

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(doctor rerum naturalium)

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Synthese und Charakterisierung DNA-bindender Peptide

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Sven David Wilking

aus Lübbecke

Bielefeld 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Anselmetti

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2006

Die Konsequenz und der Kompromiß sind Todfeinde auf Lebenszeit
Erich Limpach

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis März 2005 unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald
in der Arbeitsgruppe „Organische und Bioorganische Chemie“ an der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald für das Überlassen der interessanten Aufgabenstellung, die Möglichkeit selbstständig zu Arbeiten und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Dario Anselmetti, HD Dr. Anke Becker und PD Dr. Robert Ros danke ich für viele interessante Diskussionen. Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe OC III möchte ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die fachliche Diskussionen und Anregungen danken.

Bei Dr. Rainer Eckel bedanke ich mich für die Durchführung der AFM-Messungen und vielen Anregungen und Diskussionen. Bei Dr. Birgit Baumgarth bedanke ich mich für Hilfe bei der PCR und für die Diskussionen über die Biologie der verwendeten Systeme.

Bei Dr. Zsuzsa Majer bedanke ich mich für die Messung erster CD-Spektren und ausführliche Diskussionen.

Bei Thomas Huber bedanke ich mich für NMR-Messungen und das Molecular Modelling, für weitere NMR-Messungen danke ich Gerd Lipinski und Peter Mester. Bei Dr. Matthias Letzel bedanke ich mich für die Anfertigung von ESI-Spektren und die Unterstützung am MALDI-ToF-MS. Bei Dr. Kai Jansen bedanke ich mich für die Bereitstellung des *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan, bei Dr. Jovita Juodaityte für die des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanins. Bei Dr. Jörg Schröder bedanke ich mich für das Molecular Modelling.

Bei Carsten Funke möchte ich mich für die im Rahmen eines Blockpraktikums geleistete Arbeit bedanken. Bei Tanja Beschnitt möchte ich mich für die Durchführung der PCR's bedanken. Bei Claudia Ruwe bedanke ich mich für die geleistete Arbeit und die zuverlässige Hilfe. Bei Marco Wißbrock möchte ich mich für die Hilfe mit dem technischen Material und viele Diskussionen bedanken.

Bei Anke Nieß bedanke ich mich für ihre Arbeit, ihre Geduld und ihre ständige Hilfe im Labor.

Mein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

R. Eckel, S.D. Wilking, A. Becker, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, Single-Molecule Experiments in Synthetic Biology: An Approach to the Affinity Ranking of DNA-binding Peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 3921.

Weitere Publikationen:

M. Jost, J.-C. Greie, N. Stemmer, S.D. Wilking, K. Altendorf, N. Sewald, The First Total Synthesis of Efrapeptin C, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 4267.

R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S.D. Wilking, N. Sewald, D. Anselmetti, Identification of Binding Mechanisms in Single Molecule-DNA Complexes, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1968.

R. Ros, R. Eckel, F. Bartels, A. Sischka, B. Baumgarth, S.D. Wilking, A. Pühler, N. Sewald, A. Becker, D. Anselmetti, Single molecule force spectroscopy on ligand-DNA complexes: from molecular binding mechanisms to biosensor applications, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 5.

S.D. Wilking, N. Sewald, Solid Phase Synthesis of Amphiphilic Helical Peptides, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 109.

A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S.D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 404.

Posterpräsentationen:

6. German Peptide Symposium 2003:

S.D. Wilking, R. Eckel, R. Ros, A. Ros, D. Anselmetti, N. Sewald, Synthesis and first AFM studies of helical DNA-binding model peptides and a DNA-binding fragment of PhoB [*E. coli*].

3. International and 28. European Peptide Symposium 2004:

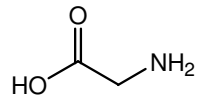
S.D. Wilking, R. Eckel, R. Ros, A. Ros, D. Anselmetti, N. Sewald, Sequence-dependent interaction between amphiphilic helical peptides and DNA.

7. German Peptide Symposium 2005:

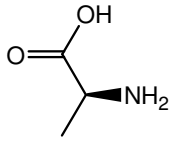
S.D. Wilking, R. Eckel, B. Baumgarth, R. Ros, A. Ros, A. Becker, D. Anselmetti, N. Sewald, Sequence-dependent interaction between amphiphilic helical peptides and DNA.

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

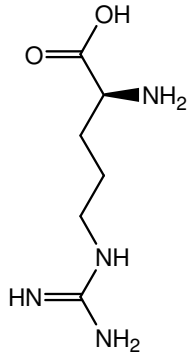
Struktur der DNA-kodierten α -Aminosäuren



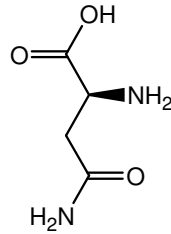
Glycin



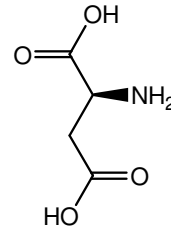
L-Alanin



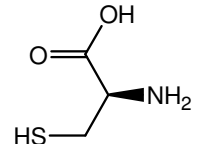
L-Arginin



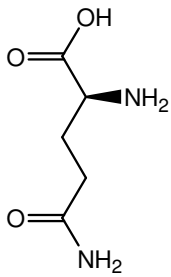
L-Asparagin



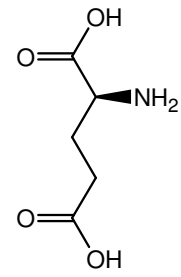
L-Asparaginsäure



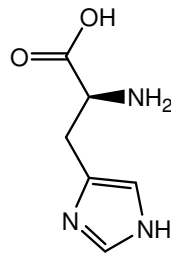
L-Cystein



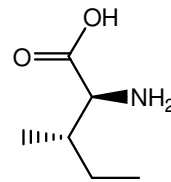
L-Glutamin



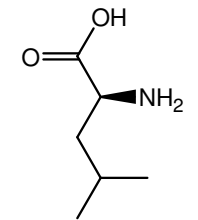
L-Glutaminsäure



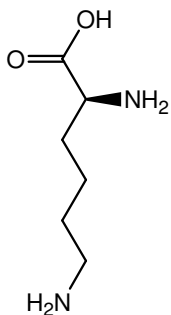
L-Histidin



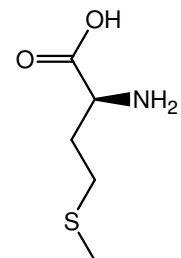
L-Isoleuzin



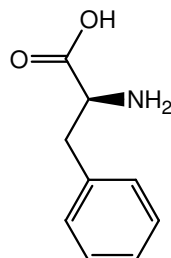
L-Leuzin



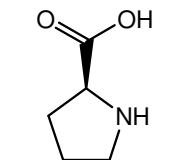
L-Lysin



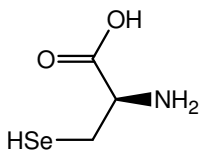
L-Methionin



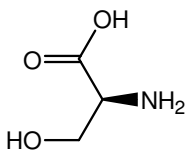
L-Phenylalanin



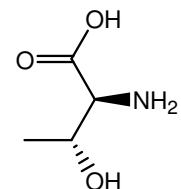
L-Prolin



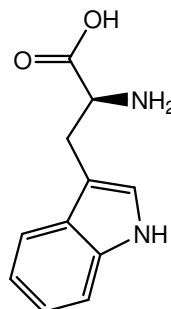
L-Selenocystein



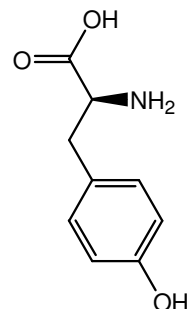
L-Serin



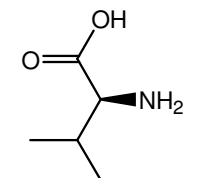
L-Threonin



L-Tryptophan



L-Tyrosin



L-Valin

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- |
| A | Adenin |
| A | Absorption |
| Ac | Acetyl- |
| AFM | <i>atomic force microscope</i> , Rasterkraft-Mikroskop |
| ATR | <i>attenuated total reflection</i> , abgeschwächte Totalreflexion |
| bp | <i>base pairs</i> (Basenpaare) |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl- |
| BOP | Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat |
| Bzl | Benzyl- |
| C | Cytosin |
| CD | Zirkulardichroismus |
| d | Duplett |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DCC | <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DVB | Divinylbenzol |
| EDC | 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid |
| EDT | Ethandithiol |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay(s), Gelretardationsexperimente |
| EPS | Exopolysaccharid(e) |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| Et | Ethyl |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie |

| | |
|----------------|---|
| G | Guanin |
| HATU | 1-[Bis(dimethylamino)methyl]yl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-oxid Hexafluorophosphat |
| HBTU | 1-[Bis(dimethylamino)methyl]yl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid Hexafluorophosphat |
| HFIP | Hexafluorisopropanol |
| Hmb | <i>N</i> -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl) |
| HMPT | Hexamethylphosphorsäuretriamid |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol |
| HOBt | 1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HTH | <i>helix turn helix</i> |
| IR | Infrarot |
| k_a | kinetische Assoziationskonstante |
| K_A | Assoziationskonstante (Gleichgewicht) |
| k_d | kinetische Dissoziationskonstante |
| K_D | Dissoziationskonstante (Gleichgewicht) |
| MALDI | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation |
| Me | Methyl- |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektroskopie |
| NMM | 4-Methylmorpholin |
| NMP | 1-Methyl-2-pyrrolidon |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> (magnetische Kernresonanz) |
| Nuc | Nucleophil |
| <i>O</i> -HATU | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat |
| OR | optische Rotation |
| ORD | <i>optical rotary dispersion</i> |
| <i>O</i> -TBTU | <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluoroborat |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-Schutzgruppe |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| PE | Petrolether |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Pip | Piperidin |
| pSG | permanente Schutzgruppe |

| | |
|-----------------|---|
| PyBOB | Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat |
| q | quartär |
| Qxc | Chinoxaloyl- |
| Rf | Retentionsfaktor |
| RP | <i>reverse phase</i> (Umkehrphasen) |
| RU | <i>response unit(s)</i> |
| s | Singulett |
| SA | Streptavidin |
| SC | Safety-Catch |
| SG | Schutzgruppe |
| SPPS | <i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese) |
| SPR | <i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz) |
| ssDNA | <i>single-stranded</i> Desoxyribonukleinsäure |
| T | Thymin |
| t | Triplett |
| TBAF | Tetra-n-butylammoniumfluorid |
| TBTU | 1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid Hexafluorophosphat |
| ^t Bu | <i>tert</i> -Butyl- |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFE | Trifluorethanol |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIPS | Triisopropylsilan |
| TMP | Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin) |
| ToF | Time of Flight |
| TR | Totalreflexion |
| T _R | Retentionszeit |
| Trt | Trityl- |
| tSG | temporäre Schutzgruppe |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Allgemeiner Teil..... | 3 |
| 2.1 DNA-bindende Proteine..... | 3 |
| 2.1.1 Allgemein..... | 3 |
| 2.1.1.1 Helix-Turn-Helix Proteine..... | 7 |
| 2.1.1.2 Zink-koordinierende Proteine..... | 8 |
| 2.1.1.3 Proteine vom Zipper-Typ..... | 9 |
| 2.1.1.4 Andere α -helicale Proteine..... | 9 |
| 2.1.1.5 β -Faltblatt Proteine..... | 10 |
| 2.1.1.6 β -Hairpin/Band-Proteine..... | 10 |
| 2.1.1.7 Andere Proteine..... | 11 |
| 2.1.1.8 Enzyme..... | 11 |
| 2.1.2 Modellsysteme..... | 12 |
| 2.1.2.1 Kontrolle der Synthese von Exopolysacchariden..... | 12 |
| 2.1.2.1.1 Allgemein..... | 12 |
| 2.1.2.1.2 Der Transkriptionsaktivator ExpG..... | 14 |
| 2.1.2.1.3 Der Transkriptionsaktivator PhoB..... | 14 |
| 2.1.3 Interkalatoren..... | 19 |
| 2.1.3.1 Allgemein..... | 19 |
| 2.1.3.2 Triostin A und TANDEM..... | 19 |
| 2.2 Peptide..... | 22 |
| 2.3 Peptidsynthese..... | 24 |
| 2.3.1 Einführung..... | 24 |
| 2.3.2 Lösungssynthese..... | 25 |
| 2.3.3 Festphasensynthese..... | 25 |
| 2.3.4 Kupplungsreagenzien..... | 28 |
| 2.3.5 Schutzgruppen..... | 31 |
| 2.3.5.1 Boc / Bzl-Schutzgruppenstrategie..... | 32 |
| 2.3.5.2 Fmoc / ^t Bu-Schutzgruppenstrategie..... | 33 |
| 2.3.6 Harze für die Festphasensynthese..... | 34 |
| 2.3.6.1 Safety-catch-Harze..... | 36 |
| 2.4 Photoschaltbare Peptide..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1 Einleitung..... | 38 |
| 2.4.2 Photoschalter..... | 38 |
| 2.4.3 Azobenzol..... | 39 |
| 2.5 Oberflächenplasmonresonanz..... | 42 |
| 2.5.1 Einleitung..... | 42 |
| 2.5.2 Physik der Oberflächenplasmonresonanz..... | 42 |
| 2.5.3 Anwendung der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie..... | 47 |
| 2.5.3.1 Einleitung..... | 47 |
| 2.5.3.2 Immobilisierung..... | 48 |
| 2.5.3.3 Massentransfereffekte und weitere Probleme..... | 50 |
| 2.5.3.4 Datenaufbereitung..... | 52 |
| 2.5.3.5 Datenanalyse..... | 53 |
| 2.6 CD-Spektroskopie..... | 56 |
| 2.6.1 Einleitung..... | 56 |
| 2.6.2 Physik der CD-Spektroskopie..... | 56 |
| 2.6.3 Anwendung der CD-Spektroskopie..... | 59 |
| 2.7 Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie..... | 68 |
| 2.7.1 Einleitung..... | 68 |
| 2.7.2 Kraftmikroskopie..... | 68 |
| 2.7.3 Kraftspektroskopie..... | 69 |
| 2.7.4 Anwendungen..... | 71 |
| 2.7.4.1 Einleitung..... | 71 |
| 2.7.4.2 Anwendungen der Kraftmikroskopie..... | 71 |
| 2.7.4.3 Anwendungen der Kraftspektroskopie..... | 72 |
| 3. Aufgabenstellung..... | 74 |
| 4. Spezieller Teil..... | 75 |
| 4.1 Der Transkriptionsaktivator PhoB und Mutanten..... | 75 |
| 4.1.1 Einleitung..... | 75 |
| 4.1.2 Synthesen..... | 76 |
| 4.1.2.1 Einleitung..... | 76 |
| 4.1.2.2 Versuch der Synthese des PhoB(190-209)Linker am Safety-catch-Harz..... | 77 |
| 4.1.2.3 Versuch der Synthese des PhoB(190-209)Linker [<i>S. meliloti</i>] mittels Fragmentkondensation..... | 78 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2.4 Versuch der Synthese des PhoB(190-209) [<i>S. meliloti</i>] am 2Cl-Trt-Harz mit anschließender C-terminaler Funktionalisierung..... | 81 |
| 4.1.2.5 Synthese des PhoB(190-209)Linker am 2Cl-Trt-Harz..... | 81 |
| 4.1.2.5.1 Kondensation von Fmoc-Leu-OH mit <i>N-tert</i> - Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe..... | 82 |
| 4.1.2.5.2.1 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Leu-Linker..... | 82 |
| 4.1.2.5.2.2 Kondensation von Fmoc-Ser(Bzl)-OH mit <i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl-1,8- diamino 3,6-dioxaoctan und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe..... | 83 |
| 4.1.2.5.2.3 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Ser(Bzl)-Linker..... | 83 |
| 4.1.2.5.2.4 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Gly-Linker..... | 84 |
| 4.1.2.5.2.5 Synthese der DNA-bindenden Epitope aus PhoB [<i>S. meliloti</i>], PhoB [<i>E. coli</i>] und der V190M-Mutante des PhoB [<i>E. coli</i>] am 2Cl-Trt-Harz..... | 84 |
| 4.1.2.5.2.6 Acetylierung von PhoB [<i>S. meliloti</i>]..... | 85 |
| 4.1.2.5.2.7 Synthese von PhoB [<i>S. meliloti</i>]..... | 85 |
| 4.1.2.5.2.8 Synthese von PhoB [<i>E. coli</i>]..... | 85 |
| 4.1.2.5.2.9 Synthese der V190M-Mutante von PhoB [<i>E. coli</i>]..... | 86 |
| 4.1.2.6 Synthese der DNA-bindenden Epitope aus PhoB [<i>S. meliloti</i>] und PhoB [<i>E. coli</i>] am mit 1,8-Diamino- 3,6-dioxaoctan funktionalisierten 2Cl-Trt-Harz..... | 86 |
| 4.1.2.6.1 Synthese von PhoB [<i>E. coli</i>]..... | 87 |
| 4.1.2.6.2 Synthese von PhoB [<i>S. meliloti</i>]..... | 87 |
| 4.1.2.7 Durchführung eines Alanin-Scans im DNA- bindenden Epitop PhoB(190-209) aus [<i>E. coli</i>]..... | 87 |
| 4.1.2.8 Synthese verschieden modifizierte Peptide..... | 89 |
| 4.1.2.9 Durchführung eines Arginin-Scans im DNA- bindenden Epitop PhoB(190-209) aus [<i>E. coli</i>]..... | 90 |
| 4.1.3 Oberflächenplasmonresonanz..... | 93 |
| 4.1.3.1 Bindungsstudie mit PhoB und den aus dem Alanin-Scan stammenden Peptiden..... | 93 |
| 4.1.3.1.1 Immobilisierung der DNA..... | 93 |
| 4.1.3.1.2 Erste Messung mit PhoB(190-209) [<i>E. coli</i>]..... | 94 |
| 4.1.3.1.3 Test auf Massentransfer-Limitierung..... | 95 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.3.1.4 Bindungsstudien mit den aus dem Alanin-Scan stammenden Peptiden | 95 |
| 4.1.3.1.5 Datenanalyse | 97 |
| 4.1.3.1.6 Maßnahmen zur Verbesserungen der Sensogramme | 98 |
| 4.1.3.2 Bindungsstudien mit den verschiedenen <i>N</i> - und <i>C</i> -terminal modifizierten Peptiden | 99 |
| 4.1.3.3 Bindungsstudien mit den aus dem Arginin-Scan stammenden Peptiden | 102 |
| 4.1.4 CD-Spektroskopie | 104 |
| 4.1.4.1 Untersuchung der aus PhoB und dem Alanin-Scan stammenden Peptide in verschiedenen Lösungsmitteln | 104 |
| 4.1.4.1.1 Vergleich der Messungen in TFE und im Puffer | 104 |
| 4.1.4.1.2 Ermittlung der Sekundärstrukturen | 105 |
| 4.1.4.2 Untersuchung der Veränderung der CD-Spektren der aus PhoB und dem Alanin-Scan stammenden Peptide bei Zugabe von DNA | 109 |
| 4.1.5 Kraftspektroskopie | 111 |
| 4.1.5.1 Einleitung | 111 |
| 4.1.5.2 Kraftspektroskopie | 112 |
| 4.1.5.3 Dynamische Kraftspektroskopie | 115 |
| 4.1.6 Vergleichende Diskussion der Ergebnisse der verschiedenen Methoden | 118 |
| 4.2 Epitope Mapping | 120 |
| 4.2.1 Überlegungen zum Auffinden der DNA-bindenden Domäne in ExpG | 120 |
| 4.2.2 Synthese 15mer-Peptide | 122 |
| 4.2.3 Oberflächenplasmonresonanz | 123 |
| 4.2.4 Synthese 20mer-Peptide 17 überlappende Aminosäuren | 125 |
| 4.2.5 Oberflächenplasmonresonanz | 126 |
| 4.3 AzoTANDEM | 127 |
| 4.3.1 Einleitung | 127 |
| 4.3.2 Synthese | 128 |
| 4.3.2.1 Probesynthese des Tridepsipectids am Wang-Harz | 132 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 4.3.2.1.1 | Synthese von H-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz | 132 |
| 4.3.2.1.2 | Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala- ^t Bu | 132 |
| 4.3.2.1.3 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala- ^t Bu | 133 |
| 4.3.2.1.4 | Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala- ^t Bu | 133 |
| 4.3.2.2 | Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala- ^t Bu | 133 |
| 4.3.2.3 | Synthese von D-Ser(Trt)-Ala- ^t Bu | 134 |
| 4.3.2.4 | Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala- ^t Bu | 134 |
| 4.3.2.5 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala- ^t Bu | 135 |
| 4.3.2.6 | Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala- ^t Bu | 135 |
| 4.3.2.7 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala- ^t Bu | 136 |
| 4.3.2.8 | Kupplung von Qxc-D-Ser(Val)-Ala- ^t Bu an 4,4'-Diazendiyldi(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoxycarbonyl)phenylalanin | 137 |
| 4.3.2.9 | Abspaltung der Boc-Schutzgruppen vom nicht cyclisierten AzoTANDEM | 138 |
| 4.3.2.10 | Synthese des AzoTANDEM | 139 |
| 4.3.3 | Spektroskopische Untersuchung | 139 |
| 4.3.3.1 | Einleitung | 139 |
| 4.3.3.2 | UV-Spektroskopische Untersuchung der einzelnen Proben | 140 |
| 4.3.3.2.1 | UV-Spektren des Lösungsmittels DMSO | 141 |
| 4.3.3.2.2 | UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(<i>N</i> - <i>tert</i> - butoxy-carbonyl)phenylalanins | 143 |
| 4.3.3.2.3 | UV-Spektrum des Chinoxaloylchlorids | 145 |
| 4.3.3.2.4 | UV-Spektrum des AzoTANDEMs | 146 |
| 4.3.3.3 | Erste Photoschaltung mittels Photoreaktor <i>trans</i> -Isomer → <i>cis</i> -Isomer | 150 |
| 4.3.3.4 | Zweite Photoschaltung mittels Sonnenlicht <i>cis</i> -Isomer → <i>trans</i> -Isomer | 152 |
| 4.3.3.5 | Dritte Photoschaltung mittels Photoreaktor <i>trans</i> -Isomer → <i>cis</i> -Isomer | 155 |
| 4.3.3.6 | Vierte Photoschaltung mittels Sonnenlicht <i>cis</i> -Isomer → <i>trans</i> -Isomer | 156 |
| 4.3.3.7 | Thermische Schaltung <i>cis</i> -Isomer → <i>trans</i> -Isomer | 160 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.3.8 Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Photoschaltungen | 165 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 168 |
| 6. Experimenteller Teil | 173 |
| 6.1 Geräte und Materialien | 173 |
| 6.1.1 Geräte | 173 |
| 6.1.2 Materialien | 178 |
| 6.1.2.1 Chromatographie | 178 |
| 6.1.2.2 Lösungsmittel | 178 |
| 6.1.2.3 Chemikalien | 179 |
| 6.1.3 DNA-Sequenzen | 179 |
| 6.1.3.1 DNA-Sequenz EcoPho1-1 als komplementäre DNA für PhoB | 179 |
| 6.1.3.2 DNA-Sequenz Kofra Ge als komplementäre DNA für ExpG | 179 |
| 6.1.3.2 DNA-Sequenz pFpR- Fragment aus EBNA als Referenz-DNA | 180 |
| 6.2 Allgemeine Arbeitsmethoden | 181 |
| 6.2.1 Beladung des Safety-Catch-Harzes | 181 |
| 6.2.2 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes | 181 |
| 6.2.2.1 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes | 181 |
| 6.2.2.2 Modifizierung des 2Cl-Trt-Harzes mit 1,8-Diamino-3,6-Dioxaoctan | 181 |
| 6.2.2.3 Beladung des modifizierten 2Cl-Trt-Harz mit der ersten Aminosäure | 182 |
| 6.2.3 Spektrophotometrische Bestimmung der Beladung des Harzes | 182 |
| 6.2.4 Manuelle Kupplung der Aminosäuren | 182 |
| 6.2.5 Manuelle Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe | 182 |
| 6.2.6 Acetylierung des Peptids | 183 |
| 6.2.7 Aktivierung des Safety-Catch-Harzes nach der Peptidsynthese | 183 |
| 6.2.8 Präparation der harzgebundenen Proben für MALDI-ToF-MS Untersuchungen | 183 |
| 6.2.9 Automatische Synthese der Peptide | 183 |
| 6.2.9.1 Quellen des Harzes | 184 |

| | |
|---|-----|
| 6.2.9.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe..... | 184 |
| 6.2.9.2.1 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 1 .. | 184 |
| 6.2.9.2.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 2 .. | 184 |
| 6.2.9.2.3 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 3 .. | 184 |
| 6.2.9.3 Waschen nach der Abspaltung der Schutzgruppe..... | 184 |
| 6.2.9.4 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure | 185 |
| 6.2.9.4.1 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure Methode 1 | 185 |
| 6.2.9.4.2 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure Methode 2, Doppelkupplung | 185 |
| 6.2.9.5 Waschen nach der Kupplung..... | 185 |
| 6.2.9.6 Trocknen nach der Synthese..... | 185 |
| 6.2.10 Abspaltung des Peptids vom aktivierten Safety-Catch-Harz | 185 |
| 6.2.11 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz | 186 |
| 6.2.11.1 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 1 | 186 |
| 6.2.11.2 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 2 | 186 |
| 6.2.11.3 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 3 | 186 |
| 6.2.11.4 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 4 | 186 |
| 6.2.11.5 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 5 | 186 |
| 6.2.11.6 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 6 | 187 |
| 6.2.11.7 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 7 | 187 |
| 6.2.12 Kondensation von Fmoc-Xaa-OH mit <i>N</i> -tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocetan..... | 187 |
| 6.2.13 Aufreinigung der Peptide mittels semipräparativer RP-HPLC..... | 188 |
| 6.3 Peptidsynthesen..... | 190 |
| 6.3.1 Versuch der Synthese von AcPhoB(190-209)Linker aus <i>E. coli</i> Ac- Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys- Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker am Safety-Catch-Harz..... | 190 |
| 6.3.2 Synthese des <i>N</i> -terminalen Fragmentes von AcPhoB(190- 209)Linker aus <i>S. meliloti</i> Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp- Val-His-Val-Gly-OH am 2Cl-Trt-Harz | 190 |
| 6.3.3 Versuch der Synthese des <i>C</i> -terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus <i>S. meliloti</i> Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu- Asn-Phe-Ser-OH am Safety-Catch-Harz..... | 191 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 6.3.4 | Manuelle Synthese des C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus <i>S. meliloti</i> Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH am 2Cl-Trt-Harz..... | 191 |
| 6.3.5 | Versuch der Synthese des C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus <i>S. meliloti</i> Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH am 2Cl-Trt-Harz..... | 192 |
| 6.3.6 | Versuch der Synthese des C-terminal Trityl-geschützten C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus <i>S. meliloti</i> Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OTrt..... | 192 |
| 6.3.7 | Versuch der Fragmentkondensation des C-terminalen Fragmentes 10 und des N-terminalen Fragment 6 zu AcPhoB(190-209)Linker [<i>S. meliloti</i>] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 11a am 2Cl-Trt-Harz..... | 192 |
| 6.3.8 | Versuch der Synthese des PhoB(190-209) [<i>S. meliloti</i>] am 2Cl-Trt-Harz mit anschließender C-terminaler Funktionalisierung..... | 193 |
| 6.3.9 | Synthese der PhoB-Varianten am 2Cl-Trt-Harz mit modifizierter C-terminaler Aminosäure..... | 193 |
| 6.3.9.1 | Kondensation von Fmoc-Leu-OH mit <i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan..... | 193 |
| 6.3.9.2 | Kondensation von Fmoc-Ser(Bzl)-OH mit <i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan..... | 194 |
| 6.3.9.3 | Kondensation von Fmoc-Gly-OH mit <i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan..... | 194 |
| 6.3.9.4 | Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [<i>S. meliloti</i>] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker..... | 195 |
| 6.3.9.5 | Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [<i>E. coli</i>] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker..... | 195 |
| 6.3.9.6 | Synthese der V190M Variante von AcPhoB(190-209)Linker [<i>E. coli</i>] Ac-Met-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker..... | 196 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 6.3.10 | Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [<i>E. coli</i>] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker am modifizierten 2Cl-Trt-Harz..... | 196 |
| 6.3.11 | Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [<i>S. meliloti</i>] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker am modifizierten 2Cl-Trt-Harz | 197 |
| 6.3.12 | Synthese der Peptide für den Ala-Scan und den Arg-Scan..... | 197 |
| 6.3.13 | Synthese von AcPhoB(190-209) [<i>E. coli</i>] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-OH..... | 198 |
| 6.3.14 | Synthese von PhoB(190-209)Linker [<i>E. coli</i>] Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker..... | 198 |
| 6.3.15 | Synthese von PhoB(190-209) [<i>E. coli</i>] Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-OH.... | 199 |
| 6.3.16 | Synthese der 15er Peptide aus ExpG [<i>S. meliloti</i>]..... | 199 |
| 6.3.17 | Synthese der 20er Peptide mit 17 überlappnden Aminosäureresten aus ExpG [<i>S. meliloti</i>]..... | 200 |
| 6.4 | Synthese des AzoTANDEM..... | 202 |
| 6.4.1 | Probesynthese des Tridepsipeptids am Wang-Harz..... | 202 |
| 6.4.1.1 | Synthese von H-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz | 202 |
| 6.4.1.2 | Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz | 202 |
| 6.4.1.3 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-Wang-Harz | 202 |
| 6.4.1.4 | Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val-)-Ala-Wang-Harz..... | 203 |
| 6.4.2 | Synthese des AzoTANDEMs..... | 203 |
| 6.4.2.2 | Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu..... | 203 |
| 6.4.2.2.1 | Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu Variante 1..... | 203 |
| 6.4.2.2.2 | Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu Variante 2..... | 204 |
| 6.4.2.3 | Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu..... | 205 |
| 6.4.2.4.1 | Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu Variante 1.... | 205 |
| 6.4.2.4.2 | Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu Variante 2.... | 205 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 6.4.2.4 | Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O ^t Bu | 206 |
| 6.4.2.5 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O ^t Bu | 207 |
| 6.4.2.5.1 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O ^t Bu Variante 1 | 207 |
| 6.4.2.5.2 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O ^t Bu Variante 2 | 208 |
| 6.4.2.5.3 | Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O ^t Bu Variante 3 | 208 |
| 6.4.2.6 | Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala-O ^t Bu | 208 |
| 6.4.2.7 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu | 210 |
| 6.4.2.7.1 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 1 | 210 |
| 6.4.2.7.2 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 2 | 210 |
| 6.4.2.7.3 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 3 | 211 |
| 6.4.2.7.4 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 4 | 211 |
| 6.4.2.7.5 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 5 | 211 |
| 6.4.2.7.6 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 6 | 212 |
| 6.4.2.7.7 | Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu Variante 7 | 212 |
| 6.4.2.8 | Kupplung von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O ^t Bu an 4,4'-Diazendiyldi(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoxy-carbonyl)phenylalanin | 214 |
| 6.4.2.9 | Abspaltung der Boc-Schutzgruppen vom nicht cyclisierten AzoTANDEM | 215 |
| 6.4.2.10 | Synthese des AzoTANDEM | 217 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 219 |
| 8. | Anhang | 240 |
| 8.1 | Sekundärstrukturanalysen aus den Daten der CD-Spektroskopie | 240 |

1. Einleitung

Proteine sind an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt. Als Enzyme katalysieren sie Reaktionen, sie bilden Strukturen in Zellen, Organen und Geweben, und nicht zuletzt kontrollieren sie viele Prozesse im Organismus. Alle Proteine sind genetisch codiert und ihre Biosynthese wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Letztlich erfolgt die Steuerung der Biosynthese von Proteinen über eine Kontrolle der Transkription der DNA zur mRNA. Die Transkription wird über Transkriptionsfaktoren positiv (Transkriptionsaktivatoren) oder negativ (Transkriptionsinhibitoren) reguliert. Auch die Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die mit der DNA interagieren. Diese Wechselwirkungen müssen sehr spezifisch sein, da schließlich nur ein bestimmtes Gen zur Expression einer bestimmten mRNA und damit zur Produktion eines bestimmten Proteins aktiviert werden darf. Die Kontrolle der Biosynthese von Proteinen, die an pathologischen Prozessen beteiligt sind, würde es ermöglichen, in diese Prozesse regulierend einzugreifen. Es wäre also sehr wünschenswert, künstliche Transkriptionsfaktoren zu entwickeln, die sequenzspezifisch an DNA binden. Zur Entwicklung therapeutisch einsetzbarer, künstlicher Transkriptionsfaktoren muß zunächst einmal eine Möglichkeit gefunden werden, Sequenzen auf der DNA spezifisch zu erkennen und daran zu binden. Um dies zu erreichen, müssen die DNA-bindenden Epitope in den DNA-bindenden Peptiden oder Proteinen bestimmt werden. Anschließend können in diesen Epitopen die Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren mit der DNA auf der Ebene der beteiligten Aminosäuren und Nukleotide untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse könnten zur Aufstellung von Regeln führen, die es ermöglichen würden, sequenzspezifisch an DNA bindende Peptide zu synthetisieren. Zu diesem Zweck können Peptide mit der Aminosäuresequenz der an der DNA-Bindung beteiligten Bereiche eingesetzt werden. Dies hat den Vorteil, daß die Peptide relativ einfach synthetisiert und chemisch werden können. In dieser Arbeit wird die Synthese DNA-bindender Peptide als Komponenten verschiedener Systeme und deren Charakterisierung sowie die Untersuchung ihrer Interaktion mit DNA vorgestellt.

Durch *epitope mapping* soll das DNA-bindende Epitop des Transkriptionsaktivators ExpG aus *S. meliloti* gefunden werden. Es werden kurze Peptide mit Abschnitten aus der Primärstruktur des Proteins synthetisiert, und ihre Wechselwirkungen mit der entsprechenden DNA untersucht. Hierdurch sollte es möglich sein, das DNA-bindende Epitop aufzufinden. Dieser *bottom-up* Ansatz zur Aufklärung von DNA/Protein

Wechselwirkungen könnte allgemein angewendet werden und die Untersuchungen von Regulationssystemen der Proteinexpression vereinfachen.

Die Auswirkungen verschiedener Mutationen auf die Bindungseigenschaften eines Peptids mit der Aminosäuresequenz eines DNA-bindenden Epitopes aus einem Transkriptionsaktivator werden beschrieben. Als Modellsystem dient PhoB aus *E. coli*, das die Expression von nahezu 40 Genen unter Phosphatmangelbedingungen kontrolliert. Aus NMR- und Röntgenstrukturanalyse sowie Mutationsexperimenten ist bekannt, über welche Aminosäurereste es an die DNA bindet. Durch den Austausch der an der Bindung beteiligten Aminosäurereste sollen deren Beiträge zur Bindung untersucht, und die Bindung durch Mutation nicht an der Bindung beteiligter Reste verbessert werden. Weiterhin soll die Synthese eines photoschaltbaren, DNA-bindenden Peptides durchgeführt werden, das auf dem Bisinterkalator TANDEM beruht. Anhand dieser beiden Systeme soll das Grundverständnis für die Vorgänge bei der spezifischen Bindung von Peptiden an DNA erhöht werden. Langfristig können diese Erkenntnisse zur Entwicklung von Substanzen und letztlich sogar Medikamenten beitragen, die direkt in die Expression von Genen eingreifen.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Synthese der Peptide und der Untersuchung ihrer Wechselwirkungen mit DNA im Molekülensemble. Weiterhin werden die mittels Oberflächenplasmonresonanz und CD-Spektroskopie im Molekülensemble erhaltenen Daten mit Einzelmoleküldaten aus der Atomkraftspektroskopie verglichen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 DNA-bindende Proteine

2.1.1 Allgemein

DNA-bindende Proteine spielen eine zentrale Rolle in allen Aspekten der genetischen Aktivität innerhalb eines Organismus, sei es Transkription, Replikation oder Reparatur. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig zu untersuchen, welcher Art die Wechselwirkungen der Komplexe zwischen Proteinen und DNA sind. In Prokaryonten codieren 2-3%, in Eukaryonten 6-7% des Genoms DNA-bindende Proteine.^[1]

Die DNA hat die Struktur einer rechtsgängigen, antiparallelen Doppelhelix. Im außen liegenden, negativ geladenen, hydrophilen Rückgrat dieser Doppelhelix wechseln sich Desoxyribose und Phosphatgruppen ab. Die Pyrimidin- und Purinbasen sind innerhalb der Doppelhelix dicht gestapelt, wobei ihre hydrophoben und annähernd planaren Ringstrukturen senkrecht zur Helixachse liegen. Jede Base des einen Stranges ist mit einer komplementären Base des anderen Stranges gepaart, Adenin mit Thymin über zwei Wasserstoffbrücken, Guanin und Cytosin über drei. Die räumliche Anordnung der Stränge führt zu einer großen und einer kleinen Furche zwischen den Strängen. Die DNA tritt in mehreren Strukturvarianten auf, die sich in der Anzahl der Basenpaare pro vollständiger Windung und dadurch in den Dimensionen unterscheiden. Unter physiologischen Bedingungen ist die B-DNA die stabilste, mit 10,5 Basenpaaren auf 3,6 nm pro Windung, 0,34 nm Anstieg pro Basenpaar und einer Breite von 2 nm. Die A-DNA ist eine gestauchte Form der B-DNA mit 11 Basenpaaren pro Windung und 0,23 nm Anstieg je Basenpaar. Die Z-DNA weicht stärker von der B-DNA ab, ihre Form ist die einer linksgängigen Doppelhelix mit 12 Basenpaaren pro Windung und 0,38 nm Anstieg pro Basenpaar. Das Rückgrat der Z-DNA ist Zick-Zack-förmig, woher auch der Name rührt.^[2] Die unterschiedlichen Dimensionen führen zu unterschiedlichen Formen der Furchen. Die B-DNA hat eine breite große Furche und eine enge kleine Furche ähnlicher Tiefe, während die A-DNA eine tiefe, enge große Furche und eine breite, flachere kleine Furche besitzt. Auch die Ausrichtung der Ebenen der Basenpaare ist unterschiedlich, in der B-DNA sind sie senkrecht zur Helixachse angeordnet und liegen in der Mitte der Struktur, während sie

in der A-DNA gekippt sind. Durch die unterschiedlichen Ausrichtungen werden in den Furchen auch verschiedene Bereiche der Basenpaare präsentiert.^[3]

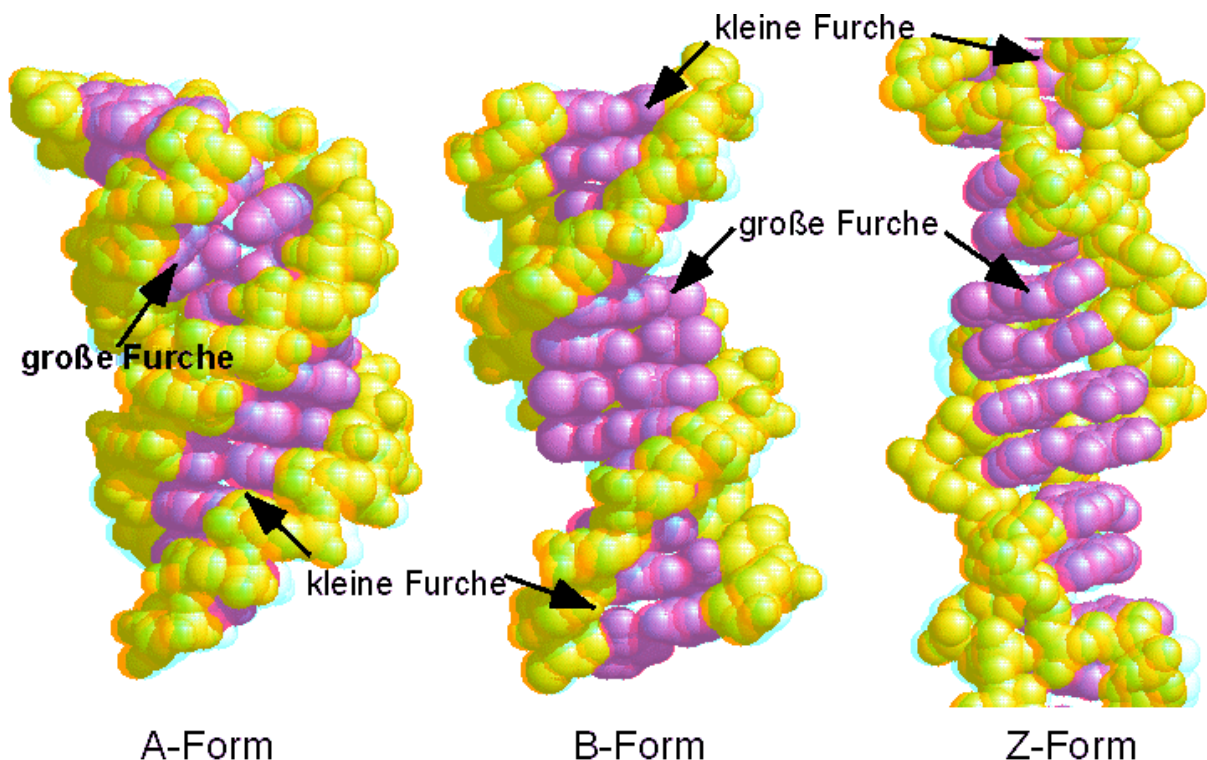


Abb. 1: Modelle der DNA-Typen^[4]

Die Aminosäurereste in den DNA-bindenden Proteinen und Peptiden können auf vier verschiedene Arten mit der DNA in Wechselwirkung treten.^[5-7] Zwischen den positiv geladenen Seitenketten von Arginin, Lysin und Histidin und den negativ geladenen Phosphatgruppen können Salzbrücken gebildet werden, die die Bindung stabilisieren, aber nicht zur Spezifität der Bindung beitragen. Wasserstoffbrückenbindungen von Sauerstoff-Substituenten aus den Phosphaten, Hydroxid-Gruppen aus den Zuckern oder den Basen mit den Peptidbindungen oder hydrophilen Aminosäureseitenketten werden als entscheidend für die Ausrichtung der Proteine zur DNA und damit für die Spezifität der Bindung betrachtet. Hydrophobe van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureseitenketten und der DNA tragen sowohl zur Stärke als auch zur Spezifität der Bindung bei.^[5-7] Die aromatischen Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin können zwischen die Basenpaare interkalieren und damit über π - π Wechselwirkungen an der Bindung teilhaben. Die Bindungsaffinität und -spezifität wird also durch die Kombination von elektrostatischen, entropischen, hydrophoben und van der Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Interkalation ermöglicht.

