

*Einsatz nativer Proteasen zur stereoselektiven
Synthese von L- und D- konfigurierten Proteinen*



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Biochemiker Andreas Pech
geboren am: 26.06.1977 in Lauchhammer

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Bordusa
2. Gutachter: PD Dr. Ralph Golbik
3. Gutachter: Prof. Dr. Christian Becker

Tag der mündlichen Verteidigung: 21.04.2011

**„Der höchste Lohn für unsere Bemühungen
ist nicht das, was wir dafür bekommen,
sondern das, was wir dadurch werden.“**

John Ruskin (1819-1900)

**Meinen Eltern und
Großeltern**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Peptide und Proteine	1
1.2.	Synthese von Peptiden und Proteinen	3
1.2.1.	Die Entwicklung der Peptidchemie	3
1.2.2.	Peptidsynthese in Lösung	6
1.2.3.	Peptidsynthese an der festen Phase	7
1.2.4.	Chemische Verknüpfung von Peptidfragmenten	9
1.2.5.	Enzymatische Verknüpfung von Peptidfragmenten	14
1.3.	Clostripain	19
1.4.	Synthese von all-D-Proteinen	20
1.5.	Spiegelmere® - spiegelbildliche Aptamere	21
1.6.	<i>High-mobility-group</i> -Proteine und HMGA 1b	23
1.7.	Alkalische D-spezifische Peptidase	24
1.8.	Peptidylprolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen und <i>E. coli</i> Parvulin 10	25
2.	Zielstellung	27
3.	Material und Methoden	29
3.1.	Material	29
3.1.1.	Chemikalien	29
3.1.2.	Geräte	29
3.2.	Allgemeine Methoden	31
3.2.1.	Beladung von 2-Chlortritylchlorid-Harz (2-CITrt) mit <i>N</i> ^α -Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten	31
3.2.2.	Beladung von 4-Sulfamyl- <i>safety-catch</i> -Harzen mit <i>N</i> ^α -Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten	31
3.2.3.	Bestimmung der Beladung des polymeren Trägers	32
3.2.4.	Abspaltung der <i>N</i> -terminalen Fmoc-Schutzgruppe	32
3.2.5.	Manuelle Kupplung von Aminosäuren an der festen Phase	33
3.2.6.	Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese	33
3.2.7.	Vorschrift zur Kontrolle des Syntheseverlaufes - „Kontrollabspaltung“	34
3.2.8.	Vorschrift zur Synthese seitenkettengeschützter Peptidsäuren - „HFIP-Abspaltung“	34
3.2.9.	Simultane Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen und des Peptids vom polymeren Träger	35
3.2.10.	Parameter für CD-spektroskopische Untersuchungen	35
3.3.	Methoden Teil A - „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“	36
3.3.1.	Synthese von HOGp(Boc) ₂	36
3.3.2.	Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH	36
3.3.3.	Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH	37
3.3.3.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	37
3.3.3.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	37
3.3.3.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	38
3.3.4.	Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp	39
3.3.4.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	39
3.3.4.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	39
3.3.4.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	42

3.3.5.	Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp	43
3.3.5.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	43
3.3.5.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	43
3.3.5.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	45
3.3.6.	Aktivierung der Cystein-Protease Clostripain und Kontrolle der Aktivität	45
3.3.7.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH	46
3.3.7.1.	Spontane Esterhydrolyse	46
3.3.7.2.	Enzymatische Esterhydrolyse	46
3.3.7.3.	Spontaner Acyltransfer	46
3.3.7.4.	Optimierung des enzymatischen Acyltransfers	47
3.3.7.5.	Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen	47
3.3.8.	Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH	47
3.3.9.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH	48
3.3.9.1.	Spontane Esterhydrolyse	48
3.3.9.2.	Enzymatische Esterhydrolyse	48
3.3.9.3.	Spontaner Acyltransfer	48
3.3.9.4.	Optimierung des enzymatischen Acyltransfers	48
3.3.9.5.	Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen	49
3.4.	Methoden Teil B - „Studien zur Synthese von <i>E. coli</i> Parvulin 10“	50
3.4.1.	Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	50
3.4.2.	Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp	50
3.4.3.	Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH	50
3.4.4.	Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl	51
3.4.5.	ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika	52
3.4.6.	ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden	52
3.4.7.	ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L-Peptide	53
3.4.8.	ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10	54
3.4.9.	Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10	54
3.4.10.	CD-spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10	55
3.4.11.	Bestimmung des k_{cat}/K_M -Wertes von synthetischem Par10	55
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Teil A - „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“	56
4.1.1.	Synthese von HOGp(Boc) ₂	56
4.1.2.	Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH	57
4.1.3.	Synthesestrategie von HMGA 1b Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH	58
4.1.4.	Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH	60
4.1.4.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	60
4.1.4.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	61
4.1.4.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	66
4.1.5.	Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp	70
4.1.5.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	70
4.1.5.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	70
4.1.5.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	76
4.1.6.	Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp	79
4.1.6.1.	Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)	79
4.1.6.2.	Synthesestrategie II (konvergente Synthese)	81
4.1.6.3.	Synthesestrategie III (optimierte Synthese)	85

4.1.7.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH	88
4.1.7.1.	Spontane Esterhydrolyse	88
4.1.7.2.	Enzymatische Esterhydrolyse	89
4.1.7.3.	Spontaner Acyltransfer	90
4.1.7.4.	Optimierung des enzymatischen Acyltransfers	90
4.1.7.5.	Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen	91
4.1.8.	Abspaltung der <i>N</i> -terminalen Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH	92
4.1.9.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH	93
4.1.9.1.	Spontane Esterhydrolyse	93
4.1.9.2.	Enzymatische Esterhydrolyse	94
4.1.9.3.	Spontaner Acyltransfer	94
4.1.9.4.	Enzymatischer Acyltransfer und Optimierung des Nukleophil-Ester-Verhältnisses sowie Zugabe von Additiven	95
4.1.9.5.	Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen	96
4.2.	Teil B - „Studien zur Synthese von <i>E. coli</i> Parvulin 10“	97
4.2.1.	Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	97
4.2.2.	Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp	98
4.2.3.	Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH	99
4.2.4.	Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl	101
4.2.5.	ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika	103
4.2.6.	ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden	106
4.2.7.	ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L-Peptide	107
4.2.8.	ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10	107
4.2.9.	Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10	109
4.2.10.	CD-spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10	110
4.2.11.	Bestimmung des enzymkinetischen Parameters k_{cat}/K_M von synthetischem Par10	111
5.	Diskussion	113
5.1.	Synthesen Teil A - „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“	113
5.1.1.	Synthese von HOGp(Boc) ₂	113
5.1.2.	Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH	113
5.1.3.	Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH	114
5.1.4.	Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp	116
5.1.5.	Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp	119
5.1.6.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH	122
5.1.7.	Abspaltung der <i>N</i> -terminalen Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH	123
5.1.8.	Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH	124
5.2.	Teil B - „Studien zur Synthese von <i>E. coli</i> Parvulin 10“	125
5.2.1.	Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	125
5.2.2.	Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp	126
5.2.3.	Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH	126
5.2.4.	Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl	128
5.2.5.	ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika	128
5.2.6.	ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden	130
5.2.7.	ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L-Peptide	131

5.2.8.	ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10	132
5.2.9.	Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10	133
5.2.10.	CD-spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10	134
5.2.11.	Bestimmung des enzymkinetischen Parameters k_{cat}/K_M von synthetischem Par10	134
6.	Zusammenfassung	135
7.	Literaturverzeichnis	139
8.	Danksagung	154

Abkürzungsverzeichnis

2-CITrt	2-Chlortrityl-
Ac	Acetyl-
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADP	Alkalische D-spezifische Peptidase (EC 3.4.11.-) aus <i>Bacillus cereus</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
br	breites Signal
Bz	Benzoyl-
CD	Circulardichroismus
CLP	Clostripain (EC 3.4.22.8.), Protease aus <i>Clostridium histolyticum</i>
d	Dublett
DBU	1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]-7-undecen
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DVB	Divinylbenzol
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
Dmb	Dimethoxybenzyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDT	Ethandithiol
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
HATU	2-(1 <i>H</i> -9-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HOAt	<i>N</i> -Hydroxy-9-azatriazol
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HOGp(Boc) ₂	<i>N,N'</i> -Bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-4-guanidinophenol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> = Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
kDa	Kilodalton
M	molar (1 mol/l)
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
MeOH	Methanol

mesh	Einheit für die Größe des polymeren Trägers
MESNA	Mercaptoethansulfonsäure
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> Kernresonanzspektroskopie
OAm	Amidinophenylester
OBzl	Benzylester
OCap	Carboxyamidophenylester
OCp	Carboxyphenylester
OGp	4-Guanidinophenylester
OGp(Boc) ₂	<i>N,N'</i> -Bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-4-guanidinophenylester
OInd	Indolylester
OPh	Phenylester
OSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidylester
OtBu	<i>tert</i> -Butylester
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par10	Peptidylprolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (PPIase) Parvulin 10 (EC 5.2.1.8) aus <i>Escherichia coli</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pNa	4-Nitroanilid
PyBOP®	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RP	<i>reversed phase</i> = Umkehrphase
rt	Retentionszeit
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPhOH	4-Hydroxyphenylthioester
SPPS	<i>solid-phase peptide synthesis</i> = Festphasen-Peptidsynthese
t	Triplett
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMSBr	Trimethylsilylbromid
TOS	4-Toluolsulfonsäure
Tricin	<i>N</i> -(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trt	Trityl-
UV/Vis	Ultraviolettes/ Sichtbares Licht
Z	Benzyloxycarbonyl-

Die verwendeten Drei- und Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* 138, 9-37 (1984)].

Englische Begriffe, für die kein deutsches Äquivalent existiert, sind im Text kursiv geschrieben. Dies gilt ebenfalls in zusammengesetzten Wörtern.

Der Ausdruck „Expression“ bezeichnet die Transkription und Translation von Genen und wird in dieser Arbeit auch im Zusammenhang mit der rekombinanten Produktion von Proteinen verwendet.

Die Begriffe ‚all-L‘ bzw. ‚all-D‘ werden bei Peptiden und Proteinen vorangestellt, die in ihrer Gesamtheit entweder vollständig aus L- oder D-Aminosäuren aufgebaut sind.

Zur Berechnung der isolierten Ausbeuten der Seitenketten-ungeschützten Peptid-Derivate wurden die Molmassen der entsprechenden TFA-Salze verwendet.

1. Einleitung

1.1. Peptide und Proteine

Neben Kohlenhydraten und Nukleinsäuren stellen Peptide bzw. Proteine eine weitere Klasse von Biopolymeren innerhalb der belebten Materie dar. Sie sind heteropolymere Kondensationsprodukte ihrer monomeren Einheiten, den α -Aminosäuren, welche über die so genannte ‚Peptidbindung‘ miteinander verbunden sind (Abb. 1). Die Peptidbindung entspricht chemisch einer Carbonsäureamidbindung, wobei der Begriff der Peptidbindung formal auf die Bindung zwischen zwei α -Aminosäuren beschränkt ist.

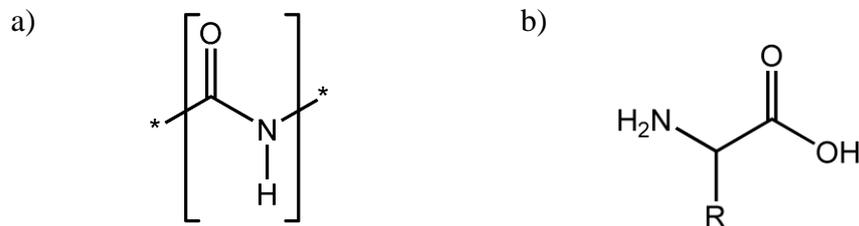


Abb. 1: Allgemeine Struktur einer Peptid- bzw. Carbonsäureamidbindung (a) und einer α -Aminosäure (b).

Bezüglich des generellen chemischen Aufbaus bestehen keine Unterschiede zwischen Peptiden und Proteinen. Einzig die Kettenlänge, also die Anzahl der miteinander verbundenen Aminosäureeinheiten, unterscheidet ein Peptid vom Protein, wobei die Grenze mit 50 bis 100 Aminosäuren zwischen beiden Termini nicht genau definiert und eher willkürlich ist.

Im Organismus können Peptide und Proteine, abhängig von ihrem Aufbau bzw. ihrer Struktur, eine Vielzahl von biochemischen und physiologischen Funktionen ausüben. So sind sie beispielsweise als Biokatalysatoren, auch als Enzyme bezeichnet, aktiv an der chemischen Stoffumwandlung beteiligt (z.B. Hexokinase innerhalb der Glykolyse), modulieren die Abwehr von Pathogenen innerhalb des Immunsystems (Immunglobuline, Interferone), wirken als Hormone regulierend (Insulin, Oxytocin), beeinflussen das Schmerzgeschehen (Enkephaline) und sind an Zell-Zell-Kommunikationsprozessen (T-Zell-Rezeptoren) beteiligt [1]. Weiterhin lassen sich bioaktive Peptide in den Bereichen der Toxine, Antibiotika, Alkaloide und Insektizide finden [2].

Bereits diese wenigen Beispiele verdeutlichen die eminente Bedeutung bioaktiver Peptide und Proteine im menschlichen, tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Organismus. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, also dem Zusammenhang von Aminosäuresequenz, Konformation des Peptids bzw. Proteins und der daraus resultierenden biologischen Aktivität. Ein großes Interesse entsteht aus dem zu-

nehmenden Wissen auch im pharmazeutisch-medizinischen Bereich, da diese endogenen Naturstoffe potentielle Therapeutika und Pharmaka darstellen. Eines der prominentesten Beispiele ist zweifelsohne das Insulin. Patienten, die auf Grund eines Diabetes mellitus Typ I an einem absoluten Insulin-Mangel leiden, können mit diesem Peptidhormon behandelt werden [3]. Der Umsatz von Peptidpharmaka wird derzeit auf ca. 12 Milliarden Dollar geschätzt, wobei das jährliche Wachstum zwischen 4-5% liegt [4]. Davon erwirtschaftet z.B. Leuprolid, ein Mittel zur Bekämpfung von Prostata- und Brustkrebs, allein jährlich zwei Milliarden US-Dollar.

Die Isolierung vieler dieser pharmakologisch und medizinisch interessanten Verbindungen aus natürlichen Quellen war zu Beginn des 20. Jahrhunderts der einzige Weg, diese Substanzen zu erhalten. Jedoch birgt jene Art der Gewinnung neben der limitierten Verfügbarkeit der menschlichen und tierischen Gewebe gewisse Gefahren. Diese sind beispielsweise die Infektion mit Pathogenen oder Allergenen. Daher war es notwendig, Methoden zu entwickeln und zu etablieren, um diese wertvollen Naturstoffe auf anderen, sicheren Wegen und in großen Mengen mit höchster Reinheit zu gewinnen.

Die klassische Methode der Darstellung von Peptiden ist zweifelsohne die chemische Synthese. Sie bietet die Möglichkeit des gerichteten Aufbaus von Peptiden, die sowohl aus natürlichen und nicht-natürlichen Aminosäuren bestehen können. Voraussetzung für die erfolgreiche chemische Synthese war dabei die Entwicklung von temporären und permanenten Schutzgruppen sowie effektiven Kupplungsreagenzien. Die chemische Synthese ist dabei nicht ausschließlich auf den Einbau der natürlichen L-Aminosäuren beschränkt. So kann beispielsweise durch den Einbau von D-Aminosäuren die biologische Halbwertszeit therapeutischer Peptide erhöht werden, da diese von Proteasen schlechter bzw. nicht erkannt werden [5].

Mitte der 70iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde mit der Einführung der rekombinanten DNA-Technologie [6], der die Entdeckung von Restriktionsendonukleasen vorausging [7], eine neue Ära in der Darstellung von Peptiden und Proteinen eingeleitet. Durch die gezielte Umprogrammierung von *Escherichia coli* gelingt es, das Bakterium so zu verändern, dass es eine in das Erbgut insertierte Proteinsequenz exprimiert, also das entsprechende codierte Protein „produziert“.

Auch wenn rekombinante Techniken einen immensen Aufschwung in der Darstellung von Peptiden bis hin zu Proteinen mit sich brachten und durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms praktisch jedes humane Protein exprimiert werden könnte [8], bleiben bisher einige Probleme ungelöst. Dazu zählen der Aufbau eines *mirror image* Proteins, das

gänzlich aus D-Aminosäuren aufgebaut ist, oder der gerichtete Einbau einer bestimmten, markierten Aminosäure bzw. die Synthese von Konjugaten bestehend aus mit Zuckerresten (Glykopeptide/proteine) [9] oder Oligonukleotiden (OPCs = *oligonucleotide peptide conjugates*) [10] verknüpften Peptiden und Proteinen. Nicht zu vergessen sind die verschiedenen post-translationalen Modifizierungen eukaryontischer Zellen. Obwohl es beispielsweise durch *selective pressure incorporation* gelang, nicht-native Aminosäuren einzubauen [11] bzw. durch Veränderungen am Ribosom D-Phenylalanin und D-Methionin zu inkorporieren [12], ist eine universelle Lösung bisher nicht gefunden. Einzig die chemische Synthese ist in der Lage, unabhängig vom Typ der Aminosäure, diese Modifikationen in die Peptidkette an definierten Positionen mit hoher Sicherheit einzubauen.

1.2. Synthese von Peptiden und Proteinen

1.2.1. Die Entwicklung der Peptidchemie

Peptide und Proteine sind, wie bereits erwähnt, heteropolymere Kondensationsprodukte aus monomeren Einheiten, den α -Aminosäuren, die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind. Diese fundamentale Gegebenheit wurde bereits 1902 von FRANZ HOFMEISTER aus den Ergebnissen seiner Arbeiten mit Eiweißstoffen, welche BERZELIUS bereits im 19. Jahrhundert als Proteine bezeichnete, vermutet [13]. Die erste Knüpfung einer Peptidbindung gelang, wenn auch ungewollt, schon 1881 THEODOR CURTIUS [14]. Während seiner Promotion in HERMANN KOLBE's Laboratorium in Leipzig erhielt er nach der Benzoylierung von Glycin neben der gewünschten Hippursäure zusätzlich N^{α} -Benzoyl-Glycyl-Glycin, ein *N*-terminal geschütztes Dipeptid. Ein weitere Errungenschaft CURTIUS' war die Einführung der Azid-Methode 1902 [15]. Durch die Überführung von Carbonsäurehydraziden in Azide können diese nach ihrer Isolierung mit einer Aminokomponente umgesetzt werden. Vorteilhaft sind der racemisierungsfreie Verlauf der Kupplungsreaktion und der Einsatz ungeschützter hydroxyfunktionalisierter Aminosäuren.

Wenn auch nicht durch die Kupplung zweier Aminosäuren, sondern durch die acidolytische Öffnung des Diketopiperazins zum Glycyl-Glycin, konnte 1901 EMIL FISCHER die erste Synthese eines freien Dipeptids erzielen [16]. Ferner gelangen ihm 1907 die Darstellung eines Oktadekapeptids, die Einführung von Estern zum Schutz des Carboxyterminus und α -Halogen-carbonsäurechloriden für die gerichtete Synthese von Peptiden [17]. Auch wenn es ihm verwehrt blieb, einen reversiblen Schutz für die *N*-terminale Aminofunktion zu

entwickeln, konnte er mit dem Hinweis auf die Einführung von Schutzgruppen des Urethantyps in die richtige Richtung zur Weiterentwicklung der Peptidsynthese weisen.

LEONIDAS ZERVAS und MAX BERGMANN, beide Schüler FISCHER'S, nahmen sich dieser Idee an und führten die Arbeiten ihres Mentors fort. Diese mündeten 1932 in der von ZERVAS entwickelten Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe, der ersten reversiblen Schutzgruppe für Aminofunktionen, welche hydrogenolytisch abgespalten werden kann [18]. Ihm zu Ehren wird diese Schutzgruppe in der Peptidchemie noch heute mit ‚Z‘ abgekürzt.

Nicht nur die Synthese von Peptiden stand im Mittelpunkt der Peptidchemiker, sondern auch die Aufklärung der Primärstruktur, also der Aminosäuresequenz von Peptiden. 1952 publizierte FREDERICK SANGER eine Methode zur Bestimmung der Primärstruktur und bestimmte damit die Sequenz des Insulins [19, 20]. Für diese eminent wichtigen Arbeiten erhielt er 1958 seinen ersten Nobelpreis. Im selben Jahr publizierte SPACKMAN ein Gerät für die chromatographische Trennung und Quantifizierung von Aminosäuren nach erfolgter Hydrolyse von Peptiden bzw. Proteinen [21].

Die Einführung neuer, effektiverer Kupplungsmethoden ermöglichten in den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts initiale Synthesen komplexerer Peptide. Zu den Methoden zählen die Mischanhydridmethode von WIELAND [22], SHEEHAN'S Carbodiimid-Methode [23] sowie die Aktivester-Methode SCHWYZER'S [24-26].

Die Ära der Synthese bioaktiver Peptide, Peptidpharmazeutika sowie Struktur-Wirkungs-Untersuchungen begann mit der Aufklärung der Primärstruktur und der Totalsynthese eines Hormons. So gelang es 1953 VINCENT DUVIGNEAUD die Primärstruktur von Oxytocin zu bestimmen und nachfolgend totalsynthetisch darzustellen [27, 28], wofür er bereits 1955 mit dem Nobelpreis geehrt wurde.

In den gleichen Zeitraum fällt ferner die Entwicklung der *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc), welche orthogonal zu der bisher bekannten Z-Schutzgruppe ist und merklich die Entwicklung der Peptidsynthese beschleunigte. Diese Schutzgruppe für die Aminofunktion kann bereits mit verdünnter Trifluoressigsäure abgespalten werden und ist zudem stabil in basischem Milieu sowie gegenüber den hydrogenolytischen Bedingungen der ‚Z‘-Abspaltung [29].

Mit der Einführung der oben genannten Schutzgruppen und Kupplungsreagenzien war es nun möglich längerkettige Peptide, wie beispielsweise Insulin [30-32] oder ACTH (Adrenocortikotropes Hormon) [33], darzustellen. Die Synthese in Lösung ist allerdings äußerst zeitintensiv und von Schwierigkeiten, wie beispielsweise der schlechten Löslichkeit längerkettiger, geschützter Peptide oder ungenügenden Kupplungsausbeuten, begleitet.

Das Problem der schlechten Kupplungsausbeuten, das durch den Einsatz der Reaktanden im Überschuß gelöst werden konnte, aber die Reinigung erschwerte, umging ROBERT BRUCE MERRIFIELD 1963 mit der Immobilisierung der C-terminalen Aminosäure über den Carboxyterminus und einer Ankergruppe an einen unlöslichen polymeren Träger [34]. Diese Methode stellt ohne Zweifel den größten Entwicklungssprung innerhalb der Synthese von Peptiden und Proteinen dar, auch wenn sie anfänglich skeptisch betrachtet wurde. Für diese Entwicklung, der so genannten Festphasen-Peptidsynthese (engl. *solid-phase peptide synthesis*, SPPS), wurde MERRIFIELD 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie bedacht. MERRIFIELD'S Methode ermöglichte nicht nur den Aufbau von Peptiden an einer unlöslichen Matrix, sondern zusätzlich die effektive Darstellung von Oligonukleotiden [35] und diente als Grundlage für die Entwicklung von Peptidbibliotheken bzw. der kombinatorischen Chemie [36].

Für die Ablösung der Peptide von der Ankergruppierung sowie die Abspaltung von Seitenketten-Schutzgruppen sind nach erfolgter SPPS harsche Bedingungen notwendig. Mit dem Einsatz von Fluorwasserstoff wurde von SHUMPEI SAKAKIBARA eine äußerst zuverlässige Methode hinsichtlich der Freisetzung des Peptids vom polymeren Träger und des Seitenkettenschutzes entwickelt, die jedoch in einigen Synthesen schädigend für das freie Peptid war [37]. Trotz der bekannten Probleme wurde 1969 erstmals der Traum FISCHER'S, die Synthese eines biologisch aktiven Enzyms, Wirklichkeit. Es gelang sowohl HIRSCHMANN in Lösung [38] als auch GUTTE an der festen Phase [39] die Darstellung von Enzymen mit Ribonukleaseaktivität. Gleichzeitig konnte damit die potentielle Leistungsfähigkeit der zunächst umstrittenen Synthese an der festen Phase demonstriert werden. Erst knapp 20 Jahre später wurde mit der HIV-Protease ein weiteres Enzym chemosynthetisch durch KENT dargestellt [40].

Wenn auch schon in den 70iger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt, konnte sich CARPINO'S 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) [41], eine Basen-labile Aminoschutzgruppe, erst in den 80iger Jahren, zusammen mit den Schutzgruppen vom *tert*-Butyl-Typ [42], durchsetzen. Gleichzeitig erfolgte die Entwicklung TFA-labiler *linker*, wie beispielsweise dem 2-Chlortrityl-*linker* von BARLOS [43]. In einem Übersichtsartikel von MOSS sind die derzeit wichtigsten *linker*-Typen mit ihren jeweiligen Abspaltbedingungen zusammengestellt [44].

Ausgehend von den Arbeiten SCHWYZER'S gelang CASTRO *et al.* die Synthese von BOP, einem äußerst effizienten Kupplungsreagenz zur *in situ* Aktivierung der Carboxyfunktion, das jedoch während der Reaktion ein toxisches Nebenprodukt generiert und sich damit nicht

vollends in der Peptidchemie durchsetzen konnte [45]. Abgeleitet von BOP wurde von COSTE *et al.* PyBOP dargestellt, welches ohne Verlust der Effektivität - im Vergleich zu BOP - in der Anwendung sicherer ist [46]. Eine Übersicht der zur Zeit verwendeten Kupplungsreagenzien ist in einem Übersichtsartikel von HAN zu finden [47].

Damit stehen dem Peptidchemiker heutzutage eine Vielzahl von Kupplungsreagenzien und zwei hauptsächliche Synthesestrategien zur Verfügung. Die erste und auch ältere ist die Boc/Bzl-Strategie. Hier werden der *N*-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure mit der Boc-Schutzgruppe und trifunktionelle Aminosäuren mit Seitenketten-Schutzgruppen vom Benzyl-Typ versehen. Das Freisetzen des *N*-Terminus erfolgt mit Trifluoressigsäure, wobei typischerweise die Seitenketten-Schutzgruppen und das Peptid vom *linker* mit der stärkeren Säure HF abgespalten werden. Andererseits wird heute die Fmoc/*t*Bu-Strategie gern benutzt. Der Fmoc-geschützte *N*-Terminus wird gewöhnlich mit 20% Piperidin in DMF freigesetzt. Für das Abspalten des Peptids von der Ankergruppierung bzw. vom polymeren Träger sowie des Seitenkettenschutzes vom *tert*-Butyl-Typ wird üblicherweise Trifluoressigsäure verwendet.

1.2.2. Peptidsynthese in Lösung

Die chemische Darstellung von Peptiden bzw. Proteinen in Lösung ist die klassische Methode in der Geschichte der Peptidsynthese. Für die Kupplung zweier Aminosäuren in Lösung unter *in situ* Aktivierungsbedingungen bedarf es des Schutzes der α -Aminofunktion der zu aktivierenden Aminosäure (Carboxy-Komponente) und des Schutzes der Carboxyfunktion der Aminokomponente sowie gegebenenfalls der Blockierung der Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren. Werden bereits aktivierte Derivate, wie beispielsweise Aminosäurepentafluorphenylester, -succinimidylester oder -halogenide eingesetzt, so kann gegebenenfalls auf einen Schutz der *C*-terminalen Carboxyfunktion verzichtet werden. Nach erfolgter Ausbildung der Peptidbindung wird das Dipeptid isoliert, gereinigt und charakterisiert. Dem schließt sich die Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe an, wobei auch hier wieder eine Isolierung, Reinigung und Charakterisierung von Bedarf sein können. Werden nun sukzessiv einzelne Aminosäuren in Richtung des *N*-Terminus geknüpft, so spricht man von einer linearen Synthese. Sind es jedoch Peptidfragmente, die gekuppelt werden, dann bezeichnet man dies als eine konvergente Synthese.

Durch die Isolierung der Zwischenprodukte sowie deren Reinigung (und Charakterisierung) können hochreine Endverbindungen erhalten werden. Weiterhin bieten diese Schritte die Möglichkeit der Detektion von Nebenreaktionen, wobei deren Produkte entfernt werden können. Vorteilhaft für eine effiziente Synthese sind hier eine genaue Planung und der

entsprechende Einsatz von geeigneten Schutzgruppen. Dem gegenüber stehen jedoch der hohe zeitliche Aufwand und die geringe Ausbeute, welche in Verlusten durch die Aufreinigung nach jedem Reaktionsschritt begründet sind. Ein weiterer Nachteil dieser Methode zeigt sich mit zunehmender Kettenlänge von vollgeschützten Peptiden durch deren abnehmende Löslichkeit, was sich besonders in der Kondensation von größeren Peptidfragmenten in der konvergenten Synthesestrategie äußert.

Trotz der erwähnten Nachteile und Probleme konnten mit dieser Methode beachtliche Erfolge erzielt werden. Dazu zählen beispielsweise die bereits erwähnten Totalsynthesen von Insulin [30-32] und RNase A [38]. Als ein besonders beeindruckendes Beispiel gilt zweifelsohne die Synthese eines 238 Aminosäure langen Vorläufermoleküls des Grün-Fluoreszierenden-Proteins in der Arbeitsgruppe um SHUMPEI SAKAKIBARA in Lösung [48].

1.2.3. Peptidsynthese an der festen Phase

Der Peptidsynthese in Lösung steht jene an der festen Phase gegenüber, bei der das Peptid, in der Regel über die Carboxyfunktion, an einem polymeren Träger gebunden, bis zum Ende der Synthese verbleibt. Die Reaktionen finden in einem sogenannten ‚quasi-gelösten‘ Zustand statt.

Nach Derivatisierung eines polymeren Trägers mit einem Anker erfolgt die Beladung mit der C-terminalen Aminosäure. Dem schließt sich die Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe sowie das Knüpfen der nachfolgenden Aminosäure in Richtung N-Terminus an. Dabei können, wie in der Peptidsynthese in Lösung, voraktivierte Derivate (Pentafluorphenylester, Succinimidylester, ect.) oder *in situ* aktivierte Aminosäurederivate eingesetzt werden. Nach der gewünschten Anzahl an Wiederholungen von N^α -Entschützungen und Kupplungen der nachfolgenden Aminosäuren erfolgt die Abspaltung der Peptidkette vom Träger und meist synchron die Entschützung der Seitenkettenfunktionen. In Abb. 2 sind diese Schritte schematisch dargestellt.

Im Gegensatz zu der Peptidsynthese in Lösung entfällt hier die zeitintensive Isolierung und Reinigung der Zwischenprodukte. Die Kontrolle des Syntheseverlaufs kann jedoch allenfalls durch eine Abspaltung des Peptids vom Träger und dessen Charakterisierung geschehen. Von Vorteil sind jedoch der Einsatz der Reagenzien, wie Aminosäuren, Kupplungsreagenzien und Additiva, im Überschuss, da diese durch Waschen sehr leicht entfernt werden können, die einfache Durchführbarkeit der einzelnen Schritte und damit verbunden die Möglichkeit einer Automatisierung. Zusätzlich kann, wenn auch limitiert, die konvergente Synthese von Peptiden am polymeren Träger durchgeführt werden. Zusammenfassungen zum Thema der konvergenten Synthese am polymeren Träger sind in [49, 50] gegeben. Auch wenn diese Art

1. EINLEITUNG

der Synthese von Peptiden und Proteinen einen enormen Entwicklungssprung innerhalb dieses Bereiches der organischen Chemie darstellt, kann ein homogenes Reaktionsprodukt nur dann erhalten werden, wenn alle Reaktionsschritte einen quantitativen Umsatz erfahren. Dies ist beispielsweise durch den Einsatz von Kupplungsreagenzien und Aminosäurederivaten im Überschuss sowie der vollständigen Deblockierung des *N*-Terminus realisierbar.

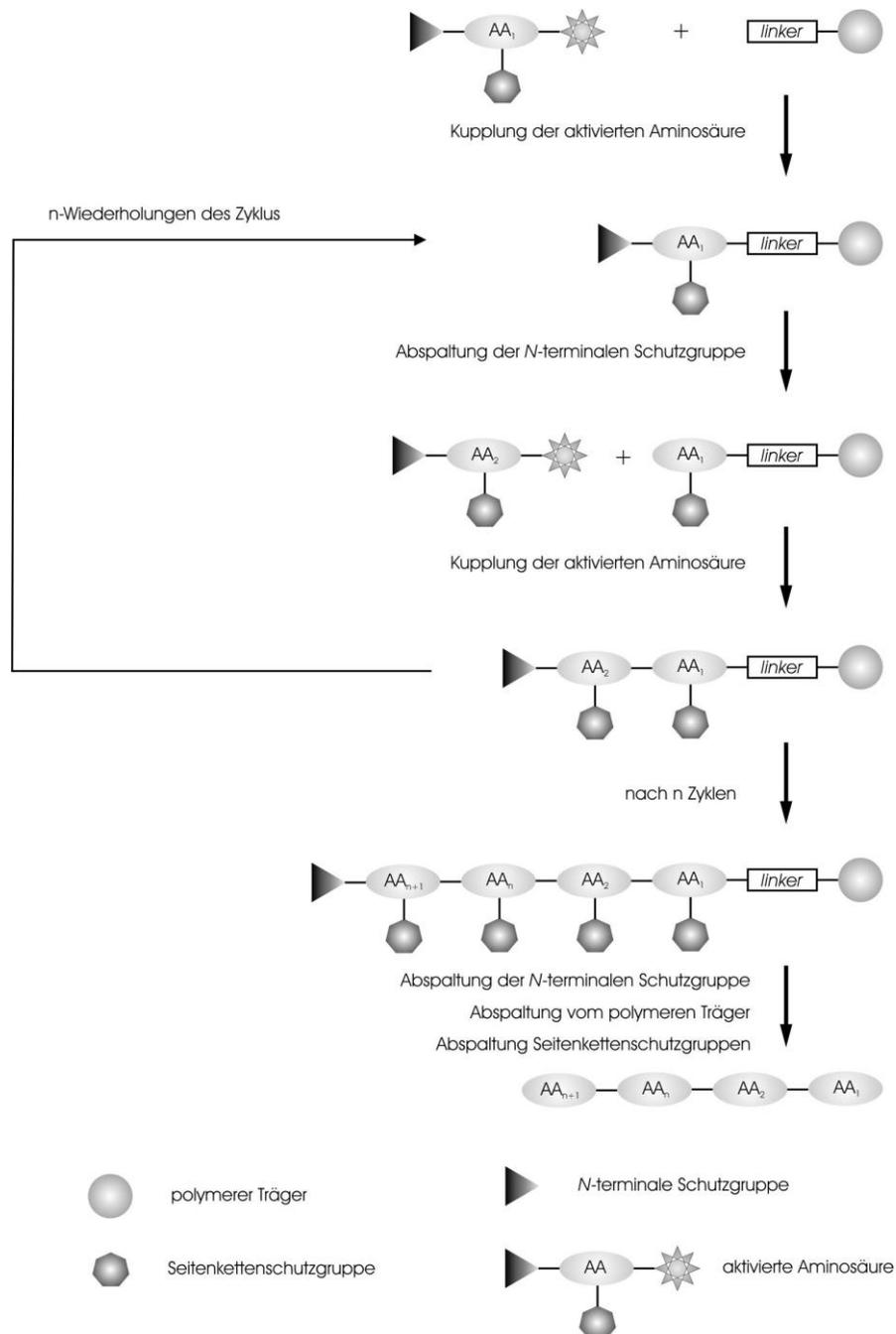


Abb. 2: Schema der Festphasen-Peptidsynthese. Nach Kupplung der C-terminalen Aminosäure über einen linker an den polymeren Träger erfolgt die Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe. Anschließend wird die nächste Aminosäure gekuppelt und der N-Terminus freigesetzt. Dieser Zyklus wiederholt sich entsprechend der Anzahl an Aminosäuren. Abschließend wird das Peptid vom Träger abgespalten und gleichzeitig können die Seitenkettenfunktionen freigesetzt werden.

Mit zunehmender Kettenlänge werden oftmals Aggregationserscheinungen beobachtet, welche Quell- und Diffusionsprobleme innerhalb des Peptid-Träger-Konstruktes verursachen [51]. Diese resultieren nicht selten in Kettenabbrüchen oder Aminosäure-Deletionen.

Um dennoch den Zugang zu längeren Peptiden oder gar Proteinen zu erhalten, bietet sich eine Kombination aus Festphasensynthese, Synthese in Lösung und der chemischen bzw. enzymatischen Verknüpfung von Peptidfragmenten an [52-54].

1.2.4. Chemische Verknüpfung von Peptidfragmenten

Aufgrund der limitierten Zugänglichkeit von längeren Peptiden bzw. Proteinen in einer schrittweisen oder konvergenten Synthese in Lösung oder an der festen Phase wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, um in den Kettenlängenbereich ganzer synthetischer Proteine vorzustoßen. Alle Methoden vereint die spezifische Reaktion zweier chemischer Funktionen in einer chemoselektiven Art und Weise unter Erhalt der Stereochemie an der Carboxyfunktion sowie das Vorliegen der Fragmente ohne Seitenkettenschutz, um eine entsprechende Löslichkeit in wässrigen Systemen zu ermöglichen. Dabei existieren Methoden, die in nicht-amidischen Bindungen, deren Produkte so genannte *backbone-engineered* Proteinanaloge sind, und in „echten“ Peptidbindungen resultieren.

Erste Erfolge einer chemoselektiven Reaktion im Sinne einer Peptidbindungsknüpfung gehen dabei auf die Arbeiten von WIELAND und BRENNER in den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts zurück, die mit einer Molekülklammer arbeiteten [55, 56]. Diese Molekülklammer ist für die räumliche Annäherung zweier funktionaler Gruppen verantwortlich und vermittelt eine chemoselektive Reaktion unter Ausbildung von nativen oder nicht-nativen Bindungen. Ähnliche Arbeiten wurden von der Gruppe um KEMP erfolgreich durchgeführt, die das so genannte Amin-Einfang-Verfahren etablierten [57].

TAM führte Anfang der 90iger Jahre die Verknüpfung zweier ungeschützter Peptidfragmente unter Ausbildung einer Pseudoprolin-Struktur ein, die durch die spezifische Reaktion eines C-terminalen Glycolaldehydesters mit einem N-terminalen Cystein oder Threonin erfolgt [58]. Als Intermediat entsteht ein Thiazolidin- bzw. Oxazolidinzwischenprodukt, welches sich spontan in 2-Hydroxymethylthioprolin umlagert. In Abb. 3 ist der Verlauf der Reaktion schematisch dargestellt.

In der von KENT beschriebenen chemischen Ligation unter Ausbildung einer Thioester-Bindung reagiert eine C-terminale Thiocarboxylgruppe mit einer N-terminalen Brom-carboxylfunktion [59]. Obwohl die so dargestellte HIV-Protease aktiv war, sind Ligationsprodukte dieser Synthesemethode aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Thioesterbindung im basischen pH-Bereich nicht stabil.

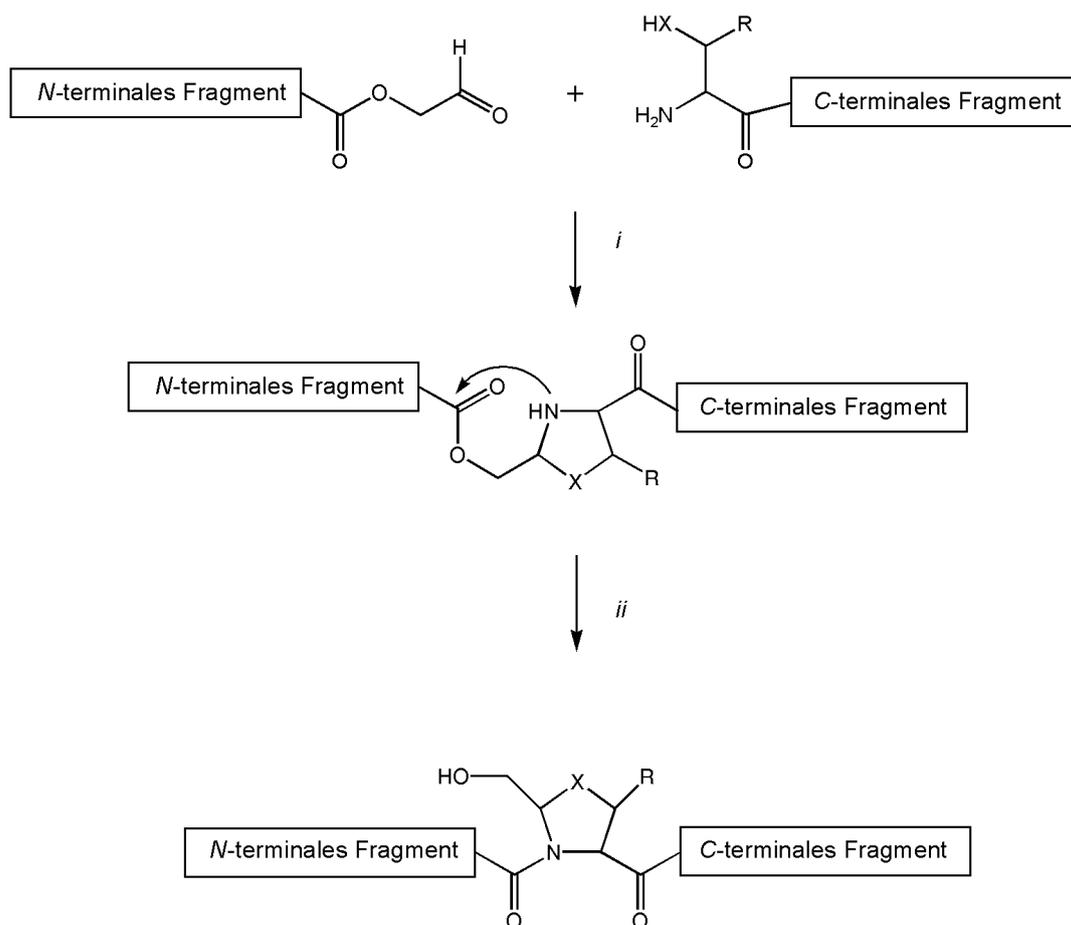


Abb. 3: Verlauf der Ligation zweier Fragmente unter Ausbildung der Pseudoprolin-Struktur nach TAM [58].
 i) Einfangreaktion (‘imine capture’) unter Wasserabspaltung. ii) Umlagerungsreaktion zum 2-Hydroxymethyloxa- bzw. thioprolin. X=S, O; R=H, CH₃

Wird jedoch die Thiocarboxylfunktion gegen ein C-terminales Cysteinamid ausgetauscht, so reagiert die Bromcarboxylfunktion mit der Sulfhydrylseitenkette des Cysteinamids unter Formierung einer stabilen Thioether-Bindung [60]. Beispielsweise gelang mit dieser Methode abermals die Synthese eines aktiven HIV-Protease-Analogons [61].

Durch die gerichtete Reaktion eines C-terminalen Peptidaldehyds mit einem N-terminalen O-alkylierten Hydroxylamin, wie beispielsweise dem Aminooxyacteyl-Rest, gelingt die Ausbildung einer Oximbindung [62]. Reagieren jedoch ein C-terminales Hydrazin und ein N-terminaler Aldehyd miteinander, so erfolgt die Ausbildung einer Hydrazon-Bindung [63, 64]. Weitere Methoden schließen beispielsweise die Verwendung verschiedener Auxiliare, ähnlich der bereits erwähnten Molekülklammer, ein [65].

Zu den etablierten chemische Methoden, die in der Ausbildung einer nativen Peptidbindung enden, zählen die „native chemische Ligation“ (*native chemical ligation*) sowie die STAUDINGER Ligation, welche im Folgenden genauer besprochen werden sollen.

Native Chemische Ligation (NCL)

Basis für die Entwicklung der nativen chemischen Ligation stellte die bereits erwähnte Arbeit von WIELAND dar. Er beobachtete, dass sich der Glycinaminoethylthioester (S-Glycyl-Cysteamin) spontan intramolekular, durch einen nukleophilen Angriff der Aminofunktion des Thiols, zum N-Glycylcysteamin umlagert [55].

Voraussetzung für die Durchführung der Verknüpfung zweier Fragmente in der nativen chemischen Ligation sind ein C-terminaler Thioester des N-terminalen Fragments und ein N-terminales Cystein des C-terminalen Fragments. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins an den Carbonyl-Kohlenstoff im Sinn einer Thioumesterung. Das so erhaltene Thioesterintermediat lagert sich - analog zu WIELAND'S Methode - spontan zum finalen Produkt unter Ausbildung einer Peptidbindung um. Abb. 4 stellt den Reaktionsverlauf schematisch dar [66].

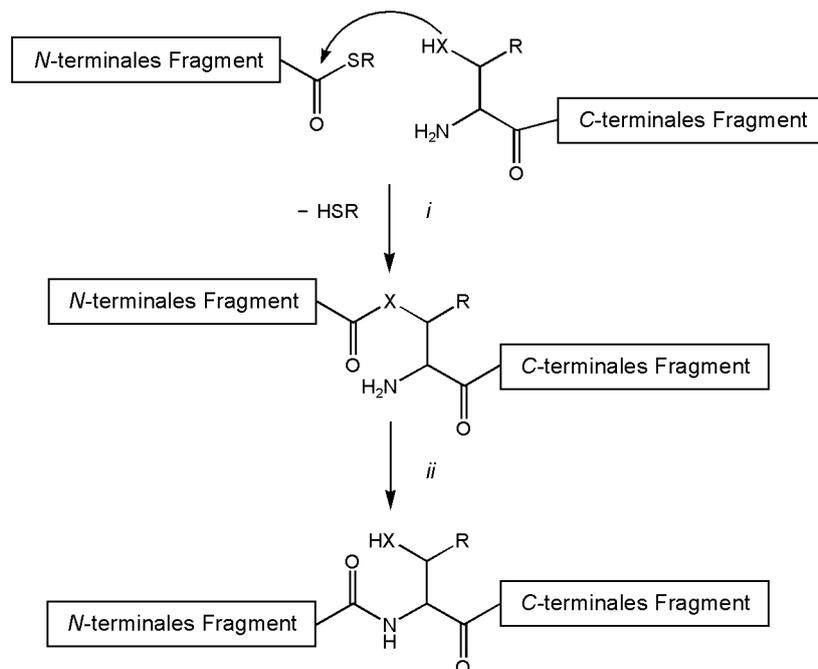


Abb. 4: Reaktionsschema der nativen chemischen Ligation. $X = S, Se, OH$. i) Nukleophiler Angriff der Sulfhydryl-Gruppe an den Carbonylkohlenstoff des Thioesters im Sinn einer Umesterung. ii) $X \rightarrow N$ Umlagerung des intermediären Esters zum finalen Ligationsprodukt unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung. $R = \text{Rest}$.

Im Falle des Vorhandenseins mehrerer Cysteine innerhalb des C-terminalen Fragments kann ausschließlich das Thioumesterungsprodukt unter Teilnahme des N-terminalen Cysteins im finalen Produkt enden, da nur dieses die räumliche Nähe für einen intramolekularen Angriff der N-terminalen Aminofunktion realisieren kann.

Ferner sind Reaktionen beschrieben worden, bei denen ein *N*-terminales Selenocystein oder Threonin an Stelle des Cysteins Verwendung fanden [67]. Erweiterungen der nativen chemischen Ligation stellen beispielsweise die Entschwefelung des Cysteins zum Alanin [68] oder der Einsatz von β -Mercaptophenylalanin [69] dar.

Durch die gezielte Auswahl an Thioestern sowie Schutz der *N*-terminalen Sulfhydrylfunktion des jeweiligen Cysteins als Thiazolidin, z.B. durch den Einbau von (4*R*)-3-Thiazolidin-4-Carbonsäure, besteht die Möglichkeit einer konvergenten nativen chemischen Ligation zur Darstellung längerkettiger Peptide [70]. In dieser Methode wird nach erfolgter NCL der Thiazolidin-Ring selektiv durch Methoxylaminhydrochlorid bei pH 4 zum Cystein geöffnet und das Fragment nachfolgend einer Reaktion mit einem weiteren Thioester im Sinn einer NCL unterworfen [71].

Eine weitere interessante Entwicklung stellt die „exprimierte Protein Ligation“ (engl. *expressed protein ligation*) dar. In dieser Methode wird über einen speziellen Intein-Vektor das Thioester-Fragment, welches mit einer Chitin-Binde-Domäne versehen ist, molekularbiologisch generiert, das Genkonstrukt in *Escherichia coli* exprimiert und nachfolgend sehr bequem mittels einer Chitinsäule gereinigt [72]. Nachteilig ist jedoch, dass sich bisher nur kanonische Aminosäuren ohne Probleme in solch ein Konstrukt einbauen lassen.

STAUDINGER Ligation

Die STAUDINGER-Reaktion, benannt nach dem Nobelpreisträger HERMANN STAUDINGER, beinhaltet die Reaktion eines Phosphins mit einem Azid zu einem Iminophosphoran [73, 74]. Nachfolgend wird das Azaylid hydrolysiert und man erhält ein Amin sowie Phosphinoxid. BERTOZZI *et al.* modifizierten diese ursprüngliche zur Reduzierung von Aziden gedachte Reaktion für die Anwendung in der Peptidchemie, allerdings noch unter Bedingungen, die an der Ligationsstelle eine „Spur“ in Form eines Phosphinoxids hinterließen [75]. Erst mit der Einführung der „spurlosen“ (engl. *traceless*) STAUDINGER-Ligation war es möglich, native Peptidbindungen zu knüpfen [76]. Voraussetzungen für diese Methode sind ein *N*-terminales Phosphinothioesterfragment und ein *C*-terminales Azidfragment. In Abb. 5 ist der Reaktionsmechanismus der STAUDINGER-Ligation schematisch dargestellt.

1. EINLEITUNG

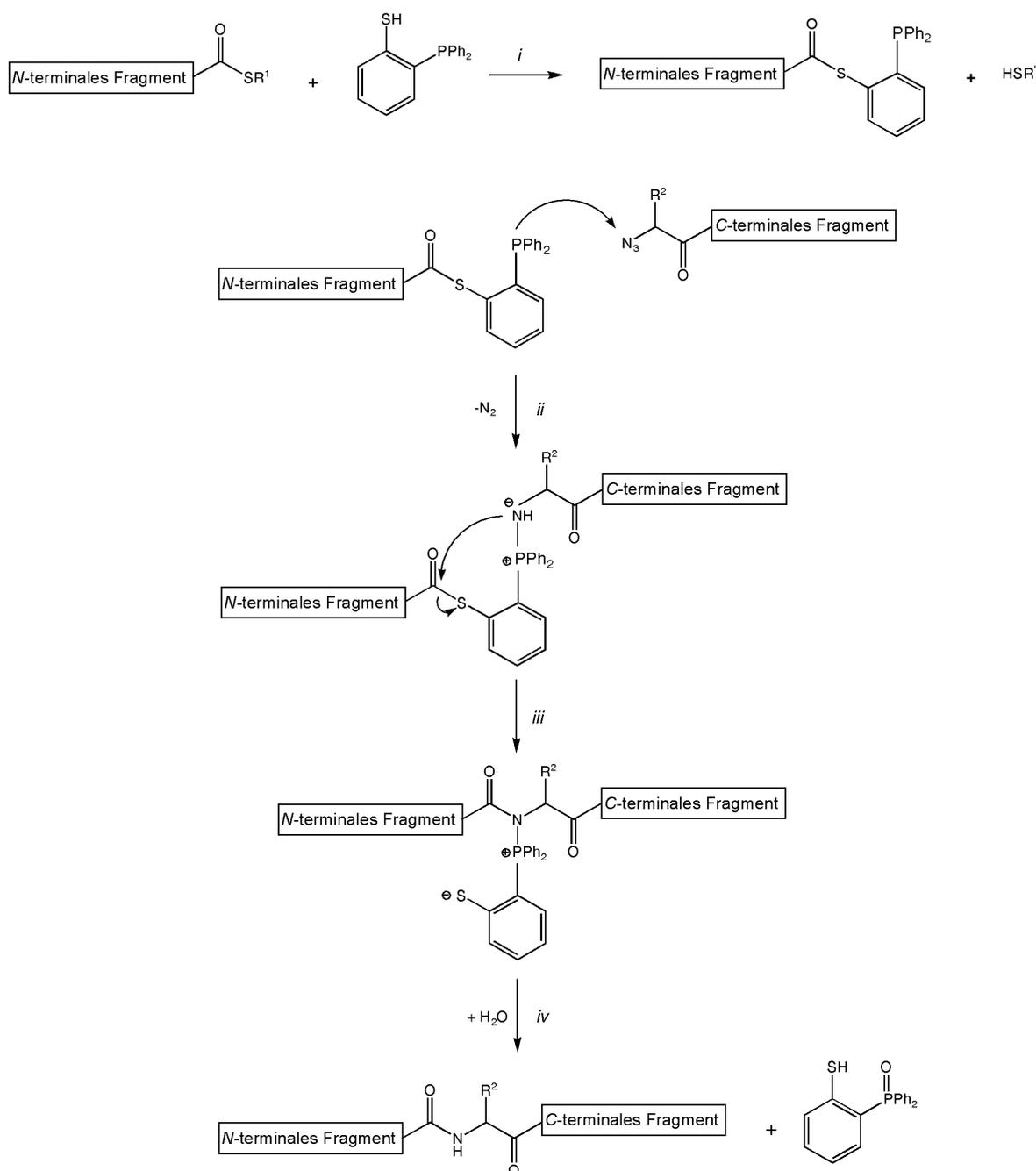


Abb.5: Reaktionsschema der „spurlosen“ STAUDINGER-Ligation [76]. i) Thiomethylierung zum Peptidphosphinothiol. ii) Angriff auf den Azidstickstoff unter Abspaltung molekularen Stickstoffs und Ausbildung des Phosphorylids. iii) Umlagerung zum Iminophosphoran. iv) Hydrolyse des Iminophosphorans zum verknüpften Peptidfragment unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung und gleichzeitiger Abspaltung des Mercaptophenyl-diphenylphosphinoxids.

Interessante Anwendungen der STAUDINGER-Ligation finden sich neben der Markierung von Zelloberflächen [75] in der gerichteten Immobilisierung von Peptiden an Glasoberflächen [77] und der Synthese von Glykoproteinen [78].

Durch die Entwicklung wasserlöslicher Phosphinothiole gelang ferner die Etablierung einer Methode, welche die STAUDINGER-Ligation in die *expressed protein ligation* integriert [79].

1.2.5. Enzymatische Verknüpfung von Peptidfragmenten

Auch wenn dem Peptidchemiker ein großes Repertoire an Methoden zur Ausbildung einer Peptidbindung gegeben ist, so stellt die Knüpfung einer Peptidbindung frei von Nebenreaktionen, unter milden Bedingungen sowie ohne Razemisierung, besonders bei länger-kettigen Peptiden oder gar Proteinen, noch immer eine Herausforderung dar. In der Natur erfolgt die Knüpfung der Peptidbindung durch die Peptidyl-Transferase innerhalb des Ribosoms. Allerdings erfolgt dieser Prozess nur im konzertierten Zusammenspiel mit weiteren Biomolekülen, so dass die alleinige Isolierung der Transferase wenig sinnvoll scheint. Betrachtet man jedoch den Abbau von Proteinen und bezieht die generelle Umkehrbarkeit von chemischen Reaktionen mit ein, so sollten Proteasen nicht nur in der Lage sein, Peptidbindungen zu spalten, sondern auch zu knüpfen. Diese Überlegung postulierte bereits 1898 VAN'T HOFF in einem Vortrag vor der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte [80]:

„ ..., ob (unter Anwendung der Gleichgewichtslehre) die Bildung von Zucker aus Kohlensäure und Alkohol unter Einfluss der Zymase beim Überschreiten eines Grenzgedruckes der Kohlensäure stattfindet, und ob nicht auch das Trypsin im Stande ist, unter Umständen, durch die Gleichgewichtslehre gegeben, Eiweiß zu bilden aus den Spaltprodukten, die es selber bildet.“ Mit seinem Vorschlag der Nutzung von Proteasen, auch als Peptidasen bezeichnet, für die Knüpfung von Peptidbindungen wurde ein neues Konzept zur Synthese von Peptiden und Proteinen geboren. MAX BERGMANN, HEINZ FRAENKEL-CONRAT und JOSPEH S. FRUTON konnten bereits 1937 unter Zuhilfenahme von Papain und α -Chymotrypsin Peptidbindungen zwischen Acylaminosäuren und Aminosäureamiden knüpfen [81-83]. Die Ausbildung von Peptidbindungen unter Verwendung von Proteasen kann dabei thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert erfolgen.

Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese

Die direkte Umkehr der nativen Hydrolyse von Peptiden, in der praktisch der Einsatz aller Proteasen unabhängig von ihrem Katalysemechanismus erfolgen kann, wird als *gleichgewichts-* oder *thermodynamisch kontrollierte* Peptidsynthese bezeichnet [84]. Diese ist jedoch durch niedrige Reaktionsgeschwindigkeiten, einen hohen Bedarf an Biokatalysator sowie meist geringe Syntheseausbeuten geprägt. Ferner eignen sich für die Synthese nur Substrate, die mit der Spezifität des eingesetzten Enzyms korrelieren. Daher ist es nötig, durch Manipulierung das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu drängen. Beispielsweise kann die Beeinflussung des Gleichgewichts durch Produktpräzipitation, Produktkomplexierung oder durch Extraktion des Produkts in eine zweite Phase erfolgen [84].

Mit Hilfe des Einsatzes organischer Lösungsmittel kann die Ionisierung der Reaktanten reduziert werden, was sich in der Erhöhung der Gleichgewichtskonstanten K_{ion} ausdrückt und somit die Bindungsbildung positiv beeinflusst (siehe Abb. 6). Beispiele für den erfolgreichen Einsatz dieser Strategie sind die Thermolysin-katalysierte Aspartam-Synthese [85] und die Semisynthese des humanen Insulins durch Transamidierung mittels Trypsin [86].

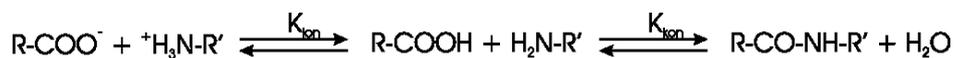


Abb. 6: Allgemeines Schema der thermodynamisch kontrollierten Peptidsynthese. R, R' = Rest.

Kinetisch kontrollierte Peptidsynthese

Gegenüber der direkten Umkehr der nativen Proteolyse steht die *kinetisch kontrollierte* Peptidsynthese. Diese Strategie macht den Einsatz von Serin- bzw. Cystein-Proteasen notwendig, da diese befähigt sind, reaktive Acyl-Enzym-Intermediate während der Katalyse auszubilden [87], wofür schwach aktivierte Aminosäure- bzw. Peptid(thio)ester benötigt werden. Die Ausbildung des Komplexes erfolgt nach der Abspaltung der (Thio-)Alkoholkomponente des Peptid(thio)esters. Im Anschluß an die Bildung des kovalenten Intermediates kann ein N-terminal freies Peptid dieses Acylenzym unter Ausbildung einer Peptidbindung deacylieren. Wasser, das auch ein Nukleophil darstellt, ist ebenso in der Lage, das Acyl-Enzym-Intermediat unter Freisetzung des hydrolysierten Aminosäure- bzw. Peptid(thio)esterderivates anzugreifen. In Abb. 7 sind diese möglichen Reaktionen im kinetischen Modell der Serin- bzw. Cystein-Protease-katalysierten Peptidsynthese dargestellt.

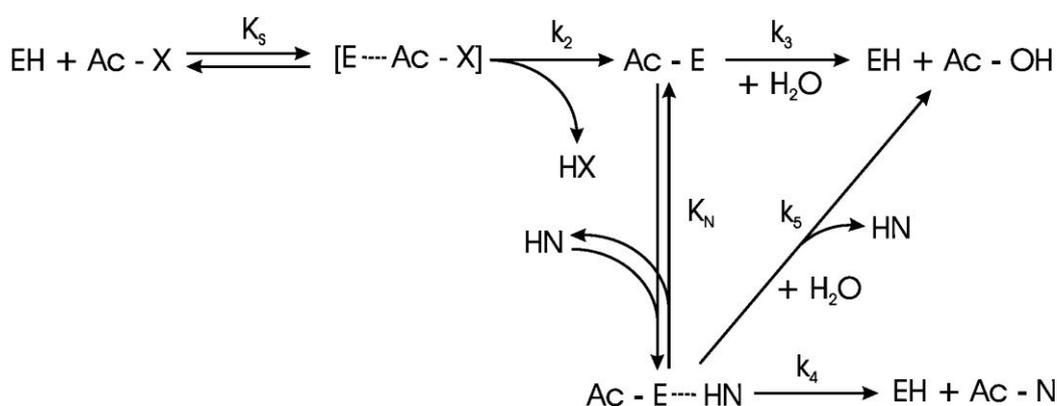


Abb. 7: Modell der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese. EH: freies Enzym; Ac-X: Acyldonor; HX: Abgangsgruppe (Alkoholkomponente); E-Ac-X: Michaelis-Menten-Komplex; Ac-E: Acyl-Enzym-Intermediat; Ac-OH: Hydrolyseprodukt; HN: Acylakzeptor; Ac-N: Aminolyseprodukt; Ac-E-HN: Acylenzym-Acylakzeptor-Komplex; k: Geschwindigkeitskonstanten; K: Gleichgewichtskonstanten.

Allerdings existieren neben den Vorteilen des Arbeitens unter milden Reaktionsbedingungen, der racemisierungsfreien Knüpfung der Peptidbindung sowie der Stereo- und Regiospezifität des Enzyms auch Nachteile. So tragen beispielsweise die proteolytische Enzymaktivität, begründet in ihrer *in vivo* Funktion als Hydrolase, die unvollkommene Ligaseaktivität sowie die Restriktionen bezüglich der Substratspezifität zum bisher limitierten Einsatz der Proteasen in der Synthese von längeren Proteinen bei. Entscheidend für die generelle Anwendbarkeit der Proteasen ist vor allem deren S_1 -Spezifität, wohingegen die Ausbeute der Reaktion durch die S' -Spezifität des Enzyms bestimmt wird (zur Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER siehe Abb. 8 [88]). Um die genannten Nachteile zu umgehen, wurden Studien durchgeführt, welche Veränderungen am Medium (*medium engineering*), Enzym (*enzyme engineering*) und Substrat (*substrate engineering*) beinhalteten.

