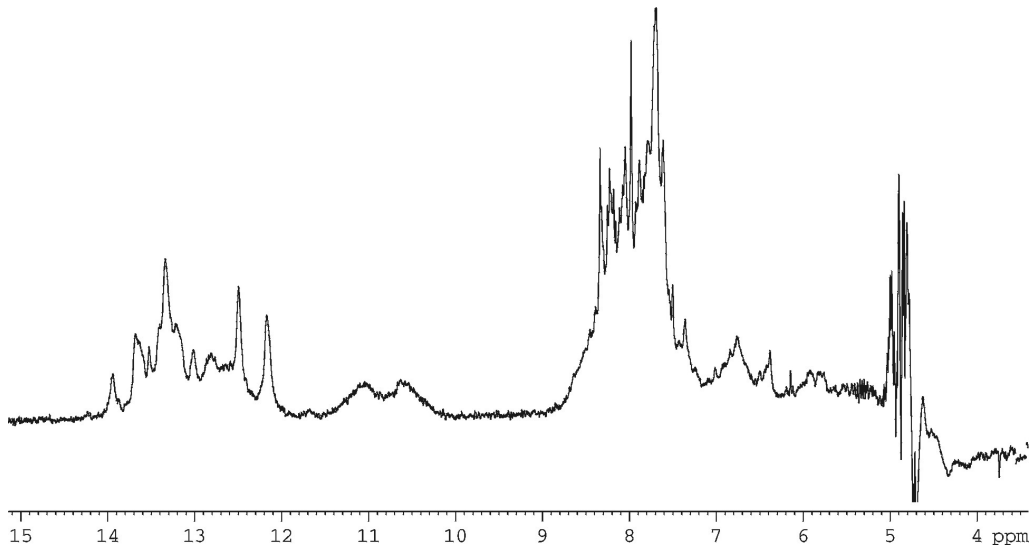


Abb. 1.41: 1D Jump Return ¹H Spektrum von einem 0.4 mM 23mer RNA in H₂O, 600 MHz, 280K, pH 6.6

Für eine vollständige Zuordnung der Protonen von RNA sind 2 und 3 dimensionale NMR-Experimente mit ¹³C/¹⁵N-markierten RNA-Oligonukleotiden unerlässlich. Die ³¹P-chemische Verschiebung kann für eine sequenzielle Zuordnung sowie für die Aufklärung der Konformation um die Torsionswinkel α und ζ genutzt werden.

Iminoprotonen können nur beobachtet und zugeordnet werden, wenn sich diese z.B. mit einem Antisense-Strang in Basenpaarung befinden, und damit ihr Austausch mit dem Lösungsmittel H₂O verlangsamt ist.

1.9 Aufgabenstellung

RNA mit seiner großen strukturellen und funktionellen Vielfalt ist ein attraktives Target-Molekül für die Wirkstoffsuche. In dieser Arbeit sollen niedermolekulare RNA-Liganden synthetisiert werden, welche potentielle Inhibitoren der reversen Transkription und Translation von RNA darstellen.

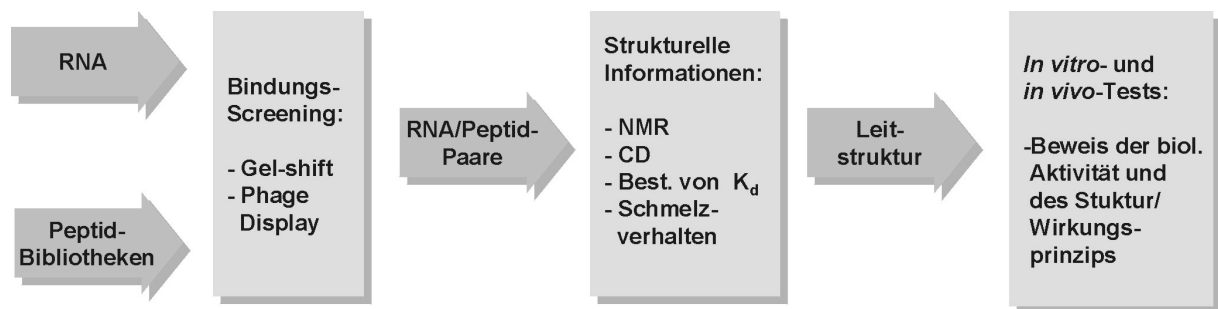


Abb. 1.42: Strategie zum RNA-Liganden-Suche

Die RNA-Targetmoleküle sollen gemäß des reduktionistischen Ansatzes kleine Oligonukleotide (ein 23mer und ein 27mer) sein. In dieser Vorgehensweise wird das Zielmolekül auf einen kleinen funktional wichtigen Abschnitt reduziert und nur dieser als Targetmolekül benutzt. Diese kleinen Teile sind oft synthetisch leichter zugänglich und mittels biophysikalischen Methoden schneller und einfacher zu untersuchen. Zur Ligandensuche wird einerseits die klassische kombinatorische Festphasenpeptidsynthese, sowie die molekularbiologische Methode des Phage Displays eingesetzt. Die RNA-Bindungseigenschaften der gefundenen Peptide sollen mit verschiedenen biophysikalischen Methoden, insbesondere der NMR-Spektroskopie, verifiziert und ihre physiologische Aktivität bewiesen werden.

2.1 Synthesen der Peptide und Peptidbibliotheken

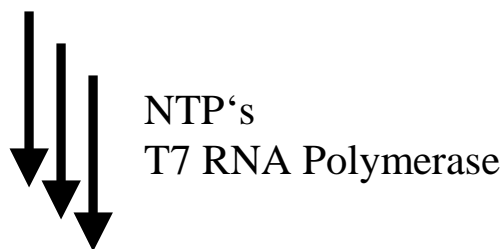
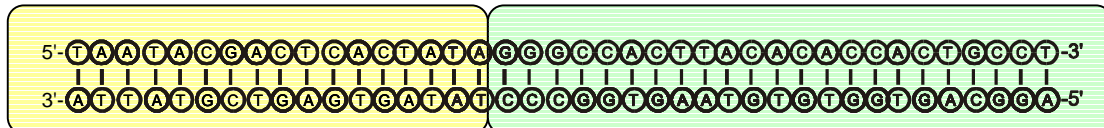
Die der kombinatorischen Peptid-Bibliotheken entnommen Sequenzen wurden mit linearer Peptid-Synthese nachsynthetisiert. Zu einem waren für weitere Untersuchungen größere Substanzmengen notwendig, als die Peptid-Bibliotheken hergaben, zum anderen mußten für *in vivo*- und *in vitro*-Experimente verschiedene Modifikationen an der Struktur vorgenommen werden. Die linearen Synthesen wurden fast ausschließlich, im Gegensatz zu den Peptid-Bibliotheken, an einem Peptid-Synthesizer hergestellt. Dennoch mußte die Biotin-Modifikation bei allen Peptiden manuell angekuppelt werden. Die Automatisierungstechnik des Peptidsynthesizers war nicht flexibel genug, um Biotin als Reagenz zu verwenden, die Löslichkeit in DMF reicht nicht aus. Außerdem muß bei der Kupplung von Fmoc-NH- β A-COOH- die reguläre Kupplungszeit (30 min) auf 1h verdoppelt werden, da diese sonst unvollständig verläuft. Sämtliche linearen Peptide wurden, wie auch die kombinatorischen Peptid-Bibliotheken, mit dem Rink Amid MBHA Harz nach der Fmoc/t.-Butyl Strategie unter DIC/HOBt-Aktivierung hergestellt. Nach der Synthese wurde die Strategie gewählt, die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen in einem Schritt zu vollziehen. Hintergrund war hierfür die Minimierung der Arbeitsschritte und die daraus resultierende Zeitersparnis.

2.2 Synthese der RNA-Oligonukleotide

Alle RNA-Oligonukleotide wurden mittels DNA-templatsgesteuerter T7-Transkription dargestellt.

DNA: T7-Primer-Region

Templat-Region



RNA:

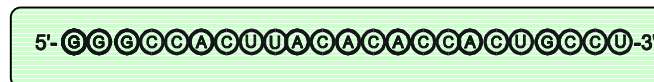


Abb.: 2.: T7-RNA Transkription

Die T7-RNA Polymerase erkennt sequenzspezifisch den T7-Primer und beginnt hinter vom Ende der Primerregion an, das DNA-Templat in RNA zu transkribieren.

2.2.1 Optimierung der T7-Transkriptionsreaktion

Um die Ausbeute der gewünschten Sequenz zu erhöhen, wurden z.T. die in der Literatur [2] gegebenen Standardtranskriptionsbedingungen optimiert. Reaktionsbedingungen, wie z.B. die Konzentration der NTP's können durchaus ein sequenzspezifisches Optimum aufweisen. Hierbei wurde in verschiedenen Reaktionsansätzen die NTP/MgCl₂-, die DNA-Templat- und die T7 RNA Polymerasekonzentration titriert.

2 Synthetischer Teil

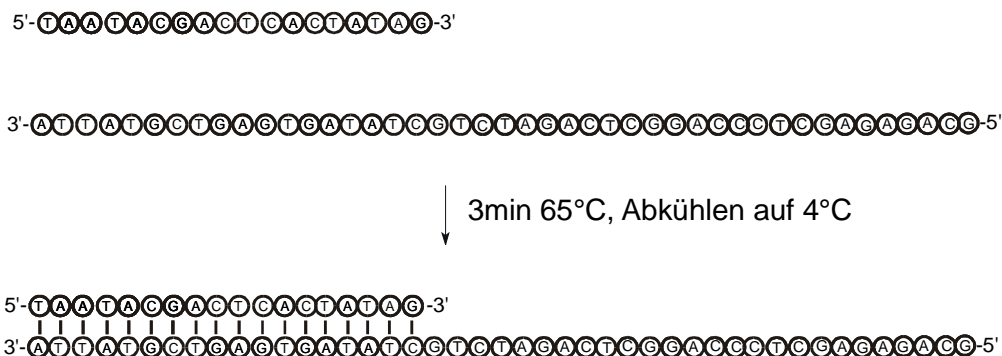
Δ TAR-RNA

Die Synthese dieses RNA 27mer Oligonukleotid ist in der Literatur [2] gut beschrieben. Folgende Standardreaktionsbedingungen erwiesen sich als hinreichend gut und wurden für die Synthese ohne weitere Optimierung übernommen:

T7-Primer	: 700 nM
Templat	: 600 nM
je NTP	: 4 mM
T7 RNA Polymerase	: ~25 U/ μ L
Tris·HCl	: 40 mM
MgCl ₂	: 30 mM
Spermidin HCl	: 1 mM
BSA	: 0.02% (2 mg/mL H ₂ O)
PEG-8000	: 5% (50 mg/mL H ₂ O)
Triton X-100	: 0.01%

Annealing:

Bei Synthese der Δ TAR-RNA war es ausreichend, daß DNA-Templat einzelsträngig einzusetzen und nur den T7 Primer als Doppelstrang vorliegen zu haben, welches durch Erhitzen der beiden käuflich erworbenen Einzelstänge auf 65°C und einfaches Abkühlen auf 4°C erreicht wurde.



2 Synthetischer Teil

1 DNA-Marker

2 44mer/17mer dsDNA-Templat

3 44mer ssDNA

4 17mer ssDNA

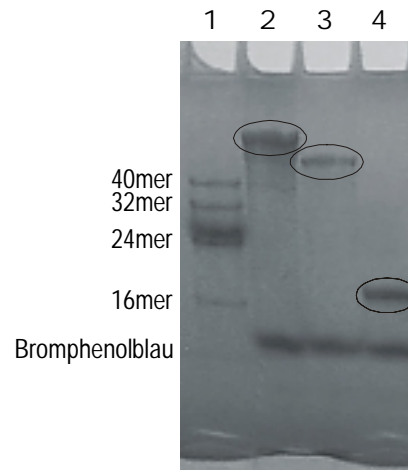
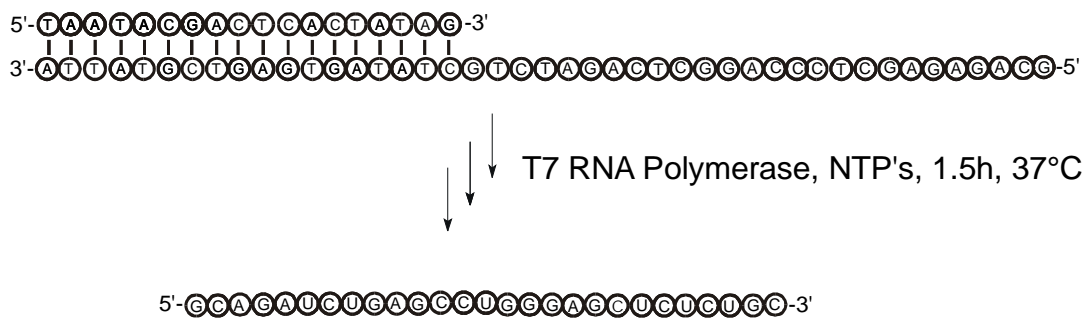


Abb. 2.2: Bildung des Δ TAR-RNA dsDNA Templates

Transkription:

Nach einer Reaktionszeit von 1.5 h bei 37°C unter den angegebenen Bedingungen wurde die Reaktion durch Erwärmen auf 80°C beendet. Längere Reaktionszeiten führten nicht zu höheren Ausbeuten von gebildetem RNA-Oligonukleotid.



1 DNA-Marker

2 Δ TAR-RNA Transkriptionsansatz

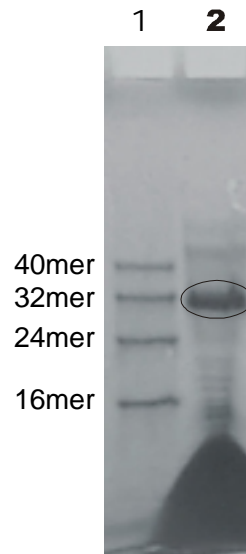


Abb. 2.3: Δ TAR-RNA Synthese (roh), das gewünschte Produkt ist deutlich zu erkennen

Um den während der Reaktion entstandenen Niederschlag zu entfernen, welcher aus Magnesiumphosphat/pyrophosphat besteht, wurde der Lösung solange 0.5 M EDTA (pH 6.5) zugegeben, bis diese klar wurde. Der Niederschlag entstammt aus den während der Synthese durch Spaltung der NTP's freigewordenen Phosphationen, welche mit Mg^{2+} einen unlöslichen Niederschlag bilden. Diese Trübung ist Hinweis und Voraussetzung für eine erfolgreiche Transkriptionsreaktion. Fehlgeschlagene Transkriptionen erkennt man häufig an dem Nichtauftreten dieser Trübung. Der Niederschlag wird mit EDTA entfernt, um evtl. mitausgefällene RNA in Lösung zu bringen.

Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion vorgenommen, um die Proteine (BSA, T7 RNA Polymerase) zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit Ethanol gefällt und als Reaktionskontrolle ein 19% Polyacrylamid-Gel (8 M Harnstoff, 1x TBE, 240 V/10cm, 40°C, unter UV-Licht) gemacht. Deutlich kann man das Hauptprodukt im Bereich des 30mer DNA-Markers sehen, welches aber aus zwei Banden besteht. Bei der T7 RNA Transkription wird meist die gewünschte Sequenz (27mer Δ TAR-RNA) und diese Sequenz plus 1 Nukleotid hergestellt. Um DNA-Templat Reste und Abbruchsequenzen, welche man im Bereich des 16mer DNA-Markers erkennen kann zu entfernen, wird das Reaktionsprodukt mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgereinigt.

2 Synthetischer Teil

1 DNA-Marker

2 Δ TAR-RNA (27mer)

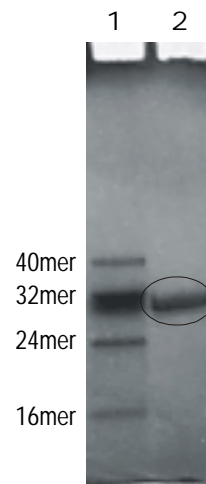
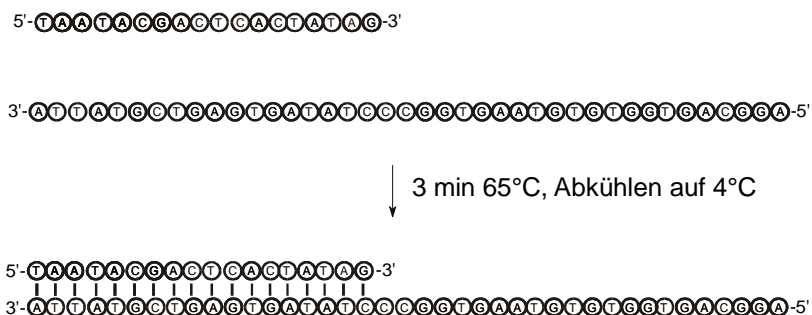


Abb. 2.4: Δ TAR-RNA nach Aufreinigung mittels denat. Gelelektrophorese

CETP-RNA

Die literaturbekannten Reaktionsbedingungen [2] führten bei dieser Sequenz zu keinem Erfolg. Es konnte kein erwünschtes Transkriptionsprodukt gefunden werden, sondern nur deutlich kürzere Abbruchsequenzen, bzw. unumgesetzte NTP's. Gemäß der Erfahrungen der Δ TAR-RNA-Synthese wurde analog das einzelsträngige DNA-Templat gebildet, um hiermit die Transkriptionsreaktion durchzuführen. Diese Vorgehensweise verlief aber erfolglos.

Annealing mit dsDNA Templat:



2 Synthetischer Teil

1 DNA-Marker

2 40mer/17mer dsDNA-Templat und
überschüssige 17mer ssDNA

3 40mer ssDNA

4 17mer ssDNA

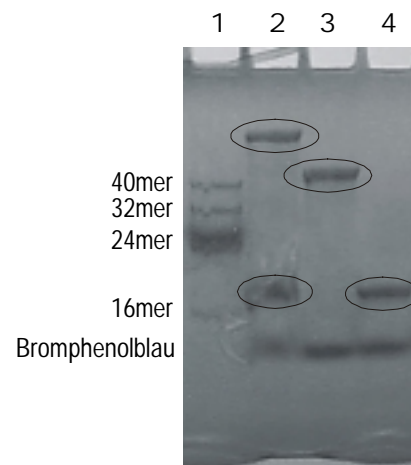


Abb.2.5: Bildung des dsDNA-Templats der CETP-RNA-Transkription

Transkription mit ssDNA-Templat:

Die Transkriptionsreaktion mit einzelsträngigem DNA-Templat, welche bei der Δ TAR-RNA erfolgreich verläuft, führt bei der CETP-RNA aber zu keinem erkennbarem Produkt.



X T7 RNA Polymerase, NTP's, 1h, 37°C

keine Transkription

1 DNA-Marker

2 erfolglose Transkriptionsreaktion

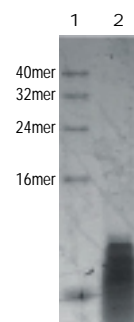


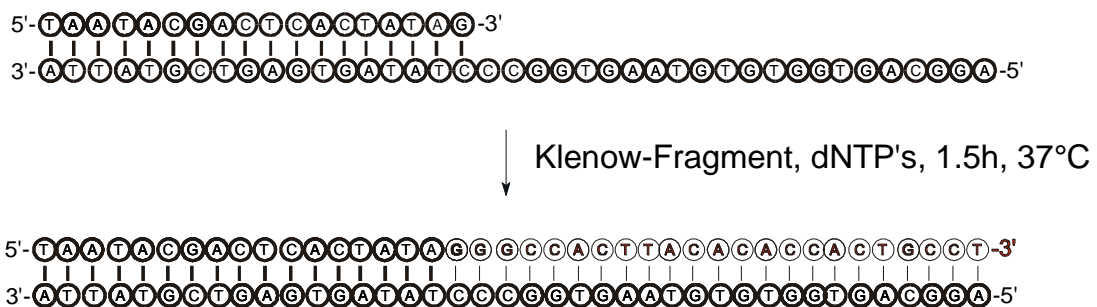
Abb. 2.6: Keine CETP-RNA Transkription mit ssDNA-Templat

2 Synthetischer Teil

Es wurde vermutet, daß das einzelsträngige Templatteil Sekundärstrukturen bildet, welche eine Transkription verhindern bzw. nur zu kürzeren Abbruchsequenzen führen. Bei Verwendung von durchgängig doppelsträngigem DNA-Templat könnte es möglich sein, dieses für die T7 RNA Polymerase überall zugänglich zu machen und somit vollständige Transkription zu erreichen.

Primerextension des ssDNA-Templats:

So wurde der Versuch unternommen, die einzelsträngige Templat-DNA mit dem Klenow-Fragment unter Zugabe der entsprechenden dNTP's zu einem Doppelstrang aufzufüllen und dann der Transkriptionsreaktion zu unterwerfen.



1 DNA-Marker

2 Produkt der Primerextension

(40mer dsDNA-Templet)

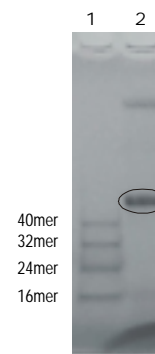


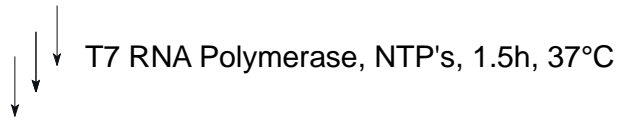
Abb. 2.7: Primerextension des ssDNA-Templat zum dsDNA-Templat

Transkription mit dsDNA-Templat:

Mit dem so gebildetem dsDNA-Templat wurde die CETP-RNA Transkription unter den Standardbedingungen der Δ TAR-RNA-Synthese durchgeführt. Erstmals wurde so im Bereich des zu erwartenden Produkts eine schwache Bande im 8 M Harnstoff Polyacrylamidgel

2 Synthetischer Teil

gefunden. Für eine präparative Darstellung der CETP-RNA war diese Synthese aber absolut unzureichend und mußte weiter optimiert werden.



1 DNA-Marker

2 CETP-RNA-Transkriptionsansatz mit dem dsDNA-Templat

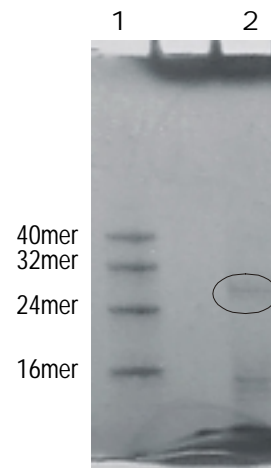


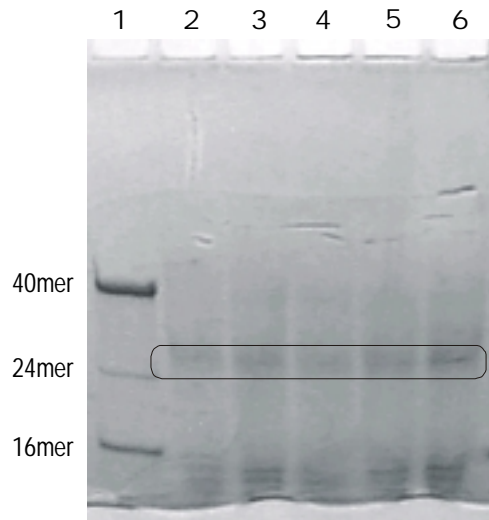
Abb. 2.8: CETP-RNA Transkription (roh), das gewünschte Produkt schwach zu erkennen

Ausgehend von diesem Stand wurden die Reaktionsbedingungen der Transkriptionsreaktion der CETP-RNA optimiert, um akzeptable Ausbeuten zu erhalten.

Als Erstes wurde die für Transkriptionsreaktionen sensible NTP/MgCl₂-Konzentration variiert. Hierfür wurden mehrerer Reaktionansätze (50 µL) gemacht, in welchen die NTP/MgCl₂-Konzentration verändert, alle anderen Konzentrationen aber konstant gehalten wurden. Bezüglich der gesamten NTP-Konzentration wurden jeweils 1.85eq. MgCl₂ eingesetzt.

2 Synthetischer Teil

- 1** DNA-Marker
- 2** 1.5 mM je NTP
- 3** 1.75 mM je NTP
- 4** 2 mM je NTP
- 5** 2.25 mM je NTP
- 6** 2.5 mM je NTP



- 7** DNA-Marker
- 8** 2 mM je NTP
- 9** 2.5 mM je NTP
- 10** 3 mM je NTP
- 11** 3.5 mM je NTP
- 12** 4 mM je NTP
- 13** 5 mM je NTP
- 14** 6 mM je NTP
- 15** 7 mM je NTP

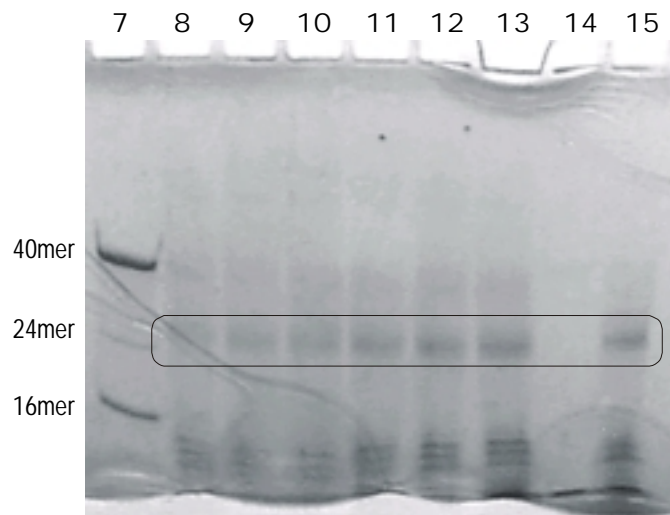


Abb. 2.9: Variationen der NTP/MgCl₂-Konzentration

Eine NTP-Konzentration von 4-7 mM wurde für optimal gefunden. Eine weitere Steigerung der NTP-Konzentration führt nicht mehr zu deutlichen Ausbeutesteigerungen. Für die folgenden Synthesen wurden 5 mM NTP verwendet, da zu hohe NTP/MgCl₂-Konzentrationen die Aufreinigung erschweren.

Anschließend wurde der Einfluß der DNA-Templat-Konzentration auf die Produktausbeute untersucht. Es wurden wieder alle Bedingungen gleichgehalten und nur die DNA-Templat-

2 Synthetischer Teil

Konzentration verändert. Als NTP/MgCl₂-Konzentrationen wurden die zuvor optimierten Werte gewählt.

- 1** DNA-Marker
- 2** 0.1 μ M DNA-Templat
- 3** 0.5 μ M DNA-Templat
- 4** 1 μ M DNA-Templat
- 5** 2.5 μ M DNA-Templat
- 6** 5 μ M DNA-Templat
- 7** 10 μ M DNA-Templat

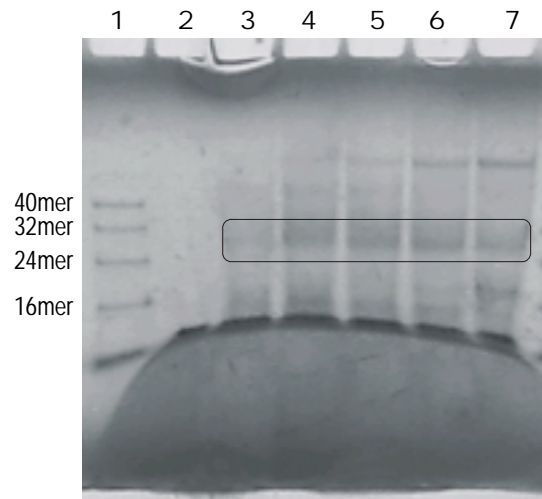


Abb. 2.10: Variation der DNA-Templat-Konzentration

Eine DNA-Templat-Konzentration von 1 μ M stellte sich als optimal heraus, eine weitere Erhöhung der DNA-Templat-Konzentration führt auch hier nicht zu einer höheren Produktausbeute. Als letztes wurde die T7 RNA Polymerase-Konzentration variiert, um die vorhandene Menge des Enzyms optimal zu nutzen. Alle anderen Konzentrationen wurden wieder beibehalten bzw. die optimalen Werte gewählt.

- 1** DNA-Marker
- 2** 750 U/mL Enzym
- 3** 450 U/mL Enzym
- 4** 300 U/mL Enzym
- 5** 150 U/mL Enzym
- 6** 75 U/mL Enzym

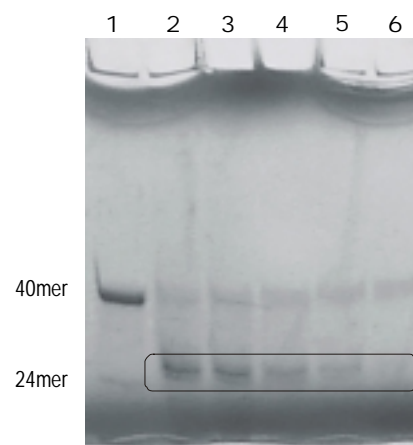


Abb. 2.11: Variation der T7 RNA Polymerase-Konzentration

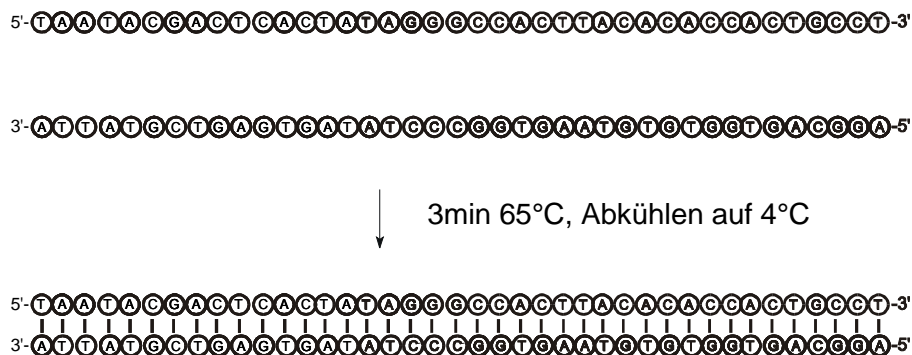
2 Synthetischer Teil

Es sind mindestens 450 U/mL T7 RNA Polymerase notwendig, um ausreichend Transkriptionsprodukte zu erhalten. Um das wertvolle Enzym nicht zu verschwenden, wurde 450 U/mL T7 RNA Polymerase für die weiteren Reaktionen verwendet.

Durch Optimierung einiger wichtiger Reaktionsparameter konnten folgende optimale Reaktionsbedingungen für die CETP-RNA ermittelt werden:

DNA Templat, 40mer ds	: 1 μ M
je NTP	: 5 mM
T7 RNA Polymerase	: ~ 450 U/mL
Tris·HCl	: 40 mM
MgCl ₂	: 37.5 mM
Spermidin·HCl	: 1 mM
BSA	: 0.2% (2 mg/mL H ₂ O)
PEG-8000	: 5% (50 mg/mL H ₂ O)
Triton X-100	: 0.01%

Um die Synthese zu vereinfachen, wurde versucht, auf die Primerextension zu verzichten. Anstelle dessen wurden versucht, direkt beide DNA-Stränge der gesamten Länge durch Annealing zu dem doppelsträngigem DNA-Templat aneinanderzufügen.



2 Synthetischer Teil

- 1 DNA-Marker
- 2 40mer dsDNA-Templat
- 3 40mer ssDNA (top)
- 4 40mer ssDNA (bottom)

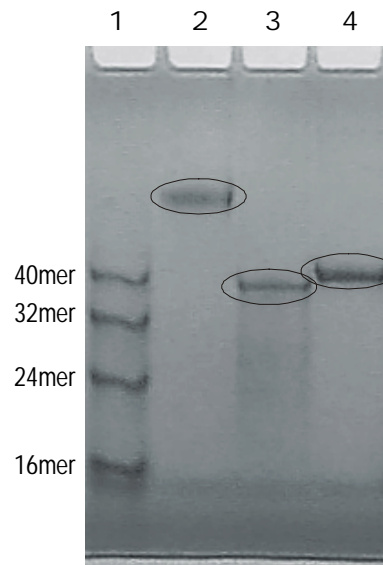


Abb. 2.12: Bildung des dsDNA-Templats der CETP-RNA-Synthese durch Annealing der Einzelstränge

Die Transkriptionsreaktion der CETP-RNA-Synthese verläuft mit dem auf diese Weise hergestellten dsDNA-Templat analog. Es konnte somit eine Synthesestufe eingespart werden. Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Eliminierung des Primerextension-Schrittes konnte man auf nachfolgend dargestelltes Syntheseergebnis zurückgreifen.

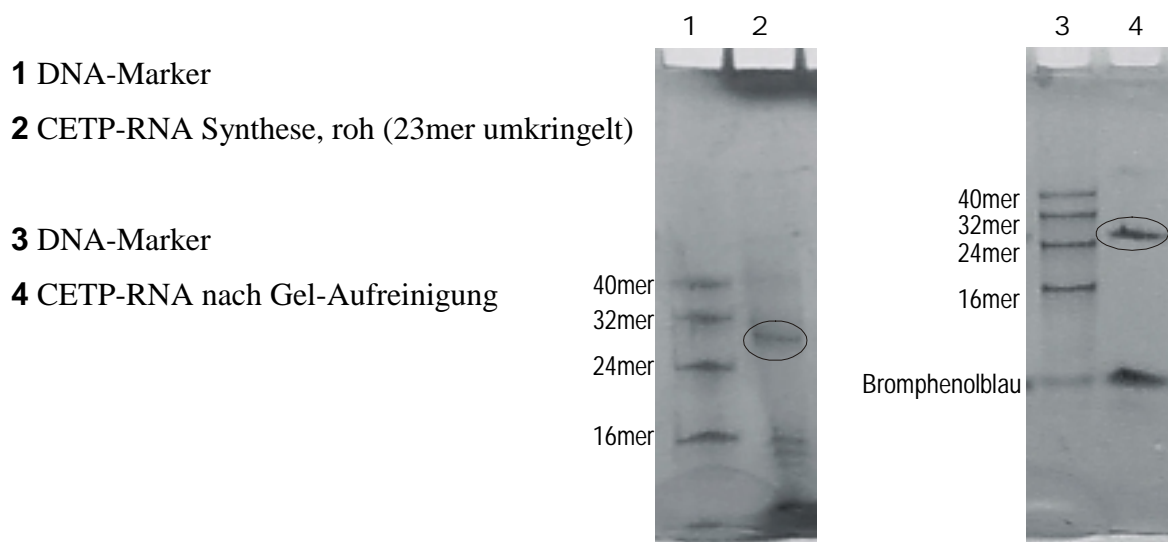


Abb. 2.13: CETP-RNA vor und nach Aufreinigung

5'-³²P-CETP-RNA

Um genau quantifizierbare Gelelektrophorese durchzuführen, wurde radioaktiv markierte RNA hergestellt, um die Gele mittels Autoradiografie auszuwerten. So soll mit quantitativen Gel-shift Experimenten die Dissoziationskonstante von RNA-Liganden bestimmt werden. Spezifisch wurde das 5'-OH-Ende der RNA mit ³²P-Phosphat enzymatisch verestert. Da die RNA-Nukleotide, welche der T7 RNA Transkription entstammen, am 5'-Ende eine Triphosphatgruppe (aus den ehem. NTP's) tragen, muß diese zuvor, ebenfalls enzymatisch, entfernt (dephosphoryliert) werden.

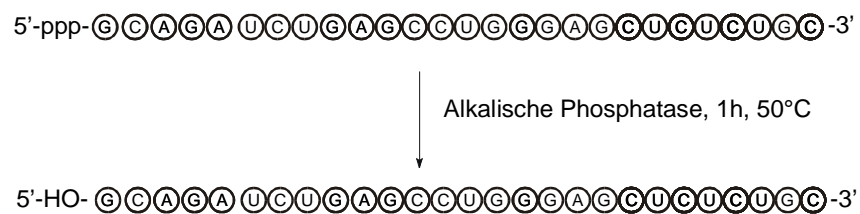


Abb. 2.14: Dephosphorylierung des 5'-Endes

In der nachfolgenden Reaktion wird nun das freie 5'-OH-Ende mit ³²P-ATP phosphoryliert. Überschüssiges ³²P-ATP wird anschließend durch Gelfiltration (Sephadex G-50 Säulen) von der ³²P markierten RNA abgetrennt.

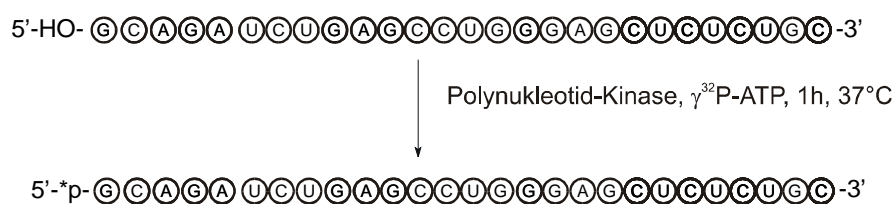


Abb. 2.15: 5'-Markierung mit ³²P

2.2.2 Aufreinigung der RNA für NMR-Proben

RNA-Oligonucleotide für NMR-Proben wurden nach zwei verschiedene Methoden aufgereinigt, mittels HPLC und Gelelektrophorese. Die Herstellung und besonders die Aufreinigung von RNA-Oligonucleotide für NMR-Proben stellt kein triviales Problem dar.

Der Hauptgrund sind die sehr großen Mengen an RNA, welche für NMR-Messungen notwendig sind. Für eine 1 mM NMR-Probe in einem Shigemi-Röhrchen mit einem Probenvolumen von ca. 250 μL benötigt man 250 nmol an RNA. Zum Vergleich braucht man für eine Bande in einem Polyacrylamidgel 0.15 nmol und für eine Probe zur UV/CD-Messung 1 nmol an RNA. Für die Ansatzgrößen bedeutet das einen scale-up-Faktor von 100. Das geringere Problem ist die Synthese. Bestehende Vorschriften müssen ggf. zur Ausbeuteerhöhung optimiert werden (z.B. NTP-Konzentration). Wenn man die (teure) T7 RNA Polymerase nun in ausreichenden Mengen zur Verfügung hat, steht eine NMR-Proben RNA-Synthese nichts mehr im Wege. Das weitaus größere Problem ist die Aufreinigung. Fast alle gängigen Protokolle müssen für die Reinigung von NMR-Proben neu entwickelt werden. Das ist u.A. hiermit begründet, da RNA-Reinigungsprotokolle meist biochemischer Methodik entspringen und für viel kleinere RNA-Mengen gedacht sind. Außerdem wirken sich für biochemische Anwendungen oft einige Verunreinigungen nicht störend aus, welche im NMR-Spektrum sehr störend sein können (mitgeschleppte Puffer, Salze, Glycerin, Ethanol u.v.m). Generell kann man sagen, daß die Aufreinigung mittels Gelelektrophorese sehr aufwendig ist, schnell an "Sisyphus"-Arbeit grenzt, aber fast immer funktioniert. Theoretisch ist hier auch eine Reinigung mit einer Auflösung von ± 1 Nukleotid möglich, aber aufgrund der in diesem Fall sehr geringen Kapazität der Gele nicht praktikabel. Allerdings ist es nicht möglich, (vermutliche) Polymerreste des Polyacrylamidgels vollständig aus der Probe zu entfernen.

Ist eine Reinigung mittels HPLC möglich, bietet diese Methode den deutlich schelleren Weg zur RNA-NMR-Probe. Die Probe ist dann auch praktisch frei von nicht-RNA-Verunreinigungen. Eine Reinigung mit einer Auflösung von ± 1 Nukleotid ist allerdings oft über HPLC nicht möglich. Man erhält jeweils die gesamten Voll-Längen-Transkriptionsprodukte. Bei kürzeren RNA-Sequenzen (<25 Nukleotide) liegt dieser Bereich zu nahe an den Abbruchsequenzen, eine Aufreinigung mittels HPLC ist dann nur in Einzelfällen oder nicht möglich.

Aufreinigung mit denaturierender Gelelektrophorese

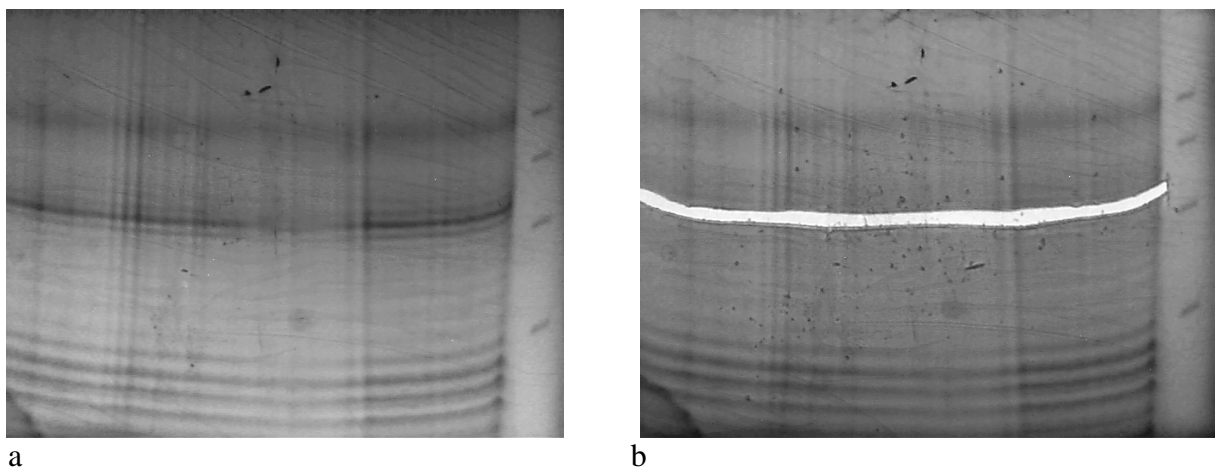
Die Reaktionsmischung der Transkriptionsreaktion wird (5 mL) am Ende der Reaktion mit Phenol/Chloroform extrahiert, die vereinigten wäßrigen Phasen vereinigt und mit Ethanol gefällt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wird getrocknet und in 2 mL 8 M Harnstoff, pH 6.5 gelöst. 500 μL dieser Menge kann nun mit einem 20% Polyacrylamid Gel

2 Synthetischer Teil

(8 M Harnstoff, 1x TBE, 40°C, 16x16x0.1cm) getrennt werden. Vor dem Beladen des Gels muß die RNA/Harnstoff-Probe für 5 min auf 100°C erhitzt werden.

Dieses Protokoll ist optimiert, weicht man hiervon ab, haben die Gele möglicherweise nicht hinreichende Trennleistung. Verwendet man zuviel RNA sind die Banden verschmiert, bei zuwenig RNA ist die Trennkapazität unakzeptabel und die Verluste noch höher.

Die gewünschte RNA-Bande wird unter UV-Licht ausgeschnitten, und mit Gelelutionspuffer 1 (siehe Anhang) eluiert. Die Gelstücke werden hierfür durch drücken durch eine Spritze zerkleinert und mit dem 4fachen Volumen Gelelutionspuffer 1 versetzt und für 4h geschüttelt (im Microspinfilter, Fa. Waters). Durch Zentrifugation erhält man das Eluat, welchen mit Centricon-3000 entsalzt und aufkonzentriert wird. Die RNA ist nun hinreichend rein, um für NMR-Messungen verwendet zu werden. Eine Umpufferung für die gewünschten NMR-Bedingungen ist optional. Für eine NMR-Probe sind ungefähr 10-15 der nachfolgend dargestellten Gele notwendig.



*Abb. 2.16: Präparative Trennung der CETP-RNA (a vor b nach dem Ausschneiden)
jeweils rechts DNA-Marker 16/24/32/40 Nukleotide*

Bei dieser Aufreinigungsmethode hat man allerdings mit Verlusten an RNA von mindestens 50% zu rechnen. Ein weiterer Nachteil ist, daß vermutlich Polymerreste des Gels in der Probe verbleiben, und mit den gängigen Methoden nicht abzutrennen sind. Das liegt vermutlich darin begründet, daß das Polymer ebenfalls hochmolekular ist und von der RNA mit Ultrafiltration oder Größenausschlußchromatographie nicht getrennt werden kann. Im ¹H-NMR-Spektrum kann man einige nicht zur RNA gehörende Signale erkennen.

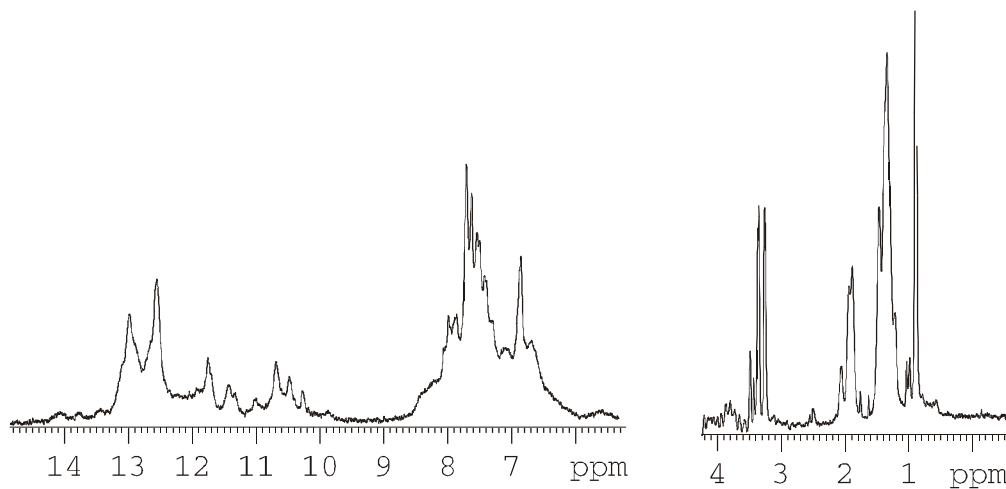


Abb 2.17: ¹H-NMR-Spektrum gelaufgereinigter RNA, 0.7mM CETP-RNA (23mer), 100mM NaCl, 10mM KP pH 6.6, 10% D₂O, JR-Wasserunterdrückung, 600MHz

Im Bereich der chemischen Verschiebung von 0-3.5 ppm sollten überhaupt keine Signale zu beobachten sein, da RNA-Signale im Bereich von ca. 3.5-14 ppm zur Resonanz kommen. Die Signale von 0.9-3.5 ppm, welche trotzdem im Spektrum zu sehen sind, müssen also von Verunreinigungen herrühren. Bei 3.2-3.5 ppm sind die Signale von Glycerin zu sehen, welches in den Membranen der Ultrafiltrationseinheiten vorhanden ist. Trotz intensiven Spülens kann man das Glycerin häufig nicht ganz entfernen. Die beiden relativ breiten Multipletts im Bereich 1.2-2.1 ppm sind auf das in der Probe verbliebende Polyacrylamid zurückzuführen. Im 2D-NOESY-Spektrum zeigen diese Signale Kreuzpeaks zu nicht RNA-Signalen im aromatischen Bereich. Dieses Verhalten, sowie die große Linienbreite, sprechen für Polyacrylamid als Verursacher dieser Signale.

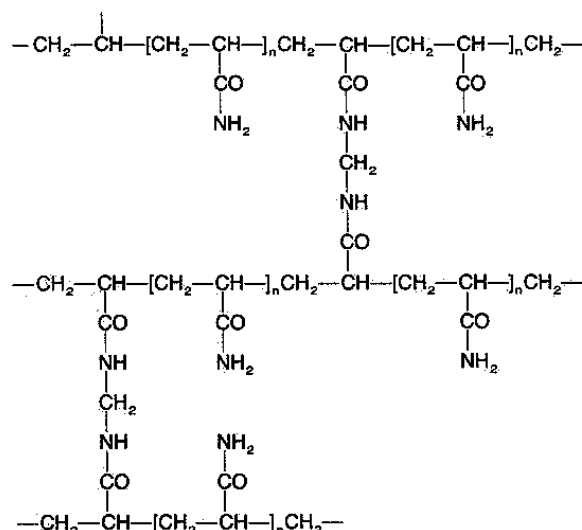


Abb. 2.18: Polyacrylamid

Von 6-9ppm kann man nun die Aromaten- und Aminosignale der RNA sehen, sowie die Amidfunktionen des Polyacrylamids (intensive Signale bei 6.9 und 7.7ppm). Bei 9-14ppm sind die Iminoprotonen der RNA in Basenpaarung zu sehen. Die Herkunft des scharfen Singulett bei 0.9ppm ist unklar. Aufgrund der Wasserunterdrückung sind im Bereich um 5 ppm keine Signale zu erkennen.

Aufreinigung mit HPLC

Besteht die Möglichkeit einer HPLC-Aufreinigung der RNA-Probe, so ist das die Methode der Wahl. Die Verluste, welche durch Gelelektrophorese und vor allem Gelelektion herrühren, können bei der HPLC nicht auftreten. Außerdem kann eine NMR-Probe mit 2-3 HPLC-Läufen gereinigt werden. Als Säulenmaterial sind Anionentauscher zu empfehlen. Die Trennung wird in 5 M Harnstoff und 100 mM KP durchgeführt und es wird ein LiCl-Gradient gefahren. Bei Bedarf, wenn die Trennleistung der Säule unbefriedigend ist, kann die Säule auf 40°C geheizt werden, um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Nachfolgend ist ein HPLC-Chromatogramm der CETP-RNA abgebildet:

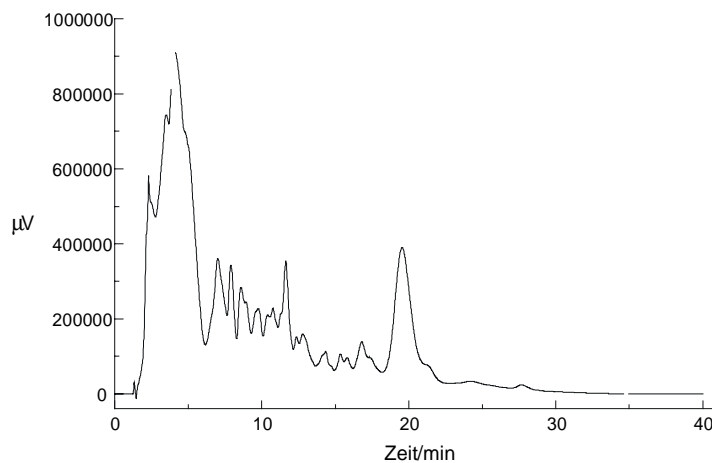


Abb. 2.19: HPLC-Chromatogramm der CETP-RNA

Die Produktfraktion der CETP-RNA hat eine Retentionszeit von ca. 20 min. Die Fraktionen der HPLC-Läufe müssen nun einzeln gelelektrophoretisch auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Es empfiehlt sich, den Produktpeak in möglichst vielen Fraktionen zu trennen und aufzufangen. Im denaturierenden Gel stellt man fest, daß sich in diesen Produktfraktionen auch noch Abbruchsequenzen und DNA-Templat-Reste befinden (Fraktionen der Retentionszeit 18-22 min aufgetragen).