Die große Furche der DNA ist die hauptsächliche Erkennungsstelle, da sie aufgrund ihrer Ausdehnung die Aufnahme einer α -Helix erlaubt und auch mehr Erkennungsstellen bietet als die kleine Furche (**Abb. 2**), jedoch gibt es auch Proteine, die zur Erkennung die kleine Furche verwenden.^[1,5] Die Erkennungsstellen sind je nach Basenpaarung unterschiedlich, so daß jedes Basenpaar eine individuelle chemische „Signatur“ hat, über die sie erkannt werden kann.^[7] Die Erkennung erfolgt über eine Oberfläche am Protein, die chemisch komplementär zu der der DNA in der Erkennungssequenz ist, während die Stärke der Bindung durch Salzbrücken zwischen den Phosphaten und positiven Seitenketten sowie Wasserstoffbrücken zu den Phosphaten bestimmt wird.^[6] Allerdings kann eine Mutation außerhalb der Bindesequenz innerhalb der DNA die Eigenschaften der Bindung verändern, was auf Änderungen in der Flexibilität oder der Konformation der DNA zurückgeführt wird.^[8]

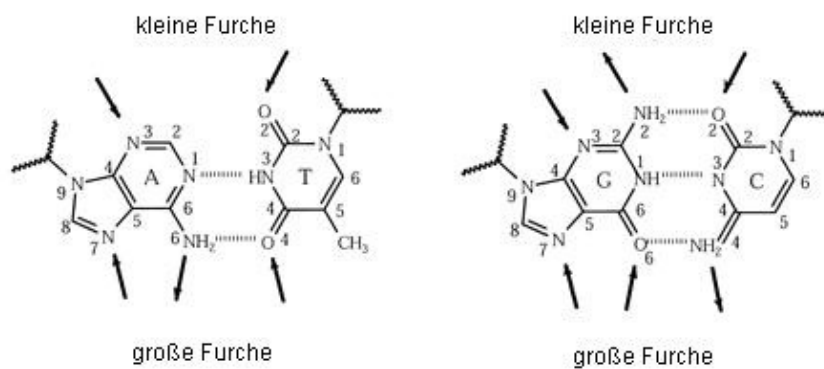


Abb. 2: Mögliche Erkennungsstellen in der großen und kleinen Furche der DNA bei den Basenpaaren.^[6]

Bisher existiert noch kein definierter Code, welche Aminosäure in einem DNA-bindenden Abschnitt an welche Base bindet, auch wenn dies bereits versucht wurde.^[6,9-12] Es herrscht jedoch Übereinstimmung darüber, daß die Spezifität eines Proteins für eine DNA-Sequenz wohl nicht mit einem einfachen 1:1 Modell für Aminosäurereste und Basenpaare beschrieben werden kann.^[6,13] Allerdings wurden in hochaufgelösten Strukturen von Protein/DNA Komplexen einige Präferenzen gefunden. Arginin und Lysin bevorzugen sehr stark Guanin. Asparagin und Glutamin bevorzugen Adenin, wenn auch nicht so stark. Serin und Histidin bevorzugen Guanin und saure Aminosäuren bevorzugen Cytosin. Arginin kann jedoch auch an Adenin und Thymin binden. Phenylalanin und Prolin bevorzugen Adenin und Thymin, Threonin bevorzugt Thymin (**Abb. 3**).^[6]

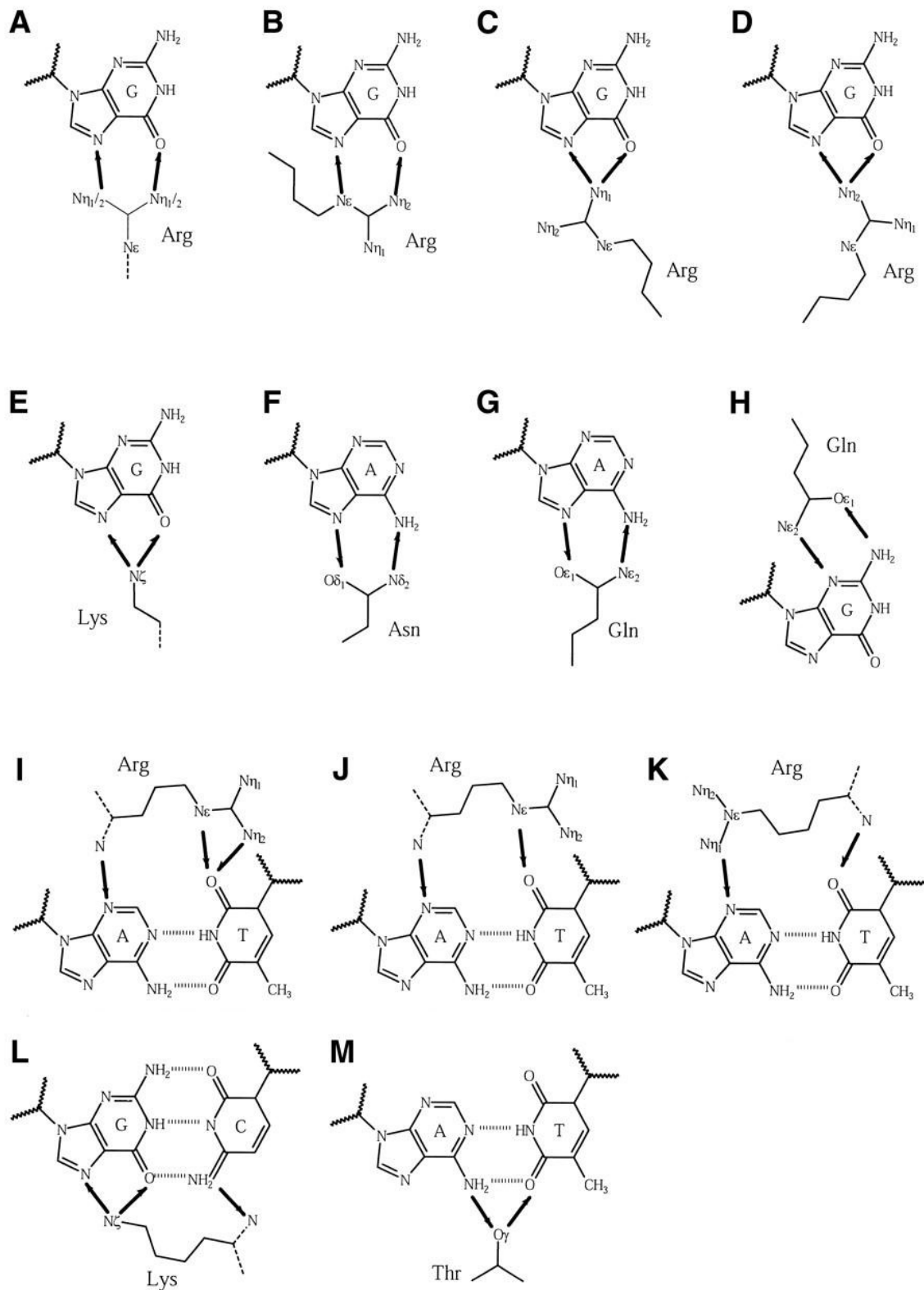


Abb. 3: Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäureresten an Basenpaare.^[6]

Eine Möglichkeit der Klassifizierung von Protein/DNA Komplexen besteht in der Einteilung entsprechend der Struktur der DNA-bindenden Region in den Proteinen.^[1,14-17]

Dies führt zu 8 verschiedenen Gruppen von Strukturen, die insgesamt 54 Familien von Proteinen enthalten. Die einzelnen Gruppen sind 1. *helix-turn-helix* Proteine (einschließlich der *winged helix-turn-helix* Familie), 2. Zink-koordinierende Proteine, 3. Zipper-Typ Proteine, 4. andere Proteine mit einer α -Helix als DNA-bindende Struktureinheit, 5. β -Faltblatt, 6. *β -Hairpin/Band*, 7. Andere, 8. Enzyme. In der Enzymgruppe werden alle Proteine zusammengefaßt, die enzymatische Aktivität zeigen, wenn sie an DNA gebunden sind. Diese Gruppe hat also keine einheitlich DNA-bindende Struktur, sondern eine gemeinsame Funktion. Enzyme, die eine zu einer anderen Gruppe gehörende Struktur enthalten, sind dort eingeordnet.^[1]

2.1.1.1 *helix-turn-helix* Proteine

Das *helix-turn-helix* Motiv kommt häufig in Transkriptionsregulatoren und Enzymen in Prokaryonten und Eukaryonten vor.^[14,15,18-21] Es besteht klassischerweise aus ca. 20 Aminosäureresten, die zwei durch einen *β -Turn* getrennte α -Helices enthalten, die nahezu senkrecht zueinander angeordnet sind. In dieser Gruppe sind jedoch auch Proteine enthalten, in denen der Abstand größer ist als die 4 Aminosäuren im *β -Turn*, solange die räumliche Anordnung der α -Helices erhalten bleibt. Diese werden zum Teil als *helix-loop-helix*-Proteine bezeichnet, was jedoch zu Verwechslungen mit den in 2.1.1.3 als *helix-loop-helix*-Motiv bezeichneten Proteinen des Zipper-Typs führen kann.

Das Motiv bindet in der großen Furche der DNA, die zweite α -Helix, als "Recognition-Helix" bezeichnet, befindet sich in der Furche. Es finden direkte Bindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren in der zweiten Helix und Nukleotidbasen der DNA statt, teilweise erfolgt die Bindung auch mittels überbrückender Wassermoleküle und über Atome im Peptidrückgrat. Weitere unterstützende Bindungen können vom DNA-Rückgrat und von der ersten α -Helix ausgehen, die die große Furche der DNA überbrückt. Außerdem können auch weiter von dem Bindungsmotiv entfernte Bereiche über Kontakte zur DNA an der Bindung teilnehmen und dadurch zu weiterer Spezifität beitragen. Häufig ist das *helix-turn-helix* Motiv in einen hydrophoben Kern aus weiteren α -Helices eingebettet. Das *winged helix-turn-helix* Motiv beinhaltet eine weitere α -Helix und ein daran anschließendes β -Faltblatt, die weitere Kontakte mit der DNA eingehen.^[1]

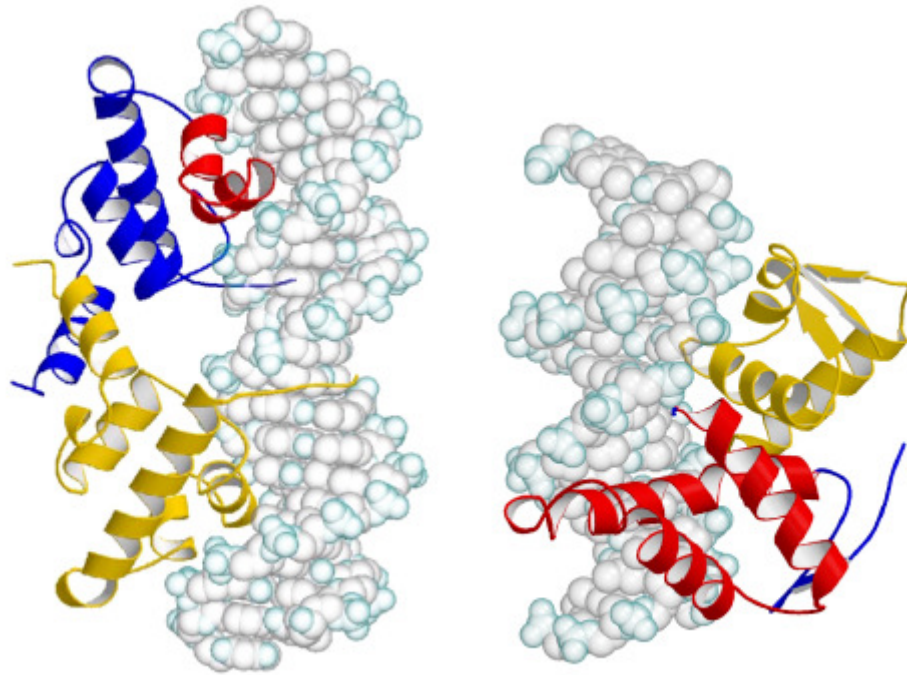


Abb. 4: Struktur des Repressor-Proteins aus Phage λ als Beispiel für ein Protein mit einem *helix-turn-helix* Motiv (links) und des Hitze-Schock Transkriptionsfaktors aus *K. lactis* als Beispiel für ein Protein mit *winged helix-turn-helix* Motiv (rechts).^[1]

2.1.1.2 Zink-koordinierende Proteine

Diese Proteine sind die größte Gruppe von Transkriptionsfaktoren in eukaryotischen Genomen, über 1000 verschiedene wurden identifiziert.^[1,22] Das DNA-Bindemotiv ist charakterisiert durch die tetrahedrale Koordination von einem oder zwei Zinkionen durch konservierte Cystein- oder Histidinreste.^[14,15,21] Auch in dieser Gruppe bindet eine α -Helix in der großen Furche, und eine zweite liegt senkrecht zur ersten α -Helix und bildet weitere Kontakte mit der DNA aus. Die weite Verbreitung könnte daran liegen, daß die Metallionen eine große Stabilität auch für kleine Domänen bieten, die keinen hydrophoben Kern enthalten.^[23] Dieses Motiv wird auch in Domänen gefunden, die für Protein-Protein Wechselwirkungen verantwortlich sind.^[24]

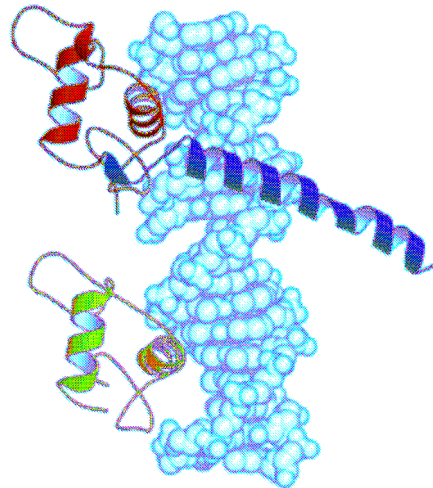


Abb. 5: Struktur des Retinolsäure-Rezeptors aus *H. sapiens* als Beispiel für ein Zink-koordinierendes DNA-bindendes Protein.^[1]

2.1.1.3 Proteine vom Zipper-Typ

Der Name dieser Gruppe stammt von der Art der Dimerisierung der Mitglieder dieser Familie. Wie in einem Reißverschluß greifen hydrophobe Reste, die sich an jeder zweiten Windung der α -Helix, aus dem das Protein besteht, befinden, ineinander. Die DNA-Bindung erfolgt mittels der α -helicalen Bindedomänen, die in entgegengesetzter Richtung in der großen Furche der DNA binden.

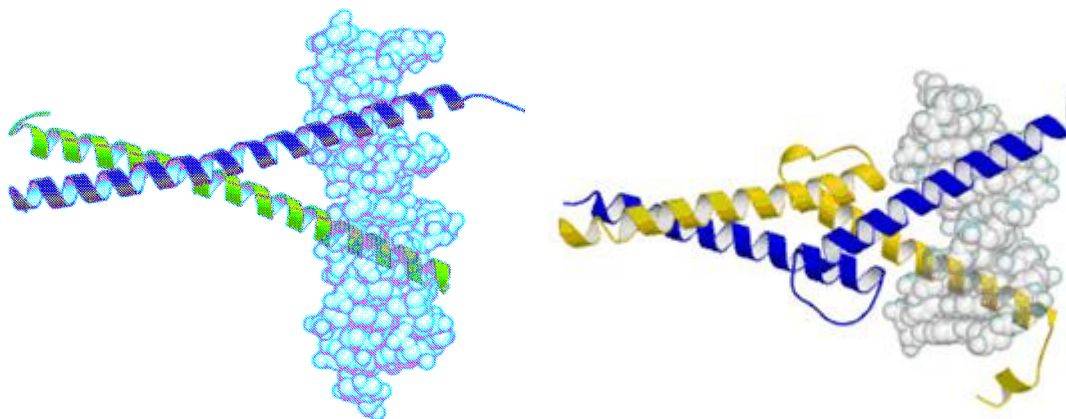


Abb. 6: Struktur von GCN4 aus *S. cerevisiae* als Beispiel für einen Leucin-Zipper (links) und von Srebp-1A aus *H. sapiens* als Beispiel für ein Protein mit *helix-loop-helix* Motiv.^[1]

2.1.1.4 Andere α -helicale Proteine

Diese Gruppe enthält sieben Familien, die alle α -Helices zur Bindung an DNA nutzen, auf die jedoch im einzelnen hier nicht näher eingegangen wird.

2.1.1.5 β -Faltblatt Proteine

Die Proteine aus dieser Gruppe binden auch über β -Faltblätter an die DNA. Ein zehnsträngiges antiparalleles β -Faltblatt überspannt die kleine Furche der DNA, an jedem Ende des Faltblattes befinden sich Phenylalaninreste, deren Seitenketten in die DNA interkalieren.

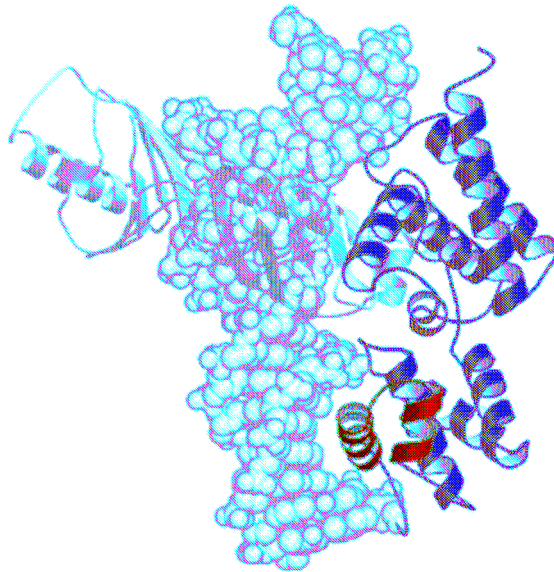


Abb. 7: Struktur des TATA-Box bindenden Proteins aus *S. cerevisiae* als Beispiel für ein β -Faltblatt Protein.^[1]

2.1.1.6 β -Hairpin/Band-Proteine

Die Proteine aus den Familien in dieser Gruppe binden über kleine β -Faltblätter an die DNA. Einzelne Stränge binden je nach Familie entweder in der großen oder der kleinen Furche der DNA. Tritt Bindung in der großen Furche auf, erfolgen die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten und den Nukleinsäuren. Bei Bindung in der kleinen Furche interkalieren Prolinreste zwischen den Basenpaaren.

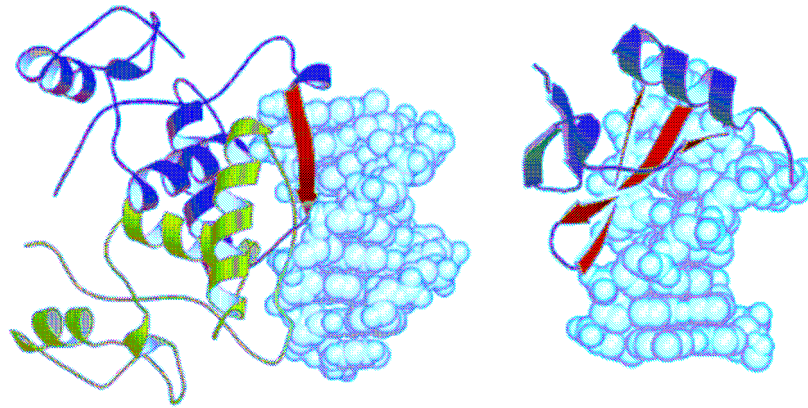


Abb. 8: Struktur des Met-Repressor Proteins aus *E. coli* als Beispiel für ein in der großen Furche bindendes Protein aus der Gruppe der β -Hairpin/Band-Proteine (links) und von Sac7D aus *S. acidocaldarius* als Beispiel für ein in der kleinen Furche bindendes Protein aus der Gruppe der β -Hairpin/Band-Protein (rechts).^[1]

2.1.1.7 Andere Proteine

Die Proteine aus den zwei Familien dieser Gruppe nutzen kein definiertes Sekundärstrukturmotiv zur Bindung an DNA. Die Proteine dieser Gruppe binden als Dimer an die DNA und umschließen diese, der entstehende Komplex ist entlang der Achse der DNA symmetrisch. Die Rel Homologie Region ist eine konservierte Region in Transkriptionsaktivatoren der Zellverteidigung und der Zelldifferentiation, bei der jede Untereinheit zwei β -Sandwich-Domänen enthält, deren Schleifen in der großen Furche der DNA binden. Die STAT-Familie enthält Transkriptionsfaktoren, die Antworten auf Zytokine und Wachstumsfaktoren vermitteln. Jede Protein-Untereinheit enthält vier Strukturdomänen, und das Dimer erinnert an eine Zange, bei der die DNA durchs Gelenk geht.^[1]

2.1.1.8 Enzyme

Die DNA-bindenden Motive der Mitglieder dieser Familie lassen sich nicht durch einfache strukturelle Motive beschreiben, sie benutzen Kombinationen von α -Helices, β -Faltblättern und von Schleifen zur Bindung. Viele Familien haben jedoch definierte Domänen, eine DNA-bindende, eine katalytische, und gegebenenfalls eine zur Dimerisierung. In der letztendlich entstehenden U-förmigen Struktur bindet die DNA, wobei die DNA-Struktur deformiert wird.^[24] Sequenz-spezifisch bindende Enzyme haben typischerweise eine 4-10 Basenpaare lange Erkennungssequenz, und die Bindung ist viel

spezifischer als bei Transkriptionsregulatoren, z.B. kann eine einzige Mutation in der Erkennungssequenz die Bindungsaffinität mehr als sechs Zehnerpotenzen abschwächen.^[1]

2.1.2 Modellsysteme

2.1.2.1 Kontrolle der Synthese von Exopolysacchariden

2.1.2.1.1 Allgemein

Das gram-negative bodenbewohnende Bakterium *Sinorhizobium meliloti* kann in symbiotischer Interaktion mit Pflanzen der Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* molekularen Stickstoff aus der Luft fixieren. Die Initiation dieser Symbiose ist ein hoch spezifischer und sich komplex entfaltender Prozeß, währenddessen beide Partner eine gemeinsame Differentiation erfahren. Zu Beginn der Wechselwirkung induzieren aus der Wurzel austretende Flavonoide die Produktion von Nod-Faktoren in den Bakterien, die die Ausbildung von Knoten auf den Wurzeln auslösen.^[25,26] Die Bakterien infizieren die Knoten durch Infektionsfäden und kolonisieren das Zytoplasma der Pflanzenzellen. Sobald sie in den Pflanzenzellen sind, differenzieren die Bakterien zu Stickstoff-fixierenden Bakteroiden.^[27]

Für die Infektion der Knoten sind Exopolysaccharide, EPS, entscheidend, die für die Ausbildung der Infektionsfäden benötigt werden.^[28,29] *S. meliloti* kann zwei verschiedene saure EPS synthetisieren, Succinoglycan, auch als EPS I bezeichnet, und Galactoglucan, EPS II. Die Infektion der Wurzelknoten von *Medicago sativa* ist abhängig von EPS I- und EPS II-Formen mit geringem Molekulargewicht.^[30-32]

EPS I ist aus wiederholten Einheiten von sieben Glukosemolekülen und einem Galaktosemolekül aufgebaut, die über β -1,4-, β -1,3- und β -1,6- glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die Zucker sind mit Acetat-, Pyruvat- und Succinylgruppen dekoriert. Der *exo* Gencluster steuert die Biosynthese von EPS I.^[33] EPS II besteht aus abwechselnden Glukose- und Galaktoseuntereinheiten, die mit Acetyl- und Pyruvylgruppen dekoriert sind.^[34] Dessen Biosynthese wird vom 30kb *exp* Gen-Cluster gesteuert, der 22 Gene in 4 Operons enthält.^[35,36] Beide Gencluster liegen auf dem zweiten Megaplasmid, pSymb,^[37] getrennt von 200 kb.^[35]

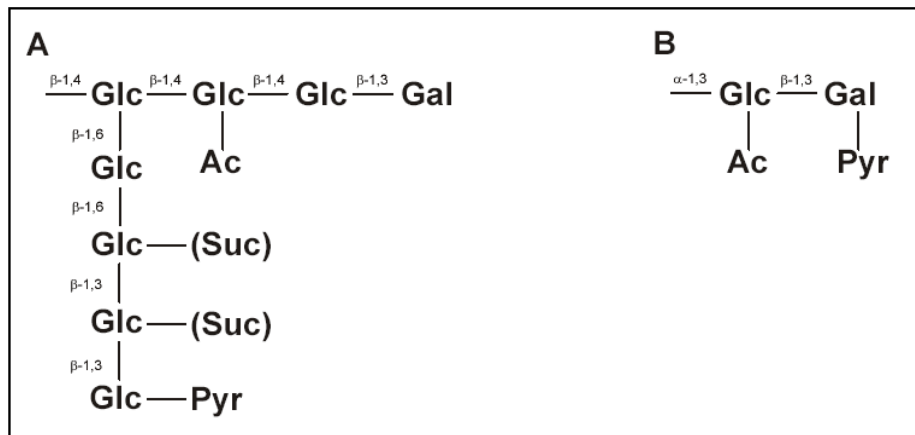


Abb. 9: Struktur der Exopolysaccharid-Untereinheiten aus *S. meliloti*. **A)** Succinoglycan (EPS I), die Succinat-Dekoration kann entweder nur an einem oder an beiden Glukoseresten gleichzeitig erfolgen. **B)** Galactoglucan (EPS II). Abkürzungen: Glc, Glukoserest; Gal, Galaktoserest; Ac, Acetylgruppe; Pyr, Pyruvylgruppe; Suc, Succinylgruppe^[35]

Unter Standardbedingungen synthetisiert *S. meliloti* EPS I und nur geringe Spuren von EPS II. Durch phosphatlimitierte Bedingungen und verschiedene Mutationen^[30,37-39] wird die Biosynthese von EPS II gesteigert,^[41] bis es das EPS I ersetzt.^[30,31,38] Weitere Kopien des regulierenden Gens *expG* im *exp* Gen-Cluster^[35,36,37] stimulieren die Transkription der *expA*, *expD* und *expE* Operone.^[36] Die gesteigerte Transkription dieser Operone unter phosphatlimitierten Bedingungen benötigt *expG*, woraus zu folgern ist, daß ExpG als Transkriptionsaktivator der *exp* Gen-Expression fungiert.^[36,37]

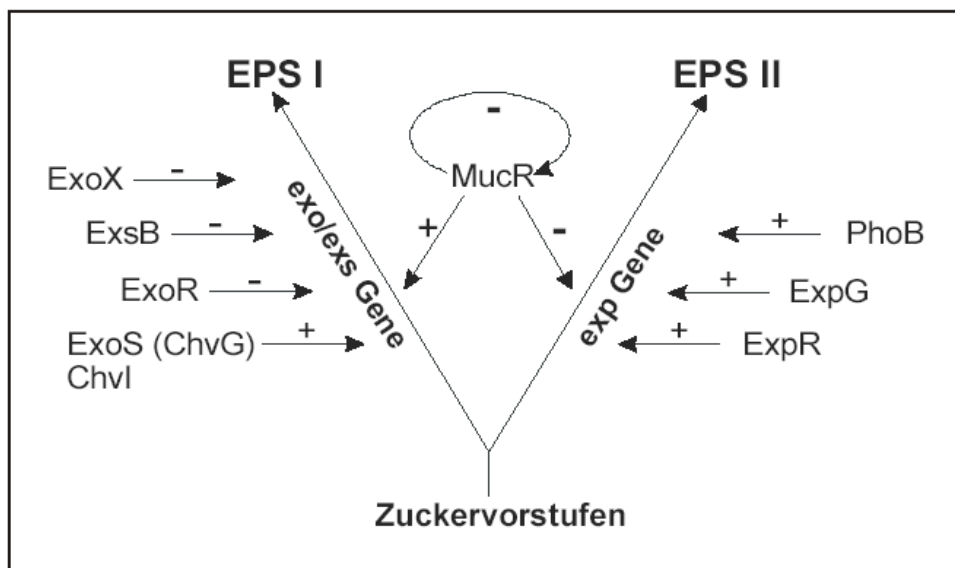


Abb. 10: Regulation der Exopolysaccharid-Biosynthese in *S. meliloti*. Die mit einem (+) markierten Pfeile weisen auf einen aktivierenden und die mit einem (-) markierten Pfeile auf einen reprimierenden Regulationsmechanismus.^[35]

2.1.2.1.2 Der Transkriptionsaktivator ExpG

Wie bereits erwähnt ist ExpG, auch als MucS bezeichnet,^[42] ein Transkriptionsaktivator der *exp* Gen-Expression. Es zeigt Homologien zu Transkriptionsaktivatoren der MarR-Familie.^[35] Diese Regulatoren binden über ein *helix-turn-helix* Motiv an DNA,^[43,44] und kontrollieren viele biologische Funktionen wie Expression von Resistenzen gegen verschiedenen Antibiotika, Detergentien, oxidativen Agentien, organische Lösungsmittel und pathogene Faktoren.^[45,46] Die meisten der Mitglieder dieser Familie sind Repressoren, nur wenige fungieren als Aktivatoren.^[47-49]

Die Homologie von ExpG zu den Regulatoren der MarR Familie impliziert, daß ExpG für die positive Regulation der *exp* Genexpression durch Bindung an die Promotor-Regionen im *exp* Gen-Cluster verantwortlich ist.^[50] Es konnte gezeigt werden, daß es sequenzspezifisch an den *exp* Gencluster bindet,^[50] und daß eine palindrome Sequenz innerhalb der *expA* Promotor-Region notwendig für diese Bindung ist.^[51]

Die Aminosäuresequenz von ExpG ist bekannt (**Abb. 11**), es besteht aus 194 Aminosäureresten. Jedoch gibt es keine Strukturdaten des Proteins, und auch das DNA-bindende Epitop ist noch nicht bestimmt.

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| MERGMNHRIL | YPFADFGDTV | AILPANETQR | KGLDTPVDDR | DGDDSLVTF | |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| ELARVMERAS | RRFSGLLRAE | LTKLGVEDIG | PAQAMVLLAI | GAEELSVGEL | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| LDRGHYVGSN | ISYYLKQLAD | GDYIDRIASQ | RDKRSARIRL | SEKGRQLCAG | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 194 |
| LRQAAKGYER | ALSHGDQDRR | NLETAFTLH | RLELVWGNA | RYGI | |

Abb. 11: Aminosäuresequenz von *S. meliloti* ExpG

2.1.2.1.3 Der Transkriptionsaktivator PhoB

Das *phosphate regulatory protein* PhoB ist ein Signal-übertragender Regulator, durch den nahezu 40 Gene unter Phosphatmangelbedingungen in *E. coli* und ähnlichen Bakterien aktiviert und reguliert werden,^[52] u. a. auch die Stickstoff-Fixierung in *S. meliloti*, wobei beide zu ca. 50% sequenzhomolog sind (**Abb. 12**). Dies geschieht als Teil eines Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem, durch das Bakterien auf Umweltbedingungen reagieren.^[53] Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme

bestehen aus einem Rezeptor, der den Stimulus registriert und anschließend durch Phosphorylierung einen Regulator aktiviert,^[54] der seinerseits durch Transkriptionsaktivierung die entsprechende Antwort auf den Umweltstimulus auslöst. Die Rezeptoren sind häufig Histidin-Kinasen, die eine Phosphatgruppe von einem Histidinrest auf einen konservierten Aspartatrest im Regulator übertragen.^[55] Die Regulatoren sind üblicherweise Proteine mit zwei Domänen, einer *N*-terminalen, die phosphoryliert wird, und einer *C*-terminalen, die an die DNA bindet.^[56]

PhoB ist ein Transkriptionsaktivator, der als Homodimer an die Phosphatbox in der Promotorregion des Phosphatregulons *pho* bindet.^[57-59] Dies Regulon steuert die Phosphataufnahme. Bei hoher Phosphatkonzentration ist das Regulon inhibiert, unter phosphatlimitierten Bedingungen wird es aktiviert.^[60]

Die Aminosäuresequenz von PhoB aus verschiedenen Bakterien ist bekannt (**Abb. 13**).

| | | | | | |
|------------------------|--------------------|------------|-------------|------------|-------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| [<i>S. meliloti</i>] | MLPKIAVVED | EEALSVLLRY | NLEAEGFEVD | TILRGDEAEI | RLQERLPDLL |
| [<i>E. coli</i>] | MARRILVVED | EAPIREMVCF | VLEQNGFQPV | EAEDYDSAVN | QLNEPWPDLI |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| [<i>S. meliloti</i>] | ILDWMLPGVS | GIELCRRLRQ | RPETERLP II | MLTARGESE | RVRGLATGAD |
| [<i>E. coli</i>] | LLDWMLPGGS | GIQFIKHLKR | ESMTRDIPVV | MLTARGEED | RVRGLETGAD |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| [<i>S. meliloti</i>] | DYVVKPFSTP | ELMARVKAML | RRAKPEVLST | LLRCGDIELD | RETHR VHRRS |
| [<i>E. coli</i>] | DYITKPFSPK | ELVARIKAVM | RRISPMAVEE | VIEMQGLSLD | PTSHRVMAGE |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| [<i>S. meliloti</i>] | REVRLGPTF | RLLEFLMSSP | GRVFSRSQLL | DGVWGHDIYV | <u>DERTVDVHVG</u> |
| [<i>E. coli</i>] | EPLEMGPTF | KLLHFFMTHP | ERVYSREQLL | NHVWGTNVYV | <u>EDRTVDVHIR</u> |
| | 210 | 220 | | | |
| [<i>S. meliloti</i>] | <u>RLRKALN</u> FSN | MPDVIRTVRG | AGYSLES | 227 | |
| [<i>E. coli</i>] | <u>RLRKALE</u> PGG | HDRMVQTVRG | TGYRFSTRF | 229 | |

Abb. 13: Sequenzvergleich der PhoB-Varianten aus *S. meliloti* und *E. coli*. Homologien zwischen dem *E. coli*-Protein und dem *S. meliloti*-Protein sind gelb unterlegt. Die Helix α^3 , die für die DNA-Bindung wichtig ist, ist unterstrichen

Als Mitglied der OmpR-PhoB Familie erfolgt diese Bindung über ein *winged helix-turn-helix* Motiv, bei dem zusätzlich zum *helix-turn-helix* Motiv Kontakte zur DNA über zwei *wings* stattfinden, die an beiden Seiten an das *helix-turn-helix* Motiv anschließen.^[61] Der Turn ist jedoch etwas länger als üblich, und wird deswegen als *loop* bezeichnet.^[62] Im Gegensatz zu den meisten Mitgliedern dieser Familie hat PhoB jedoch nur einen *wing*. Die Proteine liegen im Ruhezustand unphosphoryliert vor, ihre Struktur ändert sich durch die Phosphorylierung so, daß die spezifische Bindung an die DNA ermöglicht wird.^[55,57] In *Bacillus subtilis* gibt es ein strukturell sehr ähnliches System, PhoP, bei dem die Bindung an die DNA jedoch unabhängig vom Phosphorylierungszustand ist.^[63]

Die Struktur des Proteins wurde sowohl mittels NMR^[62] als auch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt, (Abb. 14),^[57,64] es existiert auch eine Röntgenstruktur vom Komplex mit DNA (Abb. 15).^[57]

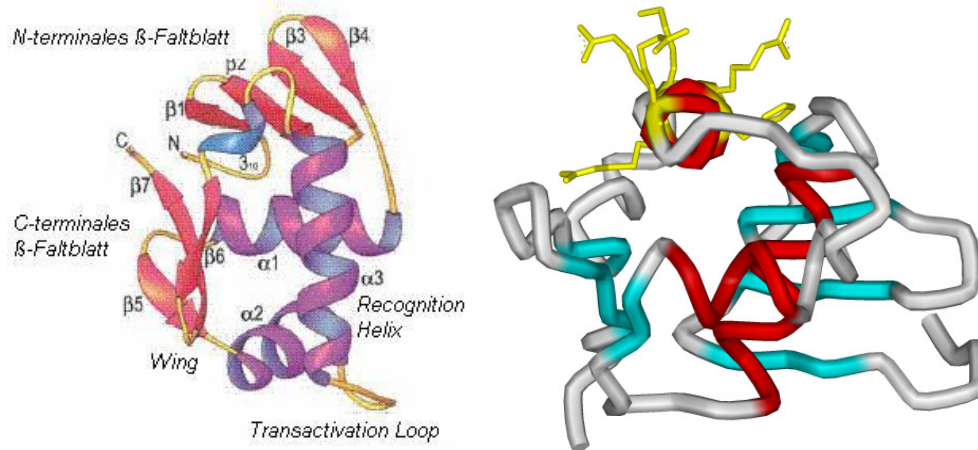


Abb. 14: Röntgenstruktur von PhoB [*E. coli*] mit DNA (links)^[57] und NMR Struktur von PhoB(126-229) [*E. coli*] – Ansicht entlang der Helixachse von α^3 . Die Seitenketten der basischen Aminosäuren der DNA-bindenden Helix α^3 sind gezeigt (rechts)^[65]

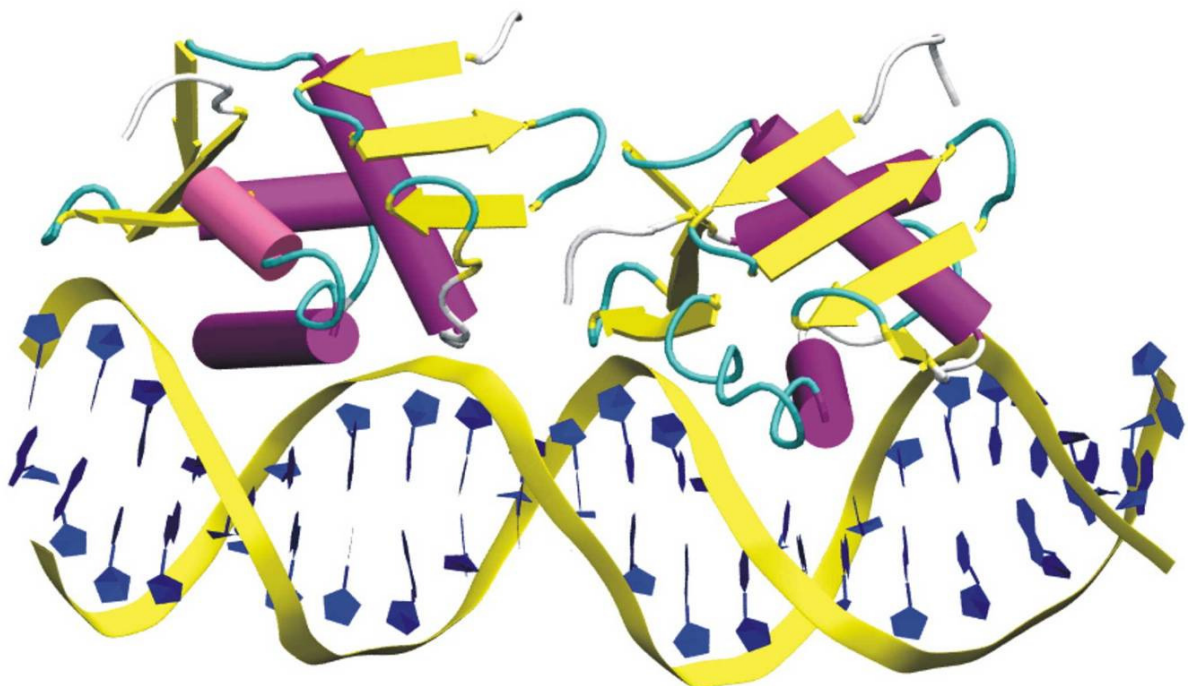


Abb. 15: Röntgenstruktur der Tandem-Bindung zweier Moleküle PhoB an DNA der Sequenz
 GAGCTGTCATAAAGTTGTCACGG
 TCGACAGTATTTCAACAGTGCCC^[57]

Das Protein enthält eine *N*-terminale Phosphorylierungsdomäne (Aminosäuren 1-127)^[66] und eine *C*-terminale DNA-bindende Domäne (*E. coli*: Aminosäuren 128-229, *S. meliloti*: Aminosäuren 128-227).^[67] Aus Deletionsexperimenten ist bekannt, daß PhoB [139-229] an

DNA bindet und in doppelsträngiger DNA die Sequenz TGTCA erkennt.^[67] Die Bindung des phosphorylierten Homodimers erfolgt in der *pho* Box, die aus zwei Wiederholungen der Sequenz CTGTCAT besteht, die durch eine AT-reiche Sequenz von 4bp Länge getrennt sind.^[68] Es können mehrere Promotorboxen vor der Sequenz des regulierten Genproduktes liegen, beim *pstS* Promotor wurden vier Bindestellen gefunden, ⁻⁶²TGTCA, ⁻⁵¹TGTCA, ⁻⁴⁰RTGTCS und ⁻²⁹TTACA. Diese liegen jeweils 11 bp voneinander entfernt, was nahezu genau einer Windung in B-DNA entspricht.^[65]

Aus den NMR- und Röntgenstrukturanalysen ist die Topologie des Proteins bekannt, β^1 - β^2 - β^3 - β^4 - α^1 - β^5 - α^2 - α^3 - β^6 - β^7 . Die Familie OmpR-PhoB ist charakterisiert durch ein N-terminales viersträngiges β -Faltblatt (β^1 - β^2 - β^3 - β^4), eine α -Helix (α^1), die durch eine kurze β -Faltblatteinheit (β^5) mit einer zweiten α -Helix (α^2) verbunden ist, gefolgt von einer dritten α -Helix (α^3) und einem β -hairpin. Helix α^3 , die DNA-Erkennungsregion, ist eine amphiphile Helix. Zwischen α^2 und α^3 befindet sich ein *turn* oder, im Falle von PhoB, ein *loop*, als *transactivation loop* bezeichnet.^[62] Der *turn* des β -hairpin (β^6 -*turn*- β^7) wird oft auch als *recognition wing* W1 (**Abb. 14**).^[61]

Aufgrund der NMR- und Röntgenstruktur und aus Mutationsexperimenten ist bekannt, welche Aminosäuren wie an der Wechselwirkung des Homodimers mit der DNA beteiligt sind.^[57,62,67] Das N-terminale Ende der Helix α^1 bindet an das Zucker/Phosphat Rückgrat der DNA, Pro157 hat van der Waals-Kontakte zu C4, Thr158 bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Phosphatgruppe von C4 aus, Thr158 O γ -C4 O1P und Thr158 N-C4 O1P. Die Helix α^2 liegt parallel zur DNA-Achse und überbrückt die große Furche. Die beiden terminalen Aminosäurereste haben über Wasserstoffbrückenbindungen Kontakt zur DNA, Arg176 zu T13' und Trp184 zur Phosphatgruppe von T5, Arg176 N η 1-T13' O5', Trp184 N ϵ 1-T5 O1P. Der *transactivation loop* bildet eine Wasserstoffbrückenbindung von Glu191 zur Phosphatgruppe von T7 aus, Glu191 N-T7 O2P. Die DNA-bindende Helix α^3 liegt senkrecht zur Achse der DNA in der großen Furche, und besitzt spezifische und unspezifische Kontakte zur DNA. Letztere bestehen aus 5 Salzbrücken mit den Phosphatgruppen, His198 N ϵ 2-G6 O2P, Arg200 N η 1-T16' O2P, Arg203 N η 2-T14' O1P und zwei zwischen Arg193 und T13', Arg193 N η 1-T13' O2P und Arg193 N η 2-T13'O2P sowie aus zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr194 und der Phosphatgruppe von G6 sowie Arg200 und der Desoxyribose von T16', Thr194 O γ -G6 O2P und Arg200 N ϵ -T16' O2P. Die spezifischen Wechselwirkungen beinhalten van der Waals-Kontakte von Thr194 C γ und beiden

Methylgruppen von Val197 mit T7. Diese verhindert die Bindung der DNA in entgegengesetzter Richtung. Weitere spezifische Wechselwirkungen sind die zwei Wasserstoffbrückenbindungen der Guanidiniumgruppe von Arg 201 C6 und N7 des G6. Der C-terminale β -hairpin bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus, zwischen Thr217 sowie Tyr223 und der Phosphatgruppe von T14', Thr217 O γ -T14' O1P und Tyr223 O η -T14' O2P. Außerdem bildet Gly220 zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus, eine mit der Phosphatgruppe von T14' und eine mit T13, Gly220 N-T14' und Gly220 N-T13 O3'. Diese drei Bindungen verhindern, daß Arg219 in der kleinen Furche Wechselwirkungen ausbilden kann, statt dessen bildet dieses eine Wasserstoffbrückenbindung mit T13 aus, und trägt über Kontakte zu T13' und A13 zur Spezifität der Bindung bei, Arg219 N η 2-T13'O4', Arg219 N η 1-T13'O2 und Arg219 N η 1-A13 N3. Bei dem Molekül im Homodimer, das *downstream* sitzt, bleibt nur Arg219 N η 2-T13'O4' erhalten, zwei andere Wasserstoffbrückenbindungen werden zusätzlich ausgebildet, ein unspezifischer Kontakt zur Desoxyribose G3, und eine spezifische Wechselwirkung mit T23', Arg219 N η 2-G3 O4' und Arg219 N η 1-T23'O2.^[57] Diese in der Röntgenstruktur gefundenen Wechselwirkungen stimmen mit denen überein, die durch Mutationsanalysen gefunden wurden (Abb. 16).^[67,69]

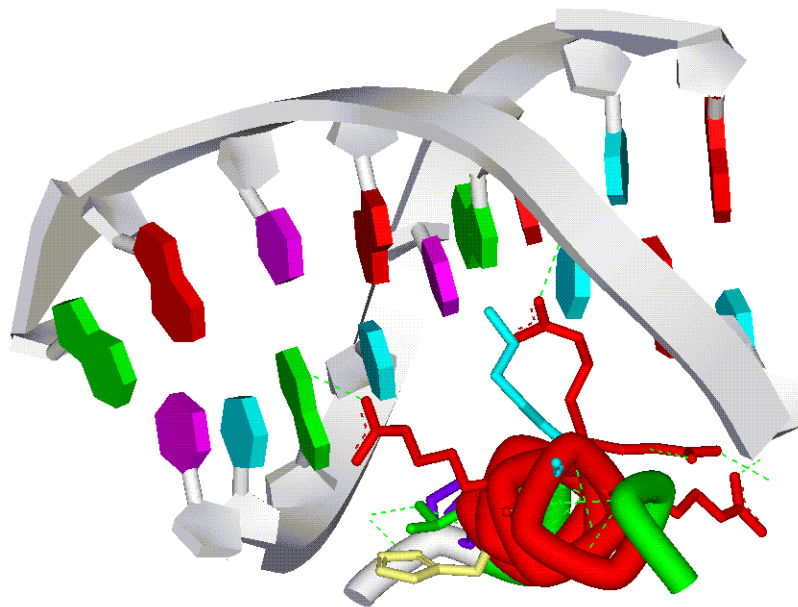


Abb. 16: Bindung der Helix α^3 in der großen Furche der DNA mit Darstellung einiger der an der Bindung beteiligten Reste (Arg, Lys, His, Glu, Thr)^[57]

2.1.3 Interkalatoren

2.1.3.1 Allgemein

Interkalatoren binden an DNA durch Einfügen eines aromatischen π -Systems zwischen zwei Basenpaare. Die Bindung beruht auf dem Stapeln von π -Systemen und elektronischen Dipol-Dipol Wechselwirkungen.^[3] Bei einfachen Interkalatoren erfolgt eine Sättigung der DNA bei einem Verhältnis von 2 Basenpaaren zu einem Interkalator, was zum *neighbor exclusion principle* führt, welches aussagt, daß Interkalatoren nur an jedes zweite Basenpaar binden.^[70-72] Einfache Interkalatoren weisen keine Bindungspräferenz oder eine leichte Präferenz für GC Basenpaare auf.^[3]

Bisinterkalatoren enthalten zwei interkalierende Strukturmodule, und zeigen größere DNA-Bindungskonstanten, langsamere Dissoziationraten und größere Sequenzselektivität als einfache Interkalatoren.^[73] Die die interkalierenden Einheiten verbindende Struktur kann weitere Kontakte zur DNA ausbilden, wodurch die Selektivität und Affinität erhöht werden kann.