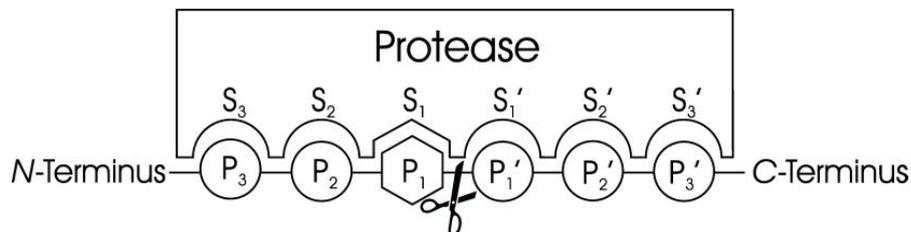


Abb. 8: Nomenklatur der Wechselwirkung zwischen Substrat und Protease nach SCHECHTER und BERGER [88]. Die Spezifität der Protease wird hauptsächlich durch den S_1 -Bindungsort determiniert.

Durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln kann der Gehalt von Wasser im Medium verringert werden, um eine Steigerung der Syntheseausbeute zu erreichen [89]. Dies geschieht dabei oftmals auf Kosten der Enzymaktivität bzw. -stabilität.

Als vorteilhaft erwies sich weiterhin die kinetisch kontrollierte Protease-katalysierte Ligation im gefrorenen wässrigen System [90]. Durch das Abkühlen des wässrigen Reaktionsmediums auf -10 bis -25 °C konnte eine Steigerung der Syntheseeffizienz und eine verminderte Hydrolyseaktivität der Proteasen Chymotrypsin [91], Elastase [92] und der Glu-spezifischen Endoprotease aus *Bacillus licheniformis* beobachtet werden [93]. Eine Erklärung dieses Effektes basierend auf einer lokal erhöhten Konzentration der Reaktanten im gefrorenen System wie in [94] beschrieben ist ungenügend. So erzielten Studien mit Konzentrationen, die denen im gefrorenen System glichen, nicht die gleichen Ergebnisse [95]. Vermutlich stellt eine Reduzierung der Wasseraktivität im gefrorenen System die Ursache für die Steigerung der Ausbeute dar, wobei bisher keine Daten für diese Erklärung des Phänomens existieren [96].

Eine weitere Möglichkeit des *medium engineering* stellt das Arbeiten mit ionischen Flüssigkeiten dar. Hierbei handelt es sich um organische Salze, die aufgrund der unsymmetrischen Struktur ihrer Kat- und Anionen bei Raumtemperatur einen flüssigen Aggregatzustand besitzen [97]. So konnten unter anderem durch den Einsatz von 80% Dimethylimidazolium-Dimethylphosphat im gepufferten System kompetitive hydrolytische Reaktionen in einer Chymotrypsin-katalysierten Ligationsreaktion komplett unterdrückt und ausschließlich die Produktbildung beobachtet werden [98]. Allerdings wird in diesem Reaktionssystem die Geschwindigkeit der Produktbildung um den Faktor 100 bis 1000 verlangsamt. Auch hier gibt es noch keine eindeutige Erklärung für diesen Effekt. Sehr wahrscheinlich sind Veränderungen im Mikromilieu oder in der Struktur des Substrats bzw. des Biokatalysators für diesen Effekt verantwortlich.

Ein weiterer Aspekt der Optimierung der enzymatischen Peptidsynthese ist die gezielte Manipulation des Biokatalysators selbst. Hierbei werden zum Beispiel Veränderungen nahe des aktiven Zentrums durchgeführt, um die hydrolytische Aktivität der Protease weitestgehend zu unterdrücken und/oder gar die Spezifitäten zu verändern [99]. Die von RALL generierte Trypsinvariante D189K/K60E weist eine deutlich reduzierte Amidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Trypsin auf [100]. Einen interessanten Ansatz stellt die Variante K60E/N143H/E151H/D189K von LIEBSCHER dar [101]. Durch gezielte Modifikation des Substratbindungsorts konnte eine Protease geschaffen werden, die in Anwesenheit von Zink-Ionen eine ausgeprägte Spezifität für die Sequenz Tyr-Arg-His aufweist und spezifisch zwischen Tyr und Arg spaltet. Diese Variante ist ferner in der Lage, den Acyltransfer zwischen Peptid-4-guanidinophenylestern und Nukleophilen mit der *N*-terminalen Erkennungssequenz Arg-His zu katalysieren, wobei keine Hydrolyse des finalen Produkts beobachtet wurde.

Weiterhin wurden Modifizierungen am Enzym auf chemischer Ebene durchgeführt, um dadurch beispielsweise eine verminderte Hydrolyse des Ligationsprodukts zu erreichen [102].

Den bisher effizientesten Weg stellt jedoch die Optimierung des Substrats dar, wobei die klassischen Abgangsgruppen-Manipulationen darauf abzielen, die Enzymaktivität gegenüber weniger spezifischen Substraten zu erhöhen und die Geschwindigkeit der Reaktion zu beschleunigen [103]. Allerdings muss noch immer die Primärspezifität der Protease mit der *C*-terminalen Aminosäure des Substrats übereinstimmen.

Erst mit der Entwicklung so genannter Substratmimetika, abgeleitet aus Studien zu Inhibitoren Arg-spezifischer Proteasen [104], konnte eine Umgehung der restriktiven S_1 -Substratspezifität der Protease erreicht werden [105, 106]. Das grundlegende Prinzip ist dabei

die Verschiebung der spezifitätsvermittelnden Struktur der C-terminalen Aminosäure in die Esterabgangsgruppe (Abb. 9). Es wird nun nicht mehr die Seitenkettenfunktion des Substrates erkannt und eingebunden, sondern die korrespondierende Esterabgangsgruppe, welche die Seitenkettenfunktion des sonst üblichen Substrats imitiert.

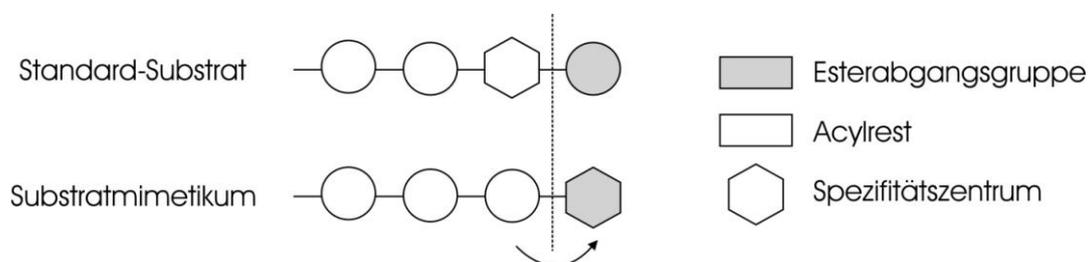


Abb. 9: Vergleich des schematischen Aufbaus eines herkömmlichen Substrats mit dem eines Substratmimetikums.

Aufgrund der Erkennung und Einbindung der substratimitierenden Esterabgangsgruppe können nun in einer kinetisch kontrollierten Peptidsynthese mittels Serin- oder Cystein-Proteasen C-terminal alle L-Aminosäuren und zusätzlich D-Aminosäuren sowie α,α -Dialkylamino-säuren, unabhängig von der Primärspezifität der Protease, eingesetzt werden [107]. Abgeleitet von den Primärspezifitäten verschiedener Proteasen für basische (Trypsin, Clostripain), saure (V8-Protease, Glu-spezifische Endoprotease aus *Bacillus licheniformis*) oder aromatische Aminosäurereste (α -Chymotrypsin, Subtilisin) wurden entsprechende Esterstrukturen als Substratmimetikum abgeleitet, welche in Abb. 10 zusammenfassend dargestellt sind.

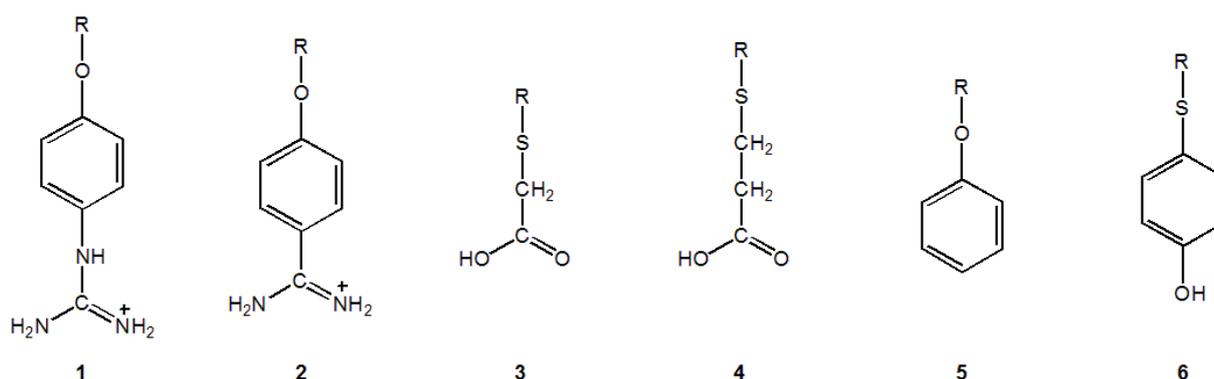


Abb. 10: Substratmimetika für Proteasen mit hoher S_1 -Bindungsortspezifität. (1) 4-Guanidinophenyl- (OGp) und (2) 4-Amidinophenylester (OAm) für Arg / Lys-spezifische Proteasen; (3) Carboxythiomethyl (SCm) und (4) Carboxythioethylester (SCe) für Glu / Asp-spezifische Proteasen; (5) Phenyl- (OPh) und (6) 4-Hydroxythiophenylester (SPhOH) für Phe / Tyr-spezifische Proteasen. R = Acylrest.

Auch wenn der Einsatz von Substratmimetika die Methode hinsichtlich der Knüpfungsstelle universeller gestaltet, besteht noch immer die Gefahr einer proteolytischen Spaltung außerhalb der Knüpfungsstelle. Um dieses Problem gänzlich zu umgehen, wären Serin- bzw. Cystein-Proteasen wünschenswert, welche ausschließlich hochspezifische Esterabgangsgruppen erkennen, aber keine Aminosäuren in der natürlichen L-Konfiguration. Damit sollte es möglich sein, eine Spaltung des Peptids oder Proteins nach erfolgter Bindungsknüpfung effektiv zu unterbinden.

Auch im umgekehrten Fall der Synthese von Peptiden in der all-D Konfiguration wäre dieses Prinzip denkbar. Mit Clostripain wurde bereits eine hervorragend geeignete Cystein-Protease gefunden und charakterisiert. Diese ist in der Lage, Peptidbindungen zwischen einem Substratmimetikum und Peptid in der D-Konfiguration zu knüpfen, jedoch bleibt die Spaltung des Ligationsprodukts aufgrund der ausschließlichen Spezifität des Enzyms für L-Aminosäuren, speziell L-Arg und L-Lys, aus [108].

1.3. Clostripain

Im Jahr 1938 wurde von MASCHMANN und KOCHOLATY eine weitere Protease neben den Collagenasen in dem Kulturüberstand des Gasbranderregers *Clostridium histolyticum* entdeckt und beschrieben, die nach Aktivierung mit einem Fe^{2+} -Cystein-System Gelatine sowie Clupein spalten kann [109, 110]. Die Protease selbst besteht aus zwei unterschiedlichen Proteinketten mit 45 und 12,5 kDa [111]. Als Inhibitoren wurden beispielsweise N^{α} -Tosyl-Lysinchloromethylketon (TLCK), Iodessigsäure und Dibromaceton identifiziert [112]. Hinsichtlich der Spezifität der Protease konnten erstmals OGLE und TYDELL in ihren Untersuchungen ausschließlich die Spaltung von Substraten nach Arginin und Lysin feststellen [113]. Die von ihnen erhaltenen Ergebnisse, wonach die Bindungsspaltung nach Arginin schneller als nach einem Lysin-Rest verläuft, wurden von GROS und LABOUESSE bestätigt und in ihrem Fall mit dem Faktor 500 bestimmt. Sie gaben ferner der Protease den Namen ‚Clostripain‘ [114, 115]. Im Gegensatz zu Trypsin, welches ebenfalls für Lysin- und Arginin-Reste spezifisch ist [116], vermag es Clostripain Arginyl-Prolyl- bzw. Lysyl-Prolyl-Bindungen zu spalten, was es zu einem wertvollen Werkzeug in der Sequenzierung von Proteinen macht [117].

Auf Grund der Pathogenität des Organismus *Clostridium histolyticum* sowie dessen strikt anaerober Kultivierung wurden Methoden entwickelt, um Clostripain - als durchaus wichtigen

Biokatalysator - nicht mehr aus Kulturfiltraten des Gasbranderregers, sondern rekombinant in *Escherichia coli* zu exprimieren und ins Kulturmedium zu sezernieren [118].

Der erste Einsatz von Clostripain zu Synthesezwecken längerkettiger all-L-Peptide erfolgte 1979 von HOMANDBERG in der Resynthese von Ribonuklease S aus zwei zuvor gespaltenen Peptidsubstraten in einem thermodynamisch-kontrollierten Ansatz [119]. Clostripain ist ferner in der Lage, Substratmimetika mit peptidischen Nukleophilen in einer kinetisch kontrollierten Reaktion umzusetzen [120], nicht native Aminosäuren miteinander zu verknüpfen [107], die Synthese von Neo-Peptidoglykanen zu katalysieren [121] oder gar Polymere aus abiotischen Monomeren im Bereich um 20 kDa zu erzeugen [122]. Dies läßt auf ein breites Substratspektrum dieser Cystein-Protease schließen und zeichnet sie als einen möglichen Biokatalysator für die Synthese von all-D-Proteinen aus.

1.4. Synthese von all-D-Proteinen

Das Auftreten von D-Aminosäuren in der Zellwand von Bakterien ist seit langer Zeit bekannt [123]. Allerdings wurden auch in Geweben von Eukaryoten Aminosäuren in ihrer spiegelbildlichen Form nachgewiesen [124].

Peptide bzw. Proteine, die ausschließlich aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, zeigen eine geringe Immunogenität [125], sind resistent gegenüber proteolytischem Abbau und können dadurch längere Serum-Halbwertszeiten erreichen [126]. Ferner kann die Applikation kurzer D-Peptide oral erfolgen, da diese systemisch aufgenommen und nicht im Magen-Darm-Trakt abgebaut werden [127]. Neben dem potentiellen Einsatz als Therapeutika [128] dienen sie als Spiegelbild-Proteine im Screening von Nukleinsäurebibliotheken, welche für die Generierung von Spiegelmeren[®], einer neuen therapeutischen Substanzklasse, unerlässlich sind [129].

Aufgrund der Tatsache, dass es in rekombinanten Systemen bisher nicht gelang, Peptide bzw. Proteine zu exprimieren, die ausschließlich aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, verbleibt für die Darstellung dieser Verbindungen ausschließlich die chemische Synthese. Als ein erstes D-Protein wurde das 45 Aminosäuren lange Rubredoxin, ein Metallionen-bindendes Protein, dargestellt [130]. Die Komplexe mit und ohne gebundene Fe²⁺-Ionen zeigten dabei im CD-Spektrum die erwarteten spiegelbildlichen Spektren. Weiterhin konnte eine Verbesserung der Röntgenstrukturdaten durch den Einsatz eines razemischen Gemisches des Proteins erreicht werden.

KENT *et al.* gelang 1992 die totalchemische Synthese eines aus 99 Aminosäuren bestehenden D-Enzyms [131]. Das Epimer der HIV-Protease ist unter Verwendung der Festphasen-

Peptidsynthese sowie der nativen chemischen Ligation dargestellt und anschließend hinsichtlich Substraten und Inhibitoren untersucht worden. Die Protease zeigte eine Spezifität für spiegelbildliche Substrate bzw. für spiegelbildliche Inhibitoren.

WEHOFSKY *et al.* konnten 2003, wie bereits erwähnt, erstmals unter Verwendung von Clostripain ein all-D-Polypeptid unter kinetisch kontrollierten Bedingungen darstellen. Dabei wurde ein 15 Aminosäure haltiger Peptid-4-guanidinophenylester mit einem Nukleophil bestehend aus 19 Aminosäuren mit einer Ausbeute von ungefähr 50% zu der aus 34 Aminosäuren bestehenden WW-Domäne des humanen Pin1 ohne Proteolyse des finalen Produkts umgesetzt [108].

Anfang 2008 synthetisierten PENTELUTE *et al.* via nativer chemischer Ligation das 81mer *anti-freeze* all-D-Protein des Schneeflohs und verglichen dessen Eigenschaften mit denen des nativen Proteins [132]. Nachfolgend wurde mittels razemischer Kristallisation und Röntgenkristallographie die Struktur des Proteins aufgeklärt [133].

1.5. Spiegelmere[®] - spiegelbildliche Aptamere

RNA-Moleküle sind nicht nur in der Lage Erbinformation zu transportieren [1], sondern sie können ferner komplexe Strukturen, ähnlich denen von Proteinen, ausbilden [134]. Dies geschieht beispielsweise in der Form von Ribozymen, welche fähig sind, chemische Reaktionen, wie etwa die Hydrolyse von RNA, zu katalysieren [135]. Es sollten daher RNA-Spezies existieren, die aufgrund ihrer Struktur in der Lage sind, Proteine mit hoher Spezifität zu binden. Diese Protein-bindenden Nukleinsäuren, nativen oder synthetischen Ursprungs, werden als Aptamere (*lat. aptus = passen*) bezeichnet. Sie sind aus ca. 30-70 RNA- oder DNA-Nukleotiden aufgebaut [136]. Durch ihre besonders spezifische Bindung und ihr geringes Molekulargewicht sind diese Aptamere prinzipiell gute Kandidaten für Pharmazeutika [137].

Die Selektion und Anreicherung geeigneter Aptamere erfolgt über einen so genannten SELEX[®]-Prozess (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) [138, 139]. Dieser Prozess besteht im Wesentlichen aus den Schritten Bindung, Waschen, Elution und Amplifikation, welche mehrfach durchlaufen werden. Im ersten Schritt werden das immobilisierte Zielmolekül und die Oligonukleotidbibliothek, die aus ca. 10^{13} - 10^{15} Molekülen besteht, direkt zur Bindung gebracht. Das anschließende Waschen entfernt nicht bindende Oligonukleotide und stellt einen wichtigen Schritt im Prozeß dar. Durch die nachfolgende Elution werden potentielle Bindemoleküle vom *target* gelöst und im letzten Schritt, der

Amplifikation, angereichert. Die Amplifikation wird durch konstante 3' und 5' Primer ermöglicht, die den variablen Nukleotidbereich im Oligonukleotid flankieren, und mittels Polymerasen bzw. PCR durchgeführt. Die so selektierten Oligonukleotide werden in weiteren SELEX[®]-Zyklen verwendet. Entscheidend ist dabei immer die effektive Trennung bindender und nicht-bindender Moleküle in jedem Zyklus. Das auf diese Weise gefundene, am stärksten bindende Molekül wird isoliert, angereichert und abschließend sequenziert. Auf diese Art erhaltene Aptamere können nun in beliebiger Menge mittels PCR oder chemisch dargestellt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Modifizierung dieser Aptamere, beispielsweise mit PEG (Polyethylenglycol), um eine Verlängerung der Bioverfügbarkeit im Körper zu erreichen [140]. Nachteilig wirkt sich bei den Aptameren der Fakt aus, dass diese aus natürlichen D-Nukleotiden aufgebaut sind und sie damit potentielle Substrate für die im Organismus vorhandenen Nukleasen darstellen.

Würde man jedoch Aptamere einsetzen, die das native *target* erkennen, jedoch aus L-Nukleotiden aufgebaut sind, so sollten diese nicht mehr von den vorhandenen Nukleasen erkannt werden und damit eine längere Bioverfügbarkeit im Organismus aufweisen. Zur effektiven Generierung dieser spiegelbildlichen Aptamere, die von KLUSSMAN *et al.* 1996 eingeführt wurden und den Namen Spiegelmer[®] tragen [141, 142], müssen zunächst Spiegelbilder der gewünschten Target-Moleküle erstellt werden. Dies erfolgt im Bereich von Peptiden bzw. Proteinen durch chemische Synthese der Zielmoleküle mit Aminosäuren in der D-Konfiguration. Da es bisher keine rekombinante bzw. andere molekularbiologische Methode zur Darstellung spiegelbildlicher Proteine gibt, sind die chemische Synthese an der festen Phase, in Lösung bzw. die Semi-Synthese unter Verwendung der Protease-katalysierten Ligation mit Clostripain die einzige Möglichkeit. Nach der erfolgreichen Darstellung des spiegelbildlichen Peptids oder Proteins erfolgt das Screening mit einer randomisierten D-RNA-Oligonukleotidbibliothek nach den Regeln der SELEX[®]-Methode.

Wurde ein Molekül mit den gewünschten Eigenschaften hinsichtlich Inhibition und Bindung gefunden, so wird dieses isoliert, angereichert und sequenziert. Mit Hilfe der Sequenz des isolierten Bindemoleküls wird das entsprechende Spiegelmer[®], also die gespiegelte Nukleinsäure, mittels chemischer Synthese in der L-Konfiguration dargestellt. Abschließend wird das so generierte Spiegelmer[®] auf seine Bindung bzw. Inhibierung gegen das native Zielmolekül getestet. Das Verfahren ist schematisch in Abb. 11 dargestellt. Vorteile der Spiegelmer[®] sind ihre Resistenz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen, ihr geringes Molekulargewicht und ihre nicht-immunogene Wirkung [143]. Einen ersten Erfolg erzielte

das von NOXXON Pharma entwickelte anti-Ghrelin Spiegelmer[®] NOX-B11 in der Behandlung von Adipositas [144].

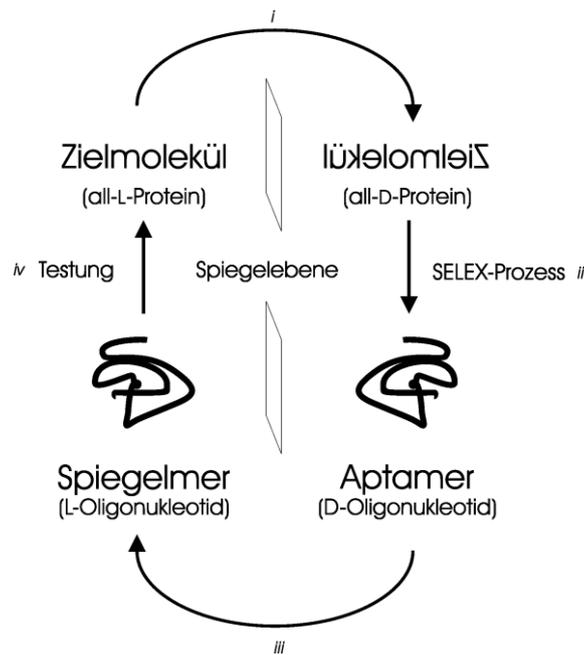


Abb. 11: Verfahren zur Darstellung von Spiegelmeren. i) Das native Zielmolekül, in diesem Fall ein Protein, wird in seiner spiegelbildlichen Konfiguration synthetisch dargestellt. ii) Durch den SELEX-Prozess mit einer randomisierten D-Oligonucleotidbibliothek wird ein Bindemolekül identifiziert und sequenziert. iii) Abschließend erfolgt die chemische Synthese des Spiegelmers als L-Oligonucleotid mit der Sequenz des identifizierten Aptamers sowie iv) der Tests der Bindung gegenüber dem nativen Zielmolekül.

1.6. High-mobility-group-Proteine und HMGA 1b

High-mobility-group-Proteine stellen eine heterogene Gruppe von Nicht-Histon-Proteinen dar. Ihre Erstbeschreibung erfolgte 1973 von GOODWIN *et al.*, wobei sie ihren Namen aufgrund ihrer hohen Mobilität in der Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen erhielten [145]. Die Unterteilung der HMG-Proteine erfolgt in Abhängigkeit ihrer charakteristischen und funktionalen Sequenzmotive für die Bindung von DNA in HMG-Box-Proteine, NBD (*nucleosome binding domain*) Proteine und AT-Haken (*AT-hook*) Proteine [146, 147]. Eine Übersicht der Familien sowie deren Nomenklatur ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen HMG Proteine sowie deren Nomenklatur nach BUSTIN [147].

HMG Motiv Protein ¹⁾	funktionales Motiv	alter Name	neuer Name
HMG-Box-Proteine	HMG-Box	HMG-1/-2	HMGB1, 2, ... n
NBD-Proteine	NBD	HMG-14/-17	HMGN1, 2,...n
ATH-Protein	ATH	HMG-I/-Y/-C	HMGA1, 2,...n

¹⁾Abkürzungen: NBD Nucleosom-Bindedomäne, ATH AT-Haken.

Die Familie der AT-Haken-Proteine (HMGA's) besteht aus den Proteinen HMGA 1a, HMGA 1b und HMGA 1c, die durch alternatives Spleißen des Genes *HMGA1* entstehen, sowie HMGA 2, welches durch das Gen *HMGA2* kodiert wird [148-151]. Wie bereits erwähnt, ist das charakteristische Motiv der HMGA-Proteine eine hochkonservierte Struktur mit der Konsensus-Sequenz Pro-Arg-Gly-Arg-Pro, die in die kleine Furche AT-reicher DNA-Abschnitte bindet und pro Protein in unterschiedlichen Abständen vorkommt [152-154]. NMR-Strukturuntersuchungen ergaben, dass das Protein in Abwesenheit von DNA unstrukturiert ist und erst bei Assoziation mit der Nukleinsäure in einen geordneten Zustand, dem Hakenmotiv, übergeht [155]. Hauptsächlich sind der zweite und der dritte AT-Haken für die Bindung verantwortlich [156], wobei gleichzeitig die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird [155]. Dazu zählen mRNA-prozessierende Proteine, Chromatinstruktur-ändernde Proteine oder Strukturproteine [157]. Wie Histone können HMGA-Proteine in ihrer Aktivität durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung gesteuert werden [158, 159].

HMGA-Proteine werden vermehrt in embryonalen Geweben [160] sowie verschiedenen Neoplasien, wie hämatologische Neoplasien [161], Schilddrüsen- [162], Colon- [163], Prostata- [164], Gebärmutterhals-[165], Brust- [166] und Bauchspeicheldrüsenkarzinomen [167] detektiert. Allein die Anzahl an verschiedenen Krebsarten, in denen HMGA Proteine beteiligt sind, lassen diese Proteine zu einem möglichen Ziel der effektiven Krebstherapie werden [168, 169].

1.7. Alkalische D-spezifische Peptidase

Wie bereits erwähnt (1.3.) existiert mit Clostripain eine Cystein-Protease, die in der Lage ist, Peptidbindungen zwischen D-Aminosäuren bzw. D-Peptiden mit Hilfe der Substratmimetika-Strategie effizient zu knüpfen, obwohl sie ursprünglich spezifisch all-L-Peptide bzw. Proteine nach Arginin und Lysin spaltet. Um dieses Prinzip für die Synthese natürlich vorkommender Proteine bzw. Peptide in der L-Konfiguration zu nutzen, gibt es nun zwei offensichtliche Möglichkeiten. Einerseits wäre die Synthese einer Serin- oder Cystein-Protease, wie beispielsweise die von Clostripain, bestehend aus ausschließlich D-Aminosäuren denkbar, um eine spiegelbildliche Protease mit spiegelbildlichen Substratspezifitäten zu schaffen. Bei einer Länge von 526 Aminosäuren sollte sich die totalchemische Synthese jedoch äußerst schwierig gestalten. Andererseits wäre eine natürlich vorkommende Endoprotease wünschenswert, deren native Substrate Peptide oder Proteine in der D-Konfiguration sind und die eine restriktive S₁-Spezifität aufweist.

Durch ein effizientes Screening-Verfahren konnte von ASANO *et al.* 1996 eine Protease gefunden werden, die in der Lage ist, [D-Phe]₄ Peptide zu degradieren [170]. Diese D-Phe-spezifische Protease wurde aus *Bacillus cereus* isoliert und als ‚Alkalische D-spezifische Peptidase‘ (ADP) bezeichnet. Diese monomere Peptidase ist aus 349 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. Als Inhibitoren sind Phenylmethylsulfonylchlorid, Ag²⁺- als auch Fe²⁺-Ionen identifiziert worden [170]. Nach Isolierung des Gens für die ADP und Klonierung kann das Enzym in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden [171].

Erste synthetische Versuche wurden bereits 1999 durchgeführt [172]. Im Mittelpunkt dabei stand die Verknüpfung von D-Phe-OMe Monomeren zu D-Phe Oligomeren sowie Untersuchungen zur Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln.

1.8. Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen und *E. coli* Parvulin 10

Damit Enzyme ihre native katalytische Funktion ausüben können, müssen sie in ihrer entsprechenden Tertiärstruktur, also in einem korrekten Faltungszustand, vorliegen [1]. Die Information für die Ausbildung der korrekten Struktur befindet sich in der Abfolge der Aminosäuren innerhalb des Proteins [173]. Bei der Faltung von Proteinen sind die Ausbildung von Disulfidbrücken sowie die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidylprolyl-Bindungen geschwindigkeitsbestimmend [174, 175]. 20 Jahre nach der Entdeckung der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) durch ANFINSEN [176] wurde 1984 von GUNTER FISCHER eines der ersten Enzyme einer neuen Klasse, der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), aus Schweinenieren isoliert, welches aktiv an der Faltung von Proteinen beteiligt ist [177]. Dieses Enzym Cyclophilin ist in der Lage, die Rotation der Peptidylprolyl-Bindung von *trans* zu *cis* und umgekehrt zu katalysieren und damit die Ausbildung des nativen Faltungszustands des Proteins zu beschleunigen [178]. Dabei wird eine Rotationsbarriere von ca. 80 kJ · mol⁻¹ überwunden, wobei sich der *cis*- und *trans*-Zustand von Xaa-Pro-Bindungen nur um 5-6 kJ · mol⁻¹ unterscheidet [179].

Zurzeit existieren drei Familien von PPIasen, Cyclophiline (Cyp), FK-506-bindende Proteine (FKBPs) und Parvuline (Par). Die beiden erstgenannten Familien zeichnen sich durch die Bindung und Inhibierung von mikrobiellen immunsuppressiven Verbindungen, wie Cyclosporin A, FK 506 oder Rapamycin, aus, zeigen keinerlei Sequenzhomologie zwischen den Familien [178, 180] und besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten [181]. Innerhalb des Organismus üben die PPIasen neben der Unterstützung der Faltung weitere Funktionen, zum

Beispiel im Immunsystem oder in der Regulation des Zellzyklus, aus [182-184]. 1994 wurde in *E. coli* der erste Vertreter der dritten Familie der PPIasen entdeckt, der keinerlei Sequenz-homologie zu den anderen Familien aufweist und als Parvulin 10 bezeichnet wird.

Escherichia coli Parvulin 10

Parvulin 10 (lat. parvulus = sehr klein) wurde 1994 von Rahfeld *et al.* in *Escherichia coli* entdeckt und ist der erste Vertreter der PPIase-Familie der Parvuline. Das Protein besteht aus 92 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 10,1 kDa und kann weder durch Cyclosporin A, noch durch FK506 inhibiert werden [185, 186]. Bisher ist Parvulin 10 die kleinste bekannte PPIase und es ist anzunehmen, dass dieses als Monomer aktive Enzym den Prototyp der Parvulinfamilie darstellt. In dieser Familie weist Parvulin 10 Homologien zu Domänen anderer Proteine auf. Dazu zählen beispielsweise das PrsA aus *Bacillus subtilis* [187], SurA aus *Escherichia coli* [188], PrtM aus *Lactococcus lactis* [189], Pft1/Ess1 aus Hefe [190] sowie dem humanen Pin1 [183]. Die eukaryotischen Vertreter besitzen zusätzlich zur PPIase-Domäne eine Interaktionsdomäne mit zwei hochkonservierten Tryptophanresten. Diese WW-Domäne wurde als Phosphoserin- bzw. Phosphothreonin-Bindemodul identifiziert [191].

Parvulin 10 zeigt im Protease-gekoppelten Ansatz eine Spezifitätskonstante von $1,69 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Substrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-4-Nitroanilid, wobei eine Präferenz für Tetrapeptidsubstrate der Struktur Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-Nitroanilid besteht, bei denen an der Stelle Xaa hydrophobe Aminosäuren eingebaut sind [192]. Parvulin 10 selbst besitzt eine *cis*-Prolylbindung zwischen Gly75 und Pro76, die durch das Enzym selbst in einem autokatalytischen Prozess ausgebildet wird [192]. Während für das humane Pin1 biologische Funktionen bereits identifiziert wurden [193, 194], ist für das Parvulin 10 diesbezüglich wenig bekannt. Durch *knock out* des Parvulin 10-Gens in *Escherichia coli*-Zellen konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress beobachtet werden [195]. Nach der Entdeckung des spezifischen Parvulin 10 Inhibitors Juglon [196], einem Chinonderivat aus der Walnuß, konnte die kleine Untereinheit der Alkylhydroperoxidreduktase (AHPC) als ein putativer Bindungspartner des Parvulin 10 identifiziert werden [197], deren Funktion die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser ist [198]. Aufgrund der Rolle der AHPC als wichtiges Enzym bei der zellulären Antwort von *E. coli* auf oxidativen Stress [199, 200] wird dem Bindungspartner Parvulin 10 eine mögliche Beteiligung an Stabilisierungs- bzw. Faltungsvorgängen während der Stressphase zugeschrieben [197].

2. Zielstellung

Im ersten Teil (Teil A) der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, eine Semi-Synthesestrategie für die Darstellung des verkürzten *high-mobility-group* Proteins HMGA 1b Ac-Ser1-Lys80(*N*^c-Biotinyl)-Lys81-OH in der all-D Konfiguration zu etablieren (im nativen Protein schließt sich ein saurer C-terminaler Teil bestehend aus 15 Aminosäuren an). In Schema 1 ist die Sequenz des finalen Zielproteins wiedergegeben. Da eine Darstellung des Proteins in einem rekombinanten System aufgrund des Aufbaus aus ausschließlich D-Aminosäuren bisher nicht möglich ist, sollten dafür sowohl chemische, als auch biokatalytische Synthesemethoden unter Einsatz der Protease Clostripain genutzt werden. Gleichermäßen galt es damit zu zeigen, dass Clostripain in der Lage ist, Polypeptide bzw. Proteine in der all-D-Konfiguration zu synthetisieren, die länger als 50 Aminosäuren sind. Das Zielprotein bestehend aus 81 Aminosäuren wurde dafür in Fragmente unterteilt, die es chemisch herzustellen und enzymatisch zu ligieren galt.

10 20 30 40
 SESSKSSQP LASKQEKDGT EKRGRGRPRK QPPKEPSEVP
 50 60 70 80 81
 TPKRPRGRP K GSKNKGA AKT RKT TTTTPGKR PRGRP K KLEK(Biotinyl) K

Schema 1: Zielsequenz des verkürzten HMGA 1b Proteins in der all-D-Konfiguration.

Die Zielstellung des zweiten Teils (Teil B) der Arbeit war es, eine Strategie zur Semi-Synthese der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase Parvulin 10 aus *Escherichia coli* zu entwickeln, deren Struktur und Aminosäuresequenz in Abb. 12 dargestellt sind.

10 20 30
 AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF
 40 50 60
 GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQQQMVPA
 70 80 90 92
 FDKVVFSCPV LEPTGPLHTQ FGYHIIKVLY RN

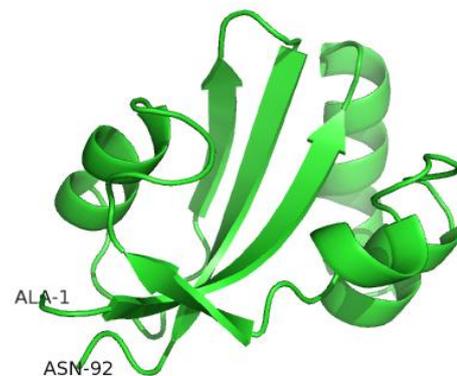


Abb. 12: Primär- und Tertiärstruktur von Parvulin 10 (Par10) aus *Escherichia coli* (PDB file: 1JNT.pdb).

2. ZIELSTELLUNG

Analog zu Teil A wurde das Zielprotein bestehend aus 92 Aminosäuren in Fragmente unterteilt, die es chemisch zu synthetisieren und Protease-katalysiert zu ligieren galt.

Im Rahmen der Synthese von Parvulin 10 sollte ein neuer Biokatalysator, die Alkalische-D-Peptidase (ADP), hinsichtlich seiner Eignung für die Synthese von all-L-Peptiden und -Proteinen untersucht werden. Dazu zählen initiale Studien bezüglich der Akzeptanz verschiedener Substratmimetiktypen sowie erste Substratmimetika-vermittelte enzymatische Peptidsynthesen. Schlussendlich galt es, dieses Enzym für die Segmentkondensation zweier chemisch generierter Fragmente abgeleitet aus der Sequenz des Par10 einzusetzen. Das synthetische Protein sollte abschließend gereinigt, isoliert und mit dem aus *Escherichia coli* stammenden Wildtyp-Parvulin 10 bezüglich biologischer Aktivität im PPIase-Test sowie dessen Struktur mittels CD-Spektroskopie verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Alle im Folgenden benutzten Chemikalien sind, soweit nicht anders vermerkt, kommerziell erhältlich und wurden ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Sie entsprachen der Qualität „p.a.“. Lösungsmittel wurden nach den üblichen Methoden getrocknet. Die benutzten Lösungsmittel wurden von Fluka (Basel, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland) sowie Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Für die Peptidsynthese sind polymere Träger, Kupplungsreagenzien, Additive und Aminosäurederivate der Firmen NovaBiochem (Bad Soden, Deutschland), Bachem (Läufelfingen, Schweiz) und IRIS-Biotech (Marktredwitz, Deutschland) eingesetzt worden. Das verwendete DTT stammte von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

Clostripain (EC 3.4.22.8) ist eine Schenkung der Firma Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan). Alkalische D-Peptidase (EC 3.4.11.-) wurde von Prof. Dr. Yasuhisa Asano (Toyama Prefectural University, Japan) zur Verfügung gestellt.

In der Festphasen-Peptidsynthese sind folgende Aminosäurederivate in der L- als auch D-Konfiguration verwendet worden: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH, Fmoc-Glu(O*t*Bu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly(Dmb)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH und Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH.

Verschiedene *N*-terminal Boc-geschützte als auch *N*-terminal freie Aminosäure- bzw. Peptid-(thio)ester sowie H-Lys(Boc)-OBzl waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden.

Alle ermittelten Werte sind Durchschnittswerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

3.1.2. Geräte

Für analytische *reversed-phase*-HPLC-Läufe wurde ein System der Firma BISCHOFF bestehend aus folgenden Komponenten genutzt: HPLC Compact Pump 2250, Detektor DAD 3 L, Datenwandler LC CaDI 2214, Alcott Autosampler 718 AL. Als Säulen kamen eine Shiseido C₈ (Capcell Pak, Typ SG 300Å, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm) und eine Vydac C₁₈ (TP 254, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm) zum Einsatz. Als mobile Phasen wurden Wasser und ACN mit

3. MATERIAL UND METHODEN

jeweils 0,1% (v/v) TFA verwendet. Die benutzten Gradienten und Wellenlängen sind an den entsprechenden Stellen gesondert vermerkt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der McDacq32 Software Version 2.0.

Zur Reinigung der Verbindungen mittels präparativer und semi-präparativer *reversed phase* HPLC wurde ein System bestehend aus den Gilson-Abimed Komponenten Pumpe 305, Pumpe 306, Druckmodul, Gradientenmischer, Detektor und einem Pharmacia Schreiber genutzt. Als stationäre Phasen dienten eine Macherey & Nagel C₈ Säule (SP 250/21 Nucleosil 100-7) bzw. Macherey & Nagel C₈ Säule (SP 250/10 Nucleosil 100-7). Die Elution erfolgte mit Wasser und ACN, welche jeweils 0,1% (v/v) TFA enthielten.

Die Festphasen-Peptidsynthese erfolgte an einem ABI 433A der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) in einem 40 ml Reaktor mit der Software SynthAssist in der Version 2.0.

Der benutzte Thermomixer Typ 5436 stammt von der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland).

ESI-Massenspektren sind mit einem ESI-Iontrap Massenspektrometer ESQUIRE-LC, Bruker-Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) bzw. Micromass ZQ Massenspektrometer, Waters (Eschborn, Deutschland), aufgenommen worden. MALDI-Massenspektren wurden mit einem Ultraflex II ToF/ToF Massenspektrometer der Firma Bruker-Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) aufgezeichnet, wobei als Matrices α -Hydroxycyanozimtsäure, DHB und Sinapinsäure zum Einsatz kamen.

Kombinierte LC-MS Analysen erfolgten mit einem Waters System bestehend aus der Pumpeneinheit 2525, Detektor 2487, Autosampler 2767 und einem Micromass ZQ Massenspektrometer. Zur Auftrennung der Proben ist eine X-Terra MS C₁₈-Säule (3,5 μ m, 2,1 mm x 50 mm) sowie Wasser und ACN mit je 0,1% (v/v) TFA genutzt worden. Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit der MassLynx Software Version 4.0.

CD-spektroskopische Messungen sind an einem CD-Spektrometer J-710 der Firma Jasco durchgeführt und Daten mit Spectra Manager in der Version 1.53.01 aufgezeichnet worden.

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren bzw. Kinetiken erfolgte an einem Hewlett-Packard 8452A Diodenarray-Spektrophotometer.

Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung fand ein Avance 400 NMR-Spektrometer der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland) Verwendung.

Zur Gefriertrocknung der Substanzen wurde die Gefriertrocknungsanlage alpha 2-4 LD der Firma Christ (Osterode, Deutschland) verwendet.

3.2. Allgemeine Methoden

3.2.1. Beladung von 2-Chlortritylchlorid-Harz (2-ClTrt) mit N^α -Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten

Entsprechend der Vorschrift aus [43] wurde 1 g 2-Chlortritylchlorid-Harz (100-200 mesh, 1% DVB) in einen 100 ml Rundkolben eingewogen. 0,4 mmol des gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäurederivats sind in einem 25 ml Becherglas mit 10 ml trockenem DCM unter Zugabe von 1,6 mmol (274 μ l) DIPEA gelöst worden. Anschließend wurde die Lösung in den Kolben überführt, mit einem CaCl_2 -Rohr verschlossen und für zwei Stunden auf einem Horizontalschüttler belassen. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Harz mit Hilfe einer 20 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden von der Lösung separiert. Der polymere Träger ist dreimal mit einer Lösung aus 5% DIPEA (v/v) und 10% (v/v) MeOH in DCM für je fünf Minuten inkubiert worden. Nachfolgend wurde je dreimal mit DCM, DMF und nochmals mit DCM gewaschen. Zur Trocknung ist das Harz zweimal für fünf Minuten mit Ether versetzt, anschließend mittels Vakuum trocken gesaugt und im Vakuumschrank aufbewahrt worden. Nach erfolgter Fmoc-Bestimmung wurde vom gesamten Harz die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wie in 3.2.4. beschrieben abgespalten.

3.2.2. Beladung von 4-Sulfamyl-*safety-catch*-Harzen mit N^α -Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten

In Anlehnung an [201] wurde für die Beladung mit der zweiten Aminosäure der entsprechenden Sequenz 1 g 4-Sulfamylbenzoylaminomethyl-Polystyren-, 4-Sulfamylbutyrylaminomethylpolystyren- bzw. 4-Sulfamylbutyrylaminomethyl-NovaGel-Harz in je einen 100 ml Rundkolben eingewogen, mit 20 ml Chloroform versetzt und nach Aufsetzen eines CaCl_2 -Rohrs mindestens 20 Minuten auf -20 °C mittels Isopropanol/Trockeneisbad temperiert. Nachfolgend wurden 0,4 mmol der gewünschten N^α -Fmoc-geschützten Aminosäure, 0,4 mmol (209 mg) PyBOP[®] sowie 1 mmol (172 μ l) DIPEA zugegeben und der Ansatz vorsichtig gerührt. Nach vier Stunden wurden nochmals 0,4 mmol (209 mg) PyBOP[®] zugesetzt, der Kolben aus dem Trockeneis/Isopropanol-Bad genommen und weiter über Nacht gerührt. Anschließend wurde der polymere Träger vom Lösungsmittel mittels Fritte separiert, mehrfach mit DCM sowie Diethylether gewaschen und im Vakuumschrank über Nacht getrocknet. Nach erfolgter Fmoc-Bestimmung laut 3.2.3. wurde das Harz für 20 Minuten in DMF gequollen und die freien Aminofunktionen des *linkers* durch Acetylierung blockiert. Dazu wurde der Träger dreimal zehn Minuten mit 10 ml einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid,

10% (v/v) DIPEA in DMF inkubiert, nachfolgend mit DMF, DCM sowie Diethylether gewaschen und im Vakuumschrank getrocknet.

3.2.3. Bestimmung der Beladung des polymeren Trägers

Zur Bestimmung der Harz-Beladung sind je 2-3 mg des nach 3.2.1. oder 3.2.2. beladenen Harzes in drei 2 ml Polypropylengefäße eingewogen, mit 1 ml 20% Piperidin (v/v) in DMF versetzt und bei Raumtemperatur im Thermomixer inkubiert worden. Nach drei Stunden wurden 10 µl des Reaktionsansatzes mit 90 µl 50%-iger Essigsäure in Wasser versetzt und mittels HPLC bei 290 nm analysiert. Die Berechnung der Beladung erfolgte mittels Gleichung 1. Der Wert für ‚y‘ wurde durch Erstellen einer Kalibriergeraden (Abb. 13) mit *N*-Fluorenylmethylpiperidin und Regression ermittelt.

$$\text{Beladung in mmol/g} = \frac{\text{Peakfläche in mV} \cdot \text{sec} \cdot 0,001 \text{ l}}{y \cdot \text{Einwaage in g}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

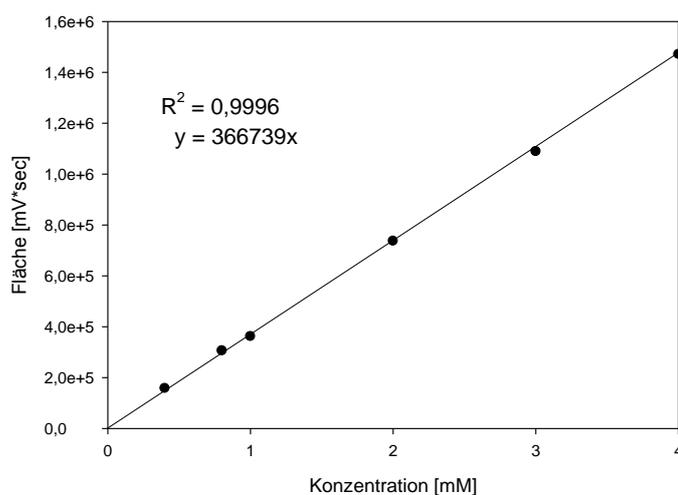


Abb. 13: Kalibriergerade für die Bestimmung der Beladung des polymeren Trägers mit *N*^α-Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten.

3.2.4. Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe

Die gewünschte Menge an am Polymer-gebundener *N*-terminal Fmoc-geschützter Aminosäure bzw. am Harz immobilisiertes *N*-terminal Fmoc-geschütztes Peptid wurde in einer 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und für 20 Minuten mit DMF gequollen sowie zweimal mit DMF gewaschen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe ist der polymere Träger dreimal je fünf Minuten mit 7 ml einer Lösung 2% Piperidin (v/v), 2% (v/v)

DBU in DMF versetzt und stark geschüttelt worden. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen des Harzes mit DMF.

3.2.5. Manuelle Kupplung von Aminosäuren an der festen Phase

0,125 mmol an 2-Chlortrityl-Harz gebundenes, *N*-terminal freies Peptid bzw. Aminosäurederivat wurden in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Fand bereits gequollenes Harz mit *N*-terminal freiem Peptid bzw. *N*-terminal freier Aminosäure Verwendung, so wurde lediglich zweimal mit NMP gewaschen. Für die Kupplung sind in einem 10 ml Rollrandgefäß 0,375 mmol des gewünschten, *N*-terminal geschützten Aminosäurederivates sowie 0,375 mmol (143 mg) HATU in 5 ml NMP gelöst und nachfolgend mit 0,750 mmol (130 µl) DIPEA versetzt worden. Nach einer Aktivierungszeit von einer Minute wurde die Lösung über eine Kanüle in die Fritte überführt und dort für eine Stunde unter Schütteln belassen. Anschließend ist die Reaktionslösung entfernt und das Harz mit NMP gewaschen worden.

3.2.6. Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese

Für die automatisierte Peptidsynthese an der festen Phase wurden 0,22 M HCTU/ 0,22 M HOBt in DMF (Kupplungsreagenz), 1 M DIPEA in NMP (Aktivatorbase), 10% (v/v) Piperidin, 10% (v/v) DBU in DMF (Fmoc-Abspaltlösung), die entsprechenden Aminosäurederivate im vierfachen Überschuss sowie DMF und DCM für Waschschrte eingesetzt. Die Ansatzgröße entsprach in allen Synthesen 0,125 mmol.

Zur Herstellung von 200 ml Kupplungsreagenz wurden in einem Becherglas 44 mmol (18,6 g) HCTU sowie 44 mmol (6 g) HOBt eingewogen und mit 150 ml DMF unter Rühren vollständig gelöst. Anschließend ist die Lösung in einen Messzylinder filtriert und mit DMF auf 200 ml aufgefüllt worden.

0,2 mol (34,2 ml) DIPEA wurde mit NMP *ad* 200 ml versetzt, um die 1 M Aktivatorbase herzustellen.

Für die Zubereitung der Fmoc-Abspaltlösung sind 20 ml Piperidin und 20 ml DBU *ad* 200 ml mit DMF gelöst worden.

Nach jedem erneuten Auffüllen der Vorratsgefäße des Syntheseapparates erfolgte ein *flow-test* entsprechend der Betriebsanleitung, um einen einwandfreien Transport der Reagenzien zu kontrollieren und gegebenenfalls zu justieren.

Für die Synthese wurde das *FastMOC* Protokoll des Herstellers verwendet. Dem ersten Doppelkupplungszyklus geht ein Quellschritt für den polymeren Träger von 20 Minuten voraus. Der Doppelkupplungsschritt ist aus einer zweimal acht Minuten Fmoc-Abspaltung,

zweimal 45 Minuten Kupplung der Aminosäuren und Waschen zwischen den einzelnen Schritten aufgebaut. Zum Abschluss einer Synthese erfolgte im Automaten das Waschen des Harzes für zweimal zehn Minuten mit DCM.

3.2.7. Vorschrift zur Kontrolle des Syntheseverlaufes - „Kontrollabspaltung“

Um den Verlauf der Peptidsynthese an der festen Phase qualitativ zu überprüfen, wurden nach einer gewünschten Anzahl an Kupplungszyklen die Synthese unterbrochen, das Peptid vom polymeren Träger sowie gleichzeitig der Seitenkettenschutz abgespalten und mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert.

Hierfür ist nach erfolgter Synthese das Harz mit DCM gewaschen und im Vakuumschrank für eine Stunde getrocknet worden. Anschließend wurden ca. 5 mg des Harz-gebundenen Peptids in eine 2 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden überführt und mit einem Stempel verschlossen. In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 25 µl Wasser, 25 µl TIS sowie 450 µl TFA vereint, über eine Kanüle in die Spritze überführt und mittels Luer-Stopper verschlossen. Nachdem der Reaktionsansatz für 30 Minuten auf einem Thermomixer unter starkem Schütteln belassen worden war, wurde die Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für weitere zwei Stunden im Thermomixer geschüttelt. Im Stickstoffstrahl war die TFA abgedampft und der Rückstand mit 1 ml eiskaltem Diethylether gefällt worden. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit einer Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert und der Diethylether vom Präzipitat durch Dekantieren getrennt. Das Präzipitat ist nachfolgend dreimal mit eiskaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und vom Lösungsmittel separiert worden. Das Entfernen der restlichen Spuren von Diethylether erfolgte vorsichtig mit einem Stickstoffstrahl.

Das so erhaltene Produkt wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und mittels analytischer HPLC untersucht. Gleichzeitig erfolgte das Sammeln von Fraktionen für massenspektrometrische Untersuchungen.

3.2.8. Vorschrift zur Synthese seitenkettengeschützter Peptidsäuren - „HFIP-Abspaltung“

Die Generierung von vollgeschützten, C-terminal freien Peptiden für die Darstellung der Substratmimetika erfolgte in Anlehnung an [202]. Dazu wurde nach erfolgter Festphasen-Peptidsynthese das an 2-Chlortrityl-Harz gebundene Peptid in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden überführt, zweimal für zwei Stunden mit 10 ml einer 30%-igen (v/v) HFIP-Lösung in DCM inkubiert und stark geschüttelt. Anschließend sind die Lösungen in einem 100 ml Rundkolben vereint worden, das in der Spritze verbliebene Harz wurde mehrmals mit

DCM gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Rundkolben gegeben. Mittels Rotationsverdampfer erfolgte das Abdampfen des Lösungsmittelgemisches, wobei der Rückstand mehrfach mit Isopropanol gewaschen und bis zur Trockne eingeengt wurde. Die Trocknung der vollgeschützten Peptidsäure geschah über Nacht unter Vakuum.

3.2.9. Simultane Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen und des Peptids vom polymeren Träger

Das nach erfolgter Festphasensynthese erhaltene Harz-gebundene Peptid wurde in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden überführt und mit einem Stempel verschlossen. Über eine Kanüle wurden 5 ml einer Lösung bestehend aus 250 µl Wasser, 250 µl TIS und 4,5 ml TFA in die Spritze aufgezogen und diese anschließend für 30 Minuten stark geschüttelt. Nachfolgend wurde die Lösung in einen 100 ml Kolben überführt, das Harz mit TFA gewaschen und die Lösung für weitere drei Stunden gerührt. Das Abdampfen der TFA nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgte mittels Vakuum und die Fällung des Peptids aus dem öligen Rückstand mit eiskaltem Diethylether. Abschließend ist das Peptid mittels Fritte vom Lösungsmittel separiert und mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen und über Nacht im Vakuumschrank getrocknet worden.

3.2.10. Parameter für CD-spektroskopische Untersuchungen

Zur Aufzeichnung der CD-Spektren wurden folgende Geräteparameter eingestellt:

Bandbreite:	1,0 nm
Antwortzeit:	1 Sekunde
Sensitivität:	Standard
Messbereich:	260 - 190 nm
Messpunktabstand:	1 nm
Aufzeichnungsgeschwindigkeit:	200 nm/min
Datenakkumulation:	20

Die verwendete Küvette hatte einen Schichtdicke von 0,1 cm.

3.3. Methoden Teil A – „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“

3.3.1. Synthese von HOGp(Boc)₂

Die Synthese des *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten 4-Guanidinophenols erfolgte in Anlehnung an [203]. Dementsprechend wurden 40 mmol *N,N'*-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*S*-Methylisothioharnstoff und 60 mmol 4-Aminophenol mit 250 ml THF in einem 500 ml Einhalsrundkolben gelöst. Anschließend ist die Lösung für zehn Minuten mit Argon begast und mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen worden. Nach 120 Stunden starken Rührens wurde das THF mittels Rotationsverdampfer abdestilliert. Der dunkle, ölige Rückstand ist in wenig Acetonitril aufgenommen und das Produkt mit Wasser gefällt worden. Das Präzipitat wurde abgefrittet und im Vakuumschrank über Phosphorpentoxid getrocknet. Anschließend erfolgte eine Reinigung mittels Säulenchromatographie. Dazu wurde Kieselgel 60 mit DCM aufgeschlämmt und in eine Flash-Säule gefüllt. Jeweils 5 g Rohprodukt sind in 10 ml DCM resuspendiert und auf die Säule gegeben worden. Die Elution erfolgte mit mehreren Säulenvolumen DCM und anschließend mit 10% (v/v) MeOH in DCM. Die Analytik ist mittels Dünnschichtchromatographie in einem Laufmittelsystem bestehend aus 10% (v/v) MeOH in DCM sowie RP-HPLC durchgeführt worden. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch unter Vakuum evaporiert und das Produkt im Vakuumschrank getrocknet.

3.3.2. Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH

1 mmol (470 mg) Fmoc-D-Lys(Boc)-OH wurde in einem Rundkolben mit 2,5 ml DCM und 2,5 ml TFA unter Rühren zur Reaktion gebracht, um die *N*^c-Boc-Schutzgruppe zu entfernen. Nach 30 Minuten ist die Lösung im Vakuum eingeeengt worden. Der Rückstand wurde mit Diethylether gefällt, mittels Fritte vom Lösungsmittel getrennt und im Vakuum getrocknet.

Zur Biotinylierung der *N*^c-Aminogruppe sind 0,98 mmol (473 mg) Fmoc-D-Lys-OH · TFA und 1 mmol (342 mg) Biotin-OSu in 10 ml DMF gelöst worden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 mmol (428 µl) DIPEA gestartet, wobei die Reaktionskontrolle mittels HPLC erfolgte. Nach vollständigem Umsatz von Fmoc-D-Lys-OH · TFA ist das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt, das Produkt mit Wasser aus dem öligen Rückstand gefällt, abgefrittet und mit wenig eiskaltem DCM sowie Diethylether gewaschen worden. Über Nacht erfolgte die Trocknung im Vakuumschrank bei Anwesenheit von Phosphorpentoxid.

3.3.3. Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH

3.3.3.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

Zur Synthese des C-terminalen Fragments, welches die D-Aminosäuren Arg48 bis Lys81 umfasst, wurden 0,125 mmol des nach 3.2.1. beladenen H-D-Lys(Boc)-2-CITrt-Harzes in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und für 20 Minuten mit NMP gequollen.

0,375 mmol (224 mg) Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH sind nach Vorschrift 3.2.5. an H-D-Lys(Boc)-2-CITrt-Harz geknüpft worden. Anschließend wurde das Trägermaterial gewaschen, getrocknet und in einen entsprechenden Reaktor für den Syntheseapparat überführt.

Im ersten Syntheseabschnitt erfolgte das Knüpfen der D-Aminosäuren Glu79 bis Arg69 mittels automatisierter Festphasen-Peptidsynthese entsprechend 3.2.6., woran sich eine „Kontrollabspaltung“ gemäß 3.2.7. anschloss.

Der zweite Syntheseabschnitt umfasste das Knüpfen der Aminosäuren Gly68 bis D-Ala57. Der Syntheseverlauf ist mit Hilfe einer „Kontrollabspaltung“ entsprechend 3.2.7. analysiert worden.

Aufgrund der unter 4.1.3. beschriebenen Ergebnisse wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen.

3.3.3.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

Ziel dieser Synthesestrategie war die separate Darstellung der drei Fragmente Fmoc-D-Arg(Pbf)48-Gly56-OH, Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH sowie H-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81-2-CITrt und deren Verknüpfung in einem konvergenten Ansatz.

Die Synthese des Fragments Fmoc-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81-2-CITrt-Harz erfolgte analog zur Synthesestrategie I. Zur Darstellung des Fragments Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH wurden 0,125 mmol H-Gly-2-CITrt-Harz eingesetzt. Die Kupplung der D-Aminosäuren Pro67 und Thr66 sowie die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte manuell wie unter 3.2.5. bzw. 3.2.4. beschrieben.

Im Synthesizer wurde die Synthese von Position D-Thr65 bis D-Ala57 fortgesetzt. Anschließend erfolgte das Waschen des Harzes mit DCM und eine „Kontroll-“ als auch „HFIP-Abspaltung“ nach 3.2.7. bzw. 3.2.8..

0,1 mmol (219 mg) des Fragments Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH wurden nach Lösen in 5 ml NMP und zehnmütiger Ultraschallbehandlung mit 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt sowie 0,2 mmol (35 µl) DIPEA aktiviert und zu 0,05 mmol am Träger gebundenes Peptid H-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81, welches zuvor 20 Minuten in NMP gequollen wurde,

gegeben. Nach Ablauf einer Reaktionszeit von zwei Stunden erfolgten das Waschen des Harzes mit NMP und DCM sowie eine „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7.. Die Acetylierung nicht reagierter Aminofunktionen wurde durch eine dreimal zehnmünütige Behandlung mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid und 10% (v/v) DIPEA in DMF erreicht. Abschließend erfolgte das Entfernen der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach Vorschrift 3.2.4..

Zur Synthese des *N*-terminalen Fragments Fmoc-D-Arg(Pbf)₄₈-Gly₅₆-OH wurden 0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz entsprechend 3.2.5. mit Fmoc-D-Lys(Boc)-OH acyliert. Im Syntheseautomaten erfolgten die Kupplungen der Aminosäuren bis D-Arg₄₈ und nach einer „Kontrollabspaltung“ (siehe 3.2.7.) ist das Polymer-gebundene Peptid einer „HFIP-Abspaltung“ (siehe 3.2.8.) unterzogen worden. Um genügend Material zu erhalten, wurde diese Synthese zweimal durchgeführt.

0,1 mmol (204 mg) des dementsprechend dargestellten Peptids sind in einem 10 ml Rollrandgefäß in 5 ml NMP gelöst und für zehn Minuten mit Ultraschall behandelt worden. Mittels 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt sowie 0,2 mmol (35 µl) DIPEA wurde die Carbonsäurefunktion in fünf Minuten aktiviert. Diese Lösung ist dem am 2-ClTrt-Harz immobilisierten Peptid H-D-Ala₅₇-D-Lys(Boc)₈₁ zugefügt worden, welches sich in einer 10 ml Spritze mit Frittenboden befand und 20 Minuten in NMP gequollen wurde. An eine zweistündige Reaktionszeit schloss sich das Waschen des Harzes mit NMP sowie DCM als auch eine „Kontrollabspaltung“ nach Methode 3.2.7. an. Nachfolgend wurden nicht umgesetzte Aminofunktionen durch eine Acetylierung blockiert. Dazu ist der polymere Träger dreimal für zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid und 10% (v/v) DIPEA in DMF behandelt worden. Nach dem Waschen mit DMF erfolgte das Freisetzen des *N*-Terminus entsprechend 3.2.4..

Das Abspalten des Peptids H-D-Arg₄₈-D-Lys₈₁-OH vom 2-ClTrt-Harz sowie das simultane Freisetzen der Seitenkettenfunktionen trifunktioneller Aminosäuren wurde mit einer TFA-Abspaltung nach Vorschrift 3.2.9. realisiert. Das erhaltene Rohpeptid ist präparativ mittels HPLC gereinigt und ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen sind vereint und lyophilisiert worden.