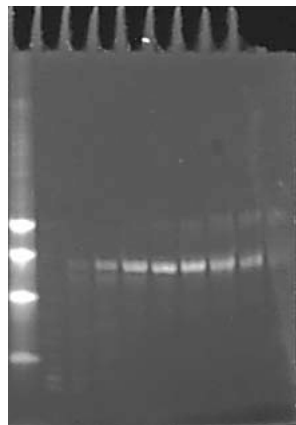


Abb. 2.20: Kontrollgel der Δ TAR-RNA-HPLC-Trennung (19% PAGE, 8 M Harnstoff, 1x TBE, MWM: ssDNA 16/24/32/40nt)

Je kleiner die synthetisierte RNA ist, desto unwahrscheinlicher ist es, daß die gewünschte Sequenz weit genug von den Abbruchsequenzen entfernt ist. Bei der CETP-RNA überschneiden sich die Abbruch- und Produktfraktionen so stark, daß nur in Einzelfällen und

2 Synthetischer Teil

nicht reproduzierbar einige reine Produktfraktionen mittels HPLC-Aufreinigung gewonnen werden konnten. Diese waren dann aber fast frei von (nicht-RNA)Verunreinigungen, dafür kann man keine Trennleistung bis auf 1 Nukleotid erhalten. Die HPLC-Fractionen fallen in einem großen Volumen und in großer Verdünnung in 5 M Harnstoff und 1 M LiCl an. Diese Lösung engt man soweit in z.B. einer SpeedVac ein, so daß die Lösung gerade noch klar und ohne Kristalle/Niederschlag ist. Anschließend entsalzt man dieses Konzentrat mit einer Sephadex G-10 Säule um den Harnstoff und das Salz zu entfernen. Die so erhaltenen Fraktionen an entsalzter RNA müssen nun nochmals eingeeengt und in die gewünschten NMR-Pufferbedingungen überführt werden.

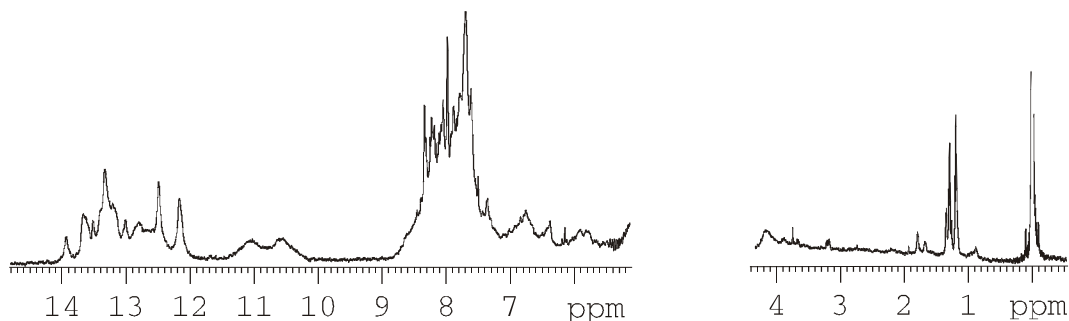


Abb. 2.21: ^1H -NMR-Spektrum HPLC-aufgereinigter RNA, 0.7 mM CETP-RNA (23mer), 100 mM NaCl, 10 mM KP pH 6.6, 10% D_2O , JR-Wasserunterdrückung, 600MHz

Man kann deutlich erkennen, daß die Probe im aliphatischen Bereich sauberer ist. Die Herkunft der verbliebenen Signale (0.9, 1.2 und 1.4 ppm) ist unklar. Der Aromaten-, sowie Inimobereich ist frei von Fremdsignalen. Die Polyacrylamid-Signale treten natürlich nicht auf.

3.1 Gel-shift Screening

Um Peptidbibliotheken auf RNA-Affinität zu screenen, wurde eigens ein Gel-shift Screening erfolgreich entwickelt. Hierfür wurden zwei Peptidbibliotheken synthetisiert. Die Synthesestrategie der Peptidbibliotheken wurde so gewählt, daß $4^5 = 625$ verschiedenen Peptide der jeweiligen Bibliothek in 25 Fraktionen mit je 25 Peptiden vorlagen. Folgende Bibliotheken wurden synthetisiert:

Lib1:	X X X X C(-S-PEG)-NH ₂	X = L, I, F, R, K
Lib2:	K X X X X K C(-S-PEG)-NH ₂	X = L, I, Y, R, K

Jede dieser 25 Mischungen wurde mit der Target-RNA in einem nativen 10% Polyacrylamidgel dem elektrischen Feld ausgesetzt. Da die Peptide mit einem Polyethylenglycol-Linker verknüpft waren, konnte bei Affinität zur RNA ein starker Shift der jeweiligen Bande beobachtet werden. Das machte die Analyse der Gele deutlich einfacher. Ohne PEG wären die schwachen Shifts, welche die niedermolekularen Peptide erzeugt hätten, nur schwierig zu erkennen gewesen.

Die Information, welche man aus diesem Effekt gewinnen konnte, war, daß in den positiv reagierenden Mischungen Peptide mit RNA-Affinität sein mußten. Die am besten reagierende Peptidmischung wurde nachsynthetisiert, erneut gescreent und somit die genaue Sequenz der bindenden Peptide ermittelt.

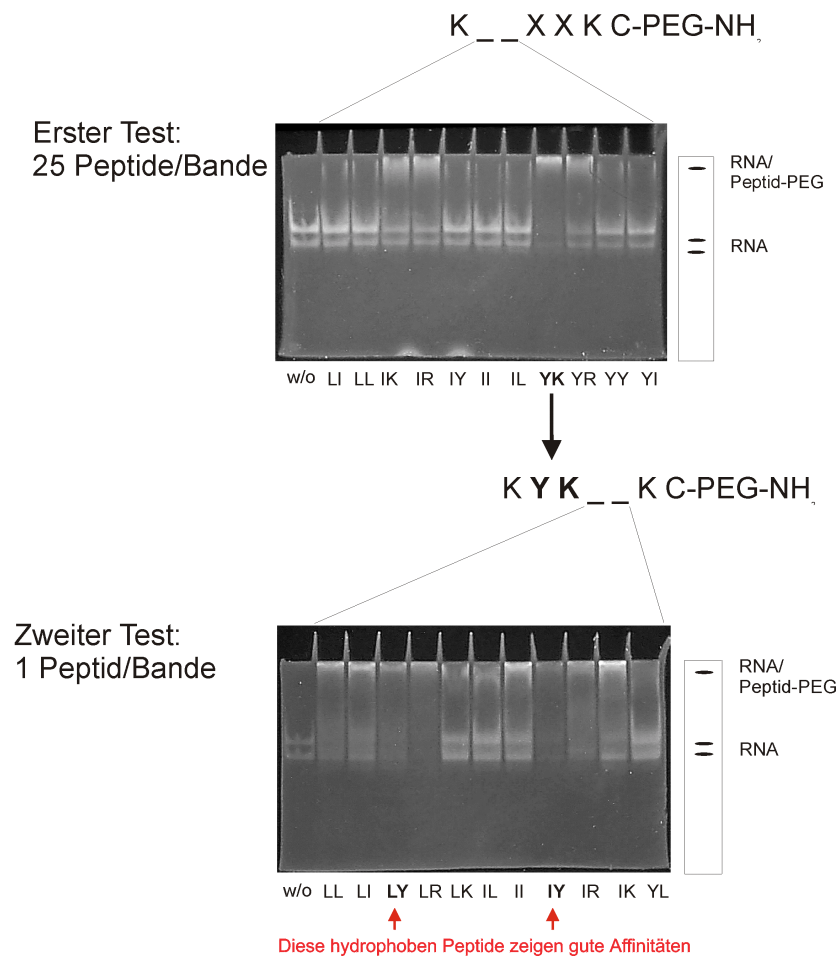


Abb. 3.1: Gel-Shift Assay (Ausschnitt), bindende Peptidmischungen sind am Shift der RNA zu deutlich zu erkennen

Es handelt sich bei den dargestellten Gelen jeweils um native 10% Polyacrylamidgele (1x TBE, 100 V/10cm), welche mit Ethidiumbromid angefärbt wurden. Die RNA-Menge pro Bande beträgt jeweils ca. 0.15 nmol. Es wurde der Gelpuffer 1 verwendet. Die Peptid/RNA-Mischungen hatten jeweils ein Pöbenvolumen von 20 µL und wurden 15 min bei RT inkubiert. Die Peptidkonzentrationen, bzw. die Summe der Peptidkonzentrationen im Falle der Peptidmischungen betragen jeweils ca. 50 µM. Die Quantifizierung erfolgte im Falle der Peptidmischungen per Einwaage, die der einzelnen Peptidekonzentrationen wurden per Aminosäureanalyse verifiziert.

3.1.1 Die Peptidbibliothek Lib1

Erster Test mit Lib1

Als erstes wurde Lib1: X X X X C(-S-PEG)-NH₂, X = L, I, F, R, K gescreent, die Synthese verlief wie folgt:

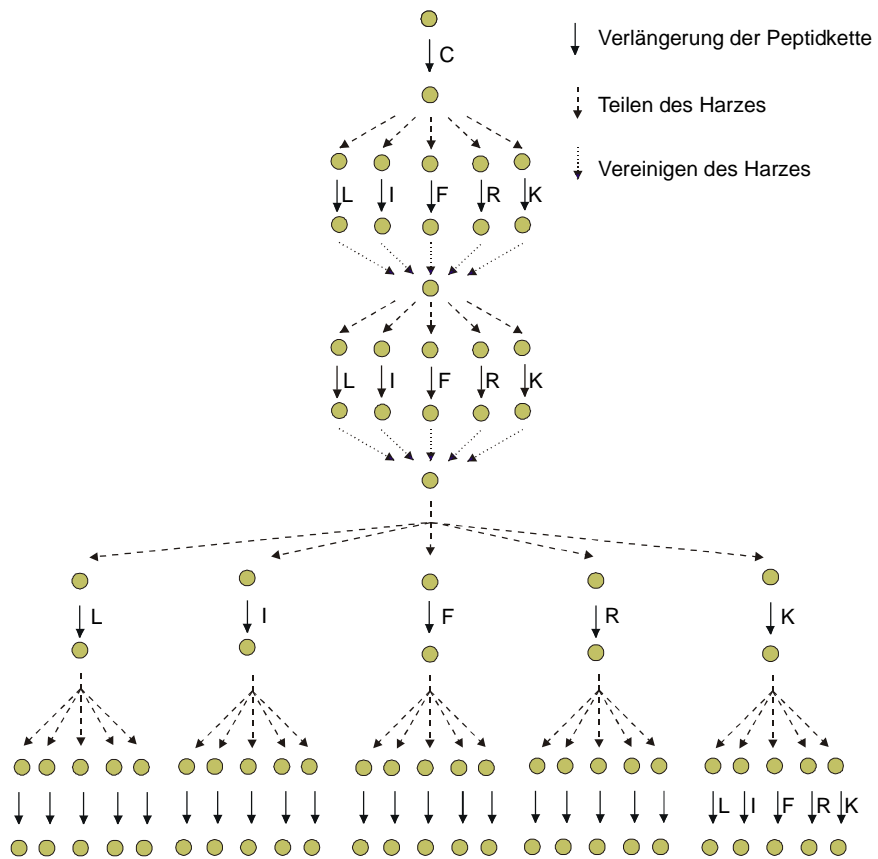


Abb. 3.2: Synthesestrategie von Lib1, 25x25 Peptide

3 Durchführung der Screening-Methoden

Screening der Δ TAR-RNA mit Lib1:

Lib1: $_ _ X X C(-S-PEG)-NH_2$, X = L, I, F, R, K

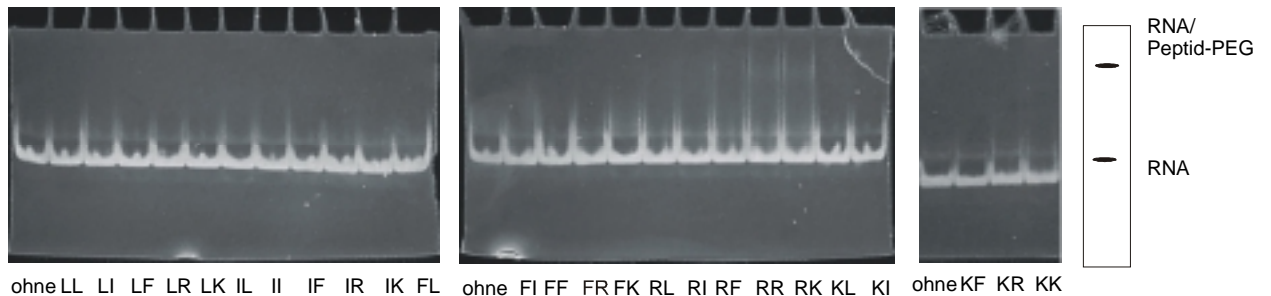


Abb. 3.3: Screening von Δ TAR-RNA mit Lib1

Es lassen sich nur sehr schwache Affinitäten bei Peptiden mit dem Ausschnitt RR und RK feststellen. Das entspricht den Erwartungen, da die Δ TAR-RNA einen Komplex mit Arginin bildet [107 oder 110]. So binden auf jeden Fall Arginin-haltige Peptide an die Δ TAR-RNA.

Screening der CETP-RNA mit Lib1:

Analog wurde die CETP-RNA mit Lib1 gescreent.

Lib1: $X X _ _ C(-S-PEG)-NH_2$, X = L, I, F, R, K

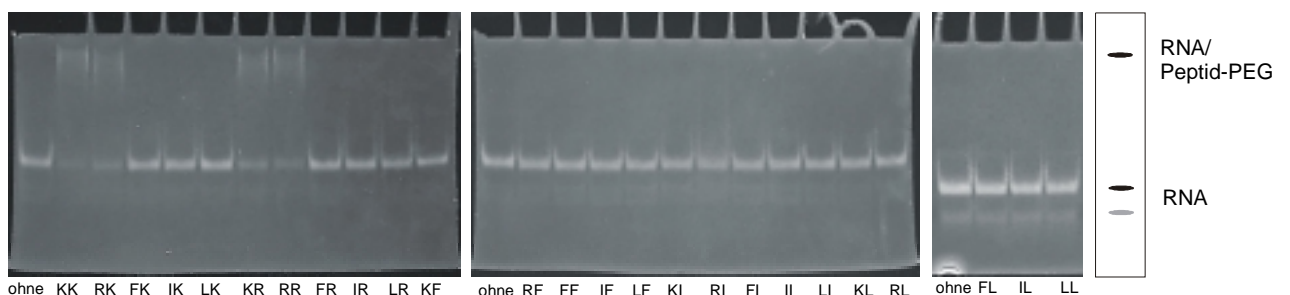


Abb. 3.4: Screening von CETP-RNA mit Lib1

3 Durchführung der Screening-Methoden

Es kann bei der CETP-RNA ein etwas anderes Bindungsverhalten festgestellt werden. Die Peptide mit den Ausschnitten KK, RK, KR und RR binden besonders gut, was in der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den basischen Aminosäureseitenketten und des negativen Phosphordiesterbackbone der RNA begründet liegt. Es kann aber, im Gegensatz zur Δ TAR-RNA, keine eindeutige Präferenz zu Arginin festgestellt werden.

Zweiter Test mit LibKK

Da z.B. die Fraktion KK der Lib1 zu CETP-RNA eine gute Affinität zeigt, nicht aber zu der Δ TAR-RNA kann von einer gewissen Selektivität der Bindung gesprochen werden. Aus diesem Grunde wurde die Mischung KK komplett nachsynthetisiert, um die tatsächlich bindenden Tetrapeptide zu finden. Die Synthese dieser Peptide (LibKK) verlief nach folgendem Schema:

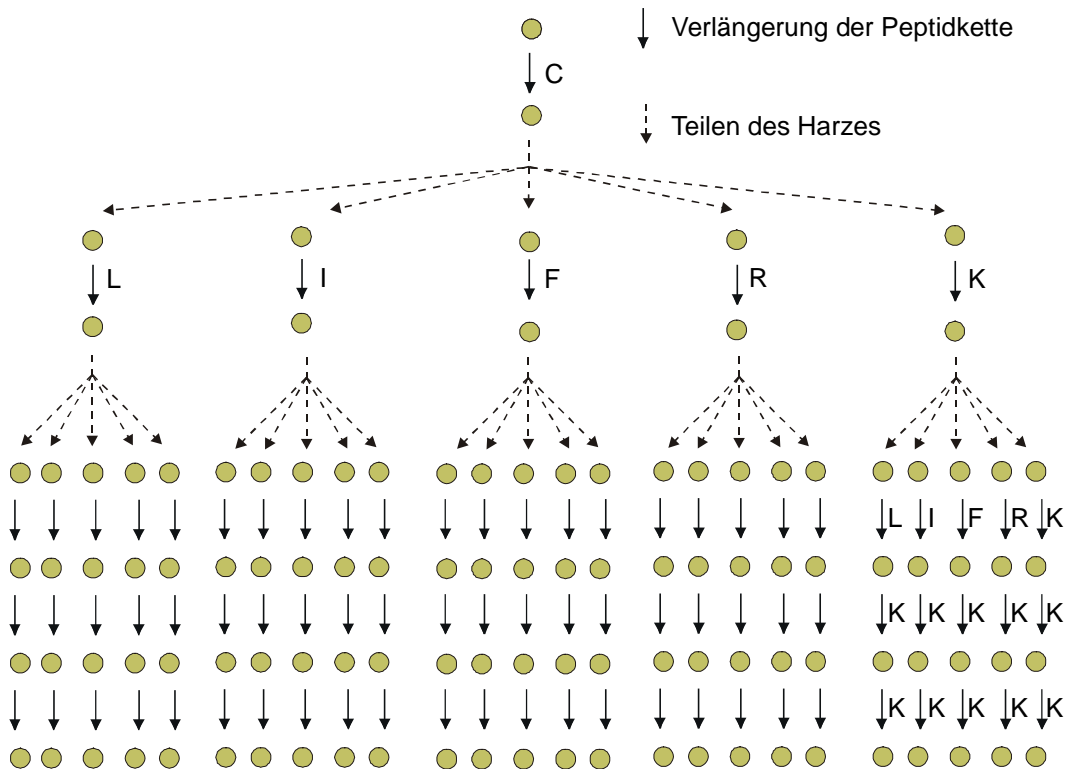


Abb.3.5: Synthesestrategie von LibKK, 25x1 Peptid

3 Durchführung der Screening-Methoden

Screening der Δ TAR-RNA mit LibKK:

Wie zuvor beschrieben wurden native Gele von LibKK mit der Δ TAR-RNA gemacht.

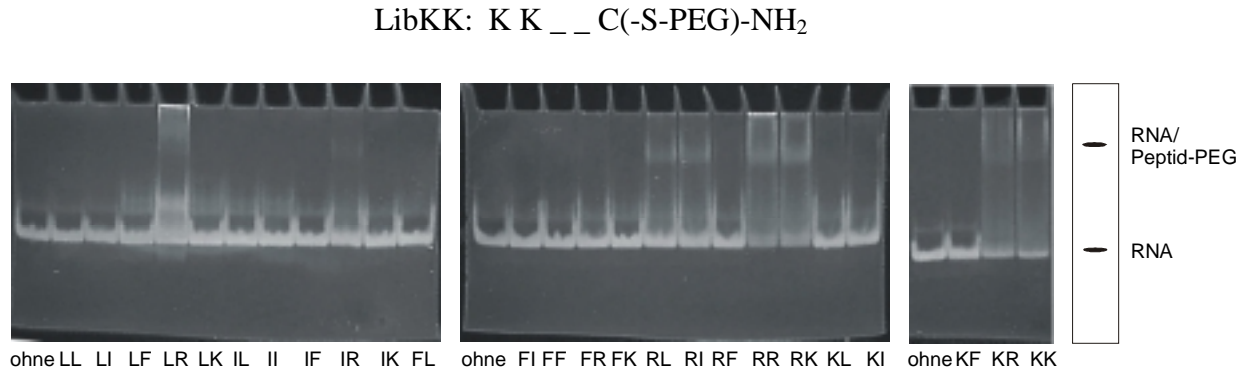


Abb. 3.6: Screening von Δ TAR-RNA mit LibKK

Aus diesem Gel können nun die Peptidsequenzen der bindenden Peptide abgelesen werden, demnach hat die Δ TAR-RNA folgende, nach den scheinbaren Affinitäten geordnete, Liganden:

KKLRC-NH₂ > KKRRC-NH₂ > KKRKC-NH₂ > KKKRC-NH₂, KKKKC-NH₂,
KKRLC-NH₂, KKRIC-NH₂

Screening der CETP-RNA mit LibKK:

Nach diesem Verfahren wurde auch die CETP-RNA getestet.

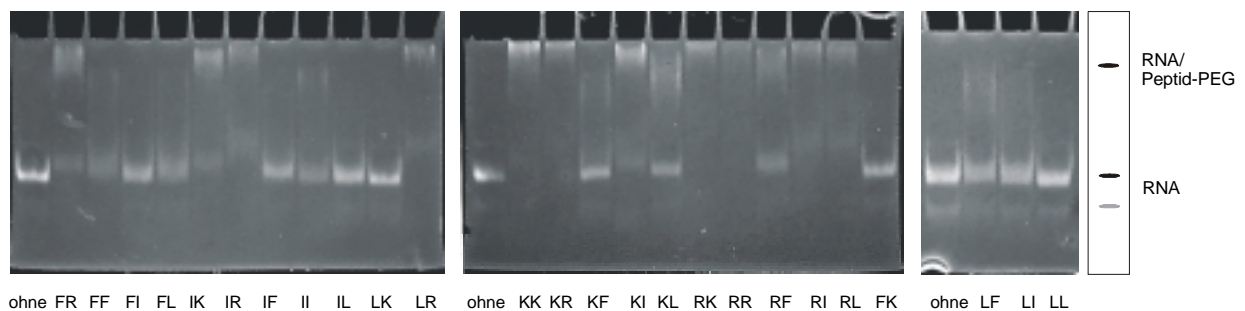


Abb. 3.7: Screening von CETP-RNA mit LibKK

Es konnten so für die CETP-RNA folgende Liganden ermittelt werden.

KKKKC-NH₂, KKKRC-NH₂, KKRKC-NH₂, KKRRC-NH₂ > KKKIC-NH₂, KKRIC-NH₂,
KKRLC-NH₂, KKLRC-NH₂ > KKIFC-NH₂, KKIIC-NH₂, KKFRC-NH₂

Ergebnis:

Bei der CETP-RNA, wie auch bei der Δ TAR-RNA, fallen die unspezifisch bindenden Peptide auf, welche nur basische Seitenketten (R, K) besitzten. Bei Peptiden mit max. einer hydrophoben Seitenkette kann man aber erste Selektivitäten bezüglich einer RNA-Sequenz feststellen.

3.1.2 Die Peptidbibliothek Lib2

Erster Test mit Lib2

Um hinreichende Affinitäten von Peptide an RNA-Moleküle zu erhalten, muß offensichtlich ein Minimum an basischen Aminosäureseitenketten in der Peptidsequenz vorhanden sein. So wurde die Peptidbibliothek nochmals synthetisiert, aber mit einer C- und N-terminal stehenden, zusätzlichen Lysineinheit (K). Da Phenylalanin (F) die Erwartungen hinsichtlich der Erhöhung der Bindungsstärke- und Selektivität nicht erfüllt hat, wurde dieses durch Tyrosin (Y) ersetzt. Die Hydroxylgruppe des aromatischen Ringes soll H-Brücken zum RNA-Traget knüpfen.

Formal wurde Lib2: K X X X X K C(-S-PEG)-NH₂, X = L, I, Y, R, K nach folgendem Schema synthetisiert.

3 Durchführung der Screening-Methoden

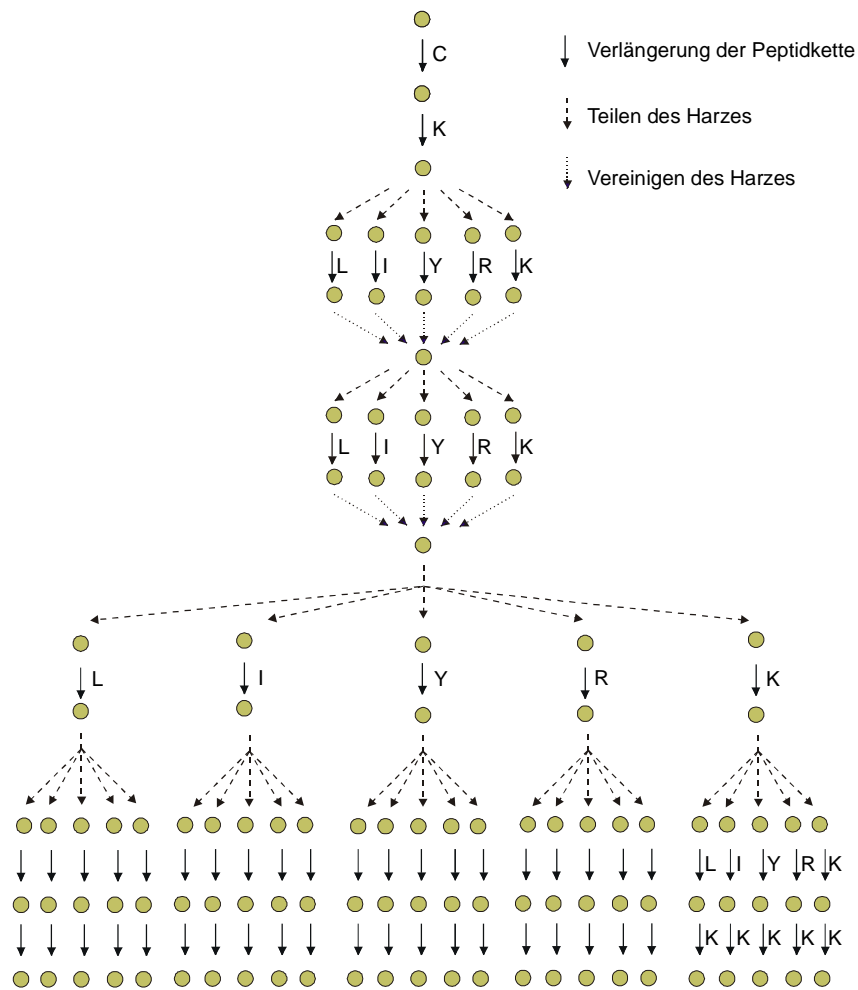


Abb. 3.8: Synthesestrategie von Lib2, 25x25 Peptide

Screening der Δ TAR-RNA mit Lib2:

Mit dieser neuen Bibliothek wurde erneut die Δ TAR-RNA gescreent.

Lib2: K _ _ X X K C(-S-PEG)-NH₂, X = L, I, Y, R, K

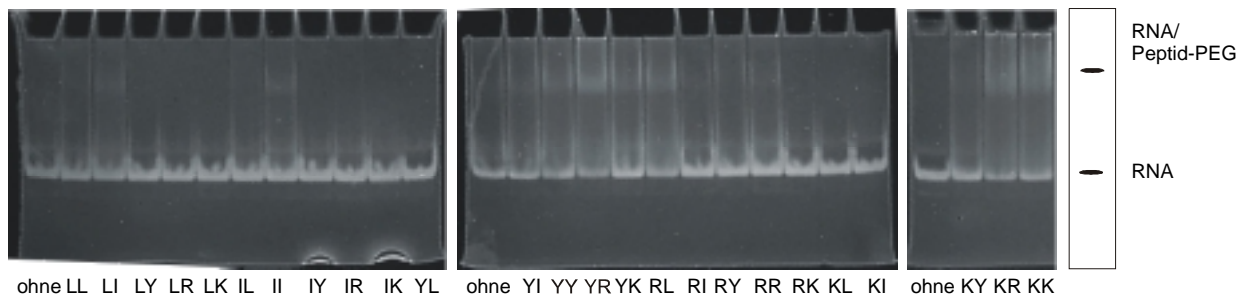


Abb. 3.9: Screening von Δ TAR-RNA mit Lib2

3 Durchführung der Screening-Methoden

Offensichtlich besitzen die Peptidmischungen, welche basische Aminosäuren und Thyrosin (Y) enthalten eine erhöhte Affinität zur Δ TAR-RNA.

Screening der CETP-RNA mit Lib2:

Analog wurde die CETP-RNA mit dieser Peptidbibliothek getestet.

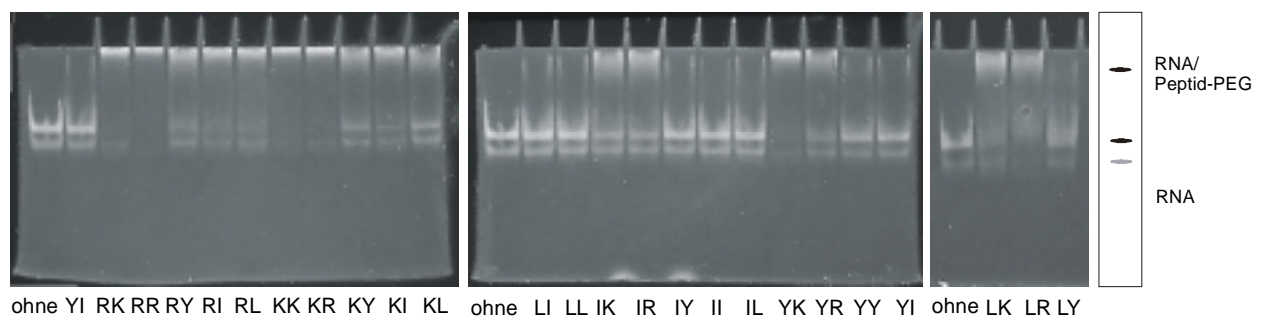


Abb. 3.10: Screening von CETP-RNA mit Lib2

Auch hier kann man die Präferenz der RNA zu basischen/Tyrosin-haltigen Peptidsequenzen beobachten. Allerdings fällt eine überdurchschnittliche Affinität der Mischung YK auf. Der Anteil der gebundenen (zurückgehaltenen) Peptide ist hier annähernd so hoch, wie bei rein basischen Peptidabschnitten. Aus diesem Grund wurde die Mischung YK komplett nachsynthetisiert, um herauszufinden welche Peptidsequenzen sich dahinter verbergen.

Zweiter Test mit LibYK

Die Synthese wurde analog LibKK durchgeführt, nur die C- und N-terminalen Lysine (K) sowie der Ersatz von Phenylalanin (F) durch Tyrosin (Y) mußte berücksichtigt werden. Schematisch verlief die Synthese wie folgt:



3 Durchführung der Screening-Methoden

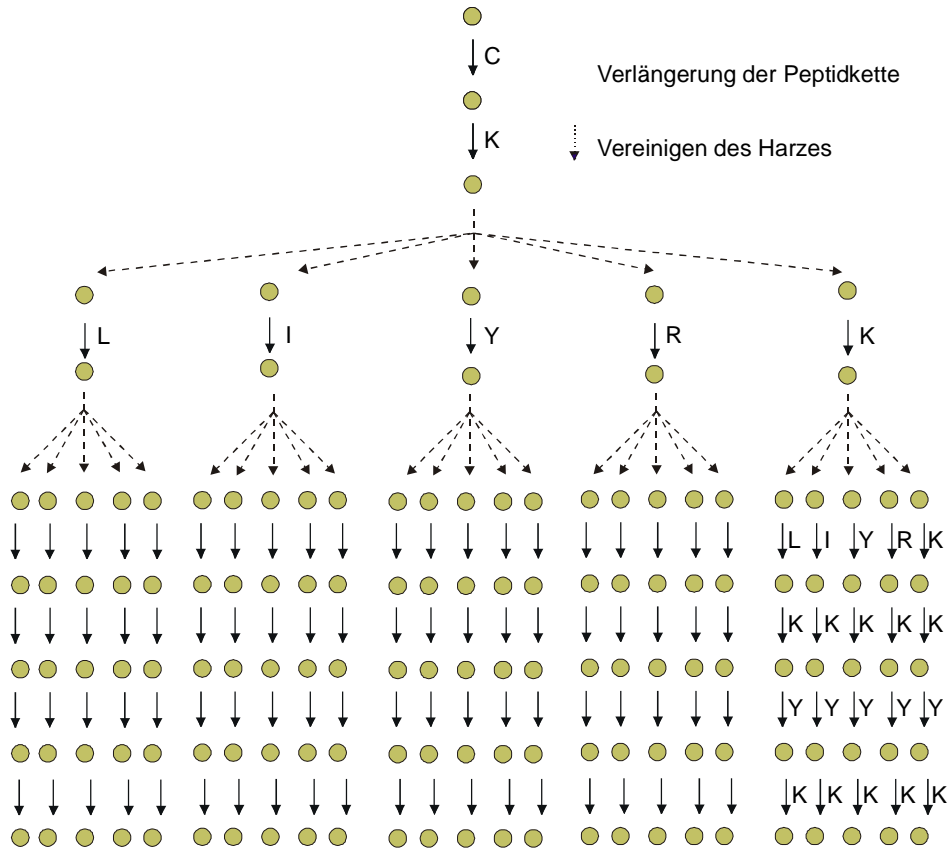


Abb. 3.11: Synthesestrategie von LibYK, 25x1 Peptide

Screening der Δ TAR-RNA mit LibYK:

Die Gele der Δ TAR-RNA mit LibYK lieferten folgendes Ergebnis

LibYK: K Y K _ _ K C(-S-PEG)-NH₂

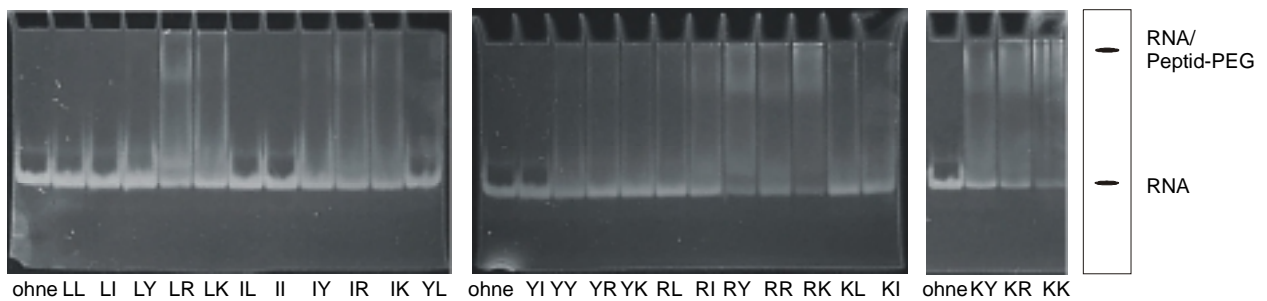


Abb. 3.12: Screening von Δ TAR-RNA mit LibYK

3 Durchführung der Screening-Methoden

Arginin-, Lysin- und Tyrosin-haltige Peptide binden besonders gut an die Δ TAR-RNA. Das entspricht den Erwartungen. Besonders gut binden die Peptide KYKRYKC-NH₂ und KYKLRKC-NH₂ als rel. hydrophobe Peptide.

Screening der CETP-RNA mit LibYK:

Die CETP-RNA wurde analog mit LibYK getestet.

LibYK: K Y K _ _ K C(-S-PEG)-NH₂

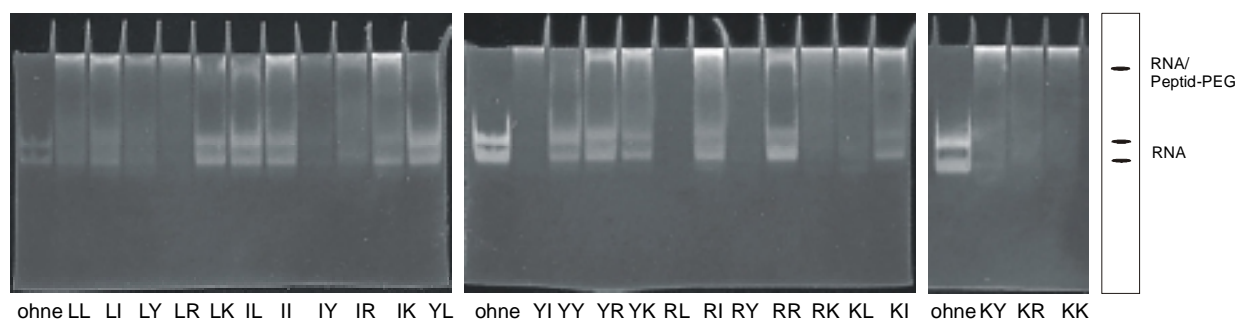


Abb. 3.13: Screening von CETP-RNA mit LibYK

Nun könnte man ablesen, welche Peptide mit dem Ausschnitt YK an die CETP-RNA binden. Zur Überraschung haben nicht nur die ansonsten basischen Peptide eine gute Affinität an die CETP-RNA, sondern auch einige hydrophobe. Auch hier binden Tyrosin-haltige Peptide in der Regel besser. Ein wichtiges Ergebnis ist, daß einige der hydrophob/basischen Peptide gut an die CETP-RNA binden, nicht aber an die Δ TAR-RNA. Man kann hier also von selektiver Bindung sprechen. Hierzu gehören folgende Peptide:

KYKRLKY-NH₂ > KYKIYKC-NH₂ > KYKYIKC-NH₂, KYKLYKC-NH₂

Abschließend konnten folgende RNA-Liganden mittels dem Gel-shift Test ermittelt werden:

CETP-RNA:	KYKLYKC-NH ₂ , KYKYIKC-NH ₂ , KYKIYKC-NH ₂ , KYKRLKC-NH ₂ , KKLRC-NH ₂ , KKKIC-NH ₂
Δ TAR-RNA:	KYKRYKC-NH ₂ , KYKLRKC-NH ₂

3.2 Phage Display

Die in Kapitel 3.2 beschriebenen Experimente wurden unter maßgeblicher Mitarbeit von Christoph Königs im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main durchgeführt.

Die CETP-, wie auch die Δ TAR-RNA wurden auch mittels Phage Display auf Peptid-Liganden mit hoher Affinität gescreent. Die Immobilisierung der RNA an die feste Phase wurde durch Bindung der Biotin-markierten RNA an adhäsiv an ELISA-Platten gebundenes Streptavidin erreicht. Die RNA wurde chemisch, festphasensynthetisch unter 3'-Biotin-Markierung durch einen kommerziellen Anbieter (Fa. Biospring) erhalten.

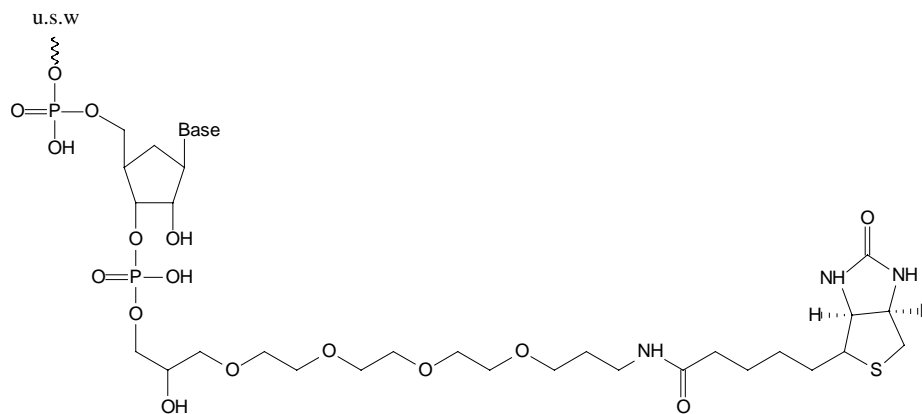


Abb. 3.14: 3'-Biotin-Markierung der RNA

Mit der an fester Phase immobilisierten RNA wurden die Phagen affinitätsselektiert. Da hierfür die RNA in Lösung längere Zeit bei RT mit biologischem Material (Phagen-Lsg, *E.coli*-Kulturlsg.) inkubiert werden muß, und die Gefahr eines RNase-Abbaus nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die RNA-Sequenzen im Vorfeld mit den benötigten biologischen Lösungen und den entsprechenden Zeiten inkubiert und anschließend auf RNA-Abbau mittels PAGE (19%, 8 M Harnstoff, 1x TBE, 220 V/10cm) untersucht.

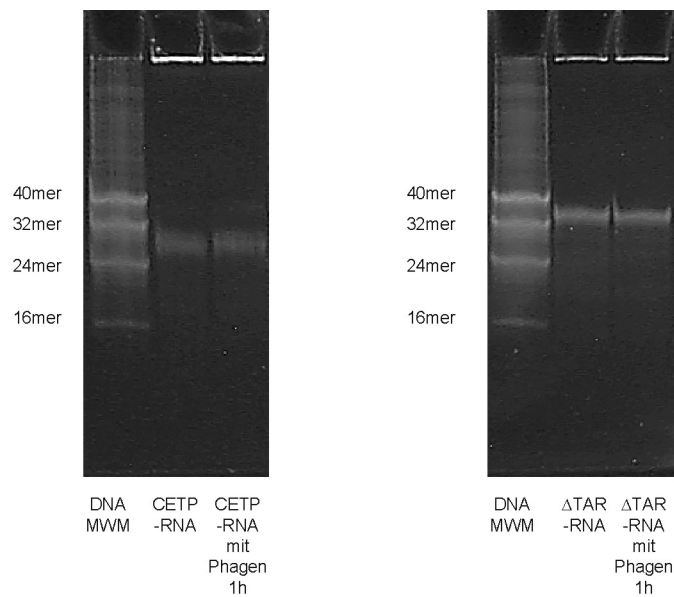


Abb. 3.15: Test der RNA-Stabilität unter "Phage Display"-Bedingungen

Während 1h Inkubationszeit konnte kein sichtbarer RNA-Abbau festgestellt werden, somit steht einem RNA-Screening mittels Phage Displays nichts mehr im Weg.

Die Phagen-Peptidbibliotheken wurden käuflich erworben (Fa. New England Biolabs). Es wurden für das RNA-Screening die lineare und cyclische Phagen-Heptapeptidbibliothek ausgewählt, welche mit dem g3p fusioniert vorlagen. Erfahrungsgemäß liefern diese besser reproduzierbarere Ergebnisse als noch größere Bibliotheken. In der cyclischen Variante ist das Heptapeptid von zwei Cysteinen umschlossen, welche spontan auf der Phagenoberfläche unter Ausbildung der Disulfidbrücke dimerisieren sollen. Für das Immobilisieren des Streptavidins, sowie die Affinitäts-Selektion „Panning“ kann man ausgearbeitete Vorschriften [28] befolgen. Lediglich die Inkubationszeiten der Phagen an der RNA wurde verkürzt, um die Gefahr eines RNA-Abbaus weiter zu verringern.

Beladung der festen Phase mit Streptavidin:

Bevor die biotinylierte RNA immobilisiert werden kann, muß die feste Phase mit Streptavidin beladen werden. Als polymerer Träger sind der Einfachheit halber sterile Polystyrol-ELISA-Platten (96 well) zu wählen. Die ELISA-Platte wird mit einer Streptavidin-Lösung behandelt, wobei sich die Streptavidin-Moleküle an der Polymer-Oberfläche anlagern. Anschließend

3 Durchführung der Screening-Methoden

müssen nicht mit Streptavidin belegte Plätze auf der Polymer-Oberfläche mit BSA blockiert werden, um unspezifische RNA-Adsorption zu verhindern.

Hierfür wird die ELISA-Platte mit Streptavidin (100 µg/mL) in 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3) vollständig benetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 24 h wird die Lösung abdekantiert, und die Schale 1h bei 4°C mit Blocking Puffer [0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3), 5 mg/mL BSA, 0.02% NaN₃] inkubiert, um die vom Streptavidin unbelegten Stellen abzusättigen. Der Blocking Puffer wird wiederum abdekantiert und die Platte 6 mal mit TBST [50 mM Tris·HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v)Tween-20] gespült.

Immobilisierung der RNA am Streptavidin

Die Inkubationszeiten der RNA sind verkürzt, und so die Gefahr eines RNA-Abbaus weiter verringert. 150 µL der biotynilierten RNA (100 µg/mL) wird in jedes well der Microtiterplatte gegeben und die Lösung kurz geschwenkt und für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird die überstehende Lösung abpipettiert und die Platte 6x mit TBST gewaschen.

Phage Display Prozedur

Die Affinitäts-Selektion kann man in fünf, sich wiederholende Schritte einteilen. Wiederholendes Inkubieren der Phagen am immobilisierten Target (1) und mit anschließendem Abspülen (2) der nicht oder nur schwachbindenden Phagen hat eine Anreicherung der Phagen mit erhöhter Affinität an das Target-Molekül zur Folge (Selektionsschritt). Diese (wenigen) Phagen werden mit niedrigem pH von der Platte gespült (3) und durch Infektion von *E.coli* (4) amplifiziert. Nach Isolierung der Phagen aus dem Kulturmedium (5) wiederholt sich die Affinitäts-Selektion, was eine erneute Anreicherung noch besser bindender Phagen zulässt.

Diese Affinitätsselektionszyklen wurden ohne Kontrollschritte hintereinander durchgeführt.

3 Durchführung der Screening-Methoden

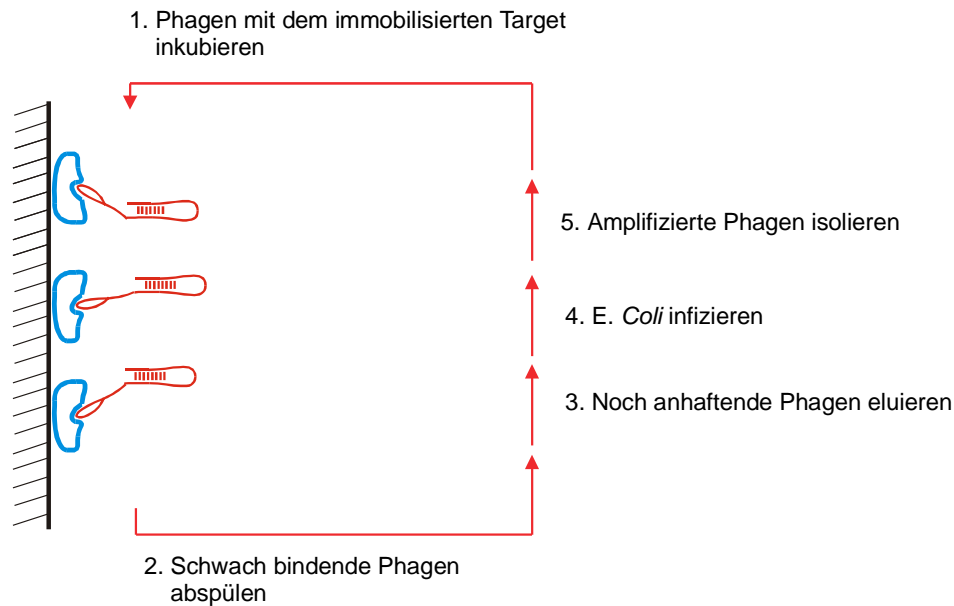


Abb. 3.16: Der Panning Prozess mit RNA

Vorgehensweise:

1. Die aus den *E.coli* ER2537 erhaltenen Phagen (oder 10 μL der Originallösung) werden auf 1 mL mit TBST verdünnt (ca. $2 \cdot 10^{11}/\text{mL}$), mit der immobilisierten RNA inkubiert (60 min).
2. Um schwach bindende Phagen zu entfernen wird die Platte nun 10 mal mit TBST gespült.
3. Die noch anhaftenden Phagen werden abgelöst, indem man die Platte mit 0.2 M Glycin'HCl, pH 2.2, 1 mg/mL BSA schwenkt, die Flüssigkeit abpipettiert und mit 1 M Tris'HCl pH 9.1 neutralisiert.
4. Mit den so erhaltenen Phagen werden *E.coli* ER2537 infiziert und bei 37°C für 4.5h inkubiert.
5. Die Phagen werden durch durch Abzentrifugation der *E.coli* und Fällung mit PEG/NaCl isoliert.

Dieser Prozess wird 3x durchlaufen. Nach dem letzten Cyclus werden die eluierten Phagen auf Kulturmedien ausgestrichen, um einzelne Klone zu isolieren. Die einzelnen Phagenklone sind anhand einer Blaufärbung (genetisch eingefügte Markierung) leicht zu erkennen.

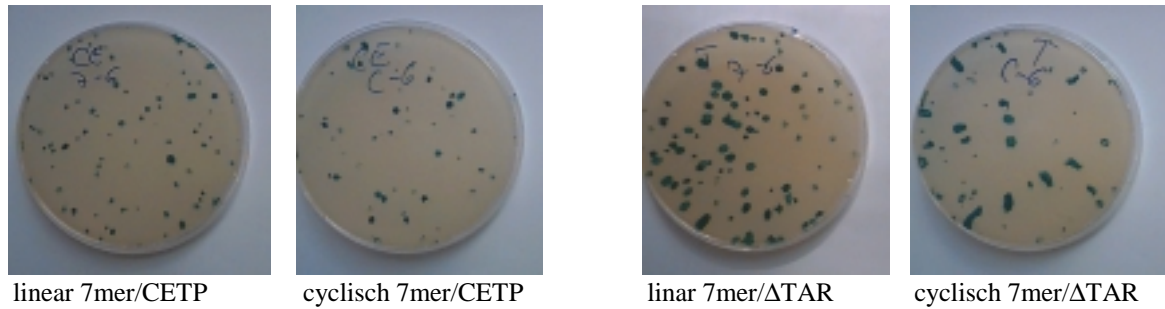


Abb. 3.17: Die isolierten Phagenklone

Es wurden insgesamt 70 Phagenklone ausgestochen, amplifiziert und auf spezifische RNA-Bindung im ELISA-Test geprüft. Hierbei wurden die RNA's mit Streptavidin immobilisiert (siehe Anfang dieses Kapitels) und mit den Phagen-Klonen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden noch gebundene Phagen mittels einem Phagen-Antikörper mit gekoppelter enzymatischer Farbreaktion detektiert. Die Phagenklone, welche selektiv nur eine der beiden RNA's gebunden haben, wurden sequenziert (Dideoxy Sequenzierung). Hierfür wurde nach Isolierung der DNA der -96 Sequenzierungsprimer 5'-GCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' verwendet.