2.1.3.2 Triostin A und TANDEM

Triostin A ist ein Mitglied der Familie der Chinoxalin-Antibiotika und wurde zuerst aus *Streptomyces* S-2-210 isoliert.^[3,74-76,77] Diese Familie umfaßt starre, bicyclische Octadepsipeptide mit zwei Chinoxalin-Einheiten, die senkrecht zum starren Octadepsipeptid und parallel zueinander im Abstand von 1,0 - 1.1 nm stehen,^[78-81] und zwei identischen Tetrapeptidsequenzen aus D-Serin, L-Alanin, *N*-Methyl-L-Cystein, *N*-Methyl-L-Valin.

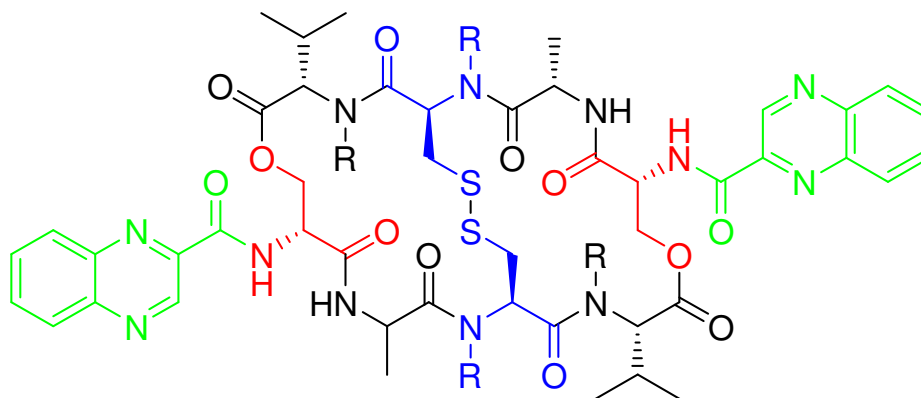


Abb. 17: Struktur von Triostin A (R = Me, GC selektiv) und TANDEM (R = H, AT selektiv).

Sie zeigen antimikrobielle, cytostatische und antivirale Aktivität und sind starke Inhibitoren der RNA-Synthese.^[82,83,84] Das cyclische Depsipeptid bindet in der kleinen Furche der DNA und bildet viele van der Waals-Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen aus, während die Chinoxalineinheiten bevorzugt an 5'-CG Stellen interkalieren, wobei sie 2 Basenpaare überspannen.^[85-87]

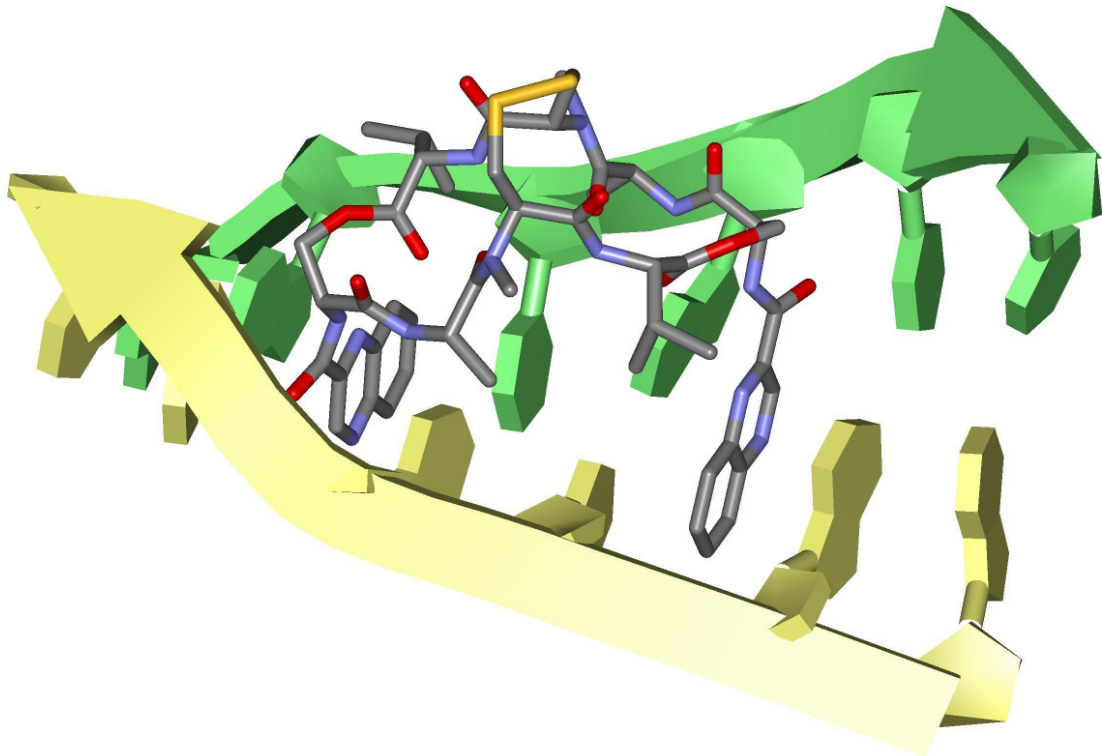


Abb. 18: [*N*-MeCys³, *N*-MeCys⁷] TANDEM im Komplex mit d(GATATC) entsprechend einer NMR-Struktur.^[85,86,88-90]

Die überspannten Basenpaare sind ca. 70-fach stabilisiert, die flankierenden Basenpaare sind es nicht.^[91] Die DNA wird um ca. 40-50° aufgewunden, und die Länge der DNA erhöht sich auf das Doppelte verglichen mit einer Monointerkalation. Die GC-Selektivität scheint hauptsächlich auf den Alanin-Guanin Wasserstoffbrücken zu beruhen, bei denen die Amid-Protonen beider Alaninreste Wasserstoffbrücken mit dem N3 Stickstoff zweier Guanine und deren Carbonyl-Sauerstoffe Wasserstoffbrückenbindungen mit den C2 Aminogruppen der Guanine ausbilden.^[92]

TANDEM ist ein künstliches Analogon zu Triostin A, dessen Amid-Stickstoffe nicht methyliert sind^[93] und das AT-Selektivität aufweist.^[94-99] Diese wird auf intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amid-Protonen beider Alaninreste und dem

N3 Stickstoff des Adenin zurückgeführt. Da die Amid-Protonen der Valinreste Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonyl-Sauerstoffen der Alaninreste ausbilden, stehen letztere nicht zur Bindung an die DNA zur Verfügung.^[93,88]

Hier zeigt sich also deutlich, daß ein verändertes Wasserstoffbrückenbindungsmuster zu einer veränderten Selektivität führt.

Es wurden viele weitere Analoga synthetisiert, sowohl mit Änderungen an den interkalierenden Einheiten als auch mit Änderungen am Octadepsipeptid.^[100,101]

Ein synthetischer Zugang zu Triostin A und TANDEM beruht auf der Synthese der Tetrapeptide, deren Kondensation, Ringschluß, Oxidation der Sulfide zu Disulfidbrücke, und letztendlich dem Einfügen der Chinoxalin-Einheiten.^[102-105]

2.2 Peptide

In lebenden Zellen vorkommende Polyamide aus Aminosäuren werden als Peptide bezeichnet, im engeren Sinne werden Oligomere mit weniger als 100 Aminosäureresten als Peptide, größere als Proteine bezeichnet. In ihnen sind die Aminosäuren über eine substituierte Amidbindung, die Peptidbindung, verknüpft. Die Bindung entsteht durch die Kondensation der α -Aminogruppe der einen Aminosäure mit der α -Carboxygruppe der Anderen (**Abb. 19**).

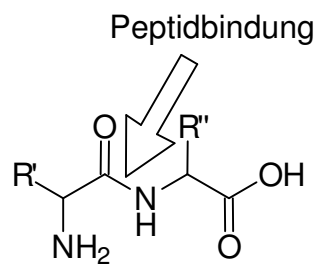


Abb. 19: Über eine Peptidbindung verknüpfte Aminosäuren

N-substituierte Säureamidbindungen, wie in der Peptidbindung, sind stark resonanzstabilisiert. Die Peptidbindung erhält durch Mesomerie partiellen Doppelbindungscharakter, der sich im Abstand zwischen dem N- und dem C-Atom von 0.132 nm zeigt. Dieser liegt zwischen dem Abstand in der C=N-Doppelbindung mit 0.125 nm und dem in der C-N-Einfachbindung von 0.147 nm. Der Doppelbindungscharakter führt dazu, daß die Peptidbindung relativ starr und die Rotationsfähigkeit um die Peptidbindung eingeschränkt ist, die Rotationsbarriere der Peptidbindung beträgt 105 kJ/mol. Die Peptidbindung kann als planar betrachtet werden, obwohl hochaufgelöste Röntgenstrukturen gewisse Abweichungen von der Planarität zeigten.^[106] Diese Abweichung entsteht hauptsächlich durch Drehungen an der OC-N Bindung und durch pyramidale Anordnung der Substituenten am Stickstoff oder am Carbonyl-Kohlenstoff. Da in 48 α -Helices ein Durchschnittswert von $179 \pm 3^\circ$ für den Winkel der OC-N Bindung gefunden wurde, scheint die Annahme der Planarität jedoch gerechtfertigt.^[107] Peptide liegen im allgemeinen in der *trans*-Form vor, da diese 8 kJ/mol stabiler als die *cis*-Form ist. Ausnahmen sind z.B. Peptidbindungen über N-disubstituierte Aminosäuren wie Prolin oder Hydroxyprolin, die zu ca. 6.5% in der *cis*-Form

vorliegen.^[108] Die hieraus resultierende Starrheit und Planarität der Doppelbindung hat großen Einfluß auf die definierte dreidimensionale Struktur der Peptide.

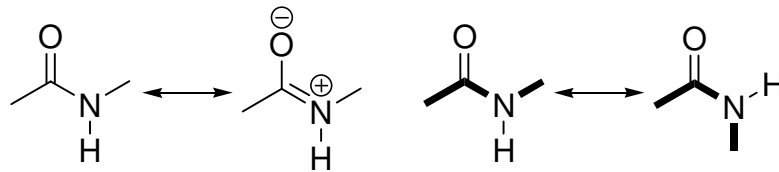
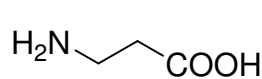
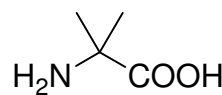


Abb. 20: a) (links) Resonanzformen der Peptidbindung, b) (rechts) *cis/trans*-Isomerie der Peptidbindung

Natürlich vorkommende Proteine und Peptide sind im allgemeinen aus 21, in seltenen Fällen auch 22, unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaut, deren Sequenz durch die DNA des zugehörigen Gens bestimmt wird. Deshalb werden diese Aminosäuren als genetisch codierte Aminosäuren bezeichnet. Diese proteinogenen Aminosäuren sind, mit Ausnahme des Glycins, C^α-substituiert und unterscheiden sich durch ihre Seitenkette. Die DNA-codierten α-Aminosäuren sind chiral und liegen als L-Isomere vor, nur das Glycin mit 2 Wasserstoffsubstituenten am α-C-Atom ist achiral. In der Natur finden sich jedoch auch Peptide, die andere Aminosäuren enthalten. Diese können z.B. D-Aminosäuren oder β-Aminosäuren (v.a. β-Alanin) sein. Eine weitere Klasse von natürlich vorkommenden, nicht genetisch codierten Aminosäuren sind α,α-dialkylierte Aminosäuren. Diese tragen anstelle eines H-Atoms und einer Seitenkette am α-C-Atom zwei Alkylreste (z.B. α-Aminoisobuttersäure).^[109]



β-Alanin
β-Ala



α-Aminobuttersäure
Aib

2.3 Peptidsynthese

2.3.1 Einführung

Um zwei unterschiedliche Aminosäuren oder Peptidfragmente in definierter Weise mit einer Amidbindung zu verknüpfen, muß dafür gesorgt werden, daß eine Komponente eine freie Carboxylgruppe und die andere eine freie Aminogruppe besitzt. Zur Bildung der Peptidbindung muß die freie Carboxylgruppe modifiziert bzw. aktiviert werden, um die Reaktion thermodynamisch zu begünstigen. Diese Aktivierung erfolgt mit einer elektronenziehenden Abgangsgruppe, die die positive Partialladung am Carbonylkohlenstoff erhöht, dessen Reaktivität gegenüber nucleophilen Aminogruppen dadurch ansteigt. Anschließend erfolgt die Reaktion mit der freien Aminogruppe des anderen Fragments.

Um Mehrfachkupplungen und Reaktionen mit den Seitenketten zu verhindern, werden diese mit Schutzgruppen maskiert. Hierbei werden zwei verschiedene Arten von Schutzgruppen unterschieden. Permanente Schutzgruppen maskieren die Seitenketten und gegebenenfalls den C-Terminus des Peptids bei Lösungssynthesen und Kupplung der ersten Aminosäure über die Seitenkette ans Harz bei Festphasensynthesen. Temporäre Schutzgruppen blockieren die Aminogruppe der aktivierten Aminosäure, damit keine Mehrfachkupplungen erfolgen können. Temporäre und permanente Schutzgruppen müssen orthogonal zueinander sein, es muß also möglich sein, sie unabhängig voneinander abzuspalten.^[110]

Die chemische Synthese von Peptiden beruht auf der wiederholten Verknüpfung von Aminosäuren über Peptidbindungen. Dies kann entweder komplett in Lösung erfolgen oder an einer festen Phase (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS).^[111]

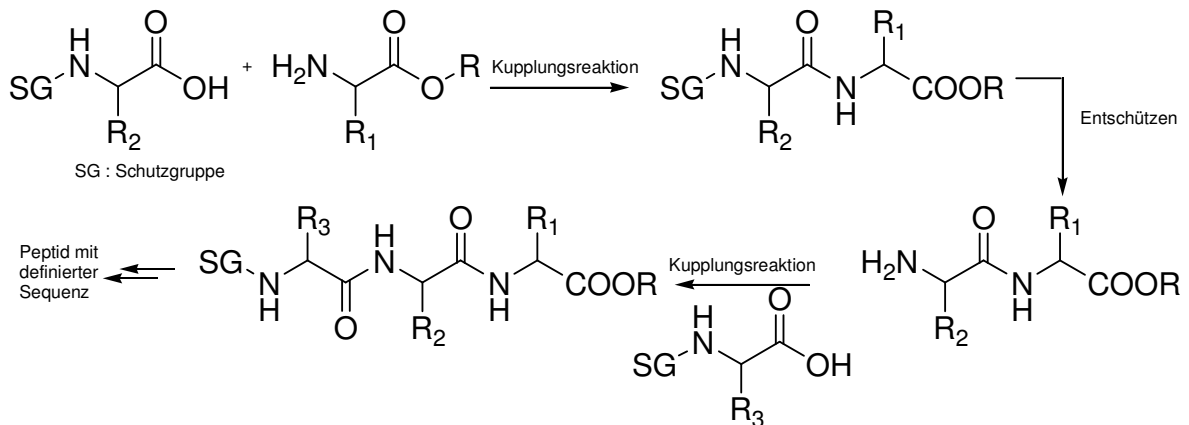


Abb. 21: Prinzip der Peptidsynthese

2.3.2 Lösungssynthese

Diese Synthese erfolgt in homogener Phase. Die vollgeschützten Zwischenprodukte müssen nach jedem Reaktionsschritt gereinigt werden. Hierbei wirkt sich die nachlassende Löslichkeit der Peptide mit wachsender Länge negativ aus, wodurch dieses Verfahren auf die Synthese gut löslicher Peptidderivate beschränkt ist.

2.3.3 Festphasensynthese

Die Festphasensynthese wurde 1963 von Merrifield in die Peptidsynthese eingeführt.^[112] 1984 wurde er für seine Arbeit mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die am Stickstoff temporär geschützte Aminosäure wird über eine reversibel spaltbare Ankergruppierung (Linker) an einen unlöslichen Träger gebunden. Als Träger fungieren meist als Harz bezeichnete Polystyrole. Nach Abspalten der temporären Schutzgruppe wird die nächste Aminosäure gekuppelt. Das Harz wird nach jedem Reaktionsschritt gewaschen, um entstandene Nebenprodukte und Hilfsreagenzien zu entfernen. Diese Reaktionsfolge wird solange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz fertiggestellt ist. Nun wird das Peptid vom Harz abgespalten und die permanenten Schutzgruppen entfernt. Das erhaltene Produkt wird aufgereinigt und charakterisiert. Der Vorteil der Festphasensynthese ist, daß die Reagenzien in großem Überschuß eingesetzt werden können, wodurch eine praktisch vollständige Umsetzung bei kurzen Reaktionszeiten erreicht wird. Es ist möglich, die überschüssigen Reagenzien und die bei der Reaktion entstandenen Nebenprodukte durch Filtrieren und ausgiebiges Waschen des Harzes zu entfernen. Hierin liegt jedoch auch ein Nachteil der Festphasenpeptidsynthese, da die Reagenzien und Nebenprodukte löslich sein müssen, um sie wieder entfernen zu können. Die gesamte Synthese kann automatisiert

werden. Hierzu wird der Träger auf einem Filter vorgelegt und alle weiteren Reagenzien können computergesteuert hinzugefügt werden. Jede Teilreaktion sollte quantitativ verlaufen, da die Gesamtausbeute von der Ausbeute jedes einzelnen Schrittes abhängig ist. Verläuft jede Anbindung einer Aminosäure mit 99.8 % Ausbeute, erreicht man bei 100 Aminosäuren eine Gesamtausbeute von 82 %. Ein Enzym schafft dies mit 100 % in nur 5 Sekunden, während der Syntheseautomat unter idealen Bedingungen 4 Tage benötigt. Nebenreaktionen, die auftreten können, sind z.B. Abspaltung von permanenten Schutzgruppen und Folgereaktionen der entschützten funktionellen Gruppen. Verläuft die Umsetzung mit einer Aminosäure nicht vollständig, kommt es zur Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen, die sich unter Umständen nur sehr schwer vom gewünschten Produkt trennen lassen. Zur Vorbeugung kann eine irreversible Blockierung nicht umgesetzter Aminogruppen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid erfolgen (Capping). Dies schränkt das Auftreten von Deletionspeptiden ein und erleichtert die spätere Aufreinigung.

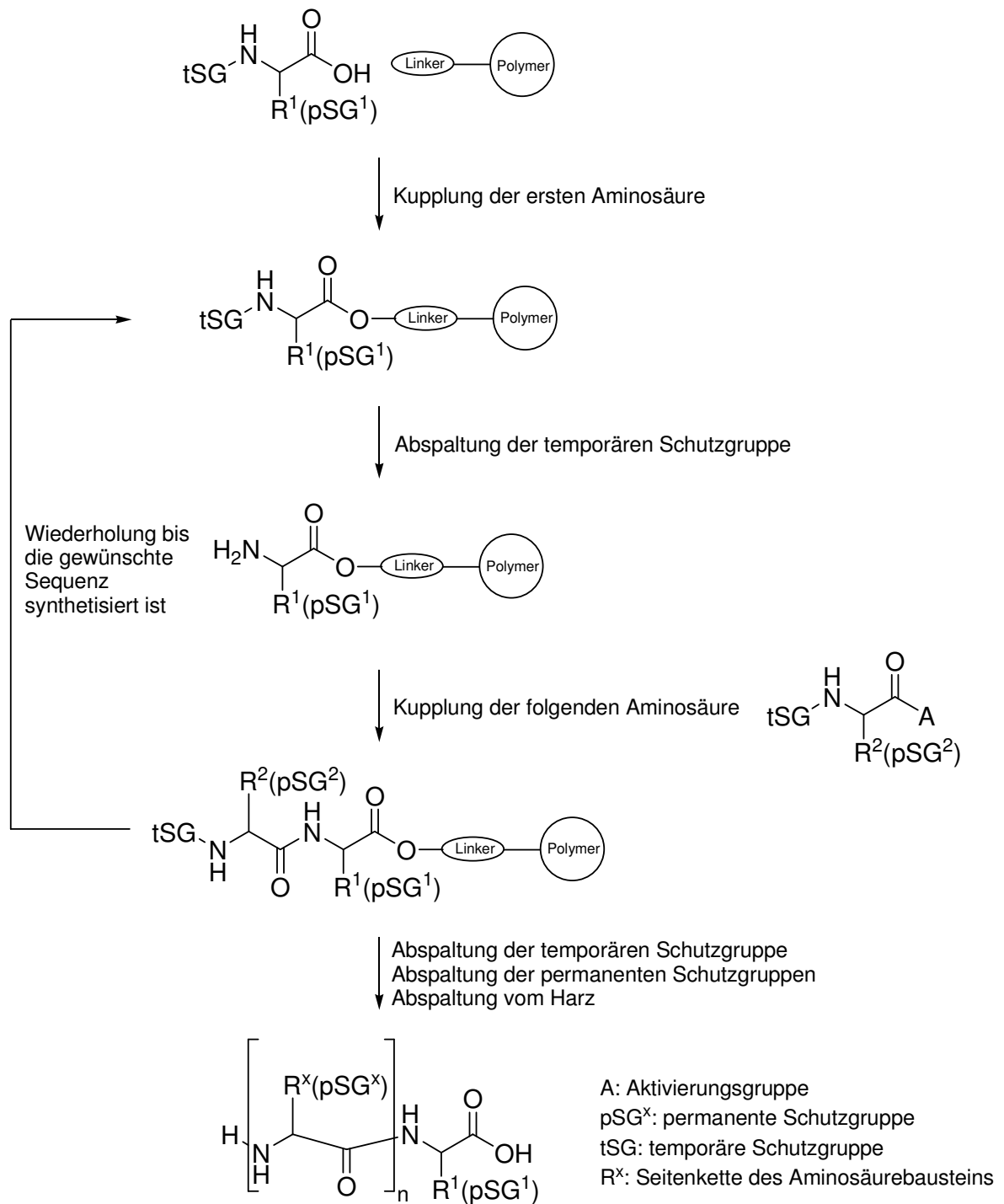


Abb. 22: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese

2.3.4 Kupplungsreagenzien

Die Aktivierung der Carboxylgruppe kann mit einer Reihe verschiedener Methoden geschehen. Aktivierungsreagenzien sollten allgemein anwendbar und einfach zu handhaben (auch in Syntheseautomaten) sein, sollten schnell hohe Ausbeuten liefern, keine Razemisierung während der Reaktion hervorrufen und es sollten keine Nebenreaktionen auftreten.

In der klassischen Peptidsynthese nach Fischer werden zur Aktivierung der Carboxylfunktion Säurechloride verwendet.^[113] Wie viele klassische Methoden spielt die Säurehalogenid-Methoden nur noch eine untergeordnete Rolle, erlebte im letzten Jahr aber eine Renaissance bei speziellen Syntheseproblemen, die nicht mit den heute üblichen Kupplungsreagenzien zu lösen sind. Während in der klassischen Peptidsynthese das zuvor synthetisierte aktivierte Aminosäurederivat eingesetzt wird, erfolgt die Aktivierung der Aminosäure mit Kupplungsreagenzien in Anwesenheit der Aminokomponente, das aktivierte Derivat wird also erst *in situ* erzeugt.

Die ersten eingeführten Kupplungsreagenzien sind Carbodiimide (**Abb.: 23 A**).^[114] Aus theoretischer Sicht ist eine Grundvoraussetzungen für Kupplungsreagenzien, nämlich inertes Verhalten gegenüber primären und sekundären Aminen, nicht erfüllt, da sie mit ihnen zu Guanidinium-Derivaten reagieren können. Diese Nebenreaktion ist aber unter den Bedingungen der Peptidsynthese sehr langsam gegenüber der schnellen Addition der Carboxylgruppe (**B**) und kann daher nicht mit der Säureaktivierung konkurrieren. Die wichtigsten Reagenzien zur Aktivierung mit Carbodiimide sind *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC),^[114] und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC).^[115] Da die Entfernung der als Nebenprodukte entstehenden Harnstoffderivate (**F**) mitunter Probleme bereitet, werden häufig Carbodiimide eingesetzt, deren Harnstoffderivate durch Extraktion mit wässriger Säure abgetrennt werden können. Ein Beispiel hierfür ist das 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC),^[116] dessen Einsatzmöglichkeit in wässriger Lösung ein weiterer Vorteil ist.

Auch die Razemisierung bzw. Epimerisierung^[117] an C^α über die Oxazolombildung, die bei *N*-Acyl-, aber nicht bei Urethan-geschützten Aminosäuren auftritt, sowie die basenkatalysierte intramolekulare Acylgruppenwanderung von *O*-Acyl- (**C**) zum *N*-Acyl-Isoharnstoffderivat (**I**), die zum Abbruch der Reaktion führt, sind problematisch. Diese Nebenreaktion kann durch Zusatz von HOBT^[118] oder dessen Aza-Analogen

HOAt^[119] (**G**) als Additiv zur Reaktionsmischung (König-Geiger-Protokoll^[118]) unterdrückt werden.

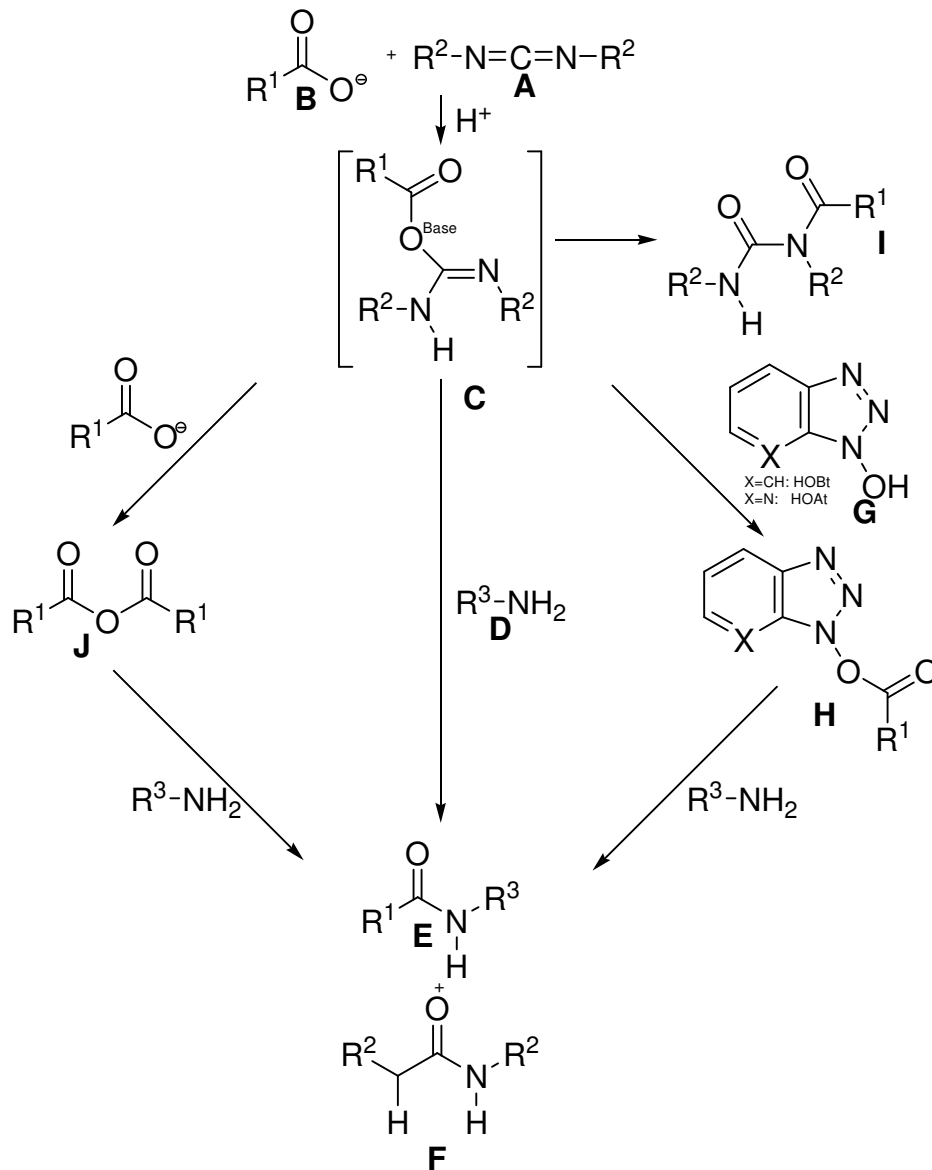


Abb. 23: Mechanismus der Peptidbindung durch Carbodiimide

Durch die Bildung symmetrischer Anhydride (**J**) entsteht ein alternativer Syntheseweg. Die symmetrischen Anhydride entstehen durch die Addition eines weiteren Säureäquivalents (**B**) an das *O*-Acyl-Isoharnstoffderivat (**C**). Das gebildete Anhydrid reagiert mit der Aminofunktion (**D**) weiter zum Peptid (**E**). Hierbei wird die Bildung des *N*-Acyl-Nebenprodukts (**I**) unterdrückt. Aus diesem Grund setzt man oft einen zweifachen Überschuß an Säureedukt hinzu und das Carbodiimid dient nur der Voraktivierung zur Bildung des Anhydrids, bevor die Mischung mit der Aminkomponente versetzt wird.

Durch Zusatz von HOBt und HOAt wird ein Aktivester (**H**) gebildet, der mit zwei *N*-Acyl-Tautomeren im Gleichgewicht steht, bei denen die Acylgruppe mit jeweils einem der anderen Stickstoffe der Triazol-Einheit verbunden ist. Der strukturelle Beweis für die Existenz des 2-*N*-Acyl-Derivates steht jedoch noch aus.^[120] Die *O*-Acyl-Varianten sind deutlich reaktiver als die *N*-Acyl-Tautomere.^[121]

Bei racemisierungsanfälligen Kupplungen ist der Einsatz von HOAt vorzuziehen, da es die Racemisierung im Vergleich zu HOBt deutlich stärker unterdrückt.^[119] Ein Grund für die höhere Effizienz von HOAt liegt im Nachbargruppeneffekt des 7-Aza-Stickstoffatoms und der Ausbildung eines siebengliedrigen cyclischen Übergangszustandes (**K**).^[122] Im Gegensatz dazu wird beim HOBt ein weniger effektiver sechsgliedriger Übergangszustand (**L**) unter Einbeziehung des *N*-Atoms der 2-Position der Triazolgruppe diskutiert.^[123]

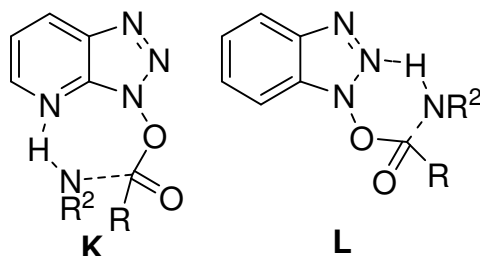


Abb. 24: Übergangszustände der Guanidiniumsalze

Additive wie HOBt und HOAt überführen bei Kupplungsreaktionen die überaktivierten Zwischenprodukte bei der Carbodiimidmethode in die weniger reaktiven Aktivester. Mit den Guanidinium- und Phosphoniumsalzen bilden sie Bestandteile einer eigenen Klasse von Kupplungsreagenzien, die zu den am häufigsten benutzten Kupplungsreagenzien gehören. Verwendet werden vor allem die Guanidiniumsalze TBTU,^[124] HBTU,^[125] sowie das Aza-analoge HATU^[126] und die Phosphoniumsalze BOP^[127] und PyBOP.^[128]

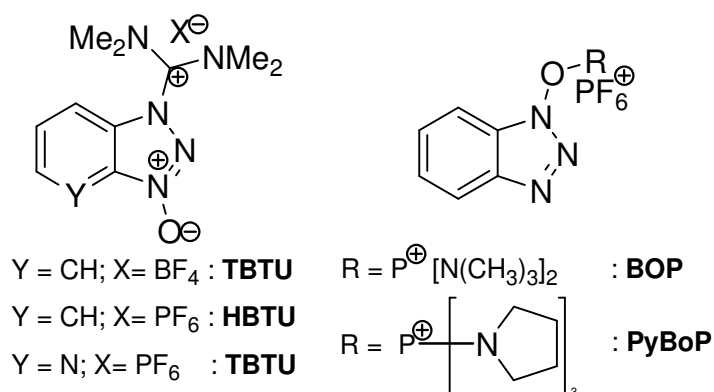


Abb. 25: Als Kupplungsreagenzien verwendete Guanidinium- und Phosphoniumsalze.

Der Einsatz von BOP wird zunehmend geringer, da als Nebenprodukt das toxische und kanzerogene Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) bildet, was bei PyBOP nicht der Fall ist. In Gegenwart einer tertiären Base wie z.B. Diisopropylethylamin (DIPEA) oder Collidin (TMP) sind die Guanidinium- und Phosphoniumsalze in der Lage, die *N*-geschützte Carboxylkomponente vollständig in den Aktivester (**N**) umzuwandeln (**Abb. 26**).^[126] Es entsteht eine Zwischenspezies (**M**), die durch eine intramolekulare Acylgruppenwanderung in den Aktivester überführt wird. Die Vorteile der Guanidinium- und Phosphoniumsalze sind die geringere Toxizität, die einfache Handhabbarkeit, die hohe Reaktionsgeschwindigkeit und die sehr geringe Neigung der Aktivester zur Racemisierung.

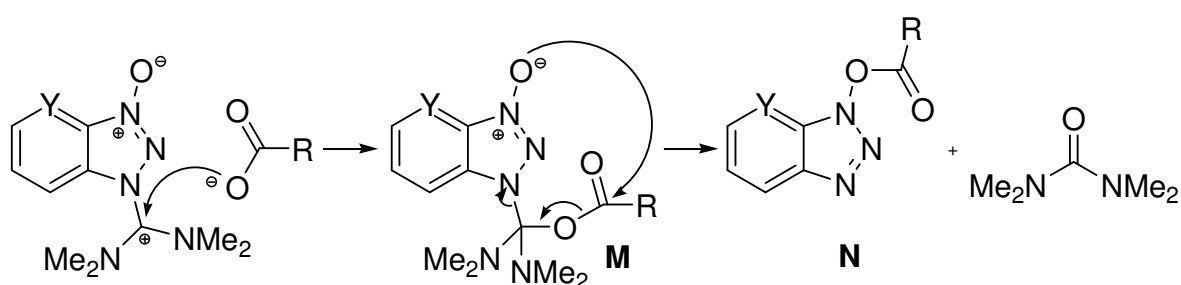


Abb. 26: Mechanismus der Aminosäureaktivierung mit Guanidiniumsalzen

Mittlerweile sind in Analogie zu den Phosphoniumderivaten PyBOP und BOP auch die Uroniumverbindungen *O*-TBTU und *O*-HATU synthetisch zugänglich. Sie unterscheiden sich von den Guanidinium-Verbindungen durch die Lage des C⁺(NMe₂)₂-Substituenten, der sich bei diesen „echten“ Uroniumverbindungen, wie ursprünglich auch für HATU und TBTU postuliert, am 1-Oxy-Substituenten befindet.^[129] Diese Reagenzien haben eine noch deutlich gesteigerte Reaktivität, die sich möglicherweise aus der Lage des oben beschriebenen Gleichgewichts der HOBT-Acyl-Derivate ergibt. Bei den Guanidiniumsalzen existieren im Gleichgewicht deutliche Mengen der *N*-Acyl-Tautomere, während bei den Uroniumsalzen bei Verwendung von Collidin als tertiärer Base nahezu ausschließlich die wesentlich reaktiveren *O*-Aktivester nachweisbar sind. Bei der Verwendung von DIPEA verlagert sich das Gleichgewicht allerdings zu *N*-Acyl-Derivaten und die Reaktivität nimmt deutlich ab.^[129]

2.3.5 Schutzgruppen

Um die Carboxylgruppe und die Aminogruppe zu schützen, stehen eine Vielzahl verschiedener Schutzgruppen zur Verfügung deren wichtigster Unterschied die Methode der Abspaltung nach der Reaktion ist. In der Regel werden Säurefunktionen als Ester und

Aminogruppen als Urethanderivate geschützt. Die Aminoschutzgruppe wird nach der Bildung der Peptidbindung entfernt, damit die nächste Aminosäure mit geschützter Aminogruppe angefügt werden kann. Sie ist deshalb eine temporäre Schutzgruppe. Die Schutzgruppe am Carboxylterminus des zu synthetisierenden Peptids ist eine permanente Schutzgruppe. Sie bleibt solange am Peptid, bis alle Aminosäurereste angefügt worden sind.

Permanente Schutzgruppen müssen trotz wiederholter Abspaltung der temporären Schutzgruppen am Peptid verbleiben und mit milden Methoden vom Peptid entfernt werden können. Temporäre Aminoschutzgruppen müssen leicht abspaltbar sein, das benachbarte chirale Zentrum vor Racemisierung schützen, den zwitterionischen Charakter der Aminosäuren zerstören und die Löslichkeit des Eduktes während der Kupplung erhöhen.

Wichtig ist, daß temporäre und permanente Schutzgruppen in einem Peptid sich entweder orthogonal zueinander verhalten, oder zumindest abgestufte Säurelabilität aufweisen, da bei der Abspaltung der temporären Schutzgruppe die permanente Schutzgruppe nicht abgespalten werden darf. Auch sollte die Racemisierung der aktivierten Aminosäuren weitgehend ausgeschlossen sein.

In der Praxis wird meist entweder nach *tert*-Butoxycarbonyl- / Benzyl-Schutzgruppenstrategie (Boc / Bzl) oder nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- / *tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie (Fmoc / *t*Bu) gearbeitet.

2.3.5.1 Boc / Bzl-Schutzgruppenstrategie

Die Boc / Bzl-Schutzgruppenstrategie basiert auf der unterschiedlichen Säurelabilität der temporären und der permanenten Schutzgruppen. Als temporäre Schutzgruppe wird die Boc-Schutzgruppe verwendet, die mit 20 – 50 % TFA spaltbar ist. Die Seitenketten werden mit Gruppen vom Benzyltyp geschützt, die unter den Abspaltbedingungen der temporären Schutzgruppen stabil sind. Aufgrund der höheren Säurestabilität erfolgt die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen erst am Ende der Peptidsynthese durch eine starke Säure, z.B. wasserfreies HF, gleichzeitig mit der Abspaltung des Peptids vom Harz. Ein Nachteil dieser Strategie ist der Umgang mit starken Säuren, ein weiterer die Tatsache, daß sich der Aufbau eines Peptids mit labilen Bindungen, wie Asp-Pro und Asp-Aib schlecht realisieren läßt. Auch die Synthese geschützter Peptide gestaltet sich schwierig. Ein Vorteil ist jedoch die Möglichkeit der Synthese von Peptiden, die zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen

neigen, da diese durch die wiederholte Azidolyse immer wieder aufgebrochen werden und somit die Reaktion nicht negativ beeinflussen können.

2.3.5.2 Fmoc / ^tBu-Schutzgruppenstrategie

Diese Strategie beruht auf der Orthogonalität der Schutzgruppen. Als temporäre Schutzgruppe wird die basenlabile 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc)^[130,131] eingesetzt, die von sekundären Aminen wie Piperidin und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en^[132] (DBU) abgespalten wird. Als permanente Schutzgruppen werden für viele Seitenkettenfunktionalitäten säurelabile Schutzgruppen vom *tert*-Butyl-Typ, aber zum Beispiel auch die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-Schutzgruppe (Pbf) für Arginin eingesetzt (**Abb. 27**).^[133] Je nach Syntheseproblem kann noch auf eine Vielzahl weiterer Schutzgruppe zurückgegriffen werden. Es sind Aminosäurederivate verfügbar, deren Seitenkettenschutzgruppen unter Pd(0)-Katalyse, mit Hydrazin, Thiolen, Fluoriden oder auch durch Enzyme abgespalten werden können.

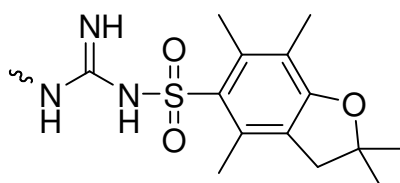


Abb. 27: Die Pbf-Schutzgruppe an der Guanidinogruppe eines Arginins

Die Fmoc-Schutzgruppe erlaubt die Bestimmung des Umsatzes einer Kupplung, da bei der Abspaltung mit 20 % Piperidin Dibenzofulven entsteht, das von Piperidin abgefangen wird. Das entstandene Dibenzofulven-Addukt kann als gutes Chromophor UV-spektroskopisch detektiert werden.

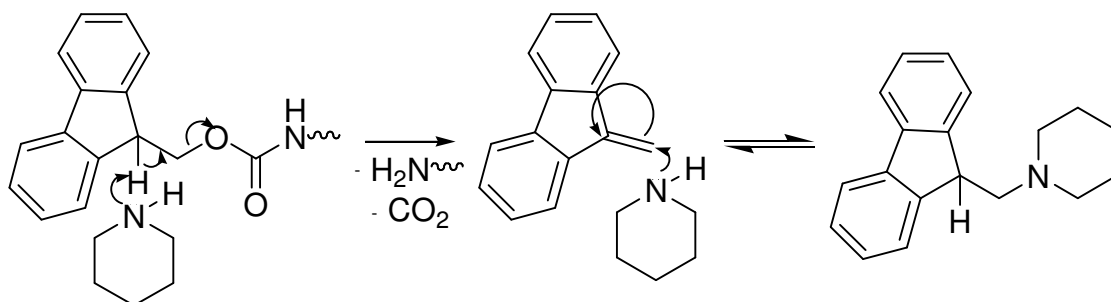


Abb. 28: Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes

Bei der Abspaltung der permanenten Schutzgruppen unter sauren Bedingungen werden häufig *Scavenger* wie Triisopropylsilan (TIPS) oder Ethandithiol (EDT) zugesetzt, die reaktive Carbokationen abfangen und mögliche Nebenreaktionen so verhindern.^[134-137] Die Bildung von β -Faltblattstrukturen kann durch Zusatz strukturbrechender Lösungsmittel wie DMSO, Trifluorethanol (TFE), Hexafluorisopropanol (HFIP) verhindert werden.^[138,139] Der Einbau von Pseudoprolindipeptidderivaten ist eine weitere Möglichkeit, die Aggregation und Assoziation der Peptidkette zu verhindern.^[140,141] Diese werden bei der Abspaltung der permanenten Schutzgruppen mittels TFA in Threonin- oder Serinreste umgewandelt. Auch der Einsatz von Aminosäurederivaten, die neben der Fmoc-Gruppe z.B. noch einen α -Amino-Hmb-Schutz als Rückgrat-Amid-Schutz tragen verhindert Aggregationen und Assoziationen der Peptidkette.^[142-145]

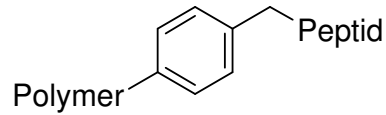
2.3.6 Harze für die Festphasensynthese

Die in der Festphasensynthese verwendeten Harze müssen einige Eigenschaften besitzen, um in der Synthese Anwendung zu finden. Sie müssen unter allen verwendeten Reaktionsbedingungen chemisch inert sein, dürfen sich nicht in den verwendeten Lösungsmitteln lösen und müssen leicht filtrierbar sein. Es haben sich verschiedene polymere Träger etabliert, in erster Linie mit 1-2% Divinylbenzol (DVB) quervernetztes Polystyrol, aber auch Tentagel und Cellulose. Die verwendeten Polymere müssen eine hohe Quellbarkeit in den benutzten Lösungsmitteln haben. Mit 1-2% DVB quervernetztes Polystyrol quillt in Dichlormethan (DCM) um das 5-fache, in DMF um das 3,5-fache und in Methanol um den Faktor 0,95.