3.3.3.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

Die Synthese des Fragments Fmoc-D-Arg₆₉-D-Lys₈₁-2-ClTrt-Harz erfolgte analog zur Synthesestrategie I. Anschließend wurde das Harz in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden überführt. Die Kupplungen der nachfolgenden Aminosäuren Gly₆₈, D-Pro₆₇ und D-Thr₆₆ sowie Fmoc-Abspaltungen erfolgten entsprechend 3.2.4. und 3.2.5. manuell. Im

Synthesizer wurde die Synthese des Fragments bis D-Ala57 fortgesetzt und im Anschluss einer „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7. unterzogen. Das am polymeren Träger gebundene Peptid ist nachfolgend in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden gegeben und Gly57 sowie D-Lys56 von Hand mit den unter 3.2.4. und 3.2.5. beschriebenen Bedingungen gekuppelt worden. Die Fortsetzung der Synthese erfolgte im Automaten bis D-Arg48.

Das nach erfolgter Festphasensynthese Harz-gebundene Peptid wurde in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden überführt und einer TFA-Abspaltung nach 3.2.9. unterworfen.

Zur Reduzierung von eventuell entstandenem Biotinsulfoxid wurde das gefällte Produkt mit 5 ml einer Lösung aus 96% TFA, 1,6% EDT sowie 2,4% TMSBr (v/v/v) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt [204]. Anschließend wurde die TFA mittels Vakuum entfernt und das Produkt aus dem öligen Rückstand mit eiskaltem Diethylether gefällt. Das *N*-terminal Fmoc-geschützte Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und die Produkt enthaltenden Fraktionen miteinander vereint und gefriergetrocknet.

Nachfolgend wurde das Produkt für zehn Minuten mit 10 ml einer 50%igen (v/v) Morpholin-Lösung in DMF versetzt um den *N*-Terminus freizusetzen. Das Lösungsmittelgemisch ist mit einem Rotationsverdampfer entfernt worden, der Rückstand wurde in 1%iger (v/v) wässriger TFA-Lösung gelöst und unter Verwendung einer präparativen HPLC gereinigt. Exklusiv Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert.

3.3.4. Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp

3.3.4.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz wurden in einen entsprechenden Reaktor für den Synthesepara-apparat eingewogen und die automatisierte Kupplung der Aminosäuren bis D-Ser37 durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Kontrollabspaltung entsprechend 3.2.7.. Beruhend auf den unter 4.3.4. beschriebenen Ergebnissen wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen und diese Synthesestrategie unter den gegebenen Bedingungen verworfen.

3.3.4.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

Innerhalb dieser Strategie wurde das Fragment in vier Subfragmente aufgeteilt, welche in einer konvergenten Synthese zum entsprechenden Produkt führen sollte.

0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz wurde in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Nachfolgend wurde Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH nach Methode 3.2.5. gekuppelt und die Synthese im Automaten bis D-Lys43 fortgesetzt. An-

3. MATERIAL UND METHODEN

schließlich wurde das Harz einer „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7. und einer *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen-Abspaltung entsprechend 3.2.4. unterworfen, mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuumschrank getrocknet.

Für die Synthese des *N*-terminal- und seitenkettengeschützten Peptids Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-D-Pro₄₂-OH wurden 0,125 mmol H-D-Pro-2-CITrt-Harz eingewogen, mit Fmoc-D-Thr(*t*Bu)-OH entsprechend 3.2.5. acyliert und im Synthesizer die Anheftung der Aminosäuren bis D-Ser₃₇ fortgesetzt. Anschließend wurde die Synthese qualitativ kontrolliert (Methode 3.2.7.) und das Produkt einer „HFIP-Abspaltung“ nach Methode 3.2.8. unterzogen.

Für die Segmentkondensation von Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-D-Pro₄₂-OH mit H-D-Lys(Boc)₄₃-Gly₄₇₋₂-CITrt wurden 0,05 mmol des trägergebundenen Peptids in einer 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden 20 Minuten in NMP gequollen. In einem 10 ml Rollrandgefäß sind 0,1 mmol (101 mg) des vollgeschützten Peptids Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-D-Pro₄₂-OH in 5 ml NMP gelöst und zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt worden. Diese Lösung wurde mit 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt sowie 0,25 mmol (35 µl) DIPEA versetzt und nach fünf Minuten Aktivierung über eine Kanüle in die Fritte mit dem Träger-gebundenen Peptid überführt. Nach einer Kupplungszeit von zwei Stunden wurde das Harz mehrmals mit NMP gewaschen und einer „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7. unterworfen. Die Blockierung nicht reagierter Aminofunktionen erfolgte durch eine dreimal zehninminütige Behandlung mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF. Eine Fmoc-Abspaltung (3.2.4.) sowie Waschen mit DMF und DCM ist abschließend durchgeführt worden.

Zur Synthese des Fragmentes H-D-Arg₂₉-D-Pro₃₆₋₂-CITrt wurde Fmoc-D-Glu(*O**t*Bu)-OH entsprechend 3.2.5. an 0,125 mmol H-D-Pro-2-CITrt gekuppelt. Die Aminosäuren bis D-Arg₂₉ sind im Syntheseautomaten angefügt worden. Nach einer „Kontrollabspaltung“ (Methode 3.2.7.) wurde die Fmoc-Schutzgruppe des *N*-Terminus nach Methode 3.2.4. entfernt, das Harz mit DMF, DCM sowie Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Für die Darstellung des vollgeschützten Fragmentes Fmoc-D-Arg(Pbf)₂₅-D-Pro₂₈-OH wurde entsprechend der Vorschrift 3.2.5. Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH an 0,125 mmol H-D-Pro-2-CITrt-Harz geknüpft. Die Aminosäuren bis D-Arg₂₅ wurden vom Synthesizer gekuppelt. Nach Ablauf der automatisierten Peptidsynthese wurde nach Methode 3.2.7. eine „Kontrollabspaltung“ durchgeführt. Um die vollgeschützte Peptidsäure zu erhalten, ist das Polymer-gebundene Peptid einer „HFIP-Abspaltung“ nach 3.2.8. unterworfen worden.

0,1 mmol (121 mg) des vollgeschützten Peptids Fmoc-D-Arg(Pbf)₂₅-D-Pro₂₈-OH wurden in einem 10 ml Rollrandgefäß mit 5 ml NMP gelöst, zehn Minuten mit Ultraschall behandelt und

3. MATERIAL UND METHODEN

mit 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt und 0,2 mmol (35 μ l) DIPEA für fünf Minuten aktiviert. Diese Lösung wurde zu 0,05 mmol Träger-gebundenem Fragment H-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-2-ClTrt gegeben, welches zuvor 20 Minuten mit NMP gequollen worden war. Nach Ablauf einer Kupplungszeit von zwei Stunden wurde das Harz mit NMP, DMF, DCM gewaschen. Die Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen erfolgte durch Acetylierung. Dazu wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF versetzt und anschließend mit DMF und DCM gewaschen. Daran anschließend erfolgte die Abspaltung der N^α -Fmoc-Schutzgruppe nach 3.2.4. sowie die Einführung der Z-Schutzgruppe. Dies wurde durch zweimaliges Inkubieren des immobilisierten Peptids mit 0,2 mmol (50 mg) Z-OSu und 0,4 mmol (69 μ l) DIPEA in NMP für zwei Stunden realisiert. Dem schloss sich eine „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7. an.

Für die Segmentkondensation zur Darstellung der vollgeschützten Peptidsäure Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-OH sind 0,1 mmol (283 mg) Z-D-Arg(Pbf)25-D-Pro36-OH, 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 1 mmol (14 mg) HOBt in 5 ml NMP gelöst worden. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 0,2 mmol (35 μ l) DIPEA. Diese Lösung wurde anschließend zu 0,05 mmol in NMP gequollenem H-D-Ser(*t*Bu)37-Gly-2ClTrt-Harz gegeben und für zwei Stunden geschüttelt. Nach zwei Stunden Kupplung war das Harz mit NMP, DMF, DCM gewaschen worden. Zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF versetzt (Acetylierung) und anschließend mit DMF und DCM gewaschen.

Zur Generierung des vollgeschützten Fragments Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-OH wurde das Träger-gebundene Peptid einer „HFIP-Abspaltung“ entsprechend 3.2.8. unterzogen.

0,02 mmol (100 mg) des so erhaltenen Peptids sind in einen 100 ml Rundkolben eingewogen, in 5 ml absolutem DMF gelöst und für zehn Minuten Ultraschall ausgesetzt worden. 0,6 mmol (210 mg) HOGp(Boc)₂, 0,10 mmol (52 mg) PyBOP[®], 0,10 mmol (17 μ l) DIPEA sowie 3 Å Molsieb wurden anschließend zugefügt, der pH-Wert auf 8 eingestellt und der Kolben mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen. Das Lösungsmittel ist nach vier Stunden rühren vom Molsieb getrennt und im Vakuum abgedampft worden.

Der ölige Rückstand wurde mit 10 ml einer Abspalllösung aus 5% Wasser (v/v), 5% TIS (v/v) in TFA versetzt und für drei Stunden stark gerührt, um sowohl die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen aller trifunktioneller Aminosäuren als auch der Boc-Schutzgruppen der Alkoholkomponente zu realisieren. Nachfolgend wurde der Abspaltmix im Vakuum eingengt und aus dem Rückstand der *N*-terminal Z-geschützte Peptidester mit eiskaltem

Diethylether gefällt. Das Rohprodukt ist nach Abfritten und Waschen mit Diethylether einer präparativen HPLC-Reinigung unterworfen worden. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert.

3.3.4.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz wurden in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Anschließend wurde D-Arg46 mit den unter 3.2.5. genannten Bedingungen gekuppelt. Die weitere Synthese wurde im Syntheseapparat bis D-Lys43 fortgeführt. Anschließend wurden die Aminosäuren D-Pro42 sowie D-Thr41 manuell nach Methode 3.2.5. geknüpft. Die Aminosäuren D-Pro40 bis D-Ser37 sind mittels Synthesizer geknüpft worden. Die Aminosäuren D-Pro36 und D-Glu35 sind wiederum per Hand gekuppelt worden. Die Fortsetzung der Synthese bis Position D-Arg29 erfolgte vollautomatisiert im Synthesizer. Mit den Bedingungen unter 3.2.5. sind nachfolgend die D-Aminosäuren Pro28 und Arg27 eingebaut worden. Die Synthese wurde bis D-Arg25 im Automaten fortgesetzt. Zur Blockierung freier Aminofunktionen wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF versetzt und anschließend mit DMF und DCM gewaschen. Abschließend wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe nach Methode 3.2.4. abgespalten.

Zur Einführung der *N*-terminalen Z-Schutzgruppe wurde der polymere Träger zweimal zwei Stunden mit einer Lösung aus 0,5 mmol (125 mg) Z-OSu, 1 mmol (172 μ l) DIPEA, gelöst in 5 ml NMP, inkubiert und nachfolgend mit DMF und DCM gewaschen. Der Verlauf der Synthese wurde mit der Methode 3.2.7. überprüft.

Um die vollgeschützte Peptidsäure zu erhalten, wurde das Harz nach dem unter 3.2.8. beschriebenen Protokoll einer „HFIP-Abspaltung“ unterzogen.

Zur Veresterung sind 0,05 mmol (245 mg) Peptid in einen 100 ml Rundkolben eingewogen, in 5 ml absolutem DMF gelöst und für zehn Minuten Ultraschall ausgesetzt worden. Anschließend wurden 1,5 mmol (527 mg) HOGp(Boc)₂, 0,25 mmol (130 mg) PyBOP[®], 0,25 mmol (43 μ l) DIPEA sowie 3 Å Molsieb zugefügt, der pH-Wert auf 8 eingestellt und der Kolben mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen. Nach vier Stunden Rühren wurde die Lösung vom Molsieb getrennt und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft.

Zur simultanen Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen des Peptidesters und der Boc-Schutzgruppen der Alkoholkomponente wurde der Rückstand mit 10 ml einer Abspalllösung aus 5% Wasser (v/v), 5% TIS (v/v) in TFA versetzt und für drei Stunden stark gerührt. Nachfolgend wurde der Abspaltmix im Vakuum eingeeengt und aus dem Rückstand der *N*-terminal Z-geschützte Peptidester mit eiskaltem Diethylether gefällt. Nach Abfritten und

Waschen des Rohprodukts mit Diethylether wurde dieses einer präparativen HPLC-Reinigung unterworfen. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen sind vereint und lyophilisiert worden.

3.3.5. Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp

3.3.5.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz wurden in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Mit den unter 3.2.5. genannten Bedingungen wurde D-Arg23 gekuppelt. Die D-Aminosäuren Lys22 bis Leu11 wurden mittels Synthesepapparat gekuppelt. Eine „Kontrollabspaltung“ ist nachfolgend gemäß Methode 3.2.7. durchgeführt worden. Aufgrund der unter 4.1.5. beschriebenen Ergebnisse wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen.

3.3.5.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

In einem konvergenten Syntheseansatz, bestehend aus der Ligation von drei Fragmenten, sollte die Darstellung des Fragmentes Ac-D-Ser1-Gly24-OGp realisiert werden.

In eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden wurden 0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt-Harz eingewogen und 20 Minuten in NMP gequollen. Anschließend wurde Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH nach der in 3.2.5. beschriebenen Methode gekuppelt, die Synthese im Synthesepapparat bis D-Thr20 fortgesetzt, eine „Kontrollabspaltung“ entsprechend 3.2.7. durchgeführt und der N-Terminus entsprechend 3.2.4. freigesetzt.

In einem weiteren 10 ml Reaktor wurden 0,125 mmol H-Gly-2-ClTrt eingewogen und nach 20 Minuten quellen mit Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH nach den unter 3.2.5. gegebenen Bedingungen umgesetzt. Nachfolgend wurde die Synthese im Automaten bis D-Leu11 fortgesetzt. Es erfolgte eine Kontrolle der Synthese wie unter 3.2.7. beschrieben und die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach 3.2.4.. Anschließend wurde die vollgeschützte Peptidsäure durch eine „HFIP-Abspaltung“ nach 3.2.8. dargestellt.

Für die chemische Ligation wurden 0,05 mmol H-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-2-ClTrt-Harz in 5 ml NMP gequollen. 0,1 mmol (181 mg) Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH sind mit 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt und 0,2 mmol (34 μ l) DIPEA für fünf Minuten aktiviert und dem polymeren Träger zugeführt worden. Nach zwei Stunden wurde der Träger von der Lösung separiert und nicht umgesetzte Aminosäuren acetyliert. Hierfür wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA

in DMF versetzt und anschließend mit DMF und DCM gewaschen. Das Freisetzen des *N*-Terminus erfolgte nach Methode 3.2.4. im Reaktor.

Für die Darstellung des geschützten Peptids Fmoc-D-Ser(*t*Bu)1-D-Pro10-OH wurden 0,125 mmol H-D-Pro-2-CITrt-Harz eingewogen, das Harz 20 Minuten in NMP gequollen und Fmoc-D-Gln(Trt)-OH mit den Bedingungen unter 3.2.5. gekuppelt. Mittels automatisierter Festphasensynthese wurde das Fragment bis D-Ser1 vervollständigt und mit einer „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.7. überprüft. Nach Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe, wie unter 3.2.4. beschrieben, erfolgte die Acetylierung des *N*-Terminus. Dazu wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF versetzt und anschließend mit DMF und DCM gewaschen. Nachfolgend ist das am 2-CITrt-Harz gebundene Peptid einer „HFIP-Abspaltung“ nach Methode 3.2.8. unterworfen worden.

0,05 mmol H-D-Leu11-Gly24-2-CITrt wurden für die chemische Ligation in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. 0,1 mmol (179 mg) des Fragmentes Ac-D-Ser1-D-Pro10-OH sind in einem 10 ml Rollrandgefäß in 5 ml NMP gelöst und für zehn Minuten mit Ultraschall behandelt worden. Die Aktivierung der Carbonsäurefunktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 mmol (41 mg) HCTU, 0,1 mmol (14 mg) HOBt und 0,2 mmol (35 µl) DIPEA. Nach fünf Minuten wurde diese Lösung über eine Kanüle dem polymeren Träger zugefügt und für zwei Stunden auf einem Blutrotierer belassen. An die Ligation schloss sich die Acetylierung nicht reagierter Aminofunktionen an. Dazu wurde das Harz dreimal zehn Minuten mit einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid sowie 10% (v/v) DIPEA in DMF versetzt und anschließend mit DMF und DCM gewaschen. Zur Überprüfung der Reaktion wurde eine „Kontrollabspaltung“ nach 3.2.5. durchgeführt.

Das zur Veresterung notwendige vollgeschützte Peptid wurde durch eine „HFIP-Abspaltung“ entsprechend 3.2.8. generiert. Zur Veresterung sind 0,05 mmol (220 mg) Peptid in einen 100 ml Rundkolben eingewogen, in 5 ml absolutem DMF gelöst und für zehn Minuten dem Ultraschall ausgesetzt worden. Anschließend wurden 1,5 mmol (527 mg) HOGp(Boc)₂, 0,25 mmol (130 mg) PyBOP[®], 0,25 mmol (43 µl) DIPEA sowie 3 Å Molsieb zugefügt, der pH-Wert auf 8 eingestellt und der Kolben mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen. Nach vierstündiger Reaktion wurde die Lösung vom Molsieb getrennt und im Vakuum das Lösungsmittel abgedampft. Das Abspalten der Schutzgruppen erfolgte analog zu 3.2.9.. Das Rohprodukt ist präparativ mittels HPLC gereinigt worden.

3.3.5.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

In eine 10 ml Polypropylen-Spritze wurden 0,125 mmol H-Gly-2-CITrt eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Nachfolgend ist Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH mit den unter 3.2.5. beschriebenen Bedingungen gekuppelt worden. Im Synthesizer wurde die Synthese bis D-Thr20 fortgesetzt. Die Kupplungen der Aminosäuren Gly(Dmb)19 und D-Asp18 sowie die entsprechenden Abspaltungen der Fmoc-Schutzgruppe erfolgten mit den Vorschriften aus 3.2.4. und 3.2.5.. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen geschah sowohl manuell, als auch im Synthesizer mit 20% (v/v) Piperidin in DMF. Die Synthese wurde im Syntheseparat bis D-Leu11 fortgesetzt. Entsprechend 3.2.4. und 3.2.5. wurden die D-Aminosäuren Pro10 sowie Gln9 manuell gekuppelt und die Synthese im Synthesizer bis D-Ser1 fortgesetzt. Nachfolgend wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung aus 20% (v/v) Piperidin in DMF entfernt und der *N*-Terminus acetyliert. Dazu ist der polymere Träger dreimal zehn Minuten mit 8 ml einer Lösung aus 10% (v/v) Acetanhydrid, 10% (v/v) DIPEA in DMF inkubiert und nachfolgend mit DMF sowie DCM gewaschen worden. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Synthese nach 3.2.7..

Im nachfolgenden Schritt wurde das vollgeschützte Peptid mit dem unter 3.2.8. beschriebenen Protokoll vom polymeren Träger abgelöst.

Für die Veresterung wurden 0,09 mmol (396 mg) vollgeschütztes Ac-D-Ser(*t*Bu)1-Gly24-OH mit 2,7 mmol (950 mg) HOGp(Boc)₂ in einen 100 ml Rundkolben eingewogen, in 10 ml absolutem DMF gelöst und zehn Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 0,45 mmol (234 mg) PyBOP[®], 0,45 mmol (77 µl) DIPEA sowie 3 Å Molsieb zugegeben und der Kolben mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Zur Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen wurde der Rückstand mit 5 ml einer Lösung aus 5% Wasser, 5% TIS und 90% TFA (v/v/v) versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachfolgend wurde der Abspaltmix im Vakuum entfernt und der Peptidester mit eiskaltem Diethylether gefällt. Das gefällte Produkt wurde mit einer Fritte vom Lösungsmittel separiert und einer Reinigung mittels präparativer HPLC unterworfen. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen sind vereint und lyophilisiert worden.

3.3.6. Aktivierung der Cystein-Protease Clostripain und Kontrolle der Aktivität

Die Aktivierung der Protease erfolgte nach dem von PORTER *et al.* veröffentlichten Protokoll [112]. Dementsprechend wurde für die Herstellung von 1 ml einer doppelt konzentrierten

Aktivierungslösung 5 μmol (0,771 mg) DTT in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen, in 998 μl Wasser gelöst und 2 μl einer 1 M CaCl_2 Lösung zugegeben.

Zur Herstellung und Aktivierung von 100 μl einer 10^{-4} M CLP-Stammlösung wurden 0,55 mg lyophilisiertes Clostripain in ein 1,5 ml Kryoröhrchen eingewogen, mit 50 μl Wasser gelöst, 50 μl der frisch hergestellten Aktivierungslösung zugefügt und für zwei Stunden bei 25 °C in einem Thermomixer unter sanftem Schütteln belassen. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Aktivität des Enzyms durch enzymatische Hydrolyse des Benzoyl-Glycyl-4-Guanidinophenylesters.

3.3.7. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH

3.3.7.1. Spontane Esterhydrolyse

In ein 500 μl Reaktionsgefäß wurden 22,5 μl Wasser mit 25 μl des doppelt konzentrierten Puffers (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl_2 , pH 8,0) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 μl einer 20 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp salzsauren, wässrigen Stammlösung (pH 6,5) und die Inkubation bei 30 °C im Thermomixer. Nach definierten Zeiträumen wurden 6 μl Probenlösung entnommen, die Reaktion mit 24 μl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) abgebrochen und mittels RP-HPLC analysiert.

3.3.7.2. Enzymatische Esterhydrolyse

In separaten 500 μl Reaktionsgefäßen wurden in einem Endvolumen von 50 μl enzymatische Hydrolyseexperimente durchgeführt. Der Ansatz setzte sich aus 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , pH 8,0 und 1 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp mit entsprechenden Volumina an 10^{-4} M CLP Stammlösung und Wasser zusammen, um Enzymkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M bzw. $1 \cdot 10^{-7}$ M CLP im Ansatz zu erreichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C in einem Thermomixer. Nach definierten Zeiträumen wurden 6 μl Probenlösung entnommen, mit 24 μl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) vermengt und mittels HPLC analysiert.

3.3.7.3. Spontaner Acyltransfer

In ein 500 μl Reaktionsgefäß wurden 17,5 μl Wasser mit 25 μl des doppelt konzentrierten Puffers (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl_2 , pH 8,0), 5 μl einer 10 mM H-D-Arg48-D-Lys81-OH wässrigen Stammlösung, 2,5 μl einer 20 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp salzsauren, wässrigen Stammlösung (pH 6,5) pipettiert und bei 30 °C in einem Thermomixer geschüttelt.

Nach definierten Zeiträumen wurden 6 µl Probenlösung entnommen, mit 24 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) vermischt und mittels HPLC analysiert.

3.3.7.4. Optimierung des enzymatischen Acyltransfers

In separate 500 µl Reaktionsgefäße wurden in einem Endvolumen von 50 µl, welche 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0, 1 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp, 5 · 10⁻⁶ M CLP enthielten, entsprechende Volumina der 10 mM H-D-Arg48-D-Lys81-OH Stammlösung und Wasser gegeben, um finale Nukleophilkonzentrationen von 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 sowie 0,4 mM zu realisieren. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Protease gestartet und die Inkubation erfolgte bei 30 °C in einem Thermomixer. Nach definierten Zeitintervallen wurden 6 µl des Reaktionsansatzes entnommen, mit 24 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) versetzt und chromatographisch analysiert. Die Ausbeute berechnet sich nach Gleichung 2 (N = Nukleophil, E = Ester).

$$\text{Ausbeute in \%} = \frac{\text{Fläche N bei } t_0 - \text{Fläche N bei } t_x}{\text{Fläche N bei } t_0} * \frac{[\text{N}] \text{ in mM}}{[\text{E}] \text{ in mM}} * 100 \quad (\text{Gleichung 2})$$

3.3.7.5. Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl Puffer (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, pH 8,0), 333 µl 10 mM H-D-Arg48-D-Lys81-OH, 77 µl Wasser und 50 µl 20 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp pipettiert, dieser auf 30 °C temperiert und der Acyltransfer durch Zugabe von 50 µl 10⁻⁴ M CLP gestartet. Nach 45 Minuten ist der Reaktionsansatz mit 100 µl Stopplösung (10% (v/v) TFA in Wasser) versetzt worden.

Die Reinigung des Produkts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC. Neben der Isolierung des Produkts wurde auch nicht umgesetztes Nukleophil zurückgewonnen. Es sind ausschließlich Produkt- bzw. Nukleophil-enthaltende Fraktionen getrennt vereint und gefriergetrocknet worden.

3.3.8. Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH

Zur Abspaltung der N-terminalen Z-Schutzgruppe nach dem Protokoll von KISO *et al.* [205] sind pro Ansatz 2 µmol (20 mg) Z-D-Arg25-D-Lys81-OH in ein 1,5 ml Kryoröhrchen eingewogen und mit 0,96 mmol (112 µl) Thioanisol sowie 5,6 mmol (412 µl) TFA für drei Stunden in einem Thermomixer bei 30 °C unter heftigem Schütteln inkubiert worden. Nachfolgend wurde das Peptid aus der Lösung mit eiskaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert und

mittels semi-präparativer HPLC gereinigt. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert.

3.3.9. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH

3.3.9.1. Spontane Esterhydrolyse

In ein 500 µl Reaktionsgefäß wurden 22,5 µl Wasser mit 25 µl eines doppelt konzentrierten Puffers (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, pH 8,0) und 2,5 µl einer 20 mM Ac-D-Ser1-Gly24-OGp wässrigen Stammlösung (pH 6,5 mit HCl eingestellt) pipettiert. Nach definierten Zeiträumen wurden 6 µl Probenlösung entnommen sowie die Reaktion mit 24 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) abgebrochen und einer HPLC-Analyse unterworfen.

3.3.9.2. Enzymatische Esterhydrolyse

In separate 500 µl Reaktionsgefäße wurden in einem Endvolumen von 50 µl, welche 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0 und 1 mM Ac-D-Ser1-Gly24-OGp enthielten, entsprechende Volumina an 10⁻⁴ M CLP-Stammlösung und Wasser gegeben, um finale Enzymkonzentration von 1 · 10⁻⁵ M, 5 · 10⁻⁶ M bzw. 1 · 10⁻⁷ M CLP im Ansatz zu erreichen. Die Inkubation der Reaktionsmischung erfolgte bei 30 °C in einem Thermomixer. Nach definierten Zeiträumen wurden 8 µl Probenlösung entnommen, mit 22 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) vermengt und mittels HPLC analysiert.

3.3.9.3. Spontaner Acyltransfer

In ein 500 µl Reaktionsgefäß wurden 17,5 µl Wasser mit 25 µl des doppelt konzentrierten Puffers (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, pH 8,0), 5 µl einer 10 mM H-D-Arg25-D-Lys81-OH wässrigen Stammlösung und 2,5 µl einer 20 mM Ac-D-Ser1-Gly24-OGp salzsauren wässrigen Stammlösung (pH 6,5) pipettiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte im Thermomixer bei 30 °C. Nach definierten Zeiträumen wurden 8 µl Probenlösung entnommen, mit 22 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) vermischt und mittels HPLC analysiert.

3.3.9.4. Optimierung des enzymatischen Acyltransfers

In separate 500 µl Reaktionsgefäße wurden in einem Endvolumen von 50 µl, welche 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0, 1 mM Z-D-Arg25-Gly47-OGp und 5 · 10⁻⁶ M CLP enthielten, entsprechende Volumina der 10 mM H-D-Arg25-D-Lys81-OH Stammlösung und Wasser gegeben, um finale Nukleophilkonzentrationen von 1 mM, 2 mM, 3 mM und

4 mM zu realisieren. Bei weiteren Ansätzen wurde Tween 20 oder Harnstoff zugesetzt, wobei die finalen Konzentrationen 0,001% bzw. 0,5 M betragen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Protease gestartet und die Inkubation erfolgte bei 30 °C in einem Thermomixer. Nach definierten Zeitintervallen wurden 8 µl des Reaktionsansatzes entnommen, 22 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) zugesetzt und mit Hilfe von HPLC analysiert.

3.3.9.5. Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen

In 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden 200 µl Puffer (0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, pH 8,0), 120 µl 10 mM H-D-Arg25-D-Lys81-OH, 56 µl Wasser, 20 µl 20 mM Ac-D-Ser1-Gly24-OGp sowie 4 µl 0,1%-ige Tween-Lösung pipettiert, auf 30 °C temperiert und die Acyltransferreaktionen durch Zugabe von 20 µl 10⁻⁴ M CLP gestartet. Nach 45 Minuten sind die Reaktionsansätze mit 400 µl Stopplösung (1% (v/v) TFA in Wasser) versetzt worden.

Die Reinigung des Produkts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC. Neben der Isolierung des Produkts wurde auch nicht umgesetztes Nukleophil zurückgewonnen. Es sind ausschließlich Fraktionen, die Produkt bzw. Nukleophil enthielten, getrennt vereint und gefriergetrocknet worden.

3.4. Methoden Teil B – „Studien zur Synthese von *E. coli* Parvulin 10“

3.4.1. Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH

0,125 mmol 2-CITrt-Harz, mit der entsprechenden Aminosäure beladen, wurden in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und für 20 Minuten mit NMP gequollen. Im Anschluss erfolgte die Kupplung der jeweils zweiten Aminosäure der Sequenz manuell mit den unter 3.2.5. gegebenen Bedingungen. Die Synthese ist im Automaten fortgeführt worden. Zur simultanen Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen sowie der Peptidkette vom polymeren Träger wurde entsprechend 3.2.9. vorgegangen. Im Vakuum wurde die TFA abgedampft und der ölige Rückstand einer Fällung mit eiskaltem Diethylether unterworfen. Das erhaltene Rohprodukt ist abgefrittet, mit eiskaltem Diethylether gewaschen, getrocknet sowie HPLC-chromatographisch gereinigt worden. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

3.4.2. Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp

Fmoc-Ala-4-Sulfamylbutyrylaminomethyl-Polystyren-Harz wurde entsprechend 3.2.2. hergestellt und 0,125 mmol dieses substituierten Trägers in der automatisierten Festphasen-Peptidsynthese entsprechend 3.2.6. eingesetzt. Nach erfolgter Synthese ist das Harz mit NMP gewaschen und die *linker*-Gruppierung zweimal vier Stunden sowie einmal über Nacht mit 1,6 mmol (117 µl) Iodacetonitril und 0,68 mmol (118 µl) DIPEA in NMP entsprechend [206] aktiviert worden. Das Ablösen des Peptidesters resultierte durch die Zugabe von 1 mmol (683 mg) H-Gly-OGp(Boc)₂ · TOS und 1 mmol (172 µl) DIPEA in DMF bei pH 8 für 24 Stunden. Sowohl die Peptid-DMF Lösung als auch das DMF, mit dem das Harz nachgewaschen wurde, sind in einem Kolben vereint worden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wurde der ölige Rückstand einer unter 3.2.9. beschriebenen TFA-Abspaltung unterworfen.

3.4.3. Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH

0,125 mmol Fmoc-Asn(Trt)-2-CITrt-Harz wurden in eine 10 ml Polypropylenspritze mit Frittenboden eingewogen und 20 Minuten mit NMP gequollen. Anschließend erfolgte die manuelle Kupplung des Aminosäurederivates Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach dem Protokoll 3.2.5.. Die Kupplungen der Aminosäuren Tyr90 bis His37 wurden im Syntheseautomaten vorgenommen. An ausgewählten Positionen wurden „Kontrollabspaltungen“ gemäß 3.2.7. durchgeführt. Das

Lysin in Position 36 wurde als entsprechend N^α -Boc-geschützter Aktivester manuell gekuppelt. Dazu wurde das Harz in NMP gequollen, zweimal zwei Stunden mit 5 ml einer Lösung aus 0,5 mmol (222 mg) Boc-Lys(Boc)-OSu und 1,0 mmol (172 μ l) DIPEA in NMP inkubiert. Anschließend wurde der polymere Träger mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen sowie im Vakuumschrank getrocknet.

Die simultane Abspaltung der Peptidkette vom Träger und der Seitenketten-Schutzgruppen erfolgte mit den unter 3.2.9. beschriebenen Bedingungen. Die Reinigung des Rohprodukts fand mittels präparativer HPLC statt. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

3.4.4. Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl

Die Synthese des *N*-terminal Z-geschützten Parvulin 35mer Benzylesters erfolgte am 4-Sulfamylbenzoylaminomethyl-Polystyren-, 4-Sulfamylbutyrylaminomethyl- sowie 4-Sulfamylbutyrylaminomethyl-NovaGel-Harz, welche mit Fmoc-Ala-OH entsprechend der Vorschrift 3.2.2. beladen wurden. Das Kuppeln der Aminosäuren Leu33 bis Lys2 erfolgte im Syntheseautomaten mit den unter 3.2.6. dargestellten Bedingungen. Für Alanin in Position 1 wurde das entsprechende N^α -Z-geschützte Derivat eingesetzt und nach den unter 3.2.5. beschriebenen Bedingungen von Hand gekuppelt.

Im Anschluß an die Synthese erfolgte die Aktivierung des jeweiligen Peptid-*linker*-Harz-Konstrukts. Dazu wurde das Harz mit NMP gewaschen bzw. gequollen, anschließend zweimal für vier Stunden sowie einmal über Nacht mit 5 ml einer Lösung aus 1,6 mmol (117 μ l) Iodacetonitril und 0,68 mmol (118 μ l) DIPEA versetzt. Nachfolgend erfolgte das Waschen des Harzes mit NMP und DMF.

Für die Ablösung des vollgeschützten Peptidesters vom Harz ist dieses zweimal 12 Stunden mit 1 mmol (337 mg) H-Lys(Boc)-OBzl und 1 mmol (172 μ l) DIPEA in 5 ml DMF versetzt worden. Die Abspaltung sowie die DMF-Fractionen, welche durch Nachwaschen des polymeren Trägers erhalten wurden, sind in einem Kolben vereint und mit einem Rotationsverdampfer eingeeengt worden.

Der so erhaltene Rückstand wurde mit 5% Wasser, 5% TIS und 90% TFA (v/v/v) versetzt und für 3 Stunden stark gerührt, um die Seitenketten-Schutzgruppen abzuspalten. Anschließend wurde der Abspaltmix mittels Vakuum entfernt und aus dem öligen Rückstand der Peptidester mit eiskaltem Diethylether gefällt. Das nach Abfritten und Waschen mit Diethylether erhaltene Rohprodukt ist einer präparativen HPLC-Trennung unterworfen worden. Ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert.

3.4.5. ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika

In 500 µl Polypropylengefäßen wurden enzymatische Hydrolysen verschiedener Ester mit einem Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Der Ansatz enthielt 0,1 M HEPES (pH 8,0), 10% (v/v) DMF, 2 mM des jeweiligen Aminosäure(thio)esters und $1 \cdot 10^{-7}$ M bis $1 \cdot 10^{-5}$ M ADP.

Die Stammlösungen (20 mM) der entsprechenden Ester sind in DMF hergestellt worden, um eine vollständige Löslichkeit zu garantieren. Nach thermischer Äquilibrierung der Ester-Puffer-Lösung auf 30 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe der entsprechenden Volumina an wässriger 10^{-4} M ADP-Stammlösung gestartet. Zu definierten Zeitpunkten sind 10 µl Probe entnommen, mit 30 µl Stopplösung (50% (v/v) MeOH, 1% (v/v) TFA in Wasser) versetzt und mittels HPLC bei 254 nm analysiert worden.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der spontanen Esterhydrolyse wurden alle Reaktionen ohne die Zugabe der Protease durchgeführt.

3.4.6. ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden

In 500 µl Polypropylen-Reaktionsgefäßen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl Acyltransfer-Reaktionen durchgeführt. Der finale Ansatz bestand aus 0,1 M HEPES (pH 8,0), 10% (v/v) DMF, 2 mM Ester, 20 mM Nukleophil sowie $3,0 \cdot 10^{-7}$ M - $4,4 \cdot 10^{-5}$ M ADP. Um eine vollständige Löslichkeit der Ester (Ac-D-Phe-OMe, Bz-Phe-OGp, Bz-Ala-OGp, Bz-Leu-OGp, Bz-Lys-OGp, Bz-Gly-OGp, Bz-Glu-OGp) zu erreichen, wurden diese in DMF gelöst. Die 40 mM (effektive Konzentration) Nukleophil-Stammlösungen wurden durch Lösen der entsprechenden Mengen an L-Aminosäureamiden (H-Pro-NH₂, H-Glu-NH₂, H-Ser-NH₂, H-Gly-NH₂, H-Lys-NH₂, H-Val-NH₂, H-Arg-NH₂, H-Ile-NH₂, H-Phe-NH₂, H-Leu-NH₂, H-Met-NH₂) in 0,2 M HEPES Puffer (pH 8,0) hergestellt und der pH-Wert durch Zugabe entsprechender Mengen an NaOH auf pH 8,0 nachgestellt. Die Berechnung der effektiven Nukleophilkonzentration wurde mittels Gleichung 3 durchgeführt.

$$[Nu]_{eff}^- = \frac{[Nu]^-}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

[Nu] = Nukleophilkonzentration; pK = pK-Wert des Nukleophils; pH = pH-Wert der Reaktionslösung.

Nach thermischer Äquilibrierung des Ansatzes wurden die Reaktionen durch Zugabe der entsprechenden Volumina an wässriger 10^{-4} M ADP-Stammlösung gestartet. Die finalen Enzymkonzentrationen für die jeweiligen Ester betragen: Bz-Phe-OGp 43,6 µM, Bz-Ala-OGp

43,6 μM , Bz-Leu-OGp 43,6 μM , Bz-Lys-OGp 21,8 μM , Bz-Glu-OGp 21,8 μM , Bz-Gly-OGp 2,22 μM , Ac-D-Phe-OMe 0,27 μM .

Zur HPLC-Analyse bei 254 nm sind 10 μl des Ansatzes nach definierten Zeitintervallen mit 30 μl Stopplösung (50% (v/v) MeOH, 1% (v/v) TFA in Wasser) versetzt worden. Als Negativkontrolle (Bestimmung des Ausmaßes an spontaner Produktbildung) wurden alle Reaktionen ohne Enzym durchgeführt.

3.4.7. ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L-Peptide

In 500 μl Reaktionsgefäßen sind in einem Gesamtvolumen von 200 μl Acyltransferreaktionen in einem gepufferten System mit verschiedenen langen Acyldonoren und -akzeptoren durchgeführt worden. In Tabelle 2 sind die entsprechenden Kombinationen mit den jeweiligen Konzentrationen an Alkalischer D-Peptidase aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Acyldonoren und -akzeptoren mit den entsprechenden Konzentrationen an ADP

Acyldonor	Acylakzeptor	ADP Konzentration [M]
Bz-Gly-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	$5,5 \cdot 10^{-6}$
Bz-Gly-OGp	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	$5,5 \cdot 10^{-6}$
Bz-Phe-Gly-Gly-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	$7,1 \cdot 10^{-6}$
Bz-Phe-Gly-Gly-OGp	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	$7,1 \cdot 10^{-6}$
Bz-AYLDAYVKAG-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	$8,7 \cdot 10^{-6}$
Bz-AYLDAYVKAG-OGp	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	$8,7 \cdot 10^{-6}$

Die Nukleophil-Stammlösungen (20 mM) wurden durch Lösen der Peptide in 0,2 M HEPES (pH 8,0) hergestellt und der pH-Wert von 8,0 mittels NaOH nachgestellt. Die 20 mM Esterstammlösungen wurden in DMF als Lösungsmittel hergestellt, um eine vollständige Löslichkeit des Esters zu realisieren. Der finale Ansatz setzte sich aus 2 mM Acyldonor, 10 mM Acylakzeptor, 0,1 M HEPES (pH 8,0) und 10% DMF zusammen. Nach thermischer Äquilibrierung des Reaktionsansatzes auf 30 °C erfolgte die Zugabe der Peptidase. Mit einer 5%-igen wässrigen TFA-Lösung wurden nach definierten Zeiträumen die Reaktionen abgestoppt und mittels RP-HPLC analysiert.

Um spontane Produktbildung und Esterhydrolyse auszuschließen, wurden alle Reaktionen ohne Zugabe von Enzym durchgeführt. Durch massenspektrometrische Analysen wurde die Identität der Produkte bestätigt.

3.4.8. ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die Ligation der beiden Fragmente Z-Ala1-Lys35-OBzl und H-Lys36-Asn92-OH bei 30 °C in einem mit 0,1 M HEPES (pH 8,0) gepufferten System und Endvolumen von 0,5 ml durchgeführt. Zur Herstellung einer 1 mM Stammlösung von Z-Ala1-Lys35-OBzl wurde die entsprechende Menge an Ester in DMF gelöst. Die 0,2 mM Stammlösung des Nukleophils wurde mit einer 0,2 M HEPES Pufferlösung (pH 8,0) hergestellt. Im finalen Ansatz betragen die Konzentrationen 0,1 mM an Nukleophil und 0,2 mM an Ester. Die Zugabe der Alkalischen D-Peptidase, deren Konzentration im Ansatz $0,2 \cdot 10^{-5}$ M betrug, erfolgte nach thermischer Äquilibrierung des Ansatzes auf 30 °C. Nach definierten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und diese mit einer Stopplösung aus 5% (v/v) TFA in Wasser bzw. doppelt konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte mit RP-HPLC und SDS-PAGE. Durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie wurde die Identität des Produkts bewiesen. Die Bestimmung der Ausbeute über SDS-PAGE erfolgte densitometrisch sowie mittels HPLC. Dabei diente rekombinantes Parvulin 10 als Standard. Die angegebene berechnete Ausbeute stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Ligrationsreaktionen dar, die mittels HPLC und SDS-PAGE analysiert wurden.

Um eine ungewünschte Produktbildung sowie Hydrolyse des Esters auszuschließen wurden Kontrollreaktionen ohne Enzym und ohne Nukleophil durchgeführt.

3.4.9. Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10

Das durch die ADP-katalysierte Ligation erhaltene *N*^α-Z-geschützte *Escherichia coli* Par10 wurde mit Hilfe einer semi-präparativen HPLC-Trennung isoliert und die ausschließlich Produkt enthaltenen Fraktionen vereint sowie gefriergetrocknet. Entsprechend der Vorschrift von KISO *et al.* [205] wurde der *N*-Terminus durch Zugabe von 0,48 mmol (56 µl) Thioanisol und 2,8 mmol (296 µl) TFA freigesetzt, das Produkt abermals semi-präparativ mittels HPLC gereinigt und ausschließlich Produkt enthaltende Fraktionen vereint. 2 mg des nach Lyophilisation erhaltenen, synthetischen Par10 sind in 1 ml Rückfaltungspuffer (10 mM HEPES Puffer (pH 7,8), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 4 M Guanidiniumhydrochlorid) resuspendiert worden. Nach einer einstündigen Inkubation erfolgte eine schnelle Achtfach-

Verdünnung durch Zugabe von 10 mM HEPES Puffer (pH 7,8). Abschließend wurde die Protein-Lösung über Nacht ebenfalls gegen 10 mM HEPES Puffer (pH 7,8) dialysiert.

3.4.10. CD-Spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10

Zur Aufnahme der CD-Spektren von synthetischem und rekombinant hergestelltem Parvulin 10 wurden die lyophilisierten Enzyme in 10 mM Phosphat-Puffer (pH 7,8) gelöst, wobei die Konzentration in der Küvette jeweils 10 μ M betragen. Entsprechende Messungen wurden in 1 mm Küvetten bei 20 °C, 90 °C und bei 20 °C nach dem Erhitzen des Enzyms auf 90 °C aufgenommen.

3.4.11. Bestimmung des k_{cat}/K_M -Wertes von synthetischem Par10

Die Bestimmung der enzymspezifischen Konstante k_{cat}/K_M des synthetischen Par10 wurde mit Hilfe des Protease-gekoppelten Tests nach FISCHER *et al.* [177] durchgeführt. Dementsprechend sind 33 μ M Chymotrypsin und 25 μ M des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNa mit unterschiedlichen Konzentrationen der synthetischen Isomerase inkubiert worden.

Eine 0,2 mM Stammlösung von Chymotrypsin und die 10 mM Substrat-Stammlösung wurden in Wasser bzw. Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel vorbereitet. Alle Messungen erfolgten bei 10 °C in 35 mM HEPES Puffer (pH 7,8), wobei das im Verlauf der Reaktion nach Zugabe des Par10 durch die Protease freigesetzte 4-Nitroanilin bei 390 nm im Spektrometer detektiert worden ist.

4. Ergebnisse

4.1. Teil A – „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“

4.1.1. Synthese von HOGp(Boc)₂

Durch die Umsetzung von 4-Aminophenol mit dem Guanidierungsreagenz *N,N'*-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*S*-Methylisothioharnstoff entsprechend 3.3.1. sollte das für die spätere Synthese der Substratmimetika benötigte Boc-geschützte 4-Guanidinophenol in Anlehnung an [203] hergestellt werden.

24 Stunden nach Start der Reaktion konnte eine deutliche Entwicklung von Methanthiol durch Geruchsprobe festgestellt werden. Nachdem nach 120 Stunden Reaktionszeit das gesamte 4-Aminophenol verbraucht war, wurde die Reaktion abgebrochen. An das Abdampfen des Lösungsmittels schloss sich die Fällung des öligen Rückstandes mit Wasser an und ergab nach dem Abfritten und Trocknen 15 g eines pulverigen, grauen Substanzgemisches.

Nach Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie wurde das gewünschte Produkt als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 56% (7,9 g) und Reinheit größer als 98% laut HPLC erhalten. Abb. 14 stellt das HPLC-Profil des gereinigten Produkts dar. Die weitere Charakterisierung erfolgte mittels NMR-Spektrometrie.

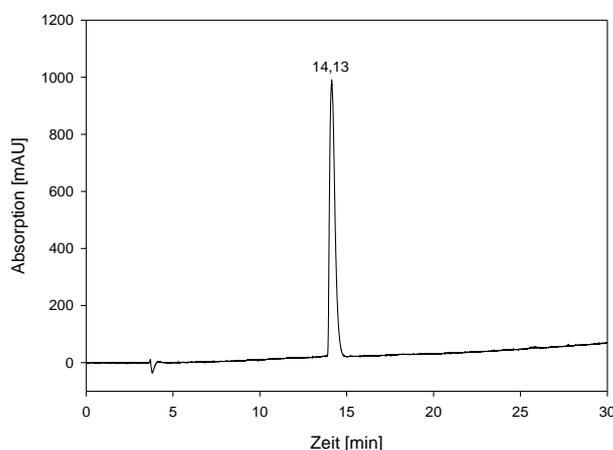


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm von HOGp(Boc)₂, HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Charakterisierung mittels NMR:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, J/Hz): 11.47 (s, 1H, NHPh), 9.77 (s, 1H, NHBoc), 9.46 (br, 1H, OH), 7.25 (d, 2H, Ar-CHCOH, ³J_{H,H} = 8.8), 6.72 (d, 2H, Ar-CHCNH, ³J_{H,H} = 8.8), 1.50 (s, 9H, N Boc), 1.37 (s, 9H, NH Boc).

4.1.2. Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH

Als zweite Aminosäure nach dem C-terminalen Lysin sollte zur Synthese des HMGA 1b Proteins ein N^{ϵ} -biotinyliertes Lysin eingeführt werden. Die Synthese des Bausteins erfolgte in Lösung durch Freisetzen der Seitenkette des Lysins durch eine TFA-Behandlung sowie ein nachfolgender Umsatz mit Biotin-OSu.

Nach Abspaltung der N^{ϵ} -Boc-Schutzgruppe von Fmoc-D-Lys(Boc)-OH mit einer 50%igen TFA-Lösung in DCM sowie Fällung und Trocknung (siehe 3.3.2.) wurde Fmoc-D-Lys-OH · TFA als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 98% (473 mg) und Reinheit größer 98% erhalten. In Abb. 15 sind dessen HPLC-Profil und ESI-Massenspektrum dargestellt. Der Molpeak $m/z = 369,1$ ($M+H$)⁺ im Massenspektrum der Verbindung, die eine Retentionszeit von 12,99 min hat, entspricht dem berechneten Wert von 368,2 Da plus ein Proton. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein NMR-Spektrum aufgenommen.

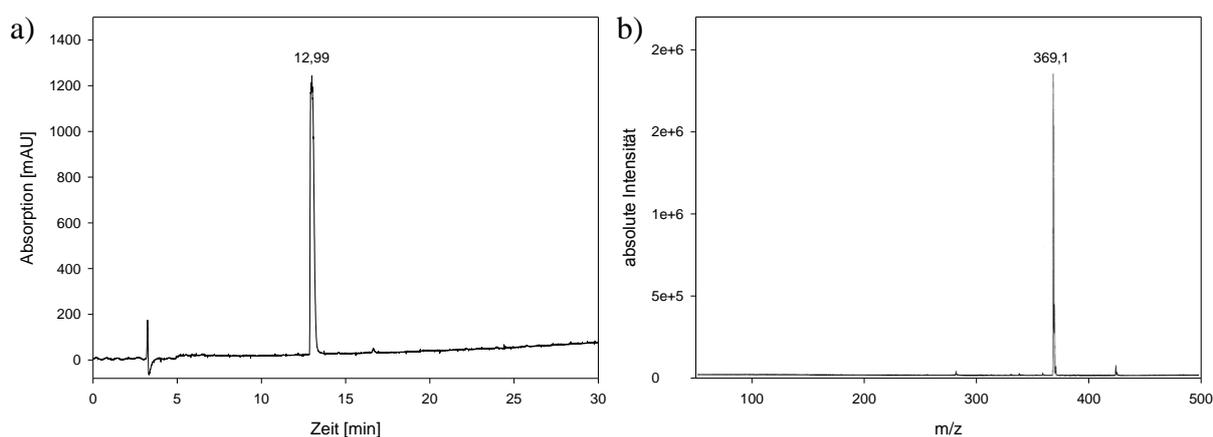


Abb. 15: a) HPLC-Profil der Verbindung Fmoc-D-Lys-OH · TFA und b) ESI-Massenspektrum der Verbindung Fmoc-D-Lys-OH · TFA. m/z berechnet: 368,2; gefunden: 369,1 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_{18} -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Charakterisierung mittels NMR:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , J /Hz): 7.89 (*d*, 2H, Ar-H, ³ $J_{H,H} = 7.5$), 7.71 (*m*, 2H, Ar-H), 7.63 (*br*, 3H, NH_3^+), 7.56 (*m*, 1H, $CHNH$), 7.42 (*m*, 2H, Ar-H), 7.33 (*m*, 2H, Ar-H), 4.28 (*m*, 2H, CH_2OCO), 4.24 (*m*, 1H, CH), 3.91 (*m*, 1H, $CHNH$), 2.77 (*t*, 2H, $CH_2NH_3^+$, ³ $J_{H,H} = 7.4$), 1.65 (*m*, 2H, $CHCH_2$), 1.55 (*m*, 2H, $CH_2CH_2NH_3^+$), 1.35 (*m*, 2H, $CHCH_2CH_2$).

Das durch Reaktion von Fmoc-D-Lys-OH · TFA mit Biotin-OSu in NMP in Gegenwart von DIPEA erhaltene Produkt Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH wurde mit eiskaltem Wasser gefällt und gewaschen (siehe 3.3.2.). Nach dem Trocknen über Nacht im Vakuumschrank mit dem

4. ERGEBNISSE

Trockenmittel Phosphorpentoxid ist Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH als weißes, kristallines Pulver mit einer Ausbeute von 96% (560 mg) erhalten worden. HPLC-Profil und ESI-Massenspektrum sind in Abb. 16 dargestellt. Das berechnete Molekulargewicht von 594,3 Da stimmt mit dem experimentell erhaltenen Molpeak von $m/z = 595,3 (M+H)^+$ überein. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein NMR-Spektrum aufgenommen.

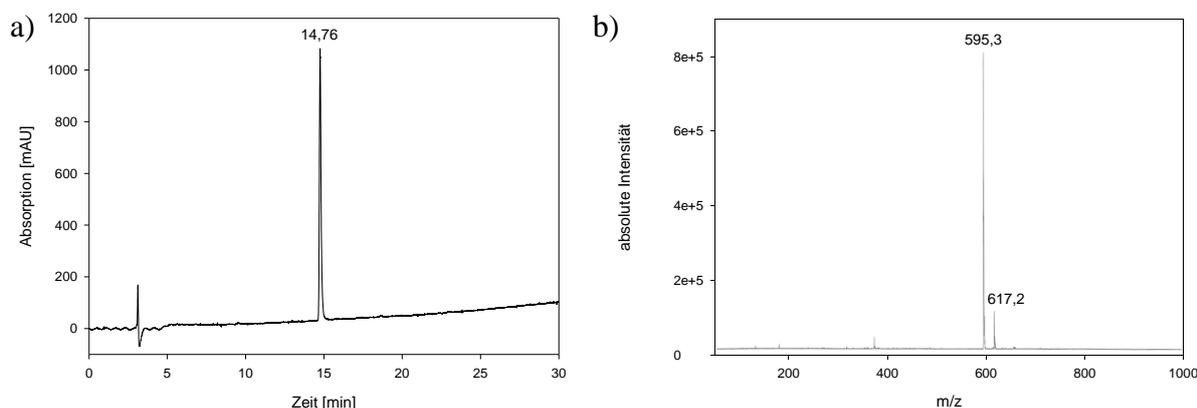


Abb. 16: a) HPLC-Chromatogramm der Verbindung Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH und b) ESI-Massenspektrum: m/z berechnet: 594,3; gefunden: 595,3 ($M+H$)⁺, 617,2 ($M+Na$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Charakterisierung mittels NMR:

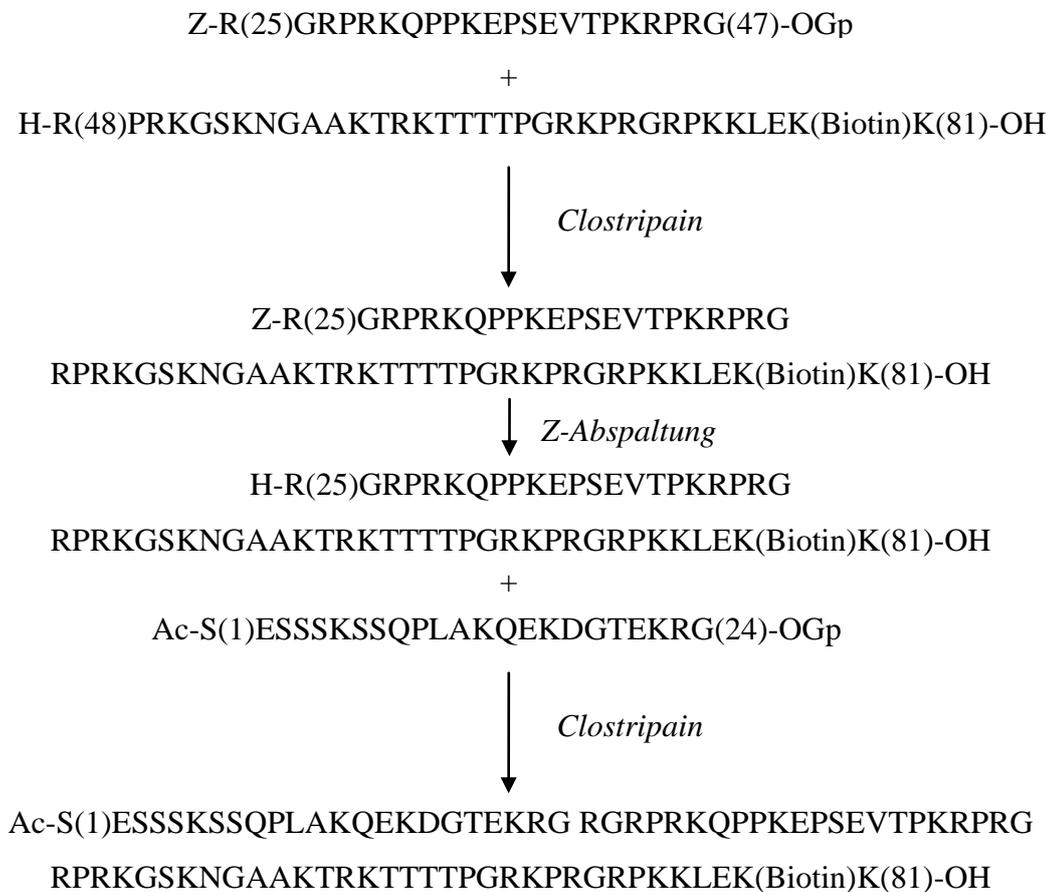
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, J/Hz): 7.89 (*d*, 2H, Ar-H, ³J_{H,H} = 7.5), 7.75 (*t*, 1H, CH₂-NHCO), 7.72 (*d*, 2H, Ar-H), 7.56 (*d*, 1H, OCONHCH), 7.42 (*t*, 2H, Ar-H), 7.32 (*t*, 2H, Ar-H), 6.39 (*s*, 1H, Biotin-NH), 6.33 (*s*, 1H, Biotin-NH), 4.28 (*m*, SCH₂CH, 1H), 4.26 (*m*, 2H, CH₂OCO), 4.22 (*t*, 1H, CH-Fmoc), 4.11 (*m*, 1H, SCHCH), 3.89 (*m*, 1H, NHCHCOO), 3.08 (*m*, 1H, SCH), 3.01 (*m*, 2H, CH₂NHCO), 2.80 (*m*, 1H, CH₂S), 2.54 (*m*, 1H, CH₂S), 2.04 (*t*, 2H, CH₂CONH), 1.70-1.20 (*m*, 12H, CH₂CH₂).

4.1.3. Synthesestrategie von HMGA 1b Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH

Da eine Synthese an der festen Phase in einem Schritt von vornherein aufgrund von möglichen Syntheseproblemen, die sich durch die hohe Anzahl trifunktioneller Aminosäuren in der Sequenz ergeben könnten, ausgeschlossen wurde, ist das Protein in drei Unterfragmente aufgeteilt worden. Die Auswahl der Schnittstellen erfolgte so, dass drei ungefähr gleich lange Fragmente entstehen, wobei sich als ein weiteres Kriterium an den N-Termini der beiden Nukleophile Arginine befinden sollten. Grund dafür ist die ausgeprägte Spezifität des Clostripains für Arginine in der S₁'-Position. Daraus ergibt sich für die Synthese der in Schema 2 dargestellte Synthesepfad. Damit eine Ligation mittels Clostripain erfolgreich

4. ERGEBNISSE

durchgeführt werden kann, müssen die Fragmente Z-D-Arg25-Gly47 sowie Ac-D-Ser1-Gly-24 als 4-Guanidinophenylester vorliegen.



Schema 2: Synthesestrategie für die Darstellung des all-D-Proteins HMGA 1b Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH

Nach der erfolgten Ligation von Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH zum Produkt Z-D-Arg25-D-Lys81-OH muss der N-Terminus durch Abspaltung der Z-Schutzgruppe freigesetzt werden, um anschließend in der zweiten Ligation mit Ac-D-Ser1-Gly24-OGp zum finalen Produkt eingesetzt werden zu können.

Als polymerer Träger für die Festphasen-Peptidsynthese der Fragmente wurde generell das 2-Chlortrityl-Polystyren Harz verwendet. Dieses bietet einerseits die Möglichkeit der Abspaltung von entschützten, als auch von Seitenketten-geschützten Peptiden, wie sie für die konvergente Peptidsynthese benötigt werden. Des Weiteren wurde bereits eine Vielzahl von (konvergenten) Synthesen längerer Peptide erfolgreich an diesem Harz durchgeführt [49, 207].

4.1.4. Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH

4.1.4.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

Die Synthese des Fragmentes H-D-Arg48-D-Lys81-OH sollte nach manueller Kupplung von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH an H-D-Lys(Boc)-2-CITrt-Harz in linearer Weise mittels vollautomatisierter Synthese durchgeführt werden. Nach Kupplung der D-Aminosäuren Glutaminsäure 79 bis Arginin 69 im Syntheseautomaten ist eine „Kontrollabspaltung“ gemäß 3.2.7. durchgeführt worden. Das HPLC-Chromatogramm und ein entsprechendes Massenspektrum der erhaltenen Substanz sind in Abb. 17 dargestellt.

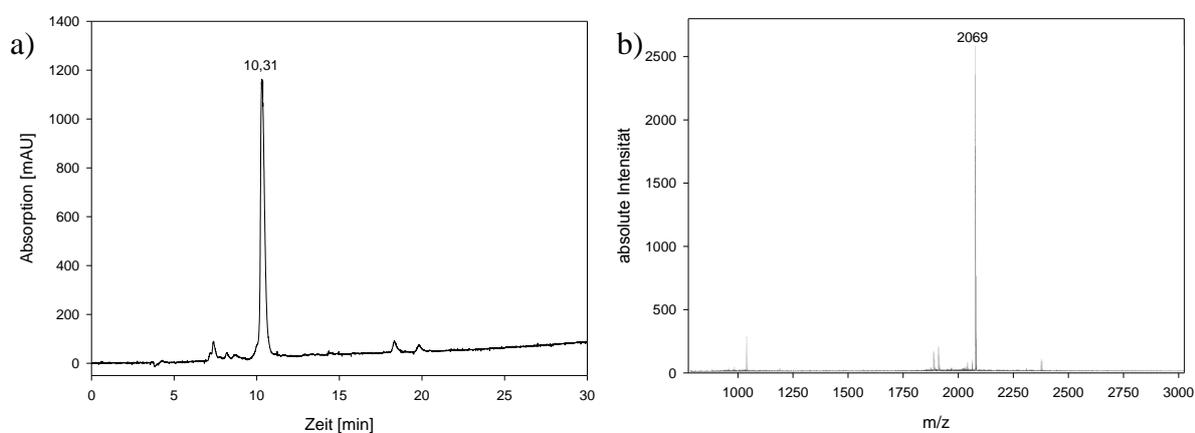


Abb. 17: a) HPLC-Chromatogramm der Verbindung Fmoc-D-Arg69-D-Lys81-OH und b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,31$ min: m/z berechnet: 2068; m/z gefunden: 2069 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Im HPLC-Profil ist ein eindeutiges Hauptprodukt bei einer Retentionszeit von 10,31 min zu erkennen. Das MALDI-ToF-Massenspektrum des entsprechenden Peaks weist ein Signal bei $m/z = 2069$ auf. Dies korreliert mit der theoretischen Molekülmasse von 2068 Da plus ein Proton.