3 Durchführung der Screening-Methoden

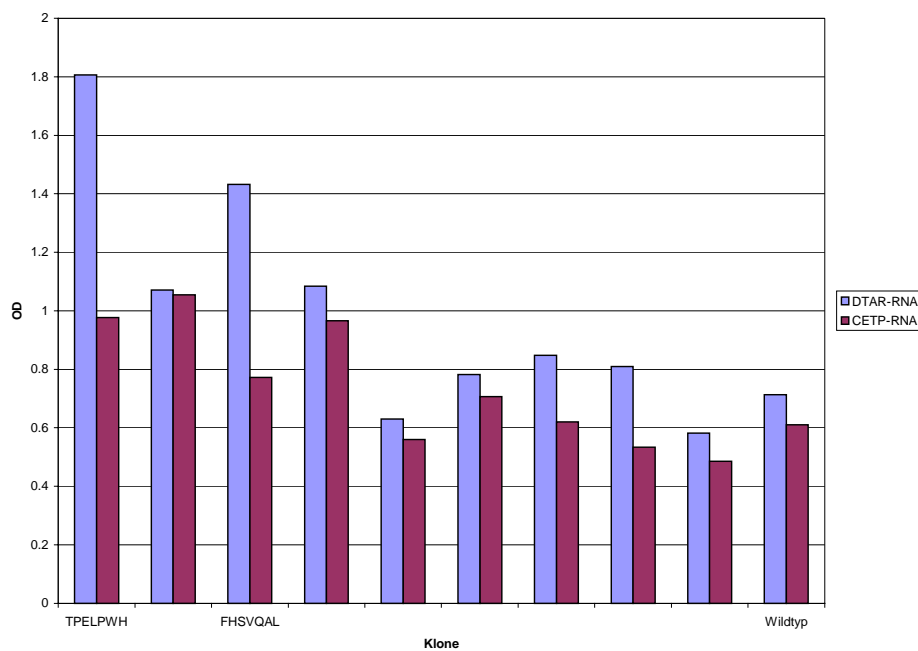


Abb. 3.18: ELISA-Test der isolierten Phagenklone auf Δ TAR-RNA-Bindung und Bindungsspezifität (Auswahl von 60 Klonen)

Die Intensität der ELISA-Farbreaktion wird für die ausgewählten Phagenklone aufgetragen. Deutlich zeigen zwei Klone (TPELPWH und FHSVQAL) eine selektive Affinität der Δ TAR-RNA gegenüber. Die Δ TAR-RNA zeigt hier jeweils einen stärkeren Ausschlag als die CETP-RNA, welche zur Kontrolle der Sequenzspezifität mitgetestet wurde. Die Wildtyp-Phagenklone zeigen wie erwartet keine selektive Affinität bei keinem RNA-Oligonukleotid. Bei dem Δ TAR-RNA-target handelt es sich hierbei um zwei Phagen-Klone (Abb.: 3.18). Es wurden folgende Peptidsequenzen ermittelt:

Δ TAR-RNA:	TAR3 = TPELPWH
	TAR4 = FHSVQAL

Bei den auf CETP-RNA-Bindung im ELISA-Test geprüften Klone zeigte nur einer von 60 eine geringe Affinität. Dieser Klon entspricht folgender Peptidsequenz:

CETP-RNA:	CETP2 = HPALAGH
-----------	-----------------

3 Durchführung der Screening-Methoden

Der Phagen-Bibliothek der cyclischen Peptide konnten keine RNA-Liganden entnommen werden, da deren Klone keine Reaktivität im ELISA-Test zeigten. Ausgehend von den erhaltenen Konsensussequenzen (lineare Peptide) wurden die jeweiligen Peptide chemisch nachsynthetisiert und deren Bindungseigenschaften genauer charakterisiert (insbes. NMR-Spektroskopie) sowie auf physiologische Wirksamkeit hin untersucht.

4.1 CD-Messungen

Schmelzen der CETP-RNA

Zuerst wurde das Schmelzverhalten der CETP-RNA untersucht um Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur zu ziehen. Die RNA-Probe (500 μL) wurde in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7 gemessen. Die RNA-Menge betrug 1 nmol (2 μM).

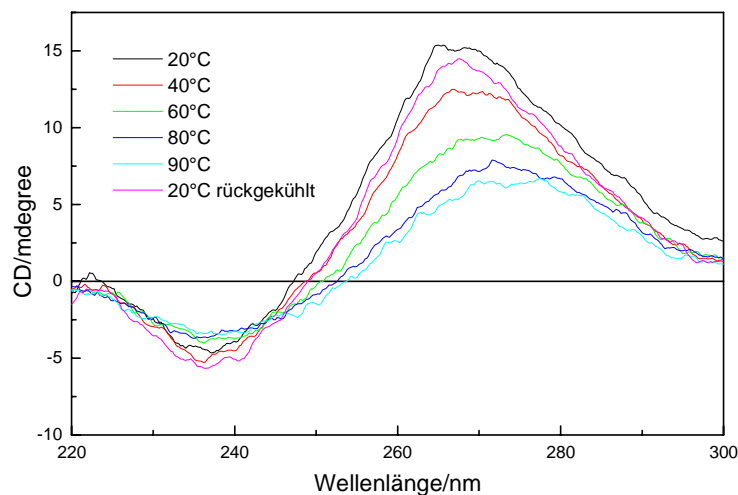


Abb.4.1: CD-Schmelzverhalten der CETP-RNA

Bei 20°C besitzt die CETP-RNA ein ausgeprägtes Maximum bei 270 nm, was für eine durch Basenpaarung strukturierte Sequenz spricht. Bei Erhöhung der Temperatur nimmt dieses Maximum immer mehr ab. Die Sekundärstruktur wird zunehmend hitzedenaturiert. Beim anschließendem langsamen Abkühlen auf 20 °C wird die RNA erneut strukturiert (renaturiert), man kann also von einem reversiblen Prozess sprechen.

Peptid/RNA-Interaktionen

CETP-RNA

Um die Bindung der im Gel-shift Screening aufgefallenen Peptide zu verifizieren, wurden die betreffenden Peptide in größerer Menge nachsynthetisiert. Von der RNA wurde nun das CD-Spektrum gemessen und das Verhalten der Kurve unter Zugabe des jeweiligen Peptids beobachtet. Alle RNA Proben (500 μL) wurden in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7 gemessen. Die RNA-Menge betrug jeweils 1 nmol (2 μM). Es wurden jeweils 5 Spektren bei RT aufgenommen und addiert. Als Peptide wurden zumeist mögl. hydrophobe gut bindende

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Peptide der Bibliotheken LibKK und LibYK ausgewählt. Es wurden jeweils einzelne CD-Spektren (links) sowie Titrationsreihen (rechts) gemessen. Bei der Titration wurden die Werte für dCD dem Maximum der freien RNA entnommen. Unter der rechten Kurve sind die Daten der für ihre Berechnung verwendeten Funktion angegeben. Da bei den meisten Fällen eine sigmoidaler Kurvenverlauf gefunden wurde, wurden die erhaltenen Werte mit einer Boltzmann-Funktion: $y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$ gefittet. In dem Fall des Peptides KYKLYKC-NH₂ wurde aufgrund der anderen Kurvenform z.T. folgende Funktion verwendet: $y = y0 + A1 \exp(-(x-x0)/t1)$. Es wurde jeweils das Programm Microcal Origin 4.10 (Microcal, Inc., MA/USA) verwendet

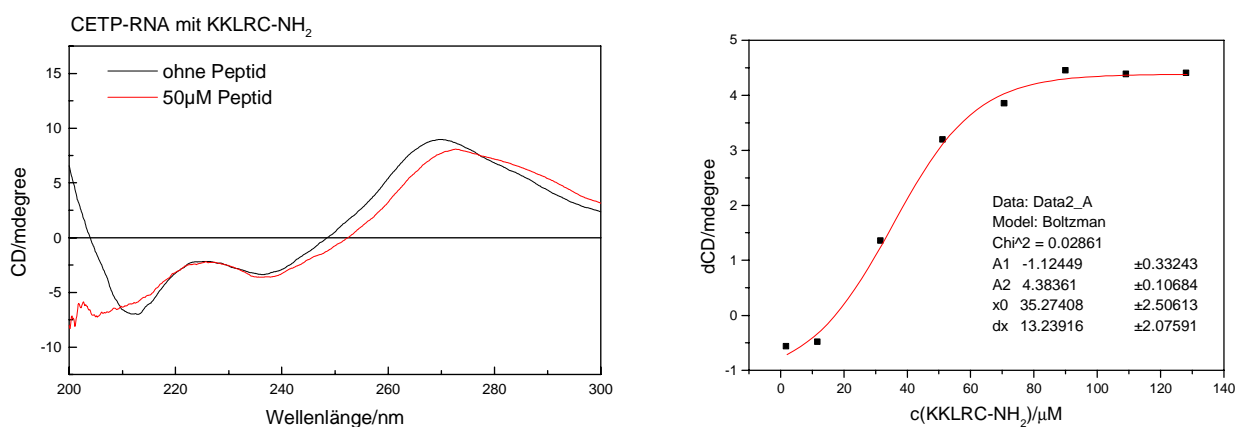


Abb.4.2: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KKLRC-NH₂

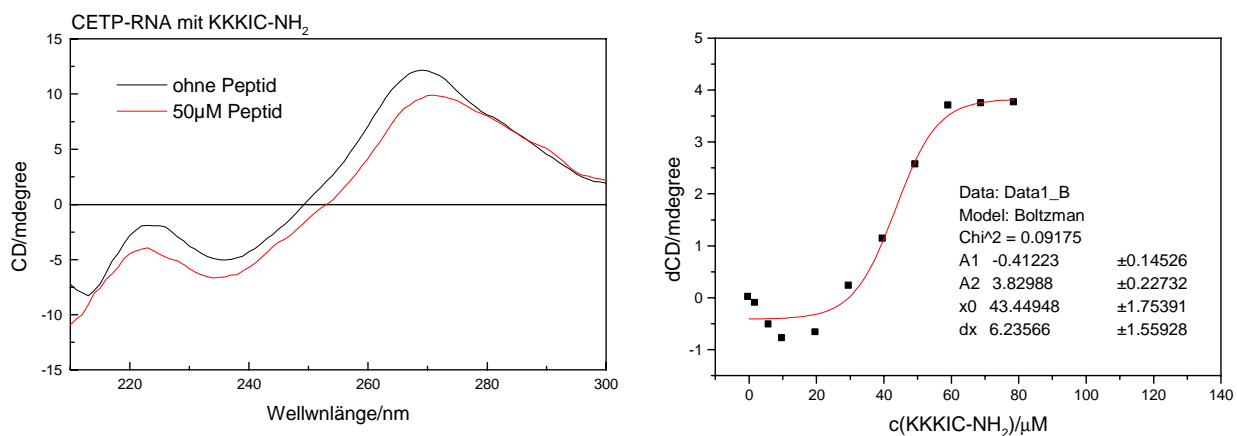


Abb. 4.3: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KKKIC-NH₂

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

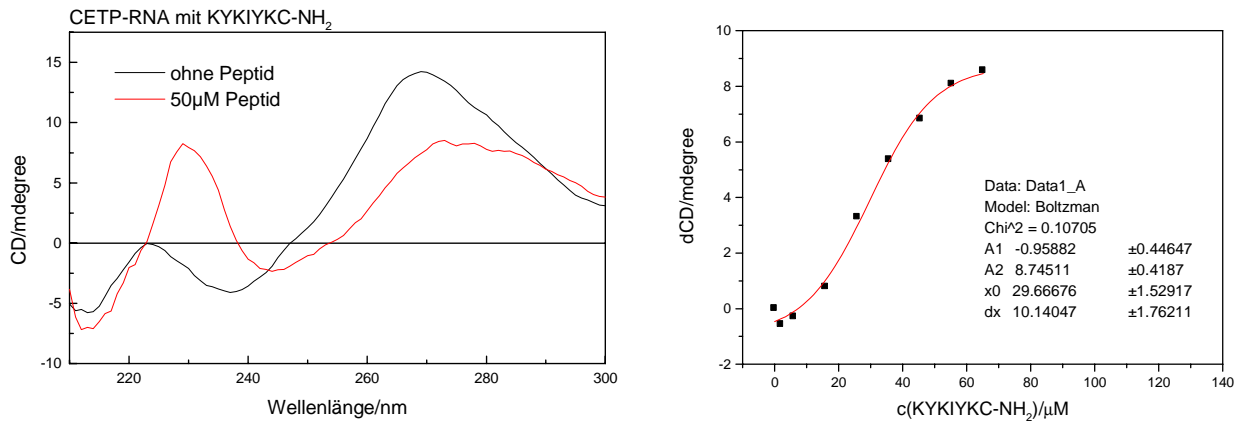


Abb. 4.4: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KYKIYKC-NH₂

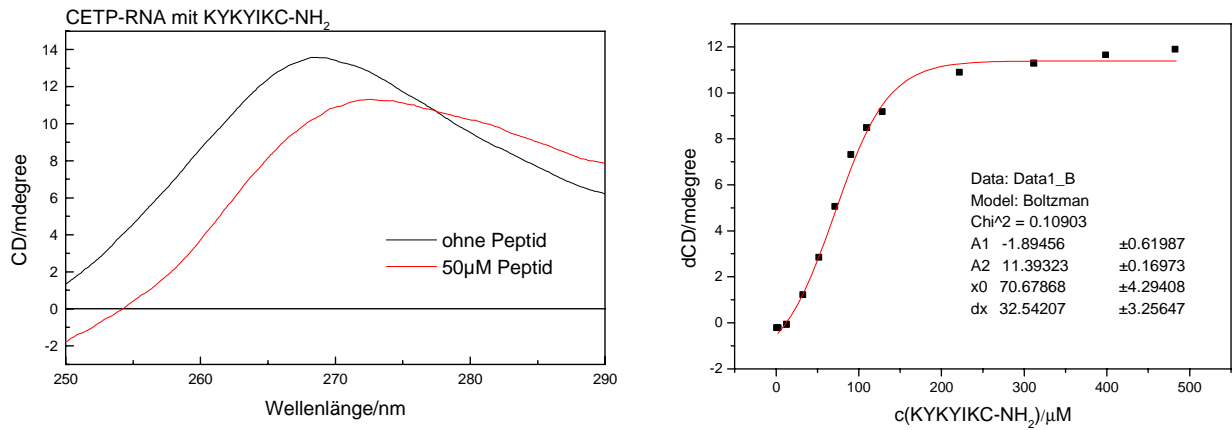


Abb. 4.5: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KYKYIKC-NH₂

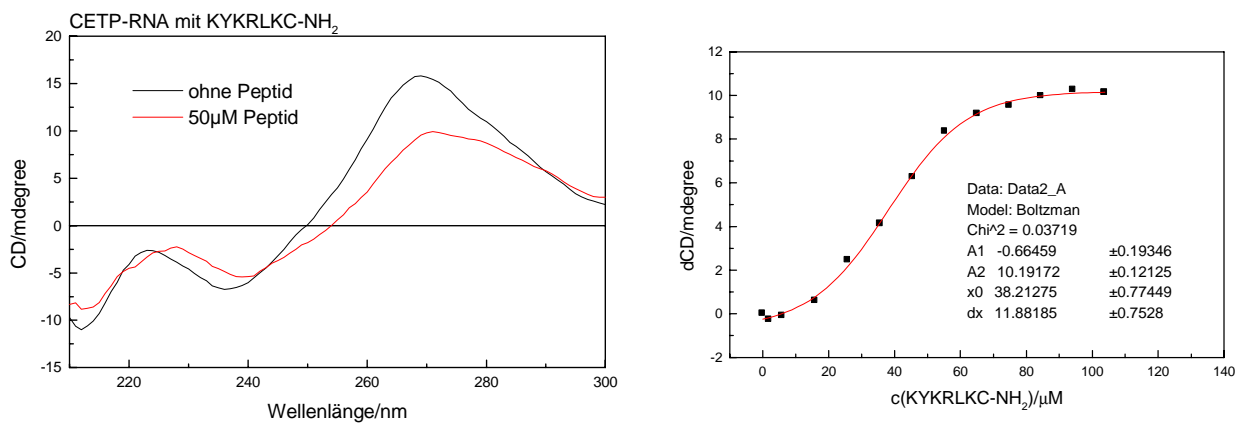


Abb. 4.6: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KYKRLKC-NH₂

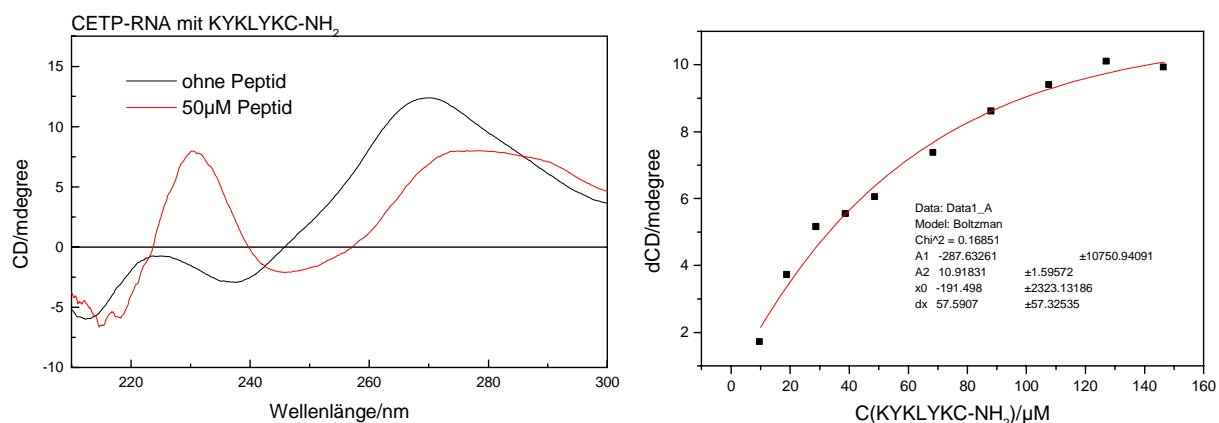


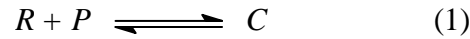
Abb. 4.7: CD-Messung/Titration von der CETP-RNA mit KYKLYKC-NH₂

Alle Peptide haben einen mehr oder weniger großen Effekt auf das RNA-Signal bei 270 nm. Hierbei ist zu erkennen, daß sich das Maximum bei den verschiedenen Peptiden unterschiedlich stark verkleinert und sich auch unterschiedlich stark zu höheren Wellenlängen verschiebt. Das Verkleinern des Maximums hat offensichtlich damit zu tun, daß das an die RNA-gebundene Peptid die Basenpaarung der RNA-Sekundärstruktur schwächt. Das Verschieben des Maximums kann mit einer Sekundärstrukturveränderung der RNA erklärt werden. Insgesamt kann festgehalten werden, daß die Heptapeptide einen deutlich größeren Einfluß auf das CD-Verhalten der RNA haben als die Pentapeptide. Die Verschiebung der CD-Maximums zu größeren Wellenlängen kann auf Komplexierung der chromophoren Gruppen zurückgeführt werden.

Zusätzlich zu den CD-Spektren wurden Titrations mit der Peptidkonzentration durchgeführt um Sättigungskurven zu erhalten. Hierbei wurde die Änderung des RNA-Signalmaximums bei 270 nm mit der Peptidkonzentration beobachtet. Die Titrations der Peptide KYKIYKC-NH₂, KKKIC-NH₂ mußten schon >100 µM abgebrochen werden, da eine plötzliche Präzipitation der RNA/Peptid-Komplexe eine weitere Messung der Lösung unmöglich machte. Alle Peptide erreichen aber dennoch einen Sättigungswert bei der Änderung des RNA-Signals. Die Bindungsaffinitäten fast aller Peptide liegen im Bereich >100 µM. Experimentell wurde meistens ein sigmoidaler Verlauf gefunden, nur das Peptid KYKLYKC-NH₂ zeigt nur ein Wachstum gegen einen Grenzwert $X = +\infty$ (Sättigungswert). Um den Grund für diese beiden Kurvenformen zu finden, wird im folgenden der Verlauf einer CD-Sättigungskurve theoretisch nachgestellt.

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Betrachtet man den theoretischen Fall einer reversiblen Bildung eines 1:1-Komplexes C aus einem Molekül RNA R und einem Molekül Peptid P:



Die Dissoziationskonstante K_d ist gegeben durch:

$$K_d = \frac{R \cdot P}{C} \quad (2)$$

Das Verhältnis v der Sättigung des CD-Signals kann wiedergegeben werden durch den Anteil der gebundenen und freien RNA:

$$v = \frac{dCD}{dCD_{\max}} = \frac{C}{C + R} \quad (3)$$

Ersetzt man nun die nicht direkt meßbaren Größen P, R und C durch die bekannten Größen p und r,

$$p = P + C \quad (4)$$

$$r = R + C \quad (5)$$

kann man nach P, C und R auflösen:

$$P = p - v \cdot r \quad (6)$$

$$C = v \cdot r \quad (7)$$

$$R = r - v \cdot r \quad (8)$$

Setzt man (6), (7) und (8) in (2) ein:

$$K = \frac{(r - v \cdot r) \cdot (p - v \cdot r)}{v \cdot r} \quad (9)$$

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

und stellt die Gleichung nach 0 um, erhält man:

$$0 = p - v \cdot r - v \cdot p + v^2 \cdot r - K \cdot v \quad (10)$$

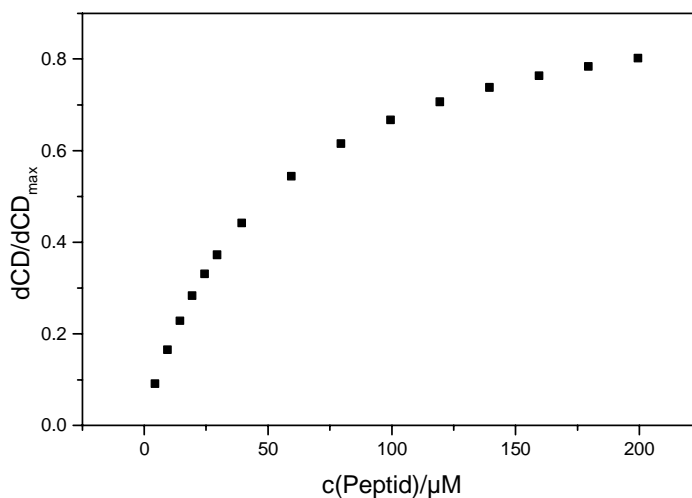
Stellt man (10) weiter um, um die pq-Formel anzuwenden, erhält man:

$$0 = v^2 - v \cdot \left(1 + \frac{p + K}{r}\right) + \frac{p}{r} \quad (11)$$

Nach Einsetzen in die pq-Formel erhält man für v:

$$v_{1/2} = \left(\frac{1}{2} + \frac{p + K}{2r}\right) \pm \sqrt{\left(\frac{1}{2} + \frac{p + K}{2r}\right)^2 - \frac{p}{r}} \quad (12)$$

Mit der Gleichung (12) läßt sich nun das Verhältnis der freien und gebundenen RNA aus bekannten Daten und gegebener Bindungskonstante K_d berechnen. So läßt sich der theoretische Verlauf einer Sättigungskurve für einen willkürlichen Modellfall eines RNA/Peptid-Paares berechnen. Die Bindungskonstante soll $50 \mu\text{M}$, die RNA-Konzentration $2 \mu\text{M}$ und der Bereich der Peptidkonzentration $5\text{-}200 \mu\text{M}$ mit (theoretischen) Titrationsschritten (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und $200 \mu\text{M}$) betragen. Die errechnete Sättigungskurve mit $p = c(\text{Peptid})$ hat nachfolgend abgebildeten Verlauf.



$$v = \frac{C + R}{C} = \frac{dCD}{dCD_{\max}} \quad \text{vs.} \quad p$$

Abb. 4.8: Theoretischer Verlauf der CD-Sättigungskurve eines 1:1-Peptid/RNA-Komplexes

Offensichtlich sollte die CD-Sättigungskurve für einen 1:1-Komplex einen derartigen Verlauf haben. Das Peptid KYKLYKC-NH₂ (CETP1) zeigt am nächsten ein solches Verhalten. Somit kann man aus der experimentell erhaltenen Sättigungskurve die Bindungskonstante von KYKLYKC-NH₂ an die CETP-RNA genau ermitteln. Liest man die Peptidkonzentration an der Hälfte des Grenzwertes der Sättigungskurve ab, erhält man einen Wert für K_d von $32 \pm 2 \mu\text{M}$.

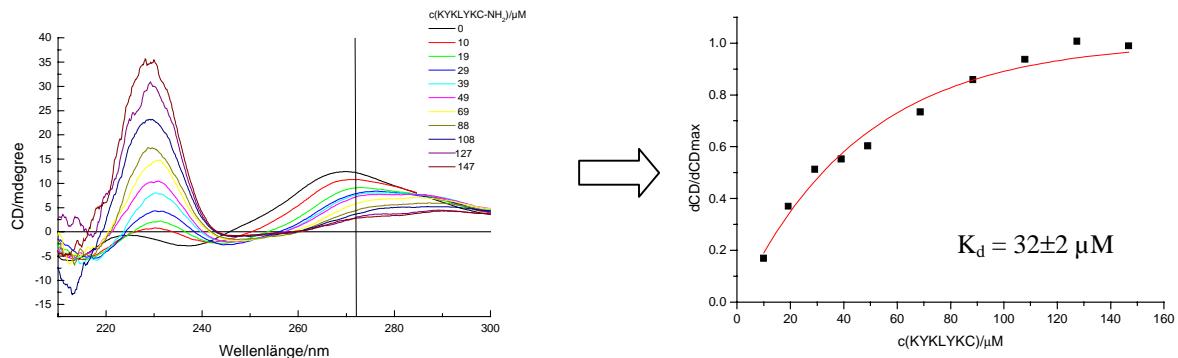


Abb. 4.9: CD-Titration

Die anderen Kurvenformen, welche z. T. auch Sprünge und Unregelmäßigkeiten aufweisen, sind vermutlich auch Präzipitation oder unkooperative Bindung zurückzuführen.

Acridin-Peptid/RNA-Komplexe

Um die Affinität an die Ziel-RNA zu erhöhen, wurde das Peptid KYKLYKC-NH₂ mit Acridin derivatisiert. Die sequenzabhängige Affinität des Peptids soll mit Acridin, einem sequenzunabhängigem Interkalator, kombiniert werden. Hierfür wurde die Strategie gewählt Acridin N-terminal mit dem Peptid über eine Säureamidbindung zu verknüpfen. Zusätzlich wurde dieses Molekül einmal mit einer und einmal mit zwei β -Alanineinheiten als Spacer hergestellt.

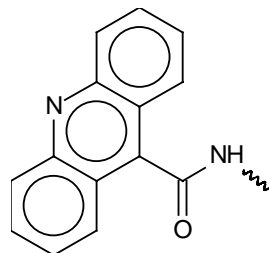


Abb. 4.10: Acridin-Derivatisierung am N-Terminus eines Peptides

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Im CD-Verhalten zeigen diese Peptide aber keinen größeren Effekt als der underivatisierten Vertreter. Offensichtlich nimmt der Einfluß des RNA-Liganden auf die RNA-Sekundärstruktur durch die Acridinderivatisierung nicht zu, sondern sogar ab, was nicht genau zu erklären ist. Ein störender Effekt des Acridins auf den gefundenen Peptid/RNA-Komplex muß die dsRNA/Acridin-Bindung überkompensieren. Auch die Einführung der zweiten β A-Einheit reduziert diesen Effekt nicht.

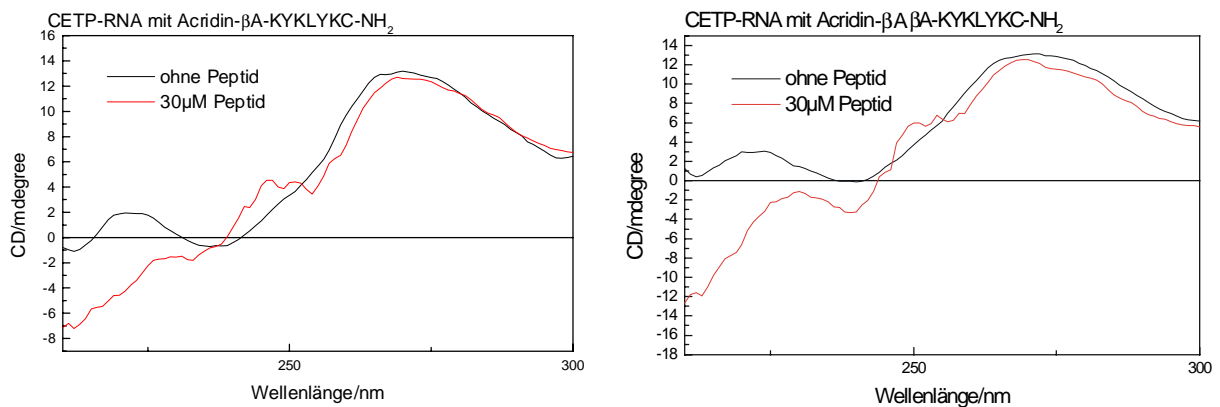


Abb. 4.11: CD-Messungen acridinderivatisierter Peptide

CETP-RNA-Ligand (CETP2 = Ac-HPALAGH-NH₂) des Phage Display

Die mittels Phage Display gefundenen Peptide wurden ebenfalls auf ihren Einfluß auf das CD-Spektrum hin untersucht.

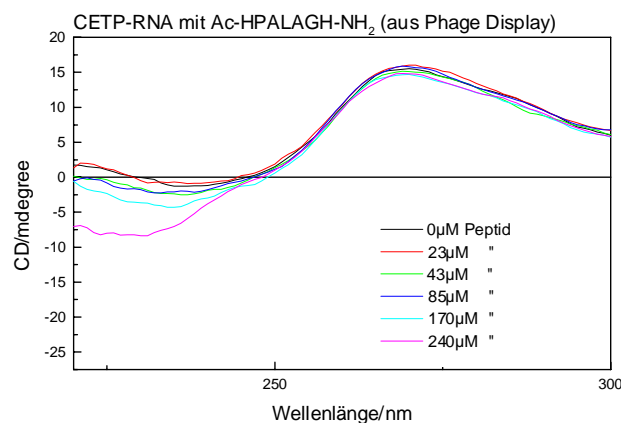


Abb. 4.12: CD-Messung der CETP-RNA und CETP2

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Entgegen den Erwartungen zeigt der mittels Phage Display gefundene CETP-RNA-Ligand nur einen sehr schwachen bis keinen Effekt im CD-Spektrum der RNA.

Δ TAR-RNA-Liganden des Gel-shifts (Tar1 = KYKLRKC-NH₂), Tar2 = KYKRYKC-NH₂)

Auch von der Δ TAR-RNA wurde das CD-Verhalten unter Einfluß der gefundenen Peptidliganden untersucht. Titrationkurven wurden nicht gemessen. Die Δ TAR-RNA-Liganden zeigen auch hier einen Effekt auf die Basenpaarung der RNA. Eine Verschiebung des Maximums ist nicht zu erkennen, wohl aber eine Verkleinerung.

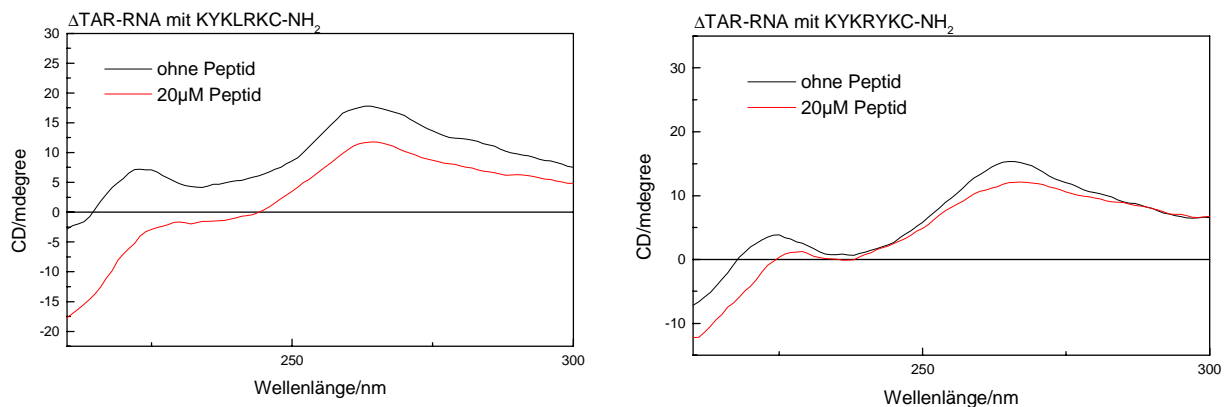
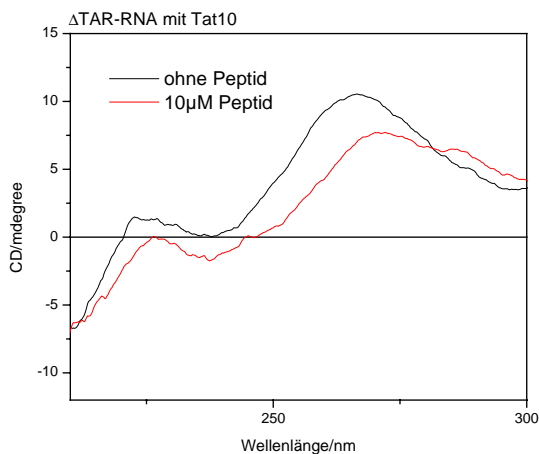


Abb. 4.13: CD-Messungen von der Δ TAR-RNA mit KYKLRKC-NH₂ (Tar1) und KYKRYKC-NH₂ (Tar2)



Der nanomolar affine Δ TAR-RNA-Ligand Tat10 [15] zeigt beide Effekte. Neben der Verkleinerung des RNA-Maximums wird dieses auch verschoben, was bei Tar1 und Tar2 nicht der Fall ist. Diese Destabilisierung und Konformationsänderung ist schon bei einem TAR-RNA/Argininamid-Komplex gefunden worden [4, 107].

Abb. 4.13: CD-Messungen von der Δ TAR-RNA mit Tat10

Δ TAR-RNA-Liganden des Phage Display ($Tat3 = TPELPWH-NH_2$, $Ac-Tar4 = Ac-FHSVQAL-NH_2$)

Die dem Phage Display entnommene Peptidsequenzen wurden auch CD-spektroskopisch auf deren Einfluß auf die RNA-Sekundärstruktur untersucht

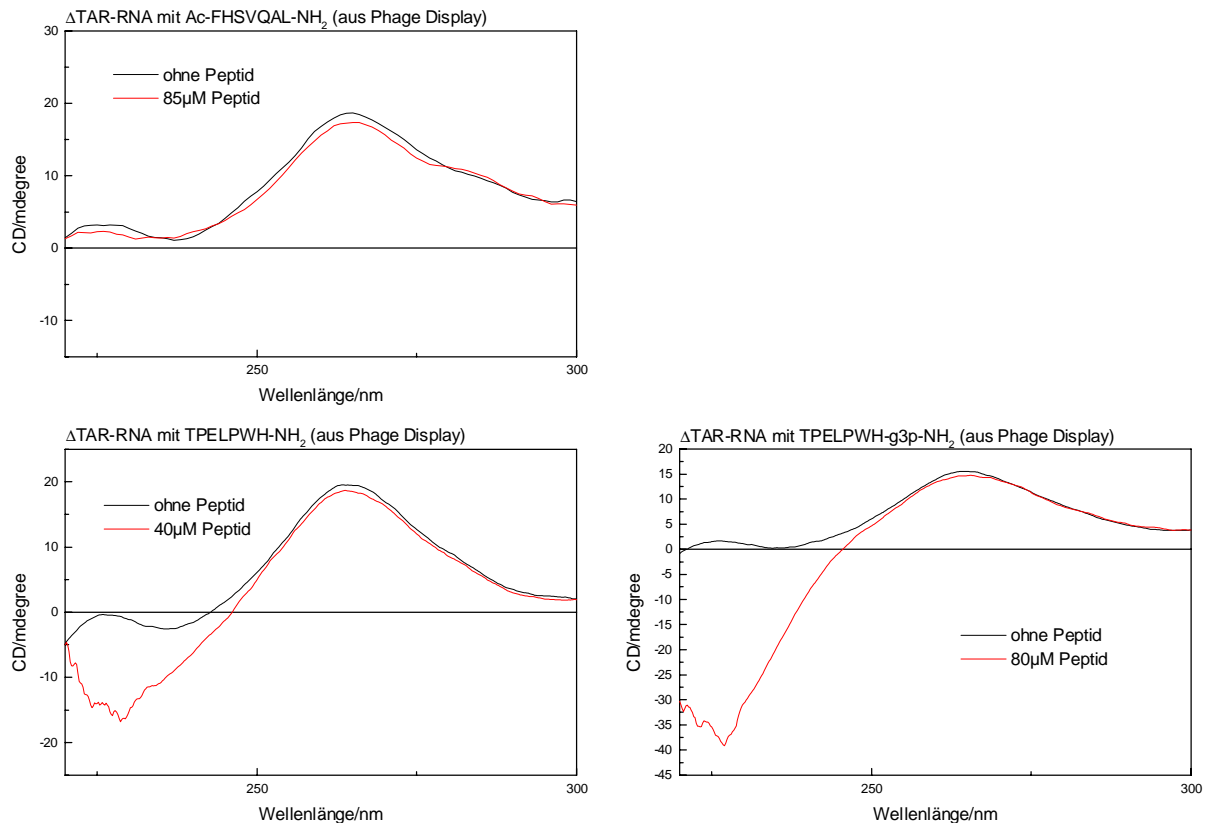


Abb. 4.14: CD-Messung der mittels Phage Display gefundenen Δ TAR-RNA-Liganden

Die dem Phage Display entnommenen Peptide haben auch in höheren Konzentrationen nur einen sehr schwachen Effekt auf das CD-Verhalten ihrer Target-RNA. Um zu überprüfen, ob Teile des Phagen-Hüllproteins (g3p), welches mit der Peptid-Bibliothek exprimiert wird, an der Bindung beteiligt sind, wurden die 23 letzten Aminosäuren des N-Terminus des g3p und den gefundenen 7mer Peptid als eine lineare Sequenz synthetisiert. Einen größeren Effekt auf das CD-Verhalten der Δ TAR-RNA konnte aber nicht festgestellt werden.

4.2 UV-Messungen

Schmelzen der CETP-RNA

Das Schmelzverhalten der CETP-RNA wurde auch mittels UV-Spektroskopie untersucht. Hierfür wurden Schmelzkurven aufgezeichnet und die Hyperchromozität der Basenpaarung ausgenutzt. Die Messungen wurden bei 260 nm und einem Temperaturbereich von 25-87 °C durchgeführt (0.5 °C/min). Damit wurde derselbe Temperaturbereich wie bei den CD-Hitzedenaturierungs-Messungen untersucht. Das Probenvolumen betrug jeweils 500 µL, als Puffer wurde 10 mM Kaliumphosphat pH 7, 100 mM Natriumchlorid verwendet. Die RNA-Menge betrug jeweils 1 nmol (2 µM).

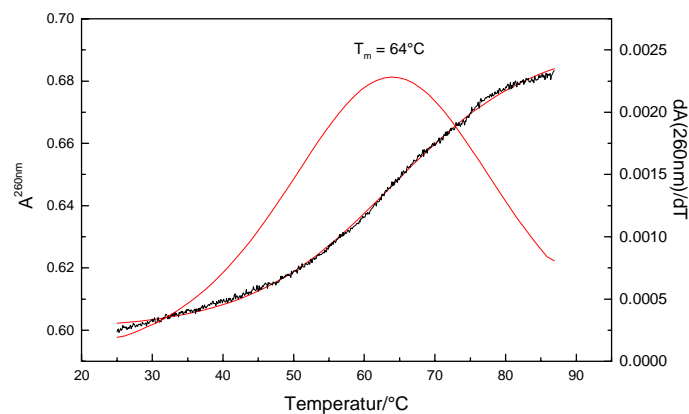


Abb. 4.15: Schmelzkurve der CETP-RNA

Es lässt sich eine Hitzedenaturierung der Sekundärstruktur beobachten. Der Schmelzpunkt, welcher durch Ablesen des Maximums der differenzierten Schmelzkurve erhalten wurde, beträgt $T_m = 64^\circ\text{C}$. Beispielsweise ist eine Renaturierungskurve der CETP-RNA dargestellt. Die RNA-Sequenz bildet eine Sekundärstruktur zurück.

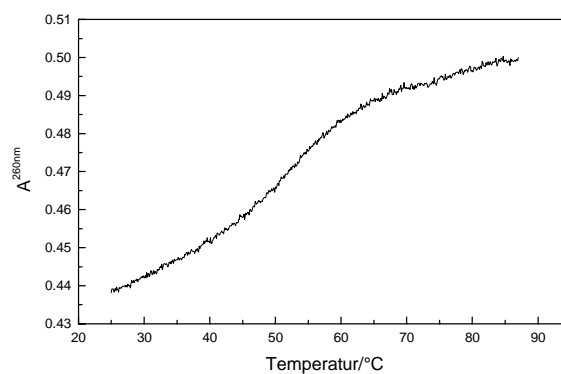


Abb. 4.16: Renaturierungsverhalten der CETP-RNA

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Das Schmelzverhalten der CETP-RNA wurde anschließend unter Einfluß des Peptids KYKLYKC-NH₂ untersucht.

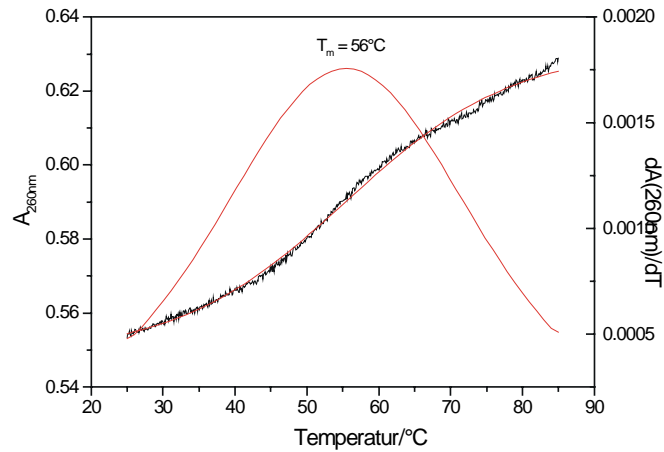


Abb. 4.17: Schmelzkurve des CETP-RNA/KYKLYKC-NH₂-Komplexes (1:1.3)

Der Schmelzpunkt der CETP-RNA wird durch Zugabe des Peptids KYKLYKC-NH₂ um 8 °C erniedrigt. Dieser deutliche Effekt ist durch die schon im CD-Spektrum erkennbare Destabilisierung der RNA-Sekundärstruktur zu erklären. Auch der CETP-RNA/KYKLYKC-NH₂-Komplex zeigt eine Renaturierungskurve.

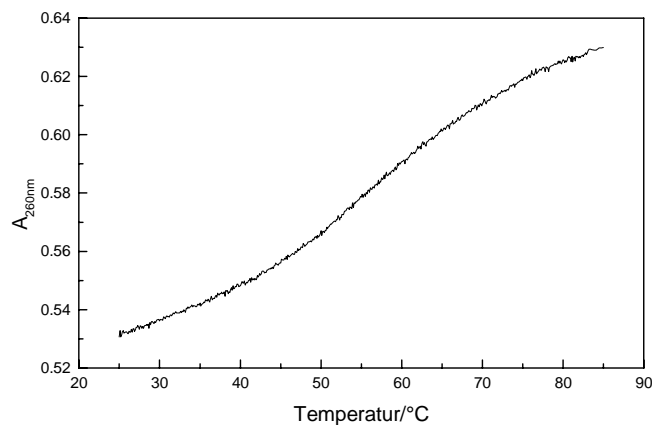


Abb. 4.18: Renaturierungsverhalten des CETP-RNA/KYKLYKC-NH₂-Komplexes (1:1.3)

4.3 Gelelektrophorese

Sekundärstruktur der CETP-RNA

Im Nativgel bei RT zeigt die CETP-RNA zwei Banden, welche im denaturierenden Gel als nur eine Bande läuft. Offensichtlich liegt die CETP-RNA bei RT mit zwei Konformationen nebeneinander vor.

1 DNA-MWM

2 8 M Harnstoff, 20% Polyacrylamid,
CETP-RNA

3 nativ, 10% Polyacrylamid
CETP-RNA

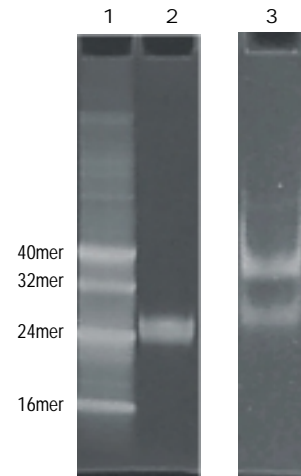


Abb. 4.19: CETP-RNA im nativ/denat. Polyacrylamidgel

Der CETP-RNA/ KYKLYKC-NH₂-Komplex

Um die Peptid/RNA-Bindung weiter zu bestätigen, wurden weitere native Gelelektrophoreseuntersuchungen der Komplexe durchgeführt. Während des Gel-Shift Screenings wurden die Peptide mit Polyethylenglykol derivatisiert, um eine besser analytisch auszuwertende Retardierung der Banden zu erhalten. Im einzelnen wurden nun versucht, mit nativen Polyacrylamidgelen längerer Laufzeit auch einen Band-shift des underivatisierten Peptids zu beobachten. Da das Peptid nur ca. 1/8 der Molmasse der RNA, hat ist der zu beobachtene Effekt nur sehr klein. Das Laufzeit des Gels muß entsprechend lang sein, um die freie und gebundene RNA auflösen zu können. Zu diesem Zweck wurde die CETP-RNA mit nicht mit Polyethylenglykol derivatisiertem Peptid KYKLYKC-NH₂ in nativen Polyacrylamidgelen analysiert.

- 1** CETP-RNA + 50 μ M KYKYLYKC-NH₂
- 2** CETP-RNA
- 3** DNA-MWM

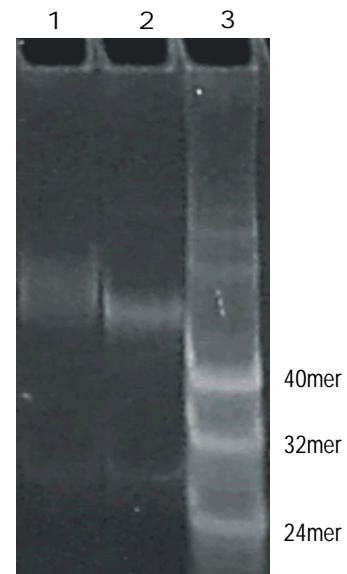


Abb. 4.20: Der CETP/KYKYLYKC-NH₂-Komplex im Nativgel (ohne PEG)

Mit Hilfe eines nativen Polyacrylamidgel wurde die Bindungskonstante des CETP-RNA/KYKLYKC-NH₂-Komplexes grob bestimmt. Die Peptidmenge wurde variiert und der jeweilige Anteil der gebundenen RNA aus dem Gel abgelesen. Wegen der deutlich besseren Auflösung und der damit verbundenen Ablesbarkeit wurde die K_d -Bestimmung mit den PEG-derivatisiertem Peptid vorgenommen. Der K_d -Wert entspricht der Peptidkonzentration, bei der die Sättigungskurve einen 50%-Wert erreicht hat.

- 1** 0 μ M KYKLYKC-(-S-PEG)-NH₂
- 2** 50 μ M KYKLYKC-(-S-PEG)-NH₂
- 3** 100 μ M KYKLYKC-(-S-PEG)-NH₂
- 4** 125 μ M KYKLYKC-(-S-PEG)-NH₂
- 5** 150 μ M KYKLYKC-(-S-PEG)-NH₂

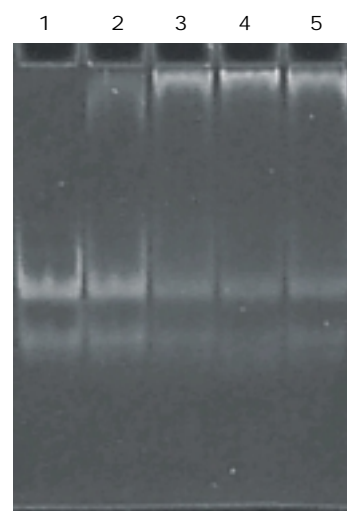


Abb. 4.21: Peptid-PEG-Titration der CETP-RNA

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Das Peptid bindet offensichtlich an beide RNA-Konformationen. Die Qualität eines Ethidiumbromid gefärbten Geles reicht grob zur Quantifizierung der Banden aus. Quantifiziert man die Komplex-Bande mit einer geeigneten Gelauswerte-Software (Kodak Kds1d) und liest man die Peptidkonzentration an der Hälfte des Grenzwertes der Sättigungskurve ab, erhält man einen Wert für $K_d = 22 \mu\text{M}$ (x-Wert bei 50% gesättigter RNA).

$$K_d = 22 \mu\text{M}$$

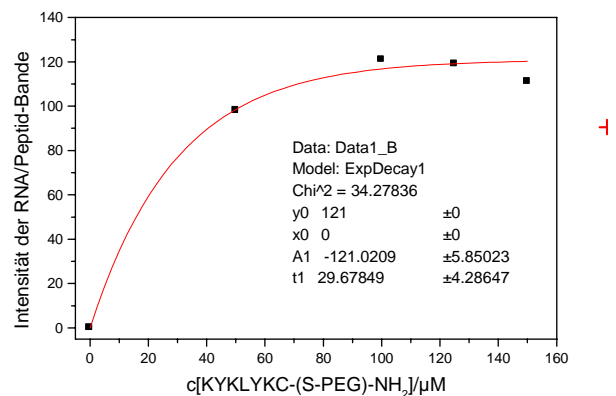


Abb. 4.22: Gel-shift-Titration mit EtBr angefärbt

Der Fehler wurde nicht genau bestimmt, dürfte aber mind. 25% betragen. Für eine grobe Abschätzung der Bindungskonstante ist diese Methode aber ausreichend.

Acridin-derivatisierte Peptide

Die RNA-Affinität des Peptids KYKYLYKC-NH₂ wurde durch die Acridinderivatisierung nicht erhöht. Immerhin läßt sich auch im Nativgel ohne PEG-Derivatisierung eine Retardierung einer der beiden CETP-RNA-Banden nachweisen.