Der wichtigere Teil des Harzes ist allerdings der Linker, über den das Peptid an das Harz gebunden ist. Es stehen viele verschiedene Linker zur Verfügung, die sich durch unterschiedliche Abspaltbedingungen für die Peptide unterscheiden. Die Säurestabilität läßt sich z.B. bei Benzyl-Typ-Linkern durch elektronenliefernde Substituenten verringern, durch die das als Intermediat auftretende Benzyl-Kation zusätzlich stabilisiert wird, so daß die Abspaltung bereits unter schwach sauren Bedingungen durchgeführt werden kann.

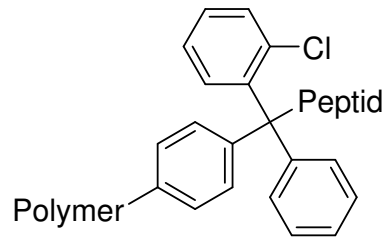
Von Merrifield^[146] wurde chlormethyliertes, quervernetztes Polystyrol (Merrifield-Harz) eingeführt. Heute wird je nach verwendeten temporären Schutzgruppen meist das Wang-Harz verwendet, ein mit 1% DVB quervernetztes Polystyrol, an das ein säurelabiler *p*-Hydroxybenzyl-Linker gebunden ist.^[147] Häufig wird auch z.B. das sehr säurelabile 2-Chlor-Trityl-Harz^[148] (Barlos-Harz) oder ein Safety-catch-Harz eingesetzt. Weiterhin seien

noch der Hycram-Linker, der unter Pd(0)-Katalyse gespalten wird,^[149] und die Existenz photolabiler Linker erwähnt, die durch Licht bestimmter Wellenlängen gespalten werden.^[150-152]



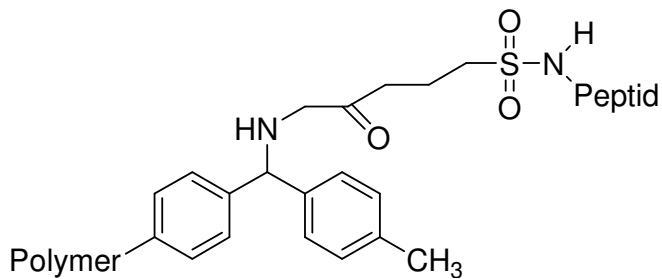
Merrifield-Harz

Abspaltung des Peptids mit flüssiger HF



2-Chlortrityl-Harz

Abspaltung des Peptids mit 0.5-1% TFA in DCM^[148] oder mit HFIP/DCM 1:4^[153]



Aliphatisches Safety-Catch-Harz

Abspaltung des Peptids mit einem Nucleophil nach Aktivierung mittels Iodacetonitril

2.3.6.1 Safety-catch-Harze

Bei Safety-catch-Harzen sind die Linker, mit denen die Peptide an das Polymer gebunden werden, unter den Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese stabil und müssen vor der Abspaltung des Peptids aktiviert werden. Die Aktivierung kann auf verschiedenste Art geschehen. So kann z. B. die Carbonylgruppe durch den negativen induktiven Effekt (-I-Effekt) einer Nachbargruppe aktiviert werden. Hierzu muß diese Nachbargruppe nach der Peptidsynthese mit einem Reagenz umgesetzt werden, das durch die Reaktion den elektronenziehenden Effekt der Nachbargruppe erhöht.^[154]

An das 4-Sulfamylbutyryl-Harz ist die erste Aminosäure als *N*-Acylsulfonamid gebunden.^[155] *N*-Acylsulfonamide sind sowohl unter basischen als auch stark nucleophilen Reaktionsbedingungen stabil.

Um das Peptid nach der Reaktion vom Harz abzuspalten, wird das *N*-Acylsulfonamid erst mittels Iodacetonitril zum *N*-Cyanomethyl-Derivat umgesetzt. Dieses kann dann mit Nucleophilen unter milden Reaktionsbedingungen abgespalten werden. Im Falle eines *N*-Nucleophils entstehen das Säureamid aus dem Peptid und dem Nucleophil.

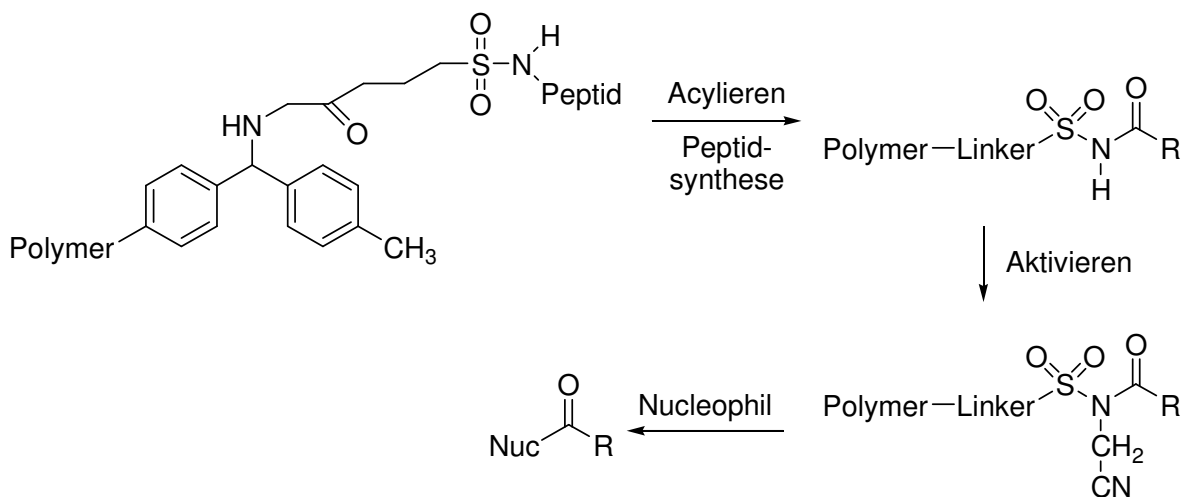
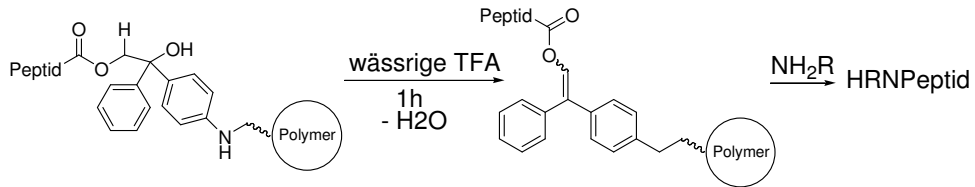


Abb. 29: SPPS mit 4-Sulfamyl-butyryl-Harz

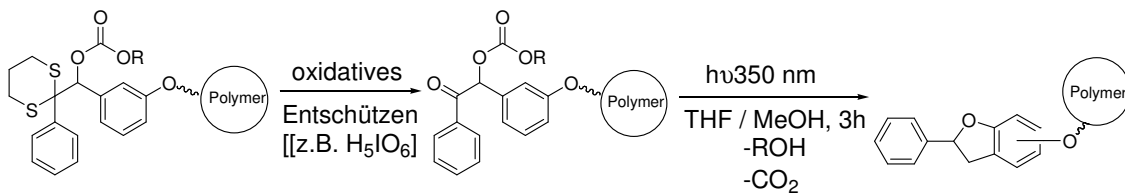
Weitere Möglichkeiten der Abspaltung sind z. B. Aktivierung durch den mesomeren Effekt (-M-Effekt) einer der Carbonylgruppe benachbarten X-Y=Z-Einheit. Dies erfolgt beispielsweise durch Abspaltung von Wasser zum Enolester (X = O, Y = CH, Z = C) mit anschließender Freisetzung des Peptids durch ein Amin.^[156] Da die Abspaltung des Wassers mit TFA erfolgt, wird die Verwendung säurelabiler Schutzgruppen

ausgeschlossen. Auch photochemische Abspaltung des Zielmoleküls nach Oxidation,^[157] oder enzymatische Aktivierung mit anschließender intramolekularer Umlagerung und Abspaltung sind möglich (**Abb. 30**).^[158,159]

Aktivierung über -M-Effekt



Photochemische Abspaltung nach Aktivierung



Enzymatische Aktivierung mit anschließender intramolekularer Umlagerung

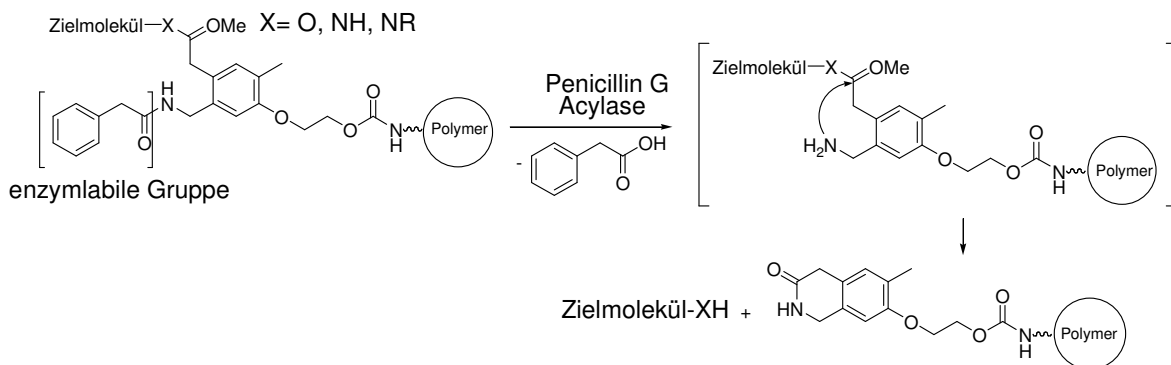


Abb. 30: Weitere Möglichkeiten zur Abspaltung des Zielmoleküls vom Harz

2.4 Photoschaltbare Peptide

2.4.1 Einleitung

Die Konformation eines Peptides oder Proteins ist entscheidend für die Wechselwirkung mit seinem Bindungspartner. Auf welche Art auch immer die Bindung stattfindet, sei es elektrostatisch, über Wasserstoffbrückenbindungen oder durch Interkalation, wenn die daran beteiligten Atome nicht an der für einen Kontakt notwendigen Position sind, kann eine Wechselwirkung nicht in der üblichen Weise stattfinden. Wenn man die Konformation von außen beeinflussen könnte, wäre es also möglich, die Bindungsfähigkeit ein- und auszuschalten.

Eine mögliche Art, die Konformation zu verändern, wäre der Einbau eines photoschaltbaren Strukturelementes, das durch Licht bestimmter Wellenlängen zwischen zwei definierten Zuständen hin- und hergeschaltet werden kann. Weitere Möglichkeiten wären z.B. Schaltung durch Änderungen im pH-Wert oder Änderungen in den Konzentrationen von Salzen im Medium.

2.4.2 Photoschalter

Licht bietet viele Vorteile als Mittel der Manipulation an Systemen, da es durch moderne Laser sehr eng räumlich und zeitlich begrenzt angewendet werden kann, und es keine Rückstände im System hinterläßt.^[160] Das am häufigsten verwendete System ist Azobenzol, das in den vergangenen Jahrzehnten in einer großen Anzahl photoschaltbarer Systeme eingesetzt wurde. Hier wird zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Isomer hin und her geschaltet. Neben verschiedenen Anwendungen bei Peptiden^[161] und Proteinen^[162] wurde es auch in auch Polymere,^[163,164] flüssig-kristalline Polymere^[165] und Cyclodextrine eingebaut.^[166] Die Anwendung bei Peptiden kann entweder im Peptidrückgrat, sowohl bei linearen,^[167] als auch bei cyclischen und bicyclischen Peptiden^[160,168-175] oder auch als funktionelle Gruppe in der Seitenkette erfolgen,^[176-191] wobei auch ein schaltbarer cyclischer Abschnitt im Peptid entstehen kann.^[192-195]

Neben Azobenzol kann auch ein Spiropyran-Derivat eingesetzt werden, das zwischen der geschlossenen, neutralen Spiro-Form und der geöffneten, zwitterionischen Merocyanin-Form hin und her geschaltet werden kann.^[161,162,196] Sowohl vom Azobenzol als auch vom

Spiropyran existieren verschiedene Derivate, die vor allem verbesserte Löslichkeit in wäßrigen Systemen haben.^[197,198]

Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Photomodulierung des Peptidrückgrates. Dies gelingt durch die Verwendung einer Thioxozeptidbindung. Dies ist ein isosterer Ersatz der Peptidbindung der sich zwischen der *cis*- und der *trans*-Form hin und her schalten läßt.^[199-201] Die weiteren Eigenschaften des Biomoleküls ändern sich kaum, im Gegensatz zu den vorgenannten Systemen.

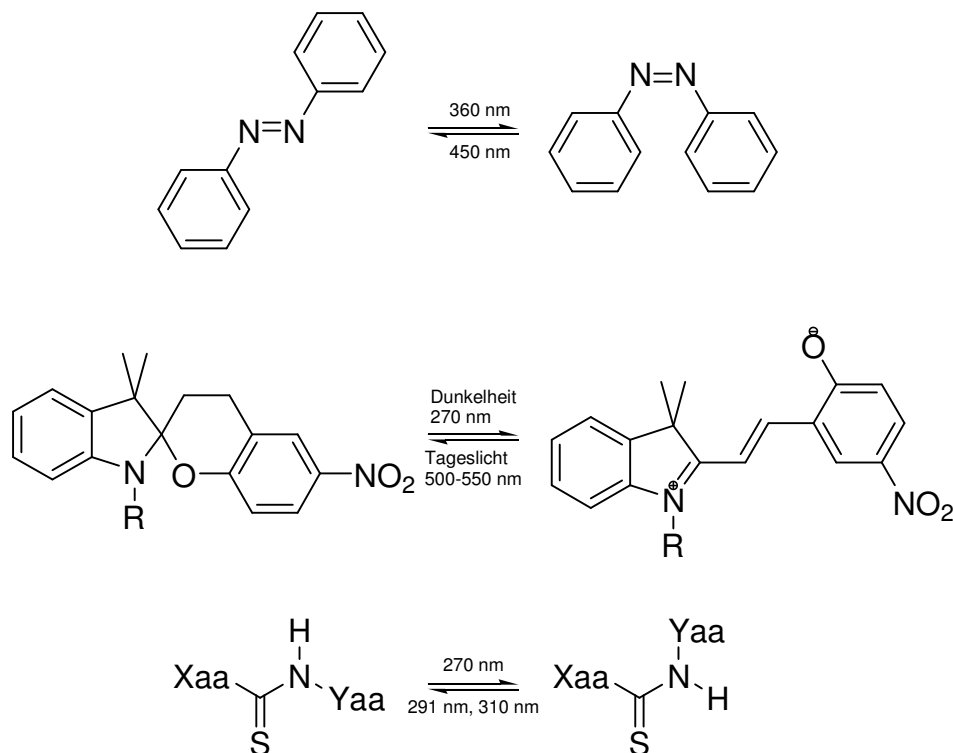


Abb. 31: Verschiedene Photoschalter: Azobenzol (oben), Spiropyran (mitte), Thioxozeptidbindung (unten)

2.4.3 Azobenzol

Azobenzolderivate haben viele positive Eigenschaften, die sie zu den am häufigsten eingesetzten Photoschaltern machen. Besonders die hohe Photostabilität, die hohe Quantenausbeute und die sehr schnelle nahezu vollständige, reversible Schaltung zwischen den Isomeren,^[202] die in 1 ps von *cis* nach *trans* und in 10 ps von *trans* nach *cis* erfolgt,^[203-207] wobei signifikante Änderungen in der Geometrie und Polarität auftreten, zeichnen dieses System aus.^[160] Die thermische Rückschaltung ist langsam, dauert über 200h,^[161] und führt zu 100% zum *trans*-Isomer.^[174,202,208] Je nachdem, in welches Peptidsystem der Photoschalter eingebaut ist, werden nach Bestrahlung 70-90 % des *cis*-

Isomere erhalten.^[192] Aus diesem Grund sollte in der inaktiven Form das *trans*-Isomer des Moleküls vorhanden sein.

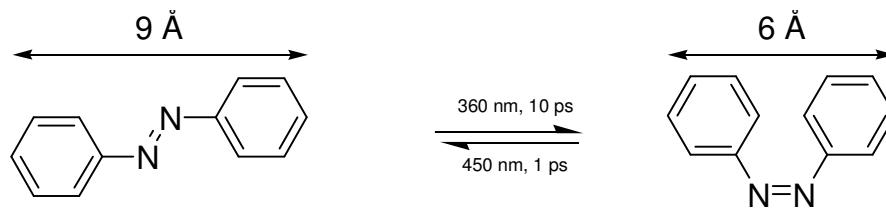


Abb. 32: Photoschaltung von Azobenzol^[160,209]

Beispielsweise kann durch einen Ringschluß mittels einer Azobenzoleinheit zwischen den Seitenketten von Aminosäuren innerhalb einer α -Helix diese entweder stabilisiert oder destabilisiert werden, je nachdem in welchem Abstand die überbrückten Aminosäuren sich in der α -Helix befinden (**Abb. 33**).^[192]

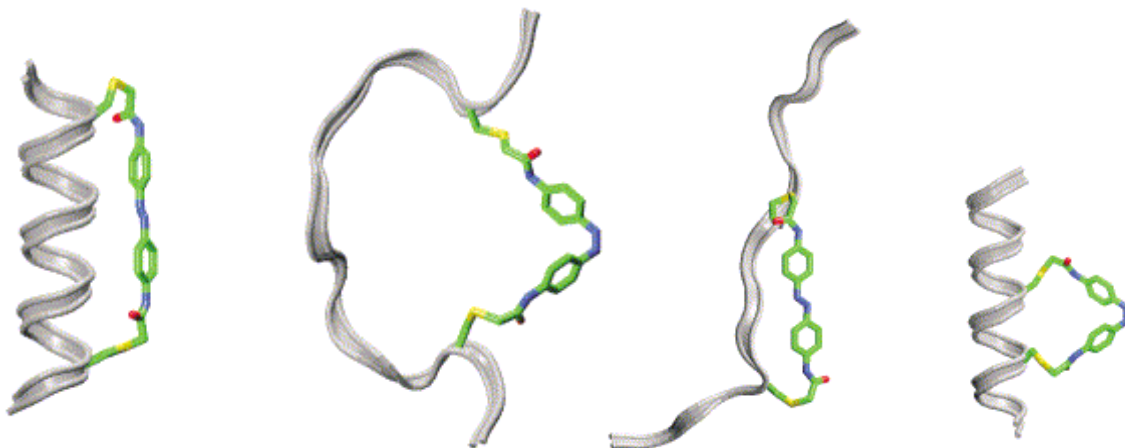


Abb. 33: Destabilisierung einer α -Helix durch Isomerisierung von *trans* nach *cis* bei einem Abstand von 11 Aminosäureresten zwischen den überbrückten Seitenketten (links). Stabilisierung einer α -Helix durch Isomerisierung von *cis* nach *trans* bei einem Abstand von 4 Aminosäureresten zwischen den überbrückten Seitenketten (rechts)^[192]

Werden zwei basische Binderegionen eines bZIP-Proteins über eine Azobenzoleinheit verbunden, kann die Photoschaltung von *trans* nach *cis* in Gegenwart von DNA stattfinden, ist dann jedoch ca. 8x langsamer als in Abwesenheit von DNA. Dies wird mit einer Stabilisation des *trans*-Isomers erklärt, die durch unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA erreicht werden soll. Die Rückschaltung von *cis* nach *trans* scheint nicht möglich zu sein (**Abb. 34**).^[167]

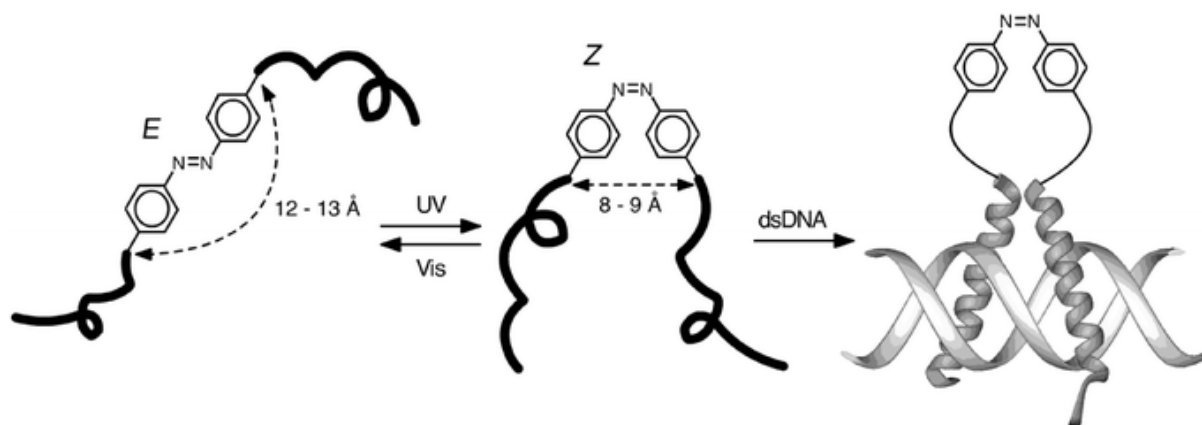


Abb. 34: Über einen Photoschalter verbundene DNA-bindende bZip-Domänen.^[167,210]

2.5 Oberflächenplasmonresonanz

2.5.1 Einleitung

Die Bestimmung der Bindungskonstanten für spezifische Bindung von Proteinen oder Peptiden an DNA ist nicht trivial. Zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung dieser Affinitäten können u. a. Mikrokalorimetrie, Kraftspektroskopie, optische Pinzetten, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), oder Oberflächenplasmonresonanz (SPR), herangezogen werden. Daneben gibt es eine Vielzahl anderer, biochemischer Methoden wie z. B. EMSA oder Footprinting.^[211] Die Kraftspektroskopie und die optischen Pinzetten arbeiten jeweils nur mit einem einzelnen Molekül, während in der Mikrokalorimetrie und bei der Oberflächenplasmonresonanz ein Molekülensemble zur Bestimmung der Bindungskonstanten eingesetzt wird.

Die Oberflächenplasmonresonanz verlangt keine Markierung der zu untersuchenden Bindungspartner, weshalb sie eine sehr populäre Analysemethode geworden ist, um qualitative und quantitative Untersuchungen reversibler, makromolekularer Wechselwirkungen biologischer Systeme durchzuführen. Hierzu wird ein Bindungspartner, als Ligand bezeichnet, auf der Sensoroberfläche immobilisiert, und die Wechselwirkung mit einem in einer Lösung über die Sensoroberfläche geleiteten zweiten Bindungspartner, dem sogenannten Analyten, in Echtzeit untersucht.

Vorteile sind der sehr geringe Substanzbedarf, da biologische Makromoleküle oft nur in kleinen Mengen erhältlich sind, und die geringe Anforderung an die Reinheit eines der Bindungspartner.

Mit der Oberflächenplasmonresonanz können Affinitäten im Bereich von mM bis pM bestimmt werden. Die Oberflächenplasmonresonanz ist mittlerweile der Standard, um Wechselwirkungen von Biomolekülen in Echtzeit zu untersuchen.^[212]

2.5.2 Physik der Oberflächenplasmonresonanz

Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz wurde bereits 1912 beschrieben.^[213] Wird ein Metallgitter mit in der Einfallsebene polarisiertem Licht senkrecht zum Gitter bestrahlt, ist im reflektierten Licht eine scharfe Linie zu beobachten, die ihre Lage mit dem Einfallswinkel ändert. Das Phänomen wurde erst in den frühen 40er Jahren des

20. Jahrhunderts als Anregung elektromagnetischer Oberflächenwellen an der Metall-Luft-Grenzfläche erklärt,^[214] und 1960 wurde der Begriff Oberflächenplasmonresonanz für das Phänomen eingeführt.^[215] Ende der 1970er wurden die Möglichkeiten der Charakterisierung von dünnen Schichten^[216] und der Verfolgung von Prozessen auf Metalloberflächen erkannt.^[217] Im Jahr 1983 wurden dann erste Biosensoren auf Grundlage der Oberflächenplasmonresonanz entwickelt.^[218,219]

Die Plasmabeschreibung der Maxwell-Theorie liefert den theoretischen Hintergrund für die Oberflächenplasmonresonanz. Die Maxwell-Theorie beschreibt freie Elektronen in Metallen als Elektronenflüssigkeit hoher Dichte, als Plasma. Ladungsdichtefluktuations auf der Oberfläche der Plasmen werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet.^[220] Dies sind Wellen oszillierender Oberflächenladungsdichte, die über die Metalloberfläche wandern.^[221] An dünnen Metallschichten können die Oberflächenplasmonen durch reflektierte Photonen oder Elektronen, die die Metalloberfläche passieren, unter Resonanzbedingung angeregt werden. Im Folgenden wird die photonische Anregung beschrieben. Plasmonen können nur an Grenzflächen von Medien mit Dielektrizitätskonstanten unterschiedlicher Vorzeichen photonisch angeregt werden, z. B. Metall \leftrightarrow Dielektrikum.^[222,223] Hierbei muß eine Resonanzkopplung zwischen Licht und freien Metallelektronen erfolgen. Die Auswahl des Metalls ist entscheidend, da sich die Elektronen entsprechend des freien Elektronen-Modells verhalten müssen.^[224] Geeignete Metalle sind z. B. Silber, Gold, Kupfer und Aluminium, wovon Silber aufgrund des schmalen SPR-Resonanzpeaks und Gold aufgrund der Stabilität am häufigsten genutzt werden.^[225] Eine direkte Anregung der Oberflächenplasmonwelle an einer planaren Metall-Dielektrikum-Grenzfläche ist von der Seite des Dielektrikums nicht möglich, weil der Impuls der Oberflächenplasmonwelle immer größer ist als der Impuls des Lichtes im Dielektrikum.^[226] Eine Möglichkeit zur Anregung bietet der Effekt der abgeschwächten Totalreflexion oder *attenuated total reflection*, ATR. Dieser Effekt wird bei der Technik der Prismen-Koppler genutzt, auf der auch die Biosensoren des in dieser Arbeit verwendeten Biacore[®] 3000 beruhen. Diese Art von Biosensoren nutzt die Totalreflexion von Licht an der Grenzschicht zwischen einem mit einer dünnen Metallschicht bedampften Glasprisma und der Probenlösung (Schichtdicke $d < \text{Wellenlänge } \lambda$).^[227-229]

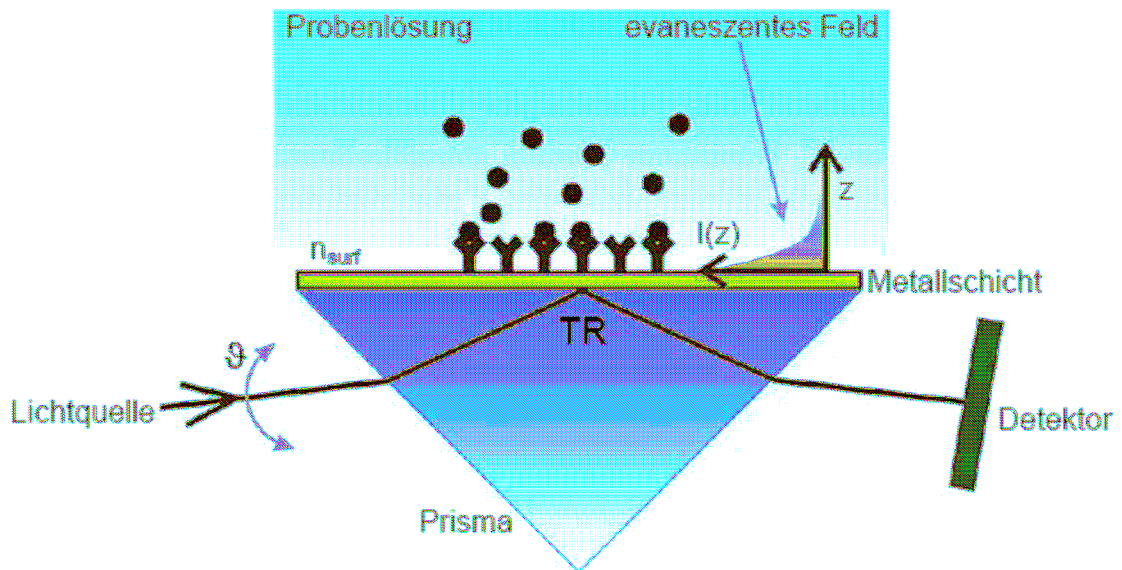


Abb. 35: Aufbau eines SPR-Biosensors mit Prismen-Koppler
 TR: Totalreflektion, n_{surf} : Brechungsindex der Lösung in der Umgebung der Sensoroberfläche, $I(z)$: Intensität des evaneszenten Feldes im Abstand z zur Sensoroberfläche^[230]

Die Resonanz-Anregung der Plasmonen an der äußeren Grenzschicht der Metallschicht erfolgt durch eine evaneszente elektromagnetische Welle. Diese wird durch das einfallende Licht unter Totalreflektion am Glasprisma generiert, und erzeugt oberflächliche Ladungsdichtewellen, also Oberflächenplasmonen, die parallel zur Grenzschicht verlaufen. Das Phänomen der Totalreflektion tritt auf, wenn Licht durch ein optisch dichtes Medium auf eine Grenzschicht zu einem Medium mit geringerer optischer Dichte trifft. Hierbei durchdringt ein Teil des Lichtes, die evaneszente Welle bzw. das evaneszente Feld, die Oberfläche in das Medium mit geringerer optischer Dichte bis auf eine Eindringtiefe von einer Wellenlänge.^[231] Dabei fällt die Amplitude des elektromagnetischen Feldes der Oberflächenplasmonen exponentiell mit dem Abstand senkrecht zur Oberfläche ab. Sie reicht wenige Hundert Nanometer in das angrenzende Medium des Sensors, wobei die Anregung auch innerhalb der Metallschicht erfolgt. Die Verteilung des elektromagnetischen Feldes der Oberflächenplasmonen ist dabei sehr asymmetrisch, 90-95% des Feldes sind im Dielektrikum konzentriert.

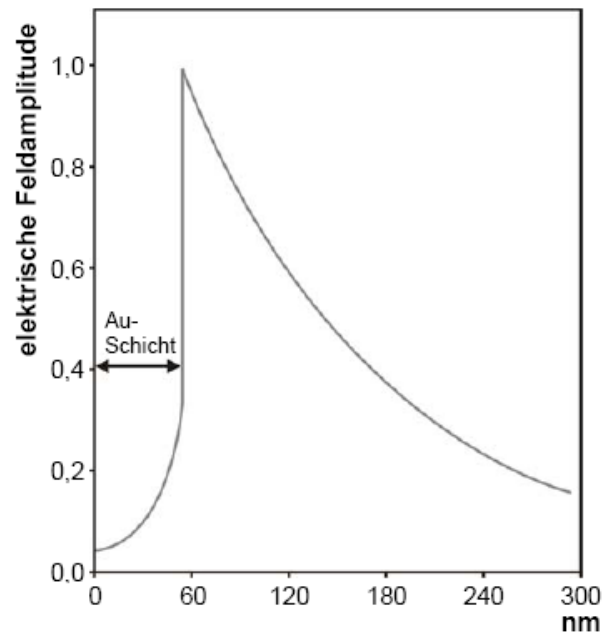


Abb. 36: simulierte Kurve des evaneszenten Feldes als Funktion des Abstandes von der Prisma-Metall-Grenzschicht^[232]

Die Anregung der Plasmonen kann nur unter einem definierten Einfallswinkel, dem Resonanzwinkel, erfolgen. Zur Anregung der Plasmonen muß der Wellenvektor des Lichts bzw. der Impuls des Photons, der in der Ebene der Metalloberfläche auf den Wellenvektor der Plasmonen trifft, den gleichen Betrag und die gleiche Richtung bei gleicher Frequenz haben. Wenn beide Wellen miteinander wechselwirken, kommt es durch Resonanz zum Energietransfer. Dieser Effekt wird als Oberflächenplasmonresonanz oder *surface plasmon resonance*, SPR, bezeichnet. Die Resonanzkopplung verursacht einen Energieverlust des reflektierten Lichtes. Bei variierendem Einfallswinkel führt die Resonanzkopplung zu einem scharfen Minimum der Lichtintensität des reflektierten Lichtes bei Einstrahlung im Resonanzwinkel, dieses Signal wird primär in einem SPR-Spektrum aufgenommen.^[233] Der Resonanzwinkel ist direkt vom Brechungsindex bzw. der Dielektrizitätskonstante der Probe in der evaneszenten Welle oberhalb der Sensoroberfläche abhängig. Der lokale Brechungsindex wird von Adsorptions- und Desorptionsprozessen an der Sensoroberfläche verändert, was zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels führt. Dieser ist in guter Näherung bis zu einer Beladung von ca. 50 ng/mm^2 proportional zur Konzentration der Makromoleküle auf der Sensoroberfläche.^[234,235] Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle und ihre Amplitude nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Grenzschicht ab (**Abb. 37**). Aus diesem Grund ist sie nur für die Metall-Dielektrikum-Grenzschicht sensitiv und Wechselwirkungen mit darüber liegenden Molekülen der angrenzenden Lösung spielen

keine Rolle.^[220] Bei der Oberflächenplasmonresonanz wird also die Änderung des Brechungsindices in der Nähe der Oberfläche des Sensors an dem die Liganden immobilisiert sind.^[236]

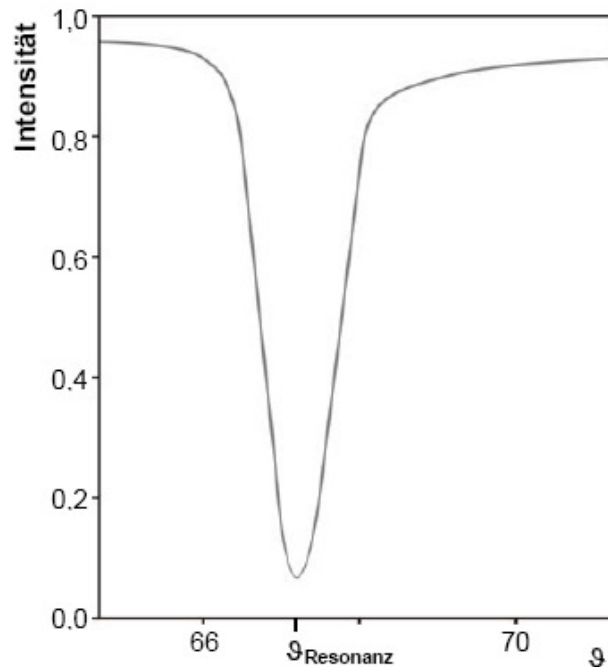


Abb. 37: Theoretisches SPR-Spektrum an der Grenzfläche Prisma-Silber-Wasser mit dem Intensitätsminimum bei $\vartheta = \vartheta_{\text{Resonanz}}$. Anregungswellenlänge 632 nm, Ag-Schichtdicke 60 nm, ϑ : Einfallswinkel, $\vartheta_{\text{Resonanz}}$: Resonanzwinkel^[232]

Die evaneszente Welle wird auch von anderen Biosensoren genutzt, z. B. Resonanz-Spiegel-Sensoren oder Gitter-Koppler. Von einer Beschreibung dieser wird hier abgesehen, sie besitzen aber eine geringere Empfindlichkeit als die im Biacore[®] 3000 verwendeten Prismenkoppler. Eine genauere Beschreibung dieser Methoden liefert die Literatur.^[222,226]

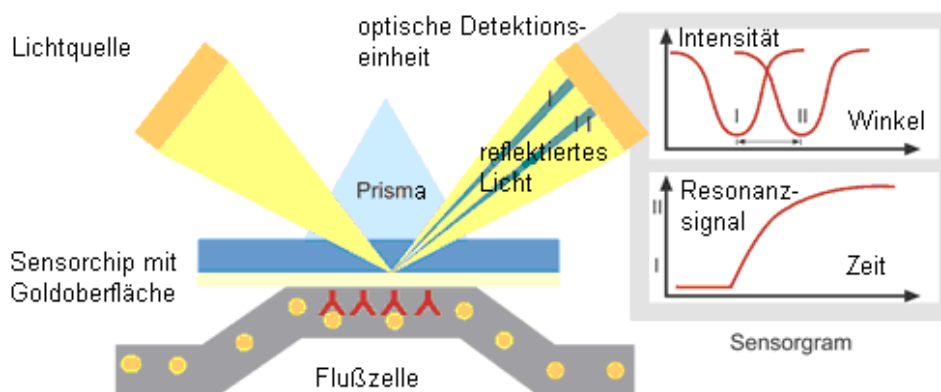


Abb. 38: Setup eines SPR-Experimentes.^[230]

2.5.3 Anwendung der Oberflächenplasmonresonanz

2.5.3.1 Einleitung

Ursprünglich war die Anwendung von SPR als Gassensor und als Biosensor vorgesehen.^[218,237]

Mittlerweile sind die Anwendungsbereiche der SPR sehr umfangreich und es werden immer noch weitere Anwendungsgebiete erschlossen.^[238] Es wurden u. a. die optischen Eigenschaften von Metallfilmen,^[239] deren Schichtdicken,^[240] Schichtdicke und dielektrische Eigenschaften von organischen Schichten auf Metalloberflächen,^[241-248] Protein-Adsorption an Biomaterialien auf der Metallschicht,^[249-256] Polymerschichten^[257-261] und die Adsorption von Gasmolekülen untersucht.^[262] Die Anwendungen als Biosensor sind noch viel umfangreicher.^[263-265] Es können sowohl qualitative als auch quantitative Wechselwirkungen aller möglichen Biomoleküle untereinander untersucht werden. Biosensor-Analysen gestatten schnell und ohne großen Materialeinsatz Aussagen zu einer Vielzahl biochemisch wichtiger Fragen, wie etwa:

1. Bindet ein Biomolekül an einen zweiten vorgegebenen Partner?
2. Gibt es Bindungspartner und wo sind sie lokalisiert - im Rohextrakt, Überstand oder Serum?
3. Wie hoch ist die Affinität zwischen den Molekülen?
4. Welcher Kinetik folgt die Bindung (Komplexbildung und Stabilität)?

Die beiden am häufigsten untersuchten Wechselwirkungen sind die zwischen Antigenen und Antikörpern^[266-270] sowie zwischen Rezeptor und Liganden.^[271-275] Weiterhin wurden auch die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren,^[276,277] kleinen Molekülen^[278] und anderen Proteinen^[279] sowie die von Nukleinsäuren mit kleinen Molekülen^[280] oder zwischen Zellen.^[281] Weitere neue, anwendungsorientierte Gebiete sind Nahrungsmittelsanalysen, Proteomics und Immunogenizität.^[282] Qualitative Anwendungen liegen im Bereich der Beobachtung der Aufreinigung von Proben,^[283] epitope mapping,^[284] ligand fishing^[285] und um Leitstrukturen kleiner organischer Moleküle zu bestimmen.^[286] Quantitative Messungen erlauben u. a. die Bestimmung von k_a , k_d und K_D ^[287,288] und der aktiven Konzentration von Molekülen.^[289] Thermodynamische Informationen können durch Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten und Reaktionsraten bei verschiedenen Temperaturen erhalten werden.^[290] Mit präzise

durchgeführten Messungen können auch die Bindungsstöchiometrie und der Interaktionsmechanismus bestimmt werden.^[287] Untersuchungen an DNA wurden in verschiedenen Systemen durchgeführt, u. a. Systemen mit einer 1:1 Stöchiometrie,^[291] sowie mit homo- und heteropolyvalent bindender DNA und Liganden,^[292-305] wobei dies in hohem Maße zum molekularen Verständnis der DNA-Protein Wechselwirkungen beigetragen hat.^[306-309] Selbst ligandeninduzierte Konformationsänderungen von Rezeptoren können mittels SPR untersucht werden, da die Änderung des hydrodynamischen Radius zu einem veränderten Brechungsindex an der Grenzfläche Lösung/Metallschicht führt.^[310,311]

2.5.3.2 Immobilisierung

Um Oberflächenplasmonresonanz zur Aufklärung von Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern einzusetzen, muß einer der Bindungspartner auf der Oberfläche des Biosensors immobilisiert werden. Der andere Bindungspartner wird dann bei der Messung in einer Lösung über die Oberfläche des Biosensors geleitet, und die Bindung in Echtzeit beobachtet.

Die Bindungspartner benötigen kein Labelling mittels Radioaktivität oder eines Chromophors, allerdings kann der Biosensor als makroskopisches Label betrachtet werden. Die Immobilisierung führt zu einer Einschränkung der Beweglichkeit des an der Sensoroberfläche befestigten Bindungspartners, wodurch das System nur noch 2-dimensional ist. Dies imitiert jedoch die biologische Situation in vielen Fällen, z. B. Ligand-Rezeptorwechselwirkungen bei membrangebundenen Rezeptoren.^[312] Für solche Systeme wurde gute Übereinstimmungen der Daten mit denen aus der isothermen Titration gefunden.^[285,313-315] Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von *human replication protein A*, RPA, und ssDNA, einem System, dessen Bindungspartner in der Natur frei beweglich sind, ergab sich jedoch ein bei FCS 20-25 höher Wert für die Gleichgewichtskonstante als bei SPR. Hieraus ergibt sich auch ein Unterschied in ΔG , während ΔH bei beiden Methoden innerhalb der Meßgenauigkeit identisch ist. Der Unterschied dürfte auf verschiedene Reaktionsentropien bei beiden Methoden zurückzuführen sein. Im dreidimensionalen System der FCS ist die Reaktion entropisch weniger bevorzugt als bei der Reaktion an der Oberfläche in der SPR.^[316]

Die Immobilisierung erfolgt je nach Oberfläche des Biosensorchips über unterschiedliche Methoden. Ursprünglich wurde ein Bindungspartner direkt auf der Goldoberfläche

immobilisiert. Alternativ dazu ist auf der Goldschicht eine carboxy-methylierte Dextranschicht verfügbar,^[317] die ein flexibles, hydrophiles Gel bildet. An diese wird mittels unterschiedlicher Linker einer der Bindungspartner kovalent oder nicht-kovalent befestigt. Die gelartige Struktur ermöglicht eine hohe Bindungskapazität, was aufgrund der größeren Effektivität des evaneszenten Feldes zu einem Anstieg des SPR-Signals führt. Außerdem neigt diese Oberfläche zu geringeren unspezifischen Oberflächensignalen und ermöglicht den Bindungspartnern einen besseren Zugang zueinander.^[318,319] Die vielfältigen Möglichkeiten zur Derivatisierung der Dextranmatrix erlauben es, die Bindung über ein breites Spektrum an funktionellen Gruppen zu knüpfen, z.B. $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$. Die Immobilisierung erfolgt dann z.B. über ein Variante des Wünsch-Weygand-Protokolls,^[320,321] bei der die Carboxylgruppen der Dextranmatrix mittels *N*-Hydroxysuccinimid und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid, EDC, aktiviert werden und anschließend mit den Aminogruppen der zu immobilisierenden Moleküle reagieren. Die Effektivität der Immobilisierung wird durch die elektrostatische Anziehung der Moleküle zur negativ geladenen Matrix beeinflusst. Aus diesem Grund muß bei Proteinen in Puffern gearbeitet werden, deren pH-Wert unterhalb des pI-Wertes des Proteins liegt,^[318,322] allerdings kann das Protein in ungünstigem Puffermilieu denaturieren.^[323] Auch können durch diese Bindungsmethode verschiedene Subpopulationen unterschiedlicher Affinität entstehen, wenn die Immobilisierung an verschiedenen Aminogruppen stattfindet, also an verschiedenen Lysin-Seitenketten.^[324] Diese Nachteile führten zur Entwicklung spezifischerer Methoden wie des Thiol/Sulfid-Austausches oder der Aldehyd-Kupplung.^[325,326] Immobilisierungen können auch über spezifische Antikörper, die einen der Bindungspartner hochaffin binden,^[327,328] und eine Vielzahl weiterer Methoden erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Chelatbindung von Oligohistidin-Tags über Nickel-Komplexe,^[329] weiterhin die Verankerung von mit Lipidankern versehenen Molekülen in Lipidschichten^[330,331] und die direkte Einbettung von Membranproteinen in membranähnlichen Doppelschichten.^[332] Zur Untersuchung von Wechselwirkungen mit DNA eignet sich besonders ein mit Streptavidin beschichteter Chip, an den die biotinylierte DNA nicht-kovalent gebunden wird.^[325,326,332] Hierbei wird die hohe Affinität der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung ausgenutzt. Diese Methode der Immobilisierung führt jedoch unter Umständen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen.^[333] Eine weitere Möglichkeit ist die kovalente Kupplung an eine Dextranmatrix,^[334] wobei unter Umständen ein Detergenz hinzugefügt werden muß,

um die Abstoßung zwischen DNA und der Dextranmatrix zu verringern.^[335] Bei dieser Methode zur Immobilisierung ist die Reproduzierbarkeit der Messungen besser.^[334]

2.5.3.3 Massentransfereffekte und weitere Probleme

Massentransfereffekte treten auf, wenn die Bindungsgeschwindigkeit des Analyten in der Lösung an den immobilisierten Liganden höher ist als die Diffusion des Analyten zur Oberfläche. Der Effekt kann also als das Nicht-Aufrechterhalten der Ausgangskonzentration der mobilen Spezies auf der Sensoroberfläche in der Umgebung der Bindungsstellen während des Bindungsprozesses beschrieben werden. Dies führt zu einem Konzentrationsgradienten innerhalb der Flußzelle während der Assoziationsphase, da die immobilisierten Bindungsstellen um eine limitierte Menge Analyten konkurrieren, wodurch eine lokal verringerte Konzentration des Analyten hervorgerufen wird, die durch die Transportrate limitiert ist.^[336,337] Aus diesem Grund ist die Konzentration weder räumlich noch zeitlich einheitlich, und kann deswegen nicht mit einem einfachen bimolekularen Reaktionsmodell beschrieben werden.^[338] Während der Dissoziationsphase fällt die Konzentration des Analyten nicht sofort auf 0, was zur Rückbindung an nicht besetzte Bindungsstellen führt, wenn die Dissoziationsrate höher ist als die Transportrate. Dies ändert die Bindungskinetik und führt zu Transport-kontrollierter Bindung, die sich zuweilen stark von der Diffusions-kontrollierten Bindung in Lösung unterscheidet, was zu Geschwindigkeitskonstanten führt, die um Größenordnungen geringer sein können als die realen intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der Wechselwirkung.^[339,340] Durch eine Variation der Flußrate oder Messungen bei unterschiedlicher Sensoroberflächenbeladung läßt sich einfach bestimmen, ob dieser Effekt im untersuchten System eine Rolle spielt.^[341,342]

Der Massentransfer kann jedoch auch genutzt werden, um die aktive Konzentration eines Analyten in einer Lösung zu bestimmen, indem bei unterschiedlichen Flußraten gemessen wird.^[343,344]

Weitere Probleme können durch sterische Effekte hervorgerufen werden. Durch die Immobilisierung hervorgerufene Konformationsänderungen in der Bindungsregion sowie sterische Einschränkungen des Zugangs des mobilen Analyten zum immobilisierten Liganden führen zu Änderungen in den Bindungseigenschaften. Durch nichtspezifische Immobilisierungsprotokolle können Subpopulationen mit verschiedenen Orientierungen und Affinitäten entstehen.^[324] Hohe lokale Konzentrationen der immobilisierten Spezies

auf der Sensoroberfläche können zu gegenseitiger Beeinflussung der Bindungsstellen führen.