Da das Produkt dem gewünschten entsprach und im HPLC-Profil nur ein eindeutiges Signal vorhanden ist, wurde die Darstellung im Syntheseautomaten bis D-Alanin 57 fortgesetzt.

Das nach der automatisierten Synthese und einer „Kontrollabspaltung“ erhaltene Rohpeptid Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-OH ist analytisch mittels HPLC sowie Massenspektrometrie charakterisiert worden. Im HPLC-Profil der Abb. 18 sind deutlich zwei Hauptsignale bei Retentionszeiten von 7,46 min und 10,32 min zu erkennen. Massenspektrometrische Untersuchungen der beiden Hauptverbindungen bei den o.g. Retentionszeiten ergaben, dass das gewünschte Produkt mit einer Molmasse von 3281,9 Da nicht enthalten war. Es wurden lediglich Molpeaks mit $m/z = 2960$ ($M+H$)⁺ und $m/z = 3061$ ($M+H$)⁺ im Hauptpeak mit der Retentions-

4. ERGEBNISSE

zeit von 10,32 min gefunden. Die massenspektrometrische Analyse des Peaks mit der Retentionszeit von 7,46 min wies Molpeaks mit noch kleineren m/z -Werten auf. Die Synthese wurde deshalb wiederholt, um Artefakte bei der ersten Synthese auszuschließen. Das Ergebnis der zweiten Synthese glich dem des ersten Versuchs und folglich wurde die Darstellung mit dieser Strategie nicht weiter fortgesetzt.

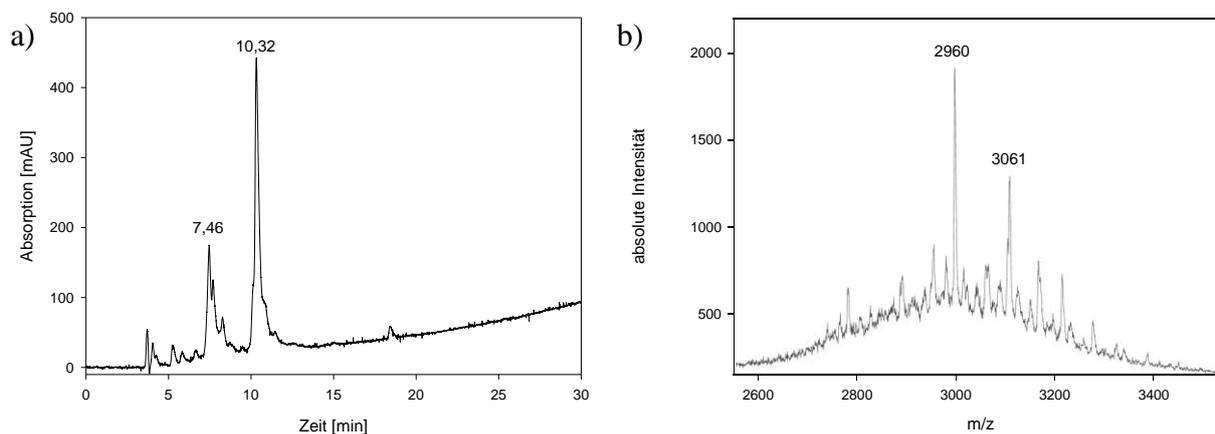


Abb. 18: a) HPLC-Chromatogramm des Peptids Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-OH nach Verlängerung von Fmoc-D-Arg69-D-Lys81-OH und b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,32$ min: m/z berechnet: 3182; m/z gefunden: 2960 ($M+H$)⁺ und 3061 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.4.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

Da unter den in 3.3.3.1. gewählten Synthesebedingungen die vollautomatisierte Synthese nicht erfolgreich verlief, war es Ziel, die Darstellung des Fragments H-D-Arg48-D-Lys81-OH mittels konvergenter Synthese zu erreichen. Das entsprechende Schema zur Synthesestrategie findet sich in Abb. 19.

Dafür war es erforderlich, die Fragmente Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH sowie Fmoc-D-Arg48-Gly56-OH als C-terminal freie Peptide mit Seitenkettenschutz darzustellen und nachfolgend an das Fragment H-D-Arg69-D-Lys81-2-ClTrt-Harz, welches mittels schrittweiser SPPS zugänglich ist (siehe 4.1.4.1.; Abb. 17), zu kuppeln. Da die Kupplung der Fragmente über eine chemische Aktivierung der C-terminalen Aminosäure verläuft und damit die Gefahr der Epimerisierung besteht, eignet sich als C-terminale Aminosäure das Glycin hervorragend, da dieses nicht epimerisieren kann. Dementsprechend wurden die Lignationsstellen an den Positionen Glycin 68 und 56 gewählt.

Als polymerer Träger wurde das 2-Chlortrityl-Polystyren-Harz zur Synthese der benötigten Fragmente verwendet. Dieses erlaubt aufgrund seines äußerst Säure-labilen *linkers* eine Ab-

4. ERGEBNISSE

spaltung des Peptids vom Harz bereits mit 30% (v/v) HFIP in DCM ohne die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen zu entfernen und ist zudem voll kompatibel mit der Fmoc/*t*Bu-Strategie [202].

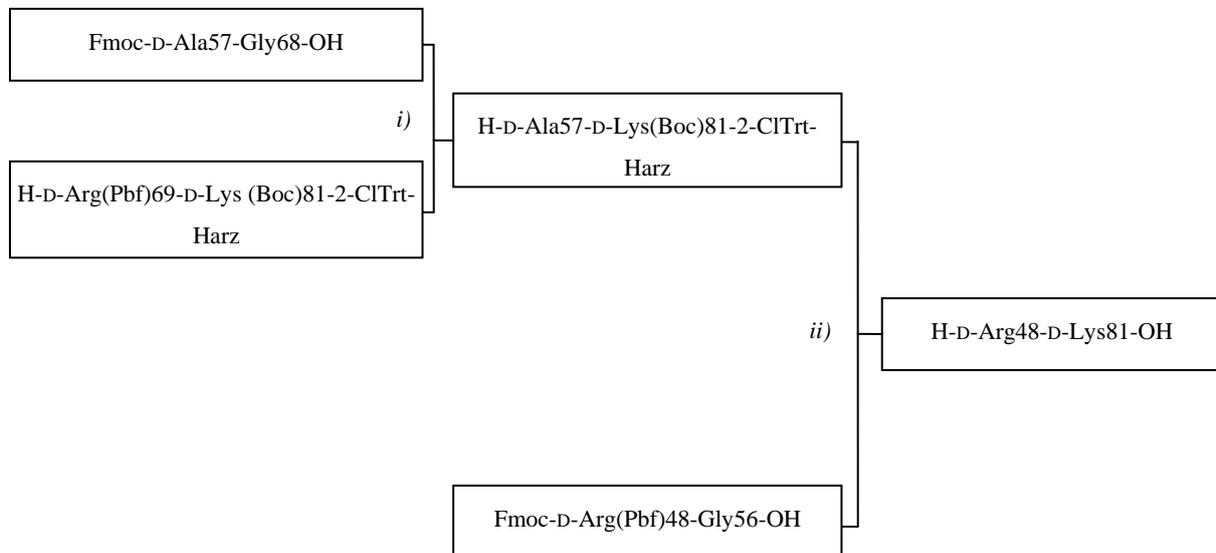


Abb. 19: Konvergente Synthesestrategie zur Darstellung des vollgeschützten Fragments Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-OH am 2-ClTrt-Harz. i) Kupplung, Fmoc-Abspaltung. ii) Kupplung, Fmoc-Abspaltung, TFA-Abspaltung.

Nach erfolgter automatisierter Festphasen-Peptidsynthese des Fragments Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH wurde eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) durchgeführt. In Abb. 20 sind HPLC-Profil und Massenspektrum für das entsprechende Syntheseprodukt dargestellt. Die für das Fragment berechnete Molekülgewicht von 1454 Da stimmt mit dem Signalen des Massenspektrums von $m/z = 727,9$ ($M+2H$)²⁺ und $m/z = 485,7$ ($M+3H$)³⁺ überein. Eine nachfolgende „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.), welche nicht quantitativ verlief, ergab die Seitenkettengeschützte Peptidsäure mit einer Ausbeute von 82% (223 mg). Aufgrund der hohen Reinheit, die aus der „Kontrollabspaltung“ bzw. nachfolgenden Charakterisierungen mittels HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie ersichtlich war und zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten wurde auf eine Reinigung der vollgeschützten Substanz verzichtet.

4. ERGEBNISSE

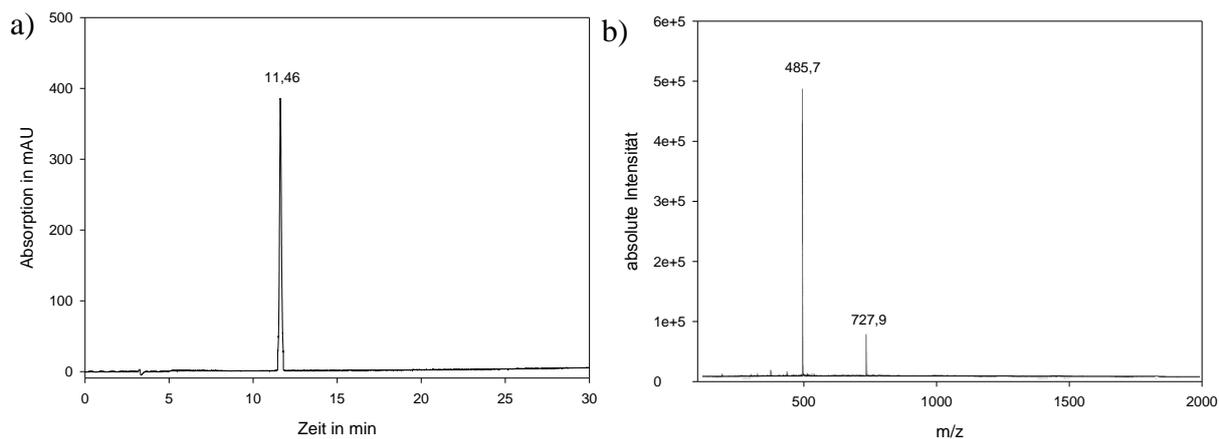


Abb. 20: a) HPLC-Chromatogramm von Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH und b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 11,46$; m/z berechnet: 1454; gefunden: 1455 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Abb. 21 stellt das HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum des für die konvergente Synthese benötigten zweiten Fragments Fmoc-D-Arg48-Gly56-OH nach erfolgter SPPS und „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) dar. Bei einer Retentionszeit von 10,17 Minuten ist ein eindeutiger Hauptpeak zu erkennen. Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten, dass dieser Peak dem gewünschten Produkt entsprach. Zur Generierung des seitenkettengeschützten Fragments wurde das am polymeren Träger immobilisierte Peptid einer „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) unterworfen. Die Ausbeute an geschütztem Peptid betrug 70% (179 mg) pro Synthese. Das Fragment ist aufgrund der akzeptablen Reinheit, die aus dem HPLC-Profil der Kontrollabspaltung sowie der massenspektrometrischen Charakterisierung ersichtlich wird, und zur Reduzierung von Substanzverlust ohne weitere Reinigung für die konvergente Synthese eingesetzt worden.

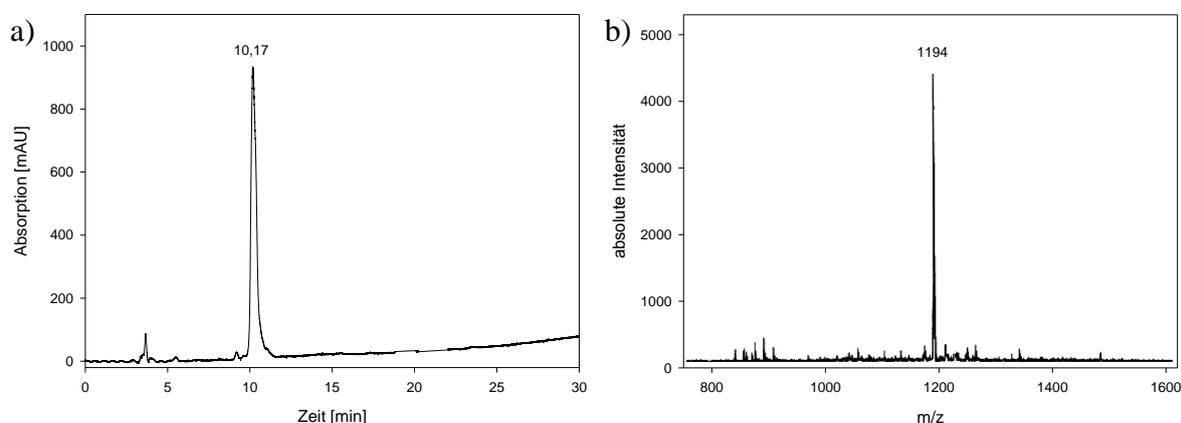


Abb. 21: a) HPLC-Chromatogramm von Fmoc-D-Arg48-Gly56-OH. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,17$; m/z berechnet: 1193; gefunden: 1194 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Anschließend erfolgte die chemische Verknüpfung der vollgeschützten Fragmente Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH und H-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81-2-CITrt-Harz und nachfolgend eine „Kontrollabspaltung“ gemäß 3.2.7.. Das entsprechende HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum des erhaltenen Rohpeptids mit einer Retentionszeit von 10,38 min sind in Abb. 22 dargestellt. Der Molpeak des Massenspektrums von $m/z = 3283$ ($M+H$)⁺ stimmt mit dem kalkulierten Molgewicht von 3282 Da überein. Der Peak bei einer Retentionszeit von 7,22 Minuten entspricht dem Peptid H-D-Arg69-D-Lys81-OH.

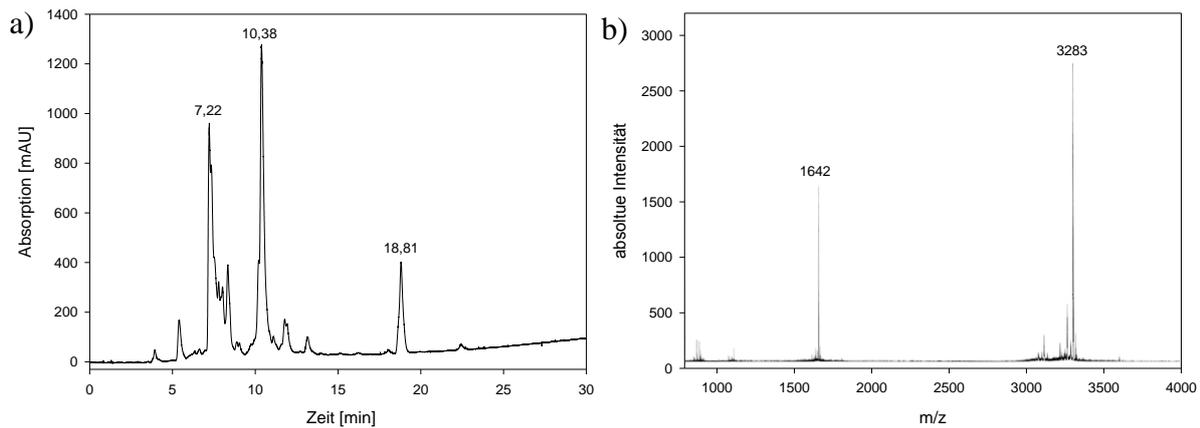


Abb. 22: a) HPLC-Chromatogramm des Fragmentes Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-OH nach „Kontrollabspaltung“, welches durch Ligation von Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH mit H-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81-2-CITrt-Harz erhalten wurde. b) Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,38$ min: m/z berechnet: 3282; m/z gefunden: 3283 ($M+H$)⁺, 1642 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

An die Acetylierung nicht acylierter Aminogruppen und Fmoc-Abspaltung des am Träger immobilisierten Peptids Fmoc-D-Ala57-D-Lys81(Boc)-2-CITrt-Harz schloss sich die chemische Ligation des Fragments Fmoc-D-Arg(Pbf)48-Gly56-OH an (3.3.3.2.). Das nach „Kontrollabspaltung“ erhaltene Produkt wurde mit HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert. In Abb. 23 sind das entsprechende Chromatogramm und Massenspektrum der Verbindung mit einer Retentionszeit von 9,73 min wiedergegeben. Auch hier stimmt das für das Fragment berechnete Molekulargewicht von 4235 Da mit dem experimentell bestimmten Wert von $m/z = 4237$ ($M+H$)⁺ überein. Zusätzlich sind im HPLC-Profil einige weitere Signale zu erkennen, welche nicht dem gewünschten Produkt entsprechen und vermutlich Fehlsequenzen darstellen.

4. ERGEBNISSE

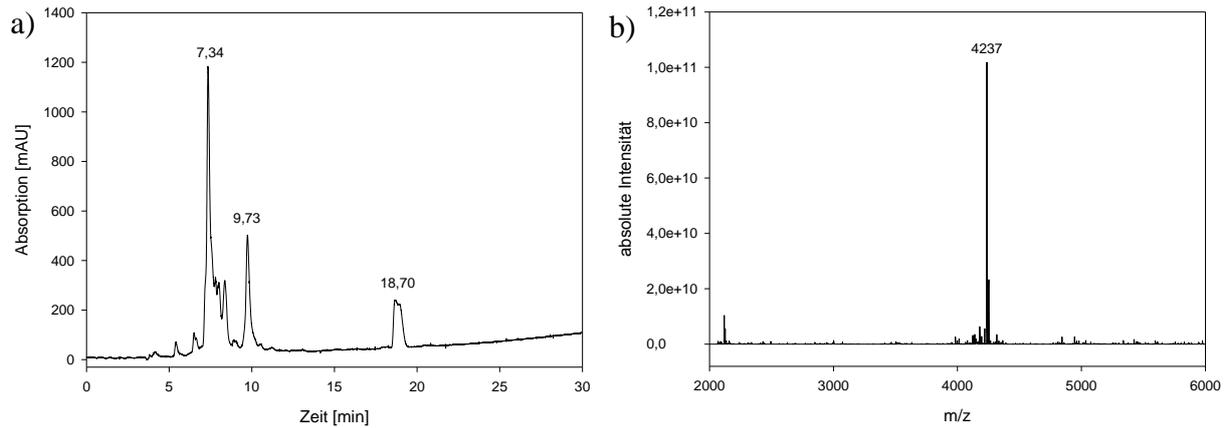


Abb. 23: a) HPLC-Chromatogramm nach „Kontrollabsplattung“ des Fragments *Fmoc-D-Arg48-D-Lys81-OH*, das durch chemische Ligation von *Fmoc-D-Arg(Pbf)48-Gly56-OH* mit *H-D-Ala57-D-Lys(Boc)81-2-CITrt-Harz* erhalten wurde. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 9,73$ min. m/z berechnet: 4235; gefunden: 4237 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Vor der Behandlung des Harzes mit einer TFA-Absplattlösung (vgl. 3.2.9.), die das Peptid vom polymeren Träger trennen und gleichzeitig vom Seitenkettenschutz befreien sollte, ist eine Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen und Fmoc-Absplattung durchgeführt worden. Das gewünschte Produkt wurde nach einer präparativen HPLC-Reinigung mit einer isolierten Ausbeute von 4,1% (12 mg) erhalten. HPLC-Profil und Massenspektrum der finalen Verbindung sind in Abb. 24 dargestellt. Der experimentell bestimmte Molpeak bei $m/z = 4014$ ($M+H$)⁺ stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 4012 Da überein.

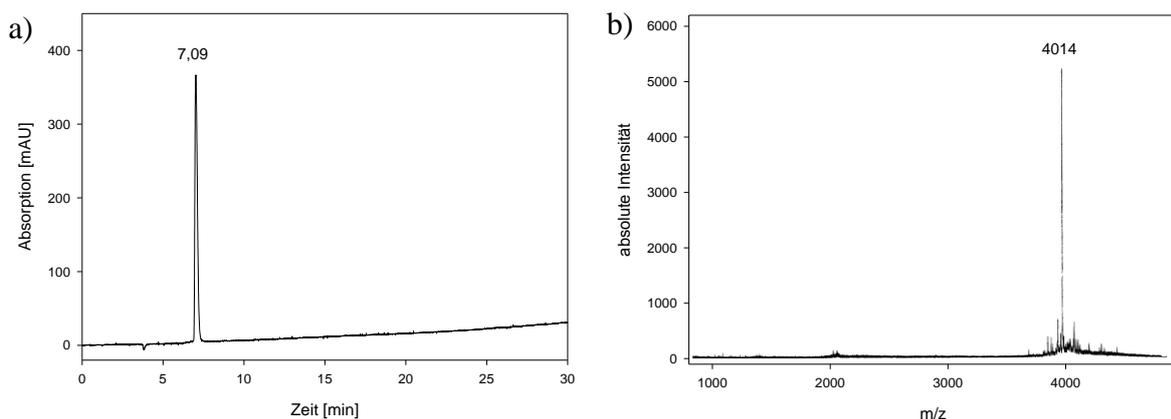


Abb. 24: a) HPLC-Chromatogramm nach präparativer HPLC-Reinigung von *H-D-Arg48-D-Lys81-OH*. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 7,09$ min: m/z berechnet: 4012; gefunden: 4014 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.4.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

Zur Erhöhung der lediglich marginalen Syntheseausbeute wurde in einer dritten Synthesestrategie zur Darstellung von H-D-Arg48-D-Lys81-OH eine Kombination aus automatisierter Festphasen-Peptidsynthese und manuellen Kupplungsschritten an bestimmten Positionen durchgeführt. Die entsprechende Synthesestrategie ist in Abb. 25 schematisch dargestellt. Als Syntheseharz fand das bereits erwähnte 2-Chlortrityl-Polystyrenharz Verwendung. Positionen, an denen manuelle Einfachkupplungen mit dem effizienteren Aktivierungsreagenz HATU durchgeführt wurden, ergaben sich aus den Ergebnissen der beiden ersten Syntheseansätze 4.1.4.1. und 4.1.4.2..

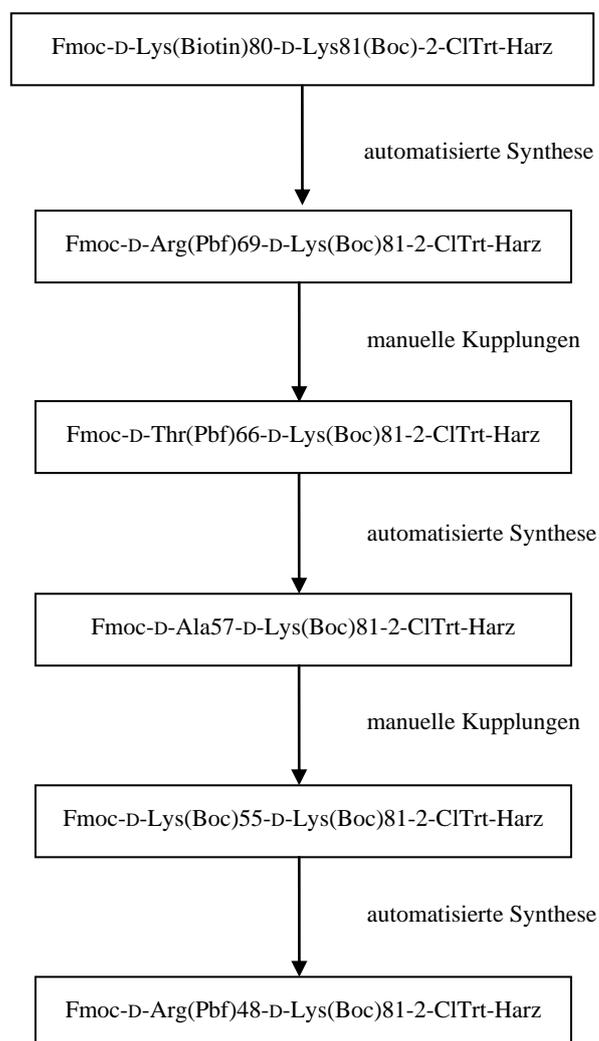


Abb. 25: Schematische Darstellung des Syntheseablaufs innerhalb der Strategie III.

Die Darstellung des Fragments H-D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)81-2-ClTrt-Harz erfolgte analog zu den beiden bereits beschriebenen Strategien. Nachfolgend wurden jedoch die entsprechend geschützten Aminosäuren Glycin 68, D-Prolin 67 und D-Threonin 66 manuell gekuppelt und

4. ERGEBNISSE

anschließend im Automaten die Synthese bis D-Alanin 57 fortgesetzt. Das HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum nach der „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) sind in Abb. 26 dargestellt. Das HPLC-Profil zeigt ein Hauptsignal bei einer Retentionszeit von 10,63 Minuten. Die massenspektrometrische Analyse des Peaks ergab einen Molpeak bei $m/z = 3284 (M+H)^+$, welcher mit dem theoretischen Wert der erwarteten Verbindung von 3282 Da in Übereinstimmung ist.

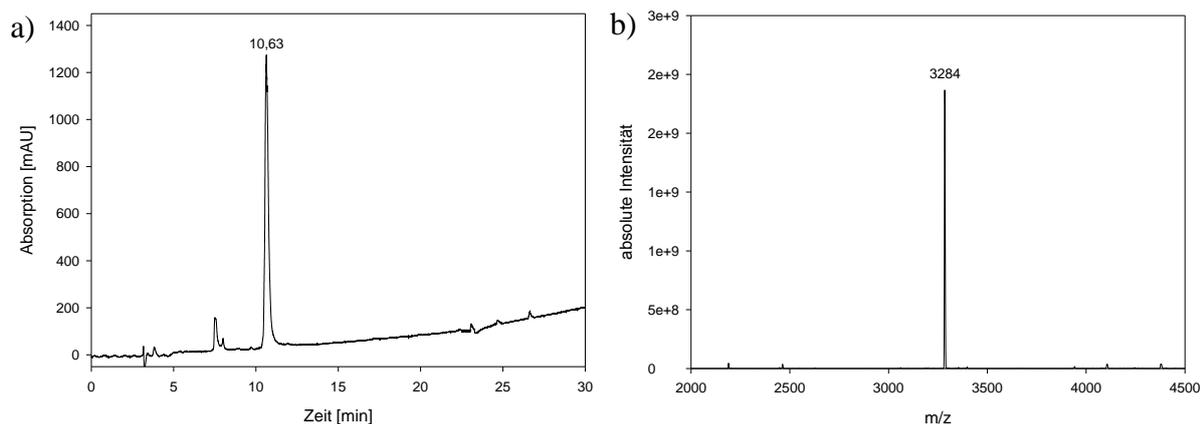


Abb. 26: a) HPLC-Chromatogramm des Fragments *Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-OH* nach „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,63$ min nach Dekonvolution. m/z berechnet: 3282; gefunden: 3284 $(M+H)^+$. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach manueller Kupplung der Aminosäuren Glycin 56 und D-Lysin 55 wurde im Synthesizer die Darstellung bis D-Arginin 48 fortgesetzt. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz und gleichzeitiger Entschützung der Seitenkettenfunktionen (3.2.9.) wurde das Fmoc-geschützte Fragment als Rohprodukt (Abb. 27) mit einer Ausbeute von 540 mg erhalten und anschließend präparativ mittels HPLC gereinigt. In Abb. 27 sind das HPLC-Profil des Rohprodukts und das Massenspektrum des Hauptpeaks mit einer Retentionszeit von 9,16 min dargestellt.

4. ERGEBNISSE

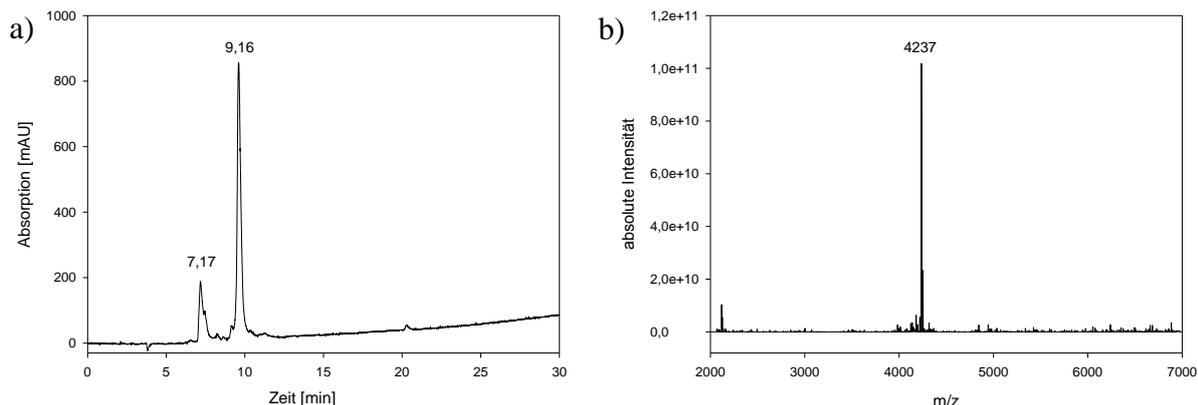


Abb. 27: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts Fmoc-D-Arg48-D-Lys81-OH nach „Kontrollabsplattung“. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 9,16$ min. m/z berechnet: 4235; gefunden: 4237 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Das gereinigte Fmoc-geschützte Fragment wurde mit einer Ausbeute von 34% (254 mg) erhalten. HPLC-Profil und Massenspektrum der gereinigten Zwischenverbindung sind in Abb. 28 grafisch dargestellt.

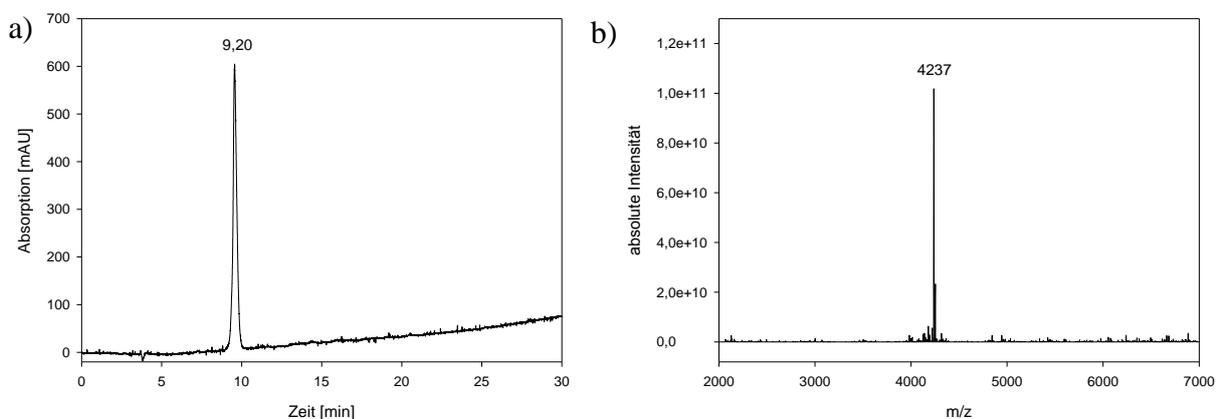


Abb. 28: a) HPLC-Chromatogramm des Fragments Fmoc-D-Arg48-D-Lys81-OH. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution der gereinigten Verbindung. m/z berechnet: 4235; gefunden: 4237 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach erfolgter Absplattung der verbliebenen N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptidfragment erneut mit Hilfe einer präparativen HPLC gereinigt. Das finale Produkt H-D-Arg48-D-Lys81-OH ist mit einer Ausbeute von 50% (125 mg) erhalten worden. HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum der finalen Verbindung gibt Abb. 29 wieder. Die theoretische Molmasse der Substanz von 4012 Da stimmt mit dem erhaltenen Wert der massenspektrometrischen Analyse von $m/z = 4014$ ($M+H$)⁺ überein.

4. ERGEBNISSE

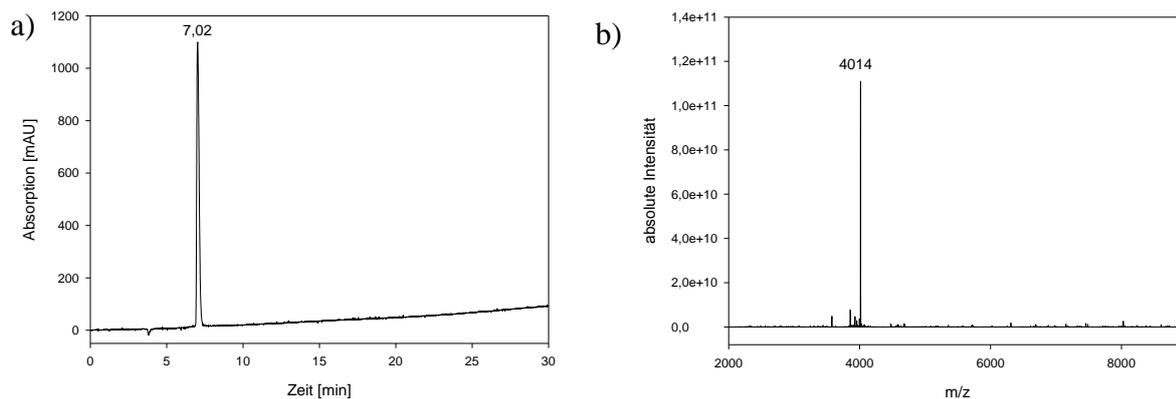


Abb. 29: a) HPLC-Chromatogramm von H-D-Arg48-D-Lys81-OH nach präparativer HPLC. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution der gereinigten Verbindung. m/z berechnet: 4012; gefunden: 4014 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Die Existenz von Sekundärstrukturen innerhalb des Fragments H-D-Arg48-D-Lys-81-OH wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht und das Ergebnis der Messung bei 25 °C ist in Abb. 30 dargestellt. Im Spektrum ist deutlich ein Maximum im Bereich von 200 nm zu sehen, welches dann ab 220 nm in einen Bereich übergeht, der nahezu 0 ist.

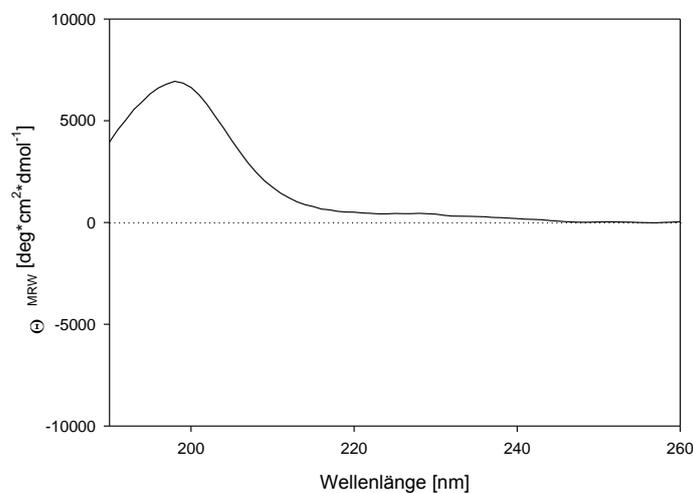


Abb. 30: CD-Spektrum der Verbindung H-D-Arg48-D-Lys81-OH bei 25 °C; 3 μ M Peptid in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

4.1.5. Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp

4.1.5.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

In einer ersten Synthesestrategie sollte mit schrittweiser Peptidsynthese an der festen Phase die Zugänglichkeit des zweiten Fragments, welches es abschließend in das entsprechende Substratmimetikum umzuwandeln galt, untersucht werden.

Nach erfolgter Beladung des 2-CITrt-Harzes mit dem C-terminalen Glycin (3.2.1.) und anschließender vollautomatisierter SPPS bis Aminosäure D-Serin 37 ist eine entsprechende „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) durchgeführt worden, deren Ergebnis in Form eines HPLC-Chromatogramms sowie Massenspektrums in Abb. 31 dargestellt ist. Die theoretische Masse des Fragments Fmoc-D-Ser37-Gly47-OH beträgt 1445 Da. Diese konnte zwar in einem Peak (rt = 13,20 min) des analytischen HPLC-Laufes mit $m/z = 1446$ ($M+H$)⁺ identifiziert werden, jedoch bestand der Hauptanteil der Verbindung aus einem Δ Pro-Peptid mit einem Molpeak bei $m/z = 1349$ ($M+H$)⁺. Da eine Wiederholung des Syntheseprozesses mit dem gleichen Ergebnis endete, wurde die Synthese an dieser Stelle nicht weiter fortgesetzt.

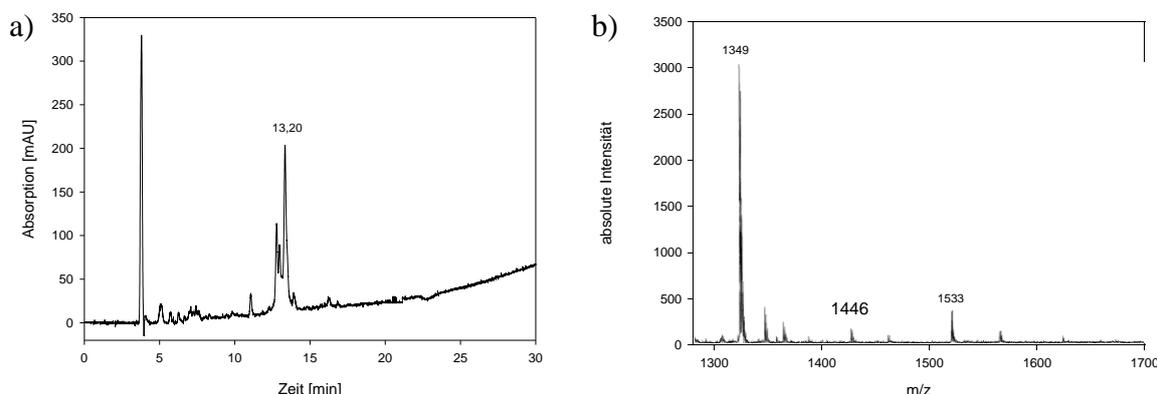


Abb. 31: a) HPLC-Chromatogramm des Fragmentes Fmoc-D-Ser37-Gly47-OH. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 13,20$ min. m/z berechnet: 1445; gefunden: 1349 ($M+H$)⁺ Δ Pro-Peptid und 1446 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.5.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

Innerhalb der zweiten Strategie wurde ein konvergenter Ansatz gewählt. Dieser setzte die Darstellung der vier Fragmente Fmoc-D-Lys(Boc)43-Gly47-2-CITrt, Fmoc-D-Ser(*t*Bu)37-D-Pro42-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-OH sowie Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH und deren Ligation voraus. Während es sowohl das Fragment D-Lys43-Gly47 als auch das Fragment D-Arg29-D-Pro36 am Harz zu belassen galt, mussten die Fragmente D-Ser37-D-

4. ERGEBNISSE

Pro42 und D-Arg25-D-Pro28 C-terminal frei, aber dennoch vollgeschützt generiert werden. Daher war der Einsatz des 2-Chlortrityl-Polystyren-Harzes notwendig. Die Synthesestrategie des Fragments ist in Abb. 32 zusammenfassend dargestellt.

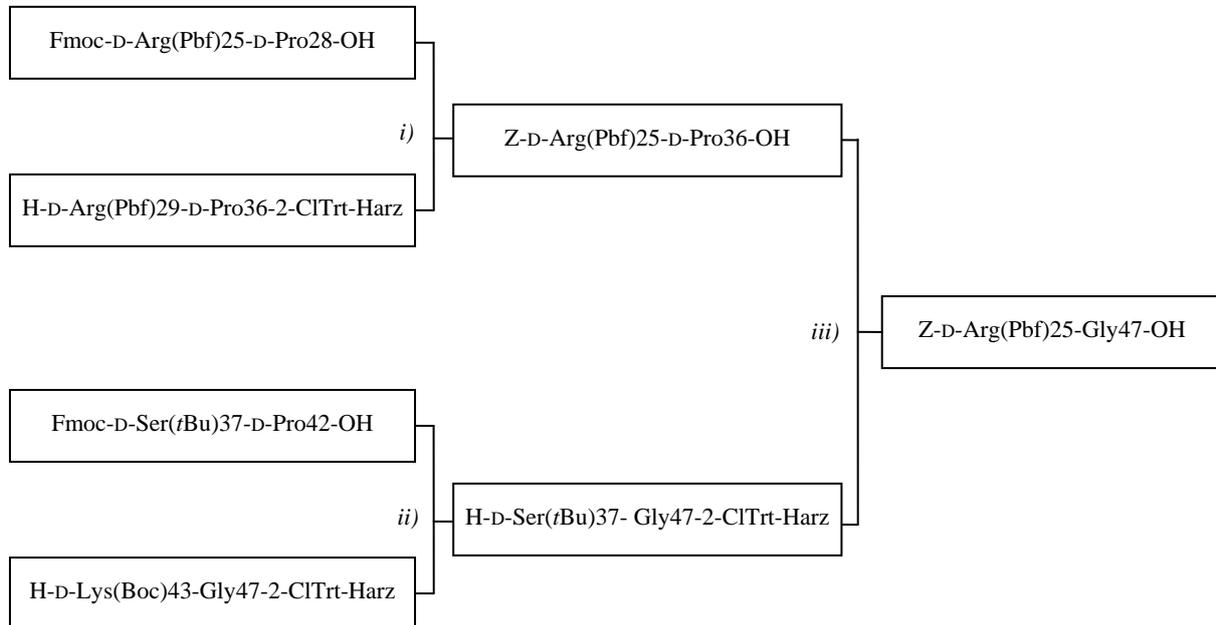


Abb. 32: Konvergente Synthesestrategie zur Darstellung des vollgeschützten Fragments Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-OH am 2-ClTrt-Harz. i) Kupplung, Acetylierung, Umschützung, „HFIP-Abspaltung“, ii) Kupplung, Acetylierung, Fmoc-Abspaltung, iii) Kupplung, Acetylierung, „HFIP-Abspaltung“.

In Abb. 33 sind das HPLC-Profil des Fragments Fmoc-D-Lys43-Gly47-OH nach erfolgter Synthese sowie „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) und das Massenspektrum der Substanz mit einer Retentionszeit von 11,5 Minuten dargestellt. Nach der erfolgreichen Synthese wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt.

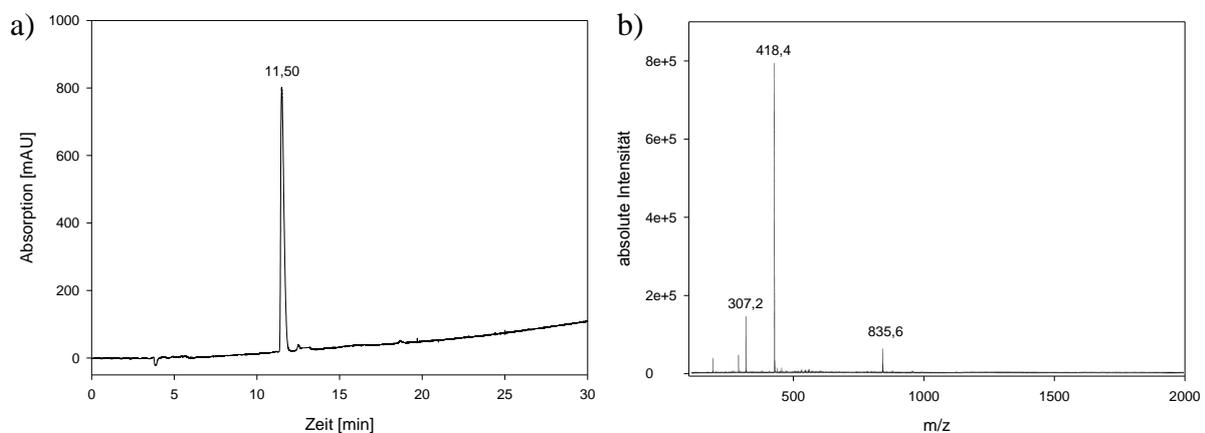


Abb. 33: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Lys43-Gly47-OH nach „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 11,50$ min. m/z berechnet: 834; gefunden: 835 ($M+H$)⁺, 418 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Nach der automatisierten Synthese des Fragments Fmoc-D-Ser37-D-Pro42-OH an der festen Phase wurde eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) sowie Charakterisierung des Produkts mittels HPLC und Massenspektrometrie durchgeführt. Das entsprechende HPLC-Profil und Massenspektrum des Produkts mit einer Retentionszeit von 14,36 Minuten sind in Abb. 34 dargestellt. Die berechnete Molekülmasse stimmt mit dem experimentell erhaltenen Molpeak überein. Anschließend wurde eine „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) durchgeführt, die in einer Ausbeute an vollgeschützter Peptidsäure von 50% (63 mg) pro Synthese resultierte.

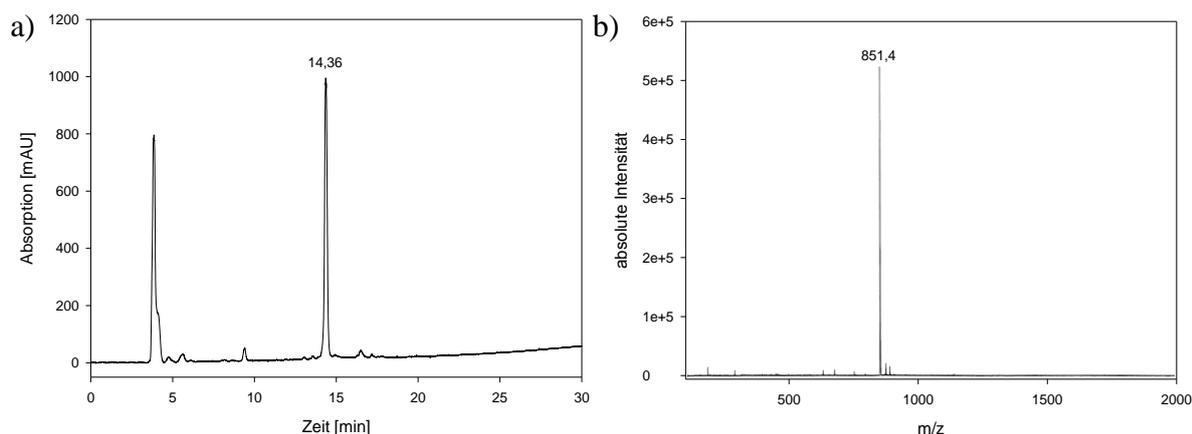


Abb. 34: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Ser37-D-Pro42-OH nach „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 14,36$ Minuten. m/z berechnet: 850; gefunden: 851 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach erfolgter chemischer Ligation des Fragments Fmoc-D-Ser(*t*Bu)37-D-Pro42-OH und H-D-Lys(Boc)43-Gly47-2-CITrt-Harz (3.3.4.2.) ist eine Acetylierung nicht reagierter Aminofunktionen, eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) sowie Charakterisierung des Produkts mittels HPLC und Massenspektrometrie durchgeführt worden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt. Der Peak bei einer Retentionszeit von 11,10 min entspricht dem gewünschten Produkt, was durch massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt wurde (m/z berechnet 1445; m/z gefunden 483 ($M+3H$)³⁺ und 724 ($M+2H$)²⁺). Der Peak bei $rt = 17,58$ min stellt nicht entfernte Schutzgruppenfragmente dar. Abschließend erfolgte die Freisetzung des *N*-Terminus durch eine Fmoc-Abspaltung (3.2.4.).

4. ERGEBNISSE

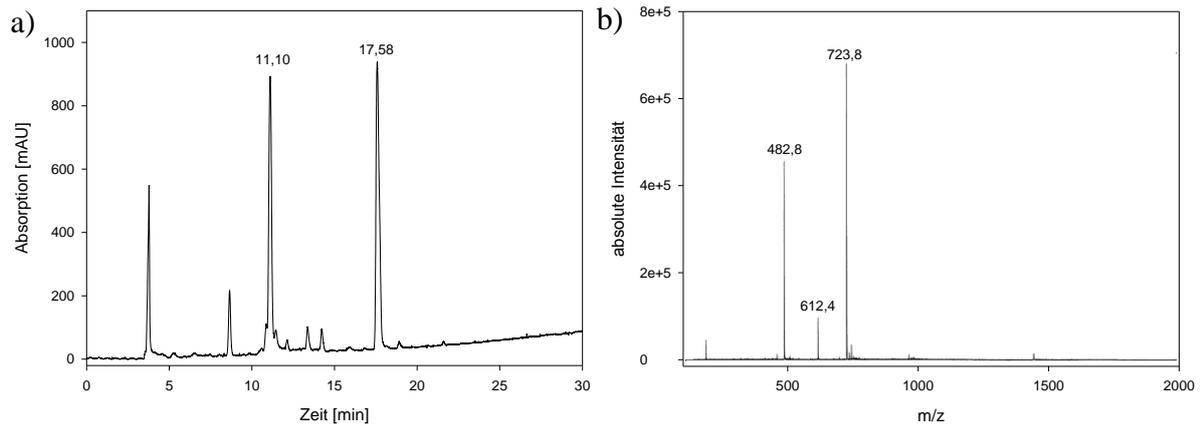


Abb. 35: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Ser37-Gly47-OH nach Ligation und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 14,36$ min. m/z berechnet: 1445; gefunden: 483 ($M+3H$)³⁺; 724 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Die Qualität der vollautomatisierten Synthese des Fragments Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH wurde mittels „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) sowie HPLC und Massenspektrometrie analysiert. In Abb. 36 sind das HPLC-Profil und das Massenspektrum der Substanz mit einem rt -Wert von 10,20 min dargestellt. Die berechnete Masse von 706 Da entspricht dem experimentell bestimmten Wert von $m/z = 707$ ($M+H$)⁺. Die später eluierende Substanz bei $rt = 17,35$ min entspricht abermals Schutzgruppenfragmenten, die nur während der TFA-Behandlung entstehen. Nach der „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) des Fragments sind durchschnittlich 89 mg pro Synthese erhalten worden, was einer Ausbeute von 58% entspricht. Aufgrund der hohen Reinheit des Produkts und um Verlusten durch Reinigungsschritte vorzubeugen, wurde auf eine Reinigung verzichtet.

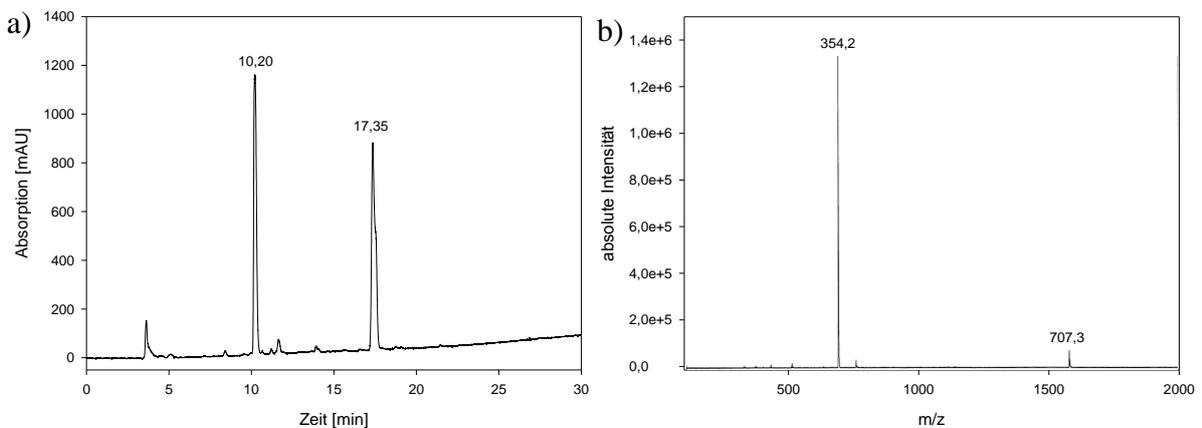


Abb. 36: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Arg25-D-Pro28-OH nach der „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,20$ min. m/z berechnet: 706; m/z gefunden: 354 ($M+2H$)²⁺ 707 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Das so erhaltene Fragment wurde anschließend an das Fragment H-D-Arg29-D-Pro36-2-CITrt gekuppelt, welches zuvor synthetisiert (3.3.4.) und analysiert wurde. Die Ergebnisse der „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) der Synthese sind in Abb. 37 zusammengestellt. Das Peptid mit einem rt-Wert von 10,85 min entspricht dem gewünschten Produkt mit einer Masse von 1201 Da, das mittels Massenspektrometrie bestätigt wurde: $m/z = 401 (M+3H)^{3+}$; $601 (M+2H)^{2+}$; $1202 (M+H)^+$. Peaks bei $rt = 19,47$ min und $rt = 21,25$ min entsprechen Schutzgruppenfragmenten.

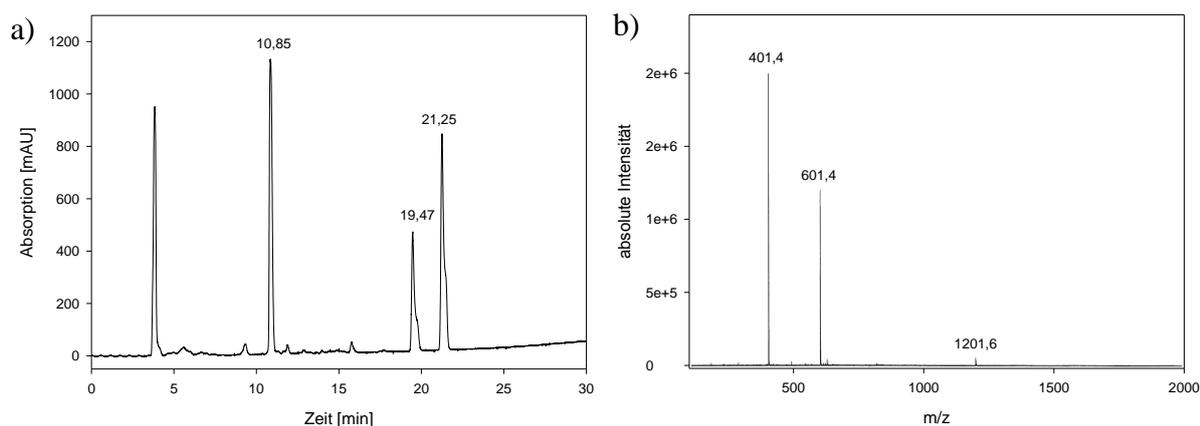


Abb. 37: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Arg29-D-Pro36-OH nach der „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,20$ min. m/z berechnet: 1201; gefunden: $m/z = 401 (M+3H)^{3+}$; $601 (M+2H)^{2+}$; $1202 (M+H)^+$. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach chemischer Ligation der Fragmente Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH und H-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-2-CITrt (3.3.4.), Acetylierung sowie Umschützung in das N^α -Z-geschützte Derivat, wurde eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) durchgeführt. Das erhaltene Produkt wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert, deren Ergebnisse in Abb. 38 dargestellt sind. Der Peak bei einer Retentionszeit von 7,80 min entspricht dem gewünschten Produkt. Der experimentell bestimmte Wert von $m/z = 1579 (M+H)^+$ stimmt mit dem theoretischen Wert von 1578 Da überein.

4. ERGEBNISSE

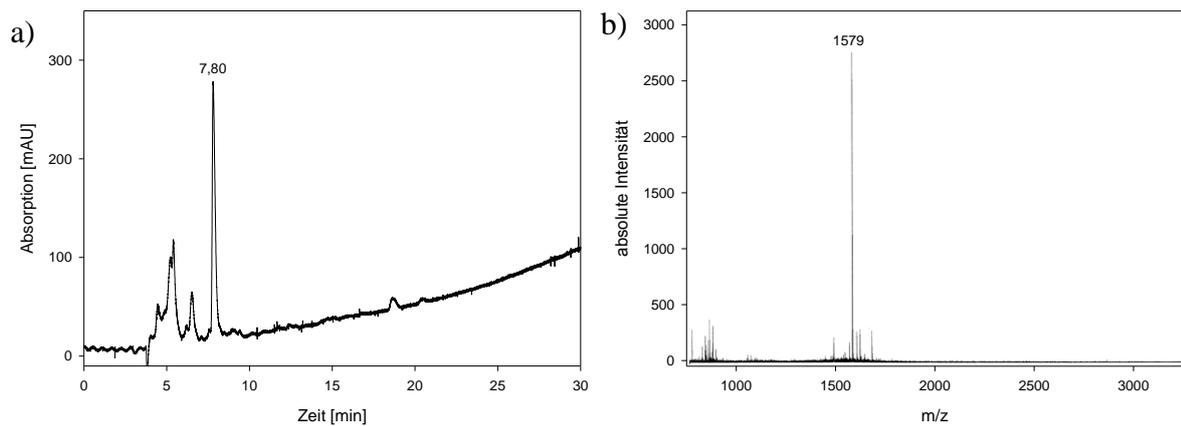


Abb. 38: a) HPLC-Profil des Peptids Z-D-Arg25-D-Pro36-OH nach der Ligation, Umschüttung und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 7,80$ min. m/z berechnet: 1578; gefunden: 1579 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Durch die nachfolgende „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) konnte das vollgeschützte Derivat mit einer Ausbeute von 60% (85 mg) pro Ansatz erhalten und in der nachfolgenden chemischen Ligation mit dem Fragment H-D-Ser37(*t*Bu)-Gly47-2-ClTrt eingesetzt werden. Das Resultat der Verknüpfung beider Fragmente (3.3.4.2.) ist in Abb. 39 nach erfolgter „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) dargestellt. Das gewünschte Produkt mit einem Molgewicht von 2783 Da findet sich bei $rt = 7,83$ min und wurde mittels Massenspektrometrie mit einem Wert von $m/z = 2784$ ($M+H$)⁺ bestätigt.

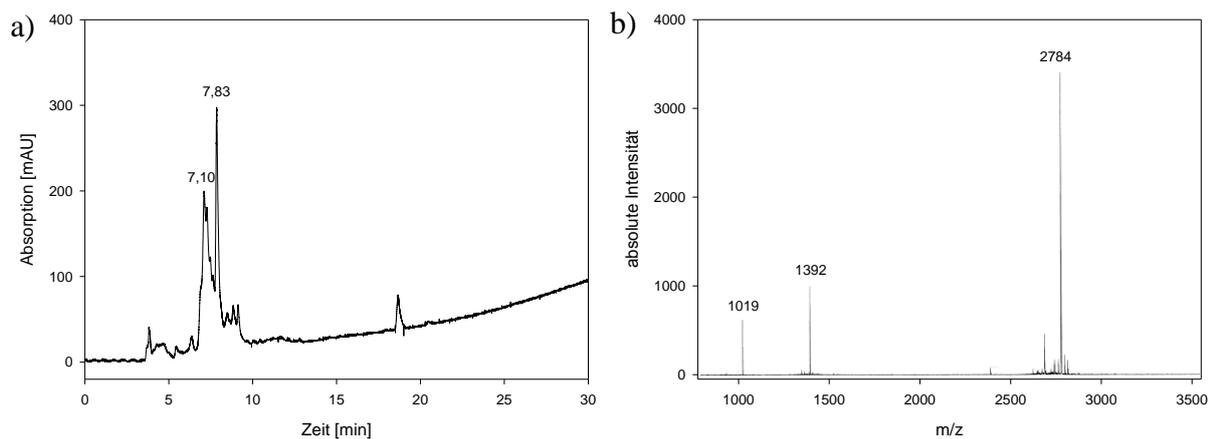


Abb. 39: a) HPLC-Profil des Peptids Z-D-Arg25-Gly47-OH nach der Ligation, Umschüttung und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 7,83$ min. m/z berechnet: 2783; gefunden: 2784 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach der Acetylierung nicht reagierter Aminofunktionen (3.3.4.2.) wurde mittels „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) das vollgeschützte, C-terminal freie Rohpeptid Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-

4. ERGEBNISSE

OH mit einer Ausbeute von 45% (108 mg) vom polymeren Träger abgelöst. Im Anschluss an die Veresterung des geschützten Fragments (3.3.4.2.), der Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen (3.2.9.) und präparativer HPLC ist der *N*-terminal *Z*-geschützte Peptidester mit einer isolierten Ausbeute von 8% (6 mg) isoliert worden. Abb. 40 zeigt das HPLC-Profil und Massenspektrum der gereinigten Verbindung. Die berechnete Masse von 2917 Da ist in Übereinstimmung mit dem Molpeak des Massenspektrums $m/z = 2917$ ($M+H$)⁺. Weiterhin ist ein Molpeak bei $m/z = 2784$ ($M+H$)⁺ enthalten, der der korrespondierenden Säure, d.h. dem nicht veresterten Peptid, entspricht.

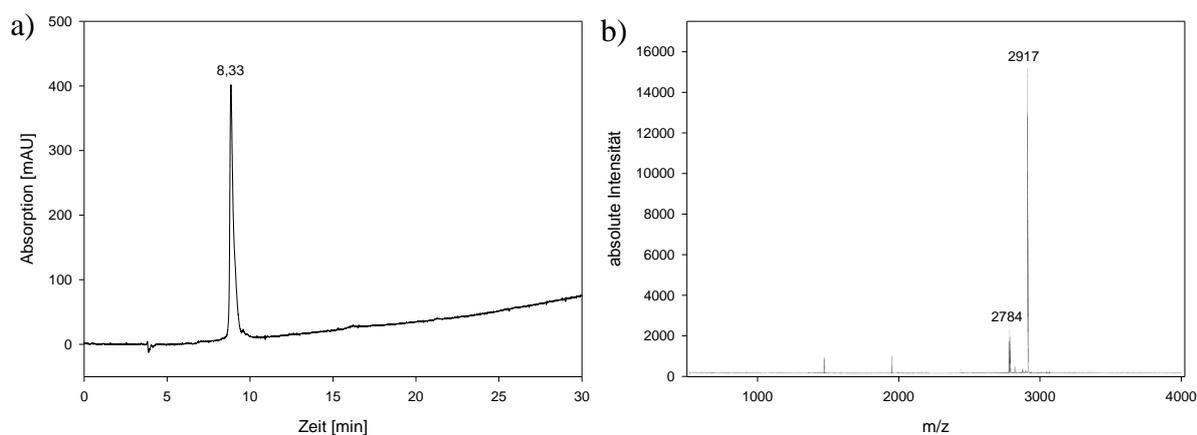


Abb. 40: a) HPLC-Profil des *Z*-D-Arg25-Gly47-OGp Esters nach präparativer Reinigung. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 8,33$ min. m/z berechnet: 2916; gefunden: 2917 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.5.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

Durch lineare Festphasen-Peptidsynthese in Kombination mit manuellen Kupplungsschritten an bestimmten Positionen sollte die Syntheseeffizienz des all-D-Peptids *Z*-D-Arg(25)-Gly47-OGp signifikant erhöht werden. Ein entsprechendes Syntheschema findet sich in Abb. 41. Dementsprechend wurden Kupplungen von Hand an den Positionen D-Pro42, D-Thr(*t*Bu)41, D-Pro36, D-Glu(*O**t*Bu)35, D-Pro28 und D-Arg(*P*bf)27 durchgeführt. Die Auswahl der Aminosäuren, welche manuell mittels HATU gekuppelt worden sind, leitete sich aus den unter 4.1.5.1. und 4.1.5.2. beschriebenen Synthesen ab.