- 1 CETP-RNA + 400 μM Acridin- β A-KYKYLYKC-NH₂
- 2 CETP-RNA
- 3 CETP-RNA + 400 μM Acridin- β A β A-KYKYLYKC-NH₂
- 4 CETP-RNA

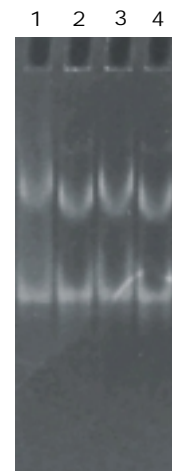


Abb. 4.23: Gel-Retardierung der CETP-RNA mit Acridin/Peptidderivaten

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Es zeigt nur die obere der beiden Banden der RNA eine Retardierung, nur hier bindet das acridinderivatisierte Peptid. Da die obere Bande vermutlich ein RNA-RNA-Doppelstrang ist, wirkt das Acridin wohl tatsächlich als Interkalator. Insgesamt ist die Affinität aber nur gering, da man rel. hohe Konzentrationen braucht, um einen Effekt zu erzeugen. Die Länge des flexiblen β A-Spacers hat keinen Einfluß auf die Affinitäten.

Gele radioaktiv markierter CETP-RNA

Um genauer quantifizierbare Gele zu erhalten, wurde die CETP-RNA am 5'-Ende mit 32 P-Phosphat markiert. Die Gele wurden mit einem Phosphorimager (Fa. Molecular Dynamics) ausgewertet. Es wurde die KYKLYKC-(S-PEG)-NH₂-Konzentration titriert, und dann der Anteil der freien und gebundenen RNA gemessen des Geles gemessen. Die RNA-Menge betrug 0.04 OD in 20 μ L Probenvolumen in Gelpuffer 1 und 15 min Inkubation bei RT.

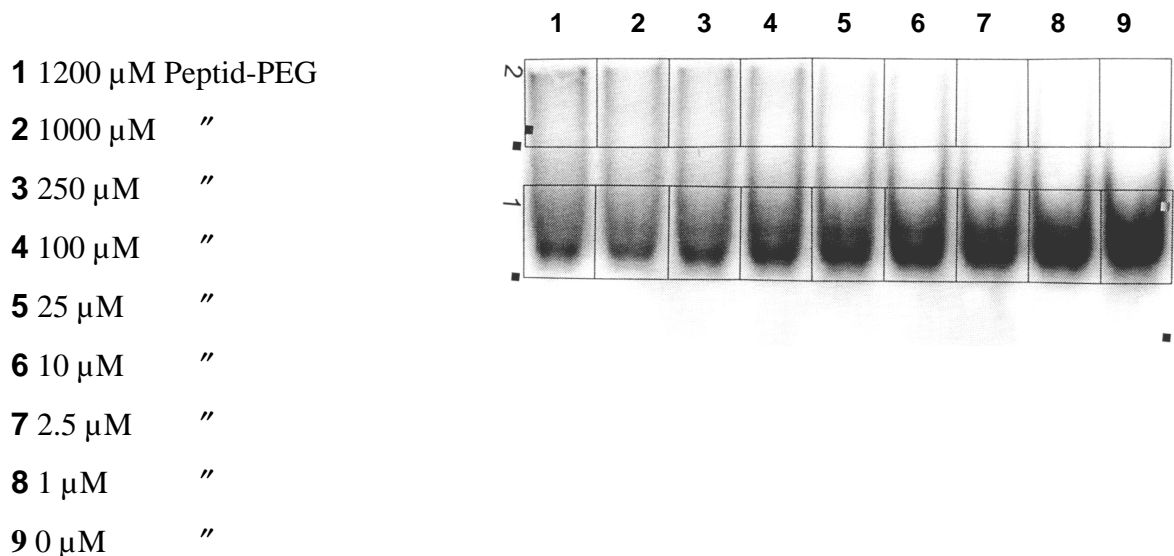


Abb. 4.24: Gel radioaktiv markierter CETP-RNA

Trägt man die RNA-Belegung gegen die Peptidkonzentration auf, erhält man eine Sättigungskurve, aus welcher man den K_d -Wert abschätzen kann.

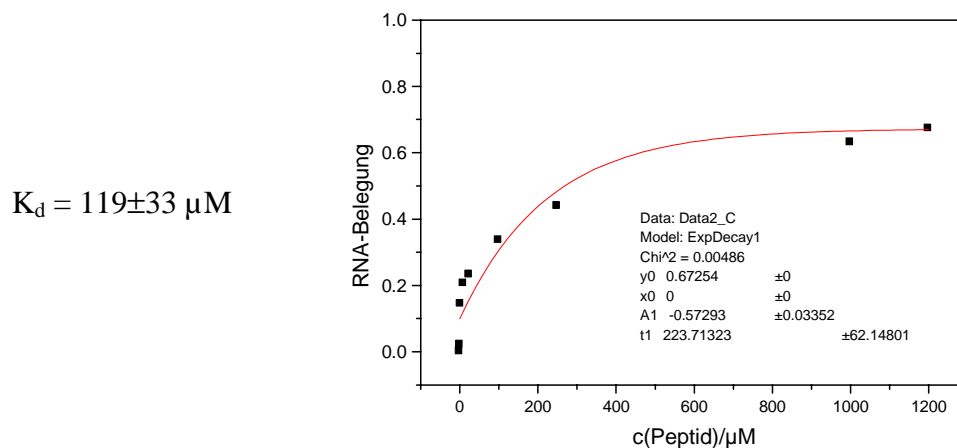


Abb. 4.25: Gel-Titration mit radioaktiv markierter RNA

Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung, wie die nach den anderen Methoden bestimmten K_d -Werte (CD-Titration $32 \mu\text{M}$, Ethidiumbromid gefärbtes Gel $20 \mu\text{M}$). Trotzdem weicht dieser Wert von den anderen Werten deutlich ab. Die Banden waren oft verschmiert, der Gel-shift häufig nicht zu beobachten. Erst als zu der radioaktiv markierten RNA noch unmarkierte zugesetzt wurde, um die gesamte RNA-Konzentration der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele zu erreichen, konnte eine Retardierung der Bande erreicht werden. Die Intensität der retardierten Bande entsprach aber nicht der Abnahme der nicht-retardierten Bande, sondern war geringer. Wo die Differenz in der Radioaktivität geblieben ist, konnte nicht geklärt werden. Evt. ist der Peptid/RNA-Komplex ausgefallen und nicht vollständig in die Geltasche überführt worden.

Peptide des Phage Display

Eine Retardierung der jeweiligen Target-RNA-Bande in Gegenwart der PEG-derivatisierten Peptide Tar3, Tar4, CEPT2 und des underivatisierten Peptids Tar3g3p konnte nicht nachgewiesen werden.

4.4 NMR-Spektroskopie

4.4.1 Schmelzverhalten

Aufgrund der ausgebildeten Sekundärstrukturen der CETP-RNA können die in Wasserstoffbrückenbindungen involvierten Iminprotonen der Basen des RNA-Oligonukleotides im NMR-Spektrum beobachtet werden. Beim Aufheizen der NMR-Probe im Probenkopf sollten diese Signale zunehmend schwächer werden, da die Wasserstoffbrückenbindungen und Sekundärstrukturen aufbrechen (Denaturieren). Ausgehend von einer Temperatur von 280 K wurde die Probe in 20 K-Schritten auf 360 K aufgeheizt und jeweils ein 1D ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Nach dem Aufheizen und vor der Aufnahme des Spektrums wurde die Probe jeweils 30 min temperiert.

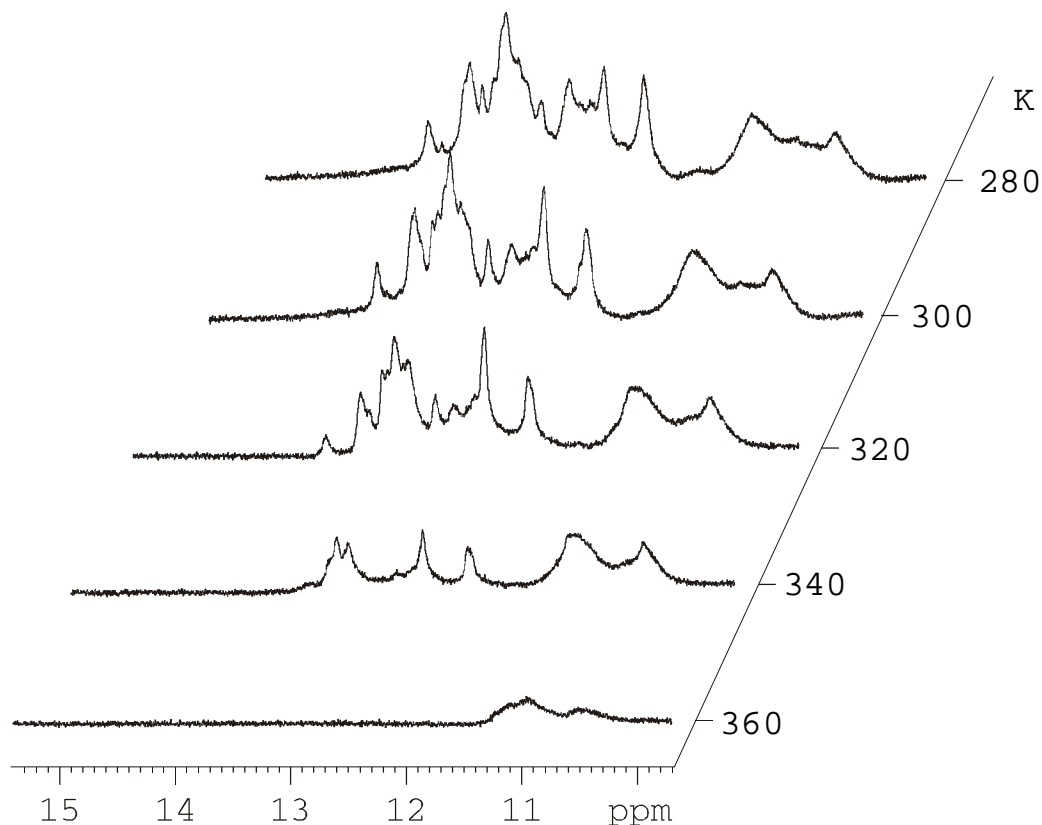


Abb. 4.26: Hitzedenaturierung der CETP-RNA im NMR-Spektrometer (600MHz, 1D Jump-Return, 1 mM CETP-RNA, 100 mM NaCl, 10 mM KP, pH 6.6)

Mit zunehmender Temperatur werden die Iminosignale im Bereich von ca. 12-14 ppm immer schwächer, während sich die Intensitäten z.B. der Aromaten/Aminosignale in Bereich von ca. 7-9 ppm nicht so stark ändern (nicht dargestellt). Bei 360 K sind nahezu keine Iminosignale mehr zu beobachten, die RNA ist denaturiert. Dieser Temperaturbereich des Schmelzens der RNA konnte auch bei UV- (Kapitel 4.2: $T_M = 344.15$ K) und CD-Messungen (Kapitel 4.1) festgestellt werden. Nach dem Rückkühlen der Probe auf 280 K konnte ein analoges Schema der Iminosignale im 1D ^1H -NMR-Spektrum festgestellt werden. Das Hitzedenaturieren und Renaturieren ist offensichtlich ein reversibler Prozeß, die Sekundärstrukturen werden zurückgebildet.

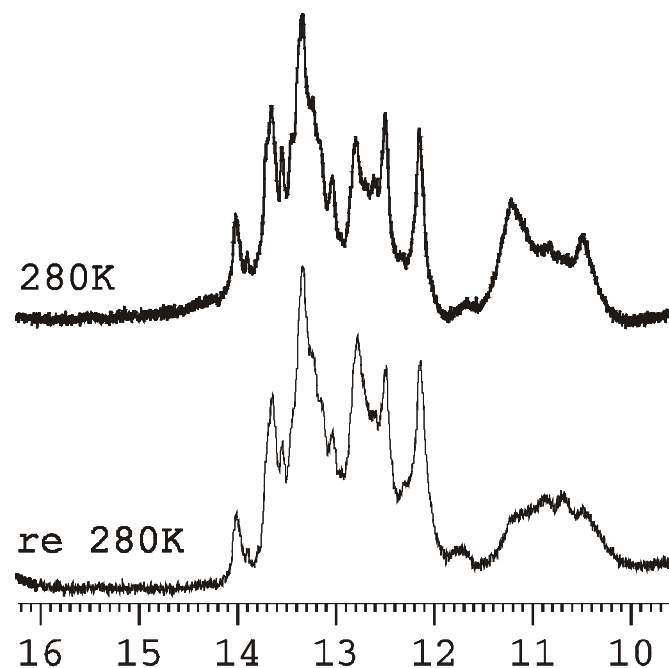


Abb. 4.27: Renaturierung der CETP-RNA (600 MHz, 1D Jump-Return, 1mM CETP-RNA, 100 mM NaCl, 10 mM KP, pH 6.6)

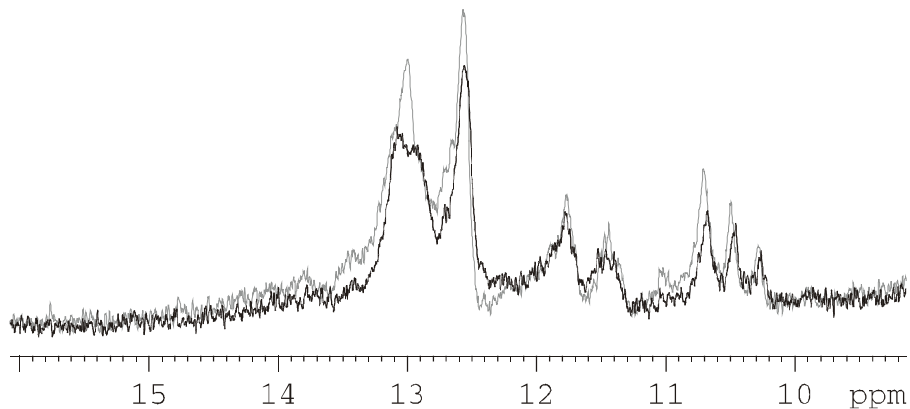
4.4.2 Bindungsstudien

Um die Affinitäten einiger Peptide zu Target-RNA weiter zu verifizieren, wurden 1D und NOESY NMR-Experimente unternommen. Hierfür wurden Liganden der CETP- und Δ TAR-RNA ausgewählt. Kriterium bei der CETP-RNA war das Verhalten der Peptide im CD-Spektrum. Es wurden jeweils ein Penta- und ein Heptapeptid, welche im Gel-shift-Test

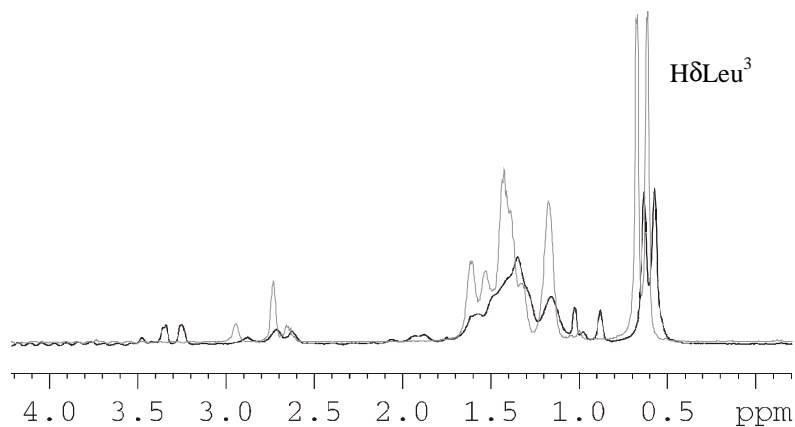
gefunden wurden, weiter untersucht. Bei der Δ TAR-RNA wurde eines der im Phage Display gefundenen Peptide auf seine Affinität mittels NMR untersucht.

KKLRC-NH₂

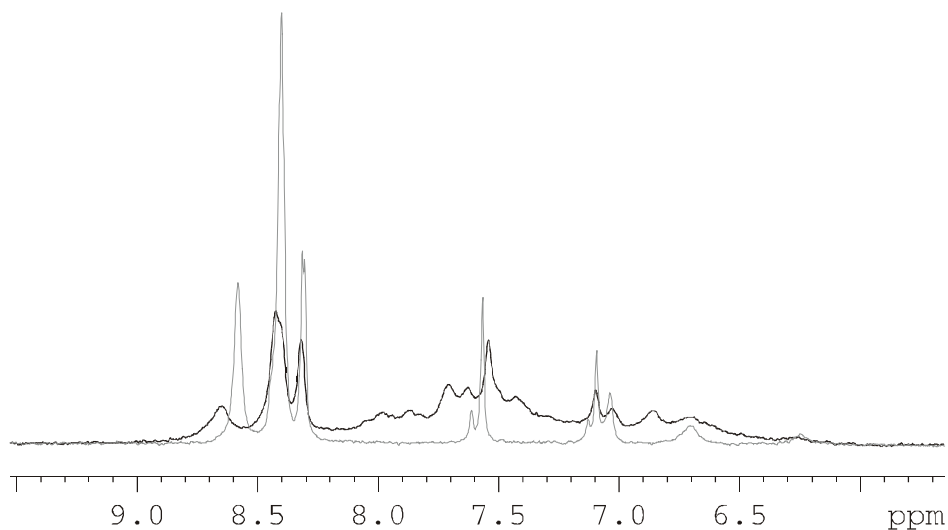
Dieses Pentapeptid zeigte im Gel-shift-Verhalten eine ähnlich gute Affinität an die CETP-RNA, wie Peptide mit nur basischen Resten. Zudem war die Affinität scheinbar höher, als die anderen Peptide mit nur einer aliphatischen Seitenkette.



*Abb. 4.28a: 1D Jump-Return ¹H-NMR-Titration der CETP-RNA mit KKLRC-NH₂ 1eq.
(Komplex: schwarz, freie RNA: grau)*



*Abb. 4.28b: 1D Jump-Return ¹H-NMR-Titration der CETP-RNA mit KKLRC-NH₂ 1eq.
(Komplex: schwarz, Peptid: grau)*



Δ TAR-RNA Abb. 4.29: 1D Jump-Return ^1H -NMR-Titration der CETP-RNA mit KKLRC-NH₂ Ieq. (Komplex: schwarz, Peptid:grau)

Im Iminobereich der RNA sind nur leichte Veränderungen zu erkennen, die geringe Abnahme der Intensität der Signale kann auf eine leichte Schwächung der Basenpaarung zurückgeführt werden. Ein Ausfallen des Peptid/RNA-Komplexes wurde bei dieser Peptidkonzentration makroskopisch noch nicht beobachtet. Bei 13.1 ppm kann eine Änderung des Iminosignalschemas erkannt werden. Die Amidprotonen des Peptids zeigen kaum eine Veränderung. Die Methylprotonen des Leucin-Restes ($\text{H}\delta\text{Leu}^3$) zeigen eine leichte Hochfeldverschiebung, offensichtlich befinden diese sich im Anisotropiebereich der aromatischen Basen der RNA. Die Linienverbreiterung ist nur sehr schwach oder nicht vorhanden.

Proton	δ ppm, J (frei)	$\delta\delta$ ppm (frei/Komplex)	Linienbreite (frei)	Linienbreite (Komplex)
$\text{H}\delta\text{Leu}^3$	0.64, $^3J = 36$ Hz	0.05	14 Hz	14 Hz
$\text{Cys}^5\text{-NH}_2^*$	7.09	>0.01	8 Hz	9 Hz
$\text{Cys}^5\text{-NH}_2^*$	7.57	0.03	9 Hz	10 Hz
NHLeu^3	8.31	>0.01	15 Hz	14 Hz
$\text{NHLys}^{1/2}$	8.40	0.02	18 Hz	17 Hz
NHCys^5	8.58	0.07	21 Hz	25 Hz

* amidierter N-Terminus

Tab.: 4.1: NMR-Daten von KKLRC-NH₂ mit/ohne der 23mer RNA

CETP1 (KYKLYKC-NH₂)

Dieses Heptapeptid zeigt im Gel-shift-Verhalten eine Affinität zur CETP-RNA, wie sie sonst nur bei Peptiden mit nahezu vollständig basischen Seitenketten zu finden war. Zudem wurde mittels CD-Titration eine Bindungs/Sättigungskurve erstellt, und somit ein $K_d = 32 \mu\text{M}$ ermittelt. Als interner Standard wurde TSPA verwendet.

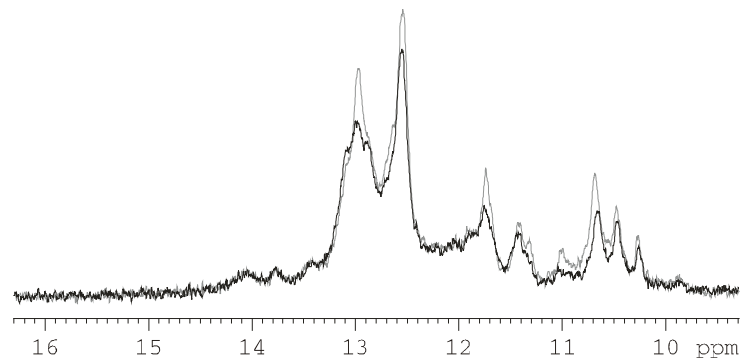


Abb. 4.30a: 1D Jump-Return ¹H-NMR-Titration der CETP-RNA mit KYKLYKC-NH₂ eq. (Komplex: schwarz, freie RNA: grau)

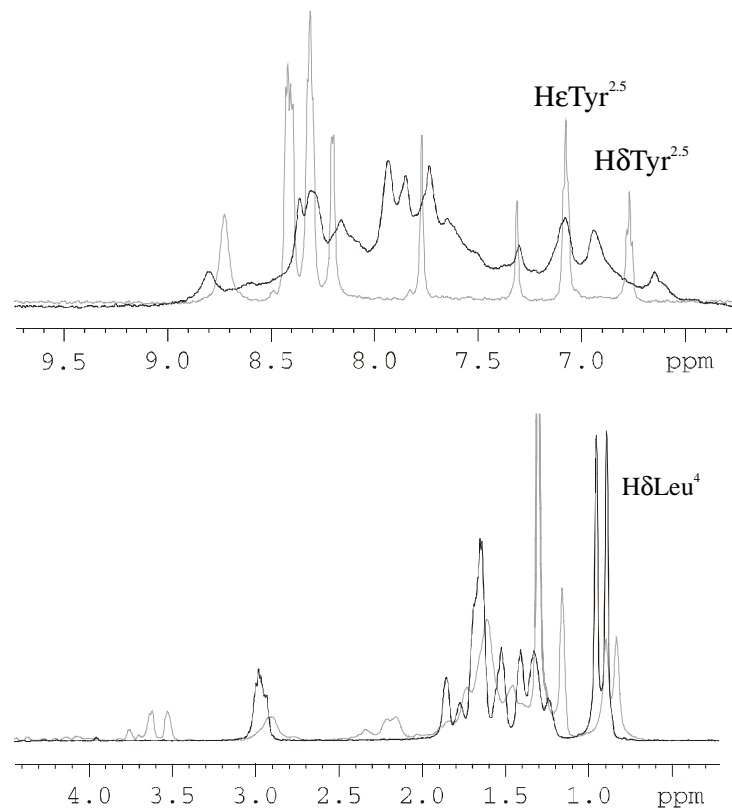


Abb. 4.30b: 1D Jump-Return ¹H-NMR-Titration der CETP-RNA mit KYKLYKC-NH₂ eq. (Komplex: schwarz, Peptid: grau)

4 Durchführung der biophysikalisch-chemischen Methoden

Es ist eine deutliche Linienverbreiterung der Peptidsignale zu beobachten. Die Linienbreite der Aromatensignale verdoppelt sich etwa. Selektiv die H δ der aromatischen Aminosäurereste und einige aliphatische, hierbei die H ϵ des Leu kommen in Gegenwart der Target-RNA hochfeldverschoben zur Resonanz. Einige Amidprotonen sind meist hochfeldverschoben, eines zeigt eine Tieffeldverschiebung.

Proton	δ ppm, J (frei)	$\delta\delta$ ppm (frei/Komplex)	Linienbreite (frei)	Linienbreite (Komplex)
H δ Leu ^{2,5}	0.64, ³ $J = 37$ Hz	0.06	12 Hz	24 Hz
H δ Tyr ^{2,5}	6.54	0.14	22 Hz	29 Hz
H ϵ Tyr ^{2,5}	6.85	0.13	9 Hz	18 Hz
Cys ⁷ -NH ₂ *	7.08	> 0.01	9 Hz	18 Hz
Cys ⁷ -NH ₂ *	7.54	0.04	9 Hz	20 Hz
NHLeu ⁴	7.97	0.04	14 Hz	34 Hz
NHLys ^{3/6}	8.08	0.01	23 Hz	überlagert
NHTyr ^{2/5}	8.20/8.17	0.05	29 Hz	überlagert
NHCys ⁷	8.50	0.07	45 Hz	50 Hz

* amidierter N-Terminus

Tab.: 4.2: NMR-Daten von *KYKLYKC-NH₂* mit/ohne der 23mer RNA

Um die Bindung weiter zu bestätigen, wurden 2D NOESY-NMR-Spektren aufgenommen. Zur Wasserunterdrückung wurde die Jump Return (JR) Pulssequenz genutzt. Im 2D NOESY-NMR-Spektrum sieht man neue Kreuzsignale zwischen dem Peptid CETP1 und der 23mer RNA. Da die Sekundärstruktur der RNA ein Hairpin ist, sollte dieses Peptid Kontakt zur stem-Region, bzw. der Basen haben.

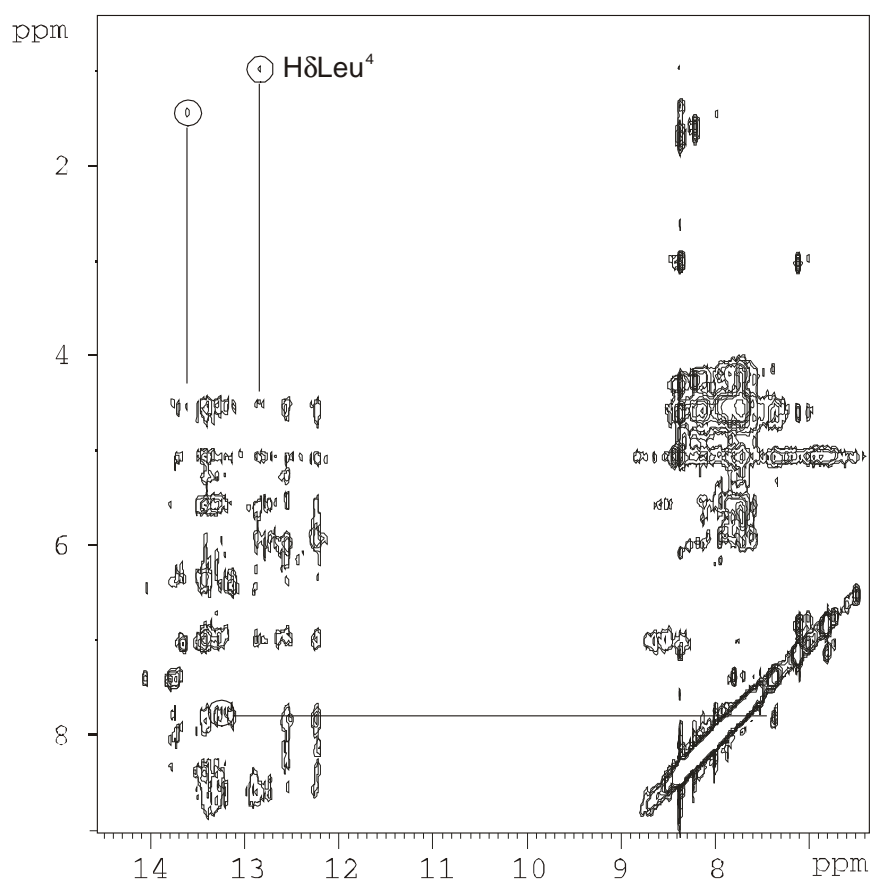


Abb. 4.30a: Jump-Return 2D NOESY NMR-Spektrum der CETP-RNA 1mM mit KYKLYKC-NH₂ 1.5 eq., 64 scans, Mischzeit $\tau_m = 250$ msec, Aufnahmezeit: 22 h 6 min

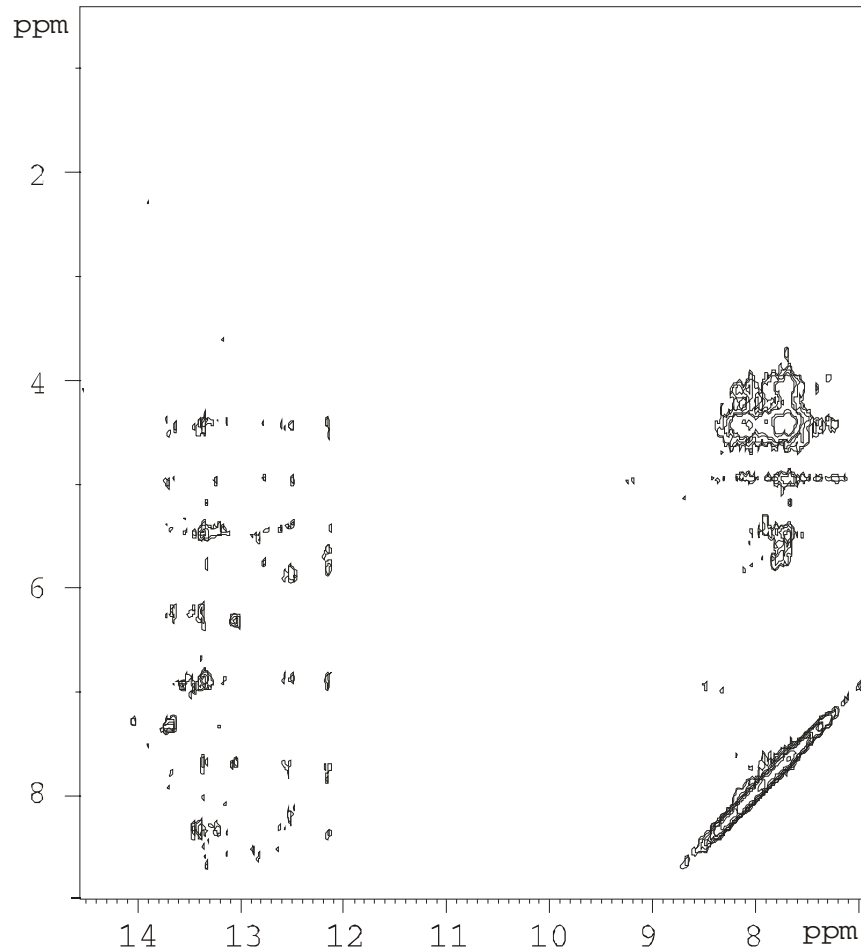
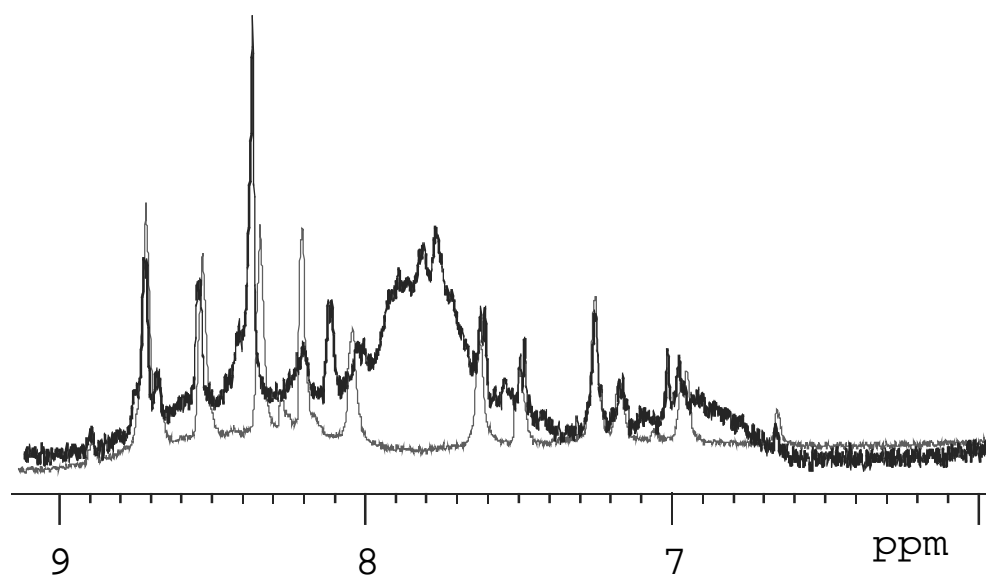


Abb. 4.30b: Jump-Return 2D NOESY NMR-Spektrum der CETP-RNA 0.6 mM, 56 scans,
Mischzeit $\tau_m = 250$ msec, Aufnahmezeit: 19 h 17 min

TAR3 (TPELPWH-NH₂)

Dieses Peptid wurde im Phage Display Screening aus einem Phagen-Klon erhalten, welcher selektiv an die Δ TAR-RNA bindet. Im CD-Spektrum zeigt das synthetisierte Peptid des Hüllproteins des Phagens allerdings nur einen schwachen Effekt. Auch im 1D ¹H NMR-Spektrum sieht man nur sehr schwache Effekte. Eine Linienverbreiterung ist kaum zu beobachten und auch die Änderung der chemischen Verschiebung der Peptidprotonen in Gegenwart der Δ TAR-RNA ist nur schwach. Zudem treten derartige Effekte nur bei Amid-Protonen und kaum bei aliphatischen oder aromatischen Protonen auf.



*Abb. 4.31: 1D Jump-Return ^1H -NMR-Titration der $\Delta\text{TAR-RNA}$ mit TPELPWH-NH_2 , 1 eq.
(Komplex: schwarz, Peptid: grau)*

5.1 Zell-Internalisierungs Tests

Die in Kapitel 5.1 beschriebenen Experimente wurden unter maßgeblicher Mitarbeit von Christoph Königs und Ursula Dietrich im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main durchgeführt.

Damit mit RNA agierende Moleküle ihre Wirksamkeit erfüllen, müssen diese in die Zielzelle gelangen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Somit ist Voraussetzung, daß die gefunden Peptide membrangängig sind. Um dieses zu überprüfen, wurden die Δ TAR-RNA-Liganden in einem Zell-Internalisierungs-Test untersucht. Hierfür wurden die Peptide biotinyliert und mit den Zellen (humane Makrophagen) inkubiert. Nach Zugabe eines Streptavidin/Farbstoff-Konjugates wurden die Peptide mittels Immunofluoreszenzmikroskopie in den Zellen nachgewiesen. Folgende Moleküle wurden für den Zell-Internalisierungs-Test hergestellt:

Biotin-HN- β A β A-RQIKIWFQNRRMKWKK- β A β A-KYKRYKC-CONH₂ (B-P-TAR1)

Biotin-HN- β A β A-RQIKIWFQNRRMKWKK- β A β A-KYKLRKC-CONH₂ (B-P-TAR2)

Biotin-HN- β A β A-KYKRYKC-CONH₂ (TAR1)

Biotin-HN- β A β A-KYKLRKC-CONH₂ (TAR2)

Biotin-NH- β A β A-TPELPWH-CONH₂ (TAR3)

Biotin-NH- β A β A-FHSVQAL-CONH₂ (TAR4)

Biotin-HN- β A β A-RQIKIWFQNRRMKWKK- β A β A-CONH₂ (B-Penetartin)

Biotin-HN- β A β A-COOH (Biotin- β A β A)

Alle Moleküle wurden der Nachweisbarkeit halber biotinyliert eingesetzt. Z.T. wurden diese Konstrukte mit der Peptidsequenz "Penetratin", einem membrangängigen 16mer (RQIKIWFQNRRMKWKK) [108] versehen, um die Zellaufnahme zu beschleunigen. Zwischen den Δ TAR-RNA-Liganden und der Penetratinsequenz sowie dem Biotin wurden zwei β -Alanin-Einheiten als flexibler Spacer eingeführt. Als Referenz wurde jeweils Biotin- und ein Biotin-Penetratin-Konstrukt verwendet.

Isolierung der humanen Makrophagen:

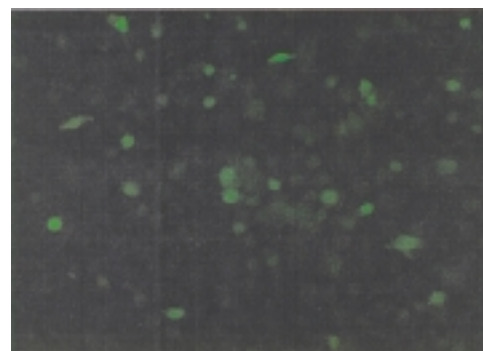
Buffy-coate wird 1:1 mit PBS verdünnt und auf einen Ficoll (Seromed) Dichtegradienten aufgetragen [109]. Die PBMC (peripheren blutmononuklearen Zellen) werden mit PBS gewaschen, in das Makrophagen-Medium gegeben und 1 Woche in einem Teflon-Sack bei 5% CO₂ und 32 °C inkubiert. Die Zellen werden anschließend auf 24-well-Platten ausplattiert und 1h bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert (damit die Zellen adherieren). Die Platte wird 3-5× mit RPMI 1640 (Makrophagen-Medium ohne Zusätze) gewaschen und anschließend in jedes well 2 mL auf 37 °C temperiertes Makrophagen-Medium gegeben. Dieses Zell-Medium ist nun für die in Kapitel 5.1 und 5.2 beschriebenen Tests verwendbar.

Durchführung des Zell-Internalisierungs-Testes:

Die Inkubation des jeweiligen Peptid-Derivates geschah im Zell-Medium (humane Makrophagen) bei Peptid-Konzentrationen von 50 µM bei 37 °C durch Zugabe einer 1 mM Stammlösung. Die Inkubationszeit der Penetratin-derivatisierten Peptide betrug 1h, die ohne Penetratin 2 h. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Zu den fixierten Zellen gab man FITC-Streptavidin-Konjugat und ließ 1/2 h inkubieren. Nach Waschen mit PBS konnten die Zellen im Immunfluoreszenzmikroskop fotografiert werden. Die Anregungsfrequenz betrug 495 nm, die Emissionsfrequenz 520 nm.

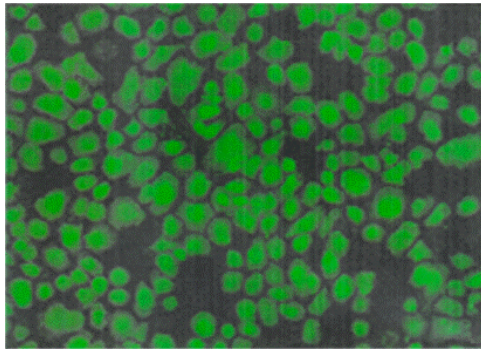


Biotin-HN-βAβA-COOH

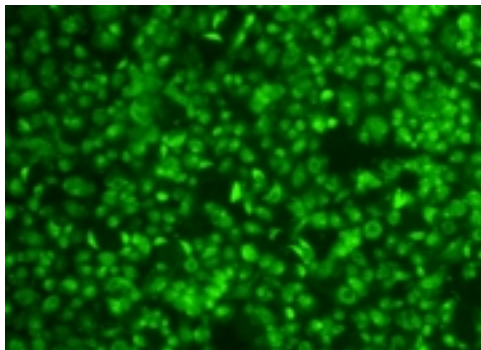


Biotin-HN-βAβA-
RQIKIWFQNRRMKWKK-βAβA-
CONH₂

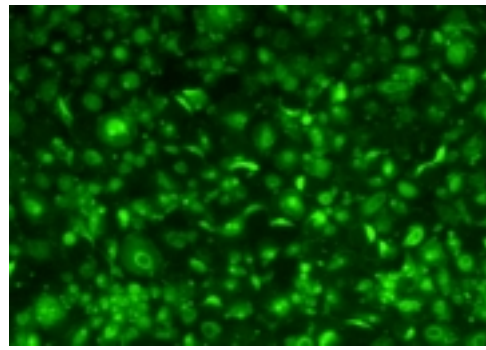
Abb. 5.1: Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop fotografierte Makrophagen



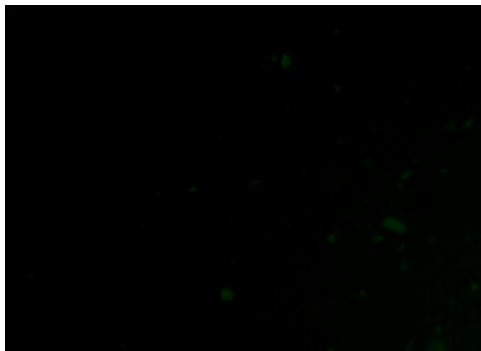
Biotin-HN-βAβA-RQIKIWFQNRRMKWKK-βAβA-KYKRYKC-CONH₂



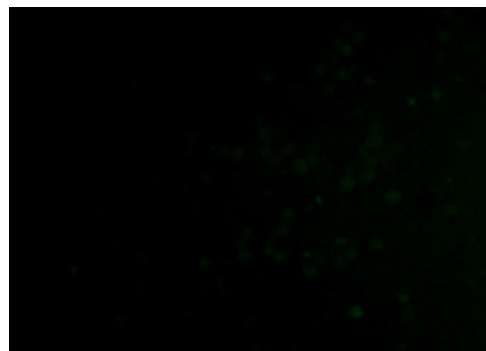
Biotin-HN-βAβA-KYKRYKC-CONH₂



Biotin-HN-βAβA-KYKLRKC-CONH₂



Biotin-NH-βAβA-TPELPWH-CONH₂



Biotin-NH-βAβA-FHSVQAL-CONH₂

Abb. 5.2: Unter dem Immunofluoreszenzmikroskop fotografierte Makrophagen

Penetratin, sowie mit Penetratin verknüpfte Peptide gelangen sehr gut in die Makrophagen, z.T. lagern sie sich sogar im Zellkern an. Die negative Referenz Biotin-βAβA zeigt keinerlei Internalisierung. Das mit dem Peptid Tar2 verknüpfte Penetratin gelangt deutlich besser in die Zellen als die Penetratinsequenz allein. Offenbar erhöht die Basizität der Seitenketten dieses

Peptides die Internalisierung. Die Peptide TAR1 und TAR2 gelangen auch ohne Penetratin hervorragend in die Makrophagen. Die Peptide TAR3 und TAR4, welche kaum basisch und nicht mit Penetratin verknüpft sind, zeigen nur eine sehr schwache, aber immer noch leicht größere Internalisierung als die negative Referenz Biotin- β A β A.

Somit ist damit zu rechnen, daß die Peptidsequenzen in die Zielzelle mit und ohne Penetratin gelangen, und dort ihre Wirkung im physiologischen Test entfalten können.

5.2 HIV-1 Inhibition

Die in Kapitel 5.2 beschriebenen Experimente wurden unter maßgeblicher Mitarbeit von Christoph Königs und Ursula Dietrich im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main durchgeführt.

Das Makrophagen-Medium (Isolierung in Kapitel 5.1 beschrieben) wurden mit HIV-1 infiziert. Folgende Peptide wurden in der HIV-1 Inhibierung eingesetzt. Als Referenz wurde analog Biotin-Penetratin und Biotin- $\beta\beta\text{A}$ eingesetzt.

Biotin-HN- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -RQIKIWFQNRRMKWKK- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -KYKRYKC-CONH₂ (B-P-TAR1)

Biotin-HN- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -RQIKIWFQNRRMKWKK- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -KYKLRKC-CONH₂ (B-P-TAR2)

Biotin-HN- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -RQIKIWFQNRRMKWKK- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -CONH₂ (B-Penetartin)

Biotin-HN- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -COOH (Biotin- $\beta\text{A}\beta\text{A}$)

H₂N- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -KYKRYKC-CONH₂ (TAR1)

H₂N- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -KYKLRKC-CONH₂ (TAR2)

H₂N-TPELPWH-CONH₂ (TAR3)

Ac-HN-TPELPWH-CONH₂ (Ac-TAR3)

Ac-NH-FHSVQAL-CONH₂ (Ac-TAR4)

Nach 7 Tagen wurden die Zellen gewaschen und neues Makrophagen-Medium hinzugegeben. 24 h später wurde der Überstand abgenommen und mit einem Antigentest (Coulter-Assay) im ELISA das p24-Capsid als Nachweis von HIV-1 quantifiziert.

5 Durchführung der "in vitro" und "in vivo"-Tests

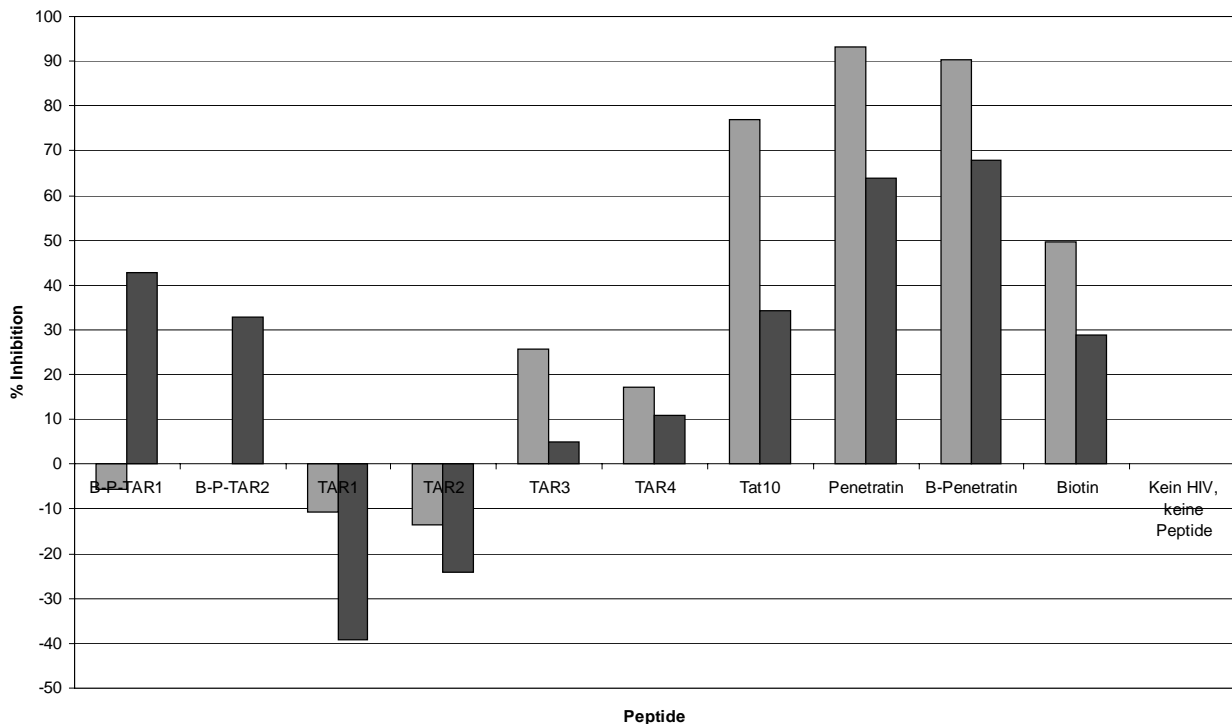


Abb. 5.3: Inhibition der HIV-1 Replikation (hellgrau: 50μM, dunkelgrau: 100μM)

Die Peptide Tar1 und Tar2 allein zeigen keine HIV-1 inhibitorische Wirkung, in Kombination mit der Penetratinsequenz schon. Allerdings ist dieser Effekt wohl auf das Penetratin, sowie die Biotinmarkierung zurückzuführen, da Penetratin, Biotin, sowie biotinmarkiertes Penetratin ebenfalls eine HIV-1 inhibitorische Wirkung besitzen. Ohne Penetratin scheinen Tar1 und Tar2 die HIV-1 Replikation sogar zu beschleunigen. Tat10, der Ausschnitt der Bindungsstelle des Tat-Proteins, an welche die Δ TAR-RNA bindet [15], zeigt eine deutliche HIV-1 inhibitorische Wirkung.

Die Peptide Tar3 und Tar4 allein zeigen eine leichte HIV-1 inhibitorische Wirkung, welches erstaunlich ist, da sie nur sehr schlecht durch die Zellwand der Makrophagen penetrierten (Kapitel 5.1). Zudem haben sie, wie mit den verwendeten biophysikalischen Methoden erwiesen (Kapitel 4), eine nur schwache Affinität an die Δ TAR-RNA. Ihre HIV-1 inhibitorische Wirkung ist dennoch signifikant.

5.3 Hemmung der CETP-Expression

Die in Kapitel 5.3 beschriebenen Experimente wurden von Hr. Dr. K.-D. Bremm, Hr. Dr. H. Bischoff, Dr. D. Schmidt und Dr. Zühlsdorf und deren Mitarbeitern im Pharmaforschungszentrum der Bayer AG in Wuppertal durchgeführt.

Folgende Peptid-Konstrukte wurden zur Inhibition der CETP-Expression in transgenen Mäusen eingesetzt. Um die Verfügbarkeit der Bindungssequenz CETP1 an dem Wirkort in der Zelle zu verbessern, wurde diese mit Penetratin [108] verknüpft. Aber auch die Bindungssequenz allein sowie Penetratin als Referenz wurde den Tests zugeführt.

H ₂ N-RQIKIWFQNRRMKWKK-βAβA-KYKLYKC-CONH ₂	(P-CETP1)
H ₂ N-RQIKIWFQNRRMKWKK-βAβA-CONH ₂	(Penetratin)
H ₂ N-KYKLYKC-CONH ₂	(CETP1)

Die transgenen Mäuse exprimieren humanes CETP und stellen damit ein geeignetes Tiermodell für die CETP-Aktivität dar. Bei den Versuchen handelt es sich um *ex-vivo* Versuche. Den Tieren werden die potentiellen Inhibitoren gespritzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der jeweiligen Injektion Blut abgenommen. Die CETP-Aktivität der genommenen Probe wird nun mit dem in Abb. 4.33 dargestellten Test festgestellt. Der Test auf CETP-Aktivität der Maus-Blutproben wurde mit einem Ultra-high-throughput-screening-Roboter durchgeführt. Es wird hierbei der Cholesterolester-Transfer von den HDL nach VLDL in pmol/h gemessen.