Im Flußsystem des Biosensors bei der SPR müssen im Gegensatz zu Bindungsprozessen homogen verteilter Reaktanden in Lösung also drei zusätzliche Transportprozesse berücksichtigt werden:

- makroskopischer Transport durch das System und über die Sensoroberfläche, der abhängig von der Flußgeschwindigkeit der Lösung ist^[345-347]
- Diffusion durch die stationäre Grenzschicht oberhalb der Grenzschicht, hervorgerufen durch den laminaren Fluß, der von der Flußzellengeometrie und dem Diffusionskoeffizienten des Analyten bestimmt wird^[339,342,345]
- Diffusion durch und innerhalb der Immobilisierungsmatrix, beeinflusst von Dicke und Dicht der Dextranmatrix, Ladung, Größe und dem Diffusionskoeffizienten des Analyten in der Polymerlösung^[339]

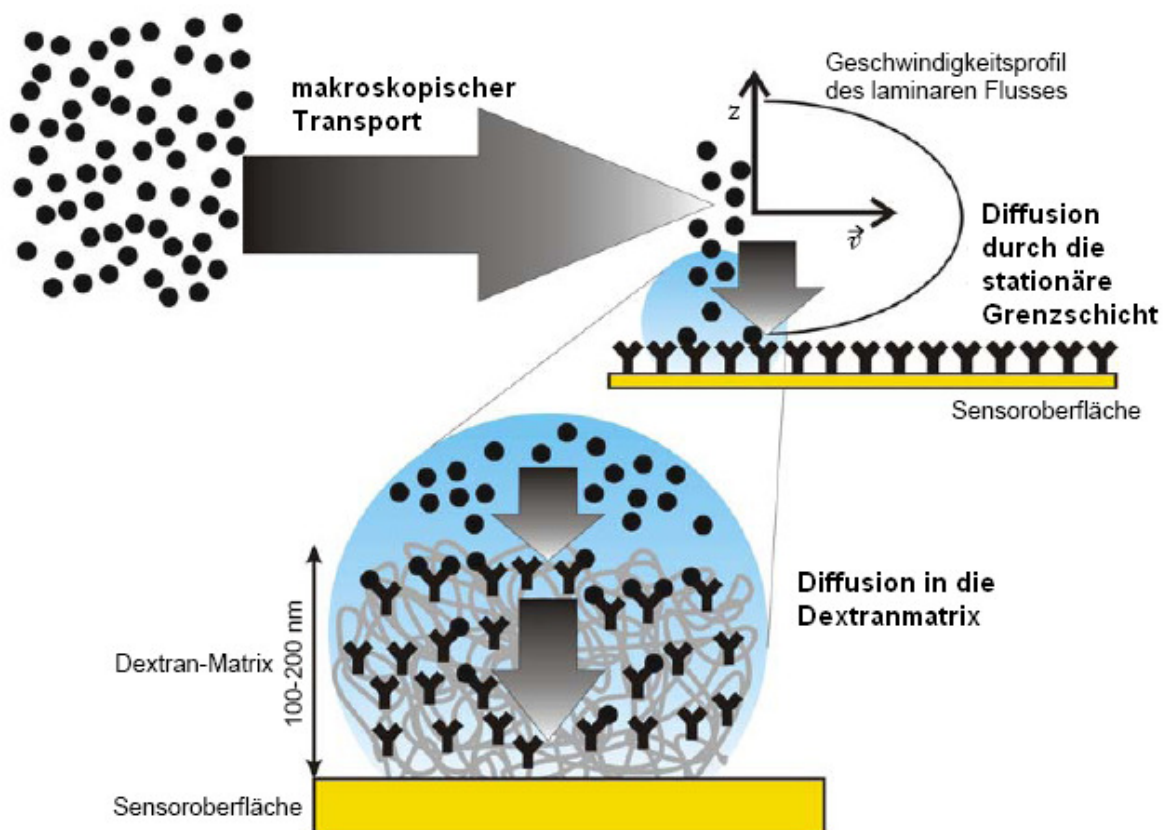


Abb. 39: Darstellung der Faktoren, die den Transport des Analyten (●) zum auf der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden (Y) beeinflussen^[230,348]

2.5.3.4 Datenaufbereitung

Die Datenanalyse ist mit Abstand der anspruchsvollste Aspekt der Oberflächenplasmonresonanz. Falsche Interpretation, inklusive der ungenügenden Beachtung von Massentransfereffekten, kann dazu führen, daß trotz einer eigentlich guten Datenbasis falsche Schlüsse gezogen werden.^[212] Um gute Daten zur Analyse zu erhalten, sollte eine möglichst gering beladene Sensoroberfläche verwendet werden, möglichst hohe Flußraten benutzt und die Oberfläche nach jeder Messung sorgfältig regeneriert werden.^[349-351,287] Eine gering beladene Sensoroberfläche minimiert Massentransfereffekte, Aggregationen und Crowding-Effekte, bei denen zu viele immobilisierte Moleküle vorhanden sind, die sich gegenseitig bei der Bindung behindern.^[339,352-354] Eine geringer beladene Sensoroberfläche benötigt weniger Moleküle des Analyten zur Absättigung des Liganden, so daß Massentransfereffekte minimiert werden. Auch eine hohe Flußrate führt zu Verringerung von Massentransfereffekten, indem eine große Anzahl an Molekülen des Analyten für die Bindung zur Verfügung gestellt wird.^[355] Wenn beide Maßnahmen nicht ausreichen, um die Effekte zu eliminieren, muß der Konzentrationsgradient in der Formel zur Beschreibung der Bindung berücksichtigt werden.^[338] Hierbei erfolgt die Bindung in zwei Schritten, Transport des Analyten an die Sensoroberfläche und anschließend die Bindung an den immobilisierten Liganden.

Eine geringe Beladung der Oberfläche führt jedoch zu einem geringeren Verhältnis von Meßsignal zu Hintergrundrauschen. Bei der Aufnahme von Oberflächenplasmonresonanzsensogrammen treten zwei verschiedene Typen von unerwünschten Signalen auf, systematische Artefakte, die durch die Probenapplikation hervorgerufen werden, und zufälliges Hintergrundrauschen, das vom Detektor abhängig ist.^[285] Die systemischen Artefakte lassen sich durch Differenzbildung mit einer Referenzzelle, die genau wie die Meßzelle behandelt wird, berücksichtigen.^[350] Im Idealfall wird auf ihr noch eine möglichst ähnliche Verbindung immobilisiert, die jedoch mit den in Lösung befindlichen Analyten nicht wechselwirkt. Durch dieses Experiment lassen sich die Artefakte, die von der Injektion herrühren, herausrechnen, da sie in beiden Zellen identisch sind. Bei dieser Differenzbildung werden noch nicht die Unterschiede der einzelnen Flußzellen berücksichtigt. Wird die zu untersuchende Lösung injiziert, ist eine Drift zu beobachten, die spezifisch für das jeweilige experimentelle Setup ist. Sie tritt in gleicher Form auch bei der Injektion von Laufpuffer auf, was es ermöglicht, diese Effekte durch Subtraktion mit einer Laufpufferinjektion unter identischen Bedingungen herauszurechnen.^[285]

2.5.3.5 Datenanalyse

Als Ergebnis einer Oberflächenplasmonresonanzmessung erhält man ein sogenanntes Sensorgramm. Vor der Injektion sollte eine konstante Baseline vorhanden sein. Direkt nach der Injektion, in der Assoziationsphase, ist die Bindung an der Oberfläche durch einen Anstieg im Signal zu erkennen, im Idealfall bis zum Gleichgewicht, wo wieder ein konstanter Bindungslevel erreicht wird. Mit Beendigung der Injektion beginnt die Dissoziationsphase, in der das Resonanzsignal wieder abnimmt. Nach der Messung muß die Oberfläche durch Injektion geeigneter Regenerationslösungen wieder regeneriert werden, so daß nach der Regeneration wieder der konstante Baseline-Level von vor der Messung erreicht werden sollte. Die Datenausgabe erfolgt in *response units*, RU, wobei 1 RU bei Proteinen ungefähr 1 pg/mm^2 entspricht.^[234]

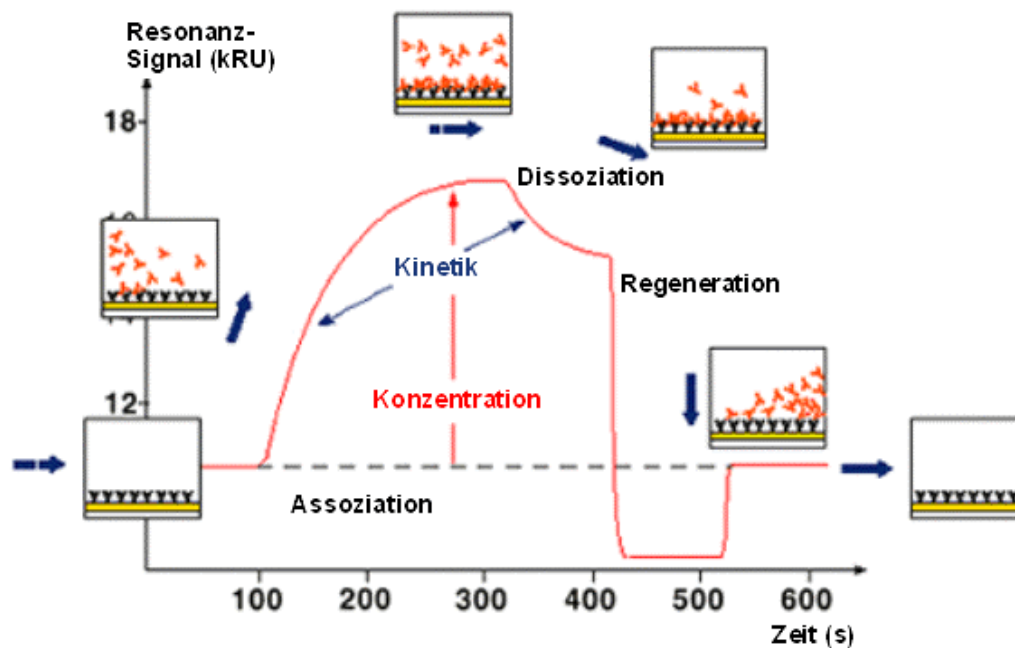
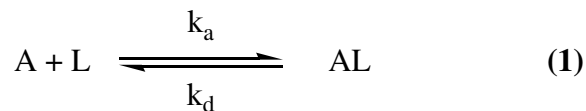


Abb. 40: Darstellung eines Sensorgrams^[230]

Werden nun Messungen bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, lassen sich kinetische Daten wie k_a , k_d und auch die Gleichgewichtskonstante K_D berechnen. Durch Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten bei verschiedenen Temperaturen lassen sich zusätzlich noch thermodynamische Daten erhalten.^[290]

Um aus den Messwerten brauchbare Daten zu gewinnen, muß ein geeignetes Modell für die untersuchte Reaktion unter Berücksichtigung der Einflüsse der Meßtechnik gefunden werden. Eine einfache 1:1 Stöchiometrie (**Gleichung 1**), wie sie anfänglich verwendet

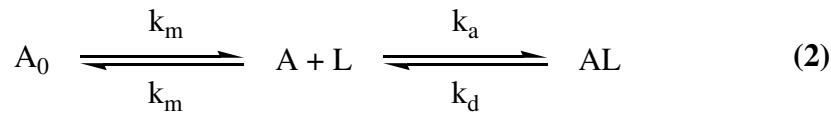
wurde,^[291] ist in den meisten Fällen nicht anwendbar, da der Massentransfer und andere in **2.5.3.3** erwähnte störende Faktoren nicht berücksichtigt werden. Allerdings können durch sorgfältige Probenvorbereitung, gutes Design des Experimentes und sorgfältige Durchführung der Messung die meisten dieser Effekte minimiert werden.^[342,345,349,354,356-358]



Ursprünglich wurden gerade Linien an die linearisierten Ergebnisse gefittet, was jedoch sehr subjektiv ist und sich nur zur Auswertung einfacher 1:1 Wechselwirkungen eignet.^[327] Später wurden direkt die erhaltenenen Response-Signale mittels eines nicht-linearen *least-square* Fits ausgewertet.^[359] Viele Systeme ließen sich jedoch nicht mit nur einer integrierten Geschwindigkeitsgleichung lösen, eventuell aufgrund der in **2.5.3.3** genannten Gründe. Wird allerdings die Summe von zwei integrierten Geschwindigkeitsgleichungen verwendet, ließen sich die Daten gut fitten.^[276,354,360-366] Diese Analysenmethode kann jedoch zu Fehlinterpretation des wahren Bindungsmechanismus führen.^[367] Die Verwendung von mehreren Gleichungen beschreibt Bindung an mehreren verschiedenen, von einander unabhängigen Bindestellen. Allerdings ist es möglich, mit einer genügend großen Anzahl an Gleichungen jede Kurve zu fitten, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Die gleichzeitige Analyse mehrerer Sensorgramme bei unterschiedlichen Konzentrationen, als globale Analyse bezeichnet, kann eingesetzt werden, um verschiedene Bindungsmechanismen zu unterscheiden.^[368] Anfänglich wurden die Wechselwirkungen sehr komplex beschrieben, wobei es nicht sicher war, ob die Komplexität am untersuchten System oder an der Meßmethode liegt.^[349] Mittlerweile lassen sich sorgfältig kreierte Daten mittels eines 1:1 Modells erfolgreich fitten,^[369,370] was darauf schließen läßt, daß die Oberflächenplasmonresonanz in der Lage ist, brauchbare Daten für eine erfolgreiche globale Analyse zu liefern.

Wenn sich Massentransfereffekte nicht vermeiden lassen, kann zur Datenanalyse ein Modell hinzugezogen werden, das von zwei getrennten Kompartimenten ausgeht, wobei

der Analyt erst von einem Kompartiment in das andere wechseln muß, bevor es in einem zweiten Schritt an den Liganden binden kann (**Gleichung 2**).^[349]



Der Massentransportkoeffizient k_m ist vom Diffusionskoeffizienten des Analyten, der Größe und Form der Flußzelle und der Flußrate abhängig.^[342,371] Dieses Modell liefert auch bei Massentransferproblemen verlässliche Daten.^[270,287,372]

Zur Auswertung der Bindung von verschiedenen Liganden in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen an DNA wurden je nach Bindungsmodell unterschiedliche Reaktionsgleichungen und damit unterschiedliche Gleichungen zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aufgestellt. Bei der Auswahl der Bindungsmodelle muß jedoch darauf geachtet werden, daß diese der biologischen Realität entsprechend erklärt werden können, da sonst leicht Fehlinterpretation der Daten die Folge sein können.^[292]

Zur Durchführung der Analysen existieren mehrere Softwarepakete, u. a. CLAMP^[373] und BIAevaluation[®], das zum Softwarepaket der Firma BIACORE[®] gehört, und mit den Geräten ausgeliefert wird. Diese Programme ermöglichen die Auswertung der Daten entsprechend verschiedener Bindungsmodelle und auch die Berücksichtigung von Massentransfereffekten. Die Auswertung kann jedoch auch mit einem einfachen Programm zur Tabellenkalkulation erfolgen, wie MS Excel[®], oder einem speziellen Programm zum Fitten von Gleichungen an Meßergebnisse wie Datafit, wobei dort individuell aufgestellte Reaktionsmodelle verwendet werden können.

2.6 CD-Spektroskopie

2.6.1 Einleitung

Zirkularer Dichroismus (*circular dichroism*, CD) tritt dann auf, wenn optische aktive Moleküle links und rechts zirkular polarisiertes Licht etwas unterschiedlich absorbieren. Die Messung erfolgt bei Wellenlängen zwischen 600 und 160 nm. Der CD-Effekt ist eine Funktion der Wellenlänge. Die Differenz der Absorptionen $A(l)-A(r)$ ist sehr gering, im Bereich von 0,0001, was einer Elliptizität von wenigen Hundertstel eines Grades entspricht.

Die CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturtypen in Peptiden, Proteinen und Nucleinsäuren sind unterschiedlich. Aus diesem Grund kann die Analyse von CD-Spektren wertvolle Informationen über die Sekundärstrukturen von biologischen Makromolekülen liefern, es sollte aber vermieden werden, zuviel aus den gewonnenen Daten herauszulesen. Die CD-Spektroskopie liefert im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse und zur NMR-Spektroskopie keine exakten Strukturdaten, läßt jedoch schnell den ungefähren Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturtypen abschätzen. Sehr sinnvoll ist auch die Untersuchung von Veränderungen der CD-Spektren bei Zugaben von Bindungspartnern der Makromoleküle oder Variation des Lösungsmittels.

2.6.2 Physik der CD-Spektroskopie

Elektromagnetische Strahlung ist eine komplexe Wellenform von der angenommen werden kann, daß sie als zwei senkrecht zueinander stehende Wellenbewegungen beschrieben werden kann, einer magnetischen (M) und einer elektrischen (E). Elektromagnetische Wellen werden von oszillierenden magnetischen oder elektrischen Dipolen erzeugt und breiten sich mit Lichtgeschwindigkeit aus. Unpolarisiertes Licht enthält Oszillationen der E-Komponenten in alle Richtungen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Linear polarisiertes Licht ergibt sich wenn die Richtung der E-Komponente auf eine Ebene senkrecht zur Richtung der Ausbreitung beschränkt ist. Zirkular polarisiertes Licht ist eine weitere Form der Polarisation, in diesem Fall ist die Größe der Oszillation konstant, während die Richtung oszilliert. Linear polarisiertes Licht einer Wellenlänge λ kann als Überlagerung von gegensätzlich zirkular polarisiertem Licht gleicher Amplitude und Phase mit den Vektoren E_L und E_R betrachtet werden. Die Projektion der addierten Amplituden entlang der Ausbreitungsrichtung ergibt eine Linie (**Abb. 41**). Durchquert dieses Licht eine

optisch aktive Probe mit unterschiedlicher Absorption A für die beiden Anteile, wird die Amplitude des stärker absorbierten Anteils kleiner als die der weniger stark absorbierten Komponente. Als Konsequenz ergibt sich als Projektion der resultierenden Amplitude nun eine Ellipse anstatt einer Linie.

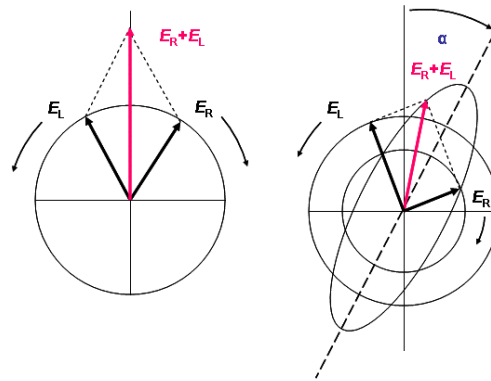


Abb. 41: a): (links) Linear polarisiertes Licht als Überlagerung von gegensätzlich polarisiertem Licht gleicher Amplitude und Phase. **b):** (rechts) Unterschiede in der Absorption der beiden Anteile führt zu Elliptizität (CD) und optischer Rotation (OR). Der wahre Effekt ist sehr klein und wird hier stärker dargestellt als er in der Realität ist.^[374]

Dieses Auftreten der Elliptizität wird als *circular dichroism* bezeichnet. Als weiterer Effekt wird optische Rotation beobachtet. E_L und E_R durchqueren die optisch aktive Probe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, ihr Brechungsindex ist also verschieden. Hierdurch wird die Ebene der Polarisation verändert und kann in Winkelgraden α_λ gemessen werden. Die Rotation steigt erst stark in eine Richtung an, fällt beim Absorptionsmaximum auf null ab, und steigt dann stark in die andere Richtung an. Diese Verteilung wird als Cotton-Effekt bezeichnet.^[375] Die Änderung der optischen Rotation in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als *optical rotary dispersion*, ORD bezeichnet. ORD ist also die Messung der Fähigkeit eines Moleküls, die Ebene der Polarisation linear polarisierten Lichts zu rotieren, während CD die Messung des Unterschieds in der Absorption links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes ist. Beide Effekte sind eng verbunden, und da beide Phänomene durch dieselben Ladungsänderungen im Molekül hervorgerufen werden, können die Effekte mittels einer Kronig-Kramers Umformung ineinander umgerechnet werden.^[376]

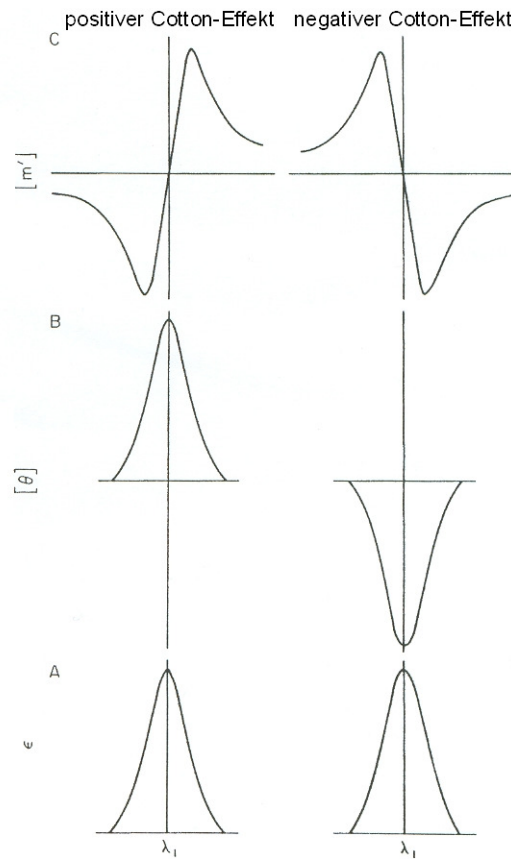


Abb. 42: Eine typische Absorptionsbande, (A) mit den assoziierten CD- und ORD-Banden.^[375]

Gemessen wird die Differenz der Absorptionen von links und rechts zirkular polarisiertes Lichtes ΔA bei einer bestimmten Wellenlänge

$$\Delta A = (A_L - A_R) \quad (3)$$

Dies kann auch als

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R)cl \quad (4)$$

ausgedrückt werden, wobei c die molare Konzentration und l die Länge der Messzelle ist.

Der molare zirkulare Dichroismus

$$\Delta \epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (5)$$

wird üblicherweise als zirkularer Dichroismus der Substanz bezeichnet.

Obwohl üblicherweise ΔA gemessen wird, werden die Ergebnisse aus historischen Gründen in Elliptizitätsgraden angegeben. Die molare Elliptizität ist

$$[\theta] = 3298 \Delta \epsilon \quad (6)$$

Die CD-Spektroskopie ist eine Absorptionsdifferenz, während die optische Rotation ein Phänomen des Brechungsindex ist. Aus diesem Grund kann Letztere auch bei Wellenlängen abseits des Absorptionsmaximum gemessen werden.^[377] Dies führt zu zwei Vorteilen der CD-Spektroskopie gegenüber der ORD-Spektroskopie. Es entsteht nur eine CD-Bande im Gegensatz zu einem positiven und einem negativen ORD-Signal, weswegen die Banden besser getrennt und zugeordnet werden können. Außerdem sind CD-Banden im Gegensatz zu ORD-Banden von bestimmter Breite und enthalten keine Beiträge von Banden außerhalb des gemessenen Wellenlängenbereichs. Aus diesem Grund wird seit Ende der 60er Jahre hauptsächlich die CD-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteinen eingesetzt.

2.6.3 Anwendung der CD-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden werden CD-Spektren üblicherweise im Bereich von 180-260 nm aufgenommen. Die meisten Chromophore in Aminosäuren erzeugen nur geringe CD-Effekte, es ist die Konformation des Proteins oder Peptids, die asymmetrische und periodische Ausrichtung im Raum, die zu charakteristischen CD-Spektren führt.^[378]

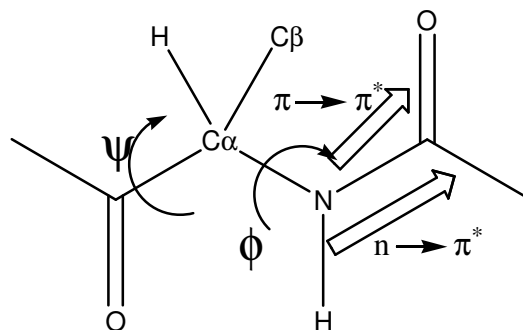


Abb. 43: mögliche Elektronenübergänge an der Peptidbindung.

Die Anregung im fernen UV führt zu Übergängen der n- und π -Elektronen nach π^* . Der $n \rightarrow \pi^*$ Übergang liegt bei ungefähr 220 nm und involviert die nicht bindenden Elektronen des Carbonyl-Sauerstoffs. Der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang liegt bei ungefähr 190 nm und involviert

die π -Elektronen der Carbonylgruppe. Die Intensität und genaue Lage dieser Übergänge hängt von den Winkeln ψ und ϕ , und somit von der Sekundärstruktur ab (**Tabelle 1**).

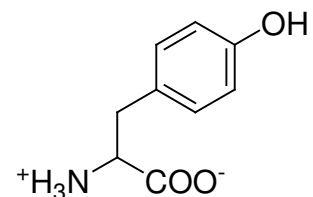
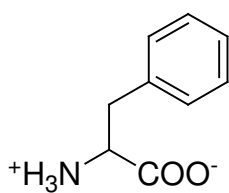
Tab. 1: Lage der Banden der Sekundärstrukturtypen im CD-Spektrum^[379]

| | $\pi \rightarrow \pi^*$ | $n \rightarrow \pi^*$ |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| Random Coil | Positiv 212 nm | Negativ 195 nm |
| β -Faltblatt | Durch Exciton-Kupplung entstehen: positiv 195 nm negativ 175 nm | negativ 215 nm |
| α -Helix | Durch Exciton-Kupplung entstehen: ($\pi \rightarrow \pi^*$) _{senkrecht} positiv 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) _{parallel} negativ 208 nm | Negativ 222 nm (rotverschoben) |

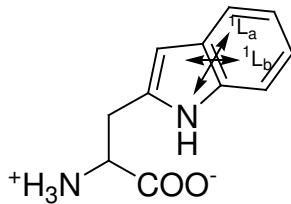
Weiterhin treten im Vakuum-UV nachfolgende zusätzliche Banden auf: Bei α -Helices eine positive Schulter bei 175 nm, eine negative Bande bei 160 nm und eine positive bei unter 140 nm, wobei die letzten beiden in Lösung nicht zugänglich sind.^[380] β -Faltblätter haben eine negative Bande bei 175 nm und eine positive bei 168 nm.^[381] Die CD-Spektren von 3_{10} -Helices sind denen von α -Helices sehr ähnlich, eine Unterscheidung ist nur durch das Verhältnis der Intensitäten der Banden zueinander möglich.^[382-386] Hierzu wird das Verhältnis der Intensitäten der Banden bei 222 nm und 208 nm zueinander betrachtet. Bei einer α -Helix liegt dieses bei ungefähr 1, bei einer 3_{10} -Helix bei unter 0,4.^[382,383,387,388] Außerdem ist die Intensität der positiven Bande bei 192 nm geringer. Bei einer α -Helix hat sie ungefähr denselben Betrag wie die negative bei 208, bei einer 3_{10} -Helix ist die Intensität wesentlich geringer.^[382,383,387-390]

In CD-Spektren in nahen UV (250-350 nm) dominieren Banden von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Disulfiden. Wenn der aromatische Rest sich in einer räumlich starren Struktur befindet, ist seine Umgebung asymmetrisch, und wird CD-Effekte zeigen. Wenn man globuläre Proteine „schmilzt“, ihre Sekundärstruktur auflöst, ändert sich das CD-Spektrum im fernen UV, das im nahen UV bleibt jedoch gleich. Aromaten haben erlaubte

$\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge (1L_a and 1L_b), die senkrecht zueinander in der Ebene des π -Systems liegen. Phenylalanin hat einen kleinen Extinktionskoeffizienten aufgrund hoher Symmetrie und ist am wenigstens anfällig für Veränderungen in der Umgebung. Die Absorptionsmaxima treten bei 254, 256, 262 und 267 nm auf. Tyrosin hat eine geringere Symmetrie als Phenylalanin, und deswegen stärkere Absorptionsbanden. Das



Absorptionsmaximum liegt bei 276 nm mit einer Schulter bei 283 nm. Eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe führt zu einer Rotverschiebung um 4 nm, auch die Dielektrizitätskonstante beeinflusst das Spektrum. Tryptophan hat die intensivste



Absorptionsbande aller aromatischen Aminosäuren, sie liegt bei 282 nm. Eine Wasserstoffbrücke zum NH kann die 1L_a -Bande bis zu 12 nm verschieben. Disulfide weisen eine inhärente

Asymmetrie auf, da die *gauche*-Konformation bei freier Beweglichkeit bevorzugt wird. Ist die Cystin-Einheit frei beweglich, und ihr dihedraler Winkel nahe 90° , weist sie keinen Netto-CD-Effekt auf, da die entsprechenden $n \rightarrow \sigma^*$ Elektronenübergänge entartet sind, verschiedene Vorzeichen aufweisen und sich damit gegenseitig aufheben.^[391] Ist die Cystin-Einheit jedoch gespannt, und weicht der Torsionswinkel von 90° ab, sind die Übergänge nicht mehr entartet und ein Elektronenübergang verschiebt sich zu kürzeren, der andere zu längeren Wellenlängen. Es treten ein Minimum und ein Maximum auf, deren Lage abhängig von der Chiralität der Cystin-Einheit sind, ein Extremum im Bereich von 250-300 nm, das andere mit entgegengesetztem Vorzeichen im Bereich von 230-250 nm. Sind die Torsionswinkel zwischen 0° und 90° und liegt ein Maximum >250 nm und ein Minimum zwischen 230 und 250 nm vor, handelt es sich bei der Cystin-Brücke um eine rechtsgängige Helix, ansonsten entsprechend umgekehrt.^[392] Die von den aromatischen Aminosäuren und Disulfidbrücken hervorgerufenen Banden können die Auswertung der CD-Spektren komplizieren.^[393] Um diese Effekte herausrechnen zu können, können Koeffizienten benutzt werden, Diese werden erhalten, indem Modellpeptide mit größtenteils identischer, regelmäßig wiederholter Sequenz synthetisiert werden, die sich durch einzelne aromatische oder aromatische Aminosäurereste unterscheiden. Durch den Unterschied in den CD-Spektren dieser Modellpeptide lassen sich die Korrekturfaktoren ermitteln.^[394]

Soll der Anteil an α -Helices, parallelen und antiparallelen β -Faltblättern, β -turns und *random coil* bestimmt werden, ergibt dies eine Gleichung mit fünf Unbekannten. Mit einem Spektrum, das bis 200 nm gemessen wurde, kann man nur zwei lösen (enthält zwei Banden), bis 190 nm drei oder vier, und bis 178 fünf.^[395] Mit Messungen bis 168 nm kommt noch eine weitere Bande dazu.^[396] Der apparative Aufwand, um bei so niedrigen Wellenlängen zu messen, ist jedoch recht groß.

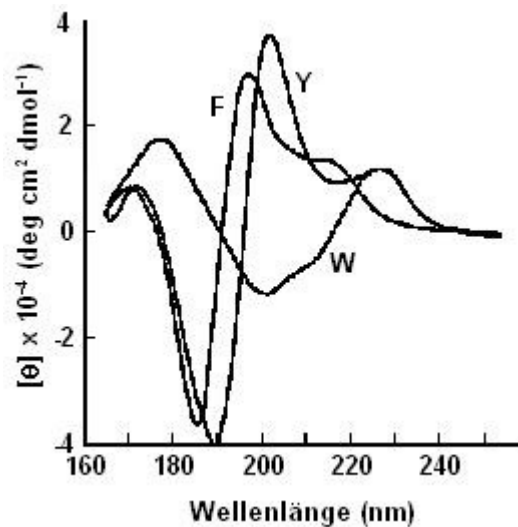


Abb. 44: Vakuuum-UV CD Spektren von Modelpeptiden mit den Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten. Glutamytyrosin (Y); Lysylphenylalanin (F); Glutamyltryptophan (W).^[397]

Für die Ermittlung des Zusammenhangs der Sekundärstruktur von Proteinen und den dazugehörigen CD-Spektren und zur Auswertung letzterer gibt es sehr viele Methoden.^[375,398-406] Alle gegenwärtig benutzten Methoden machen folgende vier Annahmen:^[398,407]

1. Die dreidimensionale Struktur der Referenzproteine, die mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurde, bleibt in der wässrigen Lösung enthalten.
2. Die Beiträge der einzelnen Sekundärstrukturelemente zum Gesamtspektrum ist additiv, und der Effekt der Tertiärstruktur auf das Spektrum ist vernachlässigbar.
3. Nur die Chromophore aus den Peptidbindungen sind verantwortlich für das CD-Spektrum im fernen UV, Beiträge von anderen Chromophoren können vernachlässigt werden.
4. Jedes Strukturelement kann mit einem eigenen CD-Spektrum beschrieben werden, der Einfluß der geometrischen Anordnung der Strukturelemente untereinander wird als vernachlässigbar betrachtet.

Das CD-Spektrum eines Proteins $S(\lambda)$ läßt sich also als Linearkombination von k Spektren $B_k(\lambda)$ (für 100 % α -Helix etc.) mit folgender Formel beschreiben:

$$S(\lambda) = \sum_{k=1}^N f_k B_k(\lambda) \quad (7)$$

Hierbei ist N die Anzahl der Sekundärstrukturtypen und f_k der Anteil der k -ten Sekundärstruktur. Die Randbedingungen für f_k sind:

$$\sum_{k=1}^N f_k = 1 \quad \text{und} \quad f_k \geq 0 \quad (8)$$

Zur Bestimmung des jeweiligen Anteils der Sekundärstrukturen benötigt man einen Satz CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur und einen mathematischen Algorithmus, um das Spektrum an den Datensatz zu fitten und die Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturtypen zu bestimmen. Als Datensätze eignen sich entweder Datensätze von Proteinen, deren Struktur bekannt ist, oder Modellpeptide, die nur einen Sekundärstrukturtyp annehmen können.

CD-Spektren eines Modellpeptids mit 100% Anteil einer Sekundärstruktur werden als Referenzspektren bezeichnet.^[408] Ein als Modellpeptid geeignetes Peptid ist poly-L-Lysin,^[409-412] das abhängig von Temperatur und pH-Wert alle drei Strukturtypen annehmen kann. Bei pH 7.0 liegt es ungeordnet als *random coil* vor, bei einem pH-Wert von 10.8 ist es α -helical, und bei pH 11.1 hat es nach Erhitzen auf 52°C und anschließendem Abkühlen β -Faltblattstruktur. Mit poly-L-Lysin als Modellschubstanz wurde es möglich, ORD^[413] und CD^[414] auf den Anteil der jeweiligen Sekundärstrukturtypen hin auszuwerten, indem die gemessenen Daten an die bekannten Daten mittels eines *least square* Fit entsprechend Gleichung 3 gefittet werden.^[415] Weitere hierfür verwendete Modellpeptid-Daten sind Myoglobin, das 80% α -helical ist, für den Anteil an α -Helix, (Lys-Leu)_n in 0.1 M NaF bei pH 7 für den Anteil an β -Faltblattstruktur, (Pro-Lys-Leu-Lys-Leu)_n in salzfreier neutraler Lösung oder poly-L-Ser in 8M LiCl für den *random coil* Strukturanteil.^[405,414,416,417] Außerdem kann der Anteil an β -turns mit dem Vergleich des Spektrums einer Kombination aus Pro-Ala, (Ala₂-Gly₂)_n und Pro-Gly-Leu bestimmt werden.^[405] Ein großer Vorteil ist, daß das experimentell erhaltene Spektrum nur an wenige Referenzspektren gefittet werden muß. Der größte Nachteil ist die Unsicherheit bei der Auswahl des Modellpeptidsystems, da die CD-Spektren von Modellpeptiden für einen Sekundärstrukturtyp größere Unterschiede aufweisen. Außerdem ist das CD-Spektrum der α -Helix abhängig von der Länge der Peptidkette. In Proteinen ist der Bereich, in dem ein Sekundärstrukturtyp auftritt, für gewöhnlich kurz, in Modellpeptiden „unendlich“.^[375,403,404]

Alternativ zu Modellpeptiden können Datensätze mit den Sekundärstrukturdaten von Proteinen, deren Sekundärstrukturen aus Röntgenstruktur- oder NMR-Analysen bekannt

sind, benutzt werden. Hierzu werden aus den bekannten Datensätzen sogenannte Basisspektren für die einzelnen Strukturtypen berechnet,^[403,418] die anschließend entsprechend Gleichung 7 an das auszuwertende Spektrum gefittet werden.^[408,419-425]

Sowohl die Methoden, die Referenzspektren von Modellpeptiden verwenden, als auch die, die Basisspektren aus Proteine bekannter Sekundärstruktur berechnen, erreichen relativ gute Ergebnisse für den Anteil an α -Helices. Diese lassen sich darüber hinaus durch Berücksichtigung der Längenabhängigkeit des CD-Spektrums einer α -Helix und durch Einführung von 3_{10} - oder verdrehten Helices verbessern. Die Korrelation von Röntgenstrukturdaten und Abschätzungen aus CD-Daten für β -Faltblätter und β -turns hängt im Gegensatz dazu stark von der Auswahl der Basis- bzw. Referenzspektren ab. Die Genauigkeit für α -Helices ist üblicherweise besser als für β -Faltblätter und β -turns. Dies wird zum Teil auf die größere Intensität der für α -Helices typischen Banden zurückgeführt, wodurch diese die CD-Spektren dominieren. Andererseits gibt es verschiedene Typen von β -Faltblättern (parallel und antiparallel) und β -turns, wodurch es möglich sein könnte, daß ein einziges CD-Spektrum nicht ausreicht, um als Basisspektrum für β -Faltblätter oder β -turns zu dienen.^[426]

Neben dem Fitten mittels *least square* Fit gibt es noch weitere Methoden zum Fitten der experimentellen Daten an die bekannten CD-Spektren. Bei der Auswertung mittels der *ridge regression* werden CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur an das CD-Spektrum des Proteins mit unbekannter Sekundärstruktur gefittet. Hierzu wird nicht die Methode des *least square* Fit benutzt, da diese eine unvollständige Lösung liefert, sondern die Methode der *constrained statistical regularization*.^[427,428] Zur Auswertung mittels dieser Methode gibt es das Programm CONTIN.^[429] Eine weitere Methode ist das Fitten mittels *singular value decomposition*, bei der aus einem Satz CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur fünf besonders signifikante CD-Spektren ausgewählt werden.^[418] Zur Auswahl der signifikanten Spektren für diese Methode existieren weitere Prozeduren,^[396,430] die jedoch kaum zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen. Weiterentwicklungen dieser Methode jedoch bringen sowohl Zeitgewinn, wie das *locally linearized model*,^[431] als auch bessere Ergebnisse wie die *self consistent method*.^[432,433] Eine weitere Prozedur ist die *principal component factor analysis*,^[434,435] die der *singular value decomposition* ähnlich ist. Die *convex constraint analysis* führt mit der Volumenminimierung eine dritte Randbedingung ein (vgl. **Gleichung 8**).^[436,437,438] Hierauf beruht auch der Algorithmus LINCOMB.^[439] Auch neuronale Netze werden zur Sekundärstrukturauswertung eingesetzt.^[432,440,441,443] Die Einteilung der Proteine mit bekannter Sekundärstruktur in Cluster mit ähnlichen

vorherrschenden Sekundärstrukturtypen, und die Beschränkung des Fits auf den Cluster, der dem zu untersuchenden Protein am nächsten kommt, verbessert die Ergebnisse. Hierbei muß jedoch zuerst einmal der am besten passende Cluster gefunden werden. Bisher gibt es noch keine Methode, die ohne einen Satz an Proteinen mit bekannter Struktur auskommt, die Auswertung ist also rein empirisch. Speziell für kurze Peptide mit weniger als 30 Aminosäureresten gibt es das Programm PEPFIT.^[443] Dieses enthält neun Basisspektren für α -Helix, β -Faltblatt, *random coil*, βI -turn, βII -turn, βIII -turn und γ -turn. Die Basisspektren werden aus Referenzspektren von Peptiden mit bekannter Sekundärstruktur berechnet. Da jeweils Polypeptide aus verschiedenen Aminosäureresten verwendet werden, wird der Einfluß der Seitenketten auf das Spektrum minimiert. Der erhaltene Satz an Basisspektren kann als Basis für alle bekannten Fitting-Algorithmen benutzt, oder aber mittels des in PEPFIT integrierten Algorithmus angewendet werden.

Bei allen Methoden sind die Ergebnisse für die α -Helix sehr gut, für β -Faltblätter und *random coils* weniger gut, und für β -turns am schlechtesten. Die Abweichungen zu den Anteilen der Sekundärstrukturen in Röntgenkristallstrukturen liegen bei den besten Methoden bei unter 10%.^[404] Im Vergleich von *ridge regression*, *singular value decomposition* und neuronalen Netzwerken schneidet die Methode der *ridge regression* am besten ab.^[444]

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Anteils an α -Helices ist das Umrechnen der molaren Elliptizität bei einer bestimmten Wellenlänge in den Anteil an α -Helices.^[422,445]

Zur Auswertung gibt es mehrere Programme, die zu Programmpaketen wie CDPro oder Dichroprot zusammengefasst erhältlich sind,^[446,447] oder online über z.B. Dichroweb zugänglich sind.^[448-450]

Dichroweb bietet online Zugang zu SELCON3,^[433,451] CONTINLL,^[427,431] VARSLC^[430,452] und CDSSTR,^[453] und K2D.^[441] CDPro erlaubt die Auswertung mittels SELCON3,^[433,451] CONTINLL^[427,431] und CDSSTR^[453] unabhängig von einem Internetzugang mit einem großem Satz an bekannten Proteinstrukturen.^[446] Dichroprot bietet die Möglichkeit der CD-Auswertung mittels "Least Square Fit",^[403,414,422,454] Varselec,^[430,452] SELCON2,^[433] SELCON3,^[451] K2D,^[441] CONTIN,^[428,429] und entsprechend der molaren Elliptizität bei 220 nm.^[422] Von JASCO wird zum Meßgerät das Programm "Spectra Analysis" in der Version 1.53.04 mitgeliefert, das auf der Auswertung nach Yang^[403] beruht.