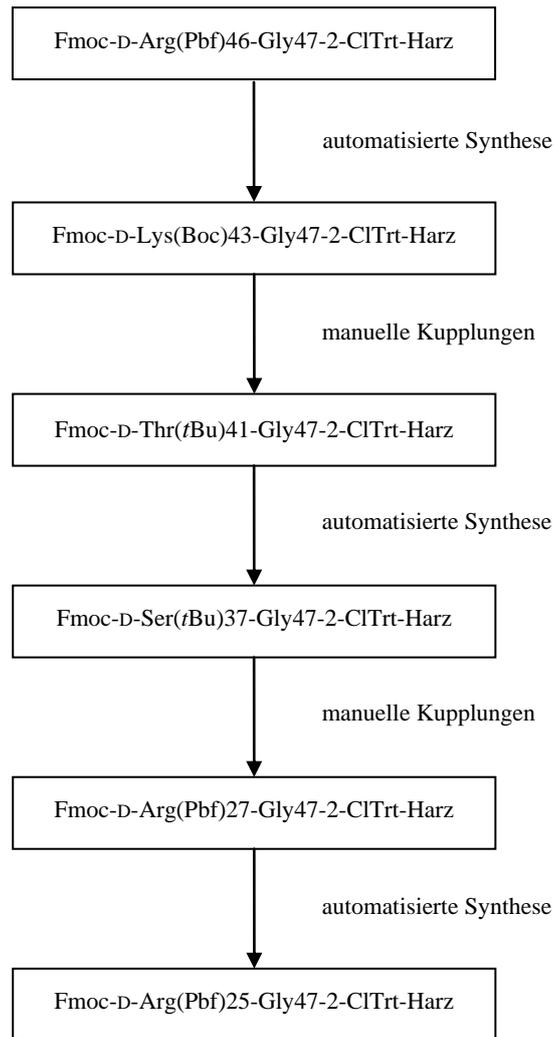


Abb. 41: Synthesestrategie für das Fragment Z-D-Arg25-Gly47-2-CITrt-Harz.

Das Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufs und das Massenspektrum nach „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) der Verbindung Z-D-Arg25-Gly47-OH stellt Abb. 42 dar. Bei einer Retentionszeit von 8,03 min ist ein Hauptpeak zu erkennen, welcher mittels Massenspektrometrie als das gewünschte Produkt identifiziert werden konnte. Die theoretische Masse von 2784 Da stimmt mit dem experimentell bestimmten Wert von $m/z = 2785 (M+H)^+$ überein.

Mittels „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) wurde das vollgeschützte Peptid vom polymeren Träger abgelöst und entsprechend getrocknet. Die Ausbeute betrug 47% (280 mg).

4. ERGEBNISSE

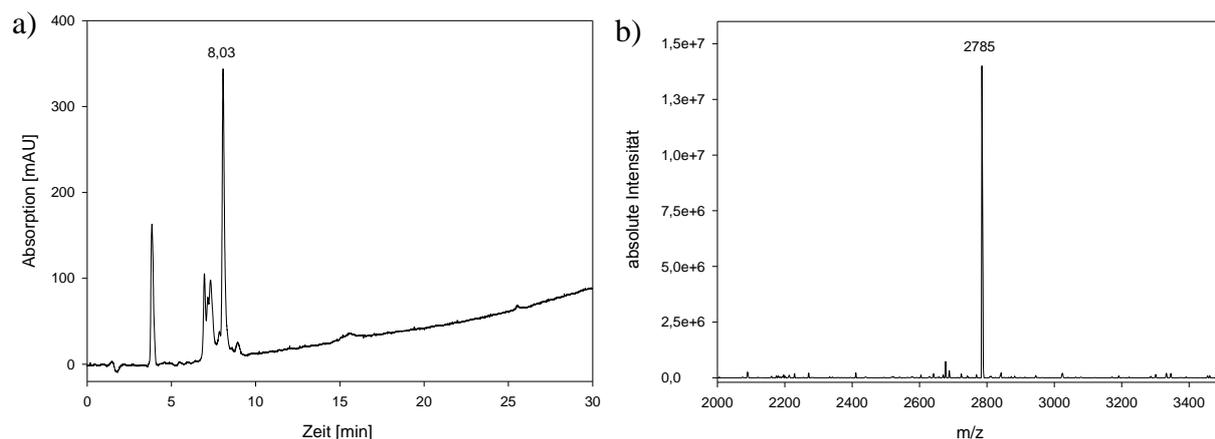


Abb. 42: a) HPLC-Profil des Peptids Z-D-Arg25-Gly47-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 8,03$ min. m/z berechnet: 2784; gefunden: 2785 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach Veresterung des vollgeschützten Fragments (3.3.4.3.), Schutzgruppen-Abspaltung (3.2.9.) und präparativer HPLC wurde das finale Produkt mit einer Ausbeute von 39% (77,5 mg) isoliert. Das HPLC-Profil und Massenspektrum der finalen Verbindung sind in Abb. 43 wiedergegeben. Die Retentionszeit des Z-D-Arg25-Gly47-OGp Esters beträgt 8,27 min und seine Identität konnte durch Massenspektrometrie bestätigt werden. Die berechnete Masse beträgt 2917 Da und stimmt mit dem Wert von $m/z = 2918$ ($M+H$)⁺ der massenspektrometrischen Untersuchung überein.

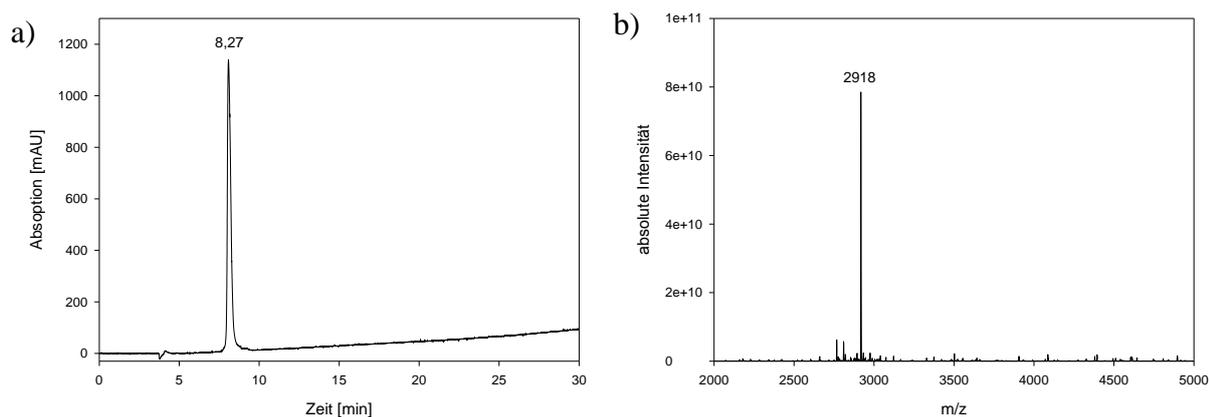


Abb. 43: a) HPLC-Profil des Esters Z-D-Arg25-Gly47-OGp nach präparativer Reinigung. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 8,03$ min. m/z berechnet: 2916; m/z gefunden: 2917 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Zur Bestimmung des Vorhandenseins von Sekundärstrukturen im Peptidester wurde ein CD-Spektrum aufgezeichnet. Das Ergebnis der Messung wird in Abb. 44 dargestellt. Im Spektrum

ist lediglich ein Signal bei einem Maximum von 190-210 nm zu beobachten. Bei ca. 230 nm kann eine leichte Schulter beobachtet werden, deren Intensität jedoch äußerst gering ist.

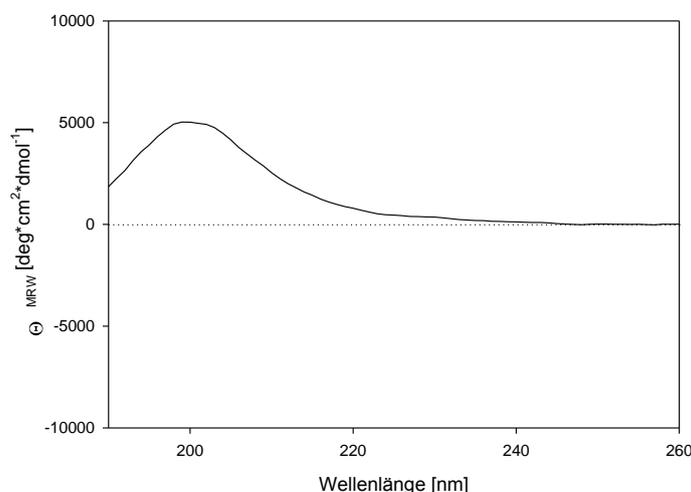


Abb. 44: CD-Spektrum des Esters Z-D-Arg25-Gly47-OGp bei 25 °C; 3 µM Peptid in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

4.1.6. Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp

4.1.6.1. Synthesestrategie I (Einschrittsynthese)

In einem ersten Versuch sollte die Möglichkeit der Darstellung des Fragments Ac-D-Ser1-Gly24-OH in einer linearen Weise am Synthesizer versucht werden. Nach erfolgter automatisierter Kupplung der D-Aminosäuren Arginin 23 bis Asparaginsäure 19 wurde eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) durchgeführt. Das Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufes und das Massenspektrum des Hauptsignals mit einem rt-Wert von 9,56 min sind in Abb. 45 veranschaulicht. Dieses Signal entspricht dem gewünschten Peptid. Das berechnete Molekulargewicht von 983 Da stimmt mit dem massenspektrometrisch bestimmten Wert von $m/z = 493 (M+2H)^{2+}$ überein. Der Peak bei $rt = 3,91$ min wird durch einen hohen Anteil an TFA hervorgerufen und das Signal bei $rt = 15,75$ min entspricht Fragmenten von Schutzgruppen.

4. ERGEBNISSE

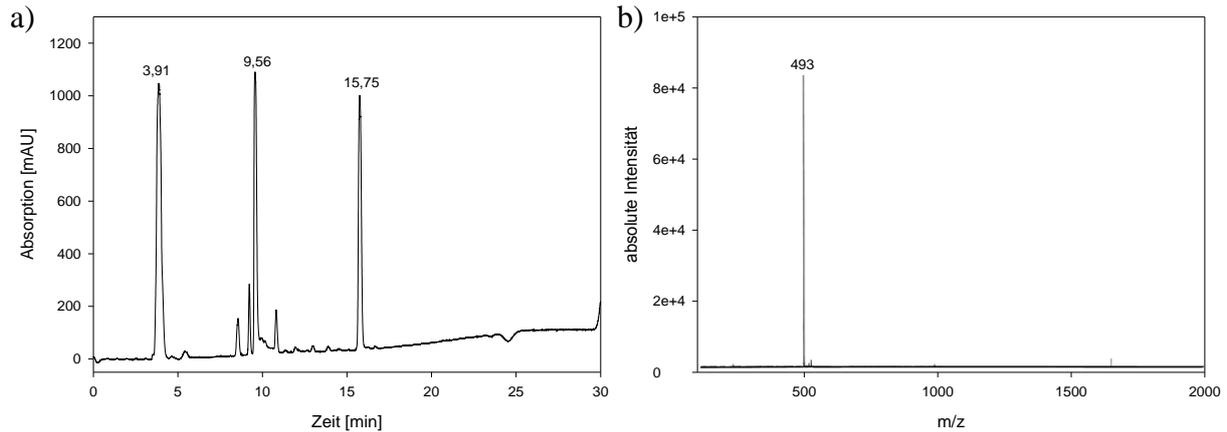


Abb. 45: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Asp18-Gly24-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 9,56$ min. m/z berechnet: 983; gefunden: 493 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach Fortsetzung der Synthese bis Aminosäure D-Leucin 11 wurde abermals eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) durchgeführt. Die erfolgte Charakterisierung des Produkts durch HPLC und Massenspektrometrie ist in Abb. 46 dargestellt. Neben den Signalen bei $rt = 16,42$ min und $rt = 17,51$ min, welche Fragmente von Schutzgruppen darstellen, ist ein Peak bei $rt = 11,26$ zu erkennen. Dieser wurde mittels Massenspektrometrie näher untersucht und zeigte Signale bei $m/z = 1752$ ($M+H$)⁺ und 1837 ($M+H$)⁺.

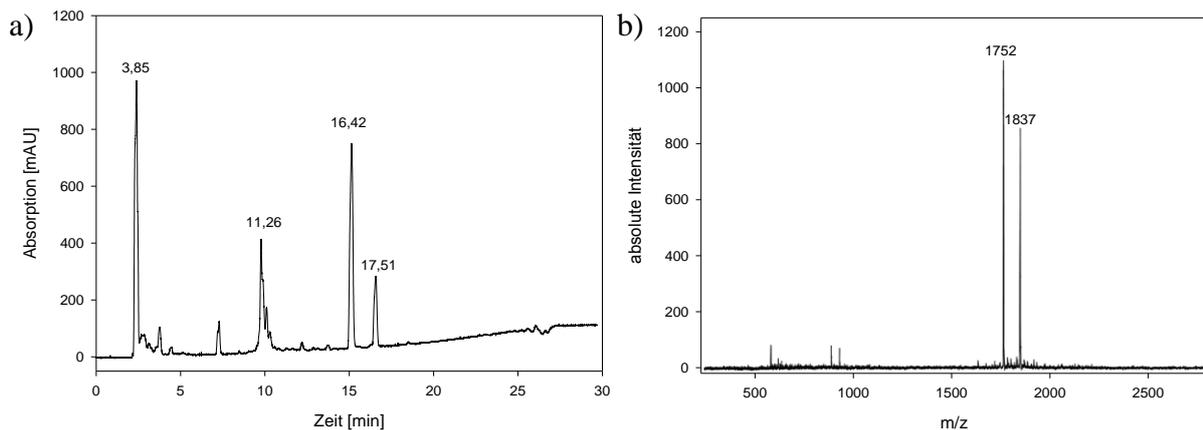


Abb. 46: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Leu11-Gly24-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 11,26$ min. m/z berechnet: 1797; gefunden: 1752 ($M+H$)⁺ und 1837 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Da diese jedoch nicht dem gewünschten Produkt mit einem Molekulgewicht von 1797 Da entsprachen und die Wiederholung der Darstellung des Peptids unter identischen Bedingungen mit demselben Ergebnis endete, wurde die Synthese an dieser Stelle beendet.

4.1.6.2. Synthesestrategie II (konvergente Synthese)

Innerhalb der zweiten Synthesestrategie sollte durch einen konvergenten Syntheseansatz die Darstellung des entsprechend vollgeschützten Fragments Ac-D-Ser(*t*Bu)1-Gly24-OH sowie die anschließende Veresterung realisiert werden. Dazu war die Darstellung dreier vollgeschützter Fragmente und deren chemische Ligation notwendig: Ac-D-Ser(*t*Bu)1-D-Pro10-OH, Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH sowie H-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-2-ClTrt-Harz. In Abb. 47 ist die Strategie schematisch dargestellt.

Die Auswahl der Fragmente erfolgte hinsichtlich minimaler Epimerisierung während der Aktivierung der Carbonsäurefunktion der entsprechenden Aminosäuren, wobei diese im Fall des Glycins nicht auftreten kann und im Fall des Prolins unter normalen Synthesbedingungen nicht geschieht, da das für die Razemisierung nötige Oxazolone nicht gebildet werden kann [208].

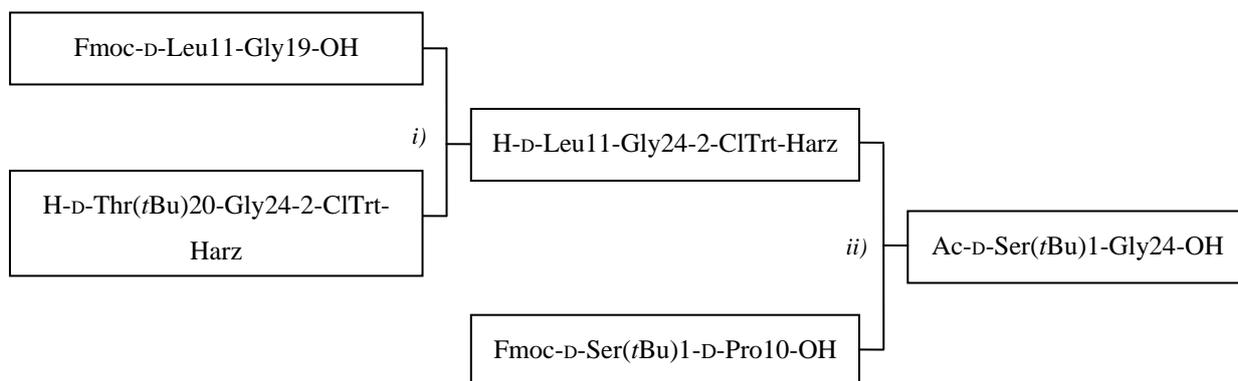


Abb. 47: Konvergente Synthesestrategie zur Darstellung des vollgeschützten Fragments Ac-D-Ser(*t*Bu)-1-Gly24-OH am 2-ClTrt-Harz. i) Kupplung, Fmoc-Abspaltung. ii) Kupplung, Fmoc-Abspaltung, Acetylierung, „HFIP-Abspaltung“.

Die Syntheseeffizienz des Fragments Fmoc-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-OH wurde nach einer „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) analysiert. Das Signal bei $t_r = 10,66$ min im HPLC-Profil wurde mittels Massenspektrometrie als das gewünschte Produkt identifiziert (Abb. 48). Das kalkulierte Molekulgewicht von 811 Da stimmt mit dem gemessenen Wert von $m/z = 812,4$ ($M+H$)⁺ überein. An die „Kontrollabspaltung“ schloss sich die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe an (3.2.4.).

4. ERGEBNISSE

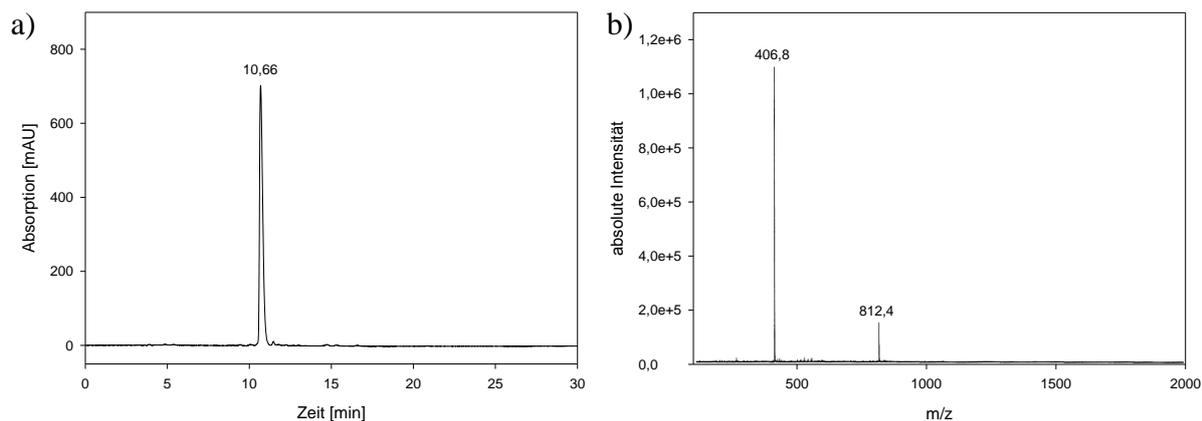


Abb. 48: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Thr20-Gly24-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,66$ min. m/z berechnet: 811; gefunden: 812 ($M+H$)⁺ und 407 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Für die Ligation zum Produkt Fmoc-D-Leu11-Gly24-2-CITrt-Harz war die Synthese des vollgeschützten Fragments Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH notwendig. Die Qualität der SPPS wurde mit einer „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) überprüft. In Abb. 49 sind HPLC-Profil und Massenspektrum der Verbindung abgebildet. Die massenspektrometrische Untersuchung des Produkts mit einer Retentionszeit von 12,83 min identifizierte die Substanz als das gewünschte Peptid. Die theoretische Molekülmasse von 1197 Da stimmt mit dem gemessenen Wert von 1198 ($M+H$)⁺ überein. Durch nachfolgende „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) wurde die geschützte, C-terminal freie Substanz mit einer Ausbeute von 68% (153 mg) pro Synthese erhalten. Aufgrund der hohen Reinheit und zur Vermeidung eines Substanzverlustes wurde auf eine Reinigung des Produkts verzichtet.

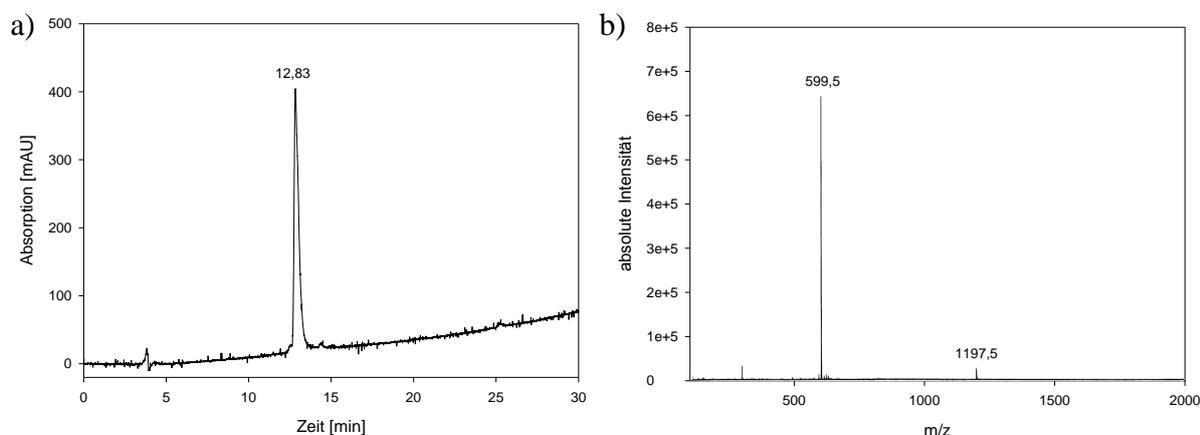


Abb. 49: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 12,83$ min. m/z berechnet: 1197; gefunden: 1198 ($M+H$)⁺ und 600 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Die chemische Ligation (3.3.5.2.) der Fragmente Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH und Fmoc-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-2-ClTrt ist mit einer „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) überprüft worden. In Abb. 50 sind die Ergebnisse in Form des HPLC-Profiles und Massenspektrums dargestellt. Die Verbindung mit $rt = 12,12$ min entspricht dem gewünschten Fragment Fmoc-D-Leu11-Gly24-OH, was durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden konnte. Der theoretische Wert von 1768 Da und der experimentell bestimmte Wert von $m/z = 886$ ($M+2H$)²⁺ sowie $m/z = 591$ ($M+3H$)³⁺ sind in Übereinstimmung. Anschließend wurden eine Acetylierung von nicht reagierten Aminofunktionen (3.3.5.2.) und die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (3.2.4.) des immobilisierten Peptids durchgeführt.

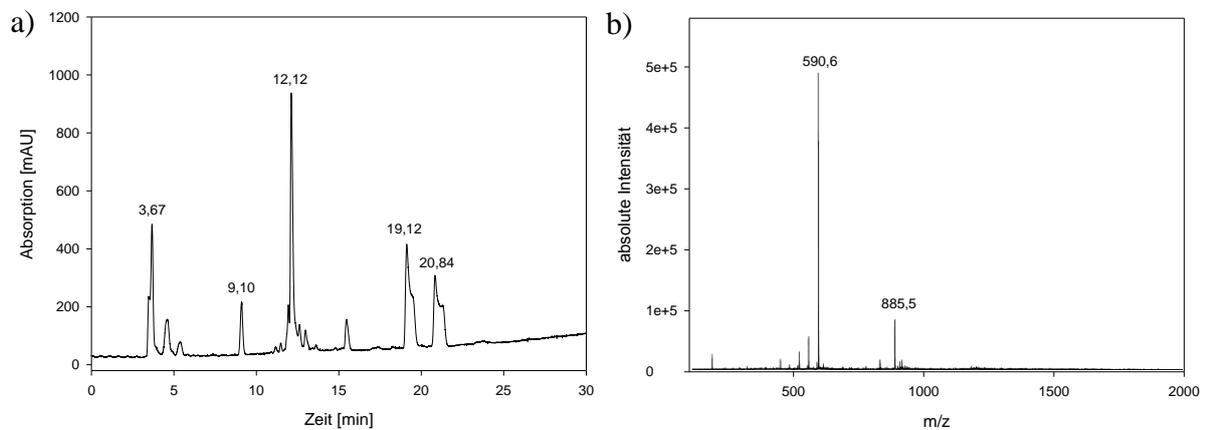


Abb. 50: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Leu11-Gly24-OH nach Ligation und „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 12,12$ min. m/z berechnet: 1768; gefunden: 886 ($M+2H$)²⁺ und 591 ($M+3H$)³⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

In Abb. 51 ist das Massenspektrum des Fragments Fmoc-D-Ser1-D-Pro10-OH nach automatisierter Synthese und „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.) dargestellt, welches für die finale Ligation zum Peptid Ac-D-Ser1-Gly24-OH benötigt wird. Die massenspektrometrische Charakterisierung des Signals bei $rt = 11,43$ min zeigte, dass es sich um das erwartete Produkt handelt. Die theoretische Masse von 1244 stimmt mit dem experimentellen Wert von $m/z = 1245,5$ ($M+H$)⁺ überein.

4. ERGEBNISSE

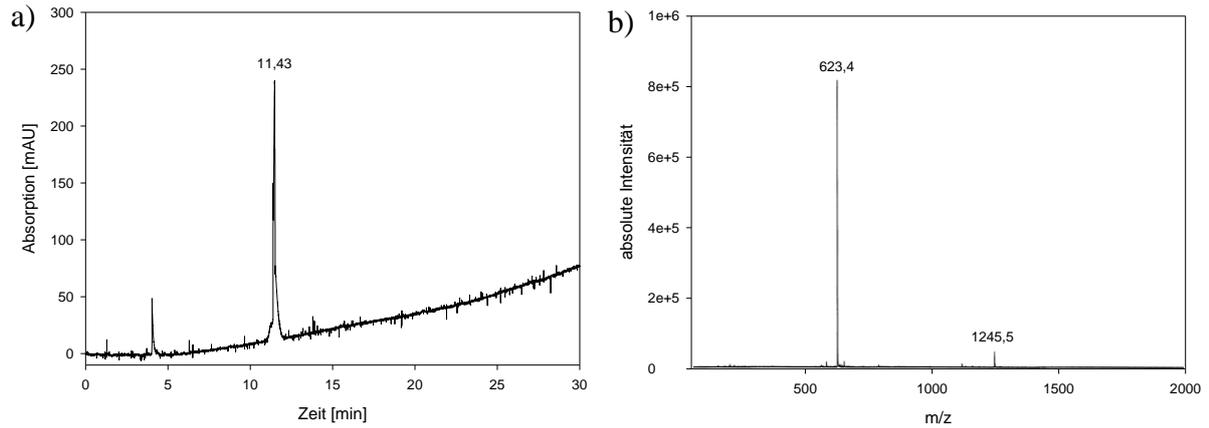


Abb. 51: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Ser1-D-Pro10-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 11,43$ min. m/z berechnet: 1244; gefunden: 1245 ($M+H$)⁺ und 623,4 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Durch „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) wurde die vollgeschützte Peptidsäure mit einer Ausbeute von 58% (143 mg) pro Synthese erhalten und in der finalen Ligation eingesetzt. Nach der Verknüpfung der Fragmente an der festen Phase (3.3.5.2.) erfolgte eine „Kontrollabspaltung“ (3.2.7.). Das Produkt ist mittels HPLC untersucht und der Peak bei $rt = 10,04$ min massenspektrometrisch analysiert worden. Das Signal bei $m/z = 2773$ ($M+H$)⁺ aus der Analyse stimmt mit dem theoretischen Molekulgewicht von 2772 Da überein. Diese Ergebnisse sind in Abb. 52 zusammengefasst.

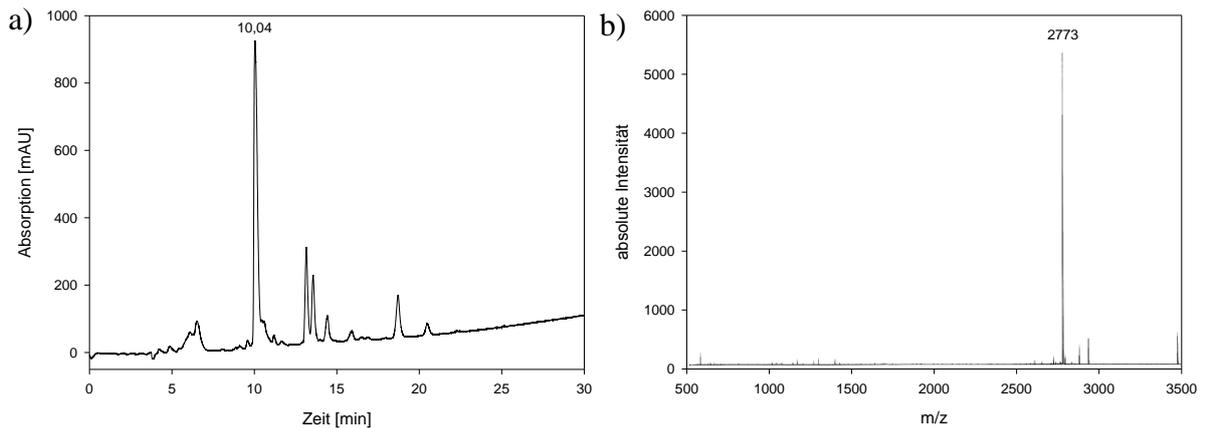


Abb. 52: a) HPLC-Profil des Peptids Fmoc-D-Ser1-Gly24-OH nach chemischer Ligation und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 10,04$ min. m/z berechnet: 2772; gefunden: 2773 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Nach der Fmoc-Abspaltung (3.2.4.) und Acetylierung (3.3.5.2.) des freien *N*-Terminus wurde das vollgeschützte Fragment vom polymeren Träger mittels „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) abgelöst und pro Synthese mit einer Rohausbeute von 54% (120 mg) dargestellt.

Abschließend ist die vollgeschützte Peptidsäure verestert (3.3.5.2.), das finale Fragment Ac-D-Ser(*t*Bu)1-Gly24-OGp(Boc)₂ durch TFA-Abspaltung von den Schutzgruppen (3.2.9.) befreit und HPLC-gestützt gereinigt worden. Die Qualität des finalen Produkts, welches mit einer isolierten Ausbeute von 8,5% (14 mg) erhalten wurde, ist mittels HPLC und Massenspektrometrie überprüft worden. Abb. 53 stellt die Analysenergebnisse dar. Die experimentell erhaltenen Signale bei $m/z = 2727$ ($M+H$)⁺ und $m/z = 1364$ ($M+2H$)²⁺ sind in Übereinstimmung mit der kalkulierten Masse von 2725 Da.

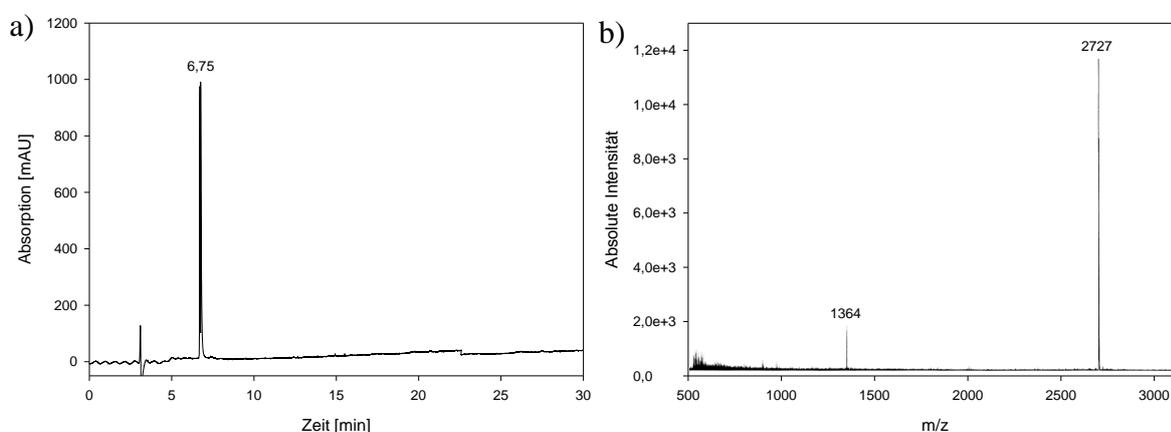


Abb. 53: a) HPLC-Profil des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp nach HPLC-Reinigung. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt=6,75$ min. m/z berechnet: 2725; gefunden $m/z = 2727$ ($M+H$)⁺ und 1364 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: *C*₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.6.3. Synthesestrategie III (optimierte Synthese)

Eine Steigerung der Synthesequalität und -quantität sollte durch die Kombination von linearer Peptidsynthese und manuellen Kupplungsschritten an der festen Phase erreicht werden. Die Synthesestrategie ist in Abb. 54 zusammenfassend schematisch abgebildet. Entsprechend wurden die Aminosäuren Arginin 23, Glycin 21, Asparaginsäure 20, Prolin 10 und Glutamin 9 manuell durch Aktivierung mit HATU geknüpft. Die Auswahl der Aminosäuren, die einer manuellen Kupplung unterworfen wurden, ergab sich aus den Ergebnissen der vorausgegangenen Synthesen (4.1.6.1. und 4.1.6.2.).

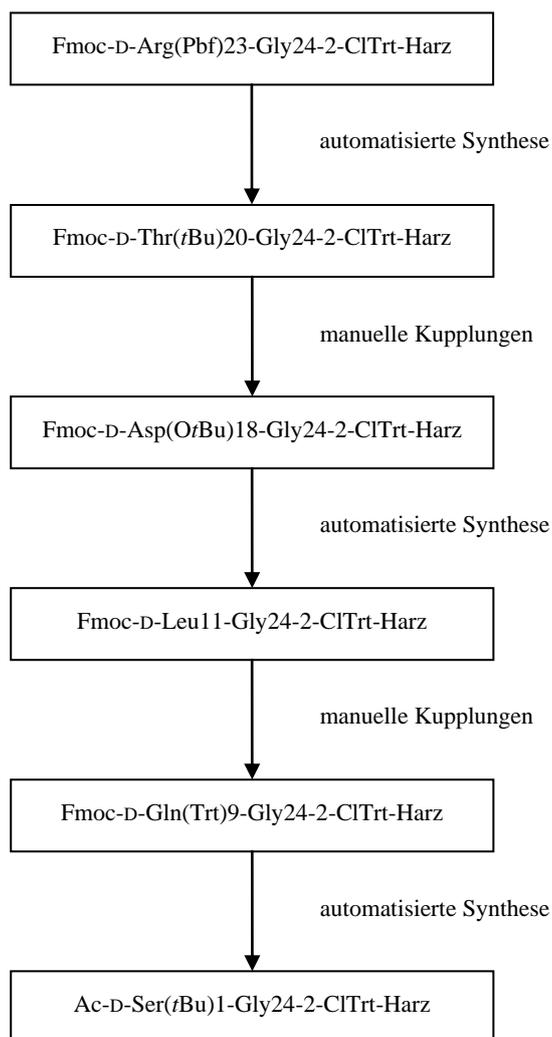


Abb. 54: Synthesestrategie für das Fragment Ac-D-Ser(tBu)1-Gly24-2-CITrt-Harz.

Das HPLC-Profil und Massenspektrum der Verbindung Ac-D-Ser1-Gly24-OH nach SPPS sind in Abb. 55 zusammengestellt. Das Chromatogramm zeigt lediglich ein großes Haupt-signal bei $rt = 5,70$ min. Der experimentell bestimmte Wert von $m/z = 2594$ und das theoretische Molekulargewicht von 2592 Da von Ac-D-Ser1-Gly24-OH sind in Übereinstimmung.

4. ERGEBNISSE

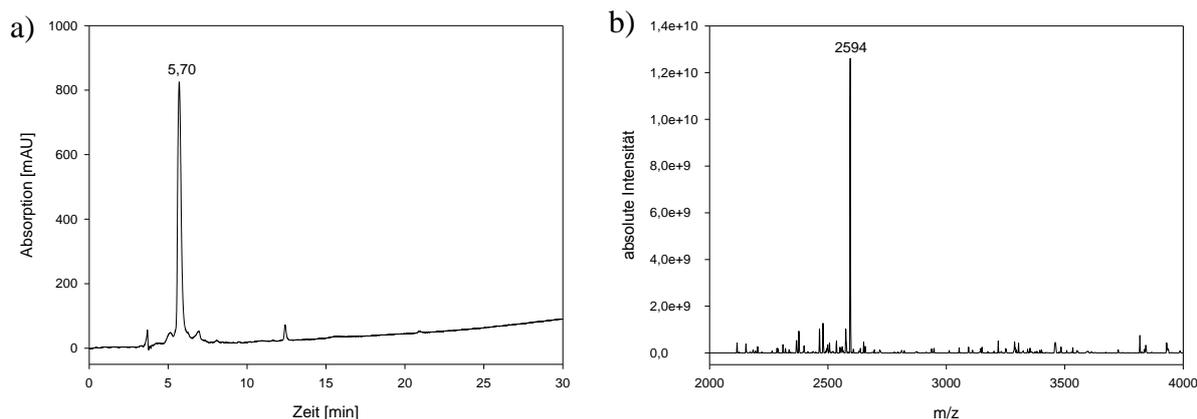


Abb. 55: a) HPLC-Profil des Fragments Ac-D-Ser1-Gly24-OH nach „Kontrollabspaltung“. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 5,70$ min. m/z berechnet: 2592; $m/z = 2594$ ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach erfolgter Acetylierung des *N*-Terminus sowie einer anschließenden „HFIP-Abspaltung“ (3.2.8.) ist das vollgeschützte, *C*-terminal freie Peptid Ac-D-Ser(*t*Bu)1-Gly24-OH vom polymeren Träger abgespalten und mit einer Ausbeute von 76% (420 mg) erhalten worden.

Die nach Veresterung mit HOGp(Boc)₂ (3.3.5.3.), Schutzgruppen-Abspaltung (3.2.9.) und präparativer HPLC-Reinigung erhaltene Endverbindung Ac-D-Ser1-Gly24-OGp wurde mit einer Ausbeute von 24% (102 mg), bezogen auf den 0,125 mmol Maßstab der SPPS, erhalten.

Abb. 56 gibt das entsprechende HPLC-Profil und Massenspektrum der gereinigten Endverbindung wieder.

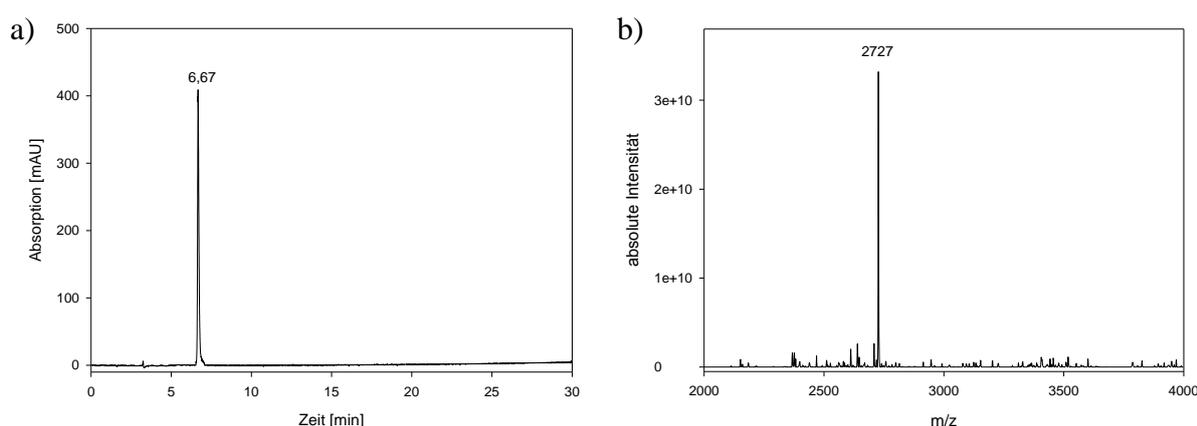


Abb. 56: a) HPLC-Profil des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp nach HPLC-Reinigung. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 6,67$ min. m/z berechnet: 2725; gefunden 2727 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_8 -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Zur Abschätzung der Ausbildung von Sekundärstrukturen des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp wurde ein CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 57). Zwischen 190-210 nm ist ein deutliches Maximum zu erkennen. Im restlichen Wellenlängenbereich ist keine signifikante Auslenkung zu beobachten.

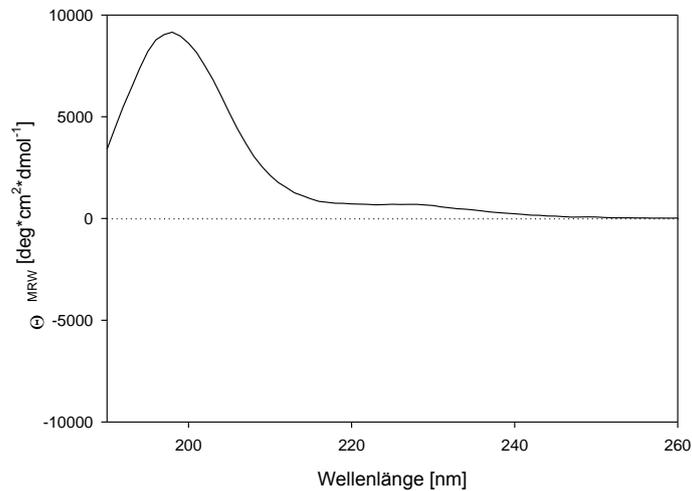


Abb. 57: CD-Spektrum des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp bei 25 °C; 3 μ M Peptid in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

4.1.7. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH

4.1.7.1. Spontane Esterhydrolyse

Durch die Bestimmung des Ausmaßes der spontanen Hydrolyse sollte die Stabilität des N-terminal Z-geschützten Peptidesters Z-D-Arg25-Gly47-OGp unter Ligationsbedingungen bei pH = 8,0 untersucht werden. Hierfür wurden der Ester in Ligationspuffer gelöst und zu bestimmten Zeitpunkten Proben des Ansatzes analysiert (3.3.7.1.). Der Zeitverlauf der Reaktion ist in Abb. 58 dargestellt. Die initiale Geschwindigkeit der spontanen Esterhydrolyse beträgt $20 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. Nach bereits vier Stunden ist der gesamte Peptid-4-Guanidinophenylester basenkatalysiert zur entsprechenden Säure hydrolysiert.

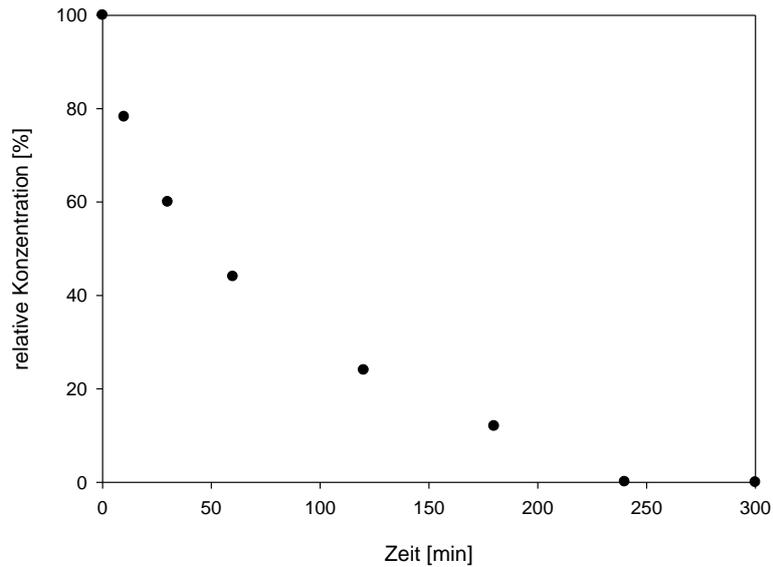


Abb. 58: Zeitverlauf der spontanen Hydrolyse des Z-D-Arg25-Gly47-OGp Esters im Ligationspuffer (1 mM Ester, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4.1.7.2. Enzymatische Esterhydrolyse

Zur Kontrolle der Akzeptanz des Z-D-Arg25-Gly-OGp Esters durch Clostripain ist dieser enzymatischen Hydrolysestudien unterzogen worden. Nach Bestätigung der Akzeptanz sollte bestimmt werden, mit welcher initialen Hydrolysegeschwindigkeit die Protease diesen Ester umsetzt (siehe 3.3.7.2.). In Abb. 59 sind die Zeitverläufe der Hydrolysereaktionen bei Clostripain-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M CLP im Ansatz ohne Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse des Esters vergleichend gegenübergestellt.

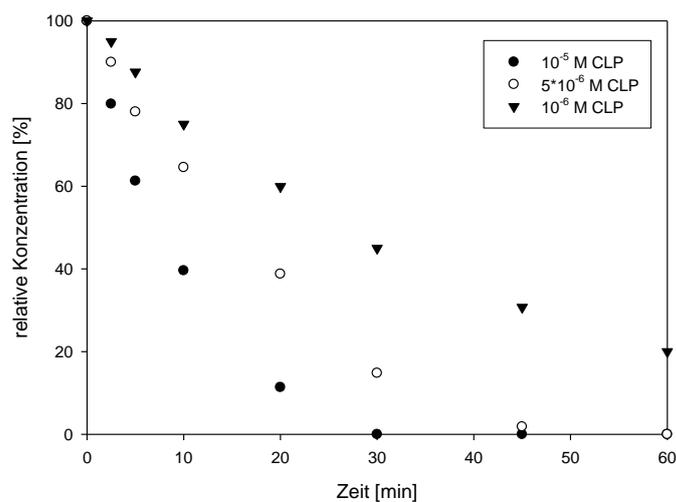


Abb. 59: Zeitverlauf der enzymatischen Hydrolyse des Z-D-Arg25-Gly47-OGp Esters bei verschiedenen Clostripain Konzentrationen ohne Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse (1 mM Ester, 10^{-5} M - 10^{-6} M CLP, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4. ERGEBNISSE

Dabei wird der Peptid-4-Guanidinophenylester nach 30 Minuten bei $1 \cdot 10^{-5}$ M Clostripain bzw. 60 Minuten bei $5 \cdot 10^{-6}$ M Clostripain zur korrespondierenden Säure umgesetzt. Für die geringste Enzymkonzentration wurde kein Endwert bestimmt.

4.1.7.3. Spontaner Acyltransfer

Um eine spontane Reaktion des Esters mit dem Nukleophil auszuschließen, wurden beide Komponenten ohne den Zusatz der Protease Clostripain miteinander inkubiert (vgl. 3.3.7.3.). In Abb. 60 ist der Verlauf der Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben. Zu erkennen ist, dass lediglich die Konzentration des Esters abnimmt, während die Konzentration des Nukleophils konstant bleibt. Dabei hydrolysiert der Ester mit der gleichen Geschwindigkeit, wie unter 4.1.6.1. bestimmt.

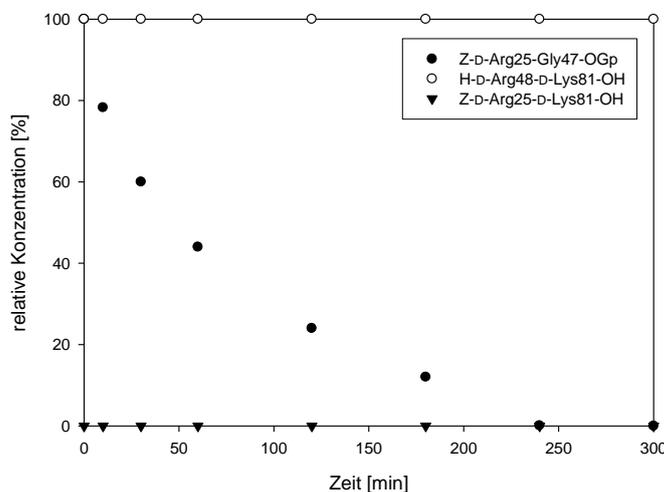


Abb. 60: Reaktionsverlauf des spontanen Acyltransfers des Z-D-Arg25-Gly47-OGp Esters mit dem Nukleophil H-D-Arg48-D-Lys81-OH unter Ligationsbedingungen ohne Anwesenheit von Clostripain (1 mM Ester, 1 mM Nukleophil, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4.1.7.4. Optimierung des enzymatischen Acyltransfers

Zur Optimierung des enzymatischen Acyltransfers von Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH hinsichtlich der Produktausbeute wurden im Reaktionsansatz verschiedene Verhältnisse von Nukleophil zu Ester bei gleicher Enzymkonzentration untersucht (siehe 3.3.7.4., Tab. 3). Wurden Ester und Nukleophil äquimolar eingesetzt, so ergab sich eine Ausbeute von 46%. Ist das Nukleophil im doppelten Überschuss zugegeben worden, so stieg die Ausbeute auf 69%. Die größte Syntheseeffizienz wurde erhalten, wenn der Acylakzeptor in einer dreifachen Konzentration verwendet wurde. Die Ausbeute betrug 82%, wobei durch eine weitere Erhöhung der Nukleophilkonzentration die Ausbeute nicht mehr gesteigert werden konnte.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 3: Ausbeuten in % des Acyltransfers von Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH in Abhängigkeit vom Verhältnis Nukleophil zu Ester.

Verhältnis Nukleophil : Ester			
1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1
46	69	82	82

(1 mM Ester, 1-4 mM Nukleophil, $5 \cdot 10^{-6}$ M Clostripain, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0, 60 Minuten Reaktionszeit)

4.1.7.5. Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen

Der Zeitverlauf der Reaktion bei einem optimierten Nukleophil: Ester Verhältnis von 3 : 1 wurde vom analytischen in den semi-präparativen Maßstab überführt und ist in Abb. 61 über einen Zeitraum von 24 Stunden dargestellt.

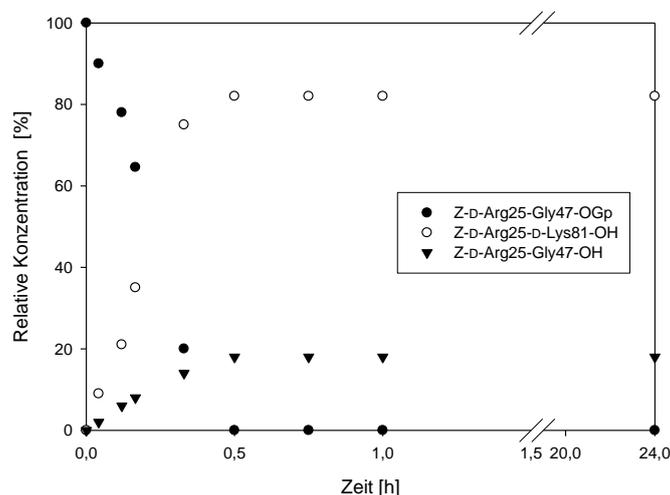


Abb. 61: Reaktionsverlauf der Clostripain-katalysierten Ligation von Z-D-Arg25-Gly47-OGp mit H-D-Arg48-D-Lys81-OH (1 mM Ester, 3 mM Nukleophil, $5 \cdot 10^{-6}$ M Clostripain, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

Zur semi-präparativen Darstellung des Peptids Z-D-Arg25-D-Lys81-OH wurden die unter 4.1.7.4. optimierten Verhältnisse gewählt (3.3.9.5.). Nach semi-präparativer Reinigung eines Reaktionsansatzes wurden im Durchschnitt 4,9 mg Produkt pro Ansatz erhalten, was einer Ausbeute von 52% entspricht. Gleichzeitig konnten durchschnittlich 7,2 mg (41%) des eingesetzten Nukleophils zurückgewonnen werden. In Abb. 62 sind das HPLC-Profil des gereinigten Produkts und das entsprechende Massenspektrum abgebildet. Die berechnete Molekülmasse von 6782 Da stimmt mit dem experimentell gemessenen Wert von $m/z = 6784$ (M+H)⁺ überein.

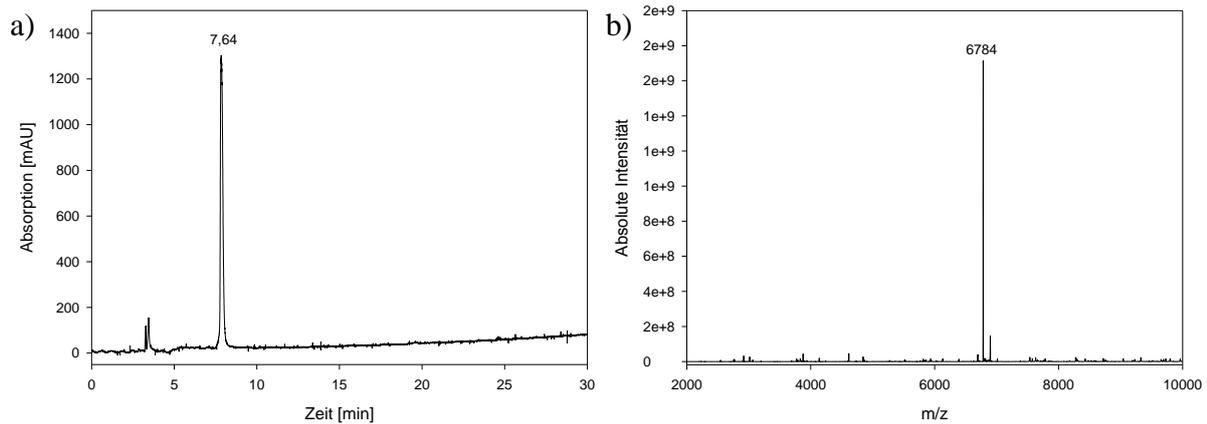


Abb. 62: a) HPLC-Profil des Produkts Z-D-Arg25-D-Lys81-OH nach semi-präparativer HPLC-Reinigung. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 7,64$ min. m/z berechnet: $m/z = 6782$; gefunden: $6784 (M+H)^+$. HPLC-Bedingungen: C_{18} -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.1.8. Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH

Nach Abspaltung der *N*-terminalen Z-Schutzgruppe mit einem Thioanisol-TFA-Gemisch sowie semi-präparativer Reinigung (3.3.8.) wurde das entsprechend *N*-terminal freie Peptid H-D-Arg25-D-Lys81-OH mit einer isolierten Ausbeute von 64% (12 mg) erhalten. Das entsprechende HPLC-Profil und Massenspektrum sind in Abb. 63 dargestellt. Der experimentell gemessene Wert von $m/z = 6648 (M+H)^+$ entspricht der theoretischen Molekülmasse von 6646 Da.

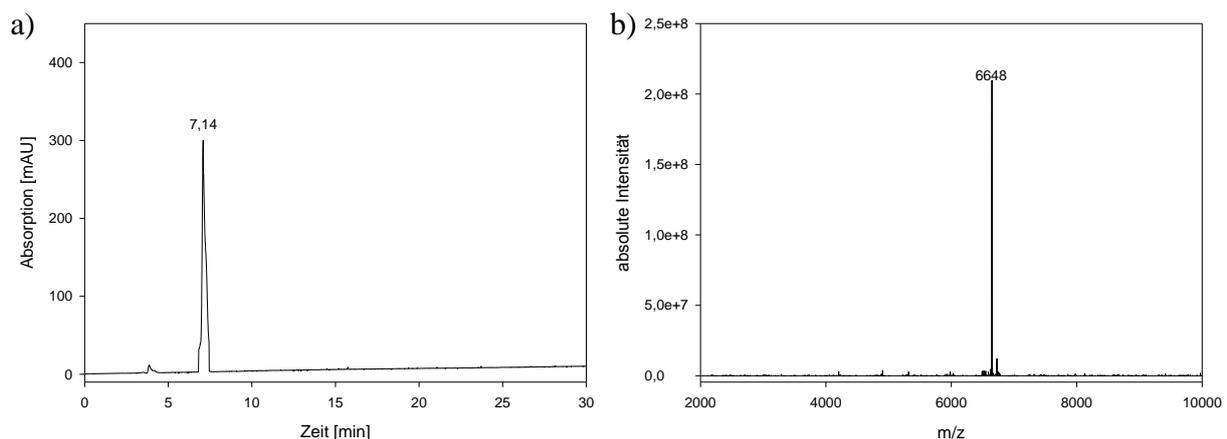


Abb. 63: a) HPLC-Profil des Produkts H-D-Arg25-D-Lys81-OH nach Abspaltung der Z-Schutzgruppe und semi-präparativer HPLC-Reinigung. b) ESI-Massenspektrum des Peaks nach Dekonvolution bei $rt = 7,14$ min. m/z berechnet: 6646; gefunden 6648 $(M+H)^+$. HPLC-Bedingungen: C_{18} -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Mittels CD-Spektroskopie sollte untersucht werden, inwieweit das 57mer Peptid H-D-Arg25-D-Lys81-OH in der Lage ist, Sekundärstrukturen auszubilden. In Abb. 64 ist das erhaltene CD-Spektrum dargestellt. Deutlich ist ein Signal im Bereich von 190-210 nm zu erkennen. Im Bereich von 225 nm kann ein schwaches Signal detektiert werden.

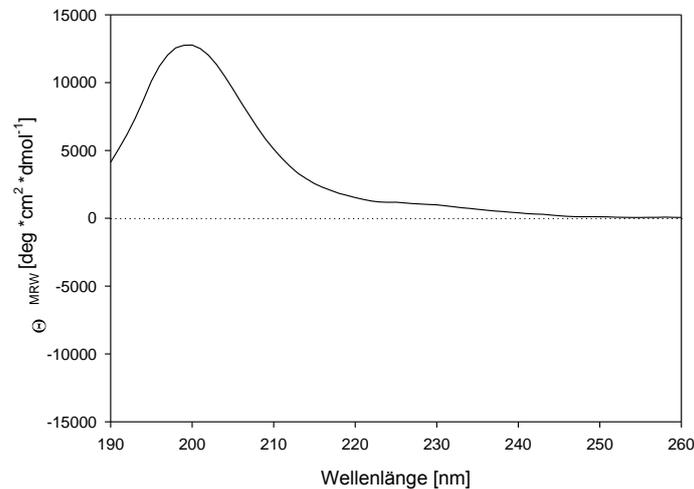


Abb. 64: CD-Spektrum von H-D-Arg25-D-Lys81-OH bei 25 °C; 3 μ M Peptid in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

4.1.9. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH

4.1.9.1. Spontane Esterhydrolyse

Zur Bestimmung der Stabilität des *N*-terminal acetylierten Esters wurde dieser einer spontanen Hydrolyse im Ligationspuffer unterzogen (3.3.9.1.). Zu ausgewählten Zeitpunkten sind dafür Aliquote des Reaktionsansatzes entnommen und mittels HPLC analysiert worden. Wie in Abb. 65 dargestellt, sind nach 40 Minuten noch ca. 50% des Esters vorhanden, was einer spontanen Zerfallsgeschwindigkeit von $25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ entspricht. Nach ca. vier Stunden findet sich kein intakter Ester mehr im Ansatz.

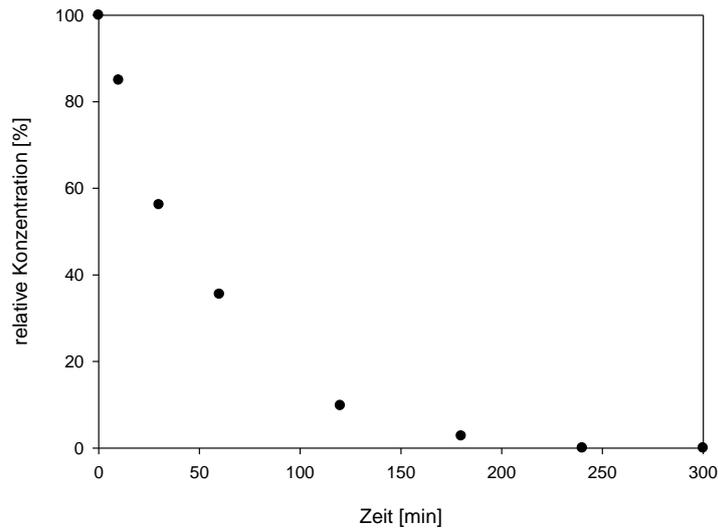


Abb. 65: Zeitverlauf der spontanen Hydrolyse des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp im Ligationspuffer (1 mM Ester, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4.1.9.2. Enzymatische Esterhydrolyse

Zur Kontrolle der Akzeptanz des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp ist dieser enzymatischen Hydrolysestudien mit Clostripain unterzogen worden. Abb. 66 gibt die Zeitverläufe der Hydrolysereaktionen bei Clostripain-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M ohne Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse des Esters wieder.

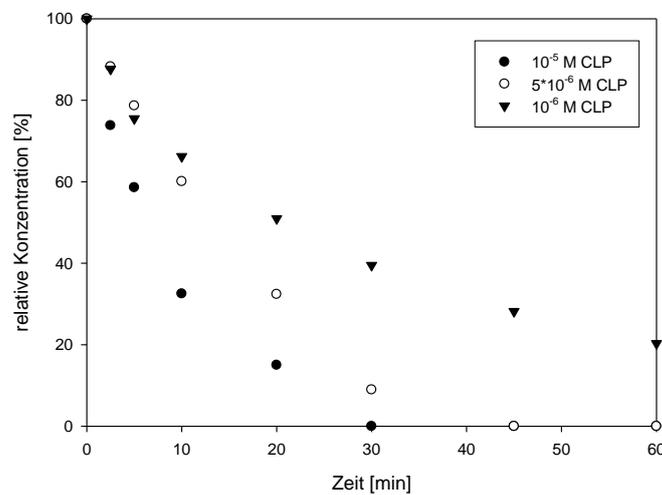


Abb. 66: Zeitverlauf der enzymatischen Hydrolyse des Ac-D-Ser1-Gly24-OGp Esters bei verschiedenen Clostripain-Konzentrationen ohne Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse (1 mM Ester, 10^{-5} M – 10^{-6} M CLP, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4.1.9.3. Spontaner Acyltransfer

Der Ester Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und das Nukleophil H-D-Arg25-D-Lys81-OH wurden ohne Zugabe von Clostripain im Ligationspuffer inkubiert, um eine spontane Reaktion beider

4. ERGEBNISSE

Verbindungen auszuschließen. Der Zeitverlauf des ablaufenden Prozesses ist in Abb. 67 dargestellt. Diesem ist zu entnehmen, dass lediglich der Ester zur korrespondieren Säure hydrolysiert, sich die Konzentration des Nucleophils nicht ändert und demzufolge keine spontane Produktbildung stattfindet.