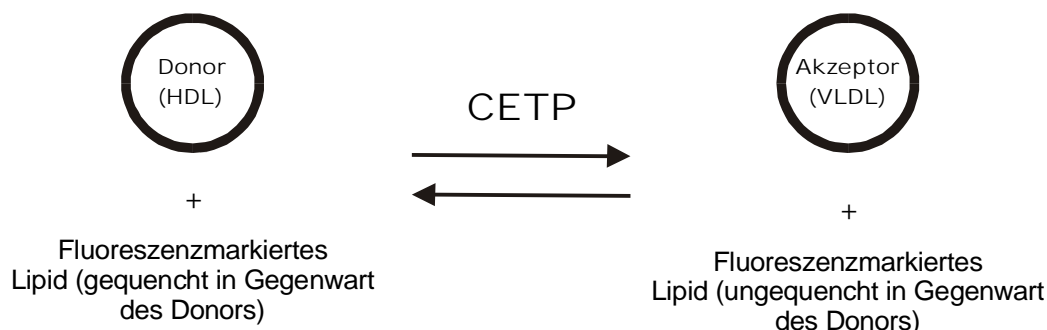


Abb. 5.4: CETP-Aktivitäts-Testprinzip

5 Durchführung der "in vitro" und "in vivo"-Tests

Das Testsystem (CETP Activity Kit) der Firma Roar Biomedical, Inc. wurde für die Tests verwendet. Es wurden pro Probe je 10 µL Donor (HDL) und 10 µl Akzeptor (VLDL) mit 1-3 µL Mäuseserum in 500 µL Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4) vermischt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer die Zunahme der Fluoreszenz gemessen. Die Anregungsfrequenz betrug 465 nm und die Emmissionsfrequenz 535 nm. In Gegenwart des Akzeptors zeigen die Lipide eine Fluoreszenz. Sollte CETP im Serum vorhanden sein, vermittelt dieses den Transport der Lipide von Donor zu Akzeptor, eine Fluoreszenzzunahme ist zu beobachten. Sollte die CETP-Expression/Aktivität durch einen geeigneten Inhibitor geschwächt sein, macht sich das in einer verringerten Zunahme der Fluoreszenz bemerkbar.

Einer Gruppe von 3 Mäusen wurde jedem Tier eine bestimmte Menge des Peptids gespritzt (i.v.) und nach der jeweiligen Zeit (0/30/60/90 min) Blut abgenommen. Für jede Peptidkonzentration und Zeit wurde eine eigene Tiergruppe verwendet, da eine mehrfache Blutentnahme aufgrund der benötigten Blutmenge nicht möglich war. Jeder Balken in den nachfolgenden Diagrammen entspricht dem Mittelwert aus den Daten dreier Mäuse. Der erhaltene Cholesterolester Transferwert muß mit der Vergleichsgruppe verglichen werden, welche nur NaCl-Lösung gespritzt bekommen hat. Ist die prozentuale Abnahme des Wertes niedriger als in der Vergleichsgruppe, liegt eine Hemmung vor.

Penetratin/P-CETP1

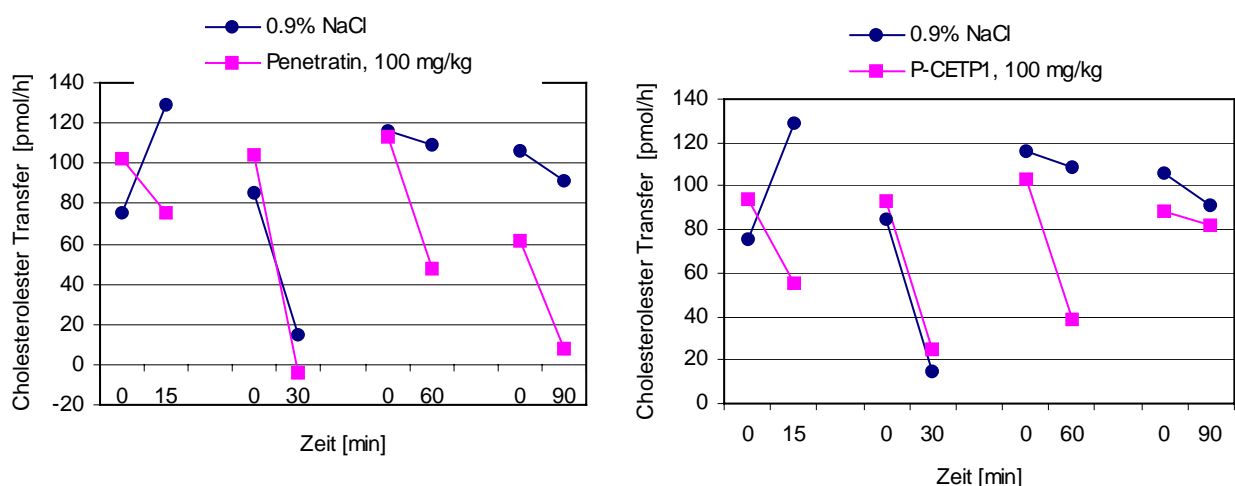


Abb. 5.5: CETP-Hemmung mit Penetratin und P-CETP1

Penetratin, das Transportmolekül, zeigt bereits alleine einen Einfluß auf den Cholesterolester Transfer, somit verfälscht es sie Ergebnisse. Daher wird der Effekt von P-CETP1 auf den Cholesterolester Transfer, wohl auch durch den Penetratin-Anteil verfälscht. Den Mäusen ging es unter Penetratin oder P-CETP1 Einfluß ersichtlich schlecht. Die Penetratinsequenz scheint also toxisch zu sein. Die mit diesem Molekül erhaltenen Ergebnisse sind nicht aussagekräftig.

CETP1

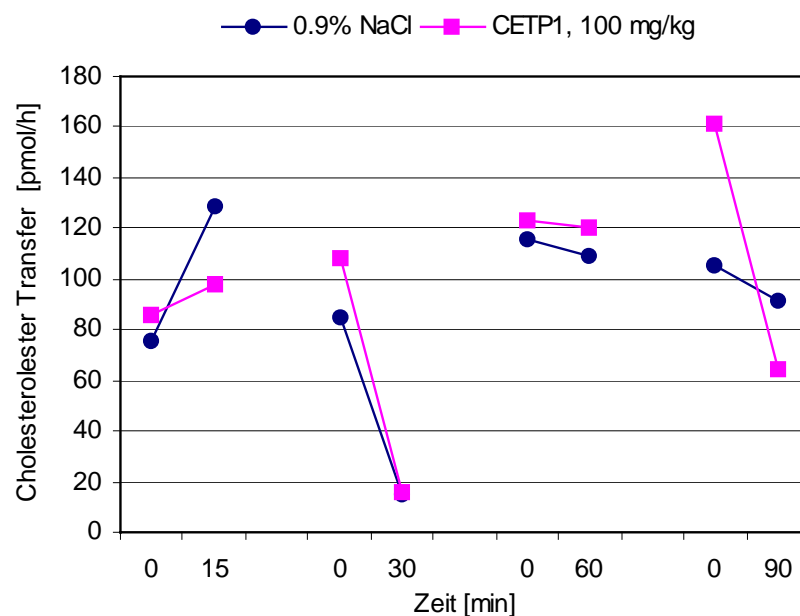


Abb. 5.6: CETP-Hemmung mit CETP1 (bei dem 0/15min-Wert wurden nur 2 Mäuse verwendet)

Nach 90 min ist bei dem CETPmRNA Ligand CETP1 ein deutlich verringertes Cholesterolester Transfer zu beobachten, zuvor kaum. Das entspricht den Erwartungen. Da CETP1 die CETP-Translation (die CETP mRNA) inhibieren soll, ist es zu erwarten, dass die Wirkung erst später eintritt, zu Beginn des Testes noch CETP im Serum vorhanden ist. Es wird schließlich nicht das CETP selbst inhibiert, sondern dessen Bildung. Leider wurden kein Cholesterolester-Transfer bei längeren Zeiten als 90 min gemessen, um eine mögliche länger anhaltende Wirkung zu erfassen und die Wirkungsdauer zu bestimmen.

5 Durchführung der "in vitro" und "in vivo"-Tests

CETP ist als hydrophobes Protein nur im Lipoprotein als Aggregat gebunden aktiv. Da Penetratin eine membrangängige Sequenz ist und damit in die Lipoproteine gelangt und diese Struktur stören kann, kann der hemmende Effekt auf diese Tatsache zurückgeführt werden. Zudem war der Zustand der Tiere bei Injektion der Penetratin-Sequenz schlecht (sogar 2 Tiere verstarben), während sich diese bei Gabe von CETP1 deutlich besser fühlten.

Eine andere Erklärung wäre die Tatsache, daß, wie im Nachhinein festgestellt, das Penetratin auch sehr gut an die CETP-mRNA bindet. Die Bindungsaffinität ist sogar deutlich besser, wie die von CETP1, da noch mit 6.5 μ molarer Konzentration eine Retardierung der RNA-Bande im nativen 10% Polyacrylamidgel festgestellt werden kann. Es sei zu bemerken, daß fast nur die obere der beiden Banden (Konformationen) an die RNA bindet. Schon Penetratin zeigt einen Einfluß auf das CD-Verhalten der CETP-RNA.

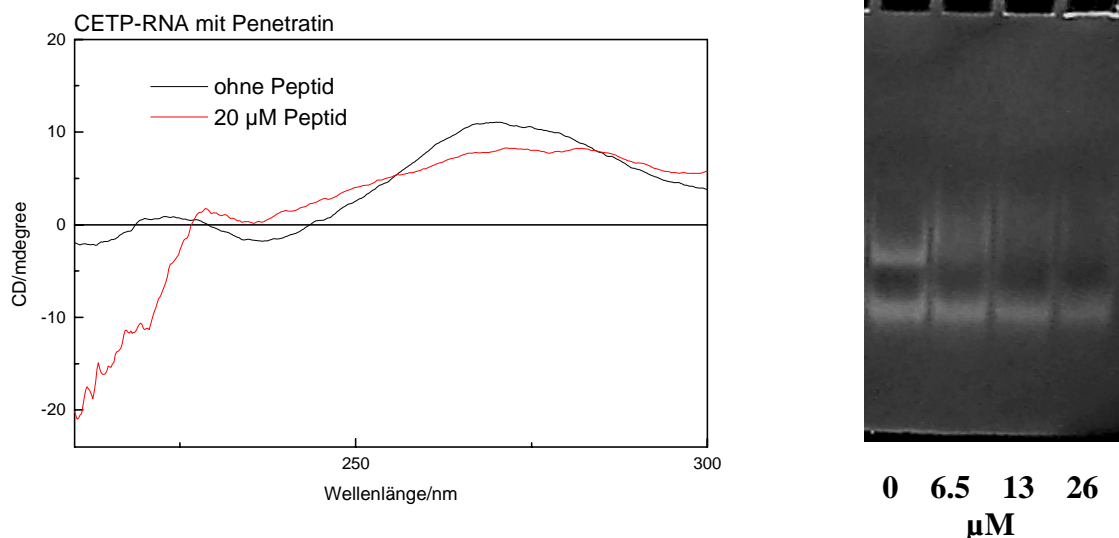


Abb. 5.7: CETPmRNA mit Penetratin (CD, links) und P-CETP1 (10% native PAGE, rechts)

Allerdings zeigt das Penetratin/P-CETP1 schon früher als bei 90 min einen Effekt. Das spricht gegen eine CETPmRNA-Interaktion und für eine Wechselwirkung mit den Lipoproteinen. Penetratin erwies sich als ungeeigneter Transporter. Allerdings ist dieser wohl gar nicht notwendig, da CETP-1 auch ohne Penetratin schon einen Effekt zeigt.

6 Zusammenfassung

Mit kombinatorisch-chemischer Synthese und einem Gel-shift Test wurden niedermolekulare, peptidische RNA-Liganden gefunden. Als Target-Moleküle dienten ein 23mer RNA-Oligonukleotid (CETP-RNA) aus der Cholesterol Ester Transfer Protein mRNA und ein 27mer RNA-Oligonukleotid aus der HIV-1 *Transactivation response region* (TAR) RNA (Δ TAR-RNA). Zudem wurde erstmals die Methode des Phage Display angewendet, um RNA-Liganden zu finden. Die aus beiden Screeningmethoden erhaltenen Liganden wurden mit verschiedenen biophysikalischen Methoden, insbesondere der NMR-Spektroskopie auf ihre Bindungseigenschaften und mittels *in vitro* und *in vivo*-Tests auf ihre physiologische Aktivität hin untersucht.

Ein 16mer Peptid der Antennapedia Homeodomäne internalisiert rasch in Zellen verschiedener Kulturen. Im Screening gefundene Peptidliganden wurde über flexible Spacer (2 β -Ala-Einheiten) mit diesen 16mer synthetisiert. Es wurde gezeigt, daß diese Peptide so in die Zielzellen und besonders in deren Zellkern gelangen. Basische Δ TAR-RNA-Liganden zeigen dieses Verhalten auch ohne Transportersequenz.

Die Ergebnisse des Phage-Display-Screenings sind widersprüchlich, da die so gefundenen RNA-Liganden mit den genutzten biophysikalischen Methoden (NMR, CD, Gelelektrophorese) keine größere Affinität an die Δ TAR-RNA zeigen. Im physiologischen Test haben diese Liganden dennoch eine HIV-1 inhibitorische Aktivität gezeigt. In einer humanen Makrophagenkultur, der Wirtszelle von HIV, wurden mit den Peptiden Thr-Pro-Glu-Leu-Pro-Trp-His-NH₂ und Phe-His-Ser-Val-Gln-Ala-Leu das HIV-1 Wachstum um 20-30% inhibiert. Diese Ergebnisse widersprechen den strukturellen Bindungsinformationen und sind deshalb fraglich. Ein Monitoring während der Panning-Prozedur wurde nicht durchgeführt. Es wurde auch nicht überprüft, wieviel RNA wirklich immobilisiert wurde. Aufgrund der sehr geringen Substanzmengen was das nicht möglich. In einem deutlich größerem Maßstab, könnten in Zukunft strukturelle Informationen über die immobilisierte RNA gewonnen werden, z. B. mit HR-MAS-NMR-Techniken.

Die im Gel-shift-Screening gefundenen Δ TAR-RNA-Liganden des Gel-shift-Screening zeigen keine HIV-1 inhibitorische Aktivität. Die gefundenen Bindungskonstanten sind allerdings um eine Größenordnung kleiner als die der natürliche Bindungsregion Tat10, welche eine HIV-1 inhibitorische Wirkung besitzt.

Die im Gel-Shift-Screening gefundenen CETP-RNA/Peptid-Paare mit den stärksten Affinitäten wurden mittels NMR-Spektroskopie und CD- und Gel-shift-Experimenten charakterisiert. Die Bindungskonstanten lagen im niedrig mikromolaren Bereich. Wie in 1D Jump Return-Experimenten gezeigt wurde, verschoben sich die Signale verschiedener Liganden in Gegenwart der CETP-RNA unterschiedlich stark. Zudem konnte eine Verbreiterung der Signale der Liganden festgestellt werden. Das Peptid Lys-Tyr-Lys-Leu-Tyr-Lys-Cys-NH₂ zeigte bei der CETP-RNA den stärksten Effekt mit Bindungsaffinitäten von $K_d = 32 \pm 2 \mu\text{M}$ (CD-Titration). In 2D NOESY Experimenten zeigt der Peptid-Ligand Kreuz-Signale zu den Iminoprotonen der CETP-RNA. Da die Sekundärstruktur der CETP-RNA ein Hairpin ist, sollte das Peptid somit Kontakt zu der Doppelstrang-Region haben. Dieses Peptid zeigt zudem einen deutlichen Effekt auf das CD-Verhalten seiner CETP-RNA. Offenbar wird die Basenpaarung der Sekundärstruktur unter Peptideinfluss geschwächt. Im physiologischem Test am Tiermodell einer transgenen Maus zeigt dieser Ligand eine Erniedrigung des Cholesterolester Transfers. In Zukunft könnte das Peptid Lys-Tyr-Lys-Leu-Tyr-Lys-Cys-NH₂ mit z. B. unnatürlichen Aminosäuren modifiziert werden, um eine bessere physiologische Stabilität zu erhalten und dadurch möglicherweise die physiologische Aktivität zu erhöhen. Auch eine Leitstrukturoptimierung kann durchgeführt werden.

7.1 Generelle Methoden

7.1.1 Silylierung von Glasgeräten

Um die Adsorption der Polymerkugeln an die Innenwand der Reaktionsgefäße, in denen die Peptide synthetisiert werden, zu verhindern, ist es erforderlich die Hydrophilie der Glasoberfläche zu erniedrigen. Daher werden die freien Hydroxylgruppen der Glasfläche mit Dichlordimethylsilan silyliert. Dadurch haften die Harzkügelchen nicht mehr an der Glasoberfläche, was ihre Handhabbarkeit deutlich vereinfacht.

Für die Silylierung füllt man das Reaktionsgefäß zu 2/3 mit dem Silylierungsreagenz (50% Dichlordimethylsilan in Toluol abs.) und läßt es eine Stunde lang schütteln. Wichtig ist dabei, daß beim Schütteln der gesamte Innenraum des Gefäßes, inklusive Stopfen, mit dem Silylierungsreagenz benetzt wird. Nach der Reaktion wird die Lösung abgegossen und das Reaktionsgefäß jeweils zwei mal drei Minuten mit ausreichenden Mengen an Toluol, Methanol und Aceton gewaschen. Nach dem letzten Aceton-Waschschritt wird das Reaktionsgefäß im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet.

7.1.2 Veresterung des Harzes mit der ersten Aminosäure

Für die Veresterung des Harzes mit der ersten Aminosäure wiegt man zunächst die entsprechende Menge an Harz im Frittenkolben ein und suspendiert es mit 10 ml CH_2Cl_2 . Um das Harz quellen zu lassen, schüttelt man diese Suspension 10 min lang. In einem Becherglas löst man in wenig CH_2Cl_2 die Menge an Fmoc- geschützter Aminosäure, die entsprechend der Harzmenge und des Substitutionsgrades des Harzes berechnet wurde: Der Substitutionsgrad liegt bei den o-Chlorotriptyl-Harzen zumeist bei 1.2-1.6 mmol Chlor pro Gramm Harz. Für eine hohe Belegung wiegt man die dem Substitutionsgrad entsprechende äquimolare Menge an Fmoc-geschützter Aminosäure ein. Wird dagegen eine niedrige Belegung angestrebt, so wiegt man bezogen auf den Substitutionsgrad 50% der entsprechenden Aminosäure ein (0.6-0.8 mmol bei 1 g Harz). Man pipettiert nun, bezogen auf den Substitutionsgrad, einen zweifachen Überschuß an DIEA und die AS (in DMF gelöst) hinzu und läßt das Reaktionsgefäß eine Stunde lang schütteln. Danach gibt man erneut einen zweifachen Überschuß an DIEA und 3ml Methanol hinzu und schüttelt weitere 15min. Hierdurch werden

die nicht mit Aminosäure veresterten Chlorgruppen des o-Chlortrityllinkers mit Methanol verethert, um zu gewährleisten, daß die im Laufe der Synthese eingesetzten Aminosäurederivate nicht direkt an die nicht abreagierten Linkermoleküle binden. Andernfalls käme es zur Bildung von Fehlsequenzen. Abschließend wird das nun mit der ersten Aminosäure belegte Harz gewaschen: Je zwei mal 3 min mit DMF, CH₂Cl₂, 2-Propanol und Diethylether. Für eine Lagerung ist es erforderlich, das Harz zu trocknen, indem man einige Minuten einen Luftstrom durch das Harz im Reaktionsgefäß leitet.

Beim Rink Amid MBHA Linker kann die erste Aminosäure sofort mit der Methoden der Peptidkupplungen (DMF, DIC, HOBT) auf das Harz gebracht werden.

7.1.3 Bestimmung der Harzbelegung (quant. Kaiser oder quant. Fmoc)

Die Bestimmung der Harzbelegung läßt sich durch die Quantifizierung Kaiser-Tests bewerkstelligen. Für die Durchführung benötigt man eine kleine Harzmenge. Nachdem die Fmoc-Gruppe der ersten Aminosäure abgespalten wurde entnimmt man etwa 7 mg, wäscht gründlich und trocknet das Harz bis zur Gewichtskonstanz. Man überführt die genau gewogene Menge Harz in ein 10 ml-Kunststoffröhrchen und versetzt es mit 4 Tropfen von Lösung 1, 4 Tropfen von Lösung 2 und 8 Tropfen von Lösung 3 (Zusammensetzung der Lösungen in 7.1.4 beschrieben). Diese Mixtur erhitzt man 7 Minuten bei 100°C. Man füllt anschließend das Röhrchen mit einer Lösung von 60% EtOH in Wasser, mischt und gibt die Suspension in einen 50 ml Meßkolben. Nachdem man bis zur Eichmarke mit 60% EtOH aufgefüllt hat, mißt man die Absorption dieser Lösung bei 570 nm. Die Harzbelegung berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Harzbelegung [mmol/g]} = \frac{\text{Absorption} \cdot \text{Verdünnung [ml]} \cdot 1000}{\epsilon \cdot \text{Einwaage [mg]}}$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ (570 nm) ist abhängig von der gekuppelten Aminosäure: Für Glycin beträgt der Wert 10000 L·cm⁻¹·mol⁻¹ und für alle anderen Aminosäuren 15000 L·cm⁻¹·mol⁻¹.

Für die Bestimmung der Harzbelegung mittels Quantifizierung der Fmoc-Gruppenabspaltung ist es notwendig, die Fmoc-Abspalllösung aufzufangen. Man geht folgendermaßen vor: Eine

kleine Harzmenge (ca. 10 mg) wird entnommen, gewaschen, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen. In einem Mikroreaktionsgefäß versetzt man das Harz mit einer Lösung von 40% Piperidin in DMF. Man läßt 30 Minuten reagieren und gibt die Lösung dann in einen 50 ml Meßkolben, welchen man mit DMF bis zur Eichmarke auffüllt. Nach gründlicher Durchmischung pipettiert man drei mal 50 µl ab und verdünnt diese in drei getrennten Gefäßen mit je 5 ml DMF. Von allen drei Lösungen werden die Absorptionen bei 300 nm bestimmt und der Mittelwert berechnet. Die Harzbelegung berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Harzbelegung [mmol / g]} = \frac{\left(\frac{\text{Absorption} - 2 \cdot 10^{-3}}{1,75} \right) \cdot 10^3}{\text{Einwaage [mg]}}$$

7.1.4 Der Kaiser-Test

Für die Durchführung des Kaiser-Tests werden drei Lösungen benötigt:

Lösung 1: 0.85 mol (80 g) Phenol in 20 ml EtOH

Lösung 2: 2.8 mmol (500 mg) Ninhydrin in 10 ml EtOH

Lösung 3: 33 mg KCN in 50 ml Wasser (0.01 M); davon werden 2 ml mit Piperidin auf 100 ml aufgefüllt

Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Kupplung entnimmt man dem Reaktionsgefäß eine Spatelspitze Harz und überführt es in eine Mikrofritte. Man legt Vakuum an und wäscht das Harz mehrfach mit DMF, 2-Propanol und Diethylether. Dann trocknet man im Vakuum und gibt das Harz anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf-Cap). Von jeder der drei zuvor aufgeführten Lösungen tropft man nun je zwei Tropfen hinzu und erhitzt die Lösung 5 min auf 100 °C. Ein positiver Test, bzw. eine unvollständige Kupplung, wird durch eine blaue Färbung der Lösung indiziert. Bleibt die Lösung gelb, war die Kupplung vollständig. Im weiteren Verlauf einer Synthese ist es möglich, daß der Test nicht mehr eindeutig ausfällt, was sich in bläulich gefärbten Harzkügelchen äußert. Bei Prolin funktioniert der Test nicht, da für eine positive Reaktion mit Ninhydrin ein primäre Aminogruppe notwendig ist.

7.1.5 Bromphenolblau als Kupplungsindikator

Für die Kontrolle der Vollständigkeit von Aminosäurekupplungen mittels Bromphenolblau setzt man eine Stammlösung von 345 mg des Farbstoffes in 25 ml DMF an. Zu jeder Aminosäurekupplungsreaktion gibt man 20 µl dieser Lösung hinzu, woraufhin sich die Reaktionslösung tief blau färbt. Das Ende der Reaktion wird dadurch erkannt, daß die Reaktionslösung gelb gefärbt ist. Im weiteren Verlauf einer Synthese ist es auch hier möglich, daß der Farbumschlag zunehmend weniger eindeutig ausfällt. Als Kriterium für die Vollständigkeit der Kupplung muß dann das Erlangen einer Farbkonstanz gewählt werden (z.B. wenn die Lösung lediglich hellgrün wird). Im Gegensatz zum Kaiser-Test kann diese Kontrollmethode auch bei Prolin verwendet werden. Der Indikator kann leicht mittels DMF ausgewaschen werden. Sollte der Farbstoff dennoch sichtbar im Harz bleiben ist das für weitere Reaktionen, wie Nachkuppeln oder Fmoc-Abspalten, nicht von Bedeutung.

7.2 Synthesen der Peptid-Bibliotheken

Die kombinatorischen Peptid-Bibliotheken wurden mit dem Rink Amid MBHA Harz nach der Fmoc/t.-Butyl Strategie unter DIC/HOBt-Aktivierung hergestellt. Mittels Rink Amid MBHA Harz erhält man nach der Abspaltungsreaktion Peptid-Amide. Somit ist die negative Ladung des Carboxy-Terminus beseitigt, was Bindungsfähigkeit der synthetisierten Peptide an RNA, einem Polyanion, erhöhen sollte.

Um die „Split, mix and combine“ Methode anzuwenden, wurde umgebaute medizinische Spritzen als Reaktionsgefäß gewählt. So kann man schnell mit vielen kleinen Harzmengen (~40 mg) operieren ohne bei den Arbeitsschritten zuviel Harzmaterial zu verlieren.



Deckel
eines 1.5 mL
Eppendorf-Caps

2 mL-Spritze (mit Frittenpropfen im Auslaß)

Spritzen-Verschuß

Abb. 7.1: Für kombinatorische Peptidsynthese verwendete Reaktionsgefäße

7.2.1 Lib1

Lib1 ist eine Tetrapeptidbibliothek mit einem C-terminalen Cystein und einem amidierten C-Terminus. Die Variabilität der vier Aminosäurepositionen ist aus den Aminosäuren Leu, Ile, Phe, Arg und Lys zusammengesetzt, d.h. die Peptidbibliothek besteht aus 625 Substanzen. Die Synthese wurde so gefahren, das die ersten beiden Aminosäurepositionen der Peptidbibliothek (Z) nach einer kombinatorischen Synthesestrategie synthetisiert wurden. Es wurden also vor den ersten beiden Kupplungen jeweils die Harzmenge in fünf gleich große Portionen geteilt, jede Fraktion mit einer der fünf Aminosäuren Leu, Ile, Phe, Arg und Lys

gekuppelt. Nach erfolgter Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, wurden die fünf Harzfraktionen wieder vereint und gründlich vermischt. In der vereinigten Harzmenge liegen nun 25 an der festen Phase gebundenen Tripeptide (inkl. Cys) vor.

Bei den letzten beiden Aminosäureportionen (X) wird die Harzmenge vor der Synthese auch in fünf Teile geteilt, jede Fraktion einzeln mit je einer der Aminosäuren Leu, Ile, Phe, Arg und Lys gekuppelt und anschließend Fmoc-entschützt. Die erhaltenen Fraktionen werden aber nun nicht mehr vereint, sondern getrennt weiterbearbeitet (divergente Synthesestrategie). Das bedeutet, daß man bei der vorletzten Aminosäure fünf Ansätze mit je 1/5 der ursprünglichen Harzmenge und bei der letzten Aminosäure 25 Ansätze mit je 1/25 der ursprünglichen Harzmenge fahren muß.

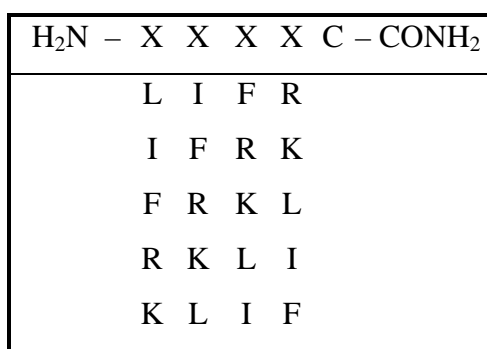


Abb. 7.2: Struktur der Peptidbibliothek Lib1

Die Synthese der Peptidbibliothek Lib1 wurde wie folgt durchgeführt.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	1 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
Überschuß der Aminosäurederivate:	3 eq.
Überschuß an DIC:	3.3 eq.
Überschuß an HOBt:	4.5 eq.
Fmocabspaltung:	mit 40% Piperidin/DMF

Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösungsmittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der

7 Experimenteller Teil

Kupplungen wurden immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft.

1. Entschützen des MBHA Rink Amid Harzes:

1 g in DMF gequollenes Harz wird für 20 min mit 10 mL 20% Piperidin/DMF geschüttelt und anschließend 4x mit 6 mL DMF gespült.

2. Beladen mit der ersten Aminosäure (Cys):

Die Kupplung von Fmoc-Cys-Trt geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 10 mL. Anschließend wurde 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmocschutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 10 ml DMF, 1x mit 10 ml Isopropanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

3. Erstes Teilen des Harzes:

Die aus der ersten Kupplung erhaltene Harzmenge wird gewogen (1.205 g) und in 5 gleich große Portionen geteilt (je 240 mg). Dabei ist darauf zu achten, daß der Substanzverlust durch z.B. Reste an den benutzten Geräten, minimal ist.

4. Kuppeln der 2. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird pauschal 2x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
2. Fmoc-Leu	L	ÜN	1x für 2 h
2. Fmoc-Ile	I	ÜN	1x für 2 h
2. Fmoc-Phe	F	ÜN	1x für 2 h
2. Fmoc-Arg-Pmc	R	ÜN	1x für 2 h
2. Fmoc-Lys-Boc	K	ÜN	1x für 2 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

7 Experimenteller Teil

5. Erstes Vereinigen des Harzes

Die nach der Fmocabspaltung mit DMF gespülten Harzmengen werden in ein Reaktionsgefäß vereinigt und 10 min innig durch Schütteln in DMF vermischt. Anschließend wird das DMF entfernt, mit Isopropanol gewaschen und das Harz getrocknet.

6. Zweites Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmenge wird erneut gewogen (1.2 g) und wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je 240 mg).

7. Kuppeln der 3. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird pauschal 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	ÜN	2x für 2 h
3. Fmoc-Ile	I	ÜN	2x für 2 h
3. Fmoc-Phe	F	ÜN	2x für 2 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	ÜN	2x für 2 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	ÜN	2x für 2 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

8. Zweites Vereinigen des Harzes

Die nach der Fmoc-Abspaltung mit DMF gespülten Harzmengen werden wieder in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 10 min innig durch Schütteln in DMF vermischt. Anschließend wird das DMF entfernt, mit Isopropanol gewaschen und das Harz getrocknet.

9. Drittes Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmenge wird erneut gewogen (1.25 g) und wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je 250 mg).

10. Kuppeln der 4. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun erneut getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird pauschal 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

7 Experimenteller Teil

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	ÜN	2x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	ÜN	2x für 3 h
3. Fmoc-Phe	F	ÜN	2x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	ÜN	2x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	ÜN	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

11. Viertes Teilen des Harzes:

Die fünf Harzmengen werden nun nicht mehr vereinigt, sondern jede einzelne in weitere fünf Fraktionen geteilt. In jeder der nun 25 Fraktionen befindet sich nun ca. 50 mg Harz.

12. Kuppeln der 5. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird wieder pauschal 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (8x20 min mit 40% Piperidin/DMF). Bei dieser Anzahl wird Fmoc-Abspaltung nicht mehr UV-spektrometrisch kontrolliert. Daher wird 8x abgespalten, um nahezu sicher zu sein, daß die Fmoc-Schutzgruppe quantitativ abgespalten worden ist. Nach der Synthese wird das Harz 4x mit DMF, 1x mit AcOH, 4x mit DCM und 1x mit MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet.

13. Abspalten des Peptides vom Harz und Entschützen der Seitenkettenschutzgruppen

Diese beiden Reaktionen werden auch bei der Peptidbibliothek in einem Schritt vorgenommen. Hierfür wird jede einzelne Harzmenge mit 1 mL Reagenz "TIS" für 2.5 h geschüttelt. Die Lösung wird von Harz getrennt, das Harz 2x mit wenig TFA gewaschen und die flüssigen Phasen vereinigt. Durch Zugabe von 5 mL MTBE zu der erhaltenen Abspalllösung wird das entschützte Peptid (die Peptidbibliothek) gefällt und durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Das Pellet wird im Argonstrom getrocknet.

Diese Vorgehensweise wendet man auf alle 25 Harzmengen an. So erhält man 25 Mischungen von je 25 verschiedenen Peptiden.

14. Derivatisierung der Peptidbibliothek mit Polyethylenglycol (PEG)

Je 0.5 mg Peptidmischung wird in ein Eppendorf-Cap eingewogen und in je 100 mL 0.1 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7 gelöst. Zu dieser Lösung pipettiert man je 60 μL (ca. 1.5 eq.) einer Lösung

von M-Mal-PEG (155 mg/1.5 mL). Die Reaktionsmischung wird für 2 h geschüttelt und anschließend eingefroren.

Die Peptidbibliothek ist nun für Bindungsassays verwendbar. Die Quantifizierung der Peptidmenge erfolgt über die Einwaage der Peptidmischung vor der Derivatisierung mit PEG.

7.2.2 Lib2

Lib2 ist eine Hexapeptidbibliothek mit einem C-terminalen Cystein und einem amidierten C-Terminus. Der variable Bereich besteht aus vier Aminosäurepositionen, welcher aus den Aminosäuren Leu, Ile, Tyr, Arg und Lys zusammengesetzt ist (625 Substanz). Dieser variable Bereich ist an beiden Seiten von je einem Lysin flankiert, um die Bindungsfähigkeit an RNA-Oligonukleotide zu steigern. Die Synthese wurde so gefahren, dass die ersten beiden Aminosäurepositionen des variablen Bereichs nach einer kombinatorischen Synthesestrategie synthetisiert wurden. Es wurden also vor den ersten beiden Kupplungen jeweils die Harzmenge in fünf gleich große Portionen geteilt, jede Fraktion mit einer der fünf Aminosäuren Leu, Ile, Tyr, Arg und Lys gekuppelt. Nach erfolgter Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, wurden die fünf Harzfraktionen wieder vereint und gründlich vermischt. Bei den letzten beiden Aminosäurepositionen (X) wird die Harzmenge vor der Synthese auch in fünf Teile geteilt, jede Fraktion einzeln mit je einer der Aminosäuren Leu, Ile, Phe, Arg und Lys gekuppelt und anschließend Fmoc-entschützt. Die erhaltenen Fraktionen werden aber nun nicht mehr vereint, sondern getrennt weiterbearbeitet (divergente Synthesestrategie).

H ₂ N – K X X X X K C – CONH ₂
L I Y R
I Y R K
Y R K L
R K L I
K L I Y

Abb. 7.3: Struktur der Peptidbibliothek Lib2

7 Experimenteller Teil

Die Synthese der Peptidbibliothek Lib2 wurde wie folgt durchgeführt.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	1 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
Überschuß der Aminosäurederivate:	3 eq.
Überschuß an DIC:	3.3 eq.
Überschuß an HOBt:	4.5 eq.
Fmocabspaltung:	mit 40% Piperidin/DMF

Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösungsmittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurden immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft.

1. Entschützen des MBHA Rink Amid Harzes:

1 g in DMF gequollenes Harz wird für 20 min mit 10 mL 20% Piperidin/DMF geschüttelt und anschließend 4x mit 6 mL DMF gespült.

2. Beladen mit der ersten Aminosäure (Cys):

Die Kupplung von Fmoc-Cys-Trt geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 10 mL. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen und 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 10 ml DMF gewaschen.

3. Beladen mit der zweiten Aminosäure (Lys):

Die Kupplung von Fmoc-Cys-Trt geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 10 mL. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 10 ml DMF, 1x mit 10 ml Isopropanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

7 Experimenteller Teil

4. Erstes Teilen des Harzes:

Die aus der ersten Kupplung erhaltene Harzmenge wird gewogen (1.257 g) und in 5 gleich große Portionen geteilt (je 240 mg).

5. Kuppeln der 3. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Tyr und Arg gekuppelt.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
2. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 2 h
2. Fmoc-Ile	I	12 h	2x für 2 h
2. Fmoc-Tyr-Boc	Y	12 h	2x für 2 h
2. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 2 h
2. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 2 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

6. Erstes Vereinigen des Harzes

Die nach der Fmoc-Abspaltung mit DMF gespülten Harzmengen werden in ein Reaktionsgefäß vereinigt und 10 min innig durch Schütteln in DMF vermischt. Anschließend wird das DMF entfernt, mit Isopropanol gewaschen und das Harz getrocknet.

7. Zweites Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmenge wird erneut gewogen (1.19 g) und wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je 230 mg).

8. Kuppeln der 4. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Tyr und Arg gekuppelt.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 2 h
3. Fmoc-Ile	I	12 h	2x für 2 h
3. Fmoc-Tyr-Boc	Y	12 h	2x für 2 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 2 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 2 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

7 Experimenteller Teil

9. Zweites Vereinigen des Harzes

Die nach der Fmoc-Abspaltung mit DMF gespülten Harzmengen werden wieder in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 10 min innig durch Schütteln in DMF vermischt. Anschließend wird das DMF entfernt, mit Isopropanol gewaschen und das Harz getrocknet.

10. Drittes Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmenge wird erneut gewogen (1.19 g) und wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je 230 mg).

11. Kuppeln der 5. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun erneut getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Tyr und Arg gekuppelt. Bei der Ile-Fraktion der Kupplung zeigte der Bromphenolblau-Test erst nach der 4. Kupplung eine negative Reaktion.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	12 h	3x für 3 h
3. Fmoc-Phe	F	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

12. Viertes Teilen des Harzes:

Die fünf Harzmengen werden nun nicht mehr vereinigt, sondern jede einzelne in weitere fünf Fraktionen geteilt. In jeder der nun 25 Fraktionen befindet sich nun ca. 40 mg Harz.

13. Kuppeln der 5. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird wieder 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (8x20 min mit 40% Piperidin/DMF). Nur die Ile- und Arg-Fraktion muß aufgrund positiver Bromphenolblau-Tests viermal gekuppelt werden.

Bei dieser Anzahl wird Fmoc-Abspaltung nicht mehr UV-spektrometrisch kontrolliert. Daher wird 4x30 min abgespalten, um nahezu sicher zu sein, daß die Fmoc-Schutzgruppe quantitativ abgespalten worden ist.

14. Kuppeln mit der siebten Aminosäureposition

Die Kupplung des N-terminalen Fmoc-Lys-Boc geschah innerhalb von 2x3 h, d.h. es wurde einmal nachgekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen 4x30 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nach der Synthese wird das Harz 4x mit DMF, 1x mit AcOH, 4x mit DCM und 1x mit MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet.

15. Abspalten des Peptides vom Harz und Entschützen der Seitenkettenschutzgruppen

Dieser beiden Reaktionen werden auch bei der Peptidbibliothek in einem Schritt vorgenommen. Hierfür wird jede einzelne Harzmenge mit 1 mL Reagenz "TIS" für 2.5 h geschüttelt. Die Lösung wird vom Harz getrennt, das Harz 2x mit wenig TFA gewaschen und die flüssigen Phasen vereinigt. Durch Zugabe von 5 mL MTBE zu der erhaltenen Abspaltlösung wird das entschützte Peptid (die Peptidbibliothek) gefällt und durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Das Pellet wird im Argonstrom getrocknet. Diese Vorgehensweise wendet man wieder auf alle 25 Harzmengen an. So erhält man 25 Mischungen von je 25 verschiedenen Peptiden.

16. Derivatisierung der Peptidbibliothek mit Polyethylenglycol (PEG)

Je 0.5 mg Peptidmischung wird in ein Eppendorf-Cap eingewogen und in je 100 mL 0.1mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7 gelöst. Zu dieser Lösung pipettiert man je 60 μL (ca. 1.5 eq.) einer Lösung von M-Mal-PEG (155 mg/1.5 mL). Die Reaktionsmischung wird für 2 h geschüttelt und anschließend eingefroren. Die Peptidbibliothek ist nun für Bindungsassays verwendbar. Die Quantifizierung der Peptidmenge erfolgt über die Einwaage der Peptidmischung vor der Derivatisierung mit PEG.

7.2.3 LibKK

LibKK ist eine Pentapeptidbibliothek mit einem C-terminalen Cystein und einem amidierten C-Terminus. Die beiden N-terminalen Aminosäurepositionen bestehen aus Lysin-Resten. Die zwei übrigen Aminosäurepositionen sind aus den Aminosäuren Leu, Ile, Phe, Arg und Lys zusammengesetzt.

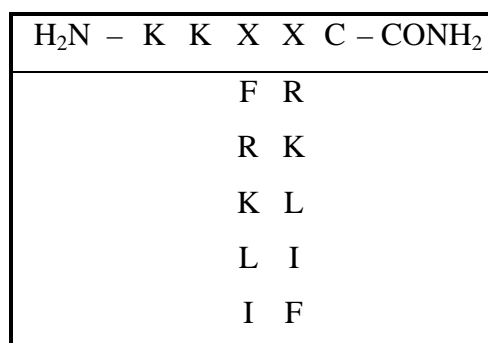


Abb. 7.4: Struktur der Peptidbibliothek LibKK

Die Synthese wurde divergent durchgeführt, das Harz wurde bei den Positionen 3 und 4 jeweils geteilt und nicht mehr vereint. Das bedeutet, daß man bei der 4. Aminosäure fünf Ansätze mit je 1/5 der ursprünglichen Harzmenge und bei der 3. Aminosäure 25 Ansätze mit je 1/25 der ursprünglichen Harzmenge fahren muß. Den 25 Ansätzen wurde anschließend jeweils 2 Lys-Einheiten angekuppelt.

Die Synthese der Peptidbibliothek Lib1 wurde wie folgt durchgeführt.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.75 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
Überschuß der Aminosäurederivate:	3 eq.
Überschuß an DIC:	3.3 eq.
Überschuß an HOBt:	4.5 eq.
Fmocabspaltung:	mit 40% Piperidin/DMF

Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösungsmittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurden immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft.

7 Experimenteller Teil

1. Entschützen des MBHA Rink Amid Harzes:

0.75 g in DMF gequollenes Harz wird für 20 min mit 10 mL 20% Piperidin/DMF geschüttelt und anschließend 4x mit 5 mL DMF gespült.

2. Beladen mit der ersten Aminosäure (Cys):

Die Kupplung von Fmoc-Cys-Trt geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 7 mL. Anschließend wurde 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmocschutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 7 ml DMF, 1x mit 7 ml Isopropanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

3. Erstes Teilen des Harzes:

Die aus der ersten Kupplung erhaltene Harzmenge wird in 5 gleich große Portionen geteilt (je ca. 180 mg).

4. Kuppeln der 2. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt und anschließend die Fmocschutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
2. Fmoc-Leu	L	12 h	-
2. Fmoc-Ile	I	12 h	-
2. Fmoc-Phe	F	12 h	-
2. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	-
2. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	-
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

5. Zweites Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmenge wird wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je ca. 30 mg).

6. Kuppeln der 3. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Phe und Arg gekuppelt. Es wird 3x gekuppelt und anschließend die Fmocschutzgruppe abgespalten.

7 Experimenteller Teil

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Phe	F	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:			4x20 min

7. Kuppeln der 4. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäure Lys gekuppelt. Es wird 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Phe	F	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:			4x20 min

8. Kuppeln der 5. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäure Lys gekuppelt. Es wird 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Phe	F	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	12 h	2x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	12 h	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:			5x20 min

Nach der Synthese wird das Harz 4x mit DMF, 1x mit AcOH, 4x mit DCM und 1x mit MeOH gewaschen (jeweils 5 mL) und im Vakuum getrocknet.

9. Abspalten des Peptides vom Harz und Entschützen der Seitenkettenschutzgruppen

Diese beiden Reaktionen werden auch bei der Peptidbibliothek in einem Schritt vorgenommen. Hierfür wird jede einzelne Harzmenge mit 0.5 mL Reagenz "TIS" für 2.5 h geschüttelt. Die Lösung wird von Harz getrennt, das Harz 2x mit wenig TFA gewaschen und die flüssigen Phasen vereinigt. Durch Zugabe von 3 mL MTBE zu der erhaltenen Abspalllösung wird das entschützte Peptid gefällt und durch Zentrifugation von der Lösung

getrennt. Das Pellet wird im Argonstrom getrocknet. Diese Vorgehensweise wendet man auf alle 25 Harzmengen an. So erhält man 25 verschiedene Peptide. Nachfolgend ist beispielhaft ein Kontroll-HPLC-Chromatogramm eines der Peptide der Bibliothek Lib KK dargestellt.

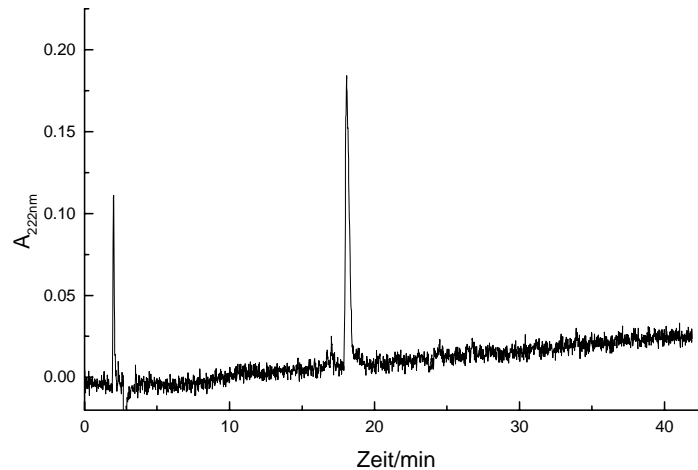


Abb. 7.5: HPLC-Chromatogramm von KKLRC-NH₂ (für das Gel-shift Screening verwendetes Rohprodukt)

10. Derivatisierung der Peptidbibliothek mit Polyethylenglycol (PEG)

Je 0,5 mg Peptid wird in ein Eppendorf-Cap eingewogen und in je 100 mL 0,1 mM Na₂H₂PO₄, pH 7 gelöst. Zu dieser Lösung pipettiert man je 60 µL (ca. 1,5 eq.) einer Lösung von M-Mal-PEG (155 mg/1,5 mL). Die Reaktionsmischung wird für 2 h geschüttelt und anschließend eingefroren. Die Peptidbibliothek ist nun für Bindungsassays verwendbar. Die Quantifizierung der Peptidmenge erfolgt über Aminosäureanalyse.

7.2.4 LibYK

LibYK ist eine Heptapeptidbibliothek mit einem C-terminalen Cystein und einem amidierten C-Terminus. Die beiden N-terminalen Aminosäurepositionen bestehen aus einer Tyr-Arg-Einheit. Die zwei übrigen Aminosäurepositionen sind aus den Aminosäuren Leu, Ile, Tyr, Arg und Lys zusammengesetzt. Der variable Bereich ist je von einem Lys flankiert.

H ₂ N – K Y K X X K C –CONH ₂
Y R
R K
K L
L I
I Y

Abb. 7.6: Struktur der Peptidbibliothek LibYK

Die Synthese wurde divergent geführt, das Harz wurde bei den Positionen 4 und 5 jeweils geteilt und nicht mehr vereint. Das bedeutet, daß man bei der 5. Aminosäure fünf Ansätze mit je 1/5 der ursprünglichen Harzmenge und bei der 4. Aminosäure 25 Ansätze mit je 1/25 der ursprünglichen Harzmenge fahren muß. Den 25 Ansätzen wurde anschließend jeweils die Tyr-Lys-Einheiten angekuppelt.

Die Synthese der Peptidbibliothek Lib1 wurde wie folgt durchgeführt.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	1 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
Überschuß der Aminosäurederivate:	3 eq.
Überschuß an DIC:	3.3 eq.
Überschuß an HOBt:	4.5 eq.
Fmocabspaltung:	mit 40% Piperidin/DMF

Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösungsmittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurden immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft.

1. Entschützen des MBHA Rink Amid Harzes:

1 g in DMF gequollenes Harz wird für 20 min mit 10 mL 20% Piperidin/DMF geschüttelt und anschließend 4x mit 10 mL DMF gespült.

7 Experimenteller Teil

2. Beladen mit der ersten Aminosäure (Cys):

Die Kupplung von Fmoc-Cys-Trt geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 10 mL. Anschließend noch einmal für 3 h nachgekuppelt und 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 10 ml DMF, 1x mit 10 ml Isopropanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

3. Kuppeln des N-Terminal flankierenden Lys:

Die Kupplung von Fmoc-Lys-Boc geschah innerhalb von 3 h nach den Standardsynthesebedingungen in einem Reaktionsvolumen von ca. 10 mL. Anschließend noch einmal für 3 h nachgekuppelt und nach Waschen mit DMF 4x20 min mit 40% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Harz wurde nun 4x mit 10 ml DMF, 1x mit 10 ml Isopropanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

4. Erstes Teilen des Harzes:

Die aus der ersten Kupplung erhaltene Harzmengung wird in 5 gleich große Portionen geteilt (je ca. 240mg).

5. Kuppeln der 3. Aminosäureposition:

Die fünf Harzmengen werden nun getrennt voneinander mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Tyr und Arg gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
2. Fmoc-Leu	L	3 h	2x für 3 h
2. Fmoc-Ile	I	3 h	2x für 3 h
2. Fmoc-Tyr-Boc	Y	3 h	2x für 3 h
2. Fmoc-Arg-Pmc	R	3 h	2x für 3 h
2. Fmoc-Lys-Boc	K	3 h	2x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

6. Zweites Teilen des Harzes:

Die erhaltene Harzmengung wird wieder in 5 gleich große Portionen geteilt (je ca. 40 mg).

7 Experimenteller Teil

7. Kuppeln der 4. Aminosäureposition:

Die 25 Harzmengen werden nun erneut einzeln mit je einer der Aminosäuren Lys, Leu, Ile, Tyr und Arg gekuppelt. Es wird 2x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
3. Fmoc-Leu	L	3 h	1x für 3 h
3. Fmoc-Ile	I	3 h	1x für 3 h
3. Fmoc-Tyr-Boc	Y	3 h	1x für 3 h
3. Fmoc-Arg-Pmc	R	3 h	1x für 3 h
3. Fmoc-Lys-Boc	K	3 h	1x für 3 h
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	

8. Kuppeln der 5. Aminosäureposition (Lys):

Die 25 Harzmengen werden nun einzeln mit dem Aminosäurederivat Fmoc-Lys-Boc gekuppelt. Es wird 2x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe (4x20 min mit 40% Piperidin/DMF) abgespalten.