Zur Auswertung der experimentell erhaltenen CD-Spektren werden je nach Problemstellung unterschiedliche Programme empfohlen:^[455,456]

1. Zur Abschätzung der Konformation von globulären Proteinen in Lösung SELCON3,^[451,453,457] K2D^[441] und CDNN^[440]
2. Zur Bestimmung der Konformation von Modellpolypeptiden LINCOMB^[439] oder CONTIN^[429]
3. Zur Bestimmung der Konformation eines Proteins, wenn die genaue Konzentration unbekannt ist, oder wenn die Änderung der Konformation bei Bindung eines Liganden betrachtet werden soll MLR^[406] oder LINCOMB^[439]
4. Um Änderungen in der Sekundärstruktur als Funktion veränderter Umgebungsbedingungen zu beobachten LINCOMB^[439] oder CONTIN^[429]

Eine weitere Anwendung der CD-Spektroskopie ist die Untersuchung der Änderung der CD-Spektren von Proteinen oder Peptiden bei Wechselwirkung mit Bindungspartnern wie DNA oder anderen Proteinen bzw. Peptiden. Hierbei kann sich sowohl das CD-Spektrum des Peptids oder Proteins als auch das CD-Spektrum der DNA ändern, wobei für beide Änderungen Strukturveränderungen und elektronische Wechselwirkungen der Bindungspartner verantwortlich sein können. Bei unspezifischer Bindung tritt im Allgemeinen eine Verringerung der Intensität der Banden auf. Spezifische Bindung ist schwerer zu beobachten und untersuchen, da weniger Bindungspartner involviert sind, und deshalb die Änderungen am Spektrum kleiner ausfallen. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß auch nicht oder unspezifisch gebundenes Protein oder Peptid zum CD-Spektrum beiträgt, was die Quantifizierung der Auswertung erschwert.^[455] Spezifische Bindung von Proteinen verursacht eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verschiebung der Banden der DNA im CD-Spektrum oberhalb von 260 nm, wobei entweder eine Rotverschiebung^[459-462] oder auch eine Verschiebung nach Blau auftritt.^[463-468] Die Verschiebung tritt nur bei spezifischer Bindung auf, binden die Peptide an DNA ohne spezifische Bindesequenz, tritt sie nicht auf. Weiterhin ändert sich die Intensität einzelner Banden im CD-Spektrum der DNA.^[459-468] Bei Proteinen mit basischer DNA-Bindungsregion erhöht sich bei Bindung an DNA der Anteil an α -Helices, da diese amphipathische α -Helices ausformen, die an die DNA binden.^[469-471] Hierbei bleibt das CD-Spektrum der DNA oberhalb 250 nm erhalten.^[471] Auch bei unspezifischer Bindung von Proteinen mit basischer DNA-Bindungsregion erhöht sich der Anteil an α -Helices, und oberhalb von 240 nm bleibt das Spektrum unverändert.^[472] Die CD-Spektren lassen sich also zur Untersuchung der Wechselwirkungen von DNA mit Proteinen oder Peptiden

in zwei Bereiche einteilen, den unter 250 nm, der hauptsächlich vom Protein bzw. Peptid dominiert wird, und den über 250 nm, der von der DNA dominiert wird. In letzterem lassen sich Änderungen der DNA bei der Bindung gut beobachten, da er sehr empfindlich gegenüber kleinen Änderungen in der Sekundärstruktur der DNA ist. Die Änderungen in diesem Bereich des CD-Spektrums der DNA können als Änderungen in der Packung der Basen oder im einzelnen Nukleotid interpretiert werden. Der andere Bereich wird wichtig, wenn ein großer Anteil an α -Helices vorliegt, der das Spektrum dominiert.^[458]

2.7 Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie^[473]

2.7.1 Einleitung

Seit der Erfindung durch Binnig, Quate und Gerber im Jahr 1986^[474] ist die Kraftmikroskopie von einer Methode zur Abbildung von Oberflächen, der eigentlichen Kraftmikroskopie, zu einer Methode weiterentwickelt worden, mit der sich molekulare Kräfte an Grenzflächen untersuchen lassen, der Kraftspektroskopie. Außerdem erlaubt sie die Manipulation von Molekülen oder Molekülkomplexen auf Oberflächen. So ist es möglich Chromosomen zu schneiden,^[475] Proteinkomplexe kontrolliert zu trennen^[476] oder Konformationsänderungen in einzelnen Molekülen auszulösen.^[477]

Die Methoden beruhen auf den Wechselwirkungen zwischen der Probe und der Spitze des AFM, die an einer Tastfeder angebracht ist.

2.7.2 Kraftmikroskopie

Bei der Kraftmikroskopie werden die Oberfläche der Probe und die Spitze einer Tastfeder gegeneinander bewegt, wobei die Oberflächenstruktur mittels eines auf der Tastfeder reflektierten Laserstrahls oder durch Aufzeichnung der Bewegung des Probenhalters abgebildet wird. Das Abtasten der Oberfläche kann dadurch erfolgen, daß die Spitze durch leichtes Andrücken in ständigem Kontakt mit der Oberfläche gehalten wird, wobei es jedoch vorkommen kann, daß nicht fixierte Proben auf der Oberfläche vor der Spitze hergeschoben und nicht gemessen werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Spitze auf- und abschwngen zu lassen, so daß sie nicht im ständigen Kontakt mit der Oberfläche ist. Hier wird die Oberflächenstruktur aus den Phasenverschiebungen der gemessenen Oszillation und der die Tastfeder antreibenden Oszillation berechnet. Hierbei kann es jedoch vorkommen, daß die Spitze an der Tastfeder die Probe deformiert, wodurch falsche Oberflächenstrukturen erhalten werden.

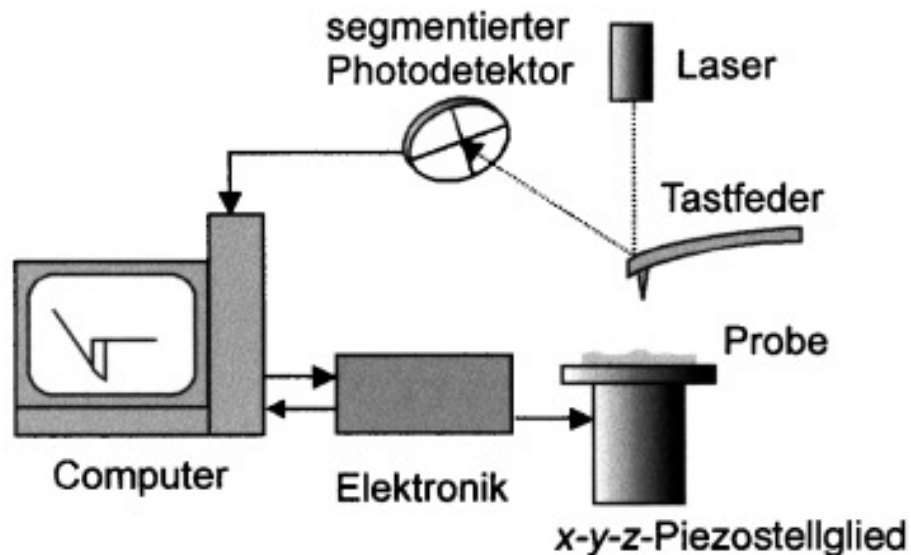


Abb. 45: Beschreibung des apparativen Aufbaus eines AFM. Die Probe wird mittels des x-y-z-Piezostellgliedes unterhalb der stationären Tastfeder bewegt. Der segmentierte Photodetektor mißt die Ablenkung des Laserstrahls an der Tastfeder.^[473]

Die erreichbare Auflösung ist von der Form der Spitze abhängig, im Idealfall besteht sie am Ende aus nur einem Atom. Hiermit können Auflösungen von 1 nm erreicht werden.^[478]

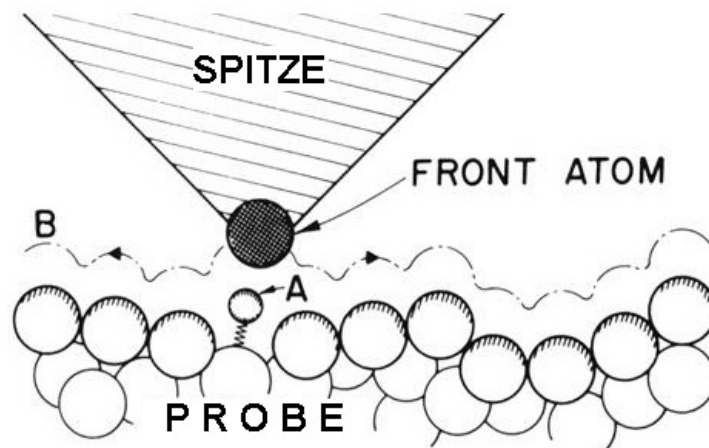


Abb. 46: Beschreibung des Prinzips der Kraftmikroskopie. Die Spitze folgt Kontur B, wobei eine konstante Kraft zwischen der Spitze und der Probenoberfläche aufrecht erhalten wird.^[474]

2.7.3 Kraftspektroskopie

Bei der Kraftspektroskopie werden sowohl die Spitze als auch die Oberfläche kovalent funktionalisiert, und es wird die Kraft gemessen, die nötig ist, um die Spitze von der Oberfläche zu entfernen (**Abb. 46**). Zum Beispiel kann ein Peptid über einen Linker an die Spitze und DNA über einen Linker auf die Oberfläche gebunden werden. Bei diesem Experiment wird mit der funktionalisierten Spitze nicht auf den Wechselwirkungspartner

gezielt, sondern die komplette Oberfläche wird abgescannt, und nur die Messungen berücksichtigt, bei denen eine Wechselwirkung stattgefunden hat.

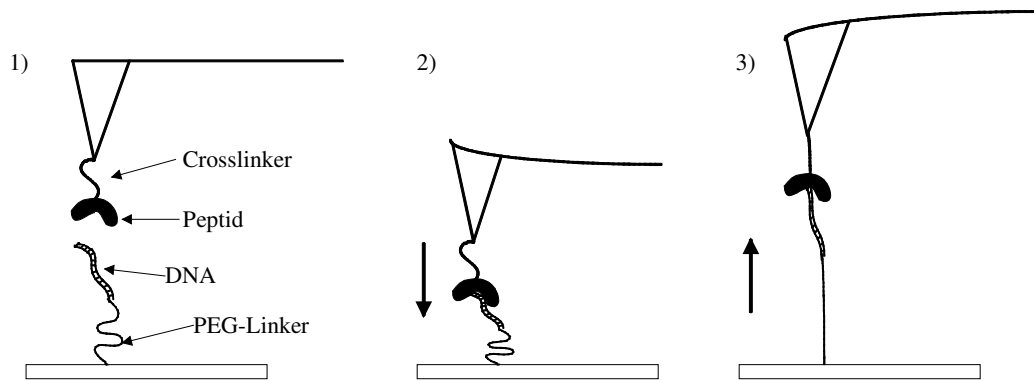


Abb. 46: Schematische Darstellung der Kraftspektroskopie. 1. Ausgangsanordnung. 2. Annäherung der Spitze an die Oberfläche und Bindung des Peptids an die DNA. 3. Die Spitze wird von der Oberfläche weggezogen und die Bindung zwischen Peptid und DNA reißt ab.

Mittels der dynamischen Kraftspektroskopie, bei der eine Variation der Geschwindigkeit, mit der die Spitze der Tastfeder von der Oberfläche entfernt wird, erfolgt, kann durch Extrapolation die Dissoziationsgeschwindigkeit für das entsprechende System ermittelt werden.^[473]

Eine weitere Möglichkeit ist es, ein Molekül sowohl an der Spitze als auch an der Oberfläche zu befestigen und es auseinanderzuziehen (**Abb. 47**). Die Kraft-Distanz Kurve enthält Informationen über intramolekulare Strukturänderungen.^[479] Wenn nun ein Bindungspartner mit dem immobilisierten Molekül wechselwirkt, wird sich die Kraft-Distanz-Kurve ändern.

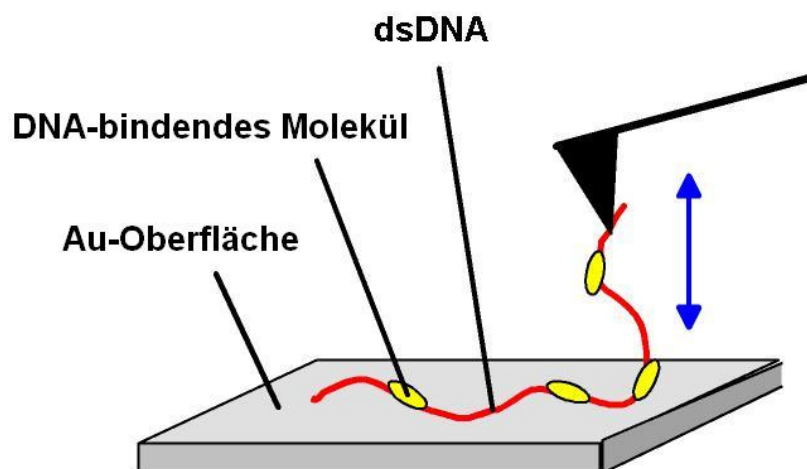


Abb. 47: Darstellung der zweiten Methode zur Kraftspektroskopie.

Die zu untersuchenden Moleküle müssen in beiden Fällen kovalent gebunden werden, da diese Bindungen bei der Untersuchung der molekularen Erkennung um Größenordnungen stabiler sein müssen als die zu Untersuchenden. Hierdurch wird sichergestellt, daß die zu untersuchenden Bindungen zuerst reißen. Es lassen sich Bindungskräfte ab einer Stärke von 10 pN untersuchen, Kräfte darunter können mittels optischer Pinzetten gemessen werden.^[480,481] Der limitierende Faktor ist hier die Empfindlichkeit des optischen Systems, mit dem die Ablenkung des Laserstrahls detektiert wird.^[478]

2.7.4 Anwendungen

2.7.4.1 Einleitung

Die Kraftmikroskopie und die Kraftspektroskopie werden leicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst. Werden die Messungen mit getrockneten Proben an Luft vorgenommen, überlagern Kapillarkräfte die van-der-Waals Kräfte, die eine Folge der Kondensation von Wasserdampf im Bereich des Kontakts Spitze-Probe (Kapillarkondensation) sind. Hierdurch wird die erreichbare Auflösung limitiert.^[478]

Bei Messungen in Flüssigkeiten sind diese Kräfte vernachlässigbar, deshalb ist die erreichbare Auflösung hier größer. Messungen in Flüssigkeiten erlauben Untersuchungen von Proben unter ihren natürlichen Bedingungen, z.B. Ligand-Rezeptor Studien unter physiologischen Bedingungen.

2.7.4.2 Anwendungen der Kraftmikroskopie

Mittels der Kraftspektroskopie konnten sowohl verschiedene Oberflächen als auch einzelne Moleküle abgebildet werden. Sie kombiniert die räumliche Auflösung der Elektronenmikroskopie mit der Fähigkeit optischer Mikroskope, in wäßriger Lösung zu arbeiten. Im Gegensatz zum *scanning-tunneling microscope*, bei dem die lokale Leitfähigkeit gemessen wird,^[482] können mittels der Kraftmikroskopie nichtleitende, und damit auch organische Oberflächen untersucht werden.^[483] Die erste mittels Kraftmikroskopie in atomarer Auflösung erhaltene Abbildung ist eine Bornitrid-Oberfläche,^[484] und auch eine Oberfläche aus Kristallen von DL-Leucin wurde abgebildet.^[485] Selbst subatomare Auflösung ist möglich.^[486] Mittlerweile wurden viele biologische Moleküle abgebildet,^[487-489] auf molekularer Ebene u. a. Proteine,^[490]

Lipide,^[491] Nukleinsäuren,^[492] und biomedizinische Polymere.^[493] Mittels der der Kraftmikroskopie konnten auch durch virale Infektion ausgelöste Prozesse auf lebenden Zellen^[494] und Membranproteine dargestellt werden.^[495,496] Auch die Bindung von Proteinen mit DNA wurde untersucht.^[497,498] Zeitaufgelöste Abbildungen von Wechselwirkungen erlauben die Korrelation struktureller Daten mit dynamischem Verhalten und der Funktion von Biopolymeren und supramolekularen Aggregaten.^[496,499,500] Die Aufnahme von AFM-Abbildungen erlaubt auch die Bestimmung qualitativer und quantitativer Daten wie der Persistenzlänge von DNA und der Elastizität von Zellen und Vesikeln.^[501]

Die Ausweitung auf lebendige Zellsysteme^[502] ist natürlich auf Oberflächen beschränkt, eine Weiterentwicklung, die anstelle der 2D-Position des Cantilevers die 3D-Position einer Kugel bestimmt, ermöglicht auch Messungen in drei Dimensionen.^[503]

2.7.4.3 Anwendungen der Kraftspektroskopie

In der Kraftspektroskopie wird der Cantilever als sehr empfindlicher Kraftsensor eingesetzt,^[504] der Messungen von Bindungskräften zwischen Molekülen im Bereich von pN erlaubt, wodurch sie zur Untersuchung von biologischen Wechselwirkungen auf molekularer Ebene geeignet ist.^[505,506] Die Kräfte, die zur Separation der Bindungspartner benötigt werden, hängen von der *loading rate* ab, die auf den Komplex ausgeübt wird. Diese ist definiert als:

$$\textit{loading rate} = \text{Geschwindigkeit des Auseinanderziehens} \times \text{Elastizität der Moleküle} \quad (9)$$

Sie beschreibt also die Zeitabhängigkeit der externen Kräfte. Eine langsam ansteigende *loading rate* gibt mehr Zeit für Energieumverteilungen im System, und führt dadurch zu geringeren Abrißkräften.^[507] Nahe dem thermischen Gleichgewicht ist die Abhängigkeit logarithmisch, wenn nur eine einzige Barriere auftritt.^[508-511]

Bei der Kraftspektroskopie muß darauf geachtet werden, daß der Linker zwischen der Probe an der Spitze und der Spitze lang genug ist. Ist dieser zu kurz, können unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Spitze selbst und dem auf der Oberfläche fixierten Molekül gemessen werden. Durch Immobilisierung eines Bindungspartners auf der Oberfläche und des anderen Bindungspartners an der Spitze des Cantilevers wurden die Wechselwirkungen zwischen Adenin und Thymin,^[512] die einer einzelnen

Wasserstoffbrückenbindung^[513] und zwischen Avidin und Biotin^[514] bzw. Iminobiotin^[515] und zwischen Streptavidin und Biotin^[516] bestimmt. Selbst die Stärke der Adhäsion zwischen Zellen konnte gemessen werden.^[517] Neben Proteinen wurden Untersuchungen der elastischen Kräfte, die bei der durch Auseinanderziehen verursachten Entfaltung eines Moleküls entstehen, auch an anderen Biomolekülen wie DNA, Polysacchariden, und Alkoholen durchgeführt.^[496,499,505] Weiterhin wurden auch zeitaufgelöste Studien von Enzymaktivitäten gemacht.^[518,519] Die Kraftspektroskopie erlaubt auch die Untersuchung molekularer Bindungskräfte,^[508,515,516,520-523] z.B. zwischen Antigen und Antikörper,^[524-527] supramolekularen Wirt-Gast Systemen^[528] und zwischen DNA und verschiedenen Bindungspartnern, sowohl spezifischer^[50,51,529] als auch unspezifischer Natur.^[479,530-532] Durch Immobilisierung eines DNA-Stranges sowohl an der Spitze des Cantilevers als auch auf der Oberfläche und Aufnahmen von Kraft-Distanz Kurven mit verschiedenen DNA-bindenden Molekülen im Puffer lassen sich verschiedene Bindungstypen unterscheiden.^[479,531-533] Hierbei tritt zuerst eine Änderung der Form der DNA von der B-Form zur gestreckten S-Form auf, und anschließend reißen die Stränge der DNA auseinander.

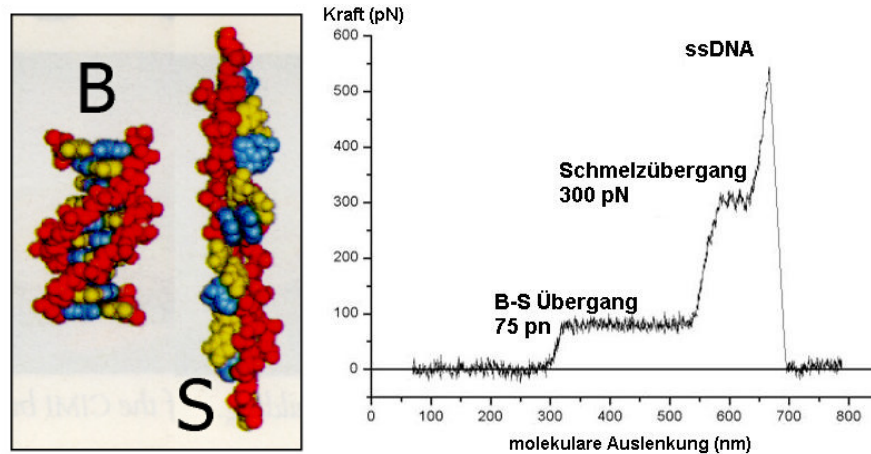


Abb. 48: Vergleich der S-Form der DNA mit der B-Form (links) und Darstellung eines Kraft/Distanz-Diagramms von DNA^[534]

3. Aufgabenstellung

Zur Synthese sequenzspezifisch an beliebig ausgewählte DNA bindender Peptide ist es wichtig, möglichst viel über die Interaktion der Aminosäuren mit den Nukleotiden zu wissen. Zu diesem Zweck können Peptide mit der Aminosäuresequenz der an der DNA-Bindung beteiligten Bereiche eingesetzt werden. Dies hat den Vorteil, daß die Peptide relativ einfach synthetisiert werden können, während die Proteine meist nicht so einfach zugänglich sind.

Basierend auf der Helix α^3 aus PhoB [*E. coli*], den Aminosäureresten 190-209 mit der Sequenz VEDRTVDVHIRRLRKALEPG, sollen Peptide synthetisiert werden, in denen die DNA-bindenden Aminosäurereste, die aus der NMR- und der Röntgenstruktur sowie aus Mutationsversuchen bekannt sind,^[57,67,68] jeweils einzeln gegen Alanin ausgetauscht werden; um ihren jeweiligen Beitrag zur Bindung zu untersuchen. Außerdem sollen Peptide synthetisiert werden, bei denen nicht an der Bindung beteiligte Reste gegen basische Reste ausgetauscht werden, was die Bindung verbessern könnte. Auch unterschiedlich *N*- und *C*-terminal modifizierte Peptide sollen synthetisiert werden. Es sollen verschiedene Synthesewege zur Synthese der Peptide verwendet und diese verglichen werden. Die Wechselwirkung der synthetisierten Peptide mit DNA sollen im Molekülensemble mittels Oberflächenplasmonresonanz und CD-Spektroskopie und auf Einzelmolekülniveau mittels Kraftspektroskopie untersucht werden.

Weiterhin soll ein als Azotandem bezeichnetes, photoschaltbares Cyclodepsipeptid auf Basis des synthetischen, auf Triostin A basierenden Bisinterkalators TANDEM synthetisiert werden.^[93] Als Photoschalter soll ein vorhandener Azobenzolbaustein verwendet werden.^[197] Die Photoschaltbarkeit des Cyclodepsipeptides soll mittels UV-Spektroskopie untersucht werden.

Außerdem soll die Aminosäuresequenz des DNA-bindenden Epitops in ExpG aus *S. meliloti* aufgeklärt werden. Das *epitope mapping* soll durch Synthese kurzer Peptide überlappender Aminosäuresequenzen aus dem Protein und der anschließenden Untersuchung ihrer Wechselwirkung mit der DNA erfolgen. Wird dieser Prozeß mehrmals nacheinander durchgeführt, sollte das Peptid mit der größten Affinität zum Protein aufgefunden werden können. Die Interaktion mit der DNA soll mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht werden werden.

4. Spezieller Teil

4.1 Der Transkriptionsaktivator PhoB und Mutanten

4.1.1 Einleitung

Um die Bindung des DNA-bindenden Epitopes aus PhoB [*E. coli*] an die entsprechende DNA zu untersuchen, sollte ein mit einem Linker am C-Terminus versehenes Peptid mit 20 Aminosäureresten synthetisiert werden. Dessen Sequenz sollte die Primärsequenz der DNA-bindenden, amphiphilen Helix α^3 enthalten. Als Sequenz wurde VEDRTVDVHIRRLRKALEPG gewählt, entsprechend den Aminosäureresten 190 bis 209. Der Linker ist nötig, um einen gewissen Abstand des Peptids nach seiner Immobilisierung auf der Mica-Oberfläche zu gewährleisten, die zur Durchführung der Kraftspektroskopie nötig ist. Als Linker wurde 1,8-Diamino-3,6-dioxaocan verwendet. Der N-Terminus des Peptids wurde acetyliert. Im Weiteren wird dieses Konstrukt als PhoB(190-209)Linker bezeichnet. Außerdem sollte das entsprechende Epitop aus der V190M-Mutante des PhoB [*E. coli*] mit der Sequenz MEDRTVDVHIRRLRKALEPG sowie das entsprechende Epitop aus PhoB [*S. meliloti*] mit der Sequenz VDERTVDVHVGRLRKALNFS synthetisiert werden (Abb.: 49). Die V190M-Mutante des Proteins bindet besser an die entsprechende DNA als die natürlich vorkommende Variante. Alle drei Peptide sollten mittels AFM und SPR auf ihre Bindungseigenschaften an DNA-Fragmente, die das Erkennungsmuster TGTCA enthalten, untersucht werden.

| | | |
|-------------------|-----|---------------------------------------|
| VEDRTVDVHIRRLRKAL | EPG | PhoB [<i>E. coli</i>] |
| MEDRTVDVHIRRLRKAL | EPG | V190M-Mutante PhoB [<i>E. coli</i>] |
| VDERTVDVHVGRLRKAL | NFS | PhoB [<i>S. meliloti</i>] |

Abb.49: Vergleich der Sequenzen der zu synthetisierenden Peptide.

4.1.2 Synthese

4.1.2.1 Einleitung

Die Modifikation des C-Terminus mit dem Linker kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Es ist möglich, das abgespaltene, voll geschützte Peptid in Lösung am C-Terminus zu modifizieren, jedoch ist die Aufreinigung eines voll geschützten Peptides nicht trivial, da seine Löslichkeit in den üblicherweise verwendeten Lösungsmitteln sehr gering ist. Außerdem hat es die Tendenz, hydrophobe Wechselwirkungen mit den in den RP-HPLC-Säulen verwendeten Trennphasen, modifizierten C18-Kieselgelen, einzugehen. Dies führt zu Problemen bei der Reinigung.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Peptidsynthese am Safety-catch-Harz. Von diesem kann es nach automatisierter SPPS, die mit Standard-Peptidsynthesemethoden erfolgen kann, und anschließender Aktivierung mit Iodacetonitril mit einem Nucleophil, hier 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan, abgespalten werden. Jedoch ist in diesem Fall die Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure und die Aktivierung relativ zeitaufwendig, und die Methode erlaubt nicht die Verwendung aller Aminosäurederivate. Außerdem muß ein Mono-Boc-geschütztes Derivat des Linkers synthetisiert werden, um eine mögliche Dimerisierung zu verhindern.

Weiterhin wäre es auch möglich, das Peptid in zwei Fragmenten zu synthetisieren. Nach der Abspaltung des vollgeschützten *N*-terminalen Fragments könnte dieses in Lösung oder an das noch ans Harz gebundene *C*-terminale Fragment gekuppelt werden. Auch hier besteht jedoch wieder das Problem der Aufarbeitung vollgeschützter Peptide.

Als letzte Möglichkeit bietet es sich an, die erste Aminosäure bereits vor der Peptidsynthese zu funktionalisieren, und funktionalisiert auf dem Harz zu immobilisieren, jedoch läßt sich auch eine *C*-terminal funktionalisierte, *N*-terminal geschützte Aminosäure nur unter großem Aufwand aufreinigen. Im Idealfall kann zuerst das Harz mit dem gewünschten Linker beladen werden und dieses modifizierte Harz dann mit der ersten Aminosäure.

4.1.2.2 Versuch der Synthese des PhoB(190-209)Linker am Safety-catch-Harz

Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 5

Der erste Versuch zur Synthese des PhoB(190-209)Linker erfolgte am Safety-catch-Harz. Die Synthese am Safety-catch-Harz hat für das amphiphile, helicale Modellpeptid Ac(LARL)₃Linker problemlos funktioniert,^[535] und sollte deshalb auch für das Epitop aus PhoB [*E. coli*] verwendet werden.

Die Beladung des Safety-catch-Harzes erfolgte nach Quellen des Harzes in Chloroform mit 5 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure bei -20°C unter Zugabe von 3 Äquivalenten PyBOP innerhalb von 8h.^[155] Die Beladungsbestimmung nach Reinigung und Trocknung ergab eine Beladung von 0.43 mmol/g im Falle des Fmoc-Gly-OH. Die Synthese des Peptids erfolgte automatisiert im Peptidsynthesizer. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF versetzt. Die Kupplung der nächsten Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgte mit 3 Äquivalenten TBTU und 6 Äquivalenten DIPEA sowie 3 Äquivalenten des entsprechenden Aminosäurederivates bezogen auf die Beladung des Harzes für 30 min. Die Acetylierung erfolgte in DMF mit 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid und 2 Äquivalenten Pyridin innerhalb von 1h.

Zur Aktivierung wurde das Harz unter Lichtausschluß unter Argon in NMP mit 20 Äquivalenten Iodacetonitril und 5 Äquivalenten DIPEA für 24 h geschüttelt. Die Abspaltung erfolgte durch Zugabe von 3 Äquivalenten *N-tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan zum in DMF unter Argon gequollenen Harz. Nach Schütteln über Nacht wurde das Harz abfiltriert und mehrfach mit DCM und DMF gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Trockne eingengt. Um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, wurde der Rückstand in einer Lösung von 5% TIPS in TFA gelöst und 6h geschüttelt. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde das Produkt HPL-chromatographisch gereinigt. Es zeigte sich jedoch, daß die Synthese nicht erfolgreich war, da auch das Trityl-geschützte Histidin 198 mit dem Iodacetonitril reagiert.^[536]

4.1.2.3 Versuch der Synthese des PhoB(190-209)Linker [*S. meliloti*] mittels Fragmentkondensation

Um das Problem der Inkompatibilität von His(Trt) in einer Synthese am Safety-Catch-Harz zu umgehen, wurde eine Fragmentkondensation versucht. Hierzu wurde das Epitop aus PhoB [*S. meliloti*] ausgewählt, VDERTVDVHVGRRLRKALNFS, da es an günstiger Stelle mitten in der Sequenz ein achirales Glycin enthält. Die Kupplung an dieser Stelle vermeidet die Möglichkeit einer Razemisierung während der Kupplung. Das *N*-terminale Fragment VDERTVDVHVG wurde am 2Cl-Trt-Harz synthetisiert, von dem es vollgeschützt abgespalten werden kann, und das *C*-terminale Fragment RLRKALNFS-Linker wurde am Safety-Catch-Harz synthetisiert. Anschließend sollten beide in Lösung gekuppelt werden.

Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-OH 6

Zur Synthese des *N*-terminalen Fragmentes wurde 2Cl-Trt-Harz mit Fmoc-Gly-OH beladen. Die Beladung des 2Cl-Trt-Harz erfolgte nach Quellen des Harzes in DCM mit 4.8 Äquivalenten DIPEA und 1.2 Äquivalenten der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure. Anschließend wurde mit DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) gewaschen, um nicht abreagierte Kupplungspositionen am Harz zu cappen. Die Beladungsbestimmung nach Reinigung und Trocknung ergab eine Beladung von 0.68 mmol/g im Falle des Fmoc-Gly-OH. Der erste Versuch der Synthese erfolgte im Syntheseautomaten, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung erfolgte mit 1% TFA in DCM, wobei das vollständig geschützte Peptid erhalten wurde. Bei der Aufreinigung mittels HPLC treten jedoch die bereits erwähnten Probleme der Hydrophobizität auf, das Produkt konnte erst nach mehreren Läufen von der HPLC-Säule gewaschen werden und war nicht rein.

Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH 7

Zur Synthese des *C*-terminalen Fragmentes wurde das Safety-Catch-Harz mit Fmoc-Ser(^tBu)-OH beladen. Die Beladung des Safety-catch-Harzes erfolgte nach Quellen des Harzes in Chloroform mit 5 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure bei -20°C unter Zugabe von 3

Äquivalenten PyBOP innerhalb von 8h.^[155] Die Beladungsbestimmung nach Reinigung und Trocknung ergab eine Beladung von 0.43 mmol/g im Falle des Fmoc-Ser(^tBu)-OH. Die Synthese erfolgte im Syntheseautomaten, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Aktivierung des Harzes erfolgte unter Lichtausschluß unter Argon in NMP mit 20 Äquivalenten Iodacetonitril und 5 Äquivalenten DIPEA für 24 h. Die Abspaltung erfolgte durch Zugabe von 3 Äquivalenten *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan zum in DMF unter Argon gequollenen Harz. Nach Schütteln über Nacht wurde das Harz abfiltriert und mehrfach mit DCM und DMF gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Trockne eingengt. Nach der Aufreinigung mittels HPLC konnte kein Produkt mehr isoliert werden.

Der nächste Syntheserversuch für das C-terminale Fragment erfolgte manuell am 2Cl-Trt-Harz **8**. Gekuppelt wurde mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgte mit je 2% DBU und Piperidin in DMF für zweimal 15 min. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit HFIP in DCM im Verhältnis 1:4. Die Kupplung soll mit dem Rohprodukt durchgeführt werden.

Die nächste Synthese des C-terminalen Fragments erfolgte wieder automatisch, diesmal jedoch am 2Cl-Trt-Harz **9**. Dies bedeutet, daß nach der Kupplung der Fragmente das Peptid C-terminal mit *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan modifiziert werden muß. Die Beladung des 2Cl-Trt-Harzes erfolgte nach Quellen des Harzes in DCM mit 4.8 Äquivalenten DIPEA und 1.2 Äquivalenten der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure. Anschließend wurde mit DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) gewaschen, um nicht abreagierte Kupplungspositionen am Harz zu cappen. Die Beladungsbestimmung nach Reinigung und Trocknung ergab eine Beladung von 1.26 mmol/g im Falle des Fmoc-Ser(^tBu)-OH. Die Synthese erfolgte im Syntheseautomaten mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure zur Kupplung und je 2% DBU und Piperidin in DMF zur Abspaltung der temporären Schutzgruppe. Nach der Synthese wurde das Harz aufgeteilt, und das Peptid von der einen Hälfte mit HFIP in DCM im Verhältnis 1:4 abgespalten.

**10**

Es wurde versucht, den *C*-Terminus dieses Fragments in Lösung mittels 2Cl-TrtCl zu schützen. Hierzu wurde wieder das Rohprodukt eingesetzt, und zu Berechnung der einzusetzenden Menge von 100% Ausbeute ausgegangen. Das Rohprodukt wurde in 2 mL DMF gelöst und 1.2 Äquivalente in 500 μ L DMF gelöstes 2Cl-TrtCl sowie 4 Äquivalente DIPEA in 500 μ L DMF wurden hinzugegeben. Die Reaktionskontrolle im MALDI-ToF-MS zeigte jedoch auch nach einer Reaktionszeit von mehreren Tagen nicht das gewünschte Produkt, sondern nur noch nicht identifizierbare Fragmente.

Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 11

Mit der anderen Hälfte des Harzes wurde versucht, das komplette Peptid am Harz zu synthetisieren **11a**. Hierzu wurde das Harz in 500 μ L DMF gequollen, das Rohprodukt der manuellen Synthese des *N*-Terminus in 1750 μ L DMF, 1.1 Äquivalente HATU in 1000 μ L DMF gelöst und alles mit 2.2 Äquivalenten DIPEA zusammen gegeben. Nach 2 Tagen wurden nochmals 1.1 Äquivalente HATU und 2.2 Äquivalente DIPEA hinzugegeben, trotzdem war kein vollgeschütztes Peptid, sondern nur noch undefinierbare Fragmente im MALDI-ToF-MS zu finden.

Als nächstes wurde das *C*-terminale Fragment nochmals im Syntheseautomaten synthetisiert, und versucht, es in einem Medium zu lösen, mit dem die HPLC arbeiten kann. Dies geschah in der Hoffnung, daß ein Wechsel der Laufmittel eine Aufreinigung mittels HPLC ermöglicht. Es zeigte sich, daß das vollgeschützte *C*-terminal Fragment weder in 95 % Wasser, 5 % Acetonitril und 0.1% TFA noch in 95 % Acetonitril, 5 % Wasser und 0.1% TFA, den Standard-Eluenten der RP-HPLC, löslich war. Auch die Verwendung eines 100 mM KH_2PO_4 / NaHPO_4 Phosphatpuffers statt des Wassers änderte dies nicht. Die Zugabe der chaotropen Reagenzien 0.1 mM NaClO_4 oder 6M

Guanidinium·HCl verbesserten die Löslichkeit nicht. Selbst in DMSO war das vollgeschützte Peptid nicht löslich.

Dies läßt vermuten, daß eine Aufreinigung dieses vollgeschützten Fragmentes und vermutlich auch des vollgeschützten kompletten Peptides mittels HPLC nicht möglich ist.

4.1.2.4 Versuch der Synthese des PhoB(190-209) [*S. meliloti*] am 2Cl-Trt-Harz mit anschließender C-terminaler Funktionalisierung

Nachdem die Synthese am Safety-catch-Harz und die Versuche mit vollgeschützten Fragmenten fehlgeschlagen waren, erfolgte als nächstes der Versuch, das Fragment komplett am 2-Cl-Trt-Harz zu synthetisieren **11b**, und es anschließend mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan C-terminal zu funktionalisieren. Zu diesem Zweck wurde am mit Fmoc-Ser(^tBu)-OH beladenem 2Cl-Trt-Harz im Syntheseautomaten das vollständige Epitop des PhoB [*S. meliloti*], VDERTVDVHVGRLRKALNFS, aufgebaut. Die Kupplung erfolgte mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure, die Abspaltung mit je 2% DBU und Piperidin in DMF. Es gelang jedoch nicht, das Peptid vollgeschützt vom Harz abzuspalten, weder mit 0,5% oder 1% TFA in DCM, noch mit HFIP in DCM im Verhältnis 1:4. Auch die Trityl-Schutzgruppen am Histidin- und/oder Glutamin-Rest wurden abgespalten, so daß kein vollgeschütztes Peptid zu finden war.

Da auch bei dieser Methode das schlecht lösliche vollgeschützte Peptid aufgearbeitet werden mußte, wurde diese Strategie zu Gunsten der nächsten nicht weiterverfolgt.

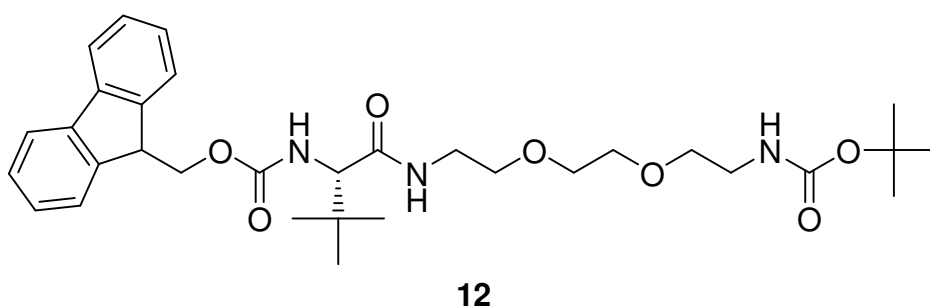
4.1.2.5 Synthese des PhoB(190-209)Linker am 2Cl-Trt-Harz

Um die C-terminale Modifikation am vollgeschützten Peptid überflüssig zu machen, wird angestrebt, das bereits modifizierte Peptid am Harz zu synthetisieren, und dies anschließend komplett entschützt abzuspalten. Zu diesem Zweck wird an die Fmoc-geschützte C-terminale Aminosäure, im Fall von PhoB [*S. meliloti*] Fmoc-Ser(Bzl)-OH, der monogeschützte Linker, *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan, kondensiert. Die Seitenkette des Serins wird mit der hydrogenolytisch abzuspaltenden Benzyl-Schutzgruppe permanent geschützt, da die *tert*-Butyl-Schutzgruppe bei der Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe vom Linker nach der Kondensation auch abgespalten werden würde. Von diesem Konstrukt wird C-terminal die Boc-Schutzgruppe

abgespalten. Anschließend wird das 2Cl-Trt-Harz mit diesem Konstrukt beladen, und die Peptidsynthese im Syntheseautomaten durchgeführt. Nach der Synthese kann das Peptid komplett entschützt abgespalten werden.

4.1.2.5.1 Kondensation von Fmoc-Leu-OH mit *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Als Probereaktion wurde aus Kostengründen anstelle von Fmoc-Ser(Bzl)-OH Fmoc-Leu-OH verwendet, um die Reaktion zu testen.



Zur Kondensation von Fmoc-Leu-OH mit *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan wurden 1 Äquivalent EDC·HCl und 1 Äquivalent NMM in auf 0°C gekühltem DCM gelöst. Es wurden 1 Äquivalent HOBT·H₂O, 1 Äquivalent Fmoc-Leu-OH und 1 Äquivalent *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan hinzugegeben. Nach Beendigung und Aufarbeiten der Reaktion wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie mit verschiedenen EtOAc/PE 60/80 Gradienten gereinigt. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das Produkt 2 h mit TFA/DCM 2:5 (v/v) behandelt.

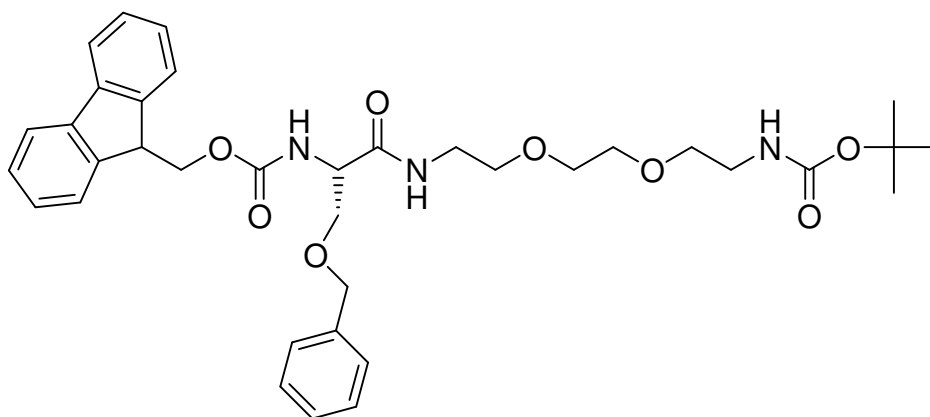
Nach der Aufreinigung konnte das Produkt mit 88% Ausbeute isoliert werden, so daß dieser Syntheseweg geeignet erscheint.

4.1.2.5.2 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Leu-Linker

Zur Beladung des 2Cl-Trt-Harzes wurde das Harz in DMF gequollen und mit 1.2 Äquivalenten der modifizierten Aminosäure sowie 4.8 Äquivalenten DIPEA versetzt. Nach Aufarbeiten und Trocknen des Harzes ergab die Beladungsbestimmung eine Beladung von

0.25 mmol/g. Es ist also möglich, das 2Cl-Trt-Harz mit der modifizierten Aminosäure zu beladen.

4.1.2.5.3 Kondensation von Fmoc-Ser(Bzl)-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe



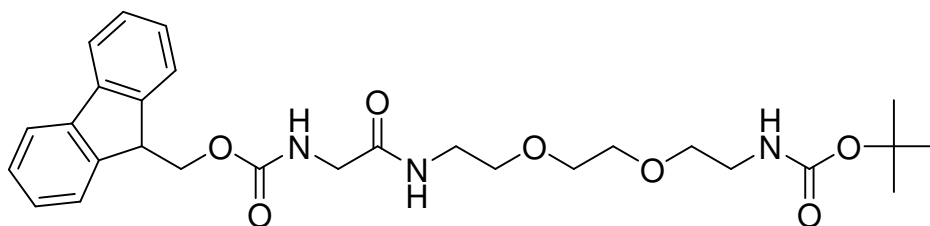
13

Zur Kondensation von Fmoc-Ser(Bzl)-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan wurden 1.5 Äquivalent EDC•HCl und 1.5 Äquivalent NMM in auf 0°C gekühltem DCM gelöst. Es wurden 1.5 Äquivalent HOBt•H₂O, 1 Äquivalent Fmoc-Ser(Bzl)-OH und 1 Äquivalent *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan hinzugegeben. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das Produkt 2 h mit TFA/DCM 2:5 (v/v) behandelt. Nach Beendigung und Aufarbeiten der Reaktion wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

4.1.2.5.4 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Ser(Bzl)-Linker

Zur Beladung des 2Cl-Trt-Harzes wurde das Harz in DMF gequollen und 1.2 Äquivalente der modifizierten Aminosäure sowie 4.8 Äquivalente DIPEA wurden hinzugegeben. Nach Aufarbeiten und Trocknen des Harzes ergab die Beladungsbestimmung eine Beladung von 0.8 mmol/g.