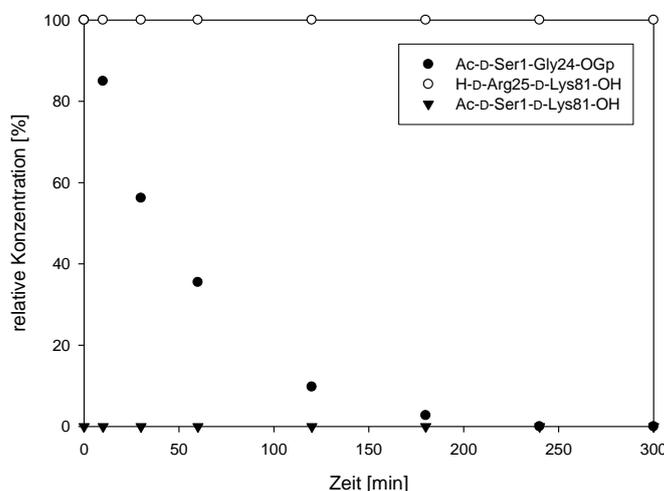


Abb. 67: Zeitverlauf des spontanen Acyltransfers von Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH im Ligationsspuffer (1 mM Ester, 1 mM Nucleophil, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0).

4.1.9.4. Enzymatischer Acyltransfer und Optimierung des Nucleophil-Ester-Verhältnisses sowie Zugabe von Additiven

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH zu erhalten, sind Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Nucleophil zu Ester durchgeführt worden (3.3.9.4.). Initial wurde auf die Zugabe von Additiven verzichtet. Aufgrund der geringen Ligationseffizienzen, die sich lediglich in 10% Produktbildung bei drei- und vierfachem Überschuss an Nucleophil äußerten (Tab. 4), wurden Experimente in Gegenwart von Harnstoff und Tween 100 durchgeführt.

Tabelle 4: Ausbeuten des Acyltransfers von Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH in % bei verschiedenen Verhältnissen von Ester zu Nucleophil.

Verhältnis Nucleophil : Ester			
1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1
0	0	10	10

(1 mM Ester, 1, 2, 3 bzw. 4 mM Nucleophil, $5 \cdot 10^{-6}$ M Clostripain, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8,0, 60 Minuten Reaktionszeit).

4. ERGEBNISSE

Dabei konnte durch die Zugabe des Detergens Tween 100 (0,01% im Ansatz) ein positiver Einfluss hinsichtlich der Ausbeute beobachtet werden und die Optimierung des Anteils an Nukleophil erfolgte deshalb unter Zugabe von Tween 100 im Ansatz. Wie in Tab. 5 zusammengestellt, konnte durch die Beigabe von Tween 100 und einem drei- und vierfachen Überschuss an Nukleophil eine Ausbeute von 25% erzielt werden.

Tabelle 5: Ausbeuten des Acyltransfers von Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH in % bei verschiedenen Verhältnissen von Ester zu Nukleophil in Gegenwart von Tween 100

Verhältnis Nukleophil : Ester			
1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1
5	8	25	25

(1 mM Ester, 1-4 mM Nukleophil, $5 \cdot 10^{-6}$ M Clostripain, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 0,01% Tween 100, pH 8,0, 60 Minuten Reaktionszeit)

4.1.9.5. Enzymatischer Acyltransfer unter optimierten Bedingungen

Um das 81mer Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH im semi-präparativen Maßstab herzustellen, wurden Ligationsansätze im 400 µl Maßstab unter optimierten Bedingungen durchgeführt, vereint, HPLC-chromatographisch getrennt und produkt-enhaltene Fraktionen lyophilisiert. Das gewünschte all-D-Protein konnte aus vier Ligationsansätzen mit einer isolierten Ausbeute von 3 mg (15%) erhalten werden. Abb. 68 zeigt das finale Produkt nach der HPLC-Reinigung sowie dessen massenspektrometrische Charakterisierung.

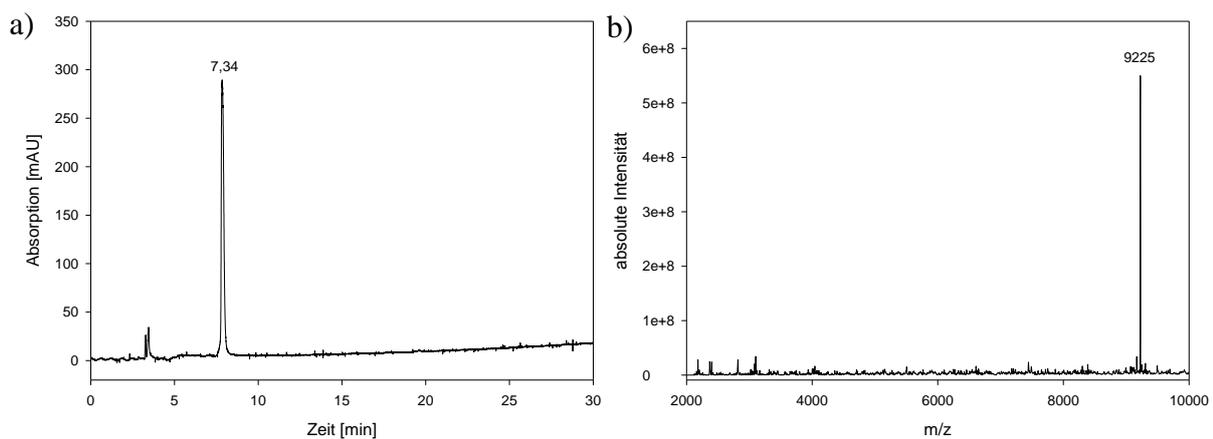


Abb. 68: a) HPLC-Profil des finalen Produkts Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH nach semi-präparativer HPLC-Reinigung. b) ESI-Massenspektrum nach Dekonvolution des Peaks bei $rt = 7,34$ min. m/z berechnet: 9223; gefunden $m/z = 9225$ ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C18-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Zur Untersuchung der Sekundärstrukturen des Proteins Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH wurde ein CD-Spektrum aufgezeichnet. Wie aus Abb. 69 ersichtlich wird, ist ein Maximum bei 190-210 nm zu verzeichnen.

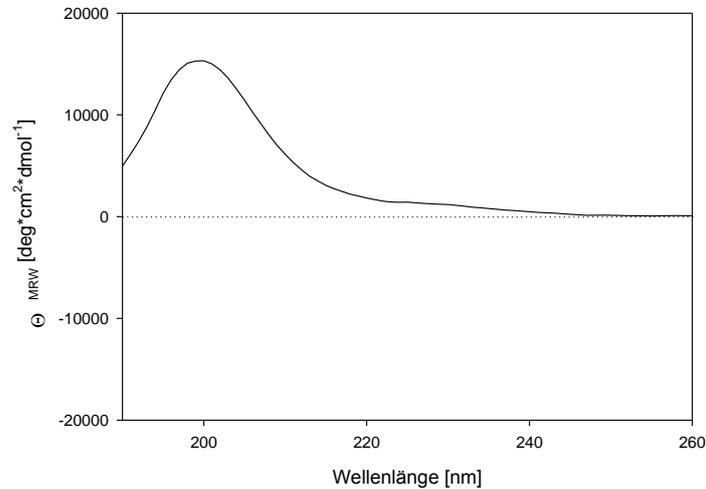


Abb. 69: CD-Spektrum Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH bei 25 °C; 3 μ M Peptid in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5.

4.2. Teil B – „Studien zur Synthese von *E. coli* Parvulin 10“

4.2.1. Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH

Die Beurteilung der Ligationseffizienz der ADP hinsichtlich der Verknüpfung längerer Peptide entsprechend der unter 3.4.7. beschriebenen Experimente setzte zunächst die Synthese der Modellnukleophile H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH voraus.

Nach Beladung von 2-Chlortritylchlorid-Polystyren-Harz für einen Ansatz im 0,125 mmol Maßstab mit der jeweiligen C-terminalen Aminosäure, automatisierter Festphasen-Peptidsynthese, TFA-Behandlung und HPLC-gestützter Reinigung (siehe 3.4.1.) wurde das Peptid H-LGSVKASAYK-OH mit einer Ausbeute von 59% (101 mg) und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH mit einer Ausbeute von 52% (137 mg) erhalten. Abb. 70 stellt die HPLC-Profile und Massenspektren der Endverbindungen dar. Unter den angegebenen Bedingungen beträgt die Retentionszeit 7,28 min für H-LGSVKASAYK-OH und 11,62 min für H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH. Die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigten die Identität der jeweiligen Produkte. Neben den einfach protonierten konnten auch die zweifach

4. ERGEBNISSE

protonierten Spezies im Spektrum gefunden werden. Diese stimmen mit den berechneten Molekülmassen überein.

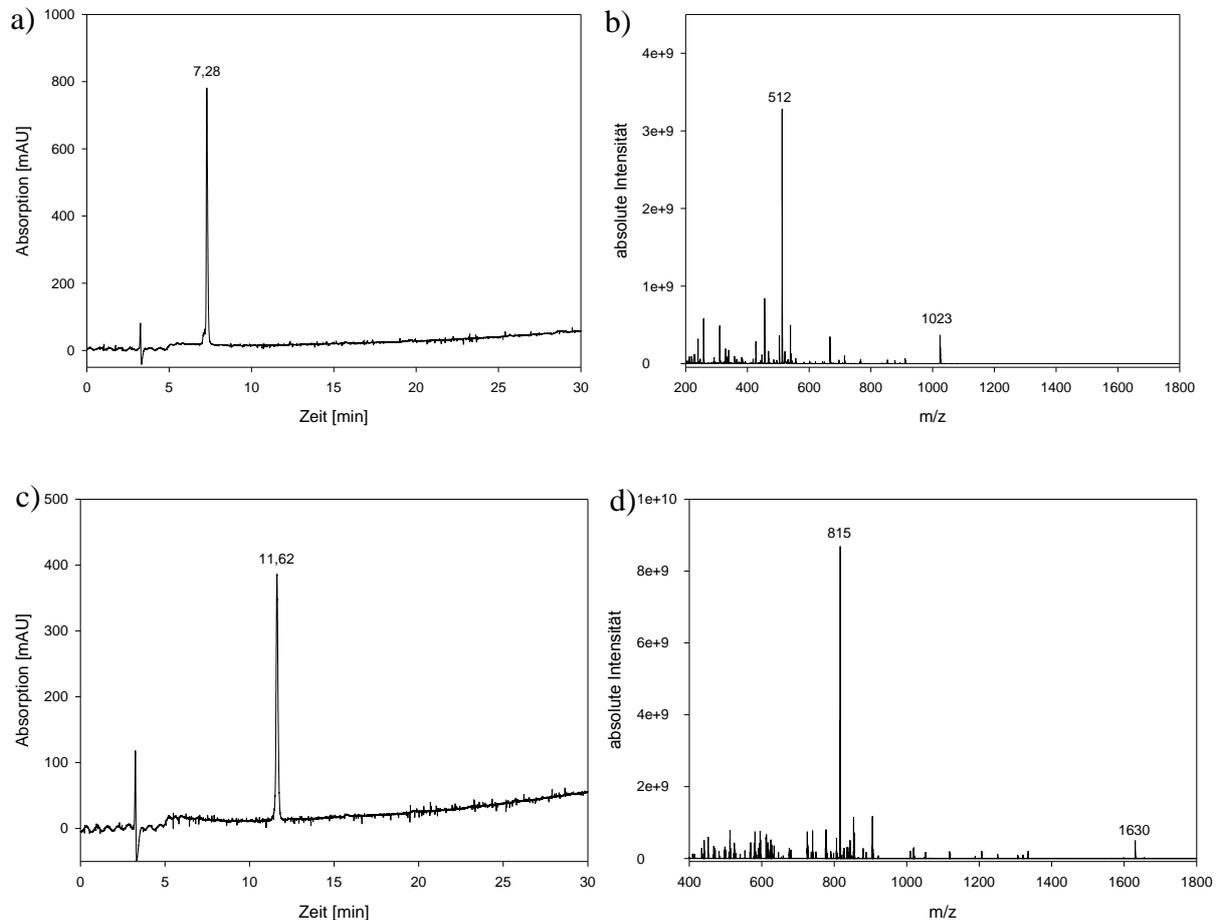


Abb. 70: a) HPLC-Profil des Peptids H-LGSVKASAYK-OH. b) ESI-Massenspektrum des Peaks mit $rt = 7,28$ min. m/z berechnet: 1022; m/z gefunden: 1023 ($M+H$)⁺ und 512 ($M+2H$)²⁺. c) HPLC-Profil des Peptids H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH. d) ESI-Massenspektrum des Peaks mit $rt = 11,62$ min. m/z berechnet: 1629; m/z gefunden: 1630 ($M+H$)⁺ und 815 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.2.2. Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp

Für nachfolgende Ligationsexperimente unter Einsatz längerer Substratmimetika als Acyldonor war die Synthese des Esters Bz-AYLDAYVKAG-OGp notwendig. Nach erfolgter SPPS am Sulfamylbutyrylaminomethyl-Harz, linker-Aktivierung mittels Iodacetonitril, Ablösung mit H-Gly-OGp(Boc)₂ und präparativer Reinigung (siehe 3.4.2.) ist das Produkt mit einer Ausbeute von 35% (67 mg) erhalten worden. HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum der Endverbindung sind in Abb. 71 dargestellt. Die Retentionszeit des Produkts beträgt unter den angegebenen Laufbedingungen 13,5 min. Der im Massenspektrum zu erkennende Peak bei $m/z = 655$ ($M+2H$)²⁺ entspricht der berechneten Molekülmasse von 1305 Da.

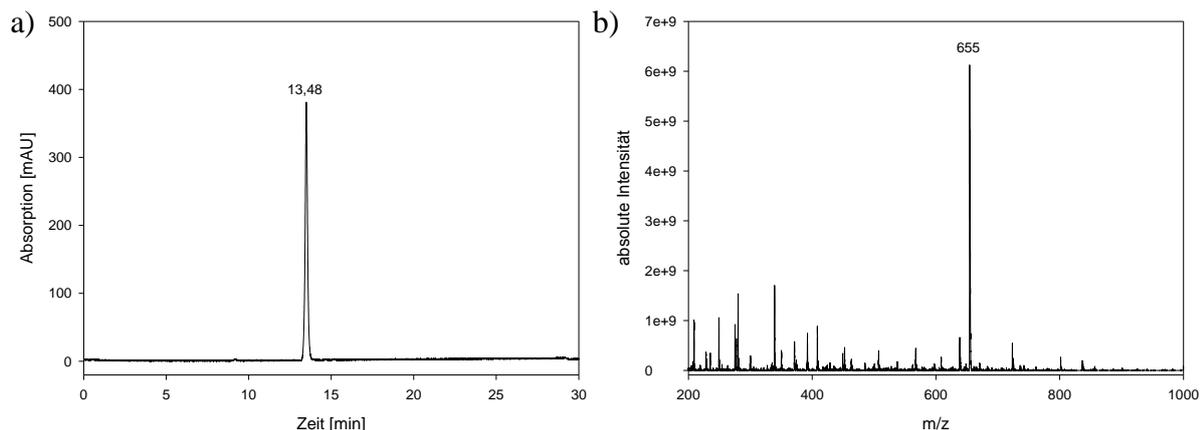


Abb. 71: a) HPLC-Profil des Esters Bz-AYLDAYVKAG-OGp nach präparativer HPLC-Reinigung b) ESI-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 13,48$ min. m/z berechnet: 1305; m/z gefunden: 655 ($M+2H$)²⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.2.3. Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH

Für die Synthese des Par10-Fragmentes H-Lys36-Asn92-OH, dem Nukleophil für die ADP-katalysierte Ligation mit dem Substratmimetikum Z-Ala1-Lys35-OBzl (siehe 3.4.3.) wurde das zuvor unter 3.2. erwähnte 2-Chlortritylchlorid-Polystyren-Harz verwendet, da bereits eigene Erfahrungen mit dem polymeren Träger bestanden, die Synthese längerer Peptide beschrieben wurde [209] und es den gewählten Bedingungen der Fmoc/*t*Bu-Festphasen-Peptidsynthese genügt.

Um den Verlauf der schrittweisen automatisierten Synthese zu verfolgen, wurde der Syntheseprozess nach dem Erreichen einer Kettenlänge von 30 bzw. 44 Aminosäuren unterbrochen und eine Kontrollabspaltung gemäß 3.2.7. durchgeführt. Eine frühere Reaktionskontrolle war aufgrund der bereits erfolgten Optimierung der Synthese nicht mehr nötig [persönliche Mitteilung Vaclav Cerovsky]. Die HPLC-Profile der entsprechenden Zwischenstufen Fmoc-Lys63-Asn92-OH sowie Fmoc-Leu49-Asn92-OH sowie deren Massenspektren sind in Abb. 72 zusammengefasst. In beiden HPLC-Profilen der „Kontrollabspaltungen“ konnte jeweils ein Hauptpeak detektiert werden. Die massenspektrometrische Analyse dieser Peaks ergab, dass es sich um die gewünschten Produkte mit Molmassen von 3678,5 ($M+H^+$) sowie 5258,1 ($M+H^+$) handelt. Entsprechend ist die Synthese bis Lys36 fortgesetzt worden.

4. ERGEBNISSE

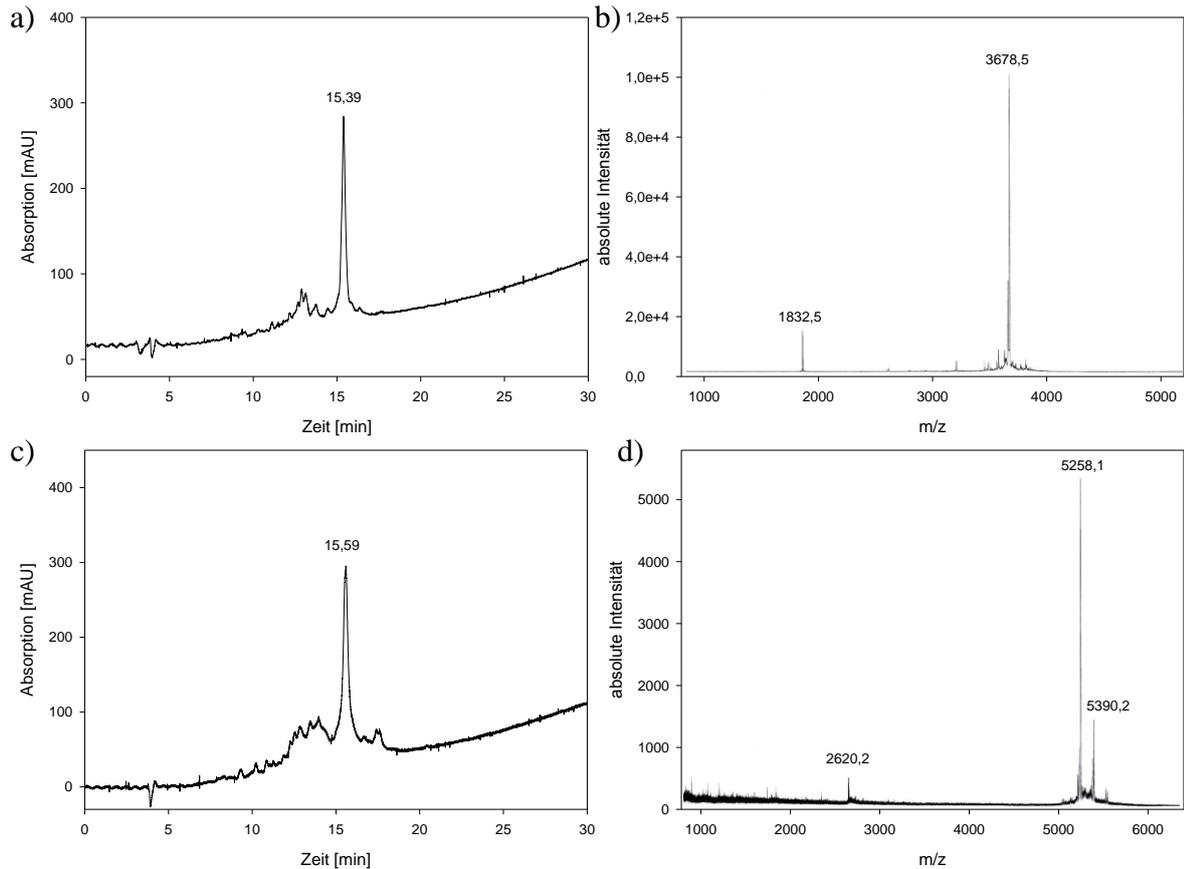


Abb. 72: a) HPLC-Profil des Intermediates Fmoc-Lys63-Asn92-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 15,39$ min. m/z berechnet: 3678,3; m/z gefunden: 3679,5 ($M+H$)⁺. c) HPLC-Profil der Zwischenstufe Fmoc-Leu49-Asn92-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. d) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei $rt = 15,59$ min. m/z berechnet: 5255,2; m/z gefunden: 5258,1 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach der Kupplung aller Aminosäuren bis Lysin 36 erfolgten die Freisetzung des Peptids vom Träger sowie simultan die Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen durch eine TFA-Behandlung (3.4.3.). Das Rohprodukt wurde nach Abdampfen der TFA mit einer Ausbeute von 207 mg erhalten. Das HPLC-Chromatogramm und das Massenspektrum des ungereinigten Rohprodukts ohne Etherfällung sind in Abb. 73 dargestellt. Der Molpeak $m/z = 6560$ ($M+H$)⁺ entspricht der kalkulierten Molekülmasse von 6560 Da.

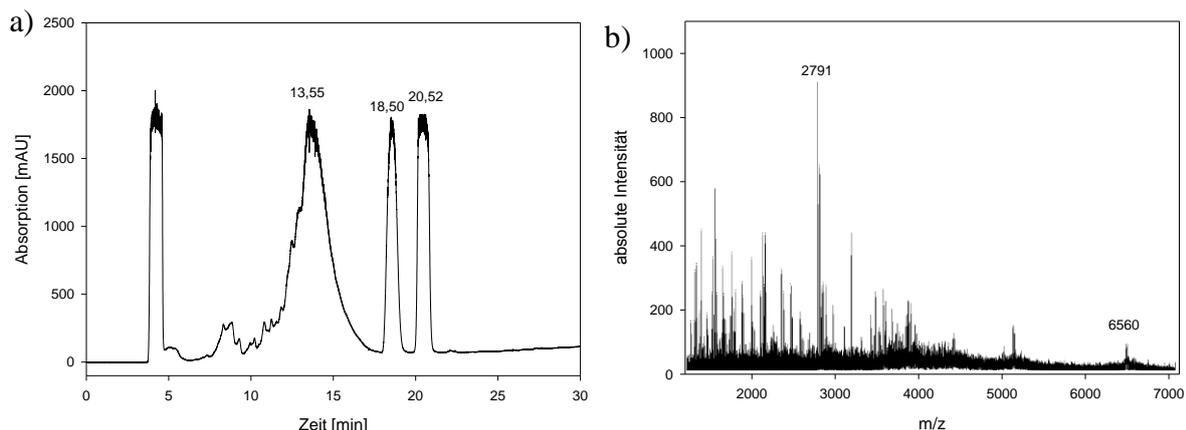


Abb. 73: a) HPLC-Profil des Rohpeptids Fmoc-Lys36-Asn92-OH nach SPPS und „Kontrollabspaltung“. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohpeptids ohne analytische Reinigung. m/z berechnet: 6560; m/z gefunden: 6560 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe sowie einer präparativen HPLC-Reinigung konnte das zur Homogenität gereinigte Produkt mit einer Ausbeute von 4% (36,2 mg) bezogen auf 0,125 mmol erhalten werden. Das entsprechende HPLC-Profil und Massenspektrum sind in Abb. 74 dargestellt.

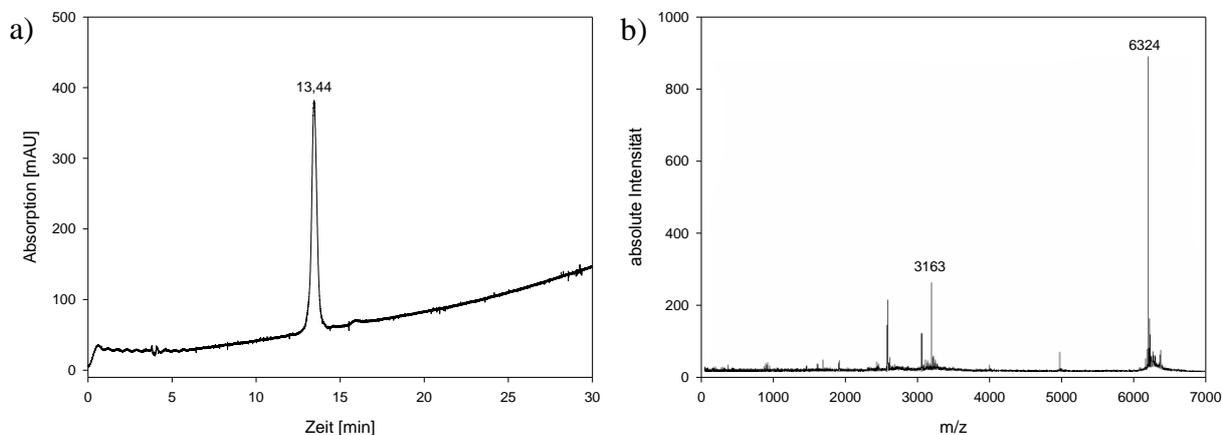


Abb. 74: a) HPLC-Profil von Par10 H-Lys36-Asn92-OH nach präparativer Reinigung. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peptids. m/z berechnet: 6323; m/z gefunden: 6324 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₁₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.2.4. Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl

Die Darstellung des Substratmimetikums Z-Ala1-Lys35-OBzl, dem Acyldonor für die ADP-katalysierte Ligation mit dem Nukleophil H-Lys36-Asn92-OH, erfolgte schrittweise an verschiedenen 4-Sulfamyl-substituierten Harzen mittels Syntheseautomaten (siehe 3.4.4.). Der Einsatz dieses linker- bzw. Harztypes war notwendig, da er bei Verwendung der

4. ERGEBNISSE

Fmoc/*t*Bu-Synthesestrategie die Möglichkeit bietet, Peptid(thio)ester mit minimaler Razemisierung der C-terminalen Aminosäure darzustellen [201]. Aufgrund der geringen Stabilität des H-Lys-OGp(Boc)₂ wurde sich anstelle des 4-Guanidinphenols für den korrespondierenden Benzylester entschieden. Dies ist legitim, da sich die enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeiten von 4-Guanidinophenyl- und Benzylestern nur marginal unterscheiden (4.2.5.).

Durch die Aktivierung des *linkers* mit Iodacetonitril und anschließender Aminolyse mit mehreren Äquivalenten H-Lys(Boc)-OBzl in DMF wurde der vollgeschützte Ester vom polymeren Träger abgespalten (3.4.2.). Das Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppen erfolgte mit einem Mix aus TFA, Wasser und TIS. Da das Rohprodukt überschüssiges H-Lys-OBzl enthielt, kann an dieser Stelle keine korrekte Rohausbeute angegeben werden. Die HPLC-Chromatogramme von Z-Ala1-Lys35-OBzl nach der Ablösung von den eingesetzten *safety-catch*-Harzen sind vergleichend in Abb. 75 dargestellt.

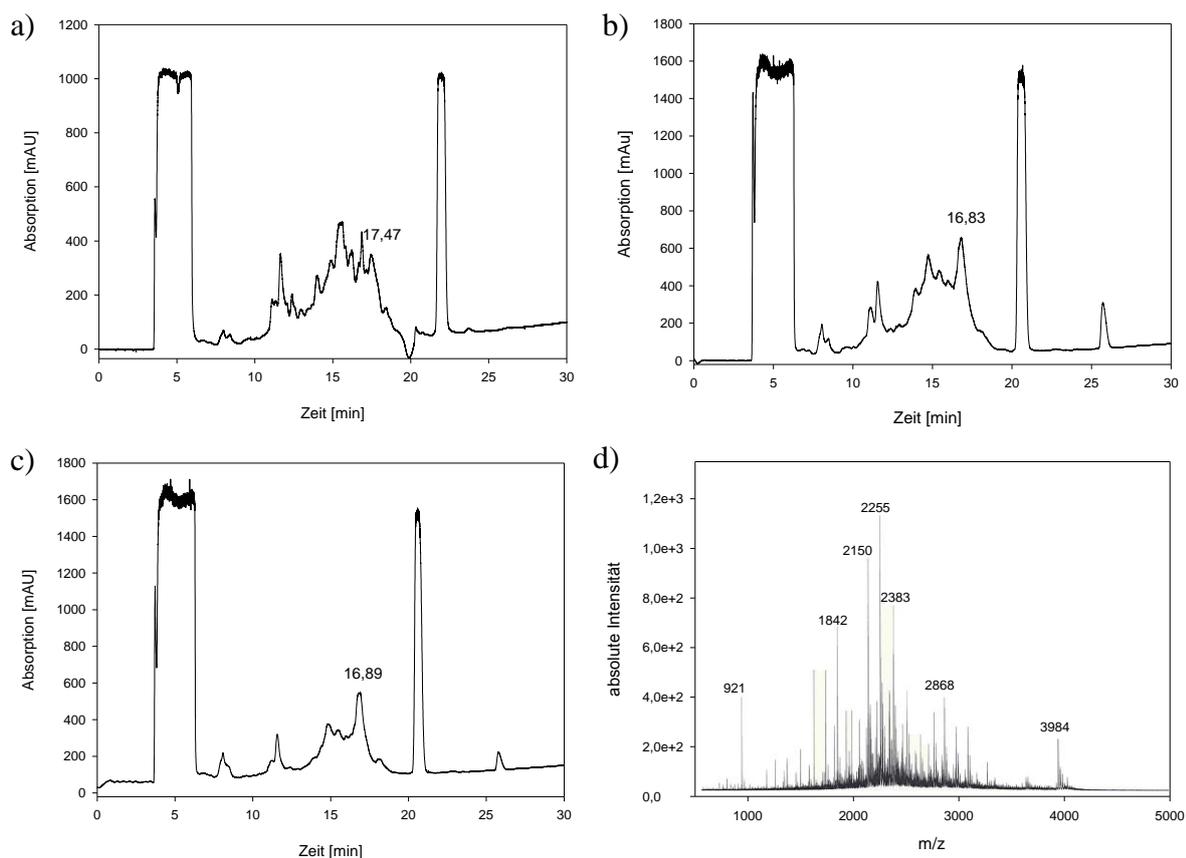


Abb. 75: a) - c) HPLC-Profile der Synthese von Z-Ala1-Lys35-OBzl an verschiedenen *safety-catch*-Harzen. a) Sulfamylbutyryl-Aminomethyl-Polystyren-Harz. b) Sulfamylbutyryl-Aminomethyl-Novagel-Harz. c) Sulfamylbenzoyl-Aminomethyl-Polystyren-Harz. d) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peaks bei einer *rt* = 16,89 min. c) *m/z* berechnet: 3983; *m/z* gefunden: 3984 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C₈-Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4. ERGEBNISSE

Generell konnte in jedem Fall das gewünschte Produkt mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Für eine effizientere Synthese des Substratmimetikums fiel jedoch die Wahl auf das Sulfamylbenzoyl-Aminomethyl-Polystyren-Harz, da sich in diesem Fall die Produktbildung in einem prominenten Hauptpeak bei 16,89 Minuten äußerte. Demgegenüber zeichneten sich besonders Sulfamylbutyrylaminomethyl-Polystyren-Harz, aber auch Sulfamylbutyrylaminomethyl-Novagel-Harz, durch eine massive Anhäufung von Fehl- und Rumpfsequenzen aus, die eine Isolierung des Produkts bei ≈ 17 Minuten unmöglich erscheinen ließen.

Nach erfolgter präparativer HPLC-Reinigung wurde das Produkt, welches aus der Synthese unter Einsatz von 4-Sulfamylbenzoylaminomethyl-Polystyren-Harz als Träger stammt, mit einer Ausbeute von 3% (18,6 mg) in Bezug auf den Gesamtansatz von 0,125 mmol erhalten. Das HPLC-Profil der gereinigten Verbindung sowie das dazugehörige Massenspektrum sind in Abb. 76 wiedergegeben.

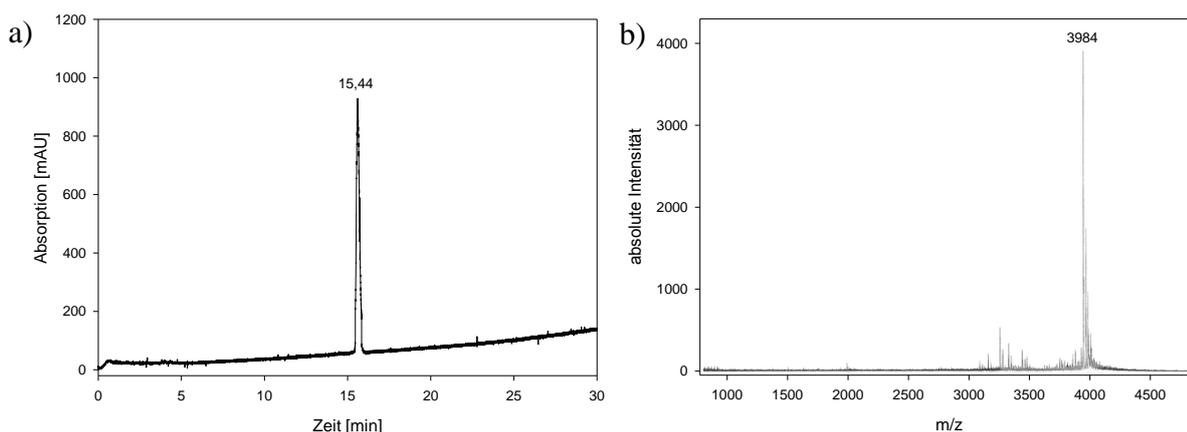


Abb. 76: a) HPLC-Profil nach präparativer Reinigung von *Z*-Ala1-Lys35-OBzl. b) MALDI-ToF-Massenspektrum des Peptidesters. m/z berechnet: 3983; m/z gefunden: 3984 ($M+H$)⁺. HPLC-Bedingungen: C_{18} -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

4.2.5. ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika

Durch den Einsatz verschiedener Boc-Ala-(Thio)esterderivate in ADP-katalysierten Hydrolysestudien sollte festgestellt werden, ob substratimitierende Esterabgangsgruppen von der Protease in das aktive Zentrum eingebunden und umgesetzt werden (siehe 3.4.5.). Die Auswahl der Abgangsgruppen umfasste gemäß der Primärspezifität der ADP für D-Phe aromatische Ester- und Thioesterstrukturen ohne und mit verschiedenen Substitutionen (Guanidino-, Acetamido-, Carboxy-, Hydroxy-) in 4-Stellung. In Abb. 77 sind die entsprechenden Strukturen der Abgangsgruppen der verwendeten Substratmimetika dargestellt. Als Negativkontrolle diente der aliphatische Methyl ester Boc-Ala-OMe und zum

4. ERGEBNISSE

Vergleich wurde das spezifische Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe in die Untersuchungen einbezogen.

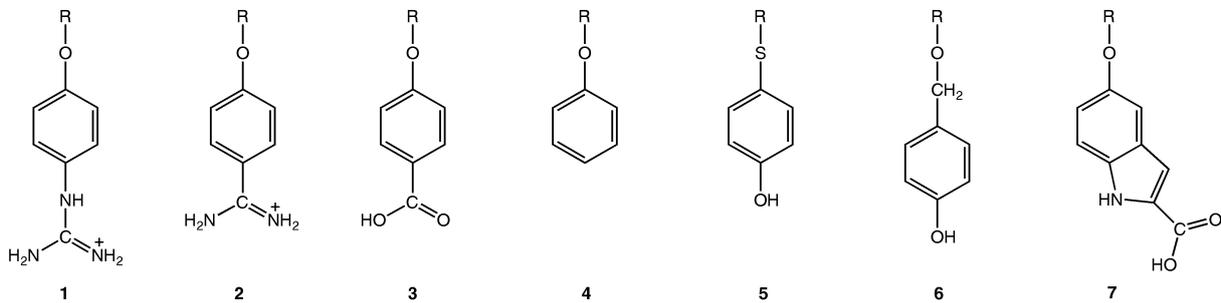


Abb. 77: Esterabgangsstrukturen verschiedener Substratmimetika. (1) 4-Guanidinophenyl (OGp); (2) 4-Carboxyamidophenyl (OCap); (3) 4-Carboxyphenyl (OCp); (4) Phenyl (OPh); (5) 4-Hydroxythiophenyl (SPhOH); (6) Benzyl (OBzl); (7) 2-Carboxy-1H-Indol-5-yl (OInd); R = Aminoacyl.

Die initialen Hydrolyseraten in $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ sind für die genannten Derivate in Abb. 78 zusammengefasst. Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, werden alle eingesetzten Substratmimetika mit aromatischer Esterabgangsgruppe von der Protease als Substrat erkannt und umgesetzt. Ausnahme stellt, wie erwartet, Boc-Ala-OMe mit dem Methyl-Rest als Abgangsgruppe dar. Das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe wird mit einer Geschwindigkeit von $630 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ umgesetzt. Das am schnellsten enzymatisch hydrolysierte Substratmimetikum ist Boc-Ala-OGp mit $2,3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$, wobei auch alle anderen untersuchten Derivate Hydrolysegeschwindigkeiten in derselben Größenordnung aufweisen.

Nachdem in initialen Hydrolysestudien die generelle Akzeptanz von verschiedenen Substratmimetika der allgemeinen Struktur Boc-Ala-O/SR bestätigt werden konnte, dienten weitere Studien der Bestimmung der Toleranz der ADP gegenüber der Natur der C-terminalen Aminosäure unter Einsatz verschiedener N-terminal Boc-geschützter Aminosäure-4-Guanidinophenylester (Boc-Xaa-OGp). Während eine gewisse Auswahl an aliphatischen, hydrophoben, sauren und basischen Boc-Xaa-OGp's (Xaa = Glu, Lys, Gln, Ala, Leu, Phe, Gly) enzymatischen Hydrolysestudien unterworfen wurden, erfolgte die Auswahl der 4-Guanidinophenylesterabgangsgruppe im Hinblick auf die schnellste initiale Hydrolysegeschwindigkeit von $2,3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ von Boc-Ala-OGp.

4. ERGEBNISSE

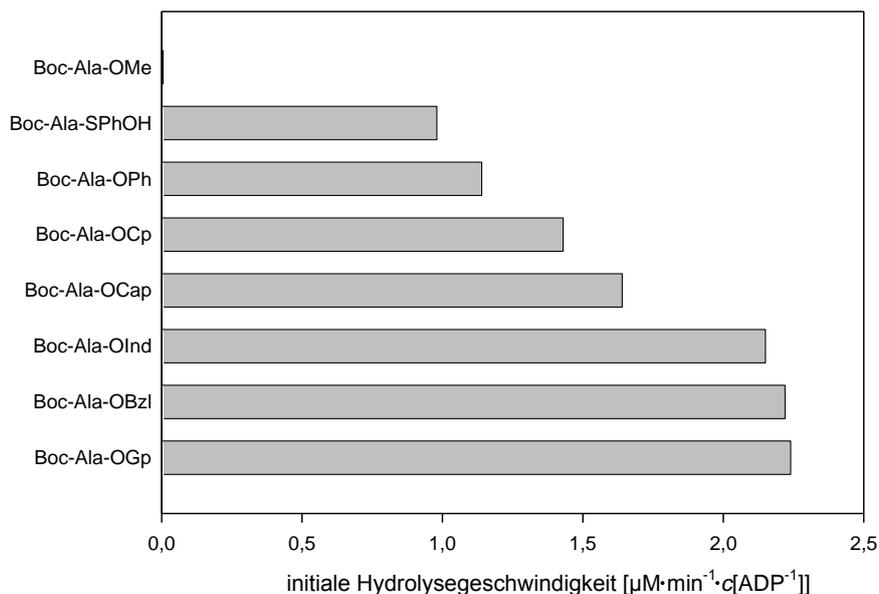


Abb. 78: *Initiale Hydrolysegeschwindigkeiten ausgewählter Boc-Ala-(Thio)ester in $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{c}[\text{ADP}]^{-1}$ (0,2 M Ester, 0,1 M HEPES, 10% (v/v) DMF, $10^{-7} - 10^{-5}$ M ADP). Die Hydrolysegeschwindigkeit des Standardsubstrates Ac-D-Phe-OMe betrug $630 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{c}[\text{ADP}]^{-1}$.*

In Abb. 79 sind die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der verschiedenen Boc-Xaa-OGp Ester vergleichend gegenübergestellt. Wie aus dem Diagramm ersichtlich wird, werden alle Derivate umgesetzt.

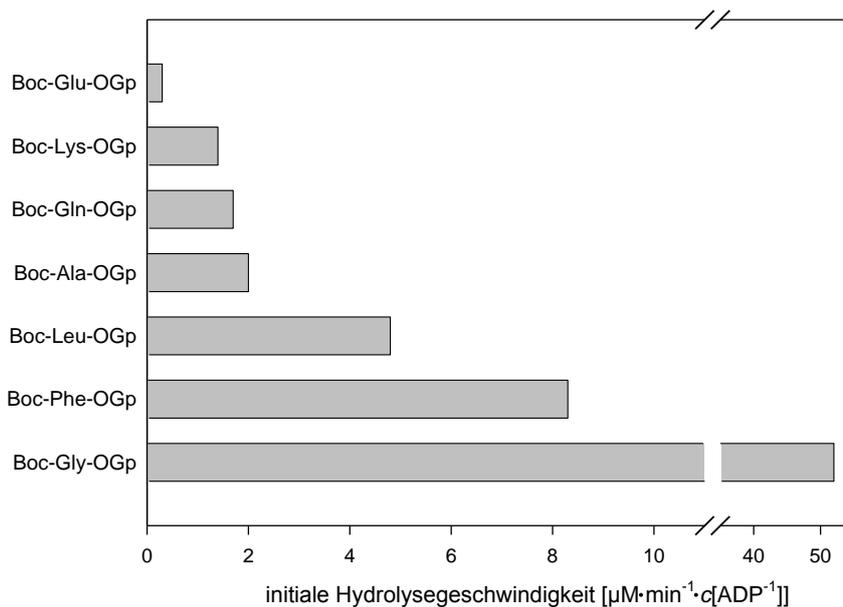


Abb. 79: *Initiale Hydrolysegeschwindigkeiten ausgewählter Boc-Xaa-OGp Ester in $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{c}[\text{ADP}]^{-1}$ (0,2 M Ester, 0,1 M HEPES, 10% (v/v) DMF, $10^{-7} - 10^{-5}$ M ADP). Die Hydrolysegeschwindigkeit des Ac-D-Phe-OMe Standardsubstrates betrug $630 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{c}[\text{ADP}]^{-1}$.*

4. ERGEBNISSE

Die Geschwindigkeitsbereiche erstrecken sich hier über zwei Größenordnungen, wobei die 4-Guanidinophenylester geladenener Aminosäuren am langsamsten ($0,3 - 1,4 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$) und die hydrophober sowie aliphatischer Aminosäuren deutlich schneller ($2,0 - 8,3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$) umgesetzt werden. Boc-Gly-OGp weist mit $52 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ eine signifikant erhöhte Hydrolysegeschwindigkeit auf.

4.2.6. ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden

Die generelle Anwendbarkeit der ADP für enzymatische all-L-Peptidsynthesereaktionen wurde zuerst in der Formierung von L-Aminosäure-haltigen Dipeptidamiden evaluiert. Dafür kamen als Acyldonoren verschiedene Bz-L-Xaa-OGp Ester und als Nukleophile ausgewählte L-Aminosäureamide zum Einsatz, wobei die Aminosäuren aliphatischen, aromatischen sowie geladenen Typs waren (siehe 3.4.6.). Zur sensitiveren Detektion der Reaktionsprodukte mittels HPLC wurde anstelle der N-terminalen Boc-Schutzgruppe (siehe 4.2.5.) der Benzylrest verwendet. Die Ausbeuten an entsprechenden Dipeptidamiden ausgehend von Substratmimetika sowie dem Standardsubstrat sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ausbeuten in % der ADP-katalysierten Ligation von ausgewählten Bz-Xaa-OGp Estern mit ausgesuchten Aminosäureamiden.

Nukleophil	Standard		Substratmimetikum				
	Ac-D-Phe-OMe	Bz-Phe-OGp	Bz-Ala-OGp	Bz-Leu-OGp	Bz-Lys-OGp	Bz-Gly-OGp	Bz-Glu-OGp
H-Pro-NH ₂	0,5	4,5	3,8	5,3	6,1	9,7	10,8
H-Glu-NH ₂	2,5	24,9	15,6	23,6	26,5	35,4	37,4
H-Ser-NH ₂	3,5	26,2	16,4	28,5	31,6	41,1	45,7
H-Ala-NH ₂	12,5	39,7	30,5	37,6	42,4	59,8	63,7
H-Gly-NH ₂	15,7	38,8	34,1	37,9	57,9	62,8	64,6
H-Lys-NH ₂	15,1	33,9	30,6	50,9	61,8	69,1	72,4
H-Val-NH ₂	28,7	35,0	49,7	51,8	65,9	82,2	83,7
H-Arg-NH ₂	29,2	43,0	60,3	65,6	73,1	84,3	87,2
H-Ile-NH ₂	35,4	45,7	69,9	71,4	77,1	88,1	89,8
H-Phe-NH ₂	43,0	55,1	78,7	78,2	80,3	89,6	90,9
H-Leu-NH ₂	47,1	57,6	75,1	83,2	80,9	92,3	91,6
H-Met-NH ₂	51,4	65,4	82,6	83,3	84,7	91,7	93,1

Bedingungen: 2 mM Ester, 20 mM Nukleophil, Konzentration ADP: Bz-Phe-OGp 43,6 μM , Bz-Ala-OGp 43,6 μM , Bz-Leu-OGp 43,6 μM , Bz-Lys-OGp 21,8 μM , Bz-Glu-OGp 21,8 μM , Bz-Gly-OGp 2,2 μM , Ac-D-Phe-OMe 0,27 μM ; 10% DMF, 0,1 M HEPES, pH 8,0. 15 Minuten Reaktionszeit.

4.2.7. ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L Peptide

Zur Überprüfung der Eignung der ADP für die Ligation längerkettiger all-L-Peptide wurden zunächst verschiedene Peptid-4-Guanidinophenylesterderivate mit Peptidakzeptoren umgesetzt (siehe 3.4.7.). Die exemplarisch ausgewählten Ester bestanden dabei aus einer, drei bzw. zehn Aminosäuren und die Acylakzeptoren aus zehn bzw. 16 Aminosäuren. Generell enthielten alle Substratmimetika als C-terminale Aminosäure Glycin und alle Nukleophile als N-terminale Aminosäure Leucin, um eventuell variierende Ausbeuten auf die Kettenlänge zurückführen zu können. Es wurden alle drei Ester mit den beiden Acylakzeptoren kombiniert und mittels ADP zur Reaktion gebracht. Die erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

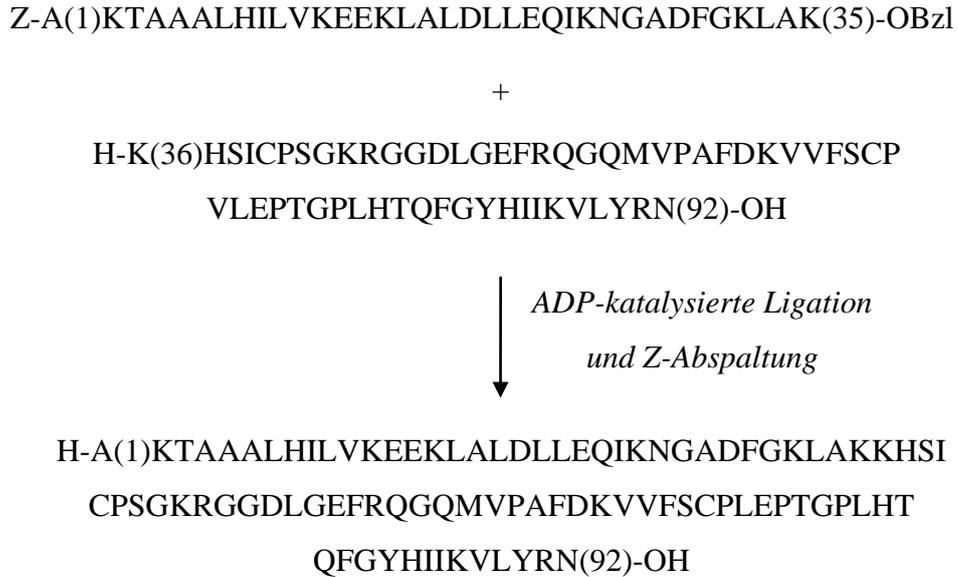
Tabelle 6: Ausbeuten in % der ADP-katalysierten Synthese von längerkettigen all-L-Peptiden.

Ester	Nukleophil	Ausbeute in %
Bz-Gly-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	77,5
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	83,2
Bz-Phe-Gly-Gly-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	45,6
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	49,0
Bz-AYLDAYVKAG-OGp	H-LGSVKASAYK-OH	40,1
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	43,1

Bedingungen: 2 mM Ester, 10 mM Nukleophil, $5,5 \cdot 10^{-6}$ M, $7,1 \cdot 10^{-6}$ M bzw. $8,7 \cdot 10^{-6}$ M ADP, 10% (v/v) DMF, 0,1 M HEPES, pH 8,0. 15 Minuten Reaktionszeit.

4.2.8. ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10

Für die Darstellung von synthetischem *E. coli* Parvulin 10 wurde sich für eine Ein-Schritt-Ligation mit Lys35 – Lys36 als Knüpfungsstelle entschieden. Diese Ligrationsstrategie ermöglicht den Vorteil einer Zugänglichkeit des Substratmimetikums Z-Ala1-Lys35-OBzl via Chemosynthese und zusätzlich wird das von PÖHLMANN als hochreaktiv beschriebene Cys40, welches Ausbeute-reduzierend wirkt, in das Nukleophil H-Lys36-Asn92-OH gelegt [210]. In Schema 3 ist die Semi-Synthesestrategie zur Darstellung von *E. coli* Parvulin 10 unter Einsatz von ADP als Synthesekatalysator dargestellt.



Schema 3: Semi-Synthesestrategie von E. coli Parvulin 10 unter Verwendung der Alkalischen D-spezifischen Peptidase.

Nach erfolgter Synthese der Reaktionspartner Z-Ala1-Lys35-OBzl (siehe 4.2.4) und H-Lys36-Asn92-OH (siehe 4.2.3.) sowie eingehender Charakterisierung des Biokatalysators ADP (siehe 4.2.5., 4.2.6., 4.2.7.) konnten diese in einer entsprechenden Ligation zur Reaktion gebracht werden (siehe 3.4.8.).

Nachdem eine spontane Hydrolysegeschwindigkeit des Benzyl-Esters im Verlauf einer Stunde von weniger als 5% ermittelt und die erfolgreiche Akzeptanz des Esters mittels ADP-katalysierter Hydrolyse bestätigt wurde, erfolgte dessen Ligation mit H-Lys36-Asn92 zum N-terminal Z-geschützten Parvulin 10.

Die Bestimmung der Produktausbeute erfolgte einerseits densitometrisch mittels SDS-PAGE und andererseits mittels HPLC, wobei rekombinantes Parvulin 10 als Standard diente. Aus den Mittelwerten der Ausbeuten beider unabhängigen Methoden ergab sich eine Ligationsausbeute von $61\% \pm 2,5\%$. Der ermittelte Unterschied zwischen beiden Methoden liegt dabei unter 5%. In Abb. 80 ist der Verlauf der Ligation von Z-Ala1-Lys35-OBzl und H-Lys36-Asn92-OH mittels ADP dargestellt. In der Kontrollreaktion ohne ADP in Bahn 3 und 5 konnte keine Bildung einer neuen Bande, der Produktbande, identifiziert werden. Jedoch wurde bereits 30 Minuten nach Start der Ligationsreaktion (Bahn 4) unter Zugabe von ADP die Entstehung einer neuen Bande, die in gleicher Höhe wie das rekombinante Par10 läuft, beobachtet. Auch nach fünf Stunden bleibt diese Bande deutlich erhalten. Die Bande des Nucleophils unterliegt keiner offensichtlichen Veränderung.

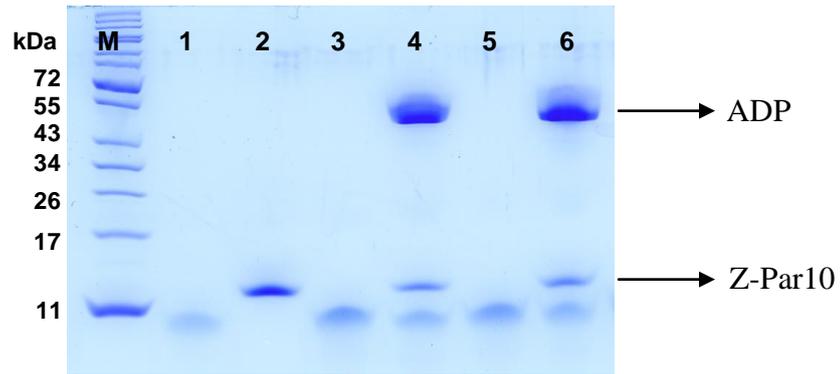


Abb. 80: SDS-Gel der ADP-katalysierten Ligation von Z-Ala1-Lys35-OBzl mit H-Lys36-Asn92-OH zum synthetischen Parvulin 10 (Bahn 1: H-Lys36-Ala92-OH, Bahn 2: rekombinantes Par10, Bahn 3: Ligation ohne ADP nach 30 min, Bahn 4: Ligation mit ADP nach 30 min, Bahn 5: Ligation ohne ADP nach 5 Stunden, Bahn 6: Ligation mit ADP nach 5 Stunden).

4.2.9. Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10

Das durch die ADP-katalysierte Ligation von Z-Ala1-Lys35-OBzl und H-Lys36-Asn92-OH dargestellte *E. coli* Parvulin 10 (siehe 3.2.9.) ist mittels RP-HPLC aus der Reaktionslösung isoliert, gefriergetrocknet, nachfolgend der Entschützung des *N*-Terminus mittels TFA/Thioanisol unterworfen und abermals semi-präparativ gereinigt und lyophilisiert worden. Es wurde eine isolierte Ausbeute von 2 mg (33%) an synthetischem Parvulin 10 erhalten. Abb. 81 zeigt das HPLC-Profil sowie das Massenspektrum der finalen Verbindung mit einer Retentionszeit von 15,4 min. Die theoretische Molekülmasse von 10102 Da und der experimentell erhaltene Wert $m/z = 10104$ ($M+H^+$) sind in guter Übereinstimmung.

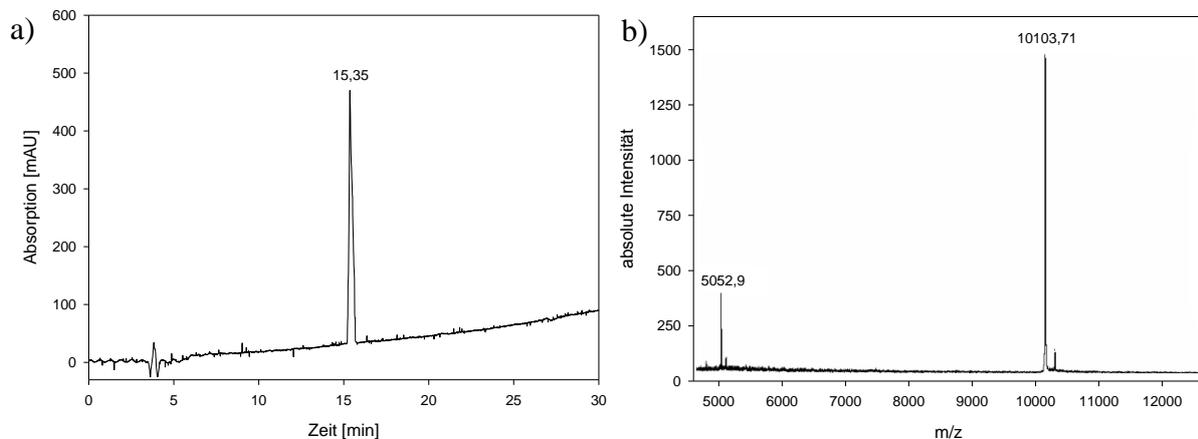


Abb. 81: a) HPLC-Profil von Par10 nach Entschützung des *N*-Terminus sowie semi-präparativer HPLC-Reinigung. b) MALDI-ToF-Massenspektrum der lyophilisierten Substanz. m/z berechnet: 10102; m/z gefunden: 10104 ($M+H^+$). HPLC-Bedingungen: C_{18} -Säule, linearer Gradient von 5-100% ACN (0,1% TFA) in 30 Minuten, Detektion 220 nm.

Anschließend wurde das Produkt einer Rückfaltung unterzogen. Ein individuelles Maß für den Erfolg der Rückfaltung kann der Aktivitätstest (3.4.11.) bzw. die Aufnahme von CD-Spektren (3.4.10.) darstellen.

4.2.10. CD-spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10

Durch die Aufnahme von CD-Spektren (siehe 3.4.10.) sollten vorhandene Sekundärstrukturen von synthetischem Par10 detektiert werden. Rekombinantes Par10 ist zum Vergleich eingesetzt worden. Hitzedenaturierungs- und Rückfaltungsspektren wurden gleichermaßen aufgezeichnet. In Abb. 74 sind die entsprechenden CD-Spektren grafisch dargestellt.

Das CD-Spektrum des synthetischen Parvulins 10 in Abb. 82 a) zeigt ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum, welches sich über den Bereich von 210 bis 220 nm erstreckt. Nach der Hitzedenaturierung bei 90 °C sinkt die Elliptizität und das Maximum verschiebt sich auf 190 nm (Abb. 82 b). Der Bereich zwischen 210 und 220 nm bleibt nahezu unverändert. Nach der Hitzebehandlung liegt das Maximum bei ca. 192 nm und der Bereich des Minimums konzentriert sich enger um den Bereich von 210 nm (Abb. 82 c). Die Elliptizität ist im Vergleich zum Spektrum vor der Hitzedenaturierung in diesem Bereich abgesenkt, wobei Unterschiede zwischen beiden Proteinen im Spektrum nahezu nicht existieren.

Um Änderungen der Sekundärstrukturen während der Hitzedenaturierung sowie die Stabilität des synthetischen Parvulin 10 zu charakterisieren, sind die Änderungen der Elliptizität bei 190 nm aufgezeichnet worden (Abb. 82 d). Bis ca. 50 °C ist nahezu keine Veränderung zu beobachten. Im Bereich von ca. 55 °C bis 70 °C ist ein deutlicher Abfall der Elliptizität festzustellen, der sein Minimum bis 90 °C nicht mehr ändert.

Das zum Vergleich herangezogene rekombinante Parvulin 10 zeigt ähnliche Charakteristika. Etwas größere Unterschiede sind lediglich im CD-Spektrum nach Hitzedenaturierung zu beobachten.

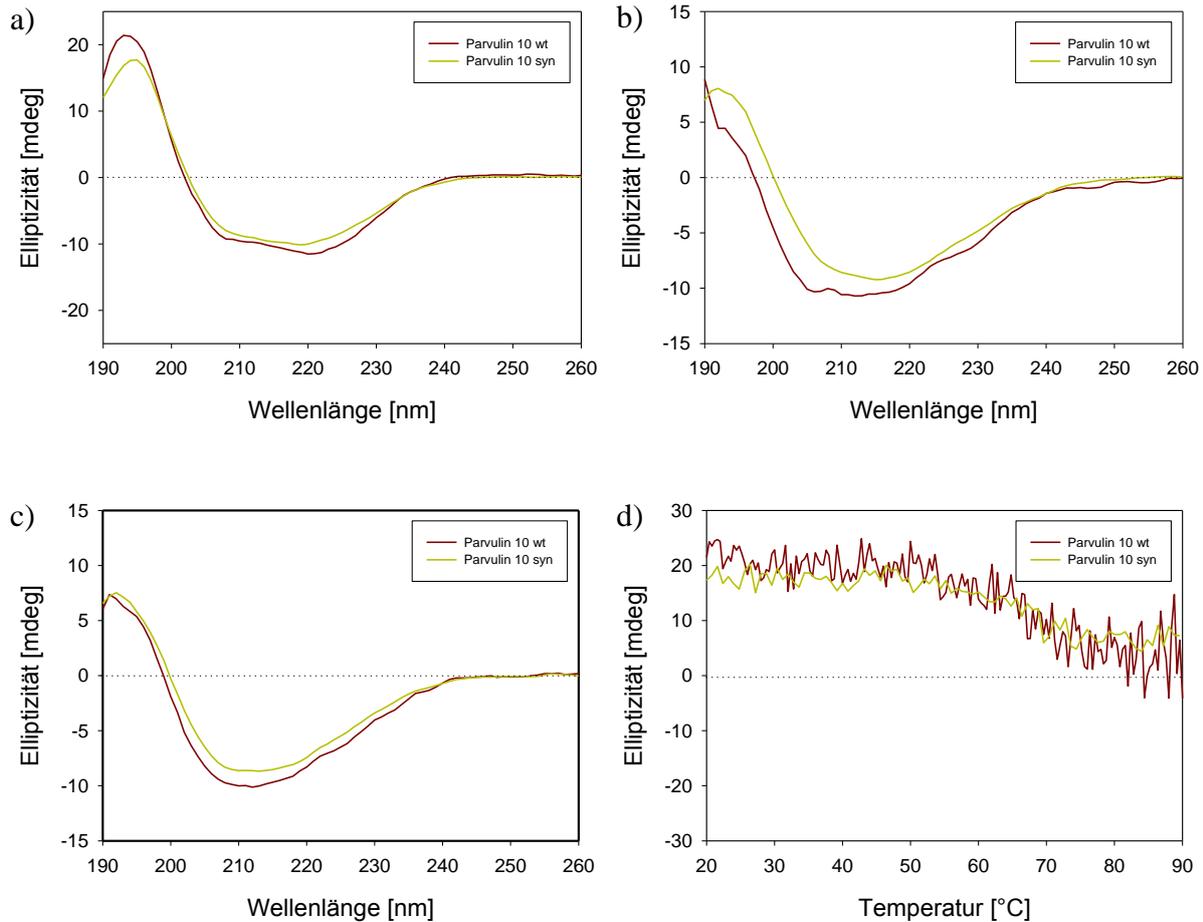


Abb. 82: CD-spektroskopische Charakterisierung von synthetischem Par10 im Vergleich zu rekombinant hergestelltem Par10 bei a) 20 °C; b) 90 °C und c) 20 °C nach Erhitzen auf 90 °C. d) Verlauf der Signaländerung bei 195 nm während der Hitzedenaturierung. Bedingungen: 10 μ M synthetisches bzw. rekombinantes Par10, 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,8.