9. Kuppeln der 6. Aminosäureposition (Tyr):

Die 25 Harzmengen werden nun einzeln mit dem Aminosäurederivat Fmoc-Tyr-Boc gekuppelt. Es wird pauschal 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe Fmoc-Schutzgruppe (4x20 min mit 40% Piperidin/DMF) abgespalten.

10. Kuppeln der 7. Aminosäureposition (Lys):

Die 25 Harzmengen werden nun einzeln mit dem Aminosäurederivat Fmoc-Lys-Boc gekuppelt. Es wird pauschal 3x gekuppelt und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe (4x20 min mit 40% Piperidin/DMF) abgespalten. Nach der Synthese wird das Harz 4x mit DMF, 1x mit AcOH, 4x mit DCM und 1x mit MeOH gewaschen (jeweils 5 mL) und im Vakuum getrocknet.

11. Abspalten des Peptides vom Harz und Entschützen der Seitenkettenschutzgruppen

Diese beiden Reaktionen werden auch bei der Peptidbibliothek in einem Schritt vorgenommen. Hierfür wird jede einzelne Harzmenge mit 0.5 mL Reagenz "TIS" für 2.5 h geschüttelt. Die Lösung wird von Harz getrennt, das Harz 2x mit wenig TFA gewaschen und die flüssigen Phasen vereinigt. Durch Zugabe von 3 mL MTBE zu der erhaltenen

Abspaltlösung wird das entschützte Peptid gefällt und durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Das Pellet wird im Argonstrom getrocknet. Diese Vorgehensweise wendet man auf alle 25 Harzmengen an. So erhält man 25 verschiedene Peptide.

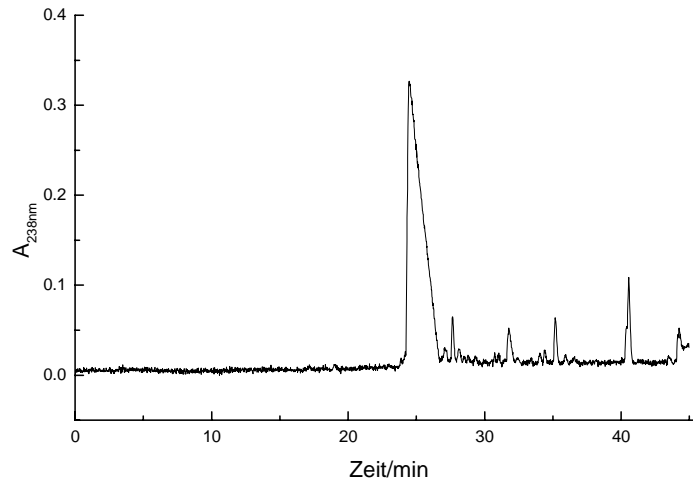


Abb. 7.7: HPLC-Chromatogramm von KYKYIKC-NH₂ (für das Gel-shift Screening verwendetes Rohprodukt)

12. Derivatisierung der Peptidbibliothek mit Polyethylenglycol (PEG)

Je 0.5 mg Peptid wird in ein Eppendorf-Cap eingewogen und in je 100 mL 0.1 mM Na₂H₂PO₄, pH 7 gelöst. Zu dieser Lösung pipettiert man je 60 µL (ca. 1.5 eq.) einer Lösung von M-Mal-PEG (155 mg/1.5 mL). Die Reaktionsmischung wird für 2h geschüttelt und anschließend eingefroren. Die Peptidbibliothek ist nun für Bindungsassays verwendbar. Die Quantifizierung der Peptidmenge erfolgt über Aminosäureanalyse. Nachfolgend ist beispielhaft ein HPLC-Chromatogramm eines der Peptide der Bibliothek Lib YK dargestellt.

7.3 Synthesen der linearen Peptide

Die Synthesen linearer Peptide wurde an einem „Continuous flow 9050 Plus Pepsynth“ Synthesizer der Firma Millipore durchgeführt. Es wurde meist die Synthesemethode "extended cycle" mit einer Kupplungsdauer von 30min gewählt. Die Fmoc-Entschützung der N-Termini geschah innerhalb von 6 min mit 40% Piperidin/DMF. In den meisten Fällen wurde jeweils 0.5g Harzmaterial und 6 eq. Fmoc-Aminosäurederivate eingesetzt. Die Aktivierung der Carbonsäurefunktion wurde mit DIC/HOBt vorgenommen. Das Lösungsmittel der Synthesen war DMF (Qualität p.a. von Merck).

Kupplung von Fmoc- β -Alanin

Sollte eine Fmoc- β -Alanin Einheit gekuppelt werden, wurde die Kupplungsdauer auf 60min erhöht. Die Reaktion des Fmoc- β -Alanins verlief aber so träge, daß die Reaktion manchmal trotzdem nicht vollständig war. Die leicht am MS-Spektrum zu identifizierenden Nebenprodukte mußten dann mittels präparativer HPLC entfernt werden.

Kupplung von Biotin

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von D-Biotin in DMF konnte die Kupplung der Carboxyfunktion des Biotins mit dem Peptid N-Terminus nicht am Synthesizer durchgeführt werden. Die Reaktion mußte manuell in verdünnter Lösung mit meist zweimaliger Kupplung unter DIC/HOBt-Aktivierung durchgeführt werden. Als Lösungsmittel diente 50:50 DMF/"magic mixture", da in dieser Mischung das Biotin etwas besser löslich war als in reinem DMF. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test kontrolliert.

Kupplung von Acridin

Das nur als Hydrat erhältliche Acridin mußte von der Synthese mittels azetroper Entfernung des Wassers mit Benzol getrocknet werden. Nun ist es mäßig in 50:50 DMF/"magic mixture" löslich. Dennoch mußte auch hier der jeweilige Syntheseschritt manuell in verdünnter Lösung durchgeführt werden (1x Nachkupplung). Die Aktivierung der Carboxyfunktion des Acridins geschah ebenfalls nach der DIC/HOBt-Methode.

7.3.1 CETP1

Bei CETP1 handelt es sich um ein 7 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches sich durch besonders gute Bindungseigenschaften an seine Ziel-RNA-Sequenz auszeichnet. Seine Primärstruktur ist formal:



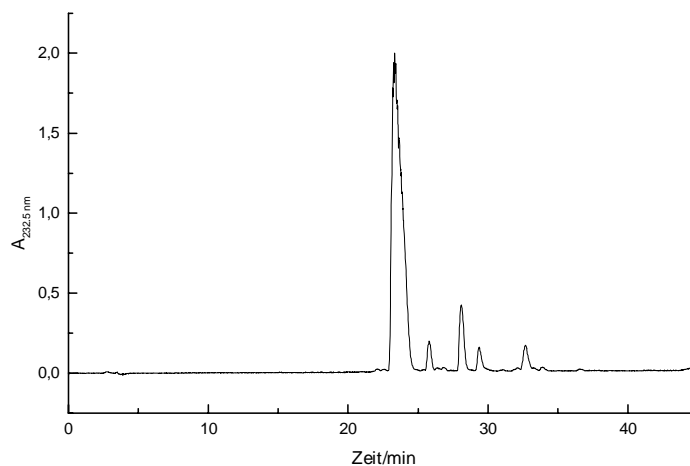
Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.5 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.254 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Durch Variation der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion erhielt man das optimale Ergebnis mit:

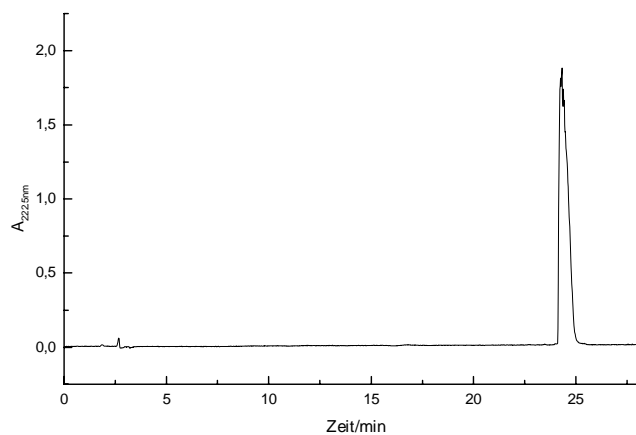
Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	3 h
Eingesetzte Harzmenge:	100 mg
Menge an Abspatlösung:	5 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.



*Abb. 7.8: RP-HPLC von CETP1, roh nach Entschützung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 23.5 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Es konnte in einer Ausbeute von 16,4% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.



*Abb. 7.9: RP-HPLC von CETP1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.6 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 944.18 g/mol.

7 Experimenteller Teil

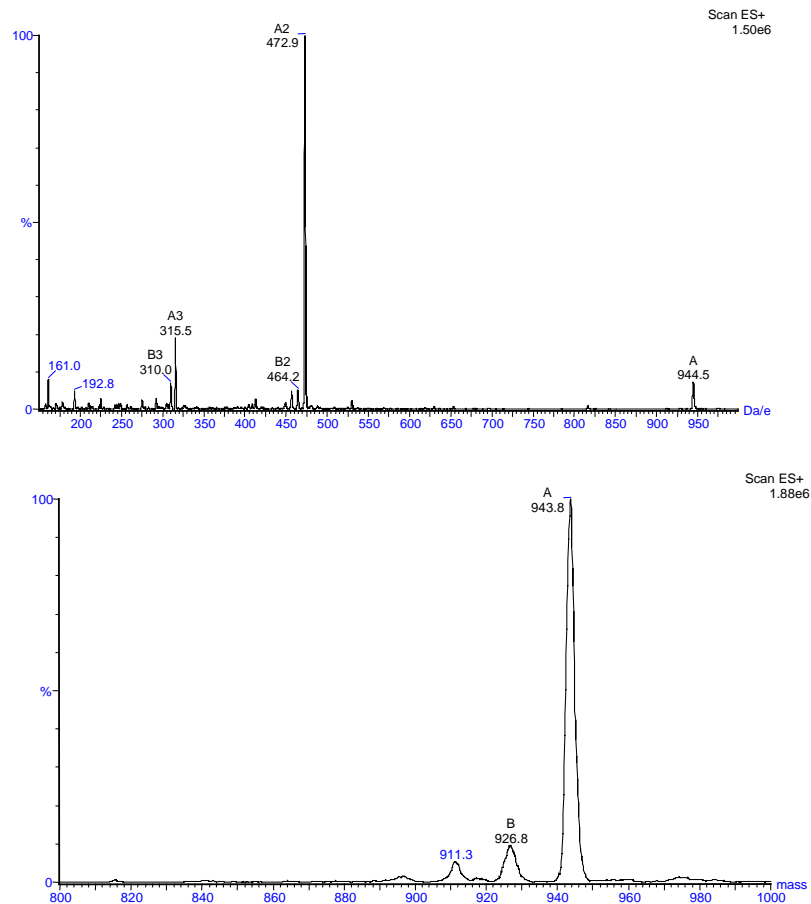


Abb. 7.10: ESI-MS-Spektrum von CETP1

Die Aminosäureanalyse entspricht ebenfalls den Erwartungen. Ferner wurden mit ihrer Hilfe angesetzte Peptidlösungen für z.B. NMR-Untersuchungen quantifiziert. Das UV-Spektrum ist nachfolgend gegeben.

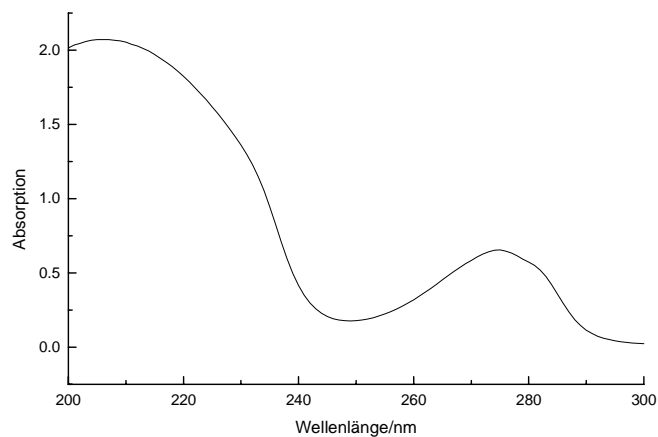


Abb. 7.11: UV-Spektrum von CETP1 (150 μ molar in H_2O , 22 $^{\circ}C$, pH 7, 10 mM K-Phosphat, 100 mM NaCl)

7 Experimenteller Teil

Mit der Information aus der Quantifizierung der Aminosäureanalyse wurde der Extinktionskoeffizient des Peptids „CETP1“ bestimmt:

$$\epsilon_{275\text{nm}}: 1.529 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$$

Das CD-Spektrum dieser Verbindung zeigt, daß das Peptid in Lösung völlig unstrukturiert vorliegt.

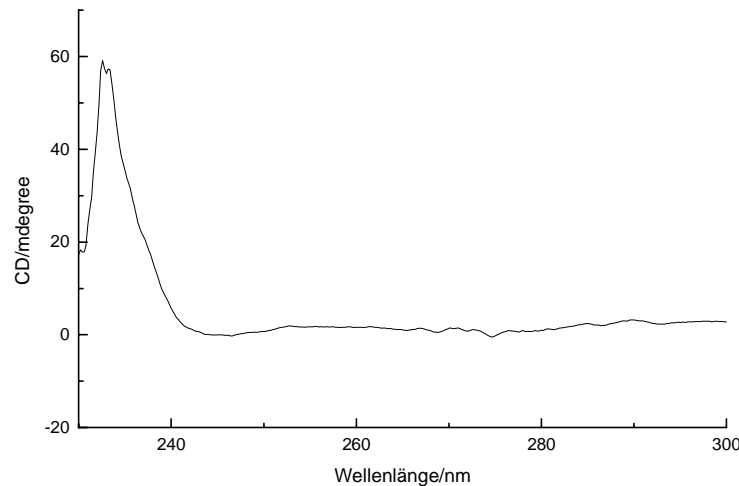


Abb. 7.12: CD-Spektrum von CETP1 (150 μmolar in H_2O , 22 $^\circ\text{C}$, pH 7, 10 mM K-Phosphat, 100 mM NaCl)

7.3.2 P-CETP1

Bei P-CETP1 handelt es sich um ein 25 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches die CETP mRNA-Bindungssequenz und durch eine Spacereinheit (- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -) getrennte membrangängige Peptidsequenz beinhaltet. Seine Primärstruktur lautet:



Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese am Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.5 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.672 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)

7 Experimenteller Teil

Überschuß der Aminosäurederivate: 5-fach

Doppelte Kupplungsdauer: 60 min

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

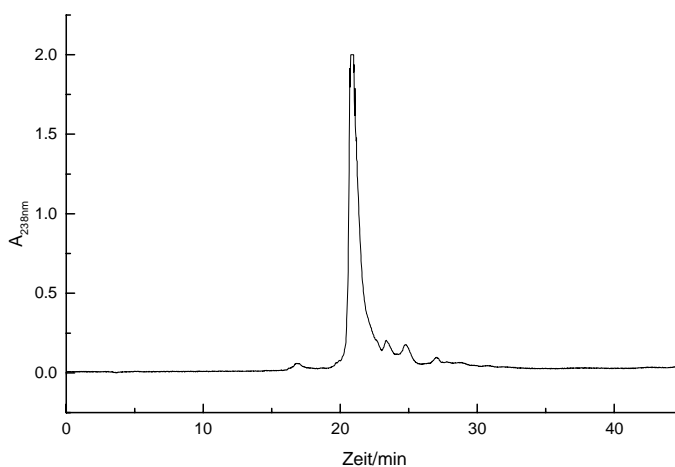
Abspaltreagenz: Reagenz „TIS“

Abspaltdauer: 6 h

Eingesetzte Harzmengung: 1200 mg

Menge an Abspalllösung: 70 ml

Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm bestätigt den erfolgreichen Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion.



*Abb. 7.13: RP-HPLC von P-CETP1, roh nach Entschüttung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 21.4 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Es konnte in einer Ausbeute von 20% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.

7 Experimenteller Teil

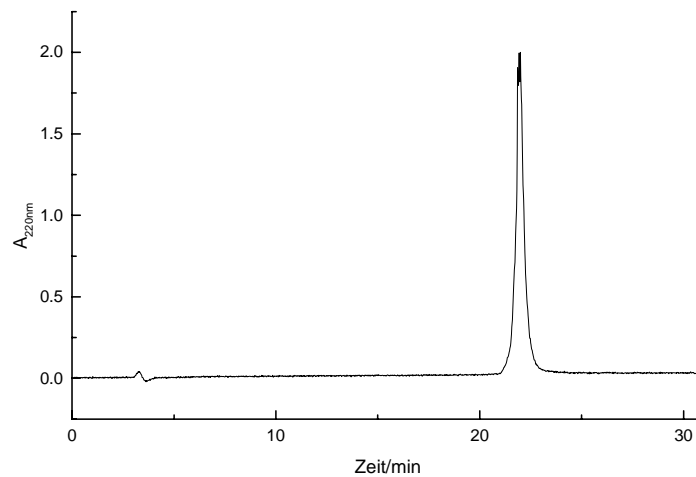


Abb. 7.14: RP-HPLC von P-CETP1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 22.0 min

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 3315.074 g/mol.

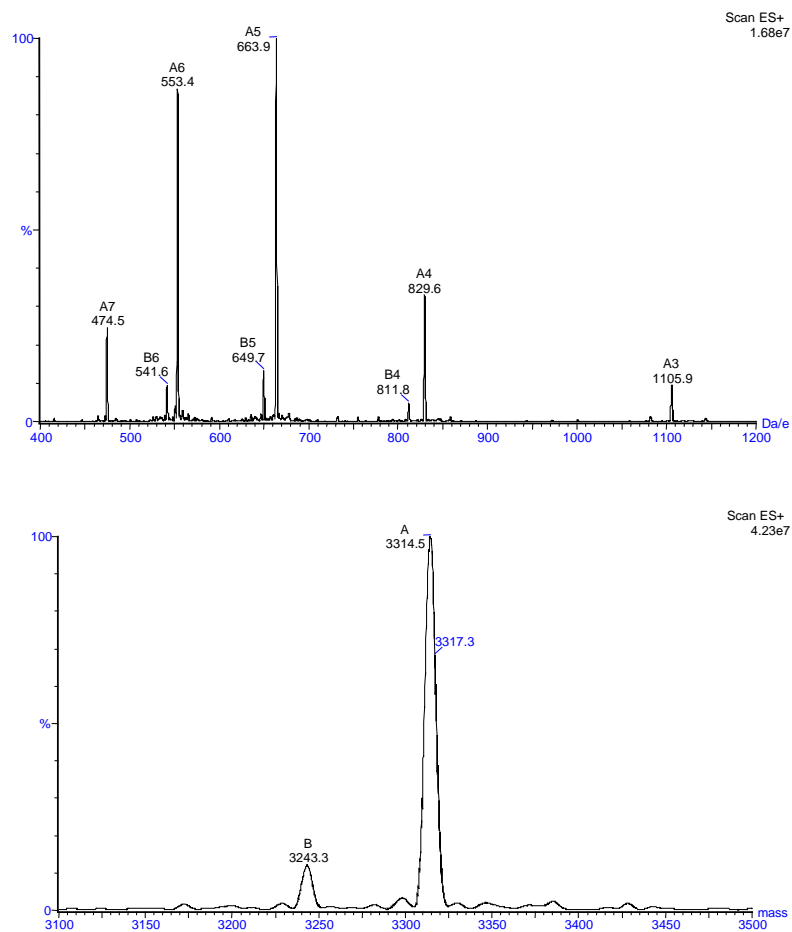


Abb. 7.15: ESI-MS-Spektrum von P-CETP1

7.3.3 Penetratin

Bei Penetratin handelt es sich um ein 18 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches die membrangängige Penetratinsequenz und eine (-βAβA)-Einheit beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:



Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.5 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.599 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	6 h
Eingesetzte Harzmenge:	2200 mg
Menge an Abspatlösung:	130 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.

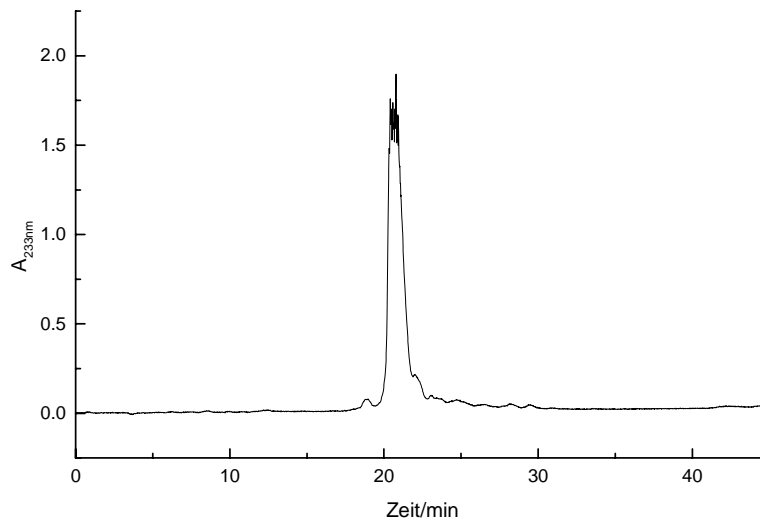


Abb. 7.16: RP-HPLC von Penetratin, roh nach Entschüttung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 20.6 min

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC gut aufreinigen. Es konnte in einer Ausbeute von 28% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.

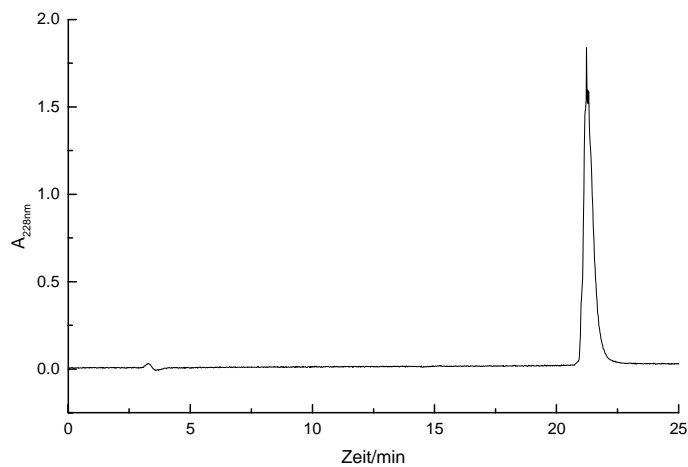


Abb. 7.17: RP-HPLC von P-CETP1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 21.3 min

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 2387.904 g/mol.

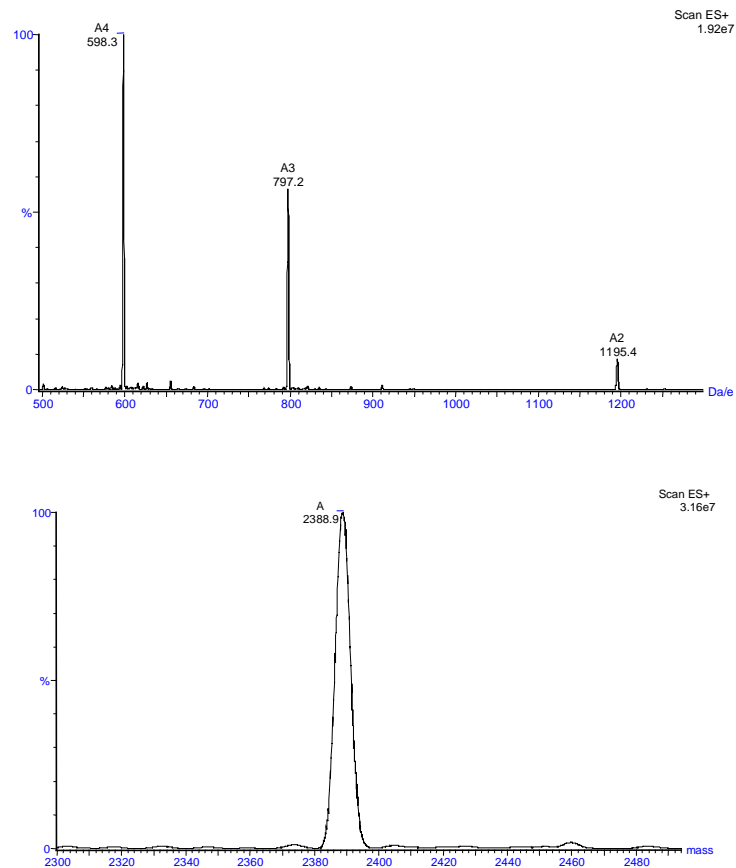


Abb. 7.18: ESI-MS-Spektrum von Penetratim

7.3.4 TAR1

Bei handelt es sich um ein 9 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches besonders an die Δ TAR RNA bindet. Die Primärstruktur lautet:



Am Peptidsynthesizer wurde nur die Peptidsequenz, sowie die (- $\beta\text{A}\beta\text{A}$ -) Einheit hergestellt. Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.4 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g

7 Experimenteller Teil

100% Ausbeute: 0.272 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)

Überschuß der Aminosäurederivate: 5-fach

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

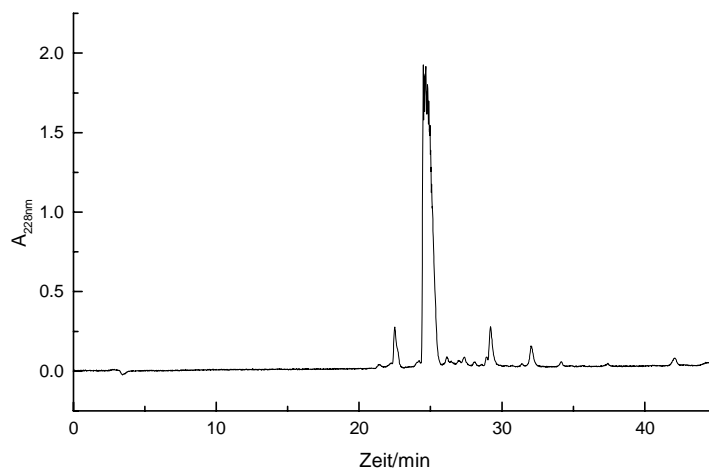
Abspaltreagenz: Reagenz „TIS“

Abspaltdauer: 4 h

Eingesetzte Harzmenge: ca. 200 mg

Menge an Abspalllösung: 8 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.



*Abb. 7.19: RP-HPLC von TAR1, roh nach Entschützung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.6 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Es konnte in einer Ausbeute von 59% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.

7 Experimenteller Teil

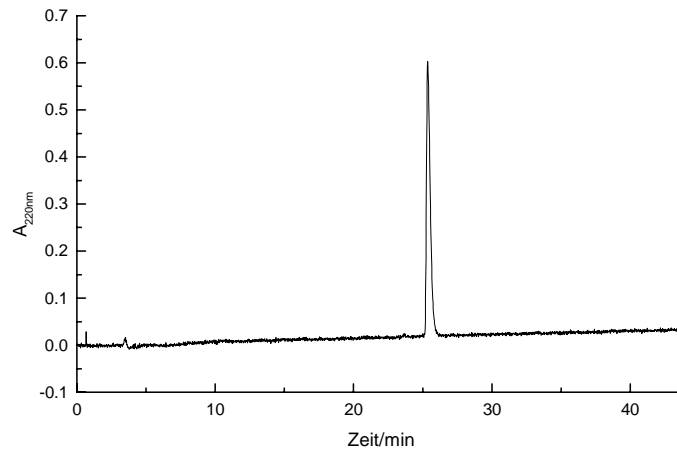


Abb. 7.20: RP-HPLC von TARI, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 25.4 min

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1079.34 g/mol.

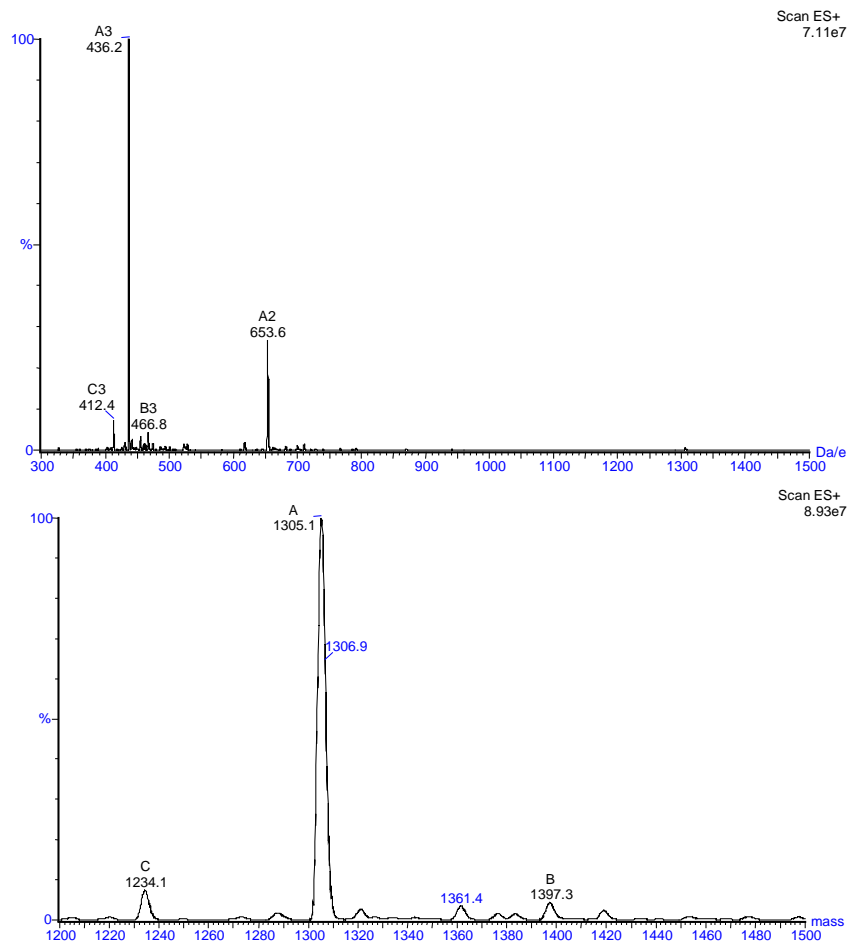
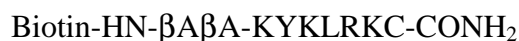


Abb. 7.21: ESI-MS-Spektrum von TARI

7.3.5 B-TAR1

Bei B-TAR1 handelt es sich um ein 9 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptidderivat, welches eine Δ TAR RNA Bindungssequenz und eine über (- β A β A-)-Einheit getrennte Biotin-Markierung beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:

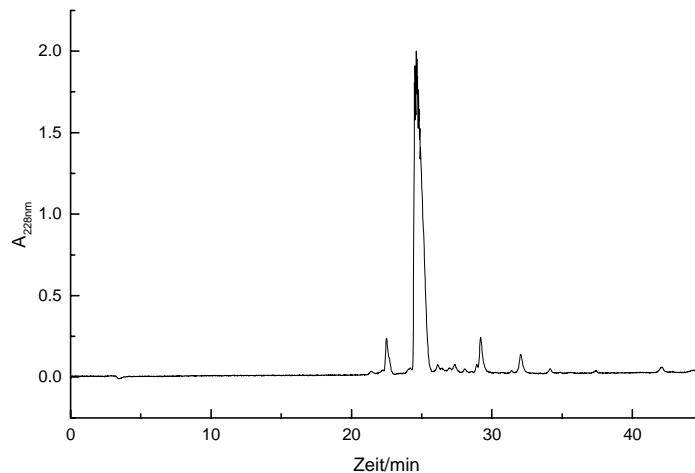


Am Peptidsynthesizer wurde, wie für TAR1 beschrieben analog die Peptidsequenz, sowie die (- β A β A-)-Einheit hergestellt. Die Biotin-Markierung mußte nachträglich manuell ansynthetisiert werden. Die Kupplung von Biotin an das festphasengebundene, mit Seitenkettenschutzgruppen geschützte, aber Fmoc entschlützte Peptid geschah so:

200 mg (0.82 mmol) D-Biotin 144 μ L (0.92 mmol) DIC und 170 mg (1.26 mmol) HOBt werden in 10 mL eines Gemisches aus DMF/Magic mixture (1:1) gelöst und zu der Hälfte des am Peptidsynthesizer eingesetzten Harzmenge gegeben und für 4 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird entfernt, das Harz mit DMF gewaschen und der Biotin-Kupplungsschritt noch einmal wiederholt. Wieder wird das Harz dreimal mit DMF, einmal mit Isopropanol gewaschen und getrocknet. Das Biotin-markierte Peptid kann nun in einem Schritt vom Harz abgespalten und entschlützt werden. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

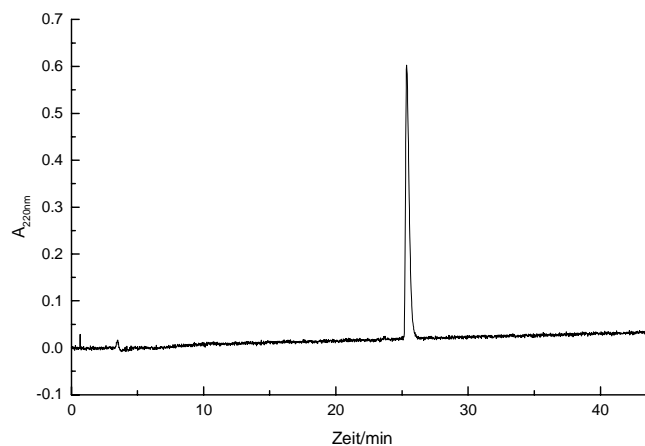
Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	4 h
Eingesetzte Harzmenge:	200 mg
Menge an Abspalllösung:	8 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.



*Abb 7.22.: RP-HPLC von B-TARI, roh nach Entschützung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.6 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC gut aufreinigen. Es konnte in einer Ausbeute von 31% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.



*Abb. 7.23: RP-HPLC von B-TARI, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 25.4 min*

Die Charakterisierung der Produkt mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1305.643 g/mol.

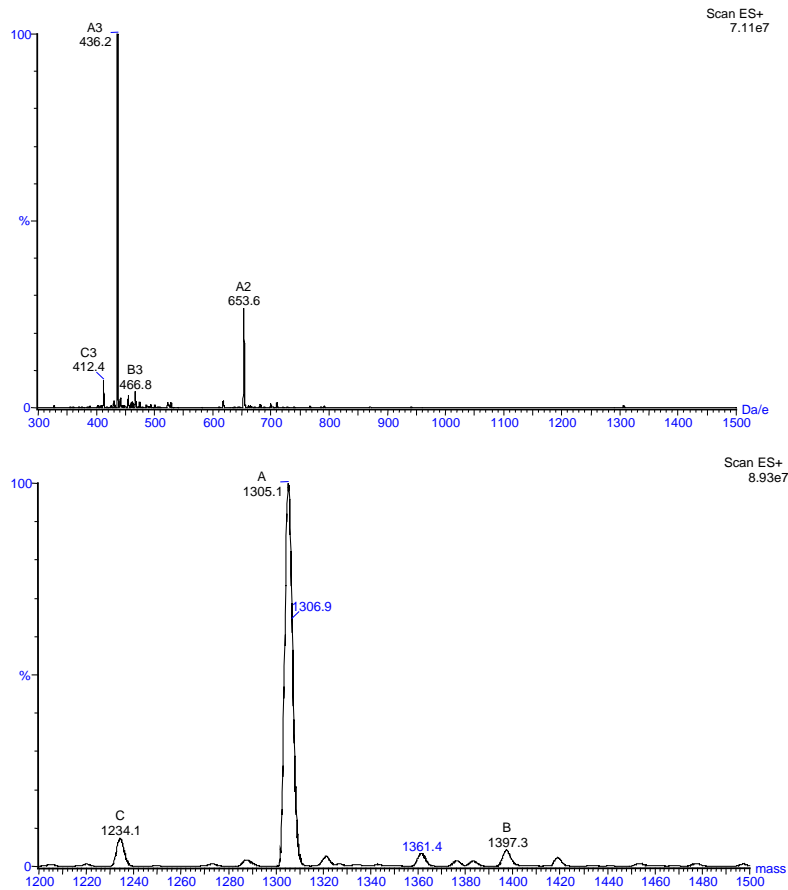


Abb. 7.24: ESI-MS-Spektrum von B-TAR1

Die Aminosäureanalyse entspricht ebenfalls den Erwartungen.

7.3.6 B-P-TAR1

Bei B-P-TAR1 handelt es sich um ein 27 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches eine Δ TAR RNA Bindungssequenz, die Penetratinsequenz, zwei (- β A β A-)-Einheiten und eine Biotin-Markierung beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:



Am Peptidsynthesizer wurde die Peptidsequenz, sowie die (- β A β A-)-Einheiten hergestellt. Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

7 Experimenteller Teil

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.250 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.478 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	6-fach
Doppelte Kupplungsdauer:	60 min

Die Biotin-Markierung mußte nachträglich, wie in 7.3.5 beschrieben, manuell an das Peptid synthetisiert werden. Das Biotin-markierte Peptid kann nun in einem Schritt vom Harz abgespalten und entschützt werden. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

Abspaltreagenz:	Reagenz „K“
Abspaltdauer:	4 h
Eingesetzte Harzmenge:	100 mg
Menge an Abspalllösung:	15 ml

Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm bestätigt den erfolgreichen Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion.

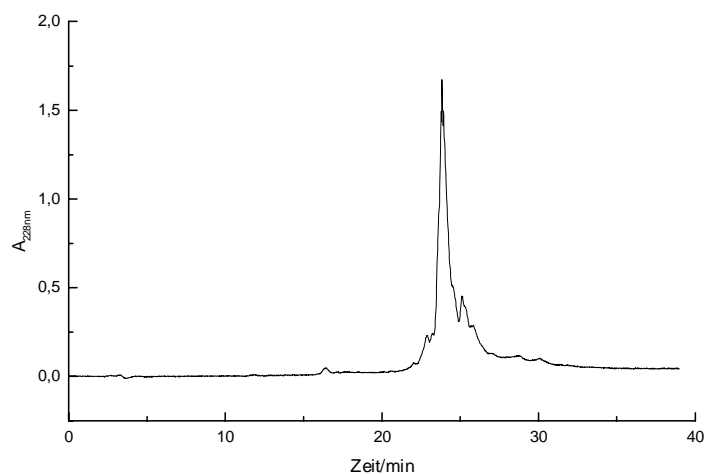
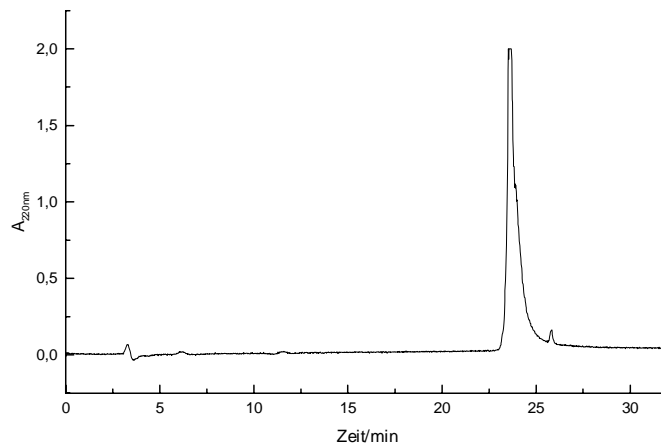


Abb. 7.25: RP-HPLC von B-P-TARI, roh nach Entschützung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24 min

7 Experimenteller Teil

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nur kleine Mengen dieses Peptids für physiologische Tests benötigt wurden und nur ein kleiner Teil des Peptid aufgearbeitet wurde.



*Abb. 7.26: RP-HPLC von B-P-TAR1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 4 0min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.3 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 3676.53 g/mol. Es ist noch ein geringer Anteil der Fehlsequenz Peptid- β A (-71 g/mol) im Produkt vorhanden.

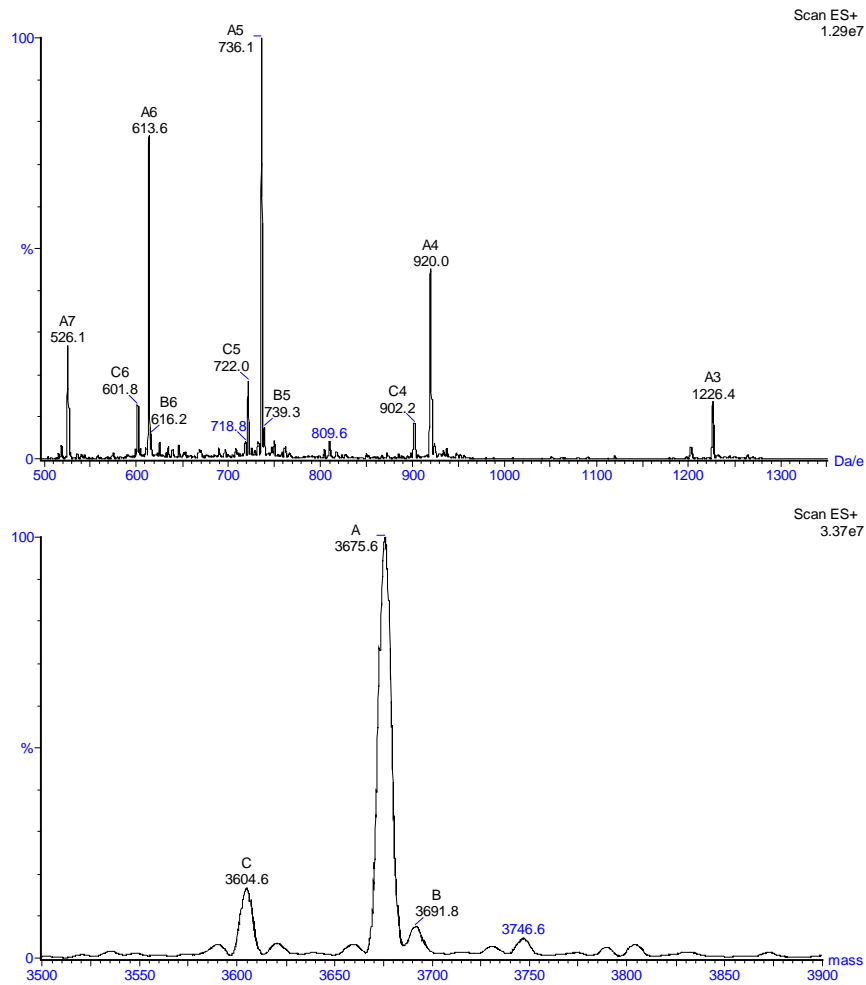


Abb. 7.27: ESI-MS-Spektrum von B-P-TAR1

7.3.7 TAR2

Bei handelt es sich um ein 9 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches besonders an die Δ TAR RNA bindet. Die Primärstruktur lautet:



Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger: Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes: 0.4 g

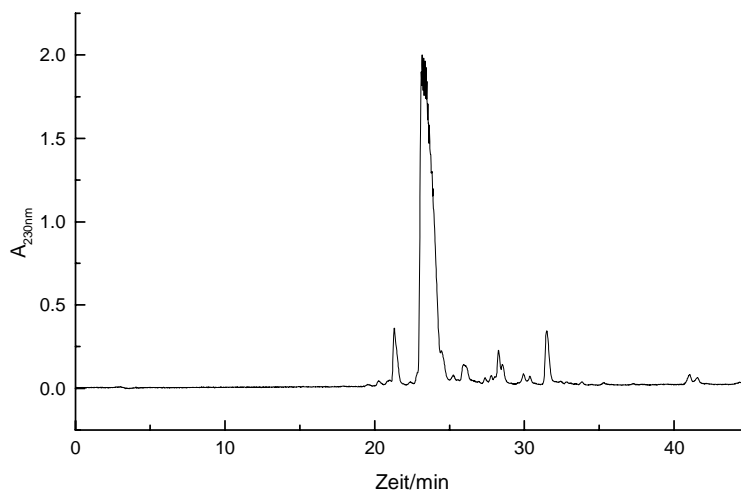
7 Experimenteller Teil

Harzbelegung: 0.52 mmol/g
100% Ausbeute: 0.272 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate: 5-fach

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

Abspaltreagenz: Reagenz „TIS“
Abspaltdauer: 4 h
Eingesetzte Harzmenge: 200 mg
Menge an Abspatlösung: 8 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm bestätigt den erfolgreichen Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion.



*Abb. 7.28: RP-HPLC von TAR2, roh nach Entschüttung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 26.62 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Es konnte in einer Ausbeute von 39% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.

7 Experimenteller Teil

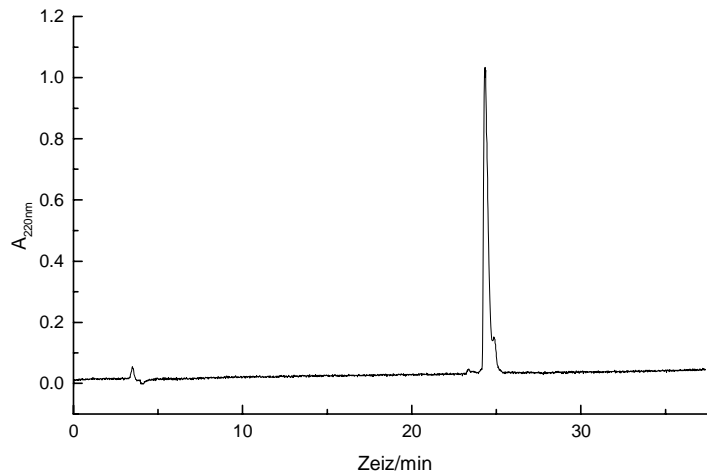


Abb. 7.29: RP-HPLC von TAR2, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.9 min

Die Charakterisierung der Produkt mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1355.66 g/mol.

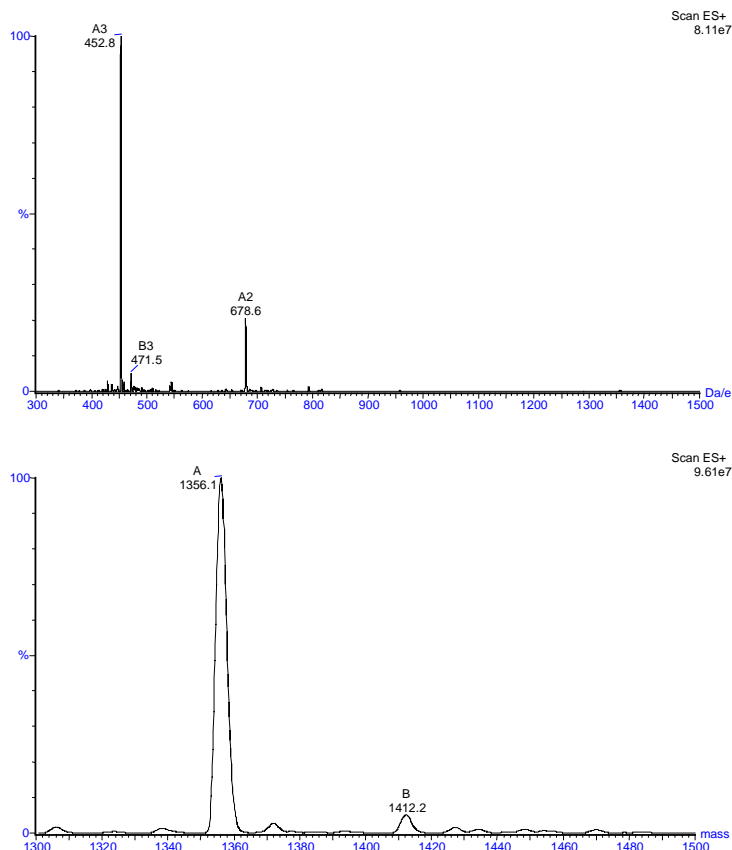


Abb. 7.30: ESI-MS-Spektrum von TAR2

7.3.8 B-TAR2

Bei B-TAR2 handelt es sich um ein 9 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches ebenfalls eine Δ TAR RNA Bindungssequenz und eine über (- β A β A-)-Einheit getrennte Biotin-Markierung beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:



Am Peptidsynthesizer wurde, wie unter 7.3.7 beschrieben, nur die Peptidsequenz, sowie die (β A β A)-Einheit hergestellt. Die Biotin-Markierung mußte nachträglich, wie in 7.3.5 beschrieben, manuell an das Peptid synthetisiert werden. Das Biotin-markierte Peptid kann nun in einem Schritt vom Harz abgespalten und entschützt werden. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	4 h
Eingesetzte Harzmenge:	200 mg
Menge an Abspatlösung:	8 mL
Theoretische Ausbeute:	282 mg

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.

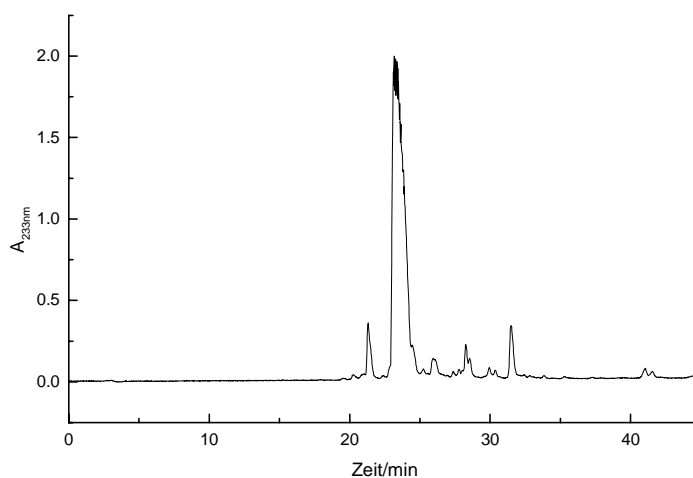
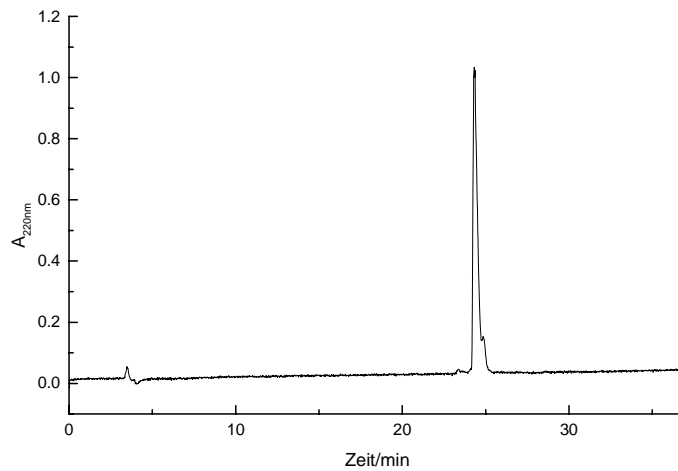


Abb. 7.31: RP-HPLC von B-TAR2, roh nach Entschützung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 23.2 min

7 Experimenteller Teil

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Die Ausbeute betrug 30%.