4.1.2.5.5 Beladung des 2Cl-Trt-Harzes mit Fmoc-Gly-Linker



14

Um nicht nur das DNA-bindende Epitop aus PhoB [*S. meliloti*], sondern auch die aus PhoB [*E. coli*] und der V190M-Mutante des PhoB [*E. coli*] zu synthetisieren, wurde Fmoc-Gly-OH auf dieselbe Weise mit dem Linker kondensiert und 2Cl-Trt-Harz mit dem Konstrukt beladen. Zur Beladung des 2Cl-Trt-Harzes wurde das Harz in DMF gequollen und 1.2 Äquivalente der modifizierten Aminosäure sowie 4.8 Äquivalente DIPEA hinzugegeben. Nach Aufarbeiten und Trocknen des Harzes ergab die Beladungsbestimmung eine Beladung von 0.76 mmol/g.

4.1.2.5.6 Synthese der DNA-bindenden Epitope aus PhoB [*S. meliloti*], PhoB [*E. coli*] und der V190M-Mutante des PhoB [*E. coli*] am 2Cl-Trt-Harz

Die Synthese der drei verschiedenen DNA-bindenden Epitope aus PhoB [*S. meliloti*], PhoB [*E. coli*] und der V190M-Mutante des PhoB [*E. coli*] sollte parallel im Syntheseautomaten erfolgen. Da nur der letzte Aminosäurerest in der V190M-Mutante von PhoB [*E. coli*] abweicht, und noch dazu ein Methioninrest ist, der mit Luftsauerstoff oxidiert werden kann, soll die letzte Aminosäure manuell gekuppelt werden. Es wurden also Peptide mit den Sequenzen VDERTVDVHVGRRLRKALNFS für PhoB [*S. meliloti*] und EDRTVDVHIRRLRKALEPG für PhoB [*E. coli*] und die V190M-Mutante des PhoB [*E. coli*] synthetisiert. Die Synthese erfolgte im Syntheseautomaten, die Kupplung erfolgte mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure, die Abspaltung mit je 2% DBU und Piperidin in DMF.

4.1.2.5.7 Acetylierung von PhoB(190-209) [*S. meliloti*]

Um den *N*-Terminus des Peptids zu acetylieren, wurde das Harz in DMF gequollen, 2 Äquivalente Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid hinzugegeben, 2 h geschüttelt und anschließend gewaschen.

4.1.2.5.8 Synthese von PhoB(190-209) [*S. meliloti*]**Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 15**

Das *N*-terminal acetylierte, *C*-terminal mit dem Linker funktionalisierte Peptid wurde mit 5% TFA in DCM vom Harz abgespalten. Es wurde bewußt eine kurze Reaktionszeit gewählt, da die kurze Kontaktzeit des TFA/DCM-Gemisches verhindert, daß sich zu viel Harz auflöst, welches anschließend vom Produkt getrennt werden muß. Allerdings war die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen noch unvollständig. Um die Schutzgruppen vollständig zu entfernen, wurde das Produkt über Nacht in 76% TFA, 13% Wasser, 8% Thioanisol und 3% TIPS geschüttelt und aufgearbeitet. Nach der Gefriertrocknung mußte noch die Bzl-Schutzgruppe vom Peptid abgespalten werden, dies geschah katalytisch mit Pd/Aktivkohle und Wasserstoff. Die abschließende Reinigung des Peptides erfolgte mittels HPLC in zwei aufeinander folgenden Läufen mit verschiedenen Gradienten. Es konnten 0.8 mg Produkt isoliert werden, dies entspricht einer Ausbeute von 0.05%

4.1.2.5.9 Synthese von PhoB (190-209) [*E. coli*]**Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 16**

Das Harz der Synthese von EDRTVDVHIRRLRKALEPGLinker wurde in zwei Teile geteilt. Zur Synthese von PhoB(190-209)Linker aus [*E. coli*] wurde manuell Fmoc-Val-OH an das harzgebundene Peptid gekuppelt. Die Kupplung erfolgte mit je 1.5 Äquivalenten Fmoc-Val-OH und TBTU sowie 3 Äquivalenten DIPEA, die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Anschließend wurde das Peptid mit 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid und 2 Äquivalenten Pyridin acetyliert. Die Abspaltung des Peptids erfolgte mit 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% Wasser. Die abschließende Aufreinigung des Peptids erfolgte mittels HPLC in zwei

aufeinander folgenden Läufen mit verschiedenen Gradienten. Es konnten 22.4 mg Produkt isoliert werden, dies entspricht einer Ausbeute von 6%.

4.1.2.5.10 Synthese der V190M-Mutante von PhoB (190-209) [*E. coli*]

Ac-Met-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 17

Der zweite Teil des Harzes der Synthese von EDRTVDVHIRRLRKALEPGLinker wurde in DMF gequollen. Zur Synthese der V190M-Mutante von PhoB [*E. coli*] wurde manuell Fmoc-Met-OH an das harzgebundene Peptid gekuppelt. Die Kupplung erfolgte mit je 1.5 Äquivalenten Fmoc-Met-OH und TBTU sowie 3 Äquivalenten DIPEA, die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Anschließend wurde das Peptid mit 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid und 2 Äquivalenten Pyridin acetyliert. Nach Abspaltung des Peptids mit 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% Wasser war kein Produkt mehr im MALDI-ToF-MS nachzuweisen.

4.1.2.6 Synthese der DNA-bindenden Epitope aus PhoB (190-209) [*S. meliloti*] und PhoB (190-209) [*E. coli*] am mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan funktionalisierten 2Cl-Trt-Harz

Da die Aufreinigung der mit dem Linker oder dem Boc-geschütztem Linker funktionalisierten Fmoc-geschützten Aminosäure sehr zeitaufwendig ist, wird zuerst das Harz mit dem Linker beladen, und anschließend die erste Aminosäure manuell ans Harz gekuppelt.

Die Beladung des Harzes erfolgte nach Quellen des Harzes in DCM, anschließendem Entfernen des DCM und Zugabe von 10 mL 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan /g Harz, was bei einer Beladung von 1.4 mmol potentieller Bindestellen /g Harz einem 50fachen Überschuß entspricht. Nach 1 h Schütteln wurde das Harz gewaschen und getrocknet.

Die Kupplung der ersten Aminosäure erfolgte mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 1.5 Äquivalenten der Aminosäure und 3 Äquivalenten DIPEA in DMF. Nach Waschen und Trocknen wurde die Beladung bestimmt, für Fmoc-Gly-OH wurde eine Beladung von 0.61 mmol/g erreicht, im Falle des Fmoc-Ser(^tBu)-OH von 0.88 mmol/g.

Die Synthese der Peptide erfolgte im Syntheseautomaten, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure zur Kupplung. Die

Kupplung wurde als Doppelkupplung durchgeführt, also zweimal nacheinander ohne zwischenzeitliche Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe. Dies verringert das Auftreten von Fehlsequenzen und erhöht die Ausbeute. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgte mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF.

4.1.2.6.1 Synthese von PhoB (190-209) [*E. coli*]

Der *N*-Terminus des Peptids wurde mit 2 Äquivalenten Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid acetyliert, und das Peptid wurde mit 50% TFA, 47.5% DCM und 2.5% TIPS vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC, in zwei aufeinander folgenden Läufen mit verschiedenen Gradienten. Es konnten 2.5 mg Produkt **18** isoliert werden, dies entspricht einer Ausbeute von 0.5 %.

4.1.2.6.2 Synthese von PhoB (190-209) [*S. meliloti*]

Der *N*-Terminus des Peptids wurde mit 2 Äquivalenten Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid acetyliert, und das Peptid wurde mit 50% TFA, 47.5% DCM und 2.5% TIPS vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC, in vier aufeinander folgenden Läufen mit verschiedenen Gradienten. Am Ende konnte kein Produkt **19** isoliert werden.

4.1.2.7 Durchführung eines Alanin-Scans im DNA-bindenden Epitop PhoB(190-209) aus *E. coli*

Auf der Basis des Synthesewegs für das DNA-bindende Epitop aus PhoB [*E. coli*], wurde ein Alanin-Scan durchgeführt. Hierzu wurden Peptide synthetisiert, in denen sämtliche basischen Aminosäurereste und andere an der Bindung beteiligte Aminosäurereste in der Sequenz jeweils einzeln gegen Alanin ausgetauscht sind (Tab. 2, Abb. 50).

Tab. 2: Sequenz der für den Alanin-Scan synthetisierten Peptide, die variierte Aminosäure ist jeweils gelb markiert.

| | | |
|----|----------------------|-------------------------------|
| 18 | VEDRTVDVHIRRLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] |
| 20 | VADRTVDVHIRRLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] E191A |
| 21 | VEDATVDVHIRRLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] R193A |
| 22 | VEDRAVDVHIRRLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] T194A |
| 23 | VEDRTVDVAIRRLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] H198A |
| 24 | VEDRTVDVHIARLRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] R200A |
| 25 | VEDRTVDVHIRALRKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] R201A |
| 26 | VEDRTVDVHIRRLAKALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] R203A |
| 27 | VEDRTVDVHIRRLRAALEPG | PhoB [<i>E. coli</i>] K204A |

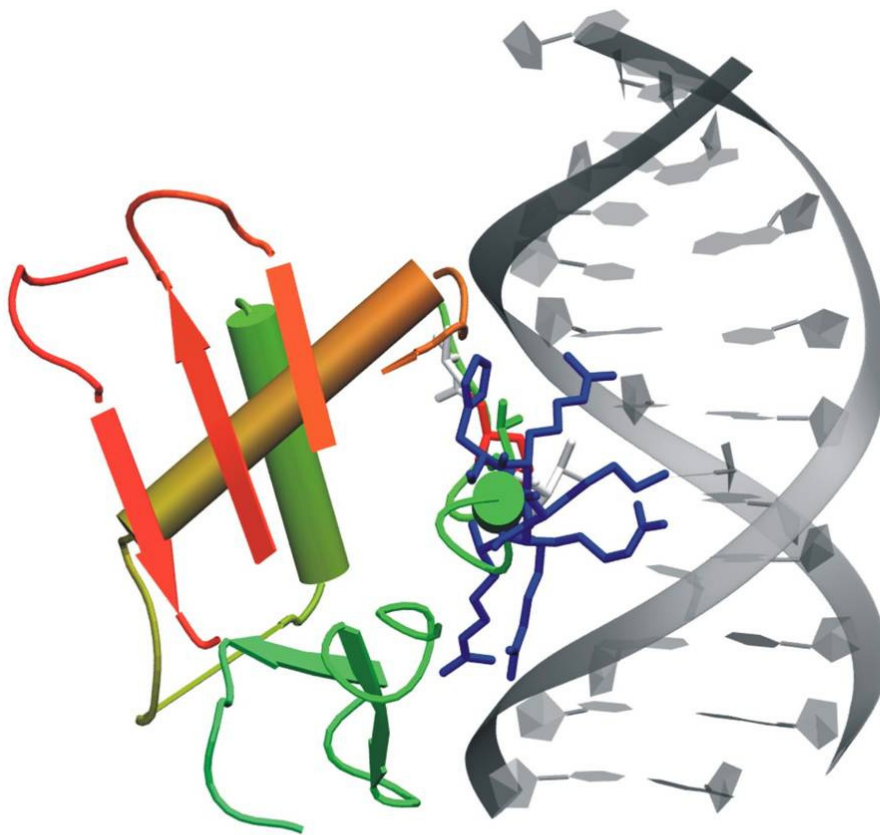


Abb. 50: Darstellung der Bindung eines Moleküls PhoB an die komplementäre DNA mit Blick entlang der DNA-bindenden Helix α^3 . Die Seitenketten der basischen Reste (Arg, Lys, His) sind blau dargestellt, die des Thr-Rests rot und die der Glu-Reste weiß.^[65]

Vergleichende Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz und Kraftspektroskopie sollten dann Aufschluß über den Grad der Beteiligung der einzelnen Aminosäuren an der Bindung zur DNA geben können.

Die Synthese wurde am mit dem Linker 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan funktionalisiertem und mit Fmoc-Glycin beladenem 2Cl-Trt-Harz im Syntheseautomaten durchgeführt. Die Kupplung erfolgte mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Kupplung wurde als Doppelkupplung durchgeführt. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgte mit 6% Piperazin in DMF, da die Rohprodukte im MALDI-ToF-MS sauberer zu sein scheinen und die Ausbeuten besser sind als bei der Abspaltung mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Der *N*-Terminus der Peptide wurde mit 2 Äquivalenten Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Peptide wurden mit 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% Wasser vom Harz abgespalten, und mittels HPLC mit mehreren Läufen und unterschiedlichen Gradienten aufgereinigt.

4.1.2.8 Synthese weiterer *C*- und *N*-terminal modifizierter Peptide

Zur Untersuchung des Einflusses der *N*- und *C*-terminalen Modifikation mit einer Acetyl-Gruppe und dem Linker wurden vier Peptide synthetisiert, die beide, keine und nur jeweils eine Modifikation enthalten (Tab. 3).

Tab. 3: Sequenz der für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Modifikationen des Peptids synthetisierten Peptide.

| | |
|-----------|--------------------------------|
| 18 | AC-VEDRTVDVHIRRLRKALEPG-Linker |
| 28 | AC-VEDRTVDVHIRRLRKALEPG |
| 29 | VEDRTVDVHIRRLRKALEPG-Linker |
| 30 | VEDRTVDVHIRRLRKALEPG |

Durch Bindungsstudien mittels der Oberflächenplasmonresonanz sollte dann untersucht werden, welchen Einfluß die Modifikationen auf die Bindungseigenschaften der Peptide haben.

Die Synthese erfolgte am 2Cl-Trt-Harz, das im Falle der *C*-terminal mit dem Linker funktionalisierten Peptide noch mit dem Linker 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan beladen wurde. Die Kupplung erfolgte mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Kupplung wurde als Doppelkupplung durchgeführt, also zweimal nacheinander ohne zwischenzeitliche Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgte mit 6% Piperazin in DMF, da die Rohprodukte im MALDI-ToF-MS sauberer zu sein scheinen und die Ausbeuten besser sind als bei der Abspaltung mit 2% DBU und 2%

Piperidin in DMF. Jeweils eine C-terminal funktionalisierte und nicht funktionalisierte Harzfraktion wurde mit 2 Äquivalenten Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Peptide wurden mit 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% Wasser vom Harz abgespalten, und mittels HPLC mit mehreren Läufen und unterschiedlichen Gradienten aufgereinigt.

4.1.2.9 Durchführung eines Arginin-Scans im DNA-bindenden Epitop PhoB(190-209) aus [*E. coli*]

Um zu versuchen, die Bindungsfähigkeit des Peptids mit der Primärsequenz des natürlich vorkommenden Proteins zu verbessern, wurden Peptide synthetisiert, in denen an geeignet scheinenden Stellen andere Aminosäurereste gegen Argininreste ausgetauscht sind. Diese Stellen wurden so ausgewählt, daß die amphiphile Struktur der DNA-bindenden Helix α^3 verstärkt wird. Dies kann dadurch erreicht werden, daß die zusätzlichen basischen Argininreste im Peptid so eingefügt werden, daß im Abstand von 3-4 Aminosäureresten basische Reste auftreten. So läßt sich an der α -Helix, die 3,6 Aminosäurereste für eine vollständige Windung benötigt, ein einheitlich basisch geladener Bereich erzeugen, der mit den Phosphatgruppen der DNA wechselwirken kann. Die erhöhte Anzahl der basischen Aminosäurereste kann zwar nicht die Spezifität der Bindung verbessern, jedoch sollte es möglich sein, eine festere Bindung nach Erkennung der spezifischen Bindungssequenz zu erreichen.

Aspartat¹⁹⁶, Valin¹⁹⁷ und Glutamat²⁰⁷ liegen an geeigneter Position, und es wurden Peptide mit den einzelnen mutierten Aminosäuren und zwei Peptide mit jeweils zwei Mutationen, Glu²⁰⁷ und jeweils entweder Asp¹⁹⁶ oder Val¹⁹⁷ synthetisiert (Tab. 4).

Tab. 4: Sequenz der für den Arginin-Scan synthetisierten Peptide, die variierte Aminosäure ist jeweils gelb markiert, die im nativen Peptid enthaltenen basischen Aminosäurereste sind blau markiert.

18 VEDRTVDVHIRR^LRKALEPG PhoB [*E. coli*]
 31 VEDRTV^RVHIRR^LRKALEPG PhoB [*E. coli*] D196R
 32 VEDRTVD^RHIRR^LRKALEPG PhoB [*E. coli*] V197R
 33 VEDRTVDVHIRR^LRKAL^RPG PhoB [*E. coli*] E207R
 34 VEDRTV^RVHIRR^LRKAL^RPG PhoB [*E. coli*] D196R E207R
 35 VEDRTVD^RHIRR^LRKAL^RPG PhoB [*E. coli*] V197R E207R

Besonders gut ist in der Netzdarstellung des Peptids zu erkennen, daß diese Aminosäuren an geeignet Positionen sind um die basischen Bereiche zu vergrößern. Für eine

Netzdarstellung wird der „Zylinder“ der α -Helix „aufgeschnitten“, so kann das „Netzwerk“ der Seitenketten betrachtet werden kann (Abb. 51).

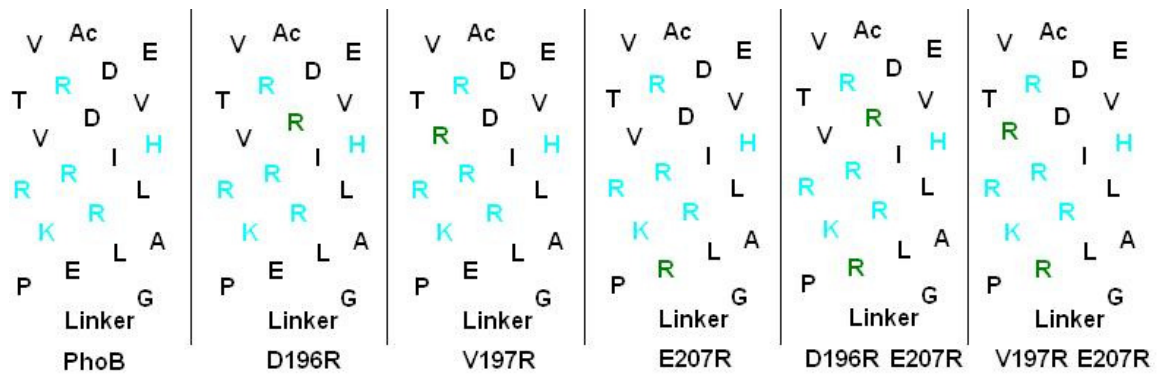


Abb. 51: Netzdarstellung der für den Arginin-Scan synthetisierten Peptide, die variierte Aminosäure ist jeweils grün markiert, die im nativen Peptid enthaltenen basischen Aminosäurereste sind blau markiert.

Auch die Darstellung als „Edmundson-Rad“ zeigt die Verstärkung der Amphiphilie durch die zusätzlich eingeführten basischen Aminosäurereste (Abb. 52).

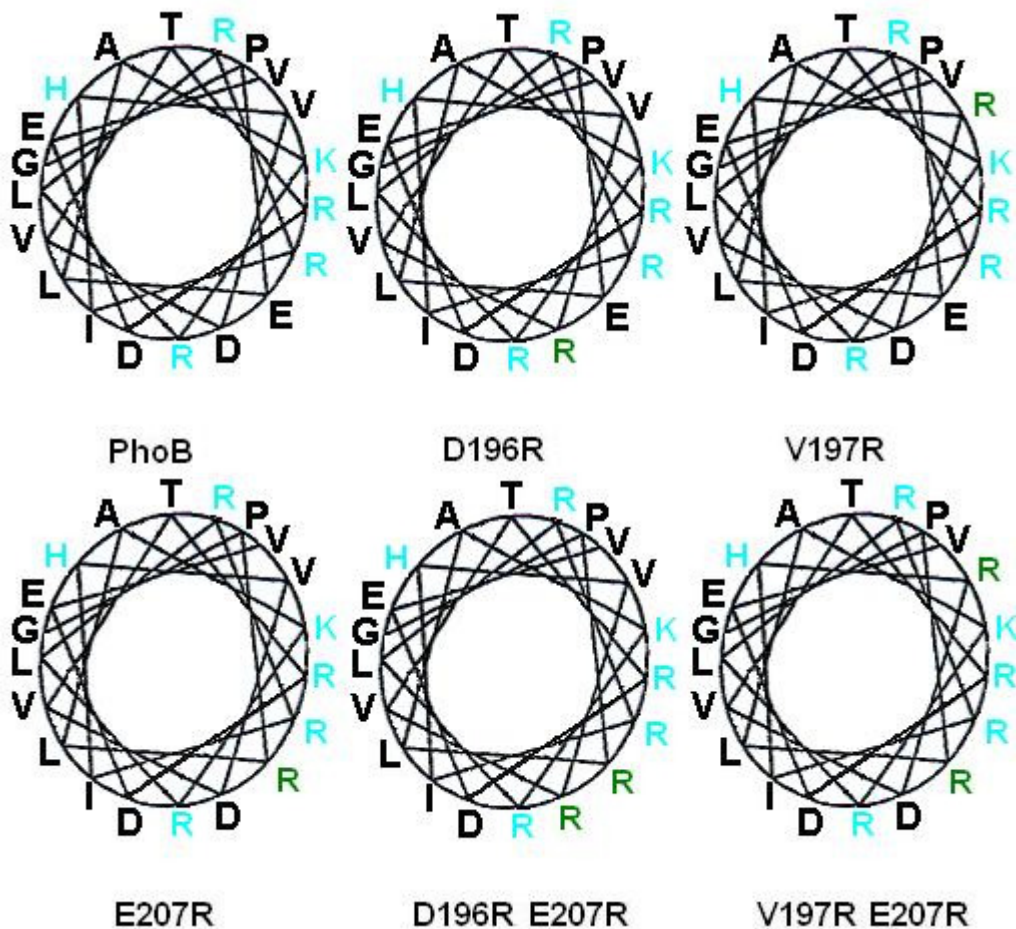


Abb. 52: Darstellung der Edmundson-Räder der für den Arginin-Scan synthetisierten Peptide, die variierte Aminosäure ist jeweils grün markiert, die im nativen Peptid enthaltenen basischen Aminosäurereste sind blau markiert.

Die Synthese wurde am mit dem Linker 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan funktionalisiertem und mit Fmoc-Glycin beladenem 2Cl-Trt-Harz im Syntheseautomaten durchgeführt. Die Kupplung erfolgte mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Kupplung wurde als Doppelkupplung durchgeführt, also zweimal nacheinander ohne zwischenzeitliche Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgte mit 6% Piperazin in DMF. Der *N*-Terminus der Peptide wurde mit 2 Äquivalenten Pyridin und 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Peptide wurden mit 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% Wasser vom Harz abgespalten, und mittels HPLC mit mehreren Läufen und unterschiedlichen Gradienten aufgereinigt. Nach der Aufreinigung von D196R konnte kein Produkt isoliert werden. Da die Bindungsstudien mittels der Oberflächenplasmonresonanz mit den übrigen Peptiden jedoch nicht zufriedenstellend waren (4.1.3.3) wurde von einer erneuten Synthese von D197R abgesehen.

4.1.3 Oberflächenplasmonresonanz

Zur Gewinnung kinetischer Daten über die Bindung der PhoB Peptide an die zu PhoB [*E. coli*] komplementäre DNA wurden Oberflächenplasmonresonanz-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde ein BIACORE[®] 3000 verwendet. Das Meßsystem besteht aus einem auswechselbaren Chip mit vier Flußkammern von je 2.1 mm Länge, 0.55 mm Breite und 0.05 mm Höhe. Diese Flußzellen sind sowohl unabhängig als auch gegeneinander schaltbar, wodurch Referenzmessungen möglich sind.

Für die Messungen wird auf der Meßzelle die zu PhoB(190-209) [*E. coli*] komplementäre 5'-biotinylierte DNA über die Streptavidin / Biotin Wechselwirkung immobilisiert, die das Bindemotiv mit vier aufeinander folgenden Bindestellen für PhoB enthält (Sequenz siehe unter 6.1.3.1). Auf der Referenzzelle wird eine identische Menge des pFPR-Fragments der EBNA-DNA ebenfalls über die Streptavidin / Biotin Wechselwirkung immobilisiert (Sequenz siehe unter 6.1.3.3), um unspezifische Wechselwirkungen detektieren zu können. Für die Messungen wurde angenommen, daß die Bindung an eine Bindungsstelle die Bindung an die übrigen Bindungsstellen nicht beeinflußt, so daß für die Auswertung von einem 1:1-Modell ausgegangen werden kann. Im Verlaufe der Datenanalyse zeigt sich jedoch, daß dies für das gewählte Versuchs-Setup nicht zulässig zu sein scheint.

4.1.3.1 Bindungsstudie mit PhoB und den aus dem Alanin-Scan stammenden Peptiden

4.1.3.1.1 Immobilisierung der DNA

Die Immobilisierung der DNA auf der Oberfläche eines SA-Sensor-Chips erfolgt mittels 5'-biotinylierter DNA. Anschließend wird so lange eine Lösung der DNA im Laufpuffer mit zusätzlich 5 M NaCl bei einem Fluß von 5 µL / min injiziert, bis die gewünschte Bindungsantwort erreicht wird. Als Puffer wird ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH₂PO₄ und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet. Das zusätzliche NaCl im Laufpuffer soll durch Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der DNA sicherstellen, daß das Biotin an der DNA auch frei vorliegt.

4.1.3.1.2 Erste Messung mit PhoB(190-209) [*E. coli*]

Die erste Messung mit dem Peptid mit der nativen Sequenz PhoB(190-209) [*E. coli*] erfolgte bei einem Fluß von 20 µL / min. Für die ersten Experimente wurden 2118 RU der DNA (Sequenz siehe 6.1.3.1) immobilisiert. Die Messungen erfolgten durch 5 min Injektion der Peptidlösung und 10 min zur Dissoziation der Peptide von der DNA, als Puffer wurde ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH₂PO₄ und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet. Die abschließende Regeneration erfolgte mit 0.5 M NaCl und 50 mM NaOH für 15 Sekunden. Für den ersten Test war auf der Oberfläche der Referenzzelle keine DNA immobilisiert. In dieser Meßreihe wurde durch die Differenzbildung die unspezifische Wechselwirkung mit der Dextranmatrix berücksichtigt, keine unspezifische Bindung an die DNA.

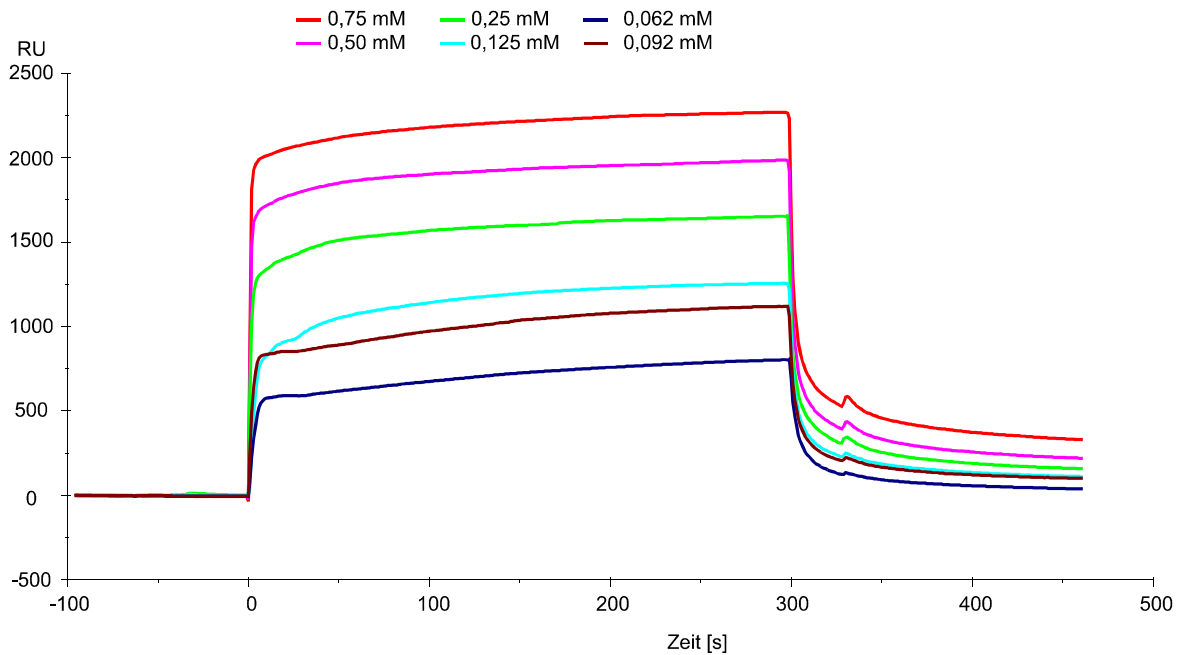


Abb. 53: Vergleich der Sensogramme der ersten Messung von PhoB(190-209) [*E. coli*], Bei diesen Experimenten war keine DNA auf der Referenzzelle immobilisiert.

Die Sensogramme für die unterschiedlichen Konzentrationen zeigen alle einen schnellen Anstieg zu Beginn der Injektion, dann einen langsamen Anstieg während der Assoziationsphase bis zum Ende der Injektion, einen schnellen Abfall direkt nach der Injektion und einen langsameren während der Dissoziationsphase (Abb. 53). Der erreichte ΔRU_{max} Wert ist offensichtlich konzentrationsabhängig. Die Tatsache, daß dieser zum Ende der Injektion noch nicht konstant ist, zeigt, daß die Assoziation noch nicht abgeschlossen ist.

4.1.3.1.3 Test auf Massentransfer-Limitierung

Massentransfer-Limitierungen treten auf, wenn die Moleküle schneller an einen Liganden binden als durch den Fluß der Injektion weitere Moleküle herangebracht werden können (siehe 2.5.3.3). Um zu überprüfen, ob diese Diffusions-limitierten Prozesse hier eine Rolle spielen, wurden Messungen mit unterschiedlichen Flußraten durchgeführt. Die Messungen wurden mit einer Konzentration von 0.1 mM des untersuchten Peptides PhoB(190-209) R201A [*E. coli*] im Standardpuffer, 100 mM KH_2PO_4 und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4, durchgeführt. Auf der Oberfläche der Referenzzelle wurde jedoch zusätzlich eine identische Menge eines biotinylierten pFPR-Fragmentes der EBNA-DNA immobilisiert (Sequenz siehe 6.1.3.3). Durch Subtraktion der Messungen an diesem Fragment sollten

sich unspezifische Wechselwirkungen mit der DNA getrennt ermitteln lassen. Für die Messung wurde jedesmal für 3 min die Peptidlösung injiziert, und dann 10 min lang die Dissoziation der Peptide von der DNA beobachtet. Die abschließende Regeneration erfolgt mit 0.5 M NaCl und 50 mM NaOH für 15 Sekunden.

Die Messungen mit Flußraten von 5 $\mu\text{L} / \text{min}$ bis 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ ergaben keinen Hinweis auf eine Massentransferlimitierung, jedoch zeigte sich später, daß mit noch höheren Flußraten gemessen werden müßte, um den Einfluß der Massentransferlimitierung zu minimieren.

Die folgenden Messungen wurden bei 20 $\mu\text{L} / \text{min}$ durchgeführt.

4.1.3.1.4 Bindungsstudien mit den aus dem Alanin-Scan stammenden Peptiden

Für die Messung wurde jedesmal während 3 min die Peptidlösung injiziert, und dann während 10 min die Dissoziation der Peptide von der DNA beobachtet. Die abschließende Regeneration erfolgte mit 0.5 M NaCl und 50 mM NaOH für 15 Sekunden. Für die Bindungsanalyse wurden unterschiedliche Konzentrationen von 2 mM bis 0.001 mM untersucht. Auf der Messzelle waren 2118 RU der komplementären DNA (Sequenz siehe **6.1.3.1**), auf der Referenzzelle die entsprechende Menge des pFPR-Fragmentes der EBNA-DNA (Sequenz siehe **6.1.3.3**) immobilisiert.

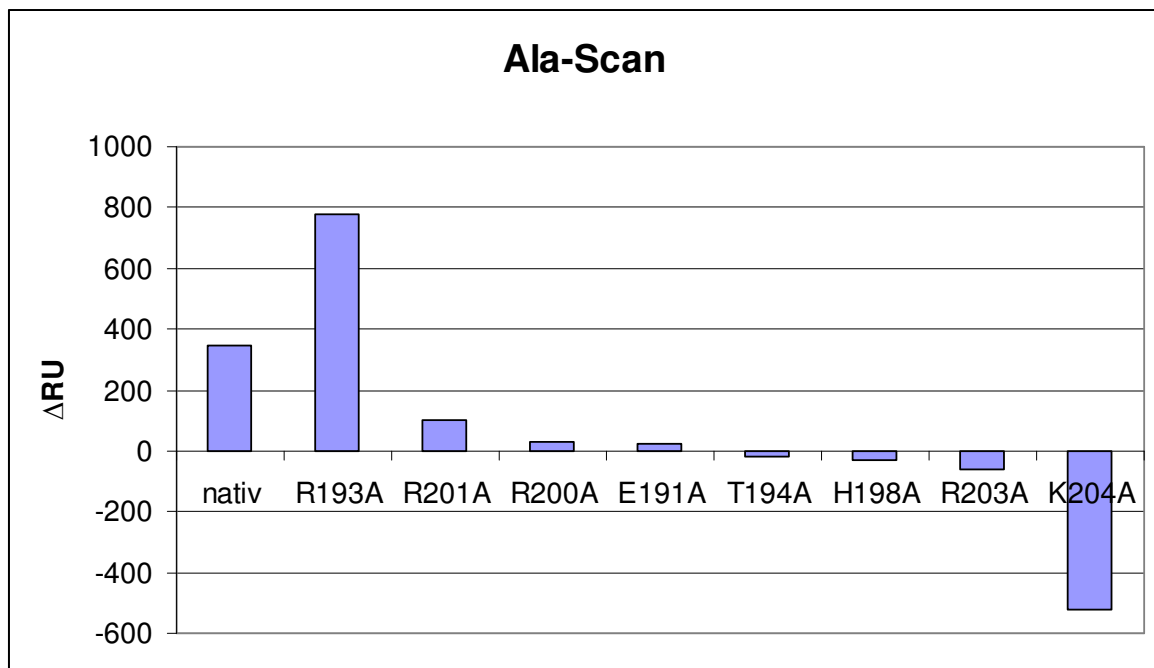


Abb. 54: Vergleich von $\Delta\text{RU}_{\text{max}}$ nach 180 s der Peptide des Alanin-Scans bei 0.25 mM.

Es zeigt sich, daß das Peptid mit der Sequenz PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] einen höheren ΔRU_{\max} Wert erreicht als das mit der nativen Sequenz PhoB(190-209) [*E. coli*]. Das Peptid PhoB(190-209) R203A [*E. coli*] zeigt sogar eine negative Bindung, es scheint an der Referenzzelle besser zu binden als an der Meßzelle. Von den übrigen Peptiden zeigt nur noch PhoB(190-209) R201A eine nennenswerte Bindung, die anderen zeigen keine spezifische Bindung mehr an die DNA (Abb. 54).

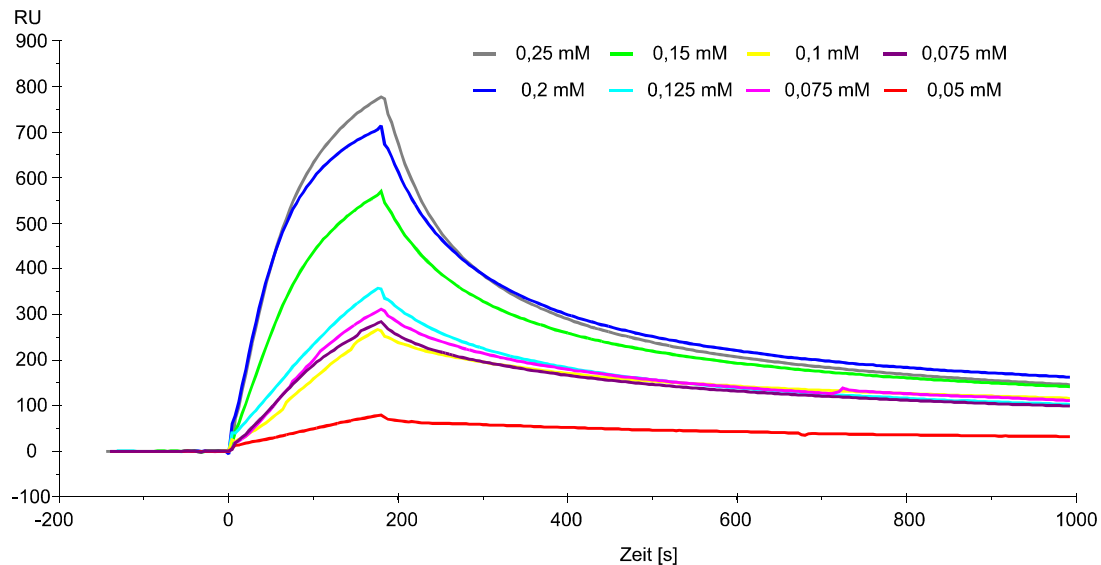


Abb. 55: Vergleich der Sensogramme des Peptides PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] im Konzentrationsbereich von 0,05 mM bis 0,25 mM

Ein Beispiel für eine Konzentrationsreihe ist in Abb. 55 für das Peptid PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] zwischen 0,05 mM bis 0,25 mM dargestellt. Der erreichte ΔRU_{\max} -Wert ist eindeutig von der Konzentration abhängig. Bei hohen Konzentrationen sind genug Moleküle vorhanden, um die DNA soweit abzusättigen, daß eine langsamere Zunahme der Response eintritt, bei geringeren nicht, so daß die Assoziationsphase dort noch im Bereich des nahezu linearen Anstiegs der Sättigungskurve ist.

4.1.3.1.5 Datenanalyse

In diesem Kapitel wird die Anwendung verschiedener Methoden zur Gewinnung kinetischer Daten aus den erhaltenen Sensogrammen beschrieben. Zunächst wurden die Meßbedingungen für die SPR so gewählt, daß sie mit denen der Kraftspektroskopie möglichst gut vergleichbar sind. Um die Meßergebnisse vergleichen zu können, wird dasselbe System für die CD-Spektroskopie und die Untersuchungen mittels

Oberflächenplasmonresonanz verwendet. Das komplementäre DNA-Fragment ist mit 360 bp sehr lang, besonders wenn man bedenkt, daß ein Peptidmolekül nur 11 bp bei der Bindung bedeckt. Es ist also eine Vielzahl unspezifischer Bindungen möglich, deren Anzahl die der spezifischen Bindungen übersteigen kann. Dieser Effekt soll über die Differenzbildung mit der Referenzzelle herausgerechnet werden, an die das pFPR Fragment der EBNA-DNA in gleicher Menge immobilisiert ist.

Für eine zuverlässige Analyse mit BIAevaluation[®], der vom Hersteller zum Gerät gelieferten Software, sollte der gemessene RU_{\max} -Wert auf den einzelnen Flußzellen 100 RU nicht überschreiten. Daher ist es praktisch unmöglich, für die spezifischen Wechselwirkungen getrennt kinetische oder thermodynamische Daten zu bestimmen.

All diese Einschränkungen führen dazu, daß die Ergebnisse der Bindungsanalyse der Sensogramme mit Unsicherheit behaftet sind.

Zur Datenanalyse wurde die globale Analyse und die Einzelanalyse mittels BIAevaluation[®] verwendet. Außerdem wurde eine Auswertung durch Scatchard Plots^[537] und einen Fit an eine Sättigungskurve mittels Datafit[®] versucht. Auch ein Vergleich der Meßergebnisse der Meßzelle mit denen der Referenzzelle und der aus ihnen mit den vorgenannten Methoden zur Datenanalyse erhaltenen kinetischen Daten wurde versucht. Alle Versuche, verlässliche kinetische Daten zu erhalten, sind jedoch gescheitert.

4.1.3.1.6 Maßnahmen zur Verbesserungen der Sensogramme

Es wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, um die Qualität der erhaltenen Sensogramme in diesem System zu verbessern.

Als erstes wurden Messungen in einem anderen Puffer durchgeführt, der zwar weiterhin 100mM KH_2PO_4 bei einem pH von 7.4 enthält, dessen NaCl-Gehalt jedoch von 50mM auf 200 mM erhöht wurde. Der höhere NaCl-Gehalt soll durch vermehrte Wechselwirkungen zwischen Na^+ und DNA die unspezifische Bindung der Peptide an die DNA verringern. Das grundsätzliche Problem bleibt hierbei jedoch bestehen, da auch weiterhin mit unspezifischer Wechselwirkung zu rechnen ist.

Weiterhin wurden die Gegenionen des Peptids ausgetauscht. Nach der Peptidsynthese liegt das Peptid als TFA-Salz vor, durch Lyophilisation aus verdünnter HCl-Lösung sollte erreicht werden, daß das Peptid nur noch Cl^- als Gegenionen enthält. Dies sollte bewirken, daß mögliche unerwünschte Bulk-Effekte, die durch sprunghafte Änderung des Brechungsindices der Lösung, bedingt durch z.B. Dichteänderungen der Lösung durch das

enthaltene Peptid oder durch vorher nicht vorhandene Ionen, hervorgerufen werden, minimiert werden.

Eine dritte Möglichkeit die Daten zu verbessern, ist eine geringere Beladung der Sensoroberfläche, also eine geringere Immobilisierung von DNA auf den jeweiligen Flußzellen. Dies verhindert sowohl Crowding-Effekte, bei denen zu viele immobilisierte Moleküle vorhanden sind, die sich gegenseitig bei der Bindung behindern, als auch Massentransfer-Effekte, da weniger Bindungspartner auf der Oberfläche vorhanden sind, und aus diesem Grund weniger Moleküle aus der Lösung für Bindungen „verbraucht“ werden. Andererseits vergrößert eine Verringerung der Beladung das Problem des Verhältnisses von unspezifischer zu spezifischer Bindung, das in **4.1.3.1.5** beschrieben wurde, da eine verringerte Beladung auch zu einem verringerten ΔRU_{\max} -Wert führt.

Als letzte Möglichkeit wurde noch eine Erhöhung der Flußgeschwindigkeit auf 50 $\mu\text{L} / \text{min}$ vorgenommen. Dies soll mögliche Massentransfereffekte, die im Test auf Massentransfereffekte (**4.1.3.1.3**) nicht aufgefallen sind, verhindern. Eine drastische Erhöhung der Flußrate wird jedoch durch die Injektionsdauer eingeschränkt, da das verwendete Gerät nur maximal insgesamt 300 μL injizieren kann. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß die Auswertung über den Scatchard Plot und die Analyse mittels Datafit[®] keine brauchbaren Ergebnisse liefert. Es konnte keine Messung bis zum Gleichgewicht durchgeführt werden, da nur ein gewisses Volumen maximal injiziert werden kann, und damit in keinem der untersuchten Flußraten / Injektionsdauer / Konzentrationsbereich – Systeme das Gleichgewicht erreicht wurde, die DNA erschien nie abgesättigt.

Für erneute Messungen wurden auf den Flußzellen jeweils ca. 120 RU immobilisiert, als Puffer wird ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH_2PO_4 und 200 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet.