4.2.11. Bestimmung des enzymkinetischen Parameters k_{cat}/K_M von synthetischem Par10

Mittels Protease-gekoppelten PPIase-Test nach FISCHER *et al.* [177] sollten für das synthetisch dargestellte Par10 die enzymspezifischen Konstanten K_m und v_{max} bei verschiedenen Enzymkonzentrationen spektrophotometrisch bei 390 nm über die Freisetzung von 4-Nitroanilin aus dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA ermittelt werden (siehe 3.4.11.). Durch Auftragen der aus der Regression erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten gegen die Konzentration kann der Wert k_{cat}/K_M mit $0,97 \cdot 10^6 \pm 0,05 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ über den Anstieg der Geraden bestimmt werden. In Abb. 83 sind die experimentell bestimmten Werte grafisch dargestellt. Der Parameter k_{cat}/K_M für rekombinantes Par10 beträgt $1,12 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [185].

4. ERGEBNISSE

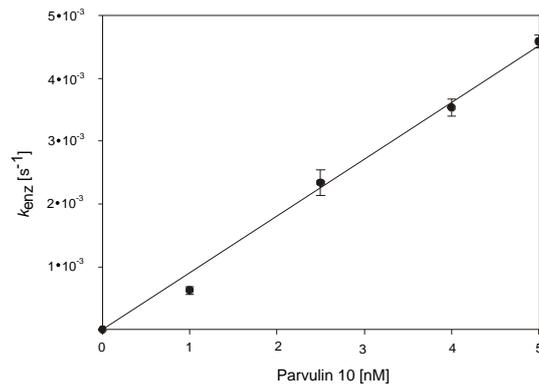


Abb. 83: Plot der Spezifitätskonstanten k_{enz} gegen die Konzentration von synthetischem Par10. 33 μM Chymotrypsin, 25 μM Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA, 1 nM - 5 nM synthetisches Par10, 35 mM HEPES, pH 8,0, 10 °C, Detektion 390 nm.

5. Diskussion

5.1. Synthesen Teil A - „Semi-Synthese des HMGA 1b Proteins“

5.1.1. Synthese von HOGp(Boc)₂

Für die Generierung von Substratmimetika des 4-Guanidinophenylester-Typs, ausgehend von *N*-terminal- und seitenkettengeschützten Peptiden, war die Synthese von HOGp(Boc)₂ notwendig.

Die Synthese des Boc-geschützten 4-Guanidinophenols aus 4-Aminophenol und *N,N'*-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*S*-Methylisothioharnstoff in THF verlief unproblematisch (3.3.1.). Nach dessen Fällung mit Wasser konnten noch Spuren anderer Verbindungen mittels Chromatographie detektiert werden, welche nicht näher charakterisiert worden sind. Das Säulenchromatographie-System bestehend aus Kieselgel und 10% MeOH in DCM als Eluent erwies sich als gut geeignet für die Reinigung der Verbindung, deren Reinheit laut HPLC-Profil (Abb. 14) größer 98% ist. Die weitere Charakterisierung erfolgte mittels NMR, wobei alle Signale eindeutig zugeordnet werden konnten (siehe 4.1.1.).

Die isolierte Ausbeute von 56% (7,9 g) HOGp(Boc)₂ ist für eine Einschritt-Reaktion akzeptabel, wobei vermutet wird, dass der größte Substanzverlust bei der Reinigung mittels Flash-Chromatographie entsteht. In der Literatur wurde im Vergleich eine Ausbeute von 92% erreicht [203]. Allerdings ist dort ein Eluent aus Benzol und Essigsäure verwendet worden, auf dessen Einsatz aufgrund der erhöhten Toxizität von Benzol gegenüber Dichlormethan verzichtet wurde.

5.1.2. Synthese von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH

Die Synthese des Bausteins Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH, welcher für die Synthese von H-D-Arg48-D-Lys81-OH benötigt wurde, erfolgte ausgehend vom Aminosäurederivat Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (3.3.2.). Nach TFA-Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und Fällung mit Ether wurde das Zwischenprodukt Fmoc-D-Lys-OH · TFA mit einer Ausbeute von 98% erhalten. Der minimale Verlust in der Ausbeute ist vermutlich auf die Fällung zurückzuführen. Die mittels HPLC bestimmte Reinheit liegt über 98%. Auch das Massenspektrum (Abb. 15) zeigt lediglich ein eindeutiges Signal bei $m/z = 396,1$ ($M+H$)⁺, was ebenfalls für die hohe Reinheit von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH spricht (4.1.2.).

Im anschließenden Syntheseschritt wurde das erhaltene Fmoc-D-Lys-OH · TFA mit Biotin-OSu und DIPEA in DMF zur Reaktion gebracht (3.3.2.). Die Reinigung des finalen Produkts Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH erfolgte durch Fällung mit Wasser, wodurch dieses mit einer

Ausbeute von 96% und einer Reinheit größer 98% laut HPLC erhalten wurde (Abb. 16). Verluste traten hierbei vermutlich bei der Fällung mit Wasser sowie dem anschließenden Waschen auf. Eine Optimierung der Reaktion selbst wurde aufgrund der hohen Syntheseeffizienz nicht als sinnvoll erachtet.

5.1.3. Festphasensynthese von HMGA 1b H-D-Arg48-D-Lys81-OH

Für die Synthese des Sequenzabschnittes H-D-Arg48-D-Lys81-OH wurden verschiedene Synthesestrategien verfolgt. Die erste Methode (3.3.3.1.) beinhaltete den linearen, schrittweisen Aufbau der Peptidkette ausgehend von Fmoc-D-Lys(Biotin)-D-Lys-2-CITrt-Harz, welches durch Beladung des Trägers mit Fmoc-D-Lys(Boc)-OH sowie manuelle Kupplung von Fmoc-D-Lys(Biotin)-OH erhalten wurde. Nach der automatisierten Knüpfung von 11 Aminosäuren wurde eine Kontrollabspaltung durchgeführt, um den Verlauf der Synthese qualitativ zu begutachten. Die Charakterisierung des Zwischenprodukts Fmoc-D-Arg69-D-Lys81-OH mittels HPLC und Massenspektrometrie ergab (Abb. 17), dass die Synthese bis zur Aminosäure D-Arg69 ohne offensichtliche Probleme verlief. Aufgrund dieses positiven Ergebnisses wurde die Festphasensynthese durch Kupplung der nachfolgenden 12 Aminosäuren fortgesetzt (4.1.4.1.). Wie jedoch anhand des Massenspektrums aus Abb. 18 ersichtlich wird, gab es massive Probleme bei der Kupplung der nachfolgenden Aminosäuren D-Ala57 bis Gly68, auch wenn nur ein prominenter Peak im HPLC-Chromatogramm (Abb. 18) zu erkennen ist. Das gewünschte Intermediat Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-OH konnte massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Aufgrund dessen wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen. Ein zweiter linearer Syntheseversuch ergab dasselbe Ergebnis, womit ein Artefakt während der Festphasensynthese ausgeschlossen werden kann. Es wird vermutet, dass die Probleme bei der Kupplung der Aminosäuren D-Thr66, D-Pro67 und Gly68 liegen. Dies stützt sich auf die Tatsache, dass ein Fragment des zweiten Syntheseabschnittes (D-Ala57-Gly68) separat zugänglich ist, wie Abb. 20 zeigt.

In einer zweiten Strategie wurde eine konvergente Synthese verfolgt (3.3.3.2.). Dazu wurde der Abschnitt D-Arg48-D-Lys81 in drei Fragmente unterteilt, die es entsprechend darzustellen und chemisch zu ligieren galt. Das Fragment D-Arg69-D-Lys81, welches bereits in der linearen Synthese erfolgreich dargestellt werden konnte (Abb. 17), blieb am Träger gebunden. Die automatisierten Synthesen der Fragmente Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH sowie Fmoc-D-Arg48-Gly56-OH verliefen mit Ausbeuten von 70% bzw. 82% erfolgreich und bedurften keiner weiteren Optimierung. Die Reinheit der Produkte wurde mittels HPLC kontrolliert und

die Identität der Produkte konnte mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 20 und 21).

Im Anschluss an die erfolgreiche Darstellung der drei Peptide erfolgte die Verknüpfung der Fragmente Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH mit dem am Träger verbliebenen Fragment H-D-Arg69-D-Lys81-2-CITrt-Harz (3.3.3.2.). Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass der Peak bei einer Retentionszeit von 10,38 Minuten im HPLC-Profil (Abb. 22) dem Produkt entspricht. Der Peak bei $rt = 7,22$ min ist nicht umgesetztem H-D-Arg69-D-Lys81-OH zuzuordnen. Eine zusätzliche Kupplung mit Fmoc-D-Ala57-Gly68-OH oder eine Verlängerung der Reaktionszeit hätte eventuell einen quantitativen Umsatz des Harz-gebundenen Peptids und somit eine Erhöhung der Ausbeute bewirken können.

Nach erfolgter Acetylierung *N*-terminal freier Peptide und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe von Fmoc-D-Ala57-D-Lys81-2-CITrt-Harz wurde das Fragment Fmoc-D-Arg48-Gly56-OH gekuppelt (3.3.3.2.). In analytischen HPLC-Läufen konnte in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen das gewünschte Produkt identifiziert werden (Abb. 23). Auch hier ist ein nicht quantitativer Umsatz des Träger-gebundenen Fragments H-D-Ala57-D-Lys81-OH zu beobachten, welcher durch den Einsatz eines größeren Überschusses an Aminokomponente und/oder der Verlängerung der Reaktionszeit hätte möglicherweise erreicht werden können.

Nach Entschützung des *N*-Terminus durch eine Piperidin/DMF-Behandlung, acidolytischer Abspaltung des Peptids vom Träger sowie gleichzeitigem Freisetzen aller Seitenkettenfunktionen und einer abschließenden präparativen HPLC-Reinigung konnte das gewünschte Produkt H-D-Arg48-D-Lys81-OH mit einer Ausbeute von 4,1% (12 mg) erhalten werden. Auch wenn die Ausbeute deutlich unter den Erwartungen lag, führte diese Synthesestrategie zum Erfolg.

In einem dritten Syntheseansatz (3.3.3.3.) konnte durch die Kombination von manuellen Kupplungen unter Einsatz von HATU als effizientem Kupplungsreagenz die vermeintlichen Problemsequenzen, Gly68 bis D-Thr66 sowie Gly56 bis D-Lys55, erfolgreich überbrückt werden. Nach der Durchführung von automatisierten und manuellen Kupplungs- und Deblockierungsschritten wurde nach einer TFA-Behandlung und zwei HPLC-gestützten Reinigungen das korrekte Produkt H-D-Arg48-D-Lys81-OH erhalten (siehe Abb. 26). Die isolierte Ausbeute betrug 17% (125 mg) - bezogen auf die eingesetzte Harzmenge - und liegt damit deutlich über der Ausbeute der konvergenten Synthese bezogen auf die Menge an eingesetzten Edukten.

Ursachen für die schlechten Kupplungsausbeuten und/oder unvollständigen Fmoc-Abspaltungen bei den genannten Aminosäuren könnten strukturelle Besonderheiten sein. So stellt die Aminosäuresequenz, die der Problemstelle vorausgeht (D-Arg(Pbf)69-D-Lys(Boc)70-D-Arg(Pbf)71), eine Akkumulation von drei sterisch anspruchsvollen Aminosäuren dar.

Ein weiterer Unterschied zwischen manueller und automatisierter Synthese besteht in den verwendeten Konzentrationen. Im Synthesizer werden für jeden Kupplungsschritt gleiche Konzentrationen an Reagenzien verwendet, die so dimensioniert sind, dass jedes Aminosäurederivat sowie das Kupplungsreagenz garantiert in Lösung sind. Kuppelt man manuell, so kann man Konzentrationen verwenden, die nahe an der Löslichkeitsgrenze liegen und somit die Kinetik positiv beeinflussen.

Betrachtet man die gesamte Teilsequenz, so fällt auf, dass sich unter den 34 Aminosäuren 23 trifunktionelle Aminosäuren befinden. Diese sind sicherlich für eine gute Löslichkeit des ungeschützten Fragments im wässrigen System von Vorteil. Dem entgegen stehen jedoch die während der Synthese benötigten voluminösen Seitenketten-Schutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren, die sterisch sehr anspruchsvoll sind und ferner aufgrund ihres hydrophoben Charakters dazu neigen, Aggregate auszubilden. Diese Aggregate verhindern einerseits eine optimale Reaktion der aktivierten Aminosäure mit der terminalen Aminofunktion des Harz-gebundenen Peptids sowie andererseits den Angriff des Piperidins während der Fmoc-Abspaltung.

5.1.4. Festphasensynthese von HMGA 1b Z-D-Arg25-Gly47-OGp

Für die Synthese des Fragments Z-D-Arg25-Gly47-OGp, welches für die Clostripain-vermittelte Ligation mit H-D-Arg48-D-Lys81-OH benötigt wird, wurde initial die schrittweise automatisierte Festphasensynthese verwendet (3.3.4.1.).

In einem ersten Syntheseabschnitt erfolgte das Kuppeln der Aminosäuren D-Ser37 bis Gly47. Mit der nachfolgend durchgeführten Kontrollabspaltung sollte der Verlauf der Synthese qualitativ untersucht werden. Wie aus der Abb. 31 ersichtlich ist, konnte kein homogenes Produkt mit der korrekten Masse des gewünschten Peptidintermediats gefunden werden. Hauptanteil stellt ein Peptid mit einer Pro-Deletion dar, wobei nicht nachvollzogen wurde, welches der drei im Sequenzabschnitt vorkommenden Proline fehlte. Die Wiederholung der Synthese, um Artefakte im ersten Versuch auszuschließen, verlief mit demselben Resultat.

Als Ursache für das Scheitern der linearen Synthese in einem Schritt sind möglicherweise strukturelle Besonderheiten, die sich aus der Sequenz des Peptids ergeben, in Betracht zu ziehen. Innerhalb dieses 24 Aminosäure-haltigen Abschnitts befinden sich 13 trifunktionelle

Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen. Besonders die Akkumulation dieser Derivate im Anfangsbereich könnte einen negativen Einfluss, hervorgerufen durch eine mögliche Aggregatbildung, auf den Verlauf der entsprechenden Kupplungs- und Deblockierungsschritte haben.

Die zweite Synthesestrategie benutzte einen konvergenten Ansatz, um das für die Veresterung mit HOGp(Boc)₂ benötigte vollgeschützte Fragment Z-D-Arg(Pbf)₂₅-Gly₄₇-OH zu generieren (3.3.4.2.). Dazu wurden die vier Fragmente D-Arg₂₅-D-Pro₂₈, D-Arg₂₉-D-Pro₃₆, D-Ser₃₇-D-Pro₄₂ sowie D-Lys₄₃-Gly₄₇ separat dargestellt, letzteres am 2-CITrt-Harz belassen, und entsprechend des Syntheschemas in Abb. 32 chemisch miteinander verknüpft. Bei der Auswahl der Sequenz der zu ligierenden Peptide wurde darauf geachtet, dass die bei der Kupplung der Fragmente zu aktivierende Aminosäure entweder Glycin oder Prolin ist, da diese keiner Epimerisierung unterliegen.

Im Anschluss an die Synthese des am Harz verbleibenden Fragments Fmoc-D-Lys₄₃-Gly₄₇-OH erfolgte eine Kontrollabspaltung, die Charakterisierung des Produkts mittels HPLC (Abb. 33 a) und die Überprüfung der Identität mittels Massenspektrometrie (Abb. 33 b), wobei aus beiden Spektren hohe Reinheiten abgeleitet werden konnten. Für die nachfolgende chemische Ligation wurde der *N*-Terminus mit einer Piperidin/DMF-Behandlung freigesetzt. Das zur chemischen Kupplung benötigte seitenkettengeschützte Fragment Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-D-Pro₄₂-OH wurde nach der Festphasensynthese einer Kontrollabspaltung unterworfen und analysiert. Aus dem in Abb. 34 dargestellten HPLC-Profil und Massenspektrum der Verbindung wird eine hohe Reinheit ersichtlich. Die „HFIP-Abspaltung“ ergab eine Ausbeute an Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-D-Pro₄₂-OH von 50% (63 mg). Das Produkt der anschließenden chemischen Ligation dieses Peptidfragments mit H-D-Lys(Boc)₄₃-Gly₄₇-2-CITrt-Harz ist mittels HPLC (Abb. 35 a) und massenspektrometrischer Untersuchungen (Abb. 35 b) identifiziert worden. Der Peak bei einer Retentionszeit von 8,2 Minuten ist nicht umgesetztem H-D-Lys₄₃-Gly₄₇-OH zuzuschreiben und der Peak bei *rt* = 17,58 min entspricht Schutzgruppen, die nach der Kontrollabspaltung nicht vollständig mittels Ether entfernt wurden. Durch einen größeren Überschuss an Carboxy-Komponente und Verlängerung der Kupplungszeit hätte womöglich ein quantitativer Verlauf der Ligation erreicht werden können. Nach einer Acetylierung der nicht reagierten Aminofunktionen wurde für die Ligation mit Z-D-Arg(Pbf)₂₅-D-Pro₃₆-OH der *N*-Terminus von Fmoc-D-Ser(*t*Bu)₃₇-Gly₄₇-2-CITrt-Harz durch eine Fmoc-Abspaltung freigesetzt.

Für die Darstellung des benötigten Fragments Z-D-Arg(Pbf)₂₅-D-Pro₃₆-OH war die Synthese der Teilfragmente H-D-Arg(Pbf)₂₉-D-Pro₃₆-2-CITrt-Harz sowie Fmoc-D-Arg(Pbf)₂₅-D-

Pro28-OH notwendig. Im Anschluss an die erste Festphasensynthese wurde zunächst mittels Kontrollabspaltung die Qualität des Intermediats Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH überprüft. Das in Abb. 36 abgebildete HPLC-Profil zeigt die hohe Reinheit des Produkts, während das Massenspektrum (Abb. 36 b) die Identität des gewünschten Fragments nachweist. Der Peak bei einer Retentionszeit von 17,35 min entspricht Schutzgruppenfragmenten, die nicht vollständig durch das Waschen mit Diethylether entfernt worden sind, jedoch während der anschließenden „HFIP-Abspaltung“, die mit einer Ausbeute von 59% (89 mg) verlief, nicht generiert werden. Das nach der zweiten Festphasensynthese am Träger verbleibende Fragment Fmoc-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-OH wurde ebenfalls einer Kontrollabspaltung unterworfen. Auch in diesem Fall konnte das Produkt mit Hilfe der Massenspektrometrie (Abb. 37 b) identifiziert werden. Die in der HPLC (Abb. 37 a) zusätzlich auftretenden Peaks nach dem eigentlichen Produktpeak bei $rt = 10,85$ min entsprechen abermals Schutzgruppenfragmenten, die nicht durch eine Etherfällung entfernt wurden. In Vorbereitung für die anschließende chemische Ligation wurde mit einer Fmoc-Abspaltung der *N*-Terminus von Fmoc-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-2-CITrt-Harz freigesetzt.

Im Anschluss an die erfolgreiche chemische Kupplung des letztgenannten Fragments mit Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH erfolgte die Acetylierung der nicht reagierten Aminofunktionen von H-D-Arg(Pbf)29-D-Pro36-2-CITrt-Harz und die Umschätzung des Ligationsprodukts in das entsprechende *N*^α-*Z*-geschützte Derivat *Z*-D-Arg(Pbf)25-D-Pro36-2-CITrt-Harz. Durch eine Kontrollabspaltung mit anschließender Analytik mittels HPLC (Abb. 38 a) und Massenspektrometrie (Abb. 38 b) konnte das gewünschte Produkt charakterisiert und identifiziert werden. Wie aus dem HPLC-Profil abzuleiten ist, wurde, wie bereits in der vorangegangenen Ligation, unter den gewählten Bedingungen kein vollständiger Umsatz der Aminofunktionen erreicht. Dies wäre eventuell durch eine Verlängerung der Reaktionszeit oder Erhöhung der Äquivalente an Fmoc-D-Arg(Pbf)25-D-Pro28-OH und Kupplungsreagenz möglich gewesen.

Im Anschluss an die „HFIP-Abspaltung“ mit einer Ausbeute von 60% (85 mg) an *Z*-D-Arg(Pbf)25-D-Pro36-OH erfolgte die finale chemische Ligation mit H-D-Ser(*t*Bu)37-Gly47-2-CITrt, deren Erfolg mit einer Kontrollabspaltung qualitativ überprüft worden ist. Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnte dem Peak bei $rt = 7,83$ min das gewünschte Produkt zugeordnet werden (Abb. 39). Der unvollständige Substratumsatz ist auch hier wiederum ein Grund für das Auftreten weiterer Peaks im HPLC-Profil, die entsprechend verkürzten Fragmenten zuzuordnen sind und durch einen Einsatz der Carboxy-Komponente in Verbindung mit Kupplungsreagenz im größerem Überschuss hätten möglicherweise

vermieden werden können. Nach der Acetylierung der nicht reagierten Aminofunktionen erfolgte die Generierung der vollgeschützten Peptidsäure Z-D-Arg(Pbf)25-Gly47-OH mittels „HFIP-Abspaltung“ mit einer Ausbeute von 45% (108 mg). Die Veresterung mit HOGp(Boc)₂, eine TFA-Behandlung zur Abspaltung aller Seitenketten-Schutzgruppen sowie eine säulenchromatographische Reinigung ergaben eine isolierte Ausbeute von 8% (6 mg) an Z-D-Arg25-Gly47-OGp, dessen Identität mittels Massenspektrometrie bestätigt wurde (Abb. 40 b).

Aufgrund der geringen Syntheseeffizienz der zweiten, konvergenten Synthesemethode erfolgte in der dritten Strategie eine Kombination aus automatisierter und manueller Peptidsynthese (3.3.4.3.). Zur Überbrückung der vermuteten Problemsequenzen D-Arg27-D-Pro28, D-Glu35-D-Pro36 und D-Thr41-D-Pro42, welche aus den Ergebnissen der vorangegangenen Synthesen abgeleitet wurden, ist HATU als effizientes Kupplungsreagenz eingesetzt worden. Nach der Durchführung der entsprechenden manuellen und automatisierten Kupplungs- und Deblockierungsschritte gemäß der Synthesestrategie aus Abb. 41 erfolgte eine Kontrollabspaltung. Dabei konnte durch den Einsatz von HPLC-Analytik und Massenspektrometrie das gewünschte Produkt Z-D-Arg25-Gly47-OH bei einer Retentionszeit von 8,03 min identifiziert werden (Abb. 42). Das nach der Blockierung von nicht umgesetzten Aminofunktionen und „HFIP-Abspaltung“ generierte vollgeschützte Peptid konnte mit einer Ausbeute von 47% (280 mg) erhalten werden. Die anschließende Veresterung mit HOGp(Boc)₂, acidolytische Freisetzung der Seitenketten- und Esterfunktionen und säulenchromatographische Reinigung ergab das gewünschte Produkt Z-D-Arg25-Gly-47-OGp mit einer isolierten Ausbeute von 39% (77,5 mg). Die hohe Reinheit des Produkts sowie dessen Identität gehen aus dem in Abb. 43 dargestellten HPLC-Profil respektive Massenspektrum hervor.

5.1.5. Festphasensynthese von HMGA 1b Ac-D-Ser1-Gly24-OGp

Entsprechend der Synthesestrategie für das all-D-HMGA 1b Protein war die Bereitstellung des Acyldonors Ac-D-Ser1-Gly24-OGp für die finale Clostripain-vermittelte Ligation mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH notwendig (Schema 2).

Nach Beladung von 2-ClTrt-Harz mit Fmoc-Gly-OH und manueller Kupplung von Fmoc-D-Arg(Pbf)23-OH wurde die Synthese im Automaten bis D-Asp18 fortgesetzt. Die Charakterisierung des Zwischenprodukts Fmoc-D-Asp18-Gly24-OH mittels HPLC-Chromatographie und Massenspektrometrie (Abb. 45) ergab, dass die Synthese prinzipiell erfolgreich verlief. Wenn auch die Qualität des 7mers als nicht optimal zu bezeichnen ist,

wurde die Synthese bis D-Leu11 im Automaten fortgeführt. Eine weitere Kontrollabspaltung zur Überprüfung der Identität des Zwischenprodukts Fmoc-D-Leu11-Gly24-OH ergab, dass das gewünschte Produkt gemäß Massenspektrometrie (Abb. 46 b) im Peptidgemisch nicht enthalten war. Die gefundenen Massen deuten auf Probleme während der sequentiell stattfindenden Kupplungs- und Fmoc-Abspaltungsschritte bei der Synthese des Abschnittes D-Leu11 bis D-Asp18 hin. Innerhalb dieses Oktapeptids sind sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren trifunktionell und tragen dementsprechend sterisch anspruchsvolle Seitenketten-Schutzgruppen, die zu Aggregationen neigen können. Aufgrund dieses Ergebnisses ist die Darstellung des Fragments basierend auf dieser Synthesestrategie abgebrochen worden.

Der zweite Syntheseansatz nutze die Methode der konvergenten Fragmentkondensation (3.3.5.2.), um das für die Veresterung erforderliche Zwischenprodukt Ac-D-Ser(*t*Bu)1-Gly24-OH zu generieren. Dafür war die Darstellung der vollgeschützten Fragmente Ac-D-Ser(*t*Bu)1-D-Pro10-OH, Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH sowie H-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-2-CITrt-Harz notwendig, welche es entsprechend der Synthesestrategie in Abb. 47 chemisch zu ligieren galt.

Die Synthese des am Harz verbleibenden Fragments Fmoc-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24 verlief ohne Probleme, wie aus dem HPLC-Profil und Massenspektrum in Abb. 48 hervorgeht, und bedurfte keiner weiteren Optimierung. Für die chemische Ligation zur Darstellung des Zwischenprodukts Fmoc-D-Leu11-Gly24-2-CITrt-Harz war die Synthese der vollgeschützten Peptidsäure Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH notwendig, die nach erfolgreicher Synthese mit einer Ausbeute von 68% (153 mg) nach „HFIP-Abspaltung“ isoliert werden konnte. Die Reinheit des Produkts wurde mittels HPLC kontrolliert und dessen Identität durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen (Abb. 49). Die Kontrolle des Kupplungsverlaufes von Fmoc-D-Leu11-Gly19-OH und H-D-Thr(*t*Bu)20-Gly24-2-CITrt-Harz erfolgte mittels HPLC und Massenspektrometrie (Abb. 50), wobei das gewünschte Produkt bei einer Retentionszeit bei 12,12 min identifiziert werden konnte. Peaks vor diesem Zeitpunkt deuten auf nicht umgesetzte Reaktanten hin und Peaks danach auf nicht entfernte Schutzgruppenfragmente. Abschließend wurde eine Blockierung der nicht abreagierten Aminofunktionen durchgeführt und der *N*-Terminus mittels Fmoc-Abspaltung für die abschließende chemische Ligation freigesetzt. Im Vergleich zu den vorangegangenen konvergenten Synthesen war das Ausmaß nicht umgesetzter Ausgangsstoffe geringer und hätte durch den Einsatz des zu kuppelnden Fragmentes im Überschuss oder verlängerten Kupplungszeiten minimiert werden können.

Das für die finale Ligation benötigte geschützte Fragment Fmoc-D-Ser(*t*Bu)1-D-Pro10-OH konnte ebenfalls mit einer guten isolierten Ausbeute von 58% (143 mg) nach Festphasen-

synthese und „HFIP-Abspaltung“ erhalten werden. Die Reinheit und Identität des Produkts sind mittels HPLC-Chromatographie bzw. Massenspektrometrie kontrolliert und nachgewiesen worden (Abb. 51).

Nach der chemischen Ligation von Fmoc-D-Ser(*t*Bu)1-D-Pro10-OH mit H-D-Leu11-Gly24-2-ClTrt-Harz konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen dem Peak mit einer Retentionszeit von 10,04 min die Masse des gewünschten Produkts zugeordnet werden (Abb. 52). Nach Fmoc-Abspaltung, Acetylierung des *N*-Terminus und einer „HFIP-Abspaltung“ wurde das für die Veresterung benötigte Fragment mit einer isolierten Ausbeute von 54% (120 mg) erhalten. Die anschließende Umsetzung mit HOGp(Boc)₂, eine TFA-Behandlung und säulenchromatographische Aufreinigung ergaben das korrekte Produkt Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit einer Ausbeute von 8,5% (14 mg), dessen Identität mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wurde (Abb. 53).

In einem dritten Ansatz sollte die Syntheseeffizienz durch die Kombination von manuellen Kupplungen mit HATU als Kupplungsreagenz an den vermeintlichen Problemstellen D-Gln9-D-Pro10 sowie D-Asp18-Gly19 und automatisierter Festphasensynthese erhöht werden (3.3.5.3.). Nach Durchführung aller erforderlichen Syntheseschritte, welche sich aus dem Syntheschema in Abb. 54 ergeben, konnte das gewünschte Produkt nach *N*-terminaler Acetylierung und „HFIP-Abspaltung“ mit einer Ausbeute von 76% (420 mg) isoliert werden. Die hohe Reinheit wurde mittels HPLC-Chromatographie bestätigt und die Identität mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen bewiesen (Abb. 55). Nach der abschließenden Veresterung, Entschützung aller trifunktionellen Aminosäuren und der OGp-Funktion sowie säulenchromatographischer Reinigung ist Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit einer isolierten Ausbeute von 34% (102 mg) erhalten worden (Abb. 56).

Wie die Ergebnisse belegen, war es unter Einsatz dieser modifizierten, linearen Synthesestrategie möglich, die Effizienz gegenüber der konvergenten Synthesemethode signifikant zu steigern. Damit konnte anschaulich demonstriert werden, dass im Fall dieser Synthese die vermuteten Stellen geringerer Kupplungsausbeute durch den Einsatz eines effizienteren Kupplungsreagenz erfolgreich überbrückt worden sind. Möglicherweise hätte der Einsatz von HATU anstelle von HCTU im Synthesizer denselben Effekt erzielt, was allerdings ökonomisch nicht vertretbar gewesen wäre, da HATU im Vergleich zu HCTU um ca. Faktor 50 teurer ist.

5.1.6. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH

Nachdem sowohl die Bereitstellung des Esterfragments Z-D-Arg25-Gly47-OGp als auch die des Nucleophils H-D-Arg48-D-Lys81-OH erfolgreich verliefen, wurden initiale Vorversuche zur Clostripain-katalysierten Ligation beider Fragmente durchgeführt.

Um die Stabilität des Acyldonors Z-D-Arg25-Gly47-OGp unter Ligationsbedingungen zu prüfen, wurde der Anteil an spontaner Hydrolyse des Esters untersucht (4.1.7.1.). Aus Abb. 58 wird ersichtlich, dass bereits nach ca. 50 Minuten die Hälfte des Esters spontan basenkatalysiert zur korrespondierenden Säure umgesetzt wird. Dieses Ergebnis korreliert mit der für Bz-Gly-OGp gefundenen Stabilität im basischen Milieu.

Die generelle Akzeptanz des aus D-Aminosäuren bestehenden 23 Aminosäure-haltigen Esters durch Clostripain wurde in Hydrolysestudien nachgewiesen (4.1.7.2.). Dementsprechend steigt die Umsatzgeschwindigkeit des Substrats mit zunehmender Enzymkonzentration (Abb. 59), was für eine produktive Einbindung des Substratmimetikums in das aktive Zentrum von Clostripain und dessen Umsatz spricht.

Durch die simultane Inkubation von Ester und Nucleophil ohne Zusatz des Biokatalysators sollte das Ausmaß an spontaner Aminolyse ermittelt werden (4.1.7.3.). Der Reaktionsverlauf in Abb. 60 zeigt eindeutig, dass es zu keiner spontanen, d.h. nicht-enzymatischen, Bildung des Produkts Z-D-Arg25-D-Lys81-OH kommt und lediglich der Ester, wie bereits genannt, spontan hydrolysiert.

Die Optimierung der Clostripain-katalysierten Ligation erfolgte nach Durchführung der Kontrollexperimente hinsichtlich des Verhältnisses von Ester zu Nucleophil (4.1.7.5.) im analytischen Maßstab. Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, beträgt bei einem äquimolaren Verhältnis von Z-D-Arg25-Gly47-OGp zu H-D-Arg48-D-Lys81-OH die Ausbeute 46%. Bereits bei einem dreifachen Überschuss von Nucleophil werden 82% Produkt gebildet, dessen Ausbeute trotz höherer Nucleophilkonzentrationen nicht gesteigert werden kann. Eine potentielle Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der Ligationseffizienz bestünde darin, den Anteil von Wasser zu reduzieren, um damit die spontane oder auch enzymatische Hydrolyse des Substratmimetikums zu minimieren. Versuche bei niedrigeren pH-Werten bzw. höheren Enzymkonzentrationen könnten Aufschluss darüber geben. Generell wäre mit dieser Zielstellung der Einsatz von Ionischen Flüssigkeiten oder Reaktionen im gefrorenen wässrigen System denkbar. Beides erfordert jedoch Studien zu deren Anwendbarkeit für Clostripain-katalysierte Ligationen.

Die genaue Analyse des Zeitverlaufs der enzymatischen Ligation unter optimierten Bedingungen (4.1.7.5.) in Abb. 61 lässt erkennen, dass die Produktbildung bereits nach 30 Minuten abgeschlossen ist. Innerhalb dieses Zeitraums findet die ebenfalls unter den gewählten Bedingungen nicht zu unterbindende spontane Hydrolyse der Esterkomponente statt. Das entstandene Produkt unterliegt ferner über 24 Stunden keiner proteolytischen Spaltung, wie es bei einer Spezifität des Clostripains für L-konfiguriertes Arginin zu erwarten ist.

Im abschließenden semi-präparativen Ligationsansatz sollte genügend Material für die geplante Ligation mit Ac-D-Ser1-Gly24-OGp zum finalen Produkt generiert werden (4.1.7.5.). Nach Ablauf der Reaktion erfolgte die säulenchromatographische Isolierung des Produkts, wobei 52% (15 mg) des gewünschten Produkts erhalten worden sind. Die Identifizierung und Charakterisierung der gereinigten Verbindung Z-D-Arg25-D-Lys81-OH erfolgte mittels HPLC und Massenspektrometrie (Abb. 62). Die Verluste an Produkt entstehen bei der Reinigung des Ligationsprodukts mittels HPLC. Als alternative Reinigungsmethode könnte eine Gelfiltration eingesetzt werden, wobei diese meist einen Entsalzungs- bzw. Dialyseschritt nach sich zieht.

5.1.7. Abspaltung der Z-Schutzgruppe von Z-D-Arg25-D-Lys81-OH

Vor dem weiteren Einsatz des Ligationsprodukts Z-D-Arg25-D-Lys81-OH als Acylakzeptor in der finalen Ligation mit Ac-D-Ser1-Gly24-OGp als Acyldonor galt es, die N^{α} -Z-Schutzgruppe abzuspalten. Dies erfolgte mit einem Gemisch aus TFA und Thioanisol (3.3.8.).

Die Reaktion verlief ohne erkennbare Probleme. Das nach der HPLC-gestützten Reinigung aufgezeichnete HPLC-Profil und Massenspektrum des Produkts zeigen einerseits die hohe Reinheit des Syntheseprodukts und andererseits dessen Identität (Abb. 63). Die isolierte Ausbeute an H-D-Arg25-D-Lys81-OH betrug 64% (12 mg). Der Verlust in der isolierten Ausbeute ergibt sich durch die präparative säulenchromatographische Aufreinigung. Auf diese konnte jedoch nicht verzichtet werden, da eine Etherfällung nicht ausreichte, um das gesamte Thioanisol zu entfernen.

Das CD-Spektrum des Produkts H-D-Arg25-D-Lys81-OH (Abb. 64) wies im Vergleich zu den CD-Spektren der Ausgangsverbindungen (Abb. 30 und 44) keine signifikante Änderung auf und unterliegt damit keiner Strukturänderung.

Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe wurde prinzipiell nicht in Erwägung gezogen, da sich im Biotin-Ringsystem des D-Lys(Biotin) ein Schwefel befindet, welcher möglicherweise die Abspaltung der Z-Schutzgruppe durch den Katalysator - Palladium auf Aktivkohle - während der Hydrogenolyse negativ beeinflussen könnte.

5.1.8. Clostripain-katalysierte Ligation der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH

Vor der finalen Clostripain-katalysierten Ligation des Fragments Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH wurde der Anteil an spontaner Hydrolyse des Acyldonors Ac-D-Ser1-Gly24-OGp unter Ligationsbedingungen untersucht (4.1.9.2.). Wie Abb. 65 zeigt, ist bereits nach ca. 50 Minuten 50% des eingesetzten Esters spontan zur korrespondierenden Säure hydrolysiert. Dies entspricht damit dem Wert des Substratmimetikums Z-D-Arg25-Gly47-OGp aus der vorangegangenen Ligation (4.1.7.1.).

Die Kontrolle der Akzeptanz des Acyldonors Ac-D-Ser1-Gly24-OGp durch die Protease Clostripain erfolgte mittels enzymatischer Hydrolysereaktionen. Da die Entstehung der korrespondierenden Säure signifikant schneller als im spontanen Hydrolyseansatz verlief (Abb. 65), kann von einem enzymatischen Umsatz des Esters ausgegangen werden (Abb. 66). Wie zu erwarten, nahm die Geschwindigkeit der Hydrolyse mit steigender Enzymkonzentration zu.

Um eine spontane Reaktion des Acyldonors mit dem Acylakzeptor zu untersuchen, wurde eine Kontrollreaktion ohne Zugabe des Biokatalysators durchgeführt (4.1.9.3.). Dabei zeigte sich (Abb. 67), dass lediglich der Ester einer spontanen Hydrolyse unterlag und keine nicht-enzymatische Produktbildung erfolgte.

An diese initialen Studien schlossen sich die Ligation der entsprechenden Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp und H-D-Arg25-D-Lys81-OH sowie die Optimierung der Ligation im analytischen Maßstab an (4.1.9.4.). Im Gegensatz zur vorangegangenen Ligation, bei der im äquimolaren Verhältnis von Ester und Nukleophil bereits eine Ausbeute von 46% bestimmt wurde (Tab. 4), konnte bei der Ligation unter diesen Bedingungen keine Produktbildung detektiert werden. Erst bei einem dreifachen Überschuss des Nukleophils in Bezug auf den Ester konnte eine Produktbildung von 10% erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Nukleophilkonzentration bis zu einem vierfachen Überschuss im Ansatz führte nicht zur erhofften Verbesserung der Effizienz. Als Ursache für die geringe Ausbeute könnte eine nicht sichtbare Aggregatbildung, beispielsweise aufgrund der Ladungen beider Ausgangsstoffe, in Frage kommen, über die eine CD-spektroskopische Untersuchung hätte womöglich Aufschluss geben können.

Durch die Zugabe von Harnstoff bzw. Detergens sollte das Auftreten dieses Problems umgangen werden. Während bei der Zugabe von Harnstoff keine Erhöhung der Ausbeute zu verzeichnen war, konnte durch die Anwesenheit von Tween 100 im Ansatz die Effizienz bei einem dreifachen Überschuss an Nukleophil von 10% auf 25% erhöht werden (Tab. 5). Dieser

Wert liegt jedoch noch deutlich unter dem Wert der ersten Ligation (80%). Da die Längen der Substratmimetika nahezu identisch und die Ligationsstellen Gly-D-Arg in beiden Reaktionen gleich sind, kann ein Einfluss der Länge des Nukleophils in der Clostripain-katalysierten Ligation auf die Ausbeute nicht ausgeschlossen werden.

In der abschließenden Ligation von Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH im semi-präparativen Maßstab unter optimierten Bedingungen konnte das Produkt mit einer isolierten Ausbeute von 3 mg (15%) nach einer HPLC-Reinigung erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels HPLC (Abb. 68 a) und die Identität des Produkts wurde massenspektrometrisch nachgewiesen (Abb. 68 b).

Die abschließende Untersuchung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie ergab nahezu das Spiegelbild eines in der Literatur veröffentlichten CD-Spektrums eines nicht biotinylierten all-L-konfigurierten HMG-I/Y Proteins [211]. Demnach sollte nach der finalen Reinigung und Lyophilisation des Produkts das Protein in der korrekten Faltung vorliegen. Aufgrund der Tatsache das dieses Protein kein Enzym ist und keine Stoffumwandlung katalysiert, kann demzufolge auch keine Aktivität bestimmt werden um einen zusätzlichen Beweis der Identität zu erbringen.

5.2. Teil B – „Studien zur Synthese von *E. coli* Parvulin 10“

5.2.1. Synthese von H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH

Um die ADP hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ligation längererkettiger all-L-Peptide untersuchen zu können (siehe 3.4.7.), war zunächst die Synthese der Acylakzeptoren H-LGSVKASAYK-OH und H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH Voraussetzung (siehe 3.4.1.).

Die nach der automatisierten SPPS erhaltenen Ausbeuten von 59% (101 mg) für das 10 Aminosäure umfassende Peptid H-LGSVKASAYK-OH und 52% (137 mg) für das aus 16 Aminosäuren aufgebaute Peptid H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH deuten auf eine unkomplizierte Synthese am 2-CITrt-Harz hin. Die hohe Qualität der Syntheseprodukte wird durch die HPLC-Profile deutlich, die Massenspektren konnten eindeutig die Identität der Produkte beweisen (siehe Abb. 70). Die Ausbeuteverluste in beiden Synthesen entstehen typischerweise während der TFA-Behandlung durch eine nicht quantitative Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger sowie durch die anschließende HPLC-gestützte Reinigung der jeweiligen Rohprodukte.

5.2.2. Synthese von Bz-AYLDAYVKAG-OGp

Die Synthese des 10 Aminosäure-haltigen Substratmimetikums Bz-AYLDAYVKAG-OGp (siehe 3.4.2.) war ebenfalls für die ADP-katalysierte Synthese längerkettiger all-L-Peptide Voraussetzung (siehe 3.4.7.) und erfolgte unter Verwendung der *safety-catch* Methode, um eine razemisierungsfreie Bildung des Esters zu garantieren.

Nach erfolgter SPPS, *linker*-Aktivierung und Ablösung mit H-Gly-OGp(Boc)₂ (4.2.2.), konnte das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 35% (67 mg) erhalten werden. Die hohe Reinheit des Produkts wird durch das HPLC-Chromatogramm (Abb. 71 a) sichtbar und das Massenspektrum (Abb. 71 b) identifiziert dies als das gewünschte Substratmimetikum.

Die hohen Verluste in der Ausbeute können sowohl durch eine unvollständige Aktivierung des Sulfamyl-*linkers* mittels Iodacetonitril als auch durch eine unvollständige Ablösung des Harz-gebundenen Peptids mit H-Gly-OGp(Boc)₂ hervorgerufen werden. Da Iodacetonitril im Vergleich zu H-Gly-OGp(Boc)₂ sterisch nicht so anspruchsvoll ist, wird der nukleophile Angriff des aktivierten *linkers* durch H-Gly-OGp(Boc)₂ als Hauptursache für die schlechte Ausbeute angesehen. Die HPLC-gestützte Reinigung reduziert die Ausbeute zusätzlich.

Eine alternative Synthesemethode wäre die Aktivierung des C-terminalen Glycins mit PyBOP[®] und Veresterung mit HOGp(Boc)₂ wie beispielsweise in 3.3.4. beschrieben. Nachteilig im Vergleich zur *safety-catch*-Methode ist, dass durch einen unvollständigen Umsatz mit der Alkoholkomponente die freie Säure des Peptids im finalen Produkt enthalten sein kann, die eine chromatographische Reinigung erschweren könnte. Generell sollte diese Methode aufgrund der Epimerisierungsgefahr nur mit Glycin oder Prolin als C-terminale Aminosäuren verwendet werden.

5.2.3. Synthese von Par10 H-Lys36-Asn92-OH

Das zur Semi-Synthese von Parvulin 10 benötigte 57 Aminosäuren lange Nukleophil H-Lys36-Asn92-OH, welches mit dem Substratmimetikum Z-Ala1-Lys35-OBzl unter Einsatz von ADP ligiert werden soll, wurde mittels automatisierter Festphasen-Peptidsynthese dargestellt (siehe 3.4.3.). Die Auswahl von 2-Chlortritylchlorid-Polystyren-Harz als polymeren Träger begründet sich sowohl in eigenen Erfahrungen als auch in der Literatur publizierten Ergebnissen hinsichtlich der Synthese längerkettiger Peptide [207].

Aufgrund der in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Erfahrungen für die Darstellung von kürzeren Abschnitten des Fragments [mündliche Mitteilung von Vaclav Cerovsky], wurde eine erste „Kontrollabspaltung“ nach 30 Aminosäuren durchgeführt.

Das HPLC-Profil des intermediären Rohpeptids Fmoc-Lys63-Asn92-OH (Abb. 72 a) zeigt ein eindeutiges Signal bei $rt = 15,4$ min. Die massenspektrometrische Analyse dieses Peaks (Abb. 72 b) bestätigte die Identität des gewünschten Produkts. Im Bereich von 12 bis 13 Minuten sind leichte Verunreinigungen erkennbar, die durch unvollständige Kupplungs- bzw. Fmoc-Abspaltungsschritte hervorgerufen werden.

Die nach der automatisierten Kupplung weiterer 15 Aminosäuren durchgeführte „Kontrollabspaltung“ ergab ein ähnliches HPLC-Chromatogramm (Abb. 72 c). Das Hauptsignal bei $rt = 15,6$ min entsprach dem gewünschten Produkt, welches im Massenspektrum (Abb. 72 d) eindeutig zu erkennen ist. Die Verunreinigungen im Bereich von 12 bis 14 Minuten nehmen nur marginal zu. Auch hier sind nicht quantitativ ablaufende Reaktionen während der Kupplungszyklen als Ursache anzusehen.

Eine signifikante Verschlechterung des Syntheseverlaufs von H-Lys36-Asn92 ist im letzten Abschnitt bei der Kupplung der Aminosäuren Lys36 bis Asp48 zu verzeichnen. Die „Kontrollabspaltung“ des Zwischenprodukts Fmoc-Lys36-Asn92-OH ergibt im HPLC-Profil einen sehr breiten Peak bei $rt = 13,55$ min, welcher sich über ca. fünf Minuten erstreckt (Abb. 73 a). Dies ist durch eine massive Anhäufung von Rumpf- bzw. Fehlsequenzen, hervorgerufen durch unvollständige Kupplungen bzw. Fmoc-Abspaltungen, zu erklären. Die Signale bei $rt = 18,50$ min und $rt = 20,52$ min sind auf Schutzgruppenfragmente zurückzuführen, da keine Etherfällung des Rohpeptids vor der HPLC-Analytik vorgenommen wurde.

Da das Produkt mittels Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden konnte (Abb. 73 b), erfolgte die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und eine HPLC-gestützte präparative Trennung. Das HPLC-Profil und Massenspektrum (Abb. 74) nach der chromatographischen Reinigung weisen auf eine hohe Reinheit hin, wenn auch im Massenspektrum kleinere Signale bei $m/z = 2500$ und 3050 zu sehen sind. Die Ausbeute von 36,2 mg entspricht 3,8% bezogen auf den gewählten Synthesemaßstab von 0,125 mmol. Diese geringe Ausbeute ist auf die bereits angesprochene Verschlechterung der Kupplungseffizienzen bzw. in der Unvollständigkeit der Fmoc-Abspaltungen während der Synthese des Abschnittes Lys36-Asp48 zurückzuführen. Eine Optimierung der Synthese könnte hinsichtlich des polymeren Trägers erfolgen. Denkbar wäre beispielsweise der Einsatz sogenannter TentaGel-Harze [212]. Diese vereinen eine geringe Beladung des polymeren Trägers mit der *C*-terminalen Aminosäure von ungefähr 0,2 mmol/g Harz und besitzen hervorragende Quelleneigenschaften in den üblichen Lösungsmitteln der SPPS. Der Einbau von Pseudoprolin-Derivaten bietet sich in diesem Fragment nicht an, da sich in einem Abstand kleiner sechs Aminosäuren von der putativen Einbaustelle Proline befinden, welche von sich aus Struktur-

brechende Eigenschaften besitzen [213]. Weiterhin wäre für die letzten Kupplungsschritte eine Erhöhung der Äquivalente an Aminosäure und Kupplungsreagenzien bzw. der Einsatz effizienterer Kupplungsreagenzien, wie beispielsweise HATU, denkbar.

5.2.4. Synthese von Par10 Z-Ala1-Lys35-OBzl

Das für die Semi-Synthese von *E. coli* Parvulin 10 benötigte Substratmimetikum Z-Ala1-Lys35-OBzl wurde schrittweise mittels SPPS unter Verwendung der *safety-catch*-Methode aufgebaut (3.4.4.). Dabei wurden unterschiedliche *linker*- (Sulfamylbutyryl-, Sulfamylbenzoyl-) und Harztypen (Aminomethyl-Polystyren sowie -NovaGel) hinsichtlich ihrer prinzipiellen Eignung und Syntheseeffizienz untersucht.

Nach erfolgter SPPS wurden die drei *linker*-Harz Kombinationen mit Idoacetonitril aktiviert und die Harz-gebundenen Peptide mit H-Lys(Boc)-OBzl abgelöst. Dabei zeigten sich besonders in den Fällen von Sulfamylbutyryl-Polystyren-Harz und Sulfamylbutyryl-Aminomethyl-Novagel-Harz massive Anhäufungen von Rumpf- und Fehlsequenzen, welche eine Aufreinigung des Produkts nicht als sinnvoll erachten ließen (Abb. 75 a und b). Die vergleichsweise beste Synthesequalität wurde unter Einsatz von Sulfamylbenzoyl-Polystyren-Harz erreicht (Abb. 75 c). Hier hob sich der Produktpeak bei $rt = 16,89$ min eindeutig von den Fehlsequenzen ab. Der 35 Aminosäure-haltige Benzyleser Z-Ala1-Lys35-OBzl wurde mittels Massenspektrometrie (Abb. 75 d) identifiziert und nachfolgend mittels präparativer HPLC isoliert. Das finale Produkt (Abb. 76) ist mit einer Ausbeute von 3% (18,6 mg) bezogen auf 0,125 mmol erhalten worden. Die geringe Ausbeute kann, wie schon unter 5.2.2. diskutiert, auf eine unvollständige Ablösung durch den N^α -ungeschützten Aminosäureester zurückzuführen sein. Zusätzlich sind jedoch massive Fehlsequenzen durch nicht quantitativ verlaufende Kupplungszyklen zu beobachten, die sich möglicherweise durch eine Kontrolle des gesamten Verlaufes der Fmoc-Abspaltung sowie den Einsatz mehrerer Äquivalente der zu kuppelnden Aminosäure sowie Kupplungsreagenz minimieren lassen. Alternativ könnte auch über die Verwendung eines anderen polymeren Trägers nachgedacht werden. Der Einsatz von Pseudoprolinen ist nicht möglich, da sich keine ersetzbaren Serin- bzw. Threonin-Reste in dem entsprechenden Sequenzabschnitt befinden.

5.2.5. ADP-katalysierte Hydrolyse verschiedener Substratmimetika

Zur Evaluierung der generellen Akzeptanz verschiedener Substratmimetika durch ADP sind Hydrolysestudien mit einer Bibliothek an Boc-Ala-(Thio)esterderivaten durchgeführt worden (3.4.5.). Die Auswahl der Esterabgangsgruppen (Abb. 77) erfolgte basierend auf der Primärspezifität der ADP für D-Phe, welche eine „spiegelbildliche“ Spezifität im Vergleich zu α -

Chymotrypsin zeigt. Da die dreidimensionale Struktur der ADP zum damaligen Zeitpunkt nicht bekannt war, war eine andere Auswahl von Abgangsgruppen, die sich aus der Struktur des Enzyms ableiten, nicht möglich und orientierte sich daher an den experimentellen Hinweisen mit α -Chymotrypsin. Für dieses Enzym konnte gezeigt werden, dass substituierte Phenylringe die Einbindung der Substratmimetika über zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen positiv beeinflussen [214]. Gestützt von der Annahme, dass sich die ADP ähnlich dem α -Chymotrypsin verhält, wurden deshalb neben dem Phenylalanin strukturell ähnelnden Phenyl- und Benzylestern auch 4-Carboxyphenyl-, 4-Carboxamidophenyl-, 4-Hydroxythiophenyl-, 2-Carboxy-1*H*-indol-5-yl- sowie im besonderen 4-Guanidinophenylester untersucht [214]. Boc-L-Ala-OMe mit einer unspezifischen Abgangsgruppe ist als Kontrolle mitgeführt worden.

Die in Abb. 78 dargestellten initialen Hydrolysegeschwindigkeiten zeigen, dass prinzipiell alle aromatischen Substratmimetika in das aktive Zentrum eingebunden und umgesetzt werden, wenn auch deutlich langsamer als das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe. Erstaunlicherweise wichen die Reaktionsgeschwindigkeiten trotz der unterschiedlichen Esterstrukturen mit einem Faktor von maximal drei nur sehr wenig voneinander ab. Dabei wurden der 4-Hydroxythiophenyl- bzw. Phenylester mit Geschwindigkeiten von ca. $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ am langsamsten und der Benzyl-, Indolyl- und 4-Guanidinophenylester mit Geschwindigkeiten von 2,2 bis 2,4 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ am schnellsten hydrolysiert. Ungeachtet der großen Substratbreite von ADP erfolgte keine Hydrolyse von Boc-L-Ala-OMe mit seiner unspezifischen Methylesterfunktion, ein Befund, der die Notwendigkeit der aromatischen Abgangsgruppe der Substratmimetika für deren Erkennung belegt.

Weitere Studien unter Verwendung der leicht präferierten Boc-Xaa-OGp Ester zeigten, dass der Effekt der OGp-Gruppe nicht auf Ala beschränkt ist. So konnte für alle eingesetzten Boc-Xaa-OGp Ester, wobei Xaa eine Auswahl an aliphatischen, hydrophoben, sauren und basischen Aminosäuren darstellte (Xaa = Glu, Lys, Gln, Ala, Leu, Phe, Gly), eine ADP-Akzeptanz nachgewiesen werden (Abb. 78). Völlig unerwartet wurde das Substratmimetikum des achiralen Glycins nur 12-fach langsamer als das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe umgesetzt ($53 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ bzw. $630 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$) gefolgt von dem L-Phe-Derivat, dem Enantiomeren des ursprünglich spezifischen D-Phe, mit einer Geschwindigkeit von $8,2 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$. Boc-Leu-OGp, ein weiterer Vertreter der aliphatischen Aminosäure-derivate, wird mit $4,8 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ umgesetzt, was ungefähr einem Zehntel der Geschwindigkeit des Gly-Derivates entspricht. Die 4-Guanidinophenylester von Alanin, Glutamin und Lysin werden mit annähernd gleichen

Geschwindigkeiten im Bereich von $1,8 - 2 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ enzymatisch hydrolysiert. Das Glutaminsäure-Derivat wird von der Protease mit einer Geschwindigkeit von $0,5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ umgesetzt. Dies entspricht nur 1/100 der Hydrolysegeschwindigkeit des spezifischsten Substratmimetikums Boc-Gly-OGp. Aus diesen Ergebnissen wird eine Präferenz für aliphatische Aminosäuren erkennbar (Ausnahme Ala). Die polaren geladenen Aminosäuren und ungeladen werden signifikant langsamer umgesetzt, wofür elektrostatische Wechselwirkungen im aktiven Zentrum die Ursachen sein könnten.

5.2.6. ADP-katalysierte Synthese von Dipeptidamiden

Die Eignung der ADP zur Ligation von L-Aminosäure-Derivaten als Reaktanden wurde durch Modellreaktionen von spezifischen 4-Guanidinophenylestern als Acyldonoren und 12 Aminosäureamiden als Acylakzeptoren untersucht (4.2.5.). Die eingesetzten Substratmimetika und Nukleophile umfassten eine Auswahl an aliphatischen, polaren und aromatischen Aminosäuren, die hinsichtlich der geplanten Synthesereaktion L-konfiguriert waren. Um eine effizientere HPLC-Analytik zu ermöglichen, wurden anstelle von N^α -Boc-substituierten Estern analoge N^α -Benzoyl-geschützte 4-Guanidinophenylester verwendet.

Zu Vergleichszwecken wurde das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe in die Untersuchungen einbezogen. Kontrollreaktionen ohne Biokatalysator dienten dazu, das Ausmaß spontaner Hydrolyse und Aminolyse zu bestimmen. In allen Reaktionen konnte keine Produktbildung durch nicht-enzymatische Ligation von Acyldonor mit Acylakzeptor detektiert werden und der Anteil an hydrolysiertem Ester betrug weniger als 5%.

Die ADP-vermittelten Reaktionen verdeutlichen (Tab. 5), dass neben dem Esterumsatz innerhalb von 15 Minuten in jedem Fall eine Produktbildung im Bereich von 0,5 bis 93,1% stattfand. Da dies auch für die L-konfigurierten Mimetika gilt, kann man schlussfolgern, dass die Protease trotz ihrer nativen Spezifität für D-Phe in der Lage ist, vermittelt durch die substratimitierende 4-Guanidinophenylester-Abgangsgruppe L-Aminosäuren miteinander zu verknüpfen.

Eine genaue Analyse der Ligationsausbeuten macht jedoch einen Einfluß des Acyldonors und -akzeptors auf die Syntheseeffizienz deutlich. Generell liegen alle Ausbeuten unter Einsatz von Substratmimetika über denen des Standardsubstrates Ac-D-Phe-OMe, ein Befund, der mit den Ergebnissen früherer Studien korreliert [215]. Betrachtet man die Substratmimetika untereinander, so resultieren die Bz-Gly-OGp und Bz-Glu-OGp vermittelten Dipeptidsynthesen in den höchsten Ausbeuten (10 - 90%), wohingegen der Einsatz des Bz-Phe-OGp zu Produkten in einem Bereich von 5 - 65% führt.

Mit den Ausnahmen des Glycins und der kleinen L-Alanin-Seitenkette scheint dieser Effekt umgekehrt proportional zur Enzymspezifität gegenüber dem jeweiligen Ester zu sein. So wird das vom L-Glu abgeleitete OGP-Derivat zwar am langsamsten enzymatisch hydrolysiert, ist aber in der Ligation am effizientesten. Dem entgegen steht der L-Phe Ester, welcher rasch umgesetzt wird, aber am wenigsten effizient in der Produktbildung ist. Nichtsdestotrotz sind die Ausbeuten für Synthesezwecke als wertvoll anzusehen.

Neben den Unterschieden in den Ausbeuten unter Einsatz verschiedener Bz-Xaa-OGP Ester, zeigen auch die Nukleophile einen deutlichen Einfluss auf die Ligationseffizienz, was einen Rückschluss auf die S_1' - Bindungsortspezifität ermöglicht. Es zeigte sich, dass die sterisch anspruchsvollen aliphatischen bzw. aromatischen Aminosäuren Met, Leu, Phe, Ile gegenüber den Aminosäuren Ala, Ser, Glu mit kleineren Seitenketten sowie polaren, insbesondere negativ geladenen, bevorzugt werden. Am schlechtesten wird die Iminosäure Prolin mit allen eingesetzten Substratmimetika akzeptiert - ein Problem vieler Proteasen. Die Erklärung hierfür könnte in der alicyclischen Ringstruktur liegen.

5.2.7. ADP-katalysierte Synthese längerer all-L-Peptide

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die ADP L-Aminosäurederivate miteinander verknüpft (4.2.6.), sollten nun sowohl längererkettige Substratmimetika als auch peptidische Nukleophile für die Ligation eingesetzt werden (4.2.7.). Für diese Studien enthielten die Ester 3 bzw. 10 Aminosäuren und die Nukleophile 10 bzw. 16 Aminosäuren. Um etwaige Einflüsse der Aminosäurenatur an der Ligationstelle auf die Syntheseeffizienz auszuschließen, sind sowohl die C-terminale Aminosäure des Acyldonors (Gly) als auch die N-terminale Aminosäure des Acylakzeptors (Leu) konstant gehalten worden.

In Kontrollreaktionen ohne ADP konnte keinerlei Produktbildung detektiert und damit eine spontane Acylierungsreaktion ausgeschlossen werden. Durch Zugabe von ADP zu den entsprechenden Ligationansätzen wurde hingegen eine schnelle Produktbildung beobachtet, welche nach 15 Minuten beendet war und mit der Kettenlänge des Acyldonors und -akzeptors variierte. Außer der Hydrolyse des Esters wurden keine weiteren Nebenreaktionen, wie der des proteolytischen Abbaus des Ligationprodukts, beobachtet. Die enzymatische Verknüpfung des Aminosäure-, Tri- und Dekapeptid-OGP-Esters mit H-Leu-NH₂, dem 10mer H-LGSVKASAYK-OH sowie 16mer H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH ergab (Tabelle 6), dass eine Verlängerung des Acyldonors vom Aminosäure-Derivat zum Tripeptidester unabhängig von der Länge des Akzeptors in einem Effizienzverlust im Bereich von 30% (Tabelle 6) resultierte. So konnte beispielsweise das Produkt der (3+10)-Ligation nur mit 45,6% im Gegensatz zur (1+10)-Ligation mit 77,5% Ausbeute erhalten werden. Eine mögliche Ursache

für die reduzierte Ligationseffizienz um ca. 30% könnte in der bisher nicht untersuchten Spezifität weiterer Bindungsorte liegen. Studien im Rahmen eines Screenings für diese Positionen könnten einen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der Effizienz geben. Dieser Verlust verändert sich nur noch marginal bei einer weiteren Verlängerung des Substratmimetikums. Die (10+10) Ligation lieferte eine Ausbeute von 40,1% und liegt damit nur knapp unter den 45,6% der (3+10) Ligation. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die ADP auch noch längere Substratmimetika akzeptiert.