*Abb. 7.32: RP-HPLC von B-TAR2, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.3 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1355.66 g/mol.

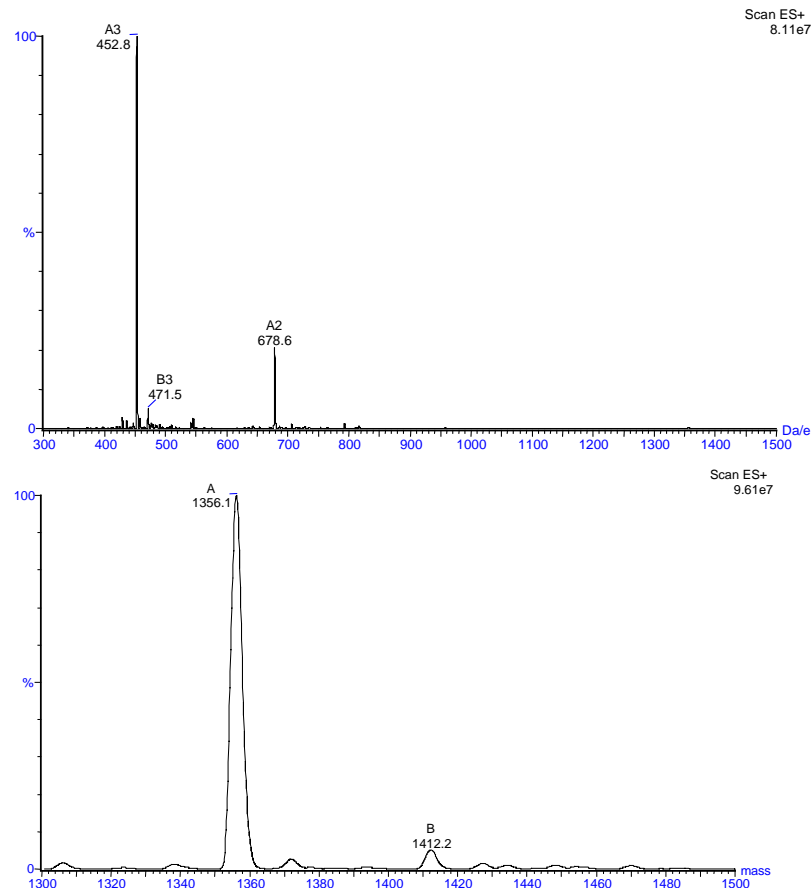


Abb. 7.33: ESI-MS-Spektrum von B-TAR2

7.3.9 B-P-TAR2

Bei B-P-TAR2 handelt es sich um ein 27 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches eine Δ TAR RNA Bindungssequenz, die Penetratinsequenz, zwei (- β A β A-)-Einheiten und eine Biotin-Markierung beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:



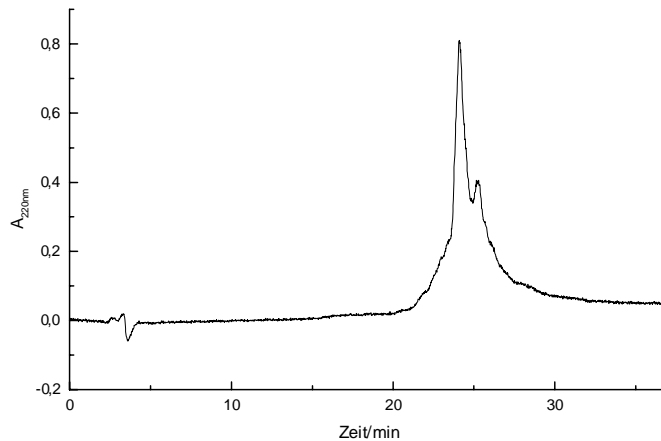
Am Peptidsynthesizer wurde die Peptidsequenz, sowie die (- β A β A-)-Einheiten hergestellt. Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.250 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.484 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	6-fach
Doppelte Kupplungsdauer:	60 min

Die Biotin-Markierung mußte nachträglich, wie in 7.3.5 beschrieben, manuell an das Peptid synthetisiert werden. Das Biotin-markierte Peptid kann nun in einem Schritt vom Harz abgespalten und entschützt werden. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

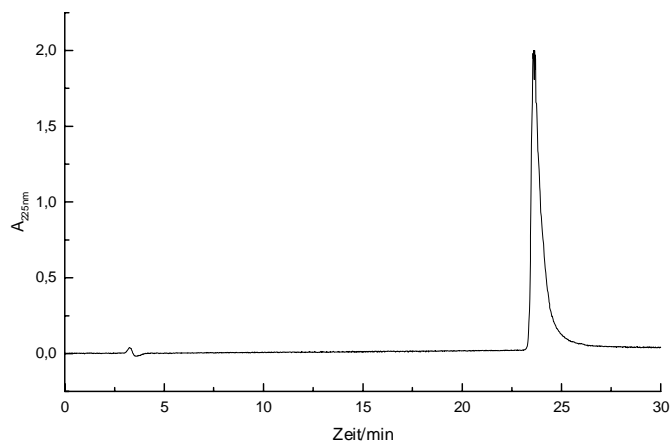
Abspaltreagenz:	Reagenz „K“
Abspaltdauer:	4 h
Eingesetzte Harzmenge:	100 mg
Menge an Abspatlösung:	15 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.



*Abb. 7.34: RP-HPLC von B-P-TAR2, roh nach Entschüttung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 24.10 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nur kleine Mengen dieses Peptids für physiologische Tests benötigt wurden und nur ein kleiner Teil des Peptid aufgearbeitet wurde.



*Abb. 7.35: RP-HPLC von B-P-TAR2, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 10 min, Eurospher RP18, 23.66 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 3726.549 g/mol.

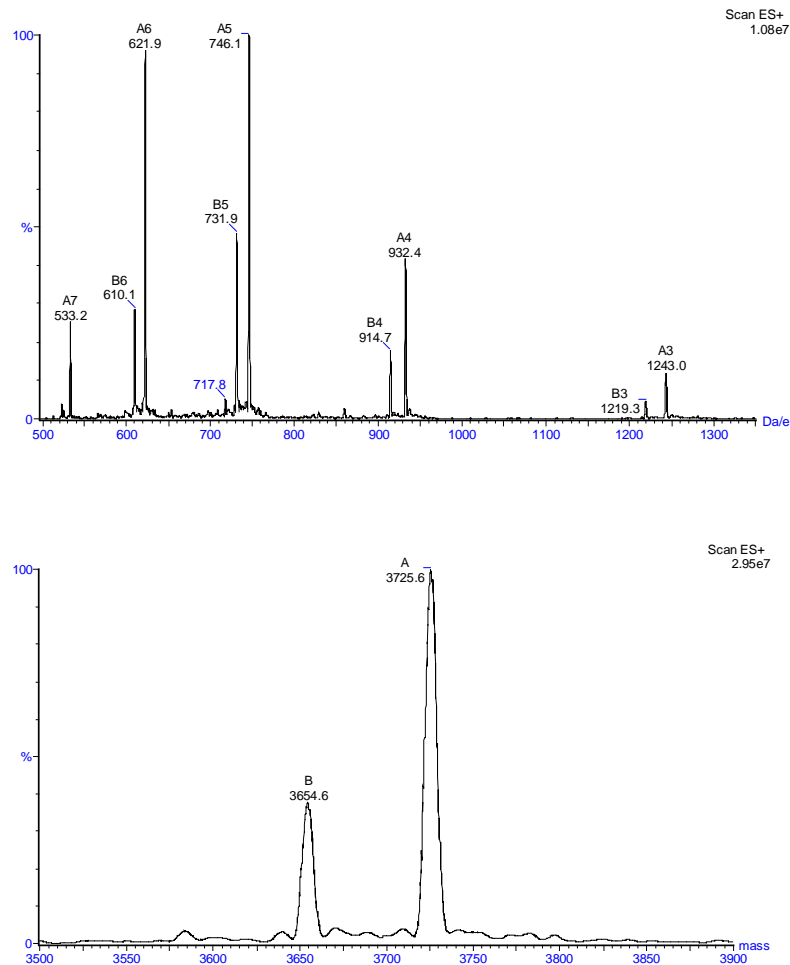
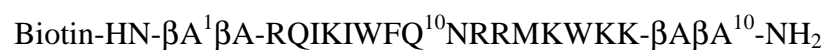


Abb. 7.36: ESI-MS-Spektrum von B-P-TAR2

Leider konnte die Fehlsequenz Peptid- β -A (-71g/mol) nicht vollständig abgetrennt werden.

7.3.10 B-Penetratin

Bei B-Penetratin handelt es sich um ein 18 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid. Die Penetratinsequenz ist über eine (- β A β A-)-Einheit mit Biotin markiert. Die Primärstruktur lautet:



7 Experimenteller Teil

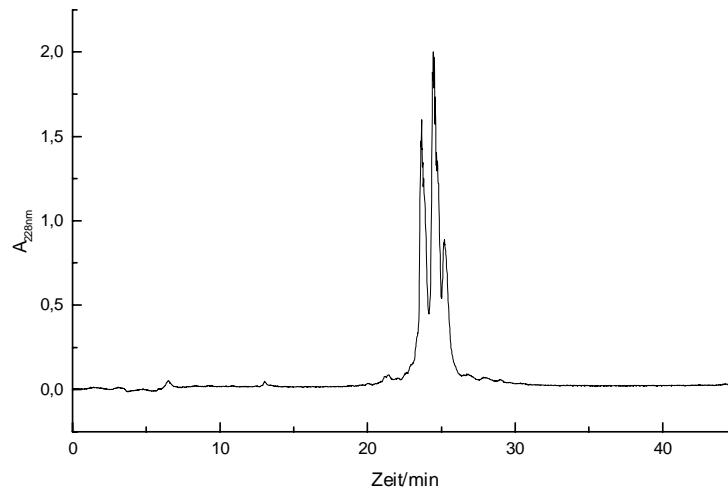
Am Peptidsynthesizer wurde die Peptidsequenz, sowie die (- β A β A-)-Einheiten hergestellt. Die Biotin-Markierung mußte nachträglich manuell angeknüpft werden. Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.400 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.500 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Die Biotin-Markierung mußte nachträglich, wie in 7.3.5 beschrieben, manuell an das Peptid synthetisiert werden. Das Biotin-markierte Peptid kann nun in einem Schritt vom Harz abgespalten und entschützt werden. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

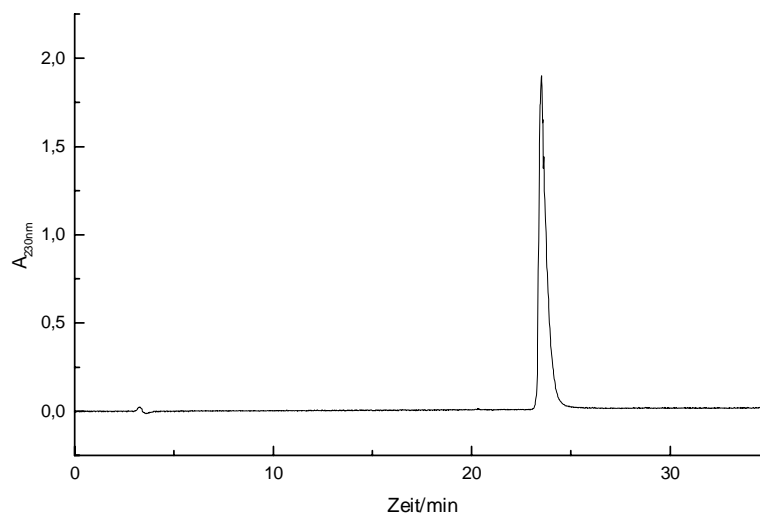
Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	6 h
Eingesetzte Harzmenge:	100 mg
Menge an Abspalllösung:	7 ml

Durch versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm zeigt den Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion. Man erkennt drei Fraktionen, das Produkt ist uneinheitlich. Eine Untersuchung mittels ESI-MS zeigt, das die die Masse des ersten Peaks die der gewünschten Verbindung hat. Der zweite Peak hat eine um 71 g/mol, der dritte eine um 142 g/mol erniedrigte Masse. Die Massendifferenz legt die Vermutung nahe, daß die Kupplungen von Fmoc-NH- β A-COOH unvollständig verlaufen ist. Das richtige Produkt ist durch präparative RP-HPLC isolierbar. Bei nachfolgenden Synthesen anderer Sequenzen mit β A-Einheiten wurde die Kupplungsdauer von Fmoc-NH- β A-COOH von standardmäßig 30min auf 1h verdoppelt, ein ein homogeneres Produkt wird erhalten.



*Abb. 7.37: RP-HPLC von B-Penetratin, roh nach Entschüttung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nur kleine Mengen dieses Peptids für physiologische Tests benötigt wurden und nur ein kleiner Teil des Peptid aufgearbeitet wurde.



*Abb. 7.38: RP-HPLC von B-Penetratin, nach HPLC-Aufreinigung.
0-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 23.58 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 2756.351g/mol.

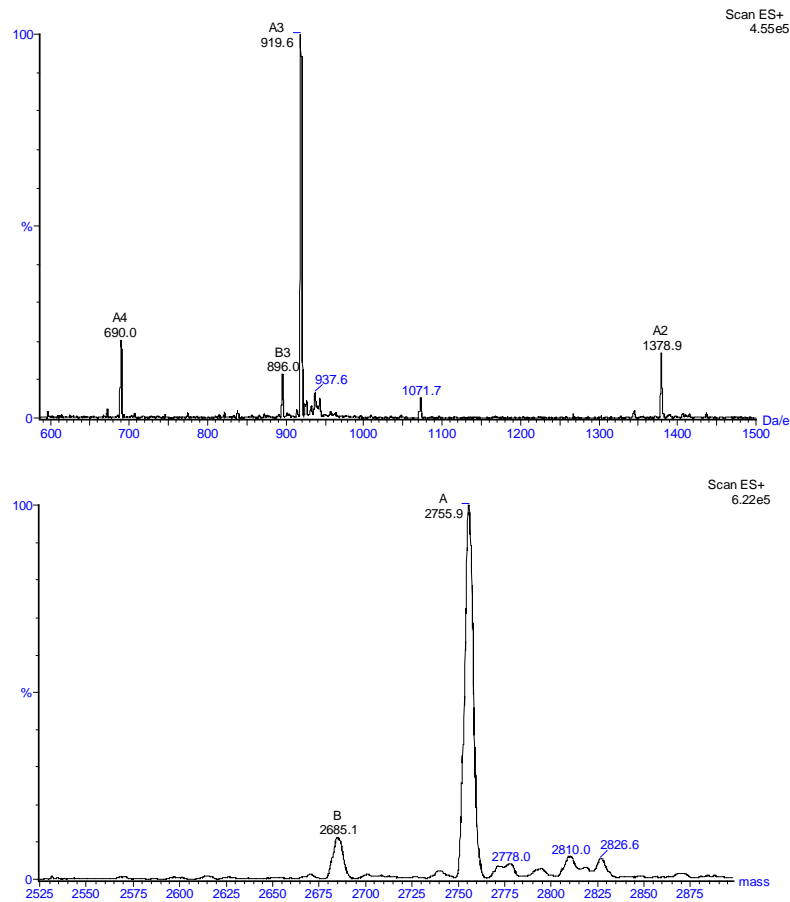
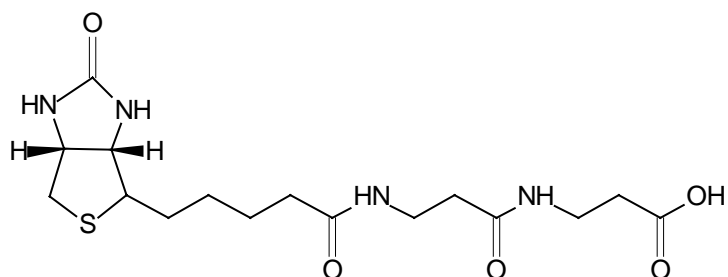


Abb. 7.39: ESI-MS-Spektrum von B-Penetratin

Die Fehlsequenz Peptid-1 β -Alanin (-71g/mol) konnte auch bei dieser Sequenz nicht vollständig abgetrennt werden.

7.3.11 Biotin- β A β A (Biotinyl- β -Alanyl- β -Alanin)

Dieses Biotin- β A β A-Konstrukt soll als Referenz in physiologischen Tests eingesetzt werden, da diese strukturelle Einheit z.T. in den zu testenden Molekülen vorkommt.

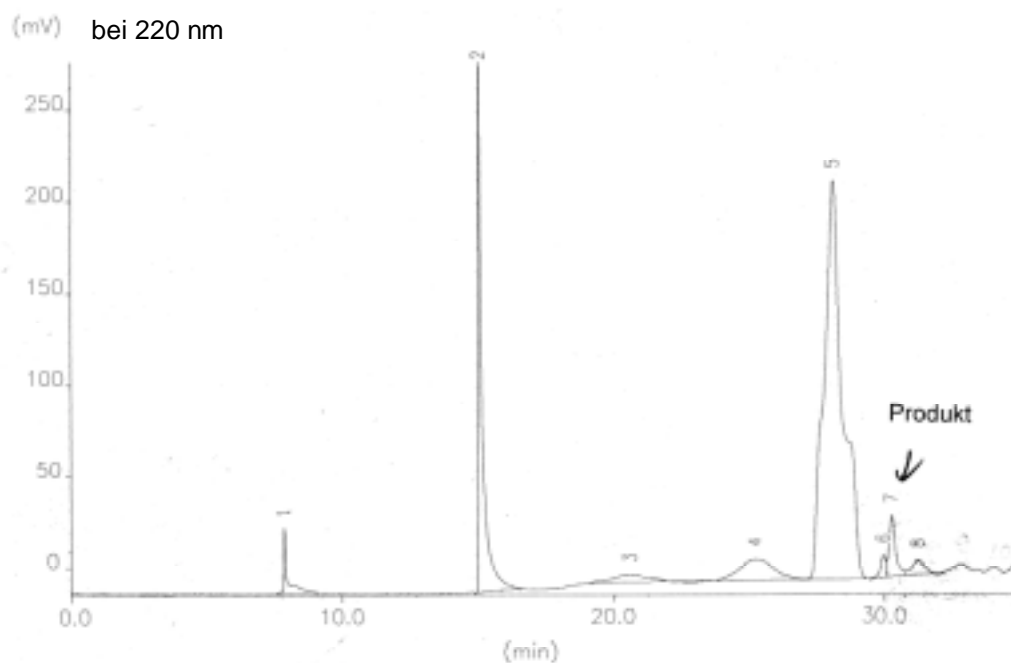


Dieses Molekül wurde manuell an der festen Phase synthetisiert. o-Chlorotriylchloridharz wurde mit Fmoc-NH- β -Alanin-COOH verestert und anschließend die Harzbelegung bestimmt (ca. 0.2 meq/g Harz). Hierfür wurde 1g o-Chlorotriylchloridharz in 10mL DCM suspendiert und mit 1.2 mL (909 mg, 7.05 mmol) DIEA und 439 mg (1.41 mmol) Fmoc-NH- β -Alanin-COOH versetzt und 1 h geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde der Mischung weitere 500 μ L (379 mg, 2.94 mmol) DIEA und 3 mL Methanol zugeführt und für 15 min geschüttelt. Auf diese Weise sollten nicht abreagierte Chlorid-Gruppen des Linkers gekappt werden, um Fehlsequenzen zu vermeiden. Das Harz wird abfiltriert und dreimal mit je 10 mL DMF gewaschen. Die Harzbelegung wird mittels quantitativen Kaiser-Test bestimmt und beträgt ca. 0.2 meq./g. Um die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen, wurde das Harz 2x 40 min mit 40% Piperidin/DMF geschüttelt und anschließend wieder das Harz abfiltriert und dreimal mit je 10 mL DMF gewaschen.

Die zweite β -Alanin-Einheit wurde mittels zweimaligen Kuppeln des Harzes mit Fmoc-NH- β -Alanin-COOH unter DIC/HOBt-Aktivierung erreicht. Dazu schüttelte man das Harz für 3h jeweils in 10 mL DMF und 439 mg (1.41 mmol) Fmoc-NH- β -Alanin-COOH, 234 μ L (1.5 mmol) DIC und 283 mg (2.1 mmol) HOBt. Anschließend mußte jeweils das Harz von der Reaktionslösung abfiltriert und dreimal mit je 10 mL DMF gewaschen werden. Um die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen, wurde wieder das Harz 2x40 min mit 40% Piperidin/DMF geschüttelt, das Harz abfiltriert und dreimal mit je 10 mL DMF gewaschen. Die anschließende Kupplung von D-Biotin geschah ebenfalls an der festen Phase unter DIC/HOBt-Aktivierung in DMF. Es wurde ebenfalls zweimal gekuppelt. Hierfür schüttelte man das Harz für 3h jeweils in 10 mL DMF/"magic mixture" (1:1) und 344 mg (1.41 mmol), D-Biotin, 234 μ L (1.5 mmol) DIC und 283 mg (2.1 mmol) HOBt. Anschließend mußte jeweils das Harz von der Reaktionslösung abfiltriert und dreimal mit je 10 mL DMF gewaschen werden.

7 Experimenteller Teil

Um die gewünschte Substanz von Harz abzuspalten, wurde das Harz für 3 h in TFE/AcOH/DCM (1:1:8) geschüttelt und anschließend die Reaktionslösung vom Harz abfiltriert. Die Reaktionslösung enthält nun das synthetisierte Biotin-Derivat. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und somit ein Großteil des DCM entfernt. Der Rest der Lösung wurde mit 100 mL Wasser/ACN (2:1) verdünnt und lyophilisiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Das Produkt Biotin- $\beta\beta\beta$ hat keine chromophore Gruppen, welche stark im Absorptionsbereich des HPLC-Detektors absorbieren. Somit ist die Produktfraktion scheinbar sehr klein und schwierig im HPLC-Chromatogramm zu finden. Samtliche anderen Fraktionen sind Verunreinigungen in unwägbaren Mengen.



*Abb. 7.40: RP-HPLC von Biotin- $\beta\beta\beta$, Rohprodukt
100% H₂O 5 min, 0-20% ACN + 0.1% TFA 30 min, 30% 40 min, Eurospher RP18, 30.05 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 386.46 g/mol.

Das Rohprodukt wurde nur zum Teil aufgereinigt, die Ausbeute wurde nicht bestimmt.

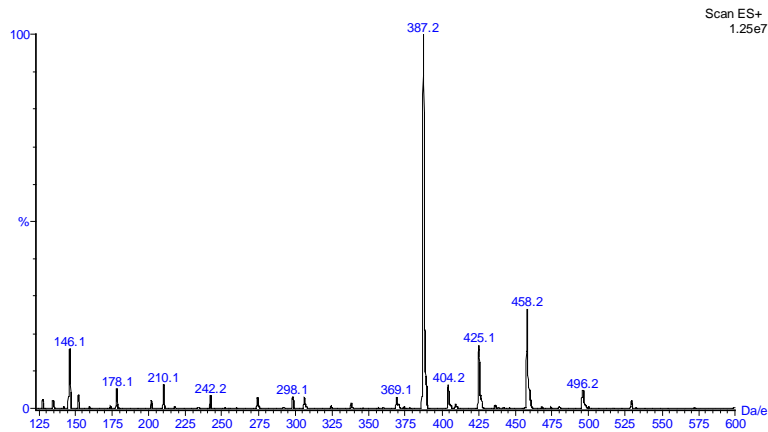


Abb. 7.41: ESI-MS-Spektrum von Biotin- $\beta\beta$

7.3.12 Tat10

Bei Tat10 handelt es sich um ein 10 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches die Bindungssequenz des Tat-Proteins an die TAR RNA und ein C-terminales Cystein beinhaltet. Die Primärstruktur lautet:



Das Peptid wurde manuell hergestellt, zu dem Zeitpunkt der Synthese dieses Moleküls stand der Peptidsynthesizer noch nicht zur Verfügung. Da das Rink Amid MBHA Harz Fmocgeschützt ist, wurde das in DMF gequollene Harz für 20 min mit 20% Piperidin/DMF entschützt. Nach viermaligem Waschen mit je 3 mL DMF konnte die Synthese durchgeführt werden.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz (fmocentschützt)
Menge des Harzes:	0.5 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.375 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	3-fach
Überschuß an DIC:	3.3-fach
Überschuß an HOBt:	4.5-fach
Fmoc-Abspaltung:	je 7 mL 40% Piperidin/DMF

7 Experimenteller Teil

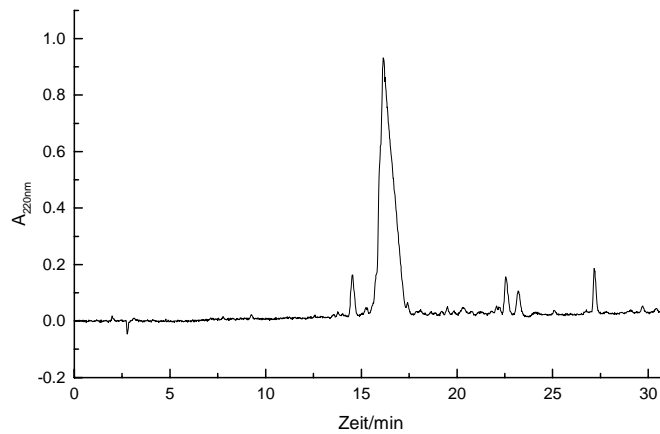
Das Syntheseprotokoll sei nachfolgend aufgeführt:

Aminosäure		Reaktionszeit	Nachkupplung
10. Fmoc-Cystein-Trt	C	3 h	nein
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	
9. Fmoc-Arg-Pmc	R	ÜN	nein
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	
8. Fmoc-Arg-Pmc	R	4.5 h	1 mal für 1 h
Fmoc-Abspaltung:		6x20 min	
7. Fmoc-Arg-Pmc	R	ÜN	nein
Fmoc-Abspaltung:		6x20 min	
6. Fmoc-Gln-Trt	Q	ÜN	nein
Fmoc-Abspaltung:		5x20 min	
5. Fmoc-Arg-Pmc	R	4 h	nein
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	
4. Fmoc-Arg-Pmc	R	4,5 h	nein
Fmoc-Abspaltung:		6x20 min	
3. Fmoc-Lys-Boc	K	ÜN	nein
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	
2. Fmoc-Lys-Boc	K	4.5 h	nein
Fmoc-Abspaltung:		4x20 min	
1. Fmoc-Arg-Pmc	R	10 h	nein
Fmoc-Abspaltung:		5x20 min	

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde mit dem Kaiser-Test, die Fmoc-Entschützung wurde UV-spektrometrisch überprüft. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

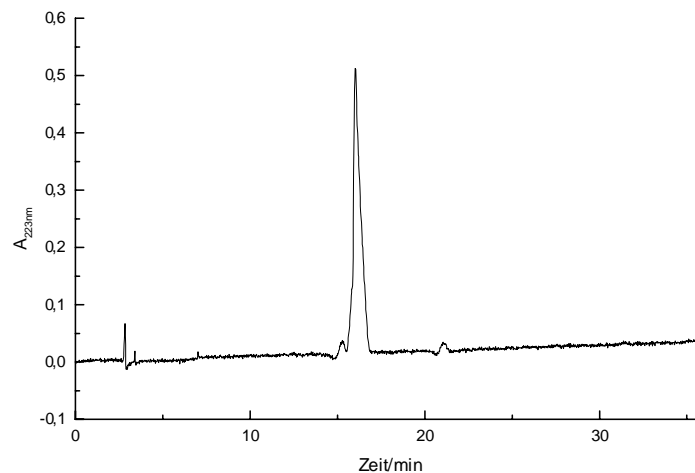
Abspaltreagenz: Reagenz „K“
Abspaltdauer: 2.5 h
Eingesetzte Harzmenge: 500 mg
Menge an Abspallösung: 5 ml

Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.



*Abb. 7.42: RP-HPLC von Tat10, roh nach Entschützung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 16.10 min*

Das Produkt ließ sich mittels präparativer HPLC gut isolieren. Es konnte in einer Ausbeute von 5% (bezogen auf die Harzbelegung) gewonnen werden.



*Abb. 7.43: RP-HPLC von Tat10, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 17.96 min*

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1441.753 g/mol.

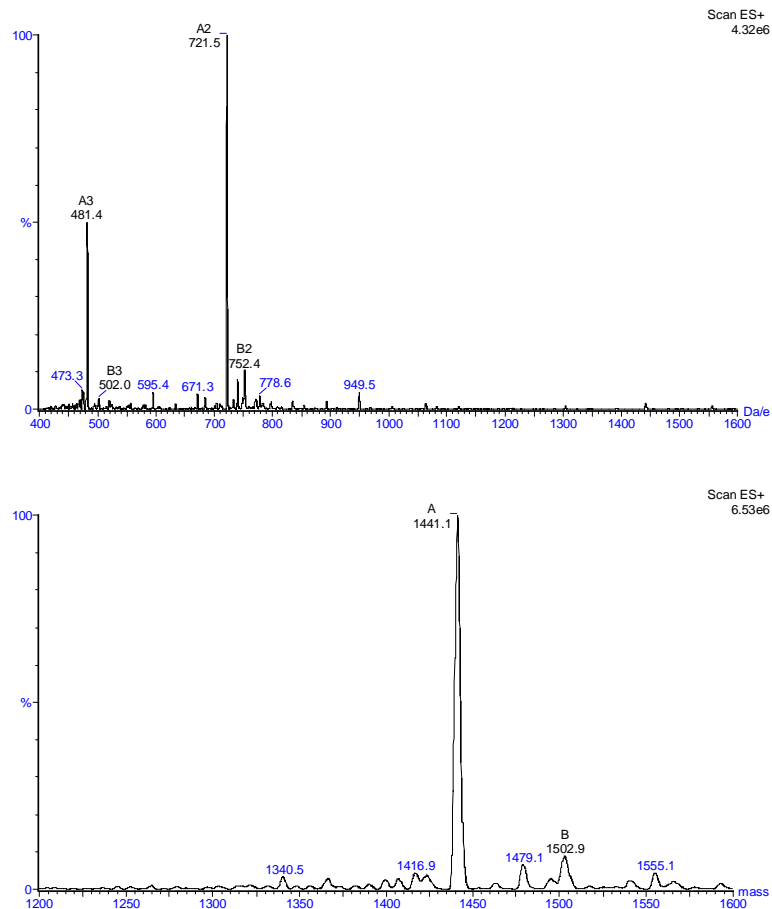
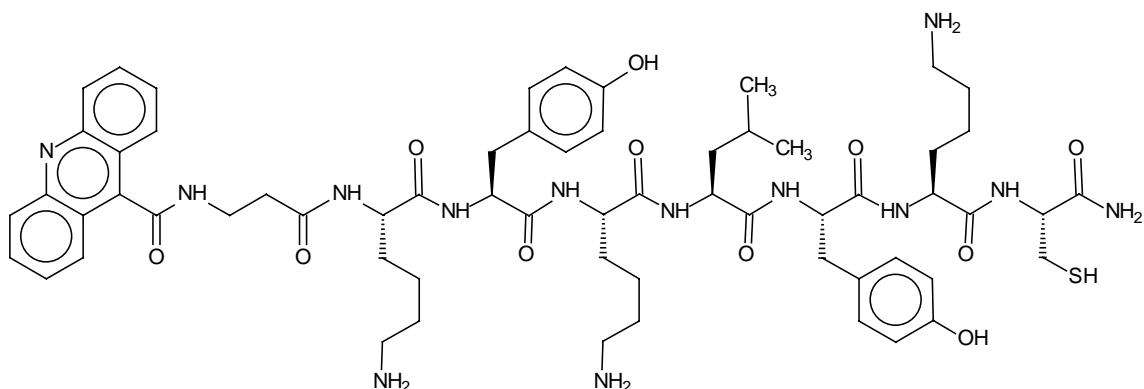


Abb. 7.44: ESI-MS-Spektrum von Tat10-NH₂

7.3.13 Acridin-βA-CETP1

Bei Acridin-βA-CETP1 handelt es sich um ein 7 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches N-terminal über einem βA-Spacer mit einem Acridinmolekül über eine Säureamidbindung derivatisiert wurde. Seine Primärstruktur ist formal:



7 Experimenteller Teil

Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet. Die β -Alanineinheit wurde mit Doppelkupplungen an das Peptid angefügt.

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.2 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.118 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Die Veresterung des harzgebundenen, Seitenketten-geschützten und Fmoc-entschützten Peptides mit Acridin wurde manuell durchgeführt. Acridin ist nur als Hydrat erhältlich, welches in den für die Peptidsynthese notwendigen Lösungsmitteln unlöslich ist. Dazu mußte das Acridin-Hydrat erst vom Wasser befreit werden. 400 mg Acridin-Hydrat wurde in 20ml Benzol in einer Wasserabscheidungsapparatur für 4 h unter Rückfluß gehalten. Nachdem sich kein Wasser mehr abschied, wurde das wasserfreie Acridin an einem Rotationsverdampfer vom Benzol befreit. Es ist nun für die Peptidsynthese verwendbar. Zur Kupplungsreaktion wurden 17 mg (0.312 mmol) wasserfreies Acridin, 43 mg/54 μ L (0.343 mmol) DIC und 63 mg HOBt in einem Gemisch aus 5 mL DMF und 5 mL "Magic mixture" gelöst, der gesamten Harzmenge zugegeben und für 3 h geschüttelt. Anschließend wurde mit den gleichen Reagenzmengen einmal nachgekuppelt. Das Harz wurde nun 3x mit DMF und 1x mit Isopropanol gewaschen und getrocknet.

Die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen wurde in einem Schritt mit folgenden Bedingungen vollzogen:

Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	4 h
Eingesetzte Harzmenge:	400 mg
Menge an Abspalllösung:	7 ml

Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm bestätigt den erfolgreichen Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion.

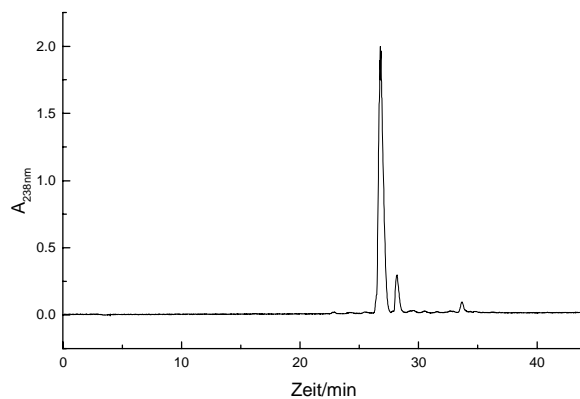


Abb. 7.45: RP-HPLC von Acridin- β A-CETP1, roh nach Entschützung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 26.86 min

Das Produkt ließ sich mittels präparativer HPLC gut isolieren. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, es konnten allerdings mehrere Milligramm der Verbindung erhalten werden.

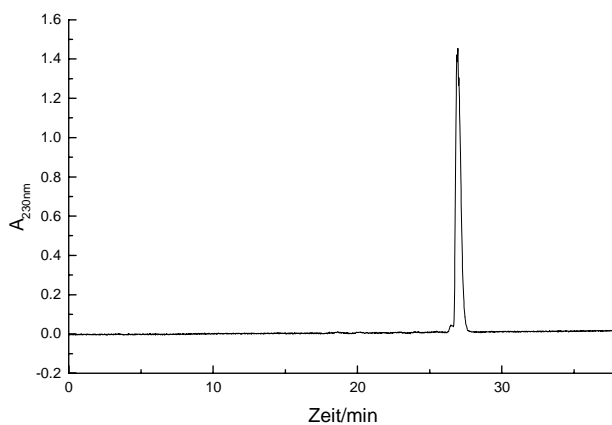


Abb. 7.46: RP-HPLC von Acridin- β A-CETP1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 26.95 min

Die Charakterisierung des Produktes mittels MALDI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1202.23 g/mol.

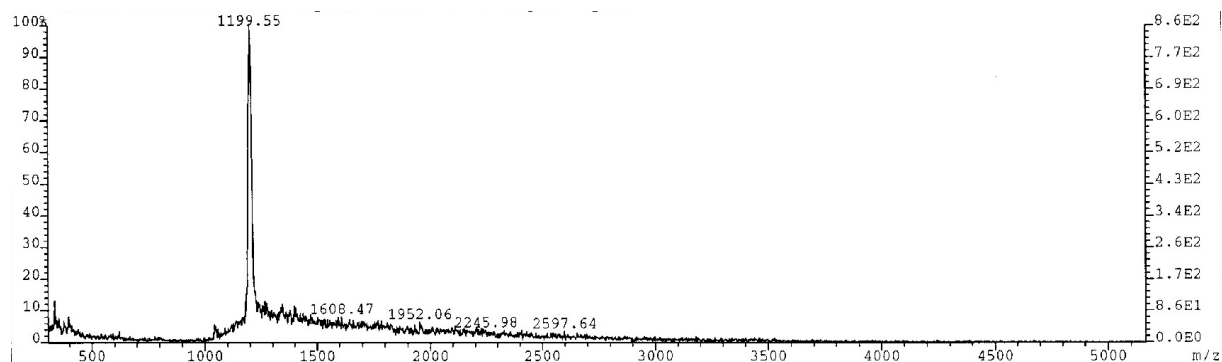


Abb. 7.47: MALDI-MS-Spektrum von Acridin- β A-CETP1

7 Experimenteller Teil

Die Aminosäureanalyse entspricht ebenfalls den Erwartungen. Das UV-Spektrum ist nachfolgend gegeben. Die Extinktionskoeffizienten betragen:

$$\epsilon_{359\text{nm}}: 8.077 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$$

$$\epsilon_{241\text{nm}}: 23.524 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$$

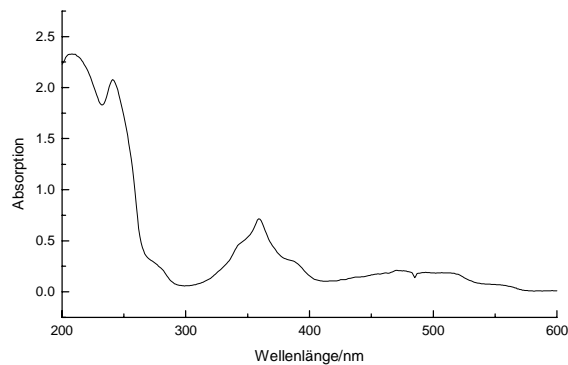
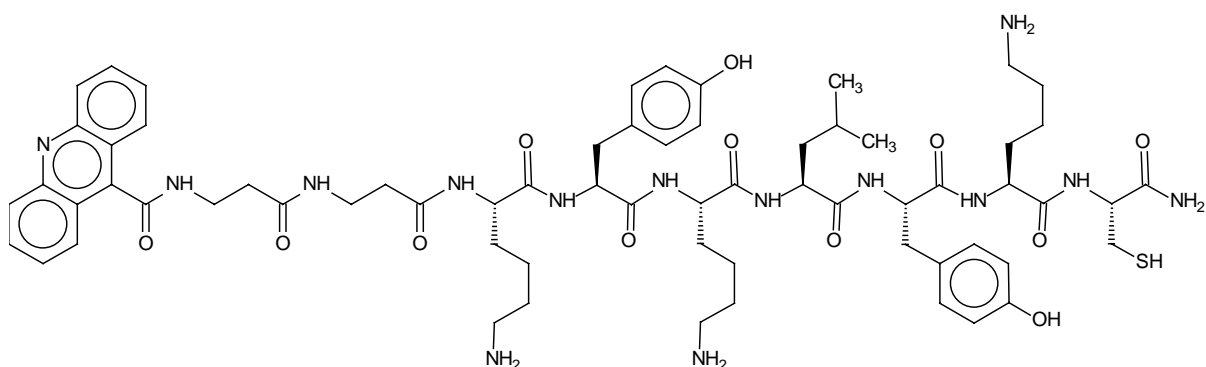


Abb. 7.48: UV-Spektrum von Acridin-βA-CETP1 (88 μmolar in H₂O, 22 °C)

7.3.14 Acridin-βA-βA-CETP1

Bei Acridin-βAβA-CETP1 handelt es sich um ein 7 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid, welches N-terminal über zwei β-Alanineinheiten mit einem Acridinmolekül über Säureamidbindungen derivatisiert wurde. Seine Primärstruktur ist formal:



Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet. Die β-Alanineinheiten wurden mit Doppelkupplungen an das Peptid angefügt.

7 Experimenteller Teil

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.2 g
Harzbelegung:	0.52 mmol/g
100% Ausbeute:	0.132 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Die Veresterung des harzgebundenen, Seitenketten-geschützten und Fmoc-entschützten Peptides mit Acridin, sowie die Abspaltreaktion wurde analog 7.3.13 durchgeführt. Das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht.

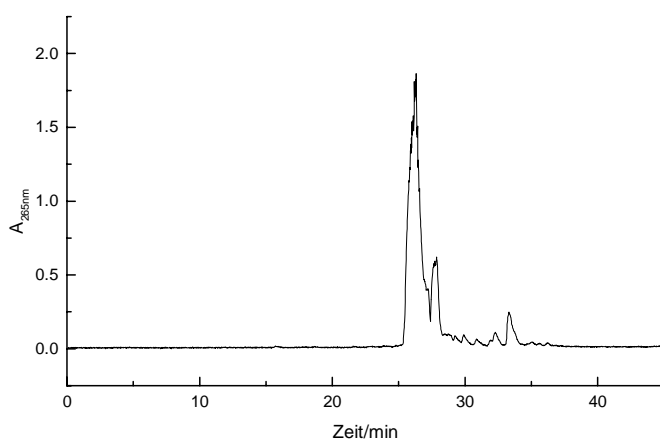


Abb. 7.49: RP-HPLC von Acridin- $\beta\beta\beta$ -CETP1, roh nach Entschützung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 26.27 min

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels präparativer HPLC sehr gut isolieren. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, es konnten allerdings mehrere Milligramm der Verbindung erhalten werden.

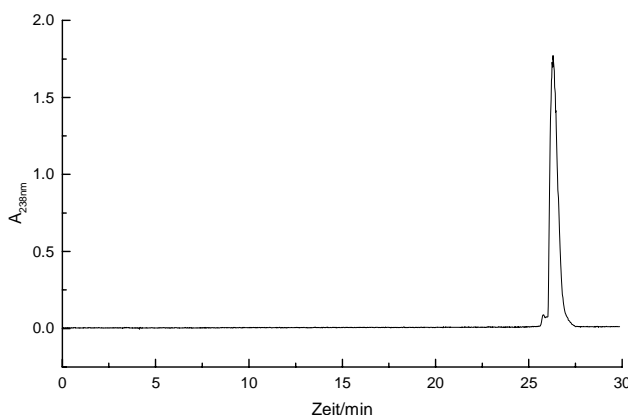


Abb. 7.50: RP-HPLC von Acridin- $\beta\beta\beta$ -CETP1, nach HPLC-Aufreinigung.
0-40% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 26.29 min

7 Experimenteller Teil

Die Charakterisierung des Produktes mittels MALDI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse beträgt 1273.23 g/mol. Das Signal um 1120 g/mol entspricht einer MALDI-MS-typischen Fragmentierung.

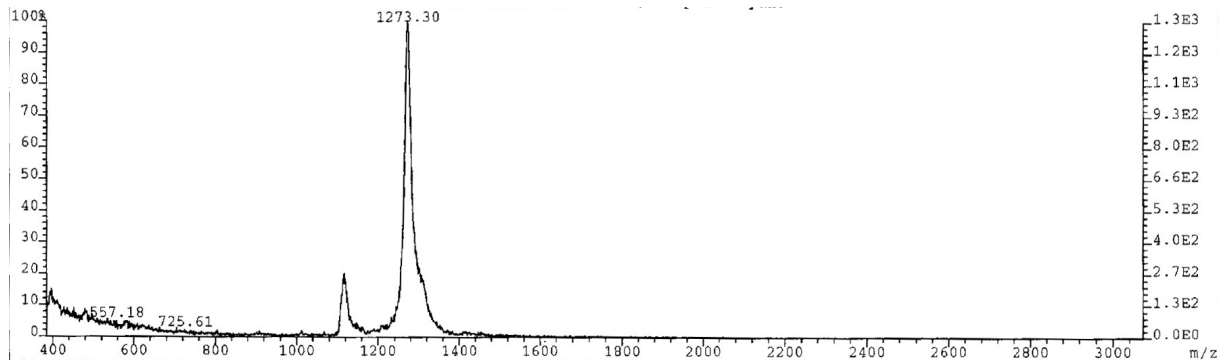


Abb. 7.51: MALDI-MS-Spektrum von Acridin- $\beta A\beta A$ -CETP1

Die Aminosäureanalyse entspricht ebenfalls den Erwartungen. Das UV-Spektrum ist nachfolgend gegeben. Die Extinktionskoeffizienten betragen:

$$\epsilon_{359\text{nm}}: 11.027 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$$

$$\epsilon_{241\text{nm}}: 29.271 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$$

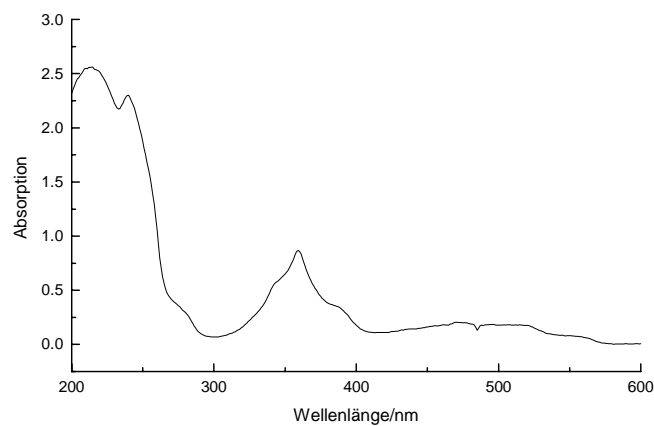


Abb. 7.52: UV-Spektrum von Acridin- $\beta A\beta A$ -CETP1 (79 μmolar in H_2O , 22 °C)

7.3.15 Peptide des Phage Displays

Da die Synthesen der Peptide TAR3, TAR4 und CETP2 analog durchgeführt wurden, werden sie im folgenden gemeinsam beschrieben.

Bei TAR3/TAR4/CETP2 handelt es sich um jeweils 7 Aminosäure lange, am C-Terminus amidierte Peptide, welche durch Phage Display Panning mit der Δ TAR-RNA bzw. CETP-RNA erhalten wurden. Die Sequenzen lauteten:

Biotin- β A β A-TAR3	Biotin-NH- β A ¹ β A- TPELPWH-CONH ₂
Ac-TAR3:	Ac-HN-T ¹ PELPWH-CONH ₂
Ac-TAR3C:	Ac-HN-T ¹ PELPWHC-CONH ₂
TAR3:	H ₂ N-T ¹ PELPWH-CONH ₂
Biotin- β A β A-TAR4	Biotin-NH- β A ¹ β A-FHSVQAL-CONH ₂
Ac-TAR4:	Ac-HN-F ¹ HSVQAL-CONH ₂
Ac-TAR4C:	Ac-HN-F ¹ HSVQALC-CONH ₂
Ac-CETP2C:	Ac-HN-H ¹ PALAGHC-CONH ₂

Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthesen an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.500 g
Harzbelegung:	0.55 mmol/g
Überschuß der Aminosäurederivate:	5-fach

Nach der automatisierten Synthese wurde der N-Terminus bei einigen Peptiden manuell acetyliert. Hiefür wurde das Harz in 10 mL DMF mit 1.906 μ L (1.39 g, 13.75 mmol, 50 eq.) Triethylamin und 260 μ L (0.28 g, 2.75 mmol, 10 eq.) Ac₂O versetzt und 1 h geschüttelt. Danach wurden die Reagenzien abfiltriert, das Harz 3x mit 10 mL DMF, 1x mit 10 mL Isopropanol und 1x mit 10 mL Diethylether gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die Biotineinheiten wurden manuell gekuppelt (in 7.3.5 beschrieben).

Nach der Synthese wurde die Strategie gewählt, die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen in einem Schritt zu vollziehen.

7 Experimenteller Teil

Hintergrund hierfür war die Minimierung der Arbeitsschritte und die daraus resultierende Zeitersparnis. Standardgemäß wurde eine Abspaltzeit von 3 h mit Reagenz „TIS“ gewählt:

Abspaltreagenz: Reagenz „TIS“
Abspaltdauer: 3 h
Eingesetzte Harzmenge: 250 mg
Menge an Abspalllösung: 12 ml

Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Alle Peptide wurden mittels präparativer RP-HPLC (Eurospher RP18) aufgereinigt. Die Masse und Reinheit der Produkte wurde mit ESI-MS und RP-HPLC bestätigt.

<i>Peptid</i>	<i>RP-HPLC Retentionszeit/min</i>	<i>Masse/g mol⁻¹ (berechnet)</i>	<i>Masse/g mol⁻¹ (gefunden)</i>	<i>Ausbeute/ %</i>
Biotin-βAβA-TAR3	18.12 (Gradient 3)	1246.45	1246.0	3
Ac-TAR3	31.19 (Gradient 1)	920.03	919.6	36
Ac-TAR3C	33.39 (Gradient 1)	1023.48	1022.9	48
TAR3	29.08 (Gradient 1)	878.00	877.6	8
Biotin-βAβA-TAR4	21.06 (Gradient 4)	1168.38	1168.0	4
Ac-TAR4	18.48 (Gradient 2)	841.96	841.6	46
Ac-TAR4C	32.58 (Gradient 1)	945.11	944.8	52
Ac-CETP2C	22.06 (Gradient 1)	845.98	845.8	70

HPLC-Gradienten:

Gradient 1: 0-40% ACN + 0.1% TFA 40min 100% 40min

Gradient 2: 0-40% ACN + 0.1% TFA 40min 100% 50min

Gradient 3: 20-60% ACN + 0.1% TFA 40min 100% 45min

Gradient 4: 10-50% ACN + 0.1% TFA 40min 100% 45min

7.3.16 TAR3g3p

Bei TAR3g3p handelt es sich um ein 30 Aminosäuren langes, am C-Terminus amidiertes Peptid. Die ersten 7 Aminosäurereste des N-Terminus entsprechen einer der im Phage Display mit der Δ TAR-RNA gefundenen Bindungssequenzen (TAR3). Der restliche Teil des Peptids stellt einen Ausschnitt (23 Aminosäurereste des N-Terminus) des g3p-Hüllproteins (3 Domänen-Protein mit 377 Aminosäurenresten) des verwendeten M13-Phagen dar. Auf der Phagenoberfläche liegt die Bindungssequenz am N-Terminus des g3p-Proteins vor. Der N-terminale Teil des g3p ist als ein 6-strängiges β -Band (β -sheet barrel) strukturiert [111]. Somit gibt das Peptid TAR3g3p die Umgebung von TAR3 auf dem Phagen wieder. Die Primärstruktur lautet:



Mit folgenden Ausgangsbedingungen wurde die Synthese an einem Peptid-Synthesizer gestartet:

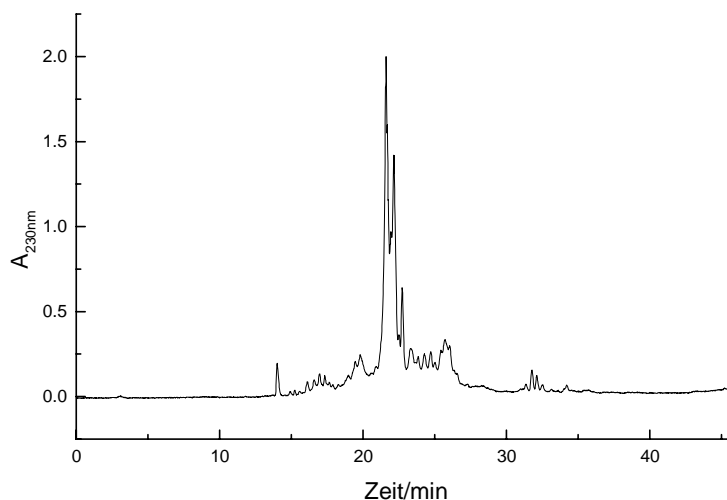
Polymerer Träger:	Rink Amid MBHA Harz
Menge des Harzes:	0.400 g
Harzbelegung:	0.54 mmol/g
100% Ausbeute:	0.701 g (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge)
Überschuß der Aminosäurederivate:	8-fach
Doppelte Kupplungsdauer:	60 min

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Abspaltreaktion ergab folgendes Ergebnis:

Abspaltreagenz:	Reagenz „TIS“
Abspaltdauer:	6 h
Eingesetzte Harzmenge:	400 mg
Menge an Abspalllösung:	20 ml

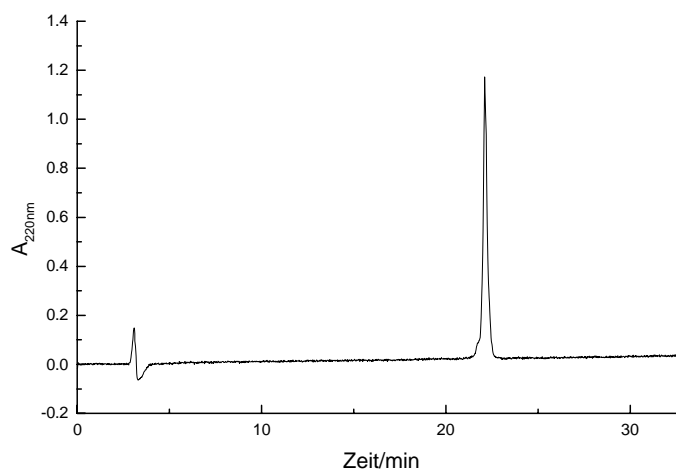
Durch Versetzen mit der 4-fachen Menge an MTBE wurde die Reaktion gestoppt und das Peptid ausgefällt. Nach viermaligen Waschen mit MTBE und Trocknen im Vakuum wurde

das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Nachfolgend aufgeführtes Chromatogramm bestätigt den erfolgreichen Verlauf der Synthese, wie der Abspaltreaktion.



*Abb. 7.53: RP-HPLC von TAR3g3p, roh nach Entschützung.
10-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 22.16 min*

Nach der Aufarbeitung des Rohproduktes ließ sich das Produkt mittels zweimaliger präparativer HPLC gut isolieren. Die erste der beiden Hauptfraktionen entspricht einer Fehlsequenz (-Threonin). Um diese besser abzutrennen, mußte zweimal HPLC gereinigt werden. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nur ein kleiner Teil des Rohprodukts aufgereinigt wurde.



*Abb. 7.54: RP-HPLC von TAR3g3p, nach HPLC-Aufreinigung.
10-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, Eurospher RP18, 22.11 min*

7 Experimenteller Teil

Die Charakterisierung des Produktes mittels ESI-MS bestätigt die Existenz der gewünschten Verbindung. Einige wenige Verunreinigungen konnten trotz zweifacher HPLC-Reinigung nicht vollständig entfernt werden. Die errechnete Molmasse beträgt 3186.41 g/mol.

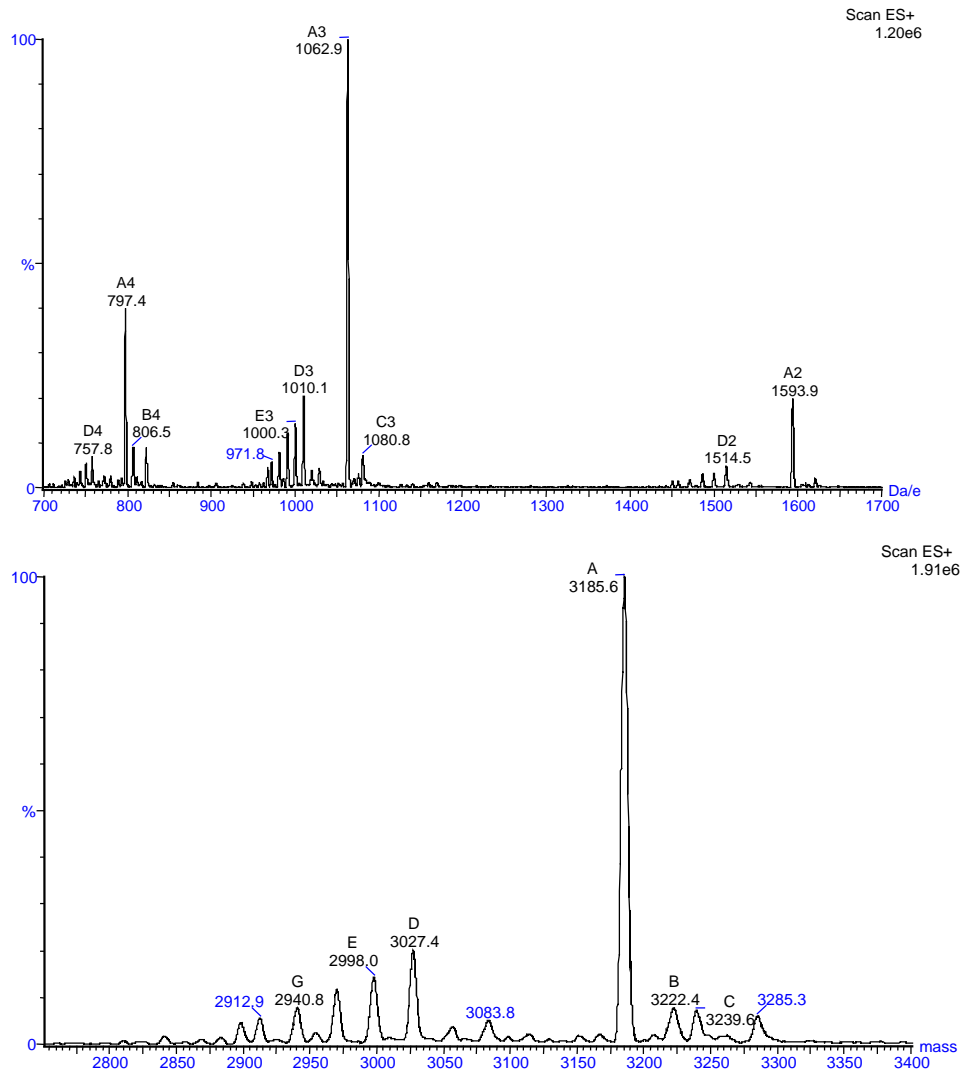


Abb. 7.55: ESI-MS-Spektrum von TAR3g3p

7.4 PEGylierung linearer Peptide

Die Derivatisierung ausgesuchter Peptide wurde mittels einer aus der Proteinderivatisierung bekannten Methode durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, daß sich selektiv die freie SH-Gruppe eines Cysteins an die Doppelbindung einer Maleinsäureimideinheit addiert. Formal lautet die Reaktionsgleichung:

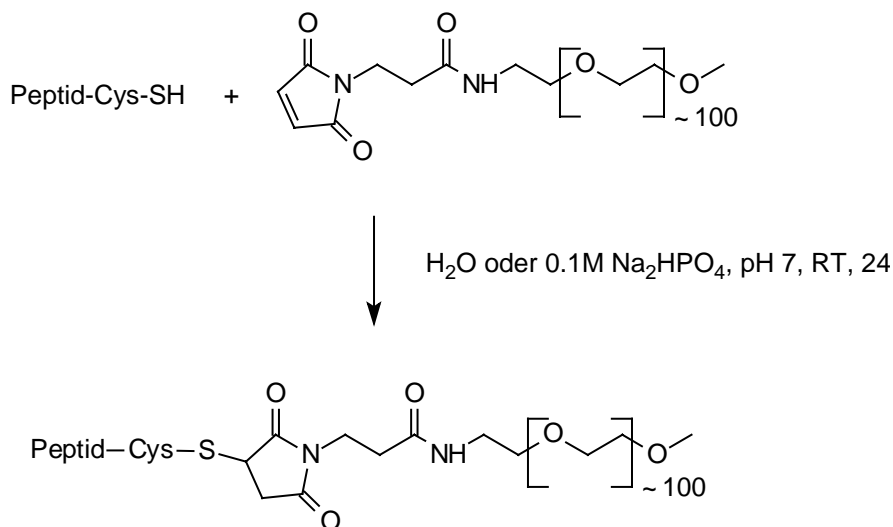


Abb. 7.56: Reaktionsgleichung der gewählten Methode zur PEGylierung von Peptiden

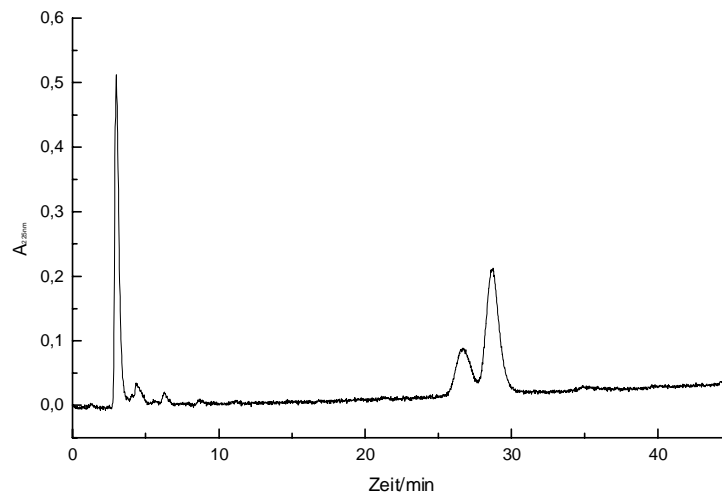
Diese Reaktion kann, wie in der Proteinchemie, mit seitenkettenentschützten Peptiden durchgeführt werden. Somit wurde die PEGylierung am Ende der Peptidsynthese am vollständig entschützten und aufgereinigten Peptid vorgenommen. Um den Überschuß (1.5 eq.) des Maleinsäureimid-PEG-Derivates (M-Mal-PEG) abzutrennen, wurde nach der PEGylierung noch einmal RP-HPLC-gereinigt (außer bei den Peptidbibliotheken).

Die PEG-Derivatisierung wurde bei jedem Peptid (mit Cys-Rest) analog durchgeführt. Es wurde jeweils folgender Ansatz gemacht:

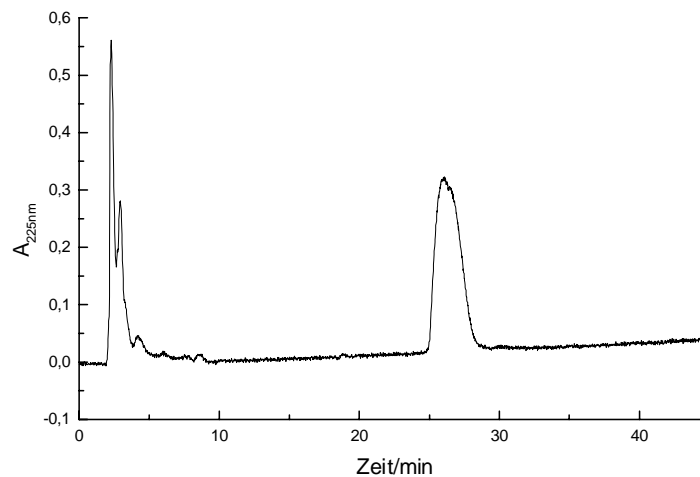
Peptid, (MW~1000 g/mol)	2 mg	(~2 µmol)
M-Mal-PEG, (MW~6000 g/mol)	20 mg	(~3 µmol)
Na ₂ HPO ₄ , 0.1 M, pH 7	1 mL	
Reaktionsdauer	24 h	

7 Experimenteller Teil

Die Mischung wird 24 h bei RT geschüttelt und anschließend aufgearbeitet. Der Umsatz ist meistens vollständig, es mußte jedoch mittels HPLC das Produkt Peptid-PEG-Derivat (Beispiel: Tat10-PEG, Retentionszeit 26.6 min) von überschüssigem M-Mal-PEG (Retentionszeit 28.7 min) abgetrennt werden.



*Abb. 7.57: RP-HPLC von Tat10-PEG, Rohprodukt
10-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, VYDAC RP4, 26 min*



*Abb. 7.58: RP-HPLC von Tat10-PEG, nach HPLC-Aufreinigung.
10-50% ACN + 0.1% TFA 40 min 100% 45 min, VYDAC RP4, 26 min*

Für Gel-shift Experimente wurden die HPLC-Fractionen gefriergetrocknet, in Wasser gelöst und mittels Aminosäureanalyse quantifiziert.

7.5 Synthesen der RNA-Oligonukleotide

7.5.1 Synthese der Δ TAR-RNA durch *in vitro* T7 RNA Transkription

Stammlösungen:

T7-Primer	: 149.5 μ M (31.7 OD ₂₆₀ /mL H ₂ O) ϵ_{260} [mmol·cm] = 185.01, 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3', Fa. Eurogentech, RP-HPLC gereinigt
Δ TAR Templat	: 113.0 μ M (56.0 OD ₂₆₀ /mL H ₂ O) ϵ_{260} [mmol·cm] = 439.41 5'-GCA GAG AGC TCC CAG GCT CAG ATC TGC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3', Fa. Eurogentech, RP-HPLC gereinigt
NTP's	: 100 mM, Fa. Boehringer Mannheim
10x Transkriptionspuffer	: 400 mM Tris·HCl, 10mM Spermidin·HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.2
10x Magnesiumchlorid	: 300 mM MgCl ₂
BSA	: 2% (20 mg/mL H ₂ O) Bovine Serum Albumin
PEG-8000	: 50% (500 mg/mL H ₂ O)
T7 RNA Polymerase	: EC 2.7.7.6 isoliert aus <i>E.coli</i> BL 21/pAR 1219, gereinigt mit DEAE Sepharose (~300000 U/mL)
Ladepuffer	: 8 M Harnstoff, pH 6.5, 0.025% Bromphenol Blau
Elutionspuffer	: 0.5 M Ammoniumacetat pH 7.0, 10 mM MgCl ₂ , 0.1% SDS

Während der Transkriptionsreaktion lagen folgende Konzentrationen vor:

T7-Primer	: 700 nM
Templat	: 600 nM
je NTP	: 4 mM
T7 RNA Polymerase	: ~25 U/ μ L
Tris·HCl	: 40 mM
MgCl ₂	: 30 mM
Spermidin·HCl	: 1 mM
BSA	: 0.02% (2 mg/mL H ₂ O)

PEG-8000 : 5% (50 mg/mL H₂O)
Triton X-100 : 0.01%

Durchführung:

Zum Aneeling der DNA-Stränge werden in ein 1.5 mL Polypropylen-Reaktionsgefäß 25 µL T7-Primer (3.5 nmol), 25 µL Templat (3 nmol), gevortext, zentrifugiert und in einem Heizblock für 3 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend läßt man auf Raumtemperatur abkühlen und stellt die Probe auf Eis.

Inzwischen pipettiert man in ein anderes Cap je 200 µL NTP-Lösung, 500 µL 10x Transkriptionspuffer, 500 µL 10x Magnesiumchlorid, 500 µL BSA, 800 µL PEG-8000 sowie 1825 µL Wasser. Die Mischung wird gevortext und der pH-Wert auf pH 8.2 eingestellt. In dieses Cap gibt man nun 50 µL des zuvor hergestellten DNA-Templats, 25 µL T7 RNA Polymerase und inkubiert das Gemisch für 45 min bei 37 °C. Nach Beenden der Reaktion mit Zugabe von 1000 µL 0.2 M EDTA, pH 8.0 wird die Reaktionsmischung mit 1 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (49.5:49.5:1) extrahiert und die org. Phase mit 500 µL Wasser nachextrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden mit 650 µL 3 M Natriumacetatlösung, pH 5.2 versetzt, gevortext und mit 20 mL gekühltem Ethanol gefällt. Nach Lagerung der Mischung über Nacht bei -20 °C wird der Niederschlag (1 h, 8500 g) abzentrifugiert.

Aufreinigung mittels PAGE:

Der Rückstand wird mit 500 µL Ladepuffer gelöst und mittels Gelelektrophorese (19% Polyacrylamidgel, 8 M Harnstoff, 1x TBE, 25 mA, 0.02x17x18cm, 420 V) gereinigt. Für die Aufreinigung eines Transkriptionsansatzes sind zwei Gele notwendig. Die entsprechende Bande wird mit UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Der Gelstreifen wird durch eine 2 mL-Spritze gedrückt und mit dem zweifachen Volumen an Elutionspuffer in einem mit einem Filtereinsatz versehenem Cap für 12 h geschüttelt. Die Flüssigkeit wird abzentrifugiert, und die Gelstücke noch einmal für 10 min mit 500 µL Elutionspuffer versetzt und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten RNA-Fraktionen werden mit Centicon-3000 Ultrafiltriermembranen oder Sephadex G-10 Gelfiltration aufkonzentriert bzw. entsalzt. Die Ausbeute beträgt 27 OD.

Aufreinigung mittels HPLC:

Der Rückstand wird in wenigen 100 μL Formamid/Wasser (1:1) gelöst und unmittelbar vor dem Einspritzen in die HPLC-Anlage für 5min auf 100 °C erhitzt. Es wurde eine Anionenaustausch-Säule verwendet (5 M Harnstoff, KCl-Gradient).

7.5.2 Synthese der 23mer CETP-mRNA durch *in vitro* T7 RNA Transkription

Stammlösungen:

Templat, top	: 149.5 μM (31.7 OD ₂₆₀ /mL H ₂ O) ϵ_{260} [mmol·cm] = 185.01, 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAG ATC TGA GCC TGG GAG CTC TCT GC-3', Fa. Eurogentech, RP- HPLC gereinigt
Templat, bottom	: 113.0 μM (56.0 OD ₂₆₀ /mL H ₂ O) ϵ_{260} [mmol·cm] = 439.41 5'-GCA GAG AGC TCC CAG GCT CAG ATC TGC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3', Fa. Eurogentech, RP-HPLC gereinigt
NTP's	: 100 mM, Fa. Roth
10x Transkriptionspuffer	: 400 mM Tris·HCl, 10 mM Spermindin·HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.2
10x Magnesiumchlorid	: 300 mM MgCl ₂
BSA	: 2% (20 mg/mL H ₂ O) Bovine Serum Albumin
PEG-8000	: 50% (500 mg/mL H ₂ O)
T7 RNA Polymerase	: EC 2.7.7.6 isoliert aus E. Coli BL 21/pAR 1219, gereinigt mit DEAE Sepharose (~300000 U/mL)
Ladepuffer	: 8 M Harnstoff, pH 6.5, 0.025% Bromphenol Blau
Elutionspuffer	: 0.5 M Ammoniumacetat pH 7.0, 10 mM MgCl ₂ , 0.1% SDS

Während der Transkriptionsreaktion lagen folgende Konzentrationen vor:

DNA Templat, 40mer ds	: 600 nM
je NTP	: 5 mM
T7 RNAPolymerase	: ~25 U/ μL
Tris·HCl	: 40 mM

7 Experimenteller Teil

MgCl ₂	: 37.5 mM
Spermidin·HCl	: 1mM
BSA	: 0.2% (2 mg/mL H ₂ O)
PEG-8000	: 5% (50 mg/mL H ₂ O)
Triton X-100	: 0.01%

Zum Annealing der DNA-Einzelstränge werden in ein 1.5 mL Polypropylen-Reaktionsgefäß je 25 µL (3 nmol) der beiden DNA-Einzelstränge gegeben, gevortext, zentrifugiert und in einem Heizblock für 3 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend läßt man auf Raumtemperatur abkühlen und stellt die Probe auf Eis.

Man pipettiert in ein 5 mL Polyethylen-Reaktionsgefäß je 250 µL NTP-Lösung, 500 µL 10x Transkriptionspuffer, 625 µL Magnesiumchlorid, 500 µL BSA, 800 µL PEG-8000, sowie 1500 µL Wasser. Die entstandene Mischung wird gevortext und der pH-Wert mit 1% KOH auf pH 8.2 eingestellt. In dieses Cap gibt man nun 50 µL der zuvor hergestellten, doppelsträngigen CETP-mRNA Templat-Lösung, 25 µL T7 RNA Polymerase, vortext und inkubiert das Gemisch für 45 min bei 37 °C. Nach Beenden der Reaktion durch Zugabe von 1000 µL 0.2 M EDTA, pH 8.0 wird die Reaktionsmischung mit 1 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (49.5:49.5:1) extrahiert und die org. Phase mit 1 mL Wasser nachextrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden mit 1/10 vol. 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) versetzt, gevortext und mit der 3-fachen Menge gekühltem Ethanol gefällt. Nach Lagerung der Mischung für 2 h bei -20 °C wird der Niederschlag abzentrifugiert (1 h, 8500 g) und in der Speedvac getrocknet.

Aufreinigung mittels PAGE:

Der Rückstand wird mit 500 µL Ladepuffer gelöst und mittels Gelelektrophorese (19% Polyacrylamidgel, 8 M Harnstoff, 1x TBE, 25 mA, 0.02x17x18cm, 420 V) gereinigt. Für die Aufreinigung eines Transkriptionsansatzes sind zwei Gele notwendig. Die entsprechende Bande wird mit UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Der Gelstreifen wird durch eine 2 mL-Spritze gedrückt und mit dem zweifachen Volumen an Elutionspuffer in einem mit einem Filtereinsatz versehenem Cap für 12 h geschüttelt. Die Flüssigkeit wird abzentrifugiert, und die Gelstücke noch einmal für 10 min mit 500 µL Elutionspuffer versetzt und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten RNA-Fraktionen werden mit Centicon-3000

Ultrafiltriermembranen oder Sephadex G-10 Gelfiltration aufkonzentriert bzw. entsalzt. Die Ausbeute beträgt 8 OD.

Aufreinigung mittels HPLC:

Der Rückstand wird in wenigen 100 µL Formamid/Wasser (1:1) gelöst und unmittelbar vor dem Einspritzen in die HPLC-Anlage für 5 min auf 100 °C erhitzt. Es wurde eine Anionenaustausch-Säule verwendet (5 M Harnstoff, KCl-Gradient). Die Säule mußte auf 40 °C temperiert werden.

7.5.3 Dephosphorylierung des 5'-Endes der 23mer CETP-mRNA

Stammlösungen:

23mer der CETP-mRNA	: 0.2 mM (0.08 OD/µL)
10x Dephosphorylierungspuffer	: 500 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5
Alkalische Phosphatase	: EC 3.1.3.1, aus Kälberdarm, 20 U/µL
EGTA	: 200 mM, pH 7

Während der Dephosphorylierung lagen folgende Konzentrationen vor:

23mer der CETP-mRNA	: 0.04 mM
Tris·HCl	: 50 mM
EDTA	: 0.1 mM
Alkalische Phosphatase	: 0.7 U/µL

In ein 1.5 mL Polyethylen-Reaktionsgefäß pipettiert man 49 µL Wasser, 7 µL 10x Dephosphorylierungspuffer, 11.5 µL RNA (2.5 nmol) und 2.5 µL alkalische Phosphatase (50 U). Das Gemisch wird gevortext, zentrifugiert und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend versetzt man die Lösung mit 7 µL EGTA und heizt diese für 10 min auf 65 °C. Zur vollständigen Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase wird die Probe noch mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die wässrigen Phasen nach Zugabe von Natriumacetat auf 0.3 M mit Ethanol gefällt. Nach Auflösen des Pellets nach Zentrifugation (1 h, 8500 g) in Wasser wird die Ausbeute UV-spektroskopisch bestimmt und beträgt 0.83 OD.

7.5.4 Phosphorylierung des 5'-OH der 23mer CETP-mRNA mit [γ - 32 P]-ATP

Stammlösungen:

5'-OH 23mer der CETP-mRNA	: 0.06 mM (0.013 OD/ μ L)
10x Phosphorylierungspuffer	: 500 mM Tris·HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, pH 8.2
5'-[γ - 32 P]-ATP·NEt ₃	: 10 mCi/mL (3000 Ci/mmol)
Polynucleotid Kinase	: EC 2.7.1.78, aus <i>E.coli</i> E. D. pFDX, 10 U/ μ L

Während der Phosphorylierung lagen folgende Konzentrationen vor:

23mer der CETP-mRNA	: 2.4 μ M
Tris·HCl	: 50 mM
MgCl ₂	: 10 mM
EDTA	: 0.1 mM
Dithiothreitol	: 5 mM
Spermidin	: 0.1 mM
5'-[γ - 32 P]-ATP·NEt ₃	: 1.2 mCi/mL
Polynucleotid Kinase	: 0.6 U/ μ L

In ein 1.5 mL Polyethylen-Reaktionsgefäß pipettiert man 1 μ L 5'-OH-RNA-Lsg., 3 μ L Polynucleotid-Kinase, 5 μ L 10x Phosphorylierungspuffer und 35 μ L Wasser. Die Mischung wird gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend setzt man der am Boden des Reaktionsgefäßes befindlichen Flüssigkeit 6 μ L 5'-[γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol) hinzu und inkubiert für 1 h bei 37 °C. Die Aufarbeitung beschränkt sich auf Gelfiltration des gesamten Reaktionsgemisches mit einer G-25 Sephadex Säule (Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim). Die erste radioaktive Fraktion wird als 5'- 32 P-RNA Stammlösung verwendet.

8. Anhang

8.1 Akademische Lehrer

Universität/GHS Essen:

Priv.-Doz. Dr. Boese,

Prof. Dr. Klärner,

Prof. Dr. Scharder,

Prof. Dr. Schmid,

Prof. Dr. Sustmann,

Prof. Dr. Stampa,

Prof. Dr. Staude

State University of New York at Stony Brook, Long Island/USA

Prof. Dr. le Noble

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Prof. Dr. Egert

Prof. Dr. Griesinger

8.2 Verwendete Geräte und Materialien

Liste der verwendeten Geräte

CD-Spektrometer	Jasco J-701
Gelelektrophorese	Biometra Multigel 8x11x0,1 Biometra Maxigel 16x16x0,1 /0,2 Hoefler SE 600 Series
HPLC	Merck-Hitachi L-6200 mit Diodenarray D-3000
Lyophilisator	Christ Alpha2-4
NMR-Spektrometer	Bruker DMX600
Peptidsynthesizer	Millipore Pepsynth 9050
Phosphorimager	Molecular Dynamics SI
Pipetten	Eppendorf Reference
SpeedVac	Jouan RC10.22
Transilluminator	Biometra T1
UV-Lampe	Heraeus Fluotest 6W 254nm
UV-Spektrometer	Perkin Elmer Lamda 16 mit Temperatureinheit PTP1
Zentrifugen	Heraeus Biofuge 13 Heraeus Biofuge Primo Hettich Universal

Chemikalien

Harze zur Peptidsynthese	NovaBiochem
Fmoc- und Seitenschutzgruppe geschützte Aminosäurederivate	NovaBiochem
Biotin	Fluka
HOBt	NovaBiochem
DMF	Merck, zur Analyse
DIC	Merck, zur Synthese
Piperidin	Merck, zur Synthese
TFA	Acros

EDT	Fluka
Phenol	Fluka
Thioanisol	Sigma
TIS	Fluka
diverse anorg. Salze	Fluka, „Biochemika“
BSA	Sigma, Fraktion V
EDTA	Fluka, „Biochemika“
Phenol	Fluka, „Biochemika“
NTP's	Boehringer Mannheim
TSPA	Merck
D ₂ O	Deutero GmbH
FITC-Streptavidin-Konjugat	ImmunoTec, Marseille, Frankreich
RPMI 1640	Seromed
 Enzyme	
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
Dnase I, Rnase frei	Boehringer Mannheim
Klenow-Fragment	selbst
Polynukleotid Kinase	Boehringer Mannheim
T7-RNA-Polymerase	selbst
 Säulen und Säulenmaterialien	
Nucleogen DEAE	5x125mm Macherey und Nagel
Nucleogen DEAE	10x125mm Macherey und Nagel
P10 Entsalzer-Säulen	Pharmacia
Sephadex G15	Pharmacia
Vydac Oligonukleotide	Vydac
Eurospher RP18	Eurospher, Fa. Knauer
Vydac RP4	Vydac
Ficoll-Dichtegeradient	Seromed

Zusammensetzung der verwendeten DNA/RNA-Polyacrylamid-Gele

Benötigte Stammlösungen:

40% Acrylamidlösung

380 g Acrylamid
20 g Bisacrylamid
auf 500 mL mit Wasser (entsalzt) auffüllen

5x TBE-Puffer

135 g Tris
69 g Borsäure
9.2 g Na₂EDTA
auf 2500mL mit Wasser (entsalzt) auffüllen

1x TBE-Puffer

1:5 Verdünnung von 5x TBE-Puffer

TEMED *N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin*

10% APS *1 g Ammoniumperoxydisulfa auf 10 ml H₂O auffüllen*

Zusammensetzung der zum Gebrauch fertigen Lösungen:

10% natives PAGE

19% denaturierendes PAGE (8 M Harnstoff)

20% natives PAGE

Vorschrift zum Gießen

für ein 10x8x0,1cm Gel werden 10 ml der entsprechenden Gellösung abgenommen. Die Polymerisation wird mit 100 µl 10% APS und 10µl TEMED gestartet. Die Lösung wird kurz gevortext und zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Anschließend wird der Kamm eingesteckt. Nach 30-45 min ist die Polymerisation soweit fortgeschritten, daß das Gel verwendet werden kann.

Folgende Probenpuffer finden Verwendung:

für Nativgele:

5x Nativprobenpuffer

aufgefüllt mit H₂O

für denaturierende Gele:

2x Harnstoffprobenpuffer

8 M Harnstoff
0,25% Bromphenolblau
aufgefüllt mit H₂O

Je nach Problem wurde wahlweise der eine oder andere Probenpuffer verwendet. Gegebenfalls wurden die Proben vor Auftragen auf das Gel zur Vervollständigung der Denaturierung 3 min bei 100 °C aufgekocht.

für native Gele:

2x Nativgelprobenpuffer

100 mM Tris·HCl, pH 7.5
140 mM NaCl
2 mM EDTA
2 mM DTT
0.02% NP-40
20% Glycerin

zur Gelelution:

Oligonukleotid Elutionspuffer:

0.1% SDS
0.5 M Ammoniumacetat
10 mM Magnesiumchlorid

zur Peptidsynthese:

Magic mixture:

DMF:NMP:DCM = 1:1:1
1% Triton X-100
2 M Ethylencarbonat

zum Phage Display:

TBST:

50 mM Tris:HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

0.1% Tween

für die physiologischen Tests:

PBS:

150 mM Kaliumphosphat, pH 7.2

150mM NaCl

Makrophagen-Medium:

500 mL RPMI 1640 (Seromed)

4% huAB Serum

2% Glutamin

1% Pen/Strep (Penicillin, Streptomycin)

1% Pyruvat

1% nicht-essentielle Aminosäuren

0.04% Vitamine

8.3 Liste der synthetisierten NMR-Proben

Bau1: CETP-RNA mit CETP1 (KYKLYKC-NH₂) titriert

Probenvolumen	250 µL	
CETP-RNA	0.4 mM	(gelelektrophoretisch aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	
D ₂ O	10%	
pH	6.6	

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid CETP1 titriert (0, 0.125, 0.25, 0.325, 0.5, 0.625, 0.75, 1, 1.25 eq.). Ab ca. 0.75 eq. Peptid begann die RNA/Peptid auszufallen (280 K).

BAU2: CETP-RNA mit CETP1 (KKLRC-NH₂) titriert

Probenvolumen	250 µL	
CETP-RNA	0.37 mM	(gelelektrophoretisch aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	
D ₂ O	10%	
pH	6.7	

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid KKLRC-NH₂ titriert (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5 eq.). Ab ca. 2.5 eq. Peptid begann die RNA/Peptid auszufallen (280 K). Dieser Niederschlag löst sich in der Wärme wieder. Das Peptid würde aus der Peptidbibliothek LibKK entnommen und nicht extra synthetisiert.

Bau3: CETP1 (KYKLYKC-NH₂) als Referenz

Probenvolumen	250 µL	
KYKLYKC-NH ₂	0.5 mM	
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	

D ₂ O	10%
pH	6.7

Diese NMR-Probe wurde zu Vergleichszwecken der Peptidsignale (mit/ohne RNA) hergestellt.

Bau4: KKLRC-NH₂ als Referenz

Probenvolumen	250 µL
KKLRC-NH ₂	5.6 mM
Kaliumphosphat	10 mM
Natriumchlorid	100 mM
D ₂ O	10%
pH	6.7

Diese NMR-Probe wurde zu Vergleichszwecken der Peptidsignale (mit/ohne RNA) hergestellt.

Bau5: CETP-RNA als Referenz

Probenvolumen	250 µL
CETP-RNA	0.6 mM (HPLC aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM
Natriumchlorid	100 mM
TSPA	1 mM
D ₂ O	10%
pH	6.7

Bau6: CETP-RNA

Probenvolumen	250 µL
CETP-RNA	1 mM (HPLC aufgereinigt)

Kaliumphosphat	10 mM
Natriumchlorid	100 mM
TSPA	1 mM
D ₂ O	10%
pH	6.6

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid CETP1 titriert (0, 0.25, 0.5, 0.625, 1eq.). Ab ca. 0.75 eq. Peptid begann die RNA/Peptid auszufallen (280 K).

Bau7: CETP1 (KYKLYKC-NH₂) als Referenz

Probenvolumen	250 µL
KYKLYKC-NH ₂	0.5 mM
Kaliumphosphat	10 mM
Natriumchlorid	100 mM
TSPA	0.1 mM
D ₂ O	10%
pH	6.7

Diese NMR-Probe wurde zu Vergleichszwecken der Peptidsignale (mit/ohne RNA) hergestellt.

Bau8: CETP-RNA (RNA-Schmelzversuch)

Probenvolumen	250 µL
CETP-RNA	1 mM (gelelektrophoretisch aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM
Natriumchlorid	100 mM
D ₂ O	10%
pH	6.6

Mit dieser Probe wurde im NMR-Spektrometer eine Hitzedenaturierung/Renaturierung durchgeführt und dabei besonders der Iminoprotonenbereich untersucht.

Bau9: Δ TAR-RNA

Probenvolumen	290 μ L	
CETP-RNA	0.4 mM	(HPLC aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	
TSPA	0.1 mM	
D ₂ O	10%	
pH	6.3	

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid Ac-TAR3 titriert (0, 0.5, 1eq.).

Bau10: Δ TAR-RNA

Probenvolumen	280 μ L	
CETP-RNA	0.3 mM	(HPLC aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	
TSPA	0.1 mM	
D ₂ O	10%	
pH	6.3	

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid Ac-TAR4 titriert (0, 0.5, 1eq.).

Bau11: Δ TAR-RNA

Probenvolumen	280 μ L	
CETP-RNA	0.3 mM	(HPLC aufgereinigt)
Kaliumphosphat	10 mM	
Natriumchlorid	100 mM	
TSPA	0.1 mM	
D ₂ O	10%	
pH	6.2	

Diese NMR-Probe wurde mit dem Peptid TAR3 titriert (0, 0.5, 1eq.).

8.4 Literaturverzeichnis

- [1] N. D. Pearson, C. D. Prescott, *Chem. Biol.*, Vol. **4**, No. **6** (1997), 409-414.
- [1a] A. Giovannageli, C. Helene, *Antisense & Nucleic Acid Development*, **7** (1997), 413-421.
- [1b] S. Neidle, *Anti-Cancer Drug Design*, **12** (1997), 433-442.
- [2] J. F. Milligan, O. C. Uhlenbeck, *Method. Enzymol.*, **180** (1989), 51.
- [3] C. Richter, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt, (1996).
- [4] K. S. Long, D. M. Crothers, *Biochemistry*, **34** (1995), 8885.
- [5] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, "Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen", 4. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (1991).
- [6] E. Mutschler, "Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie", 6. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (1991).
- [7] G. Zubay, W. Parson, D. Vance, "Principles of Biochemistry", Dubuque, Melbourne, Oxford, Wm. C. Brown Communications, Inc. (1995).
- [8] H. Lüllmann, K. Mohr, A. Ziegler, "Taschenbuch der Pharmakologie", Stuttgart, New York, G. Thieme Verlag (1994).
- [9] M. Hanefeld, "Fettstoffwechselstörung", 2. Auflage, Jena, Stuttgart, G. Fischer Verlag (1995).
- [10] L. Stryer, "Biochemie", Heidelberg, Berlin, New York, Spektrum akad. Verlag (1991).
- [11] D. Drayna, A. Jarnagin, J. McLean, W. Henzel, W. Kohr, C. Fielding, R. Lawn, *Nature*, Nr. **18**, Vol. **327** (1987), 632-634.
- [12] C. Hessler, T. Swenson, A. Tall, *J. Biol. Chem.*, Nr. **18**, Vol. **262** (1987), 2275-2282.
- [13] E. Quinet, T. Yang, C. Marinos a. Tall, *J. Biol. Chem.*, Nr. **23**, Vol. **268** (1993), 16891-16894.
- [14] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.*, **253** (1995), 313-332.
- [15] I. Choudhury, J. Wang, A. B. Rabson, S. Stein, S. Pooyan, M. J. Leibowitz, *J. ACQ. IMMUN. DEF. SYND.*, **17** (1998), 104-111.
- [16] B. R. Bloom; *Science*, **272** (1996), 1888.
- [17] R. C. Gallo; *Spektrum der Wissenschaft*, **03/87** (1987), 82.
- [18] W. A. Haseltine, F. Wong-Staal; *Spektrum der Wissenschaft*, **12/88** (1988), 58.
- [19] M. G. Koch; AIDS, Spektrum-d.-Wiss.-Verl.-Ges., Heidelberg (1989).
- [20] E. Freed, R. Risser; *B. I. Pasteur*, **88** (1990), 73.

- [21] J. P. Moore, B. A. Jameson, R. A. Weiss, Q. J. Sattentau; *Viral Fusion Mechan.*, CRC Press (1993), 230.
- [22] G. Myers, R. Lenroot; *AIDS Res. Hum. Retrov.*, **8** (1992), 1459.
- [23] C. K. Leonard et. al.; *J. Biol. Chem.*, **265** (1990), 10373.
- [24] H. Geyer, C. Holschbach, G. Hunsmann, J. Schneider; *J. Biol. Chem.*, **263** (1988), 11760.
- [25] T. Mizuochi et. al.; *Biochem. J.*, **254** (1988), 599.
- [26] J. Goudsmit et. al.; *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85** (1988), 4478.
- [27] K. Javaherian, A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. Profy, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, T. J. Matthews; *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86** (1989), 6768.
- [28] C. F. Scott Jr., S. Silver, A. T. Profy, S. D. Putney, A. Langlois, K. Weinhold, J. E. Robinson; *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87** (1990), 8597.
- [29] J. P. Moore, P. L. Nara; *AIDS*, **5** (1991), 21.
- [30] W. C. Greene; *Spektrum d. Wiss.*, **SPEZIAL 2**, 57.
- [31] W. C. Greene; *Spektrum d. Wiss.*, **SPEZIAL 2**, 62.
- [32] P. J. Maddon, A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, R. Axel; *Cell*, **47** (1986), 333.
- [33] P. A. Ashorn, E. A. Berger, B. J. Moss; *J. Virol.*, **64** (1990), 2149.
- [34] D. Dedera, L. Ratner; *J. Virol.*, **65** (1991), 6129.
- [35] J. Binley, J. P. Moore; *Nature*, **387** (1997), 346.
- [36] C. M. Farnet, W. A. Haseltine; *J. Virol.*, **65** (1991), 1910.
- [37] S. Schwartz, B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, G. N. Pavlakis; *J. Virol.*, **64** (1990), 2519.
- [38] S. Hoglund, L.-G. Ofverstedt, A. Nilsson, P. Lundquist, H. Gelderblom, M. Ozel, U. Skoglund; *AIDS Res. Hum. Retrov.*, **8** (1992), 1.
- [39] M. A. Nowak, A. J. McMichael; *Spektrum der Wissenschaft*, **11/95** (1995), 52.
- [40] J. H. Condra, W. A. Schleif, O. M. Blahy, L. J. Gabryelski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, D. Titus, T. Yang, H. Tepler, K. E. Squires, P. J. Deutsch, E. A. Emini; *Nature*, **374** (1995), 569.
- [41] A. S. Perelson, P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, D. D. Ho; *Nature*, **387** (1997), 188.
- [42] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **35** (1902), 1095.

- [43] R. B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963), 2149.
- [44] E. Bayer; *Angew. Chem.*, **103** (1991), 117.
- [45] G. B. Fields, R. L. Noble; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **35** (1990), 161.
- [46] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer; *Tetrahedron. Lett.*, **30** (1989), 3943.
- [47] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotiu, W. Schäfer, Y. Wenqing; *Tetrahedron. Lett.*, **30** (1989), 3947.
- [48] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **37** (1991), 513.
- [49] N. Koch, S. Brandtner, E. Lichte, D. Gatos, K. Barlos, C. Griesinger; *Peptides 1992*, 852, ESCOM, Leiden.
- [50] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **37** (1991), 513.
- [51] T. Curtius; *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **35** (1902), 3226.
- [52] E. Wunsch, G. Wendleberger; *Chem. Ber.*, **100** (1967), 160.
- [53] J. Meienhofer; *The Peptides*, Vol. **1**, Chap. **4**, Academic Press, London (1979).
- [54] M. Bodanszky, *The Peptides*, Vol. **1**, Chap. **3**, Academic Press, London (1979).
- [55] D. H. Rich, J. Singh; *The Peptides*, Vol. **1**, Chap. **5**, Academic Press, London (1979).
- [56] J. S. Fruton; *Advances in Enzymology*, Vol. **53** (1982), 239, New York, Wiley.
- [57] W. König, R. Geiger; *Chem. Ber.*, **103** (1970), 788, 2024, 2034.
- [58] L. A. Carpino; *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993), 4397.
- [59] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen; *Tetrahedron. Lett.*, **30** (1989), 1927.
- [60] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve; *Tetrahedron. Lett.*, **14** (1975), 1219.
- [61] K. Barlos, D. Papaionnu, S. Patrianakou, T. Tsegenidis; *Liebigs Ann.*, (1986), 1950.
- [62] G. W. Anderson, A. C. McGregor; *J. Am. Chem. Soc.*, **79** (1957), 6180.
- [63] L. A. Carpino, G. Y. Han; *J. Am. Chem. Soc.*, **92** (1970), 5748.
- [64] D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **36** (1990), 255.
- [65] E. T. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook; *Anal. Biochem.*, **43** (1970), 595.
- [66] Karlson, „Biochemie für Mediziner“, Stuttgart, New York, G. Thieme Verlag ().
- [67] G. B. Fields, R. L. Noble; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **35** (1990), 161.
- [68] J. Jones; „The Chemical Synthesis of Peptides“, Clarendon Press, Oxford (1991), 62.
- [69] M. Bodanszky, J. Martinez; *Synthesis*, **5** (1981), 333.

- [70] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger; *Angew. Chem.*, **104** (1992), 375.
- [71] M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moos; *Org. Med. Chem. Letts.*, **3** (1993), 387.
- [72] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon; *J. Med. Chem.*, **37** (1994), 1233.
- [73] J. K. Scott, G. P. Smith; *Science*, **249** (1990), 386.
- [74] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó; *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **37** (1991), 487.
- [75] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp; *Nature*, **354** (1991), 82.
- [76] K. S. Lam, V. J. Hruby, M. Lebl, R. J. Knapp, W. M. Kazmierski, E. M. Hersh, S. E. Salmon; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3** (1993), 419.
- [77] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science*, **228** (1990), 386-90.
- [78] G. P. Smith, *Science*, **228** (1985), 1315-17.
- [79] S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87** (1990), 6378-82.
- [80] J. J. Devlin, L.C. Panganiban, P.E. Devlin, *Science* **249** (1990), 306-12.
- [81] H. B. Lowman, *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, **26** (1997), 401-24.
- [82] F. Felici, L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, G. Cesareni, *J. Mol. Biol.*, **222** (1991), 301-10.
- [83] J. Greenwood, A. E. Willis, R. N. Perham, *J. Mol. Biol.*, **220** (1991), 821-27.
- [84] S. D. Yanofski, D. N. Baldwin, H. J. Butler, F. R. Holden, J. W. Jacobs, et al., *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93** (1996), 7381-86.
- [85] R. W. Barrett, S. E. Cwirla, M. S. Ackerman, A. M. Olson, E. A. Peters, W. J. Dower, *Anal. Biochem.*, **204** (1992), 357-64.
- [86] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Mol. Immunol.*, **23** (1986), 709-15.
- [87] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick, P.G. Schoofs, *J. Immunol. Methods*, **102** (1987), 259-74.
- [88] N. C. Wrighton, F. X. Farrell, R. Chang, A. K. Kashyap, F. P. Barbone, *Science*, **273** (1996), 458-63.
- [89] J. Doorbar, G. Winter, *J. Mol. Biol.*, **244** (1994), 361-69.
- [90] R. J. Goodson, M. V. Doyle, S. E. Kaufman, S. Rosenberg, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91** (1994), 7129-33.

- [91] K. T. O'Neil, R.H. Hoess, S. A. Jackson, N. S. Ramachandran, S. A. Mousa, W. F. DeGrado., *Proteins*, **14** (1992), 509-15.
- [92] H. B.Lowman, J. A. Wells, *Methods Comp. Methods Enzymol.*, **3** (1991), 205-16.
- [93] N. B. Adey, A. H. Mataragnon, J. E. Rider, J. M. Carter, B. K. Kay, *Gene*, **156** (1995), 27-31.
- [94] L. B. Giebel, R. T. Cass, D. L. Miligan, D. C. Young, R. Arze, C. R. Johnson, *Biochemistry*, **34** (1995), 15430-35.
- [95] M. A. McLafferty, R. B. Kent, R. C. Ladner, W. Markland, *Gene*, **128** (1993), 29-36.
- [96] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, L. D. Thompson, *Biochemistry*, **31** (1992), 9350-54.
- [97] B. Li, L. Y. K. Tom, D. Oare, R. Yen, W. J. Fairbrother, et al., *Science*, **270** (1995), 197-201.
- [98] New England Biolabs. 1998/99 Katalog.
- [99] New England Biolabs. 1998. Katalog #8100. Ph.D.-7 . Instruction manual.
- [100] C. Kao, M. Zheng, S. Rüdissler, *RNA*, **5** (1999) 1268-72.
- [101] J. R. Wyatt, M. Chastain, J. D. Puglisi, *Biotechniques*, Vol. **11**, No. **6** (1991), 764-769.
- [102] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acid Res.*, Vol. **15**, Nr. **6** (1987), 8783-99.
- [103] P. J. Romaniuk, O. C. Uhlenbeck, *Method. Enzymol.*, **100** (1983), 52-62.
- [104] M. Chastain, I. Tinoco Jr., *Prog. Nucleic. Acid Re.*, **41** (1991), 131-177.
- [105] M. Wu, J. McDowell, D. Turner, *Biochemistry*, **34** (1995), 3204-3211.
- [106] J. Lucia, R. Kierzek, D. Turner, *Biochemistry*, **30** (1991), 8242-8251.
- [107] J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science*, **257** (1992), 76-80.
- [108] J. Brigidou, C. Legrand, J. Méry, A. Rabié, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, Vol. **214**, Nr. **2** (1995), 685-693.
- [109] R. Andreesen, J. Picht, G. W. Lohr, *Journal Immunol. Methods*, **56** (1983), 295-304.
- [110] B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science*, **252** (1991), 1167-1171.
- [111] D. A. Marvin, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **8** (1998), 150-158.

Lebenslauf

Personalien

Name: Michael Baumann
Geburtsdatum: 23. Februar 1971
Geburtsort: Düsseldorf
Nationalität: deutsch

Ausbildung

1977-1981 Grundschule in Velbert-Langenberg
1981-1990 Neusprachliches Gymnasium in Velbert-Langenberg, Abschluß: Abitur
1990-1991 Zivildienst
10/91 Beginn des Diplom-Studienganges Chemie an der Universität/GHS Essen
11/93 Vordiplom
1993-1995 Hauptstudium: 4. Hauptfach: Technische Chemie, Nebenfach: Biochemie
Vertiefungsfach: Organische Chemie (an der SUNY Stony Brook, Long
Island/USA)
7/94-9/94 Praktikum im Bereich Verfahrensentwicklung/Feinchemikalien bei der
Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim/Rhein
1/96-7/96 Diplomarbeit bei Prof. Dr. F.-G. Klärner am Inst. f. Org. Chemie der
Universität/GHS Essen, "Synthese und Eigenschaften einer mit Elektronen-
Donatoren substituierten molekularen Pinzette"
8/96 Diplom
11/96 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. C. Griesinger am Inst. f. Org. Chemie
der Universität Frankfurt, "Kombinatorische Synthese niedermolekularer
RNA-Liganden"
11/96-10/99 Stipendiat des DFG -Graduiertenkollegs "Chemische und biologische
Synthese von Wirkstoffen" der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den 19.6.2000