Betrachtet man den Einfluss der Länge des Acylakzeptors auf den Syntheserfolg, so ist zu erkennen, dass sich die Ausbeuten unter Einsatz desselben Substratmimetikums nur um maximal 9% unterscheiden. So wird beispielsweise in der (3+10) Ligation eine Produktausbeute von 45,6% erhalten, wohingegen in der (3+16) Ligation 49% Produkt entstehen.

Die geringere Ausbeute der Ligation von Bz-Gly-OGp mit H-Leu-NH₂ in Höhe von 86,1% (siehe 4.2.7.) im Vergleich zu 92,3%, wie unter 4.2.6. zu sehen, ist lediglich auf eine geringere Nukleophilkonzentration im Ansatz zurückzuführen.

Aus den Ergebnissen lässt sich zusammenfassend ableiten, dass die ADP prinzipiell in der Lage ist, neben längerkettigen Acyldonoren auch längerkettige Acylakzeptoren zu tolerieren, wobei jedoch die Kettenlänge des Acylakzeptors nur einen geringfügigen Einfluss auf den Syntheserfolg hat. Die unterschiedlich variierenden Ausbeuten beim Einsatz des 10 bzw. 16 Aminosäure langen Nukleophils liegen vermutlich in einem Einfluss weiterer Bindungsorte begründet und könnten durch ein entsprechendes Screening bestätigt werden.

5.2.8. ADP-katalysierte Synthese von Z-Par10

An die Charakterisierung der Alkalischen D-Peptidase hinsichtlich der Akzeptanz verschiedener Substratmimetika (4.2.5.), der Synthese von Dipeptidamiden (4.2.6.) sowie längerkettigen all-L-Peptiden (4.2.7.) schloss sich für die Semi-Synthese von Parvulin 10 die finale Ligation der Fragmente Z-Ala1-Lys35-OBzl und H-Lys36-Asn92-OH mittels des genannten Biokatalysators an (4.2.8.).

Die Kontrolle des Verlaufs der Ligungsreaktion erfolgte zunächst mittels SDS-PAGE. Im Reaktionsansatz ohne ADP konnte weder nach 30 Minuten noch nach 5 Stunden eine spontane Produktbildung beobachtet werden (Abb. 80 Bahn 3 und 5). Erst nach Zugabe des Biokatalysators ADP ist nach 30 Minuten Reaktionszeit eine eindeutige Produktbildung in Form einer neuen Bande bei ca. 10-11 kDa zu erkennen (Abb. 80 Bahn 4), die dem Ligungsprodukt zuzuschreiben ist. Durch densitometrische Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass nach fünf Stunden Inkubationszeit die Konzentration des Produkts Z-Par10 im Vergleich zum 30 Minuten-Wert unverändert ist. Daraus lässt sich einerseits

schlussfolgern, dass die Produktbildung bereits nach 30 Minuten abgeschlossen ist und dass andererseits eine unerwünschte Spaltung des Produkts, aufgrund der Primärspezifität der ADP für D-Phe, ausbleibt.

Die Ausbeute, welche durch Mittelwertbildung zweier unabhängiger Methoden (SDS-PAGE und RP-HPLC) mit 61% bestimmt wurde, ähnelt dem Wert, der für die Synthese von Bz-Lys-Lys-NH₂ erhalten wurde (Tabelle 5). Der nicht quantitative Umsatz ist auf eine kompetitive Hydrolyse des Substratmimetikums zurückzuführen. Eine Verbesserung der Ausbeute wäre durch eine Erhöhung der Nukleophilkonzentration oder die Verringerung des Wasseranteils im Reaktionsmedium denkbar (Einsatz von ionischen Flüssigkeiten [98], Arbeiten im gefrorenen wässrigen System [216]), was jedoch gesonderten Studien bedarf.

Im Allgemeinen demonstriert das Ergebnis der erfolgreichen Ligation die hohe Flexibilität der Protease ADP bezüglich der Akzeptanz längerer Substrate für die Synthese von Proteinen. Da keine Produkte mit einem Molekulargewicht identifiziert wurden, welche größer als die des gewünschten Produkts waren, kann abgeleitet werden, dass keine zusätzlichen Acylierungen an nukleophilen Seitenkettenfunktionen stattfinden und dass das Enzym entsprechend regioselektiv arbeitet.

5.2.9. Isolierung, Z-Abspaltung, Reinigung und Rückfaltung von synthetischem Par10

Nach der ADP-katalysierten Ligation der Fragmente Z-Ala1-Lys35-OBzl und H-Lys36-Asn92-OH (siehe 3.4.8.) erfolgte die Isolierung und Reinigung mittels HPLC, die Z-Abspaltung sowie die Rückfaltung des Syntheseprodukts Z-Par10 (1-92) (siehe 3.4.9.). Die isolierte Ausbeute an synthetischem Parvulin 10 beträgt 33% (2 mg).

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 81 a) zeigt lediglich einen Peak bei $t_r = 15,4$ min und lässt auf eine hohe Reinheit schließen. Das MALDI-ToF-Massenspektrum (Abb. 81 b) bestätigte die Identität und Reinheit des finalen Produkts. Es ist allerdings ein sehr kleines Signal bei ca. $m/z = 11240$ zu sehen, welches dem noch N^α -Z-geschützten Parvulin entsprechen könnte. Ursache dafür wäre eine nicht quantitative Abspaltung der N -terminalen Schutzgruppe durch das TFA/Thioanisol-Gemisch (siehe 3.4.9.). Diese hätte durch eine nochmalige Inkubation unter den gegebenen Bedingungen bzw. eine Verlängerung der Inkubationszeit umgangen werden können.

Eine alternative Methode zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe stellt die Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle in Verbindung mit molekularem Wasserstoff und Methanol als Lösungsmittel dar [18]. Da sich jedoch in der Parvulin 10 Sequenz Cystein- und Methionin-

reste befinden, welche Schwefel als Katalysatorgift enthalten und damit die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppen erschweren oder gar verhindern, wurde diese Methode nicht in Betracht gezogen.

5.2.10. CD-spektroskopische Untersuchungen von synthetischem Par10

Die Ausbildung von Sekundärstrukturen von synthetischem Parvulin 10 sind durch Aufnahme von CD-Spektren untersucht worden (siehe 4.2.10.). Zu Vergleichszwecken wurden Spektren von rekombinantem *E. coli* Parvulin 10 aufgezeichnet.

Bei 20 °C sind marginale Unterschiede zwischen beiden Par10-Spezies im Maximum von 190 bis 195 nm sowie im Minimum 210 bis 220 nm zu erkennen (Abb. 82 a). Das Spektrum ist typisch für Proteine mit einem hohen Anteil an α -helicalen Sekundärstrukturen.

Nach der Hitzedenaturierung bei 90 °C (Abb. 82 b) ist eine deutliche Verringerung der Elliptizität bei 190 nm zu erkennen. Die Verkleinerung des Maximums lässt auf eine Umwandlung der Konformation beider Proteine schließen. Die Unterschiede zwischen synthetischem und rekombinantem Protein sind hier abermals als nur gering einzustufen.

Das CD-Spektrum, welches nach Erhitzen auf 90 °C und Abkühlen auf 20 °C erhalten wird (Abb. 82 c), zeigt nur minimale Unterschiede im Bereich von 210 bis 220 nm, dem Bereich des Minimums. Bereiche, die davor und danach liegen, sind nahezu identisch.

Markant ist, dass die Maxima bei 190 nm nicht mehr den Wert der Elliptizität der nicht Hitze-behandelten Proteine erreichen. Dies lässt auf eine irreversible Zerstörung von α -helicalen Bereichen innerhalb der Proteinkette beider Parvuline schließen.

5.2.11. Bestimmung des enzymkinetischen Parameters k_{cat}/K_M von synthetischem Par10

Zur Bestimmung der Aktivität des synthetischen Parvulin 10 wurde der Protease-gekoppelte PPIase-Test nach FISCHER *et al.* benutzt [177]. Als Substrat fand Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNa Verwendung und α -Chymotrypsin wurde als Protease eingesetzt. Nach Bestimmung der Konstante k_{enz} bei unterschiedlichen Konzentrationen an synthetischem Parvulin 10 und der Auftragung der Anstiege gegen die Konzentration an Parvulin konnte aus der Geraden durch Regression der Parameter k_{cat}/K_M bestimmt werden (siehe Abb. 83). Dieser liegt mit $0,97 \cdot 10^6 \pm 0,05 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ nahezu in derselben Größenordnung von rekombinantem *E. coli* Parvulin 10 ($1,12 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [185, 210]. Die um ca. 90% verminderte Aktivität des synthetischen Enzyms kann auf eine nicht korrekte Faltung eines bestimmten Anteils des Proteins zurückzuführen sein, obwohl im CD-Spektrum nur marginale Unterschiede zwischen rekombinantem und synthetischem Enzym detektiert werden konnten.

6. Zusammenfassung

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Semi-Synthese des verkürzten HMGA 1b, einem Protein welches aus 81 Aminosäuren besteht. Da die Totalsynthese mittels automatisierter Festphasensynthese nicht möglich war, beinhaltete die Synthesestrategie die Darstellung der Fragmente Ac-D-Ser1-Gly24-OGp, Z-D-Arg25-Gly47-OGp sowie H-D-Arg48-D-Lys81-OH und deren nachfolgende sequentielle Ligation unter Verwendung der L-spezifischen Cystein-Protease Clostripain.

Als besonders problematisch stellte sich dabei die chemische Synthese der einzelnen Fragmente heraus. Die Gewinnung durch lineare Festphasen-Peptidsynthese in einem Schritt war für alle drei Fragmente unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. Bereits nach wenigen Kupplungsschritten brach die Synthese unerwarteter Weise ab. Generell betrachtet sind die Syntheseschwierigkeiten vermutlich auf den hohen Anteil an trifunktionellen Aminosäuren zurückzuführen, welche aufgrund ihrer voluminösen Seitenketten-Schutzgruppen sterisch äußerst anspruchsvoll sind, zu Aggregationen neigen und Ursache für nicht-quantitative Kupplungs- und Deblockierungsschritte sein können. Erste Erfolge hinsichtlich der Fragmentsynthese konnten durch konvergente Syntheseansätze realisiert werden. Vorteil dieser Strategie ist die Darstellung von kurzen Unterfragmenten im Bereich von vier bis zwölf Aminosäuren mit hohen Reinheiten und guten Ausbeuten von 50% bis 82% sowie deren chemische Ligation. Die dadurch erhaltenen Produkte wiesen nach HPLC-gestützter Reinigung eine hohe Reinheit auf, jedoch war das Verhältnis von eingesetzten Aminosäuren zur Ausbeute an finalem Produkt nicht akzeptabel, da kein hundertprozentiger Umsatz der am Träger immobilisierten Aminokomponenten erreicht wurde.

Erst durch den Einsatz von manuellen Kupplungen an Positionen, welche sich aus den Erfahrungen der konvergenten Synthese und dem Scheitern in der linearen Synthese ergaben, und dem Einsatz von HATU als Kupplungsreagenz an diesen Positionen konnten mittels linearer Synthese die Fragmente in hoher Reinheit und mit guten Ausbeuten von 47% bzw. 76% erhalten werden. Obgleich die Veresterung erfolgreich verlief, bedarf die Umwandlung der geschützten Peptidsäuren in die entsprechenden 4-Guanidinophenylester, die mit Ausbeuten von 34% bzw. 39% erhalten wurden, weiteren Optimierungen.

Nach der Kontrolle der Akzeptanz des Esters durch die Protease Clostripain, der Bestimmung des Anteils der spontanen Esterhydrolyse sowie dem Ausschließen eines nicht-enzymatischen Acyltransfers erfolgte die erste Ligation der Fragmente Z-D-Arg25-Gly47-OGp und H-D-Arg48-D-Lys81-OH katalysiert durch Clostripain. Durch die Optimierung der Synthese-

effizienz mittels Variation des Ester-Nukleophil-Verhältnisses konnten in analytischen Ansätzen Ausbeuten bis zu 80% erreicht werden. Die Ligationsansätze zum Z-geschützten 57mer im semi-präparativen Maßstab, eine säulenchromatographische Reinigung und Freisetzung des N-Terminus resultierten in einer isolierten Produktausbeute von 12 mg (33%).

Vor der finalen enzymatischen Ligation von Ac-D-Ser1-Gly24-OGp mit H-D-Arg25-D-Lys81-OH zu Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH wurde in initialen Studien die Akzeptanz des Esters Ac-D-Ser1-Gly24-OGp durch Clostripain bestätigt, das Ausmaß der spontane Esterhydrolyse bestimmt und ein nicht-enzymatischer Acyltransfer durch Kontrollreaktionen ohne Enzym ausgeschlossen.

Durch Optimierung des Ester-Nukleophil-Verhältnisses sowie Zugabe von Additiven (Tween, Triton-X) konnte in analytischen Ansätzen eine maximale Ausbeute von 25% an Zielprotein erhalten werden. Nach Clostripain-katalysierten Ligationsreaktionen im semi-präparativen Maßstab unter optimierten Bedingungen und anschließender chromatographischer Reinigung wurden 3 mg (15%) des entsprechenden Produkts Ac-D-Ser1-D-Lys81-OH isoliert, dessen korrekte Faltung mittels CD-Spektroskopie bestätigt wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die D-Phe-spezifische Alkalische D-Peptidase aus *Bacillus cereus* (ADP) als ein neuer Biokatalysator, auf dessen potentielle Fähigkeit zur Verknüpfung von all-L Peptiden zur Darstellung größerer Peptide und Proteine näher untersucht.

Initial erfolgten dazu Studien zur Akzeptanz ausgewählter Substratmimetika durch die Protease. Als besonders geeignete Ester stellten sich in den enzymatischen Hydrolysestudien der 4-Guanidinophenylester (OGp), Benzylester (OBzl) sowie der Indolyester (OInd) heraus. Das nachfolgend durchgeführte Screening des Bindungsortes unter Einsatz einer Bibliothek von Boc-Xaa-OGp Estern (Xaa = Glu, Lys, Gln, Ala, Leu, Phe, Gly) zeigte, dass prinzipiell alle Substrate in das aktive Zentrum der ADP eingebunden und von der Protease mit Geschwindigkeiten von maximal $2,4 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot c[\text{ADP}]^{-1}$ umgesetzt werden.

In ADP-katalysierten Ligationsreaktionen mittels einer Auswahl an N^α -Benzoyl-geschützten Aminosäure-4-Guanidinophenylestern und 12 ausgewählten Aminosäureamiden konnte erstmals gezeigt werden, dass die ADP als eine D-spezifische Protease in der Lage ist, Substratmimetika-vermittelt zwei Aminosäuren in der L-Konfiguration unter Ausbildung einer Peptidbindung miteinander zu verknüpfen. Dabei variierten die Dipeptidamidausbeuten in einem Bereich von 4,5% bis 93% in Abhängigkeit vom eingesetzten Acyldonor und -akzeptor. Während die Präferenz der Protease hinsichtlich der Struktur des Acylakzeptors bei Aminosäuren mit großen hydrophoben bzw. aliphatischen sowie aromatischen Resten liegt,

wurden die höchsten Produktausbeuten mit Bz-Gly-OGp und Bz-Glu-OGp als Acyldonoren erzielt. Generell weisen alle Substratmimetika-vermittelten Reaktionen höhere Ligations-effizienzen als das D-Phe-haltige Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe auf, was deren hohen synthetischen Nutzen belegt.

Nachfolgende Ligationsexperimente mit synthetisch hergestellten peptidischen Substratmimetika und Nukleophilen ergaben, dass die ADP befähigt ist, neben Aminosäure- auch Tri- und Dekapeptid-OGp-Ester mit Nukleophilen bestehend aus 10 bzw. 16 Aminosäuren effizient zu verknüpfen (Ausbeuten: 40-84%). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Enzym in der Lage ist, noch größere Fragmente miteinander zu ligieren.

Für die geplante Semi-Synthese des aus 92 Aminosäuren bestehenden *E. coli* Parvulin 10 war zunächst die Synthese der Fragmente Z-Ala1-Lys35-OBzl sowie H-Lys36-Asn92-OH Voraussetzung. Zur Darstellung des Acyldonors sind verschiedene *safety-catch*-Harze (Sulfamylbutyrylaminomethyl-Polystyren-, Sulfamylbutyrylaminomethyl-NovaGel- und Sulfamylbenzoylaminomethyl-Polystyren-Harz) hinsichtlich ihrer Eignung für die Synthese untersucht worden. Während Sulfamylbutyrylaminomethyl-Polystyren und -NovaGel-Harz zu unbefriedigenden Produktreinheiten und -quantitäten führte, ergab das Sulfamylbenzoylaminomethyl-Polystyren-Harz die vergleichsweise besten Syntheseergebnisse. Nach *linker*-Aktivierung, Ablösung mit H-Lys(Boc)-OBzl, Deblockierung aller Aminosäureseitenketten und säulenchromatographischer Trennung wurden 3% (18,6 mg) an Produkt erhalten.

Die Synthese des 57mers H-Lys36-Asn92-OH erfolgte am 2-CITrt-Harz unter Kontrolle des Syntheseverlaufes. Wenngleich die Synthese auch erfolgreich verlief und das Produkt mit einer Ausbeute von 4% (36,2 mg) isoliert werden konnte, sind Probleme während der Kupplung der Aminosäuren Lys36-Asp48 beobachtet worden, die es für nachfolgende Synthesen zu lösen gilt.

Im Anschluss an die erfolgreiche Festphasensynthese ist die Ligation der Fragmente Z-Ala1-Lys35-OBzl mit H-Lys36-Asn92-OH katalysiert durch die Alkalische D-Peptidase im semi-präparativen Maßstab erfolgreich durchgeführt worden. Die Ausbeute, ermittelt durch zwei unabhängige Meßmethoden (HPLC und Densitometrie der SDS-PAGE), wurde mit 61% bestimmt. Wie erwartet, konnte keine proteolytische Spaltung des Ligationsprodukts aufgrund der Spezifität der Protease für D-Phe detektiert werden. Im Anschluss an die HPLC-chromatographische Trennung, Produktisolierung, Abspaltung der *N*-terminalen Z-Schutzgruppe und Rückfaltung des Proteins, was mit einer Ausbeute von 33% (2 mg) gelang, erfolgten vergleichende Strukturuntersuchungen mit rekombinantem Parvulin 10 mittels CD-

Spektroskopie. Dabei konnten lediglich marginale Unterschiede zwischen rekombinantem und synthetischem Parvulin 10 festgestellt werden.

In der abschließenden Bestimmung der enzymatischen Aktivität des synthetischen Parvulin 10 mittels Protease-gekoppelten Tests erreicht das synthetische Parvulin 10 ca. 7% der Aktivität des rekombinanten Proteins.

7. Literaturverzeichnis

1. Voet, D. und Voet, J., *Biochemistry, 2nd Edition*. John Wiley and Sons, 1995.
2. Jakubke, H.D., *Peptide. Chemie und Biologie*. Spektrum Verlag, Heidelberg, 1996.
3. Ross, S.A., Gulve, E.A. und Wang, M.H., *Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes*. Chemical Reviews, 2004. **104**(3): S. 1255-1282.
4. Verlander, M., *Industrial applications of solid-phase peptide synthesis - A status report*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2007. **13**(1-2): S. 75-82.
5. Hong, S.Y., Oh, J.E. und Lee, K.H., *Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide*. Biochemical Pharmacology, 1999. **58**(11): S. 1775-1780.
6. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. und Helling, R.B., *Construction of biologically functional bacterial plasmids in-vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**(11): S. 3240-3244.
7. Arber, W. und Linn, S., *DNA modification and restriction*. Annual Review of Biochemistry, 1969. **38**: S. 467-500.
8. Venter, J.C., *et al.*, *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): S. 1304-1351.
9. Otvos, L., Urge, L., Hollosi, M., Wroblewski, K., Graczyk, G., Fasman, G.D. und Thurin, J., *Automated solid-phase synthesis of glycopeptides - Incorporation of unprotected monosaccharide and disaccharide units of N-glycoprotein Antennae into T-cell epitopic peptides*. Tetrahedron Letters, 1990. **31**(41): S. 5889-5892.
10. Zubin, E.M., Romanova, E.A., Volkov, E.M., Tashlitsky, V.N., Korshunova, G.A., Shabarova, Z.A. und Oretskaya, T.S., *Oligonucleotide-peptide conjugates as potential antisense agents*. Febs Letters, 1999. **456**(1): S. 59-62.
11. Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F.M., Moroder, L. und Huber, R., *Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire*. Faseb Journal, 1999. **13**(1): S. 41-51.
12. Dedkova, L.M., Fahmi, N.E., Golovine, S.Y. und Hecht, S.M., *Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins*. Biochemistry, 2006. **45**(51): S. 15541-15551.
13. Hofmeister, F., *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 1902. **17**: S. 529-545.
14. Curtius, T., *Über die Einwirkung von Chlorbenzoyl auf Glycocollsilber*. Journal für praktische Chemie, 1881. **24**(5): S. 239-240.
15. Curtius, T., *Synthetische Versuche mit Hippurazid*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1902. **35**(3): S. 3226-3228.
16. Fischer, E. und Fourneau, E., *A derivative from glykocolls*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1901. **34**: S. 2868-2877.
17. Fischer, E., *Synthesis of Polypeptides. XVII*. Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft, 1907. **40**: S. 1754-1767.
18. Bergmann, M. und Zervas, L., *A general procedure of the peptide synthesis*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1932. **65**(7): S. 1192-1201.

19. Sanger, F., *The arrangement of amino acids in proteins*. Advances in Protein Chemistry, 1952. **7**: S. 1-67.
20. Sanger, F. und Thompson, E.O., *The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin*. Biochemical Journal, 1952. **52**(1): S. 353-66.
21. Spackman, D.H., Stein, W.H. und Moore, S., *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*. Analytical Chemistry, 1958. **30**(7): S. 1190-1206.
22. Wieland, T., Kern, W. und Sehring, R., *Über Anhydride von acylierten Aminosäuren*. Annalen der Chemie - Justus Liebig, 1950. **569**(2): S. 117-121.
23. Sheehan, J.C. und Hess, G.P., *A new method of forming peptide bonds*. Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(4): S. 1067-1068.
24. Schwyzer, R., Iselin, B. und Feurer, M., *Über Aktivierte Ester .1. Aktivierte Ester der Hippursäure und ihre Umsetzungen mit Benzylamin*. Helvetica Chimica Acta, 1955. **38**(1): S. 69-79.
25. Schwyzer, R., Feurer, M., Iselin, B. und Kägi, H., *Über aktivierte Ester .2. Synthese aktivierter Ester von Aminosäure-Derivaten*. Helvetica Chimica Acta, 1955. **38**(1): S. 80-83.
26. Schwyzer, R., Feurer, M. und Iselin, B., *Über Aktivierte Ester .3. Umsetzungen aktivierter Ester von Aminosäure-Derivaten und Peptid-Derivaten mit Aminen und Aminosäureestern*. Helvetica Chimica Acta, 1955. **38**(1): S. 83-91.
27. du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, P.G. und Gordon, S., *The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin*. Journal of the American Chemical Society, 1953. **75**(19): S. 4879-4880.
28. du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W. und Katsoyannis, P.G., *The synthesis of oxytocin*. Journal of the American Chemical Society, 1954. **76**(12): S. 3115-3121.
29. Carpino, L.A., *Oxidative reactions of hydrazines. II. Isophthalimides. New protective groups on nitrogen*. J. Am. Chem. Soc., 1957. **79**(1): S. 98-101.
30. Meienhofer, J., Zahn, H., Schnabel, E., Bremer, H., Zabel, R., Sroka, W., Okuda, T., Brinkhof, O., Brandenburg, D. und Klostermeyer, H., *Synthese der Insulinketten und ihre Kombination zu insulinaktiven Präparaten*. Zeitschrift für Naturforschung Part B - Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete, 1963. **B 18**(12): S. 1120.
31. Kung, Y.T., *et al.*, *Total synthesis of crystalline bovine insulin*. Scientia Sinica, 1965. **14**(11): S. 1710.
32. Katsoyannis, P.G., Tilak, M., Tometsko, A., Fukuda, K. und Suzuki, K., *Insulin peptides .X. synthesis of B-chain of insulin and its combination with natural or synthetic A-chain to generate insulin activity*. Journal of the American Chemical Society, 1964. **86**(5): S. 930.
33. Schwyzer, R. und Sieber, P., *Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone*. Nature, 1963. **199**(488): S. 172-174.
34. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): S. 2149-2154.

35. Uhlmann, E. und Peyman, A., *Antisense oligonucleotides - a new therapeutic principle*. Chemical Reviews, 1990. **90**(4): S. 543-584.
36. Houghten, R.A., Pinilla, C., Blondelle, S.E., Appel, J.R., Dooley, C.T. und Cuervo, J.H., *Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery*. Nature, 1991. **354**(6348): S. 84-86.
37. Sakakiba, S., Shimonis, Y., Kishida, Y., Okada, M. und Sugihara, H., *Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis .I. Behavior of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1967. **40**(9): S. 2164.
38. Hirschmann R., Nutt, R.F., Veber, D.F., Vitali, R.A., Varga, S.L., Jacob, T.A., Holly, F.W. und Denkewalter, R.G., *Studies on total synthesis of an enzyme .V. Preparation of enzymatically active material*. Journal of the American Chemical Society, 1969. **91**(2): S. 507-508.
39. Gutte, B. und Merrifield, R.B., *Total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity*. Journal of the American Chemical Society, 1969. **91**(2): S. 501-2.
40. Schneider, J. und Kent, S.B.H., *Enzymatic-activity of a synthetic-99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease*. Cell, 1988. **54**(3): S. 363-368.
41. Carpino, L.A. und Han, G.Y., *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*. Journal of Organic Chemistry, 1972. **37**(22): S. 3404-3409.
42. Fields, G.B. und Noble, R.L., *Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1990. **35**(3): S. 161-214.
43. Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Yao, W.Q. und Schäfer, W., *Synthesis of protected peptide-fragments using substituted Triphenylmethyl resins*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(30): S. 3943-3946.
44. Moss, J.A., *Guide for resin and linker selection in solid-phase peptide synthesis*. Curr Protoc Protein Sci, 2005. **Chapter 18**: S. Unit 18 7.
45. Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G. und Selve, C., *Reactions of peptide bond .4. Benzotriazolyl-N-oxytridimethylamino phosphonium hexafluorophosphate (BOP)*. Tetrahedron Letters, 1975(14): S. 1219-1222.
46. Coste, J., Lenguyen, D. und Castro, B., *PyBOP - a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*. Tetrahedron Letters, 1990. **31**(2): S. 205-208.
47. Han, S.-Y. und Kim, Y.-A., *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. Tetrahedron, 2004. **60**(11): S. 2447-2467.
48. Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bodi, J., Kimura, T., Tsuji, F.I. und Sakakibara, S., *Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(23): S. 13549-13554.
49. Albericio, F., Lloyd-Williams, P. und Giralt, E., *Convergent solid-phase peptide synthesis*. Methods Enzymol, 1997. **289**: S. 313-36.
50. Lloyd-Williams, P., Albericio, F. und Giralt, E., *Convergent solid-phase peptide-synthesis*. Tetrahedron, 1993. **49**(48): S. 11065-11133.

51. Merrifield, B., *The role of the support in solid phase peptide synthesis*. British Polymer Journal, 1984. **16**(4): S. 173-178.
52. Riniker, B., Florsheimer, A., Fretz, H., Sieber, P. und Kamber, B., *A general strategy for the synthesis of large peptides - the combined solid-phase and solution approach*. Tetrahedron, 1993. **49**(41): S. 9307-9320.
53. Jakubke, H.D. und Kuhl, P., *Proteases as biocatalysts for peptide-synthesis*. Pharmazie, 1982. **37**(2): S. 89-106.
54. Bayer, E., *Towards the chemical synthesis of proteins*. Angewandte Chemie - International Edition, 1991. **30**(2): S. 113-129.
55. Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H.U. und Lau, H., *Über Peptidsynthesen .8. Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten*. Annalen der Chemie - Justus Liebig, 1953. **583**(2): S. 129-149.
56. Brenner, M., Zimmermann, J.P., Wehrmüller, J., Quitt, P., Hartmann, A., Schneider, W. und Beglinger, U., *Aminoacyl-Einlagerung .1. Mitteilung - Definition, Übersicht und Beziehung zur Peptidsynthese*. Helvetica Chimica Acta, 1957. **40**(5): S. 1497-1517.
57. Kemp, D.S., Grattan, J.A. und Reczek, J., *Peptide-bond formation by prior amine capture principle*. Journal of Organic Chemistry, 1975. **40**(23): S. 3465-3466.
58. Liu, C.F. und Tam, J.P., *Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(14): S. 6584-8.
59. Schnölzer, M. und Kent, S.B.H., *Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides - backbone-engineered HIV-protease*. Science, 1992. **256**(5054): S. 221-225.
60. Schnölzer, M. und Kent, S.B.H., *Peptides 1992*. Proceedings of the 22nd European Peptide Symposium, 1993: S. 237.
61. Englebretsen, D.R., Garnham, B.G., Bergman, D.A. und Alewood, P.F., *A novel thioether linker - chemical synthesis of a HIV-1 protease analog by thioether ligation*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(48): S. 8871-8874.
62. Rose, K., *Facile synthesis of homogeneous artificial proteins*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(1): S. 30-33.
63. Rose, K., Vilaseca, L.A., Werlen, R., Meunier, A., Fisch, I., Jones, R.M.L. und Offord, R.E., *Preparation of well-defined protein conjugates using enzyme-assisted reverse proteolysis*. Bioconjugate Chemistry, 1991. **2**(3): S. 154-159.
64. Fisch, I., Kunzi, G., Rose, K. und Offord, R.E., *Site-specific modification of a fragment of a chimeric monoclonal-antibody using reverse proteolysis*. Bioconjugate Chemistry, 1992. **3**(2): S. 147-153.
65. Offer, J., Boddy, C.N.C. und Dawson, P.E., *Extending synthetic access to proteins with a removable acyl transfer auxiliary*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(17): S. 4642-4646.
66. Dawson, P.E., Muir, T.W., Clarklewis, I. und Kent, S.B.H., *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. Science, 1994. **266**(5186): S. 776-779.
67. Quaderer, R., Sewing, A. und Hilvert, D., *Selenocysteine-mediated native chemical ligation*. Helvetica Chimica Acta, 2001. **84**(5): S. 1197-1206.

68. Yan, L.Z. und Dawson, P.E., *Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(4): S. 526-533.
69. Crich, D. und Banerjee, A., *Native chemical ligation at phenylalanine*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(33): S. 10064-10065.
70. Boerema, D.J., Tereshko, V.A. und Kent, S.B.H., *Total synthesis by modern chemical ligation methods and high resolution (1.1 Angstrom) X-ray structure of ribonuclease A*. Biopolymers, 2008. **90**(3): S. 278-286.
71. Bang, D., Pentelute, B.L. und Kent, S.B.H., *Kinetically controlled ligation for the convergent chemical synthesis of proteins*. Angewandte Chemie - International Edition, 2006. **45**(24): S. 3985-3988.
72. Muir, T.W., Sondhi, D. und Cole, P.A., *Expressed protein ligation: a general method for protein engineering*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998. **95**(12): S. 6705-10.
73. H. Staudinger, J.M., *Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine*. Helvetica Chimica Acta, 1919. **2**(1): S. 635-646.
74. Gololobov, Y.G. und Kasukhin, L.F., *Recent advances in the Staudinger reaction*. Tetrahedron, 1992. **48**(8): S. 1353-1406.
75. Saxon, E. und Bertozzi, C.R., *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction*. Science, 2000. **287**(5460): S. 2007-2010.
76. Saxon, E., Armstrong, J.I. und Bertozzi, C.R., *A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds*. Organic Letters, 2000. **2**(14): S. 2141-2143.
77. Soellner, M.B., Dickson, K.A., Nilsson, B.L. und Raines, R.T., *Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(39): S. 11790-11791.
78. Grandjean, C., Boutonnier, A., Guerreiro, C., Fournier, J.M. und Mulard, L.A., *On the preparation of carbohydrate-protein conjugates using the traceless Staudinger ligation*. Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(18): S. 7123-7132.
79. Tam, A., Soellner, M.B. und Raines, R.T., *Water-soluble phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with expressed protein ligation*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(37): S. 11421-11430.
80. Hoff, J.H.v.t., *Über die zunehmende Bedeutung der anorganischen Chemie. Vortrag, gehalten auf der 70. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte zu Düsseldorf*. Zeitschrift für anorganische Chemie, 1898. **18**(1): S. 1-13.
81. Bergmann, M., Fruton, J.S. und Fraenkel-Conrat, H., *On proteolytic enzymes. XV. Regarding the general nature of intracellular proteolytic enzymes*. Journal of Biological Chemistry, 1937. **119**(1): S. 35-46.
82. Bergmann, M. und Fraenkel-Conrat, H., *The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. Synthesis with intracellular enzymes*. Journal of Biological Chemistry, 1937. **119**(2): S. 707-720.
83. Bergmann, M. und Fruton, J.S., *Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin*. Journal of Biological Chemistry, 1938. **124**(1): S. 321-329.

84. Jakubke, H.D., Kuhl, P. und Könnecke, A., *Basic principles of protease-catalyzed peptide-bond formation*. Angewandte Chemie - International Edition, 1985. **24**(2): S. 85-93.
85. Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, T., Mori, K., Nonaka, Y., Kihara, K., Oyama, K., Satoh, H. und Nishimura, S., *Thermolysin-catalyzed condensation-reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl esters*. Tetrahedron Letters, 1979(28): S. 2611-2612.
86. Inouye, K., Watanabe, K., Morihara, K., Tochino, Y., Kanaya, T., Emura, J. und Sakakibara, S., *Enzyme-assisted semisynthesis of human insulin*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(3): S. 751-752.
87. Schellenberger, V. und Jakubke, H.D., *Protease-catalyzed kinetically controlled peptide-synthesis*. Angewandte Chemie - International Edition, 1991. **30**(11): S. 1437-1449.
88. Schechter, I. und Berger, A., *On size of active site in proteases .I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): S. 157-162.
89. Klibanov, A.M., *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature, 2001. **409**(6817): S. 241-246.
90. Schuster, M., Aaviksaar, A. und Jakubke, H.D., *Enzyme-catalyzed peptide-synthesis in ice*. Tetrahedron, 1990. **46**(24): S. 8093-8102.
91. Hänsler, M., Gerisch, S., Rettelbusch, J. und Jakubke, H.D., *Application of immobilized alpha-chymotrypsin to peptide synthesis in frozen aqueous systems*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1997. **68**(2): S. 202-208.
92. Hänsler, M., Wehofsky, N., Gerisch, S., Wissmann, J.D. und Jakubke, H.D., *Reverse catalysis of elastase from porcine pancreas in frozen aqueous systems*. Biological Chemistry, 1998. **379**(1): S. 71-74.
93. Hänsler, M., Wissmann, H.D. und Wehofsky, N., *Enzymatic formation of Glu-Xaa and Asp-Xaa bonds using Glu/Asp-specific endopeptidase from Bacillus licheniformis in frozen aqueous Systems*. Journal of Peptide Science, 2000. **6**(8): S. 366-371.
94. Fennema, O., *Water Relations of Food*. Academic Press, 1974.
95. Ullmann, G., Hänsler, M., Gründer, W., Wagner, M., Hofmann, H.J. und Jakubke, H.D., *Influence of freeze-concentration effect on proteinase-catalysed peptide synthesis in frozen aqueous systems*. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1997. **1338**(2): S. 253-258.
96. Schuster, M., Ullmann, G., Ullmann, U. und Jakubke, H.D., *Chymotrypsin-catalyzed peptide-synthesis in ice - use of unprotected amino-acids as acyl acceptors*. Tetrahedron Letters, 1993. **34**(36): S. 5701-5702.
97. Welton, T., *Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for synthesis and catalysis*. Chemical Reviews, 1999. **99**(8): S. 2071-2083.
98. Wehofsky, N., Wespe, C., Cerovsky, V., Pech, A., Hoess, E., Rudolph, R. und Bordusa, F., *Ionic liquids and proteases: A clean alliance for semisynthesis*. ChemBioChem, 2008. **9**(9): S. 1493-1499.

99. Grünberg, R., Domgall, I., Gunther, R., Rall, K., Hofmann, H.J. und Bordusa, F., *Peptide bond formation mediated by substrate mimetics - Structure-guided optimization of trypsin for synthesis*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(24): S. 7024-7030.
100. Rall, K., *Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese*. Dissertation, 2004.
101. Liebscher, S., *N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen*. Dissertation, 2008.
102. Itoh, K., Sekizaki, H., Toyota, E. und Tanizawa, K., *Methyltrypsin-catalyzed peptide coupling: comparison of alkyl ester and guanidinophenyl ester derivatives as acyl donor component*. Bioorganic Chemistry, 1997. **25**(5-6): S. 307-319.
103. Schellenberger, V., Görner, A., Könnecke, A. und Jakubke, H.D., *Protease-catalyzed peptide synthesis: prevention of side reactions in kinetically controlled reactions*. Journal of Peptide Research, 1991. **4**(5): S. 265-269.
104. Wagner, G. und Horn, H., *Synthesis of antiproteolytically acting arylcarboxylates, alkylcarboxylates and arylsulfonates of amidinophenols*. Pharmazie, 1973. **28**(7): S. 427-431.
105. Schellenberger, V., Jakubke, H.D., Zapevalova, N.P. und Mitin, Y.V., *Protease-catalyzed peptide synthesis using inverse substrates: The influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency*. Biotechnology and Bioengineering, 1991. **38**(1): S. 104-108.
106. Bordusa, F., Ullmann, D., Elsner, C. und Jakubke, H.D., *Substrate mimetic mediated peptide synthesis: An irreversible ligation strategy that is independent of substrate specificity*. Angewandte Chemie - International Edition, 1997. **36**(22): S. 2473-2475.
107. Günther, R., Stein, A. und Bordusa, F., *Investigations on the enzyme specificity of clostripain: A new efficient biocatalyst for the synthesis of peptide isosteres*. Journal of Organic Chemistry, 2000. **65**(6): S. 1672-1679.
108. Wehofsky, N., Thust, S., Burmeister, J., Klusmann, S. und Bordusa, F., *All-D-polypeptides: Novel targets for semisynthesis*. Angewandte Chemie - International Edition, 2003. **42**(6): S. 677-9.
109. Maschmann, E., *Bacteria protease IV: The protease of B. histolyticus*. Biochemische Zeitschrift, 1938. **295**(5/6): S. 391-399.
110. Kocholaty, W., Weil, L. und Smith, L., *Proteinase secretion and growth of Clostridium histolyticum*. Biochemical Journal, 1938. **32**(10): S. 1685-1690.
111. Gilles, A.M., Imhoff, J.M. und Keil, B., *Alpha-clostripain - chemical characterization, activity, and thiol content of the highly active form of clostripain*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(5): S. 1462-1468.
112. Porter, W.H., Cunningham, L.W. und Mitchell, W.M., *Studies on active Site of clostripain - specific inactivation by chloromethyl ketone derived from alpha-N-Tosyl-L-Lysine*. Journal of Biological Chemistry, 1971. **246**(24): S. 7675-7682.
113. Ogle, J.D. und Tytell, A.A., *The Activity of Clostridium histolyticum Proteinase on synthetic substrates*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1953. **42**(2): S. 327-336.

114. Gros, P. und Labouesse, B., *La Clostripaine, protease de Clostridium histolyticum .2. Specificite*. Bulletin de la Societe de Chimie Biologique, 1960. **42**(5-6): S. 559-568.
115. Labouesse, B. und Gros, P., *La Clostripaine, protease de Clostridium-histolyticum .1. Purification et activation par les thiols*. Bulletin de la Societe de Chimie Biologique, 1960. **42**(5-6): S. 543-558.
116. Bergmann, M., Fruton, J.S. und Pollok, H., *The specificity of trypsin*. Journal of Biological Chemistry, 1939. **127**(3): S. 643-648.
117. Mitchell, W.M., *Hydrolysis at arginylproline in polypeptides by clostridiopeptidase B*. Science, 1968. **162**(3851): S. 374-375.
118. Kim, C.K., Lee, S.Y., Kwon, O.J., Lee, S.M., Nah, S.Y. und Jeong, S.M., *Secretory expression of active clostripain in Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2007. **131**(3): S. 346-352.
119. Homandberg, G.A. und Laskowski, M., *Enzymatic resynthesis of the hydrolyzed peptide bond(s) in ribonuclease-S*. Biochemistry, 1979. **18**(4): S. 586-592.
120. Bordusa, F., Ullmann, D. und Jakubke, H.D., *Subsite specificity studies on the unusual cysteine protease clostripain: Charged residues in the P-3 position indicate a narrow subsite region*. Biological Chemistry, 1997. **378**(10): S. 1193-1198.
121. Wehofsky, N., Loser, R., Buchynskyy, A., Welzel, P. und Bordusa, F., *Synthesis of neo-peptidoglycans: An unexpected activity of proteases*. Angewandte Chemie - International Edition, 2002. **41**(15): S. 2735-8.
122. Yoo, B. und Kirshenbaum, K., *Protease-mediated ligation of abiotic oligomers*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(49): S. 17132-3.
123. Ghuyssen, J.M., *Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism*. Bacteriological Reviews, 1968. **32**(4P2): S. 425-464
124. Nagata, Y., Fujiwara, T., Kawaguchi-Nagata, K., Fukumori, Y. und Yamanaka, T., *Occurrence of peptidyl D-amino acids in soluble fractions of several eubacteria, archaea and eukaryotes*. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 1998. **1379**(1): S. 76-82.
125. Zawadzke, L.E. und Berg, J.M., *The structure of a centrosymmetric protein crystal*. Proteins, 1993. **16**(3): S. 301-5.
126. Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ripellino, J.A., Li, Y.S., Schmidt, S.D., Mathews, P.M., Fryer, J.D., Holtzman, D.M., Sigurdsson, E.M. und Wisniewski, T., *A synthetic peptide blocking the apolipoprotein e/beta-amyloid binding mitigates beta-amyloid toxicity and fibril formation in vitro and reduces beta-amyloid plaques in transgenic mice*. American Journal of Pathology, 2004. **165**(3): S. 937-948.
127. Pappenheimer, J.R., Karnovsky, M.L. und Maggio, J.E., *Absorption and excretion of undegradable peptides: Role of lipid solubility and net charge*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997. **280**(1): S. 292-300.
128. Welch, B.D., VanDemark, A.P., Heroux, A., Hill, C.P. und Kay, M.S., *Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(43): S. 16828-16833.
129. Vater, A. und Klussmann, S., *Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects*. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2003. **6**(2): S. 253-261.

130. Zawadzke, L.E. und Berg, J.M., *A racemic protein*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(10): S. 4002-4003.
131. Milton, R.C.D., Milton, S.C.F. und Kent, S.B.H., *Total chemical synthesis of a D-enzyme - the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate-specificity*. Science, 1992. **256**(5062): S. 1445-1448.
132. Pentelute, B.L., Gates, Z.P., Dashnau, J.L., Vanderkooi, J.M. und Kent, S.B.H., *Mirror image forms of snow flea antifreeze protein prepared by total chemical synthesis have identical antifreeze activities*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(30): S. 9702-9707.
133. Pentelute, B.L., Gates, Z.P., Tereshko, V., Dashnau, J.L., Vanderkooi, J.M., Kossiakoff, A.A. und Kent, S.B.H., *X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(30): S. 9695-9701.
134. Price, S. und Nagai, K., *Secrets of RNA folding revealed*. Structure, 1996. **4**(10): S. 1129-1132.
135. Cech, T.R., Zaug, A.J. und Grabowski, P.J., *In vitro splicing of the ribosomal-RNA precursor of Tetrahymena - Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence*. Cell, 1981. **27**(3): S. 487-496.
136. Hermann, T. und Patel, D.J., *Biochemistry - Adaptive recognition by nucleic acid aptamers*. Science, 2000. **287**(5454): S. 820-825.
137. Sullenger, B.A. und Gilboa, E., *Emerging clinical applications of RNA*. Nature, 2002. **418**(6894): S. 252-258.
138. Tuerk, C. und Gold, L., *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment - RNA ligands to Bacteriophage-T4 DNA-polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): S. 505-510.
139. Ellington, A.D. und Szostak, J.W., *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): S. 818-822.
140. Watson, S.R., Chang, Y.F., O'Connell, D., Weigand, L., Ringquist, S. und Parma, D.H., *Anti-L-Selectin aptamers: Binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and Activity against an intravascular Target in vivo*. Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 2000. **10**(2): S. 63-75.
141. Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V.A. und Furste, J.P., *Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(9): S. 1116-1119.
142. Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A. und Furste, J.P., *Mirror-image RNA that binds D-adenosine*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(9): S. 1112-1115.
143. Wlotzka, B., Leva, S., Eschgfäller, B., Burmeister, J., Kleinjung, F., Kaduk, C., Muhn, P., Hess-Stump, H. und Klussmann, S., *In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: An example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(13): S. 8898-8902.

144. Becskei, C., Bilik, K.U., Klussmann, S., Jarosch, F., Lutz, T.A. und Riediger, T., *The anti-Ghrelin Spiegelmer NOX-B11-3 blocks Ghrelin- but not fasting-induced neuronal activation in the hypothalamic arcuate nucleus*. Journal of Neuroendocrinology, 2008. **20**(1): S. 85-92.
145. Goodwin, G.H., Sanders, C. und Johns, E.W., *New group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino-acids*. European Journal of Biochemistry, 1973. **38**(1): S. 14-19.
146. Bustin, M. und Reeves, R., *High-mobility-group chromosomal proteins: Architectural components that facilitate chromatin function*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 54, 1996. **54**: S. 35-100.
147. Bustin, M., *Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal Proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 2001. **26**(3): S. 152-153.
148. Johnson, K.R., Lehn, D.A., Elton, T.S., Barr, P.J. und Reeves, R., *Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group protein HMG-I(Y)*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(34): S. 18338-18342.
149. Johnson, K.R., Lehn, D.A. und Reeves, R., *Alternative processing of messenger-RNAs encoding mammalian chromosomal high mobility group proteins HMG-I and HMG-Y*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(5): S. 2114-2123.
150. Friedmann, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. und Reeves, R., *Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein Gene*. Nucleic Acids Research, 1993. **21**(18): S. 4259-4267.
151. Ishwad, C.S., Shriver, M.D., Lassige, D.M. und Ferrell, R.E., *The high mobility group I-C gene (HMGI-C): Polymorphism and genetic localization*. Human Genetics, 1997. **99**(1): S. 103-105.
152. Strauss, F. und Varshavsky, A., *A protein binds to a satellite DNA repeat at 3 specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome*. Cell, 1984. **37**(3): S. 889-901.
153. Solomon, M.J., Strauss, F. und Varshavsky, A., *A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of 6 at base-pairs in duplex DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(5): S. 1276-1280.
154. Reeves, R. und Beckerbauer, L., *HMGI/Y proteins: Flexible regulators of transcription and chromatin structure*. Biochimica et Biophysica Acta - Gene, Structure and Expression, 2001. **1519**(1-2): S. 13-29.
155. Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S., Evans, J.N.S., Reeves, R., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M., *The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif*. Nature Structural Biology, 1997. **4**(8): S. 657-665.
156. Harrer, M., Luhrs, H., Bustin, M., Scheer, U. und Hock, R., *Dynamic interaction of HMGAla proteins with chromatin*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(16): S. 3459-3471.
157. Sgarra, R., Tessari, M.A., Di Bernardo, J., Rustighi, A., Zago, P., Liberatori, S., Armini, A., Bini, L., Giancotti, V. und Manfioletti, G., *Discovering high mobility group A molecular partners in tumour cells*. Proteomics, 2005. **5**(6): S. 1494-1506.

158. Reeves, R., *Molecular biology of HMGA proteins: Hubs of nuclear function*. Gene, 2001. **277**(1-2): S. 63-81.
159. Zhang, Q.C. und Wang, Y.S., *Homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) phosphorylates HMGA1a at Ser-35, Thr-52, and Thr-77 and modulates its DNA binding affinity*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(12): S. 4711-4719.
160. Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B.M., Fidanza, V., Giancotti, V., Santoro, M., Simeone, A. und Fusco, A., *High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development*. Oncogene, 1996. **13**(11): S. 2439-2446.
161. Pierantoni, G.M., Agosti, V., Fedele, M., Bond, H., Caliendo, I., Chiappetta, G., Lo Coco, F., Pane, F., Turco, M.C., Morrone, G., Venuta, S. und Fusco, A., *High mobility group A1 proteins are overexpressed in human leukaemias*. Biochemical Journal, 2003. **372**(1): S. 145-150.
162. Chiappetta, G., Bandiera, A., Berlingieri, M.T., Visconti, R., Manfioletti, G., Battista, S., Martinezello, F.J., Santoro, M., Giancotti, V. und Fusco, A., *The expression of the high mobility group HMGI (Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias*. Oncogene, 1995. **10**(7): S. 1307-1314.
163. Fedele, M., Bandiera, A., Chiappetta, G., Battista, S., Viglietto, G., Manfioletti, G., Casamassimi, A., Santoro, M., Giancotti, V. und Fusco, A., *Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins*. Cancer Research, 1996. **56**(8): S. 1896-1901.
164. Tamimi, Y., Vanderpoel, H.G., Denyn, M.M., Umbas, R., Karthaus, H.F.M., Debruyne, F.M.J. und Schalken, J.A., *Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high-grade prostatic-cancer determined by in-situ hybridization*. Cancer Research, 1993. **53**(22): S. 5512-5516.
165. Bandiera, A., Bonifacio, D., Manfioletti, G., Mantovani, F., Rustighi, A., Zanconati, F., Fusco, A., Di Bonito, L. und Giancotti, V., *Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix*. Cancer Research, 1998. **58**(3): S. 426-431.
166. Flohr, A.M., Rogalla, P., Bonk, U., Puettmann, B., Buerger, H., Gohla, G., Packeisen, J., Wosniok, W., Loeschke, S. und Bullerdiek, J., *High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade*. Histology and Histopathology, 2003. **18**(4): S. 999-1004.
167. Abe, N., Watanabe, T., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Uchimura, H., Fujioka, Y., Chiappetta, G., Fusco, A. und Atomi, Y., *Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins*. Cancer Research, 2000. **60**(12): S. 3117-3122.
168. Fusco, A. und Fedele, M., *Roles of HMGA proteins in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(12): S. 899-910.
169. Liao, S.S., Rocha, F., Matros, E., Redston, M. und Whang, E., *High mobility group AT-Hook 1 (HMGA1) is an independent prognostic factor and novel therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer, 2008. **113**(2): S. 302-314.

170. Asano, Y., Ito, H., Dairi, T. und Kato, Y., *An alkaline D-stereospecific endopeptidase with beta-lactamase activity from Bacillus cereus*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(47): S. 30256-30262.
171. Wehofsky, N., Pech, A., Liebscher, S., Schmidt, S., Komeda, H., Asano, Y. und Bordusa, F., *D-amino acid specific proteases and native all-L-proteins: A convenient combination for semisynthesis*. Angewandte Chemie - International Edition, 2008. **47**(29): S. 5456-5460.
172. Komeda, H. und Asano, Y., *Synthesis of phenylalanine oligopeptides catalyzed by alkaline peptidase from Bacillus cereus DF4-B*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1999. **6**(3): S. 379-386.
173. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. und White, F.H., *Kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of reduced polypeptide chain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1961. **47**(9): S. 1309-14.
174. Schmid, F.X., Grafl, R., Wrba, A. und Beintema, J.J., *Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(4): S. 872-876.
175. Freedman, R.B., Hirst, T.R. und Tuite, M.F., *Protein disulfide-isomerase - Building bridges in protein-folding*. Trends in Biochemical Sciences, 1994. **19**(8): S. 331-336.
176. Givol, D., Anfinsen, C.B. und Goldberger, R.F., *Oxidation and disulfide interchange in reactivation of reduced ribonuclease*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(9): S. 3114-16.
177. Fischer, G., Bang, H. und Mech, C., *Detection of enzyme catalysis for cis-trans-isomerization of peptide-bonds using proline-containing peptides as substrates*. Biomedica Biochimica Acta, 1984. **43**(10): S. 1101-1111.
178. Fischer, G., Wittmannliebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. und Schmid, F.X., *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. Nature, 1989. **337**(6206): S. 476-478.
179. Brandts, J.F., Halvorson, H.R. und Brennan, M., *Consideration of possibility that slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues*. Biochemistry, 1975. **14**(22): S. 4953-4963.
180. Harding, M.W., Galat, A., Ühling, D.E. und Schreiber, S.L., *A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase*. Nature, 1989. **341**(6244): S. 758-760.
181. Harrison, R.K. und Stein, R.L., *Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding-protein - Evidence for the existence of a family of distinct enzymes*. Biochemistry, 1990. **29**(16): S. 3813-3816.
182. Schreiber, S.L. und Crabtree, G.R., *The mechanism of action of cyclosporine a and FK506*. Immunology Today, 1992. **13**(4): S. 136-142.
183. Lu, K.P., Hanes, S.D. und Hunter, T., *A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis*. Nature, 1996. **380**(6574): S. 544-547.
184. Shaw, P.E., *Peptidyl-prolyl isomerases: A new twist to transcription*. Embo Reports, 2002. **3**(6): S. 521-526.

185. Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K. und Fischer, G., *A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli*. Febs Letters, 1994. **343**(1): S. 65-69.
186. Rahfeld, J.U., Rücknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. und Fischer, G., *Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases - Amino acid sequence and recombinant production of Parvulin*. Febs Letters, 1994. **352**(2): S. 180-184.
187. Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M. und Kontinen, V.P., *Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the Parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(18): S. 19302-19314.
188. Eisenstark, A., Miller, C., Jones, J. und Leven, S., *Escherichia coli genes involved in cell-Survival during dormancy - Role of oxidative stress*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **188**(3): S. 1054-1059.
189. Haandrikman, A.J., Kok, J., Laan, H., Soemitro, S., Ledebroer, A.M., Konings, W.N. und Venema, G., *Identification of a gene required for maturation of an extracellular Lactococcal serine proteinase*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(5): S. 2789-2794.
190. Hani, J., Stumpf, G. und Domdey, H., *Ptf1 encodes an essential protein in Saccharomyces cerevisiae, which shows strong homology with a new putative family of PPIases*. Febs Letters, 1995. **365**(2-3): S. 198-202.
191. Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M.H. und Lu, K.P., *Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules*. Science, 1999. **283**(5406): S. 1325-1328.
192. Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. und Schmid, F.X., *Catalysis of protein folding by Parvulin*. Journal of Molecular Biology, 1997. **273**(3): S. 752-762.
193. Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M.H., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G. und Lu, K.P., *Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins*. Molecular Cell, 2000. **6**(4): S. 873-883.
194. Liou, Y.-C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.-X., Huang, H.-K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T. und Lu, K.P., *Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration*. Nature, 2003. **424**(6948): S. 556-561.
195. Kuhlewein, A., Voll, G., Alvarez, B.H., Kessler, H., Fischer, G., Rahfeld, J.U. und Gemmecker, G., *Solution Structure of Escherichia coli Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases*. Protein Science, 2004. **13**(9): S. 2378-2387.
196. Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G. und Fischer, G., *Selective inactivation of Parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone*. Biochemistry, 1998. **37**(17): S. 5953-5960.
197. Schelbert, B., *Untersuchungen zur Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Parvulin aus Escherichia coli und dem homologen Protein PTF1 aus Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, 1999.

198. Ellis, H.R. und Poole, L.B., *Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, 1997. **36**(43): S. 13349-13356.
199. Jacobson, F.S., Morgan, R.W., Christman, M.F. und Ames, B.N., *An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage - Purification and properties*. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**(3): S. 1488-1496.
200. Cha, M.-K., Kim, H.-K. und Kim, I.-H., *Thioredoxin-linked "Thiol Peroxidase" from periplasmic space of Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(48): S. 28635-28641.
201. Backes, B.J. und Ellman, J.A., *An alkanesulfonamide "safety-catch" linker for solid-phase synthesis*. *Journal of Organic Chemistry*, 1999. **64**(7): S. 2322-2330.
202. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K. und Grell, E., *A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesized on 2-Chlorotriyl Chloride Resin*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1994(22): S. 2559-2560.
203. Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. und Tanizawa, K., *Synthesis and tryptic hydrolysis of p-Guanidinophenyl esters derived from amino acids and peptides*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1996. **44**(8): S. 1577-1579.
204. Beck, W.a.J., G., *Convenient reduction of S-oxides in synthetic peptides, lipopeptides and peptide libraries* *Letters in Peptide Science*, 1994. **1**(1): S. 31-37.
205. Kiso, Y., Ukawa, K. und Akita, T., *Efficient removal of N-Benzyloxycarbonyl group by a push-pull mechanism using Thioanisole-Trifluoroacetic acid, exemplified by a synthesis of Met-Enkephalin*. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 1980(3): S. 101-102.
206. Backes, B.J., Virgilio, A.A. und Ellman, J.A., *Activation method to prepare a highly reactive Acylsulfonamide "Safety-catch" linker for solid-phase synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(12): S. 3055-3056.
207. Bódi, J., Süli-Vargha, H., Ludányi, K., Vékey, K. und Orosz, G., *New strategy for the synthesis of large peptides as applied to the C-terminal Cysteine-rich 41 amino acid fragment of the mouse Agouti protein*. *Tetrahedron Letters*, 1997. **38**(18): S. 3293-3296.
208. duVigneaud, V. und Meyer, C.E., *The temporary formation of the azlactone ring in the racemization of acyl derivatives of amino acids with acetic anhydride*. *Journal of Biological Chemistry*, 1932. **99**(1): S. 143-151.
209. Barlos, K., Gatos, D. und Schäfer, W., *Synthesis of prothymosin alpha (Pro T-alpha) - A protein consisting of 109 amino acid residues*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 1991. **30**(5): S. 590-593.
210. Pöhlmann, A., *Untersuchungen zur Intein-vermittelten Semisynthese modifizierter Proteine*. Dissertation, 2006.
211. Slama-Schwok, A., Zakrzewska, K., Leger, G., Leroux, Y., Takahashi, M., Kas, E. und Debey, P., *Structural changes induced by binding of the high mobility group I protein to a mouse satellite DNA sequence*. *Biophysical Journal*, 2000. **78**(5): S. 2543-2559.

212. Bayer, E. und Rapp, W., *Chemistry of peptides and protein*. DeGruyter, Berlin, 1986: S. 3-7.
213. Mutter, M., Nefzi, A., Sato, T., Sun, X., Wahl, F. und Wöhr, T., *Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides*. Journal of Peptide Research, 1995. **8**(3): S. 145-53.
214. Bordusa, F., *Substrate mimetics in protease catalysis: Characteristics, kinetics, and synthetic utility*. Current Protein & Peptide Science, 2002. **3**(2): S. 159-180.
215. Bordusa, F., *Proteases in organic synthesis*. Chemical Reviews, 2002. **102**(12): S. 4817-4867.
216. Hänsler, M., Keilhack, H. und Jakubke, H.D., *The application of the cysteine protease Ficin in peptide-synthesis in frozen aqueous-solution*. Pharmazie, 1995. **50**(3): S. 184-187.

8. Danksagung

Prof. Dr. Gunter Fischer danke ich recht herzlich für die Möglichkeit, die Synthesen und Experimente in seinen Laboren durchführen zu können sowie für die Bereitstellung von optimalen Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Frank Bordusa danke ich für die Überlassung der spannenden und fordernden Themen. Weiterhin bin ich ihm für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit zur Präsentation der erhaltenen Ergebnisse auf Symposien dankbar.

Prof. Dr. Yoshuhisa Asano danke ich für die Bereitstellung der Alkalischen D-Peptidase aus *Bacillus cereus* (ADP).

Bei Frau Dr. Nicole Wehofsky und Stephanie Schmidt möchte ich mich besonders hinsichtlich der Zusammenarbeit im ADP-Projekt bedanken. Weiterhin bin ich Frau Dr. Nicole Wehofsky für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft auf wissenschaftlicher als auch menschlicher Ebene dankbar.

Dr. Sven Klussmann danke ich für sein stetes Interesse am Voranschreiten der Synthese des all-D-HMGA 1b Proteins.

Dem Sonderforschungsbereich 610 „Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz“ danke ich für die finanzielle Unterstützung sowie der Möglichkeit der Teilnahme an Doktoranden-Workshops.

Dr. Sandra und Dr. Markus Liebscher danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme von CD-Spektren und den Tris-Tricin-Gelen sowie ihrer steten Diskussionsbereitschaft und kurzweiligen Stunden nach dem Laboralltag.

Mein Dank gilt weiterhin:

Dr. Angelika Schierhorn und Christina Gersching für die Aufnahme einer Vielzahl Massenspektren,

Dr. Carmen Mrestani-Claus und Dr. Christian Lücke bin ich dankbar für die Analyse von Substanzen mittels Kernresonanzspektroskopie,

Stephanie Kaufmann, Karin Jentzsch und Ilona Kunze für die schönen Stunden im Labor, ihre praktischen Tipps, aufmunternde Worte und stete Hilfsbereitschaft sowie den Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und der AG Bordusa für das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern und Großeltern gilt mein besonderer Dank für die immerwährende Unterstützung während der Promotion auch in finanzieller Hinsicht.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig sowie ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Lebenslauf

Name: Pech
Vorname: Andreas
Geburtsdatum: 26.06.1977
Geburtsort: Lauchhammer
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1991 POS „Arthur Wölk“ Senftenberg
1991-1997 Gymnasium Senftenberg, Abschluss: Abitur

Wehrdienst

06/1997-01/1998 Heeresfliegerwaffenschule Bückeburg
02/1998-08/1998 Heeresfliegeraufklärungs- und Verbindungsstaffel 400 Cottbus

Studium

10/1998-09/2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle/ Wittenberg
Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Synthese von
Peptidthioestern am polymeren Träger“ in der Max-Planck-
Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung unter Anleitung
von Prof. Dr. Frank Bordusa

10/2003-01/2008 Promotionsarbeit an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie
der Proteinfaltung mit dem Thema „Einsatz zweier nativer Proteasen
zur Synthese von Proteinen in der L- und D-Konfiguration“ unter
Anleitung von Prof. Dr. Frank Bordusa

02/2008- Anstellung als Wissenschaftler in der NOXXON-Pharma AG Berlin