Als erstes zeigt sich, daß der erreichte ΔRU_{\max} -Wert mit ca. 440 RU eine ähnliche Größenordnung erreicht wie bei den ersten Messungen im anderen Puffer mit der höheren Beladung der Flußzellen, dort waren es ca. 380 RU. Auch ein Vergleich der Sensogramme der einzelnen Flußzellen zeigt, daß ähnliche ΔRU_{\max} -Werte im Bereich von 4100 RU für die Meßzelle im Vergleich zu ca. 4500 RU bei der ersten Messung und 3700 RU im Vergleich zu ca. 4100 RU unter den alten Bedingungen. Die geringere Beladung führt wie erwartet zu insgesamt etwas niedrigeren Werten für die RU_{\max} -Werte. Die Assoziationsphase zeigt nun zu Beginn keinen steilen Anstieg mehr, so daß anscheinend vorhandene Bulk-Effekte tatsächlich durch den Austausch des Gegenions vermindert werden konnten. Die Kurve des Differenz-Sensogrammes zeigt zu Beginn negative

ΔRU_{\max} -Werte. Das Peptid scheint zuerst schneller an die Referenz-DNA zu binden, erst nach ungefähr 130 Sekunden ist die Bindung an die komplementäre DNA größer. Dies könnte mit einer Massentransferlimitierung erklärt werden. Die Lösung läuft nicht gleichzeitig über beide Zellen, sondern zuerst über die Referenzzelle, anschließend über die Meßzelle. Wenn nun die DNA auf der Referenzzelle einen großen Teil der in Lösung befindlichen Peptidmoleküle „wegfängt“, ist die Konzentration der Lösung beim Fluß durch die Meßzelle geringer, und die Assoziation erfolgt dementsprechend langsamer. Erst wenn die Referenz-DNA mit Bindungspartner abgesättigt ist, stände dann die volle Konzentration für die Bindung an die komplementäre DNA zur Verfügung. Bei den ersten Messungen konnte dieser Effekt vermutlich deswegen nicht beobachtet werden, weil die Assoziationsphase durch den Bulk-Effekt dominiert wurde.

4.1.3.2 Bindungsstudien mit den verschieden *N*- und *C*-terminal modifizierten Peptiden

Zur Untersuchung des Einflusses der *N*- und *C*-terminalen Modifikation mit einer Acetyl-Gruppe und dem Linker wurden vier Peptide synthetisiert, die beide, keine und nur jeweils eine Modifikation enthalten. Durch Bindungsstudien mittels der Oberflächenplasmonresonanz soll dann untersucht werden, welchen Einfluß die Modifikationen auf die Bindungseigenschaften der Peptide haben.

Die Bindungsstudien mit den Peptiden mit den unterschiedlichen *N*- und *C*-terminalen Modifikationen wurden bei einem Fluß von 20 μL / min über 5 Minuten durchgeführt, die Regeneration der Flußzellen erfolgte mit 0.5% SDS im Puffer für eine Minute wiederum bei einer Flußrate von 20 μL / min. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH_2PO_4 und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet. Zur Untersuchung wurde auf einem Biacore SA-Chip über die Streptavidin/Biotin-Bindung auf der Meßzelle das entsprechende DNA-Fragment (Sequenz **6.1.3.1**) immobilisiert, auf der Referenzzelle das pFPR-Fragment der EBNA-DNA (Sequenz **6.1.3.3**). Da eine quantitative Auswertung aufgrund der in **4.1.3.1.5** genannten Gründe nicht sinnvoll erscheint, erfolgt nur eine qualitative Betrachtung der erhaltenen Sensogramme.

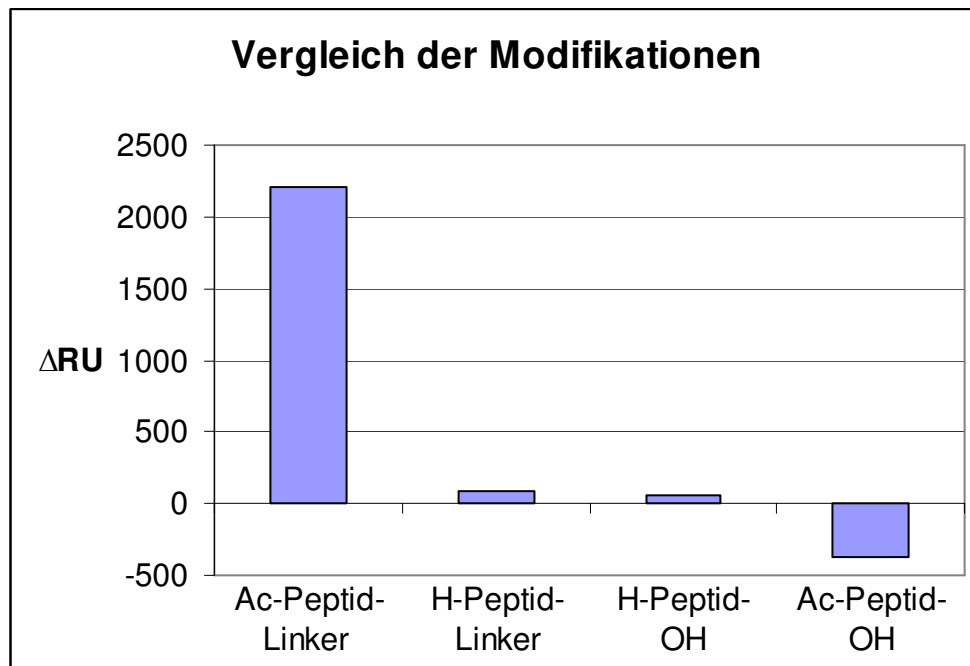


Abb. 56: Vergleich von ΔRU_{\max} -Wert nach 300 s Injektion der Peptide mit den unterschiedlichen *N*- und *C*-terminalen Modifikationen bei einer Konzentration von 1mM.

Ein Sensogramm, das auf spezifische Bindung hinweist, wird nur mit dem an beiden Termini modifizierten Peptiden erreicht (Abb. 56). Der Grund hierfür dürfte in der ladungskontrollierten Assoziation des Peptids an die DNA als ersten Schritt der Bindung zu suchen sein. Ein ungeschützter *C*-Terminus ist unter den gewählten Bedingungen negativ geladen, was zu einer Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen DNA führen müßte. Ein nicht acetylierter *N*-Terminus sollte unter den gewählten Bedingungen positiv geladen sein, was unspezifische Bindungen mit der negativ geladenen DNA ermöglichen sollte, und zu einer Verstärkung der Amphiphilie der Helix führen sollte, wie bei einer Betrachtung des entsprechenden Edmundson-Rades und der Netzdarstellung ersichtlich wird (Abb. 57).

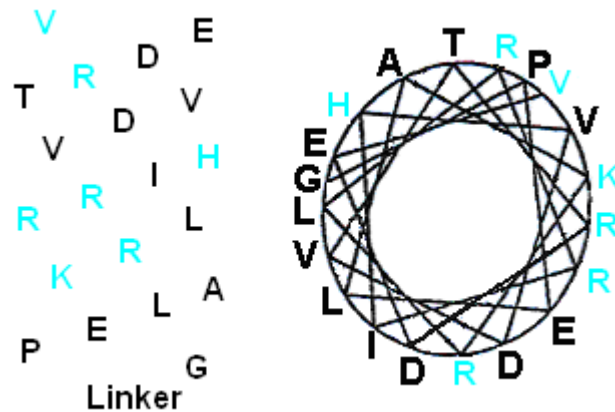


Abb. 57: Netzdarstellung und Edmundson-Rad von PhoB(190-209) aus *E. coli* mit positiv geladenem, nicht modifiziertem *N*-Terminus, die basischen Aminosäurereste sind blau markiert.

Trotzdem wirkt sich dies negativ auf die Bindungseigenschaften aus. Ein Grund könnte sein, daß im kompletten Protein keine positive Ladung auftritt, und die Acetylierung somit die Situation im Protein besser nachbildet. Es zeigt sich also, daß die Modifikationen Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit der Peptide haben, und nur Peptide mit beiden Modifikationen Sensogramme liefern, die sich als Bindungsereignisse deuten lassen. Die Modifikationen scheinen also die Situation im kompletten Protein am besten zu mimikrieren.

4.1.3.3 Bindungsstudien mit den aus dem Arginin-Scan stammenden Peptiden

Um zu versuchen, die Bindungsfähigkeit des Peptids mit der Primärsequenz des natürlich vorkommenden Proteins zu verbessern, wurden Peptide synthetisiert, in denen an geeignet scheinenden Stellen andere Aminosäurereste gegen Argininreste ausgetauscht sind. Diese Stellen werden so ausgewählt, daß die amphiphile Struktur der DNA-bindenden Helix α^3 verstärkt wird.

Die Bindungsstudien mit den im Arginin-Scan synthetisierten Peptiden wurden mit einem Fluß von 20 μL / min über 5 Minuten durchgeführt, die Regeneration der Flußzellen erfolgte mit 0.5% SDS im Puffer für eine Minute wiederum bei einer Flußrate von 20 μL / min. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH_2PO_4 und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet. Zur Untersuchung wurde auf einem Biacore SA-Chip über die Streptavidin/Biotin Bindung auf der Meßzelle das entsprechende DNA-Fragment (Sequenz **6.1.3.1**) immobilisiert, auf der Referenzzelle das pFPR-Fragment der EBNA-DNA (Sequenz **6.1.3.3**). Da eine quantitative Auswertung aufgrund der in **4.1.3.1.5**

genannten Gründe nicht sinnvoll erscheint, erfolgt nur eine qualitative Betrachtung der erhaltenen Sensogramme.

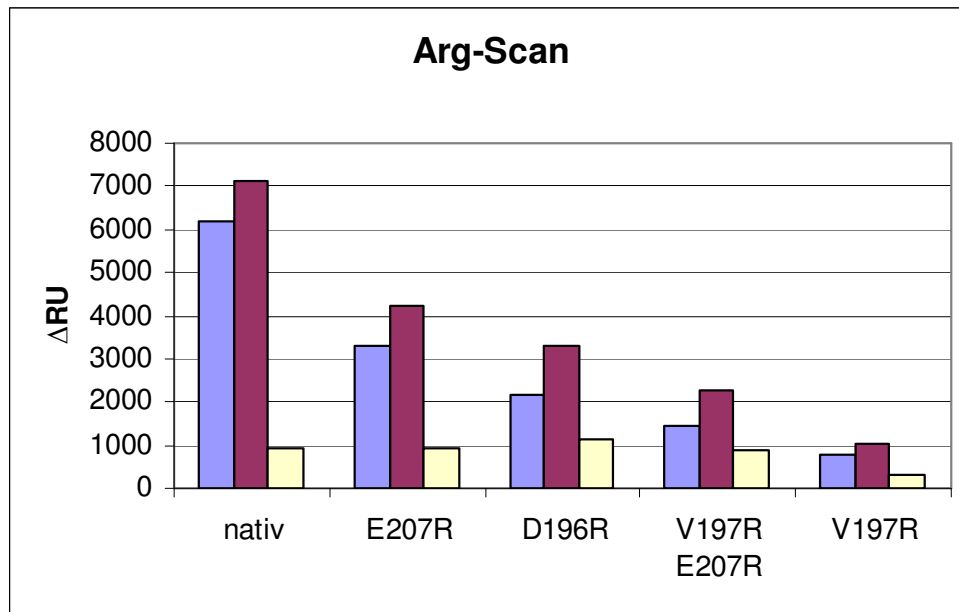


Abb. 58: Vergleich von ΔRU_{\max} -Wert nach 300 s Injektion der Peptide der im Arginin-Scan synthetisierten Peptide und Vergleich mit dem Peptid mit der nativen Sequenz, es wurde eine Konzentration von 0.3mM verwendet (Referenzzelle blau, Meßzelle rot, Differenz gelb).

Wie in Abb. 58 zu erkennen ist, führt der Austausch von Val¹⁹⁷ dazu, daß offensichtlich keine Bindung mehr stattfindet. Das Sensogramm fällt nach dem Anstieg bei der Injektion und dem sofortigen Abfall nach Beendigung des Einspritzens der Probelösung nahezu auf den Ausgangswert zurück. Dies verwundert nicht, da die zwei Methylgruppen dieses Aminosäurerests für zwei der drei Wechselwirkungen, die für die spezifische Bindung bedingenen, verantwortlich sind. Der zusätzliche Austausch vom Glu²⁰⁷ verbessert die Bindung anscheinend wieder, die Assoziation an die DNA scheint sehr schnell stattzufinden, der anschließende Abfall erfolgt nach einem kurzen, steilen Abfall von ähnlichem Ausmaß wie beim vorherigen Peptid sehr langsam, die Dissoziation scheint bei diesem Peptid am langsamsten von allen stattzufinden. Begründet werden kann dies damit, daß die Bindung zwar nicht mehr spezifisch ist, aber das Peptid besser unspezifisch binden bzw. nach der Dissoziation schneller wieder assoziieren kann, bevor es wieder „weggespült“ wird. Ein Grund dafür könnte eine stabilere amphiphile Helix sein, oder auch einfach die höhere Anzahl basischer Aminosäurereste, wodurch das Peptid zu mehr unspezifischen Wechselwirkungen fähig ist. Die Tatsache, daß auch die Assoziation zu Beginn schneller ist als beim Peptid ohne zusätzliche basische Reste deutet darauf hin, daß

der Grund für die langsamere Dissoziation vermutlich eher in der schnellen Reassoziierung liegt. Überprüfen ließe sich dies mit Messungen mit höheren Flußraten. Da jedoch die durchgeführten Messungen nicht zu einer wirklichen Verbesserung der Bindung geführt haben, wird darauf verzichtet. Der Austausch von Asp¹⁹⁶ führt zu einer ähnlich schnellen Assoziierung wie bei dem vorherigen Peptid, allerdings erfolgt die Dissoziation so schnell wie beim Peptid ohne zusätzliche basische Reste. Wird nur das Glu²⁰⁷ gegen Arginin ausgetauscht, erfolgt die Assoziierung ähnlich schnell wie die Assoziierung des Peptids mit der nativen Sequenz, die anschließende Dissoziation ist allerdings sehr viel schneller.

Vergleicht man nur die Sensogramme der Bindung an die Meßzelle, ist deutlich zu erkennen, daß die Bindung des Peptids mit der nativen Sequenz das stärkste RU-Signal erzeugt. Jedoch ist die Assoziierung hier mit Abstand am langsamsten, und die Dissoziation schneller als bei den anderen Peptiden, mit Ausnahme des Peptides bei dem das Glu²⁰⁷ ausgetauscht wurde. Der Grund für die beobachtete schnellere Dissoziation könnte die langsamere Reassoziierung sein. Der Grund dafür, daß das Peptid trotzdem den größten RU-Wert erreicht, wenn auch viel langsamer als die übrigen, könnte daran liegen, daß durch die spezifische Bindung am Peptid, bei der vier Peptide direkt nebeneinander binden können, mehr Peptide am DNA-Fragment binden können. Im Gegensatz dazu könnten die unspezifischer, schneller assoziierenden Peptide ungeordnet, aber fester binden, so daß im Endeffekt weniger Peptide Platz am DNA-Fragment finden. Wäre dies der Fall, müßten die Peptide an der Referenzzelle ähnliche RU-Werte erreichen, da das DNA-Fragment, das auf dieser Zelle immobilisiert ist, das DNA-Bindemotiv natürlich nicht enthält.

Betrachtet man nun die Sensogramme auf der Referenzzelle, erkennt man zuerst, daß die Sensogramme von der Form her nahezu identisch sind, die erreichten RU-Werte jedoch variieren. Die Annahme, daß der höhere RU-Wert beim Peptid mit der nativen Sequenz durch die spezifische Bindung an die DNA hervorgerufen wird, bestätigt sich allerdings nicht. Der Grund könnte jedoch immer noch größere Ordnung der Peptide auf dem DNA-Fragment sein, also eng zusammenliegende Peptide ohne viel Zwischenraum. Wenn diese Ordnung dadurch erzeugt wird, daß dies Peptid eben nicht so stark unspezifisch bindet, deswegen schneller wieder dissoziieren kann, und wiederholt an anderer Stelle bindet, an einer Stelle die noch nicht von einem anderen Peptid besetzt ist. Dies würde während der gesamten Injektionszeit zu immer höherer Ordnung der Peptide führen, solange die Peptide schnell genug dissoziieren können, und würde die längere Assoziationsphase erklären, die mit Ende der Injektion noch nicht abgeschlossen zu sein scheint.

4.1.4 CD-Spektroskopie

4.1.4.1 Untersuchung der aus PhoB und dem Alanin-Scan stammenden Peptide in verschiedenen Lösungsmitteln

Die CD-Spektroskopie erlaubt die Abschätzung der Anteile der unterschiedlichen Sekundärstrukturen von Peptiden in Lösung. Standardmäßig wird eine Einwaage von 0.2-0.5 g Peptid / mL Puffer verwendet, was bei einer Masse der vorhandenen Peptide von um 2.5 kDA einer Konzentration von 0.08 - 0.2 mM entspräche. Für die Messungen wurde eine Peptidkonzentration von 0.1 mM verwendet. Als Puffer wurde der Phosphatpuffer verwendet, der für die Bindungsstudien der PhoB-Mutanten mittels Oberflächenplasmonresonanz verwendet wurde, 100 mM Na₂HPO₄ und 50 mM NaCl bei einem pH von 7.4.

4.1.4.1.1 Vergleich der Messungen in TFE und im Puffer

Zuerst wurde der Einfluß des Lösungsmittels auf die Sekundärstruktur durch Messungen im verwendeten Puffer und im Helix-stabilisierenden TFE für das Peptid mit der nativen Sequenz, PhoB(190-209) untersucht (Abb. 59).

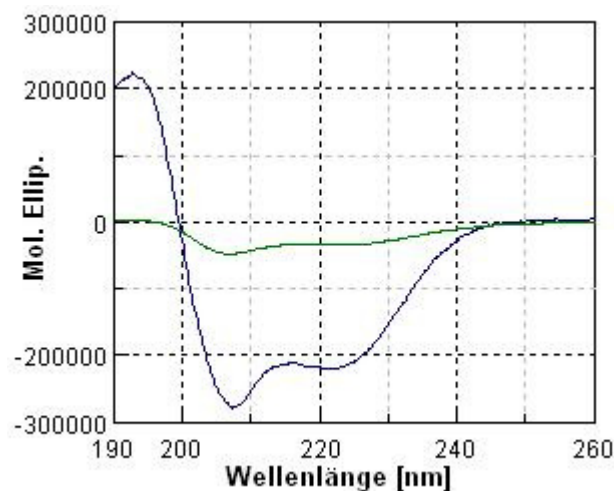


Abb. 59: Vergleiche der CD-Spektren von PhoB(190-209) in TFE (blau) und im Puffer (grün).

Es zeigt sich eine deutliche Veränderung, das Spektrum hat mit den beiden Minima bei 208 nm und 222 nm sowie dem in der Intensität nahezu identischen Maximum bei 192 nm die typischen Anzeichen für eine α -Helix. Auch die Sekundärstrukturvorhersage mit dem von

JASCO gelieferten Tool ergab einen Anteil von 100% α -Helix. Es zeigte sich also, daß das Peptid unter geeigneten Bedingungen eine komplett α -helicale Struktur einnehmen kann.

4.1.4.1.2 Ermittlung der Sekundärstrukturen

Anschließend erfolgten Messungen von vier ausgewählten Peptiden bei 0.1 mM im Puffer in der 1 mm Küvette. Es wurden Messungen mit den Peptiden mit der nativen Sequenz PhoB(190-209) sowie den punktmutierten Peptiden PhoB(190-209) R193A, PhoB(190-209) H198A und PhoB(190-209) R203A durchgeführt. Das Peptid PhoB(190-209) R193A zeigte in den Sensogrammen der Oberflächenplasmonresonanz eine größere Affinität zu der DNA als das mit der nativen Sequenz, PhoB(190-209) H198A zeigte nahezu keine Affinität, und PhoB(190-209) R203A ergab ein negative Bindung im Sensogramm, was bedeutet, daß die Bindung an die Referenzzelle besser ist als an die Meßzelle.

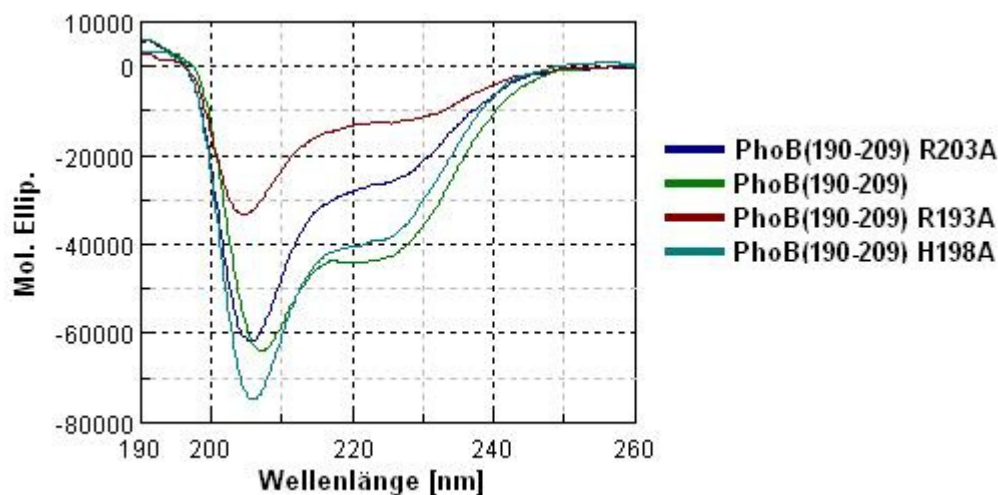


Abb. 60: Vergleich der CD-Spektren des Peptids im Puffer mit der native Sequenz PhoB(190-209) sowie den punktmutierten Peptide PhoB(190-209) R193A, PhoB(190-209) H198A und PhoB(190-209) R203A.

Alle vier Spektren zeigen eine Form, die ansatzweise auf helicale Strukturen hinweisen (Abb. 60). Sie zeigen ein Minimum bei 208 nm, ein weiteres, bzw. eine Schulter bei ungefähr 222 nm und ein Maximum bei 192 nm. Die Betrag der Intensität des Maximums bei 192 nm sollte allerdings ähnlich groß sein wie der für das Minimum bei 208, dies ist bei keinem der Peptide der Fall, die Intensität bei 192 nm ist immer viel geringer. Dies könnte auf 3_{10} -Helices anstelle von α -Helices hindeuten.^[382,383,387,388] Hierfür spricht auch die Tatsache, das die Intensitäten bei 222 nm und 208 nm nicht ähnlich sind, sondern die bei 222nm immer viel geringer ist. Das Verhältnis für eine α -Helix sollte ungefähr bei 1

liegen, für eine 3_{10} -Helix bei unter 0.4.^[383,387-390] Letzteres ist bei keinem der Peptide der Fall, wenn die Peptide PhoB(190-209) R193A und PhoB(190-209) R203A auch nahe daran sind. Der Grund für die geringere Intensität des Maximums bei 192 nm dürfte jedoch eher der verwendete Puffer sein. NaCl absorbiert bei unter 195 nm so stark, daß Messungen verfälscht werden können.

Das Spektrum für PhoB(190-209) entspricht noch am ehesten dem, was für eine α -Helix erwartet wird. Allerdings sind auch hier die Intensitäten des Maximums bei 192 nm sehr gering und des Minimums bei 222 nm auch geringer als eigentlich erwartet. Für kürzere Peptide mit α -helicaler Struktur ist dies jedoch bekannt.^[538]

Mit den Spektren dieser Messungen wurden Sekundärstrukturanalysen durchgeführt. Die Sekundärstrukturanalysen wurden mit Hilfe des Programmes Dichroprot und der von JASCO zum CD-Spektrometer mitgelieferten Software sowie mittels des auf einem neuronalen Netz basierenden Programmes CDNN durchgeführt. Dichroprot liefert die Ergebnisse entsprechend der Methoden von Fasman,^[414] Chen,^[422] Bolotina,^[454] Chang^[408] und Yang^[403] (in Tab. **10** und **23-25** als Yang I bezeichnet) sowie den α -helicalen Anteil über die molare Elliptizität bei 220 nm.^[422] Die Software von JASCO liefert Ergebnisse entsprechend Yang (in Tab.: **10** und **23-25** als Yang II bezeichnet),^[403] dieser Wert sollte eigentlich identisch mit Yang I sein, da er auf derselben Methode basiert, jedoch ergeben sich deutliche Unterschiede.

Die Betrachtung der Ergebnisse der Sekundärstrukturanalysen mittels Dichroprot und der Software von JASCO zeigt zunächst einmal, daß die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente je nach Auswertemethode stark variieren (Tab. **10** für das Peptid PhoB(190-209) H198A, für die übrigen Peptide im Anhang, Tab. **23-25**). Für das Peptid PhoB(190-209) H198A ergibt sich beispielsweise ein Anteil der α -Helix von 7.7 % aus Yang I bis zu 121.4% bei der Abschätzung über die molare Elliptizität. Es wird sogar dreimal ein negativer prozentualer Anteil für das β -Faltblatt vorgeschlagen, zweimal bei Bolotina, einmal bei Chen. Dies zeigt die eingeschränkte Anwendungsmöglichkeit des "Least Square Fit" zur Sekundärstrukturanalyse. Weiterhin ist es nötig, das mittels Fit errechnete Spektrum mit dem gemessenen zu vergleichen, um die Übereinstimmung zu überprüfen. Nur die Auswertung nach Bolotina und die nach Yang II liefern ähnliche berechnete Spektren wie die gemessenen, jedoch sind die Abweichungen immer noch sehr groß. Außerdem läßt die die Ausgabe negativer Anteile für das β -Faltblatt generell Zweifel an der Anwendung dieser Methode für die Auswertung der Peptide aufkommen.

Tab. 10: Ergebnis der verschiedenen Analysemethoden für den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturen für PhoB(190-209) H198A.

| | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | Coil |
|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|------|
| Fasman | 18,3 | 33,3 | 0,0 | 48,5 |
| Chen | 15,0 | 13,4 | 0,0 | 71,7 |
| Bolotina | 35,6 | 3,0 | 40,8 | 20,5 |
| Chang | 20,5 | 9,2 | 28,8 | 41,6 |
| Yang I | 7,7 | 44,3 | 0,0 | 48,0 |
| Yang II | 42,8 | 0 | 0 | 57,2 |
| über die Mol. El. | 121,4 | | | |

In der Tendenz liefern die Auswertemethoden alle einen relativ hohen Anteil an Turn-Strukturen und α -Helices für die Peptide. Vergleicht man die Sekundärstruktur der vier Peptide untereinander, läßt sich kein Trend feststellen, wenn alle Methoden betrachtet werden. Außerdem sind die Fits nicht gut genug, um zuverlässige quantitative Aussagen treffen zu können. Es läßt sich eigentlich nur sicher sagen, daß die Peptide einen großen Anteil an α -Helices und Turn-Strukturen haben, wobei mehrere davon ja im Prinzip auch zu helicalen Strukturen führen. Ein quantitativer Vergleich dieser Daten ist jedoch als nicht sinnvoll zu betrachten

Als weitere Methode zur Sekundärstrukturanalyse wurde das Programm CDNN verwendet, das über ein neuronales Netz arbeitet. Die Sekundärstrukturanalyse mit CDNN liefert Ergebnisse für verschiedene Bereiche des Spektrums, in 5 nm-Schritten von 190 nm bis 210 nm beginnend bis 260 nm. Dies erlaubt eine differenzierte Betrachtung der Ergebnisse. Die Analysen im Bereich von 190-260 nm und 195-260 nm sind aufgrund der hohen Absorption des NaCl im Puffer in diesem Bereich von geringer Aussagekraft. Die Analyse im Bereich von 210-260 nm verzichtet sowohl auf die Information aus dem Maximum bei 192 nm als auch auf die aus dem Minimum bei 208 nm. Dies dürfte die Genauigkeit der Vorhersagen besonders für α -Helices verringern. Aus diesem Grund wird die Betrachtung der Ergebnisse bei 200-260 nm und 205-260 nm als die Zuverlässigste angenommen (Tab. 11 für das Peptid PhoB(190-209) H198A, für die übrigen Peptide im Anhang, Tab. 26-28).

Tab. 11: Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse mittels CDNN für PhoB(190-209) H198A

| | 190-260 nm | 195-260 nm | 200-260 nm | 205-260 nm | 210-260 nm |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| α -Helix | 37,20% | 43,10% | 57,20% | 63,10% | 56,20% |
| β -Faltblatt antiparallel | 12,30% | 7,40% | 4,30% | 3,60% | 4,10% |
| β -Faltblatt parallel | 6,00% | 5,50% | 3,90% | 3,60% | 4,90% |
| β -Turn | 17,80% | 15,80% | 13,80% | 12,80% | 13,40% |
| Coil | 18,70% | 18,30% | 15,80% | 16,80% | 20,80% |
| Summe | 91,90% | 90,10% | 95,00% | 99,90% | 99,30% |

Ein Kriterium für die Qualität der Sekundärstrukturvorhersage ist die Summe der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturtypen, diese sollte möglichst nahe bei 100% sein.

Tab. 12: Vergleich der Vorhersagen für Sekundärstrukturanteile der relevanten Meßbereiche der vier Peptide.

| | | α -Helix | β -Faltblatt antiparallel | β -Faltblatt parallel | β -Turn | Coil | Summe |
|------------|------------|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------|--------|---------|
| PhoB | 200-260 nm | 36,40% | 8,00% | 7,40% | 16,70% | 27,10% | 95,60% |
| | 205-260 nm | 40,60% | 6,50% | 7,20% | 15,70% | 28,30% | 98,30% |
| PhoB R193A | 200-260 nm | 22,40% | 13,60% | 11,60% | 19,80% | 36,90% | 104,30% |
| | 205-260 nm | 24,20% | 10,50% | 12,30% | 18,50% | 40,50% | 106,00% |
| PhoB H198A | 200-260 nm | 57,20% | 4,30% | 3,90% | 13,80% | 15,80% | 95,00% |
| | 205-260 nm | 63,10% | 3,60% | 3,60% | 12,80% | 16,80% | 99,90% |
| PhoB R203A | 200-260 nm | 41,30% | 7,40% | 5,90% | 16,50% | 21,00% | 92,20% |
| | 205-260 nm | 46,90% | 5,60% | 5,90% | 15,00% | 24,30% | 97,70% |

Der Vergleich der Sekundärstrukturanalysen der Peptide aus CDNN bestätigt den Trend, der sich auch im Vergleich der Sekundärstrukturanalysen mittels Dichroprot bereits abzeichnete (Tab. 12). Der Anteil an α -Helices der Peptide PhoB und PhoB R203A ist ähnlich groß, bei der Auswertung mittels CDNN liegt der Wert um 40%, mit etwas höheren Werten für PhoB R203A. Bei PhoB H198A liegt dieser Anteil um die Hälfte höher, bei ungefähr 60%, und für PhoB R193A liegt der Anteil um die Hälfte geringer bei knapp über 20%. Allerdings weist die Summe aller Sekundärstrukturen ca. 5% Abweichungen von 100% auf, was an der Zuverlässigkeit auch dieser Vorhersagen zweifeln läßt. Einzige Ausnahme mit einem Wert von 99.90% ist PhoB H198A im Bereich von 205-260 nm. Diese kann als recht zuverlässig betrachtet werden, und liefert 63% Anteil an α -Helices, ca. 7% für β -Faltblattstrukturen, ca. 13% für β -Turns und 17% für Random Coils, also einen großen Anteil an α -Helices und Turn-Strukturen, wie zu vermuten war.

4.1.4.2 Untersuchung der Veränderung der CD-Spektren der aus PhoB und dem Alanin-Scan stammenden Peptide bei Zugabe von DNA

Um mögliche Änderungen der Sekundärstruktur des Peptids bei Zugabe der DNA, und auch Änderungen der Sekundärstruktur der DNA zu betrachten sollte eine DNA-Titration mit den vier Peptiden durchgeführt werden. Als DNA wird das 360 bp große, 238 kD schwere Fragment verwendet, das schon für die Oberflächenplasmonresonanz-Messungen

eingesetzt wurde. Dies Fragment enthält innerhalb der Bindesequenz vier spezifische Bindestellen (Sequenz siehe 6.1.4.1).

Es werden bei unterschiedlichen Verhältnissen von Peptid und DNA CD-Spektren aufgenommen, um Änderungen zu untersuchen. Hierbei ist jedoch der große Unterschied der Massen ein Problem. Um Änderungen im Spektrum des Peptides überhaupt zu sehen, müßten für Messungen im Verhältnis 1 Peptid pro spezifischer Bindungsstelle auf der DNA bei einer Peptidkonzentration von 0.1 mM ca. 5.85 g DNA / mL Lösung eingewogen werden. Dies ist natürlich völlig utopisch. Es wurden Messungen im Verhältnis 117 Peptide (Abb. 61) pro Bindestelle bis zu 23 Peptide / Bindestelle durchgeführt. Die quantitative Auswertung dieser Messungen ist allerdings nicht möglich. Für eine Betrachtung der Änderungen in der Form des Spektrums der DNA ist die Konzentration an DNA zu gering, außerdem stört die viel höhere Konzentration an Peptidmolekülen in der Lösung, da diese schließlich überlagernde eigene Spektren liefern. Die Auswirkungen auf die Peptidspektren sind auch nicht aussagekräftig, da neben den gebundenen Peptiden noch eine sehr große Anzahl nicht an die DNA gebundene Peptidmoleküle in der Lösung vorliegen. Außerdem ist nicht bekannt, wie hoch der Anteil der zusätzlichen unspezifischen Bindung ist.

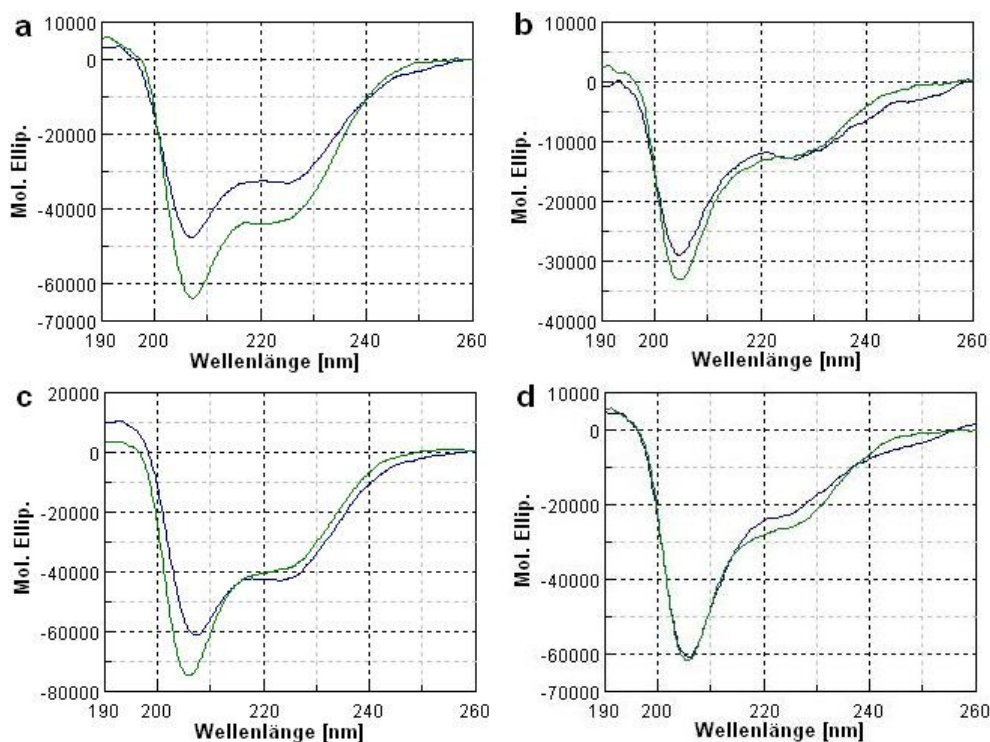


Abb. 61: Vergleich der CD-Spektren der vier Peptide (PhoB(190-209) **a**, PhoB(190-209) R193A **b**, PhoB(190-209) H198A **c**, PhoB(190-209) R203A **d**) vor (grün) und nach (blau) der Zugabe von DNA, Konzentration der Peptide 0.1 mM, Konzentration der DNA 0.21 μ M.

Die Betrachtung der Spektren für PhoB(190-209) R193A und PhoB(190-209) R203A zeigt kaum große Änderungen. Für das Peptid mit der nativen Sequenz lässt sich eine Erhöhung des helicalen Anteils erahnen, zumindest nähert sich die Intensität der Minima unter 210 und ca. 222 nm an. Gleichzeitig sinkt jedoch die Gesamtintensität der Effekte. Beim Peptid PhoB(190-209) H198A nähern sich diese Minima auch einander an, allerdings bleibt die Gesamtintensität der Effekte nahezu identisch. Um die hier erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren sind Messungen mit kürzerer DNA nötig, da das hier gewählte Setup zu viele Faktoren offen lässt.

4.1.5 Kraftspektroskopie

4.1.5.1 Einleitung

Parallel zu den durchgeführten Bindungsstudien im Molekülensemble wurden von Rainer Eckel in der Fakultät für Physik auch Bindungsstudien auf Einzelmolekülebene durchgeführt. Hierfür wurden vier Peptide ausgewählt: die native Sequenz PhoB(190-209) sowie die punktmutierten Peptide PhoB(190-209) R193A, PhoB(190-209) H198A und PhoB(190-209) R203A. Das Peptid PhoB(190-209) R193A zeigte in den Sensogrammen der Oberflächenplasmonresonanz eine größere Affinität zu der DNA als das mit der nativen Sequenz, PhoB(190-209) H198A zeigte nahezu keine Affinität, und PhoB(190-209) R203A ergab ein negative Bindung im Sensogramm, was bedeutet, daß die Bindung an die Referenzzelle besser ist als an die Meßzelle.

Für die Messung wurde das bereits für die Biacore-Studien verwendete Fragment mit der Bindesequenz für die DNA (Sequenz unter **6.1.3.1**) über einen bifunktionalen PEG-Linker an die AFM-Spitze gebunden, in diesem Fall war der Primer für das 5' Ende für die PCR der DNA Thiol-funktionalisiert. Das Peptid wurde über den kurzen C-terminalen Linker auf funktionalisiertem Glimmer aufgebracht (Abb. **62**). Als Standardpuffer wurde der Puffer verwendet, der auch in den ersten Bindungsstudien im Molekülensemble verwendet wurde, 100 mM Na_2HPO_4 und 50 mM NaCl bei einem pH von 7.4.

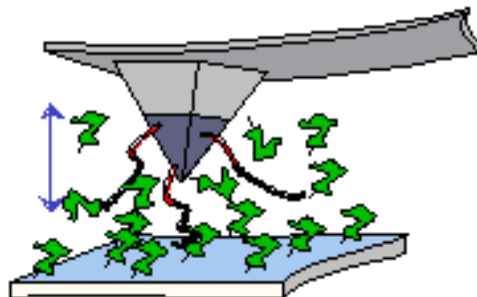


Abb. 62: Darstellung des Setups für die kraftspektroskopischen Untersuchungen. Das Peptid ist in grün dargestellt, die DNA in rot, die Größenverhältnisse stimmen nicht überein.

Der lange PEG-Linker, mit dem die DNA immobilisiert wurde, ermöglicht die Unterscheidung von echten Entbindungs-Ereignissen von unspezifischer Adhäsion der Spitze an der Oberfläche, da die Dehnung des elastischen PEG-Linkers in der Kraft-Distanz-Kurve als gradueller Anstieg der Kraft bis zum Abriß zu erkennen ist (Abb. **63**).

Die Auswertung der Abrisskräfte zu Histogrammen und die statistische Analyse der resultierenden Verteilung liefern für die Peptide die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte bei gegebener Ziehgeschwindigkeit.

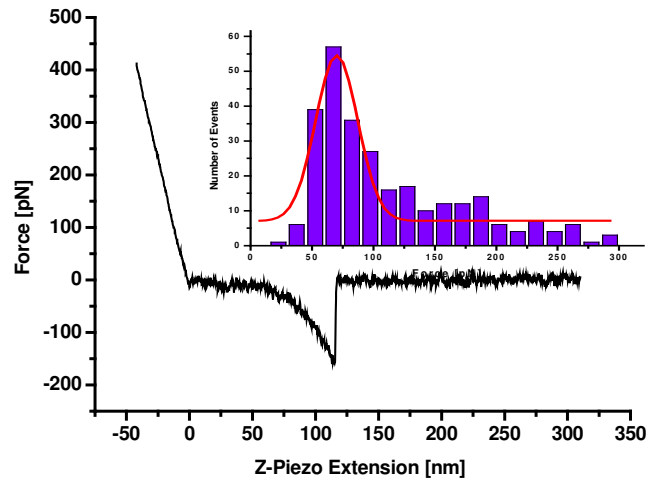


Abb. 63: Charakteristische Kraft-Distanz-Kurve und typisches Kräfte-Histogramm.

4.1.5.2 Kraftspektroskopie

Die Zusammenstellung der Abrißkräfte zu Histogrammen und die statistische Analyse der Verteilung lieferten für das PhoB-Peptid eine wahrscheinlichste Abrißkraft (\equiv Entbindungskraft) von 70 pN bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1000 nm/s (Abb. 64).

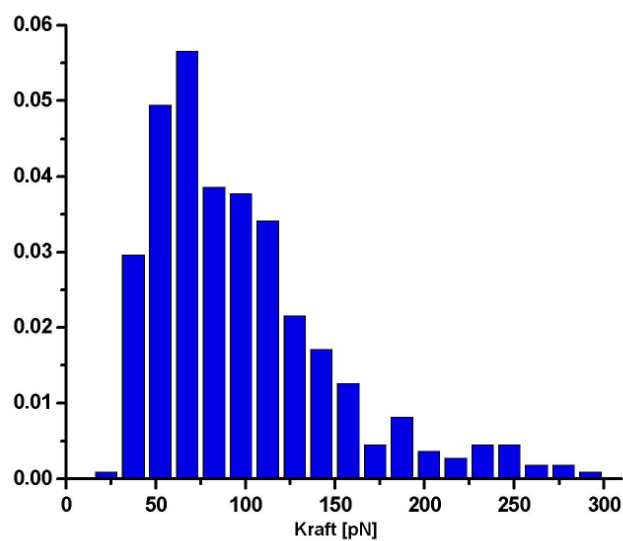


Abb. 64: Kraft-Histogramm der Bindung des Peptides mit der Primärstruktur des nativen PhoB.

Die Spezifität der Bindung des PhoB-Modellpeptids wurde mittels Konkurrenzexperimenten getestet. Hierfür wurden Kraftspektroskopie-Messungen im Standardpuffer mit Messungen mit einem Überschuß an freiem Bindungspartner (Peptid oder DNA) im Puffer abgewechselt. Drei solche Messreihen sind in Abb. 65 dargestellt: (a) zeigt ein Experiment im Standardpuffer. In (b) wurde dem Puffer freies Peptid im Überschuß hinzugesetzt, was zu einer deutlichen Verringerung der Bindewahrscheinlichkeit führte. In (c) wurde die Probe mit Standardpuffer gewaschen und in Standardpuffer gemessen. Es zeigt sich, daß die Gesamtbindewahrscheinlichkeit wieder auf nahezu ihren Wert aus (a) gestiegen ist. Die anschließende Konkurrenz mit freier DNA ist in (d) dargestellt, sie führte wieder zu einem signifikanten Rückgang der Bindeereignisse. Abschließendes Waschen der Probe mit Standardpuffer reaktivierte das System erneut, wie in (e) zu sehen ist.

Diese Experimente lassen darauf schließen, daß die Bindung der hier untersuchten PhoB-Peptide tatsächlich spezifisch an einer Bindesequenz erfolgt, da die Verdrängung sowohl mit freiem Peptid wie auch mit freier DNA zu einem Rückgang der Bindewahrscheinlichkeit geführt hat, was bei unspezifischer Bindung des Peptids nicht der Fall sein dürfte. Im Falle des Peptids mit der nativen Frequenz, und auch PhoB(190-209) R193A war die Konkurrenz eindeutig erfolgreich, was auf eine spezifische Bindung der Mutante an die DNA hinweist. Auch für PhoB(190-209) H198A war bei Überschuss eines freien Bindungspartners ein leichter Rückgang der Gesamtbindewahrscheinlichkeit feststellbar, allerdings war hier die Gesamtbindewahrscheinlichkeit schon beim Experiment im Standardpuffer bedeutend kleiner als für das native Peptid und PhoB(190-209) R193A. Die Mutante PhoB(190-209) R203A schließlich lieferte so wenige Bindeereignisse, daß eine statistische Analyse überhaupt nicht möglich war. Diese kraftspektroskopischen Experimente deuten also zumindest im Falle des nativen Peptids sowie der Mutante PhoB(190-209) R193A auf eine spezifische Bindung zur PhoB-Zielsequenz hin, auch wenn nur ein je zwanzig Aminosäuren langer Ausschnitt aus der Erkennungssequenz des Proteins synthetisiert wurde.

Ein Vergleich der wahrscheinlichsten Abrißkraft (\equiv Entbindungskraft) von 70 pN bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1000 nm/s (Abb. 65) für PhoB(190-209) mit den anderen Peptiden liefert für PhoB(190-209) R193A einen ähnlichen Wert, der von PhoB(190-209) H198A ist mit 40 pN nur ungefähr halb so groß, und für PhoB(190-209) R203A ließ sich aufgrund zu weniger Bindungsereignisse keine Statistik anfertigen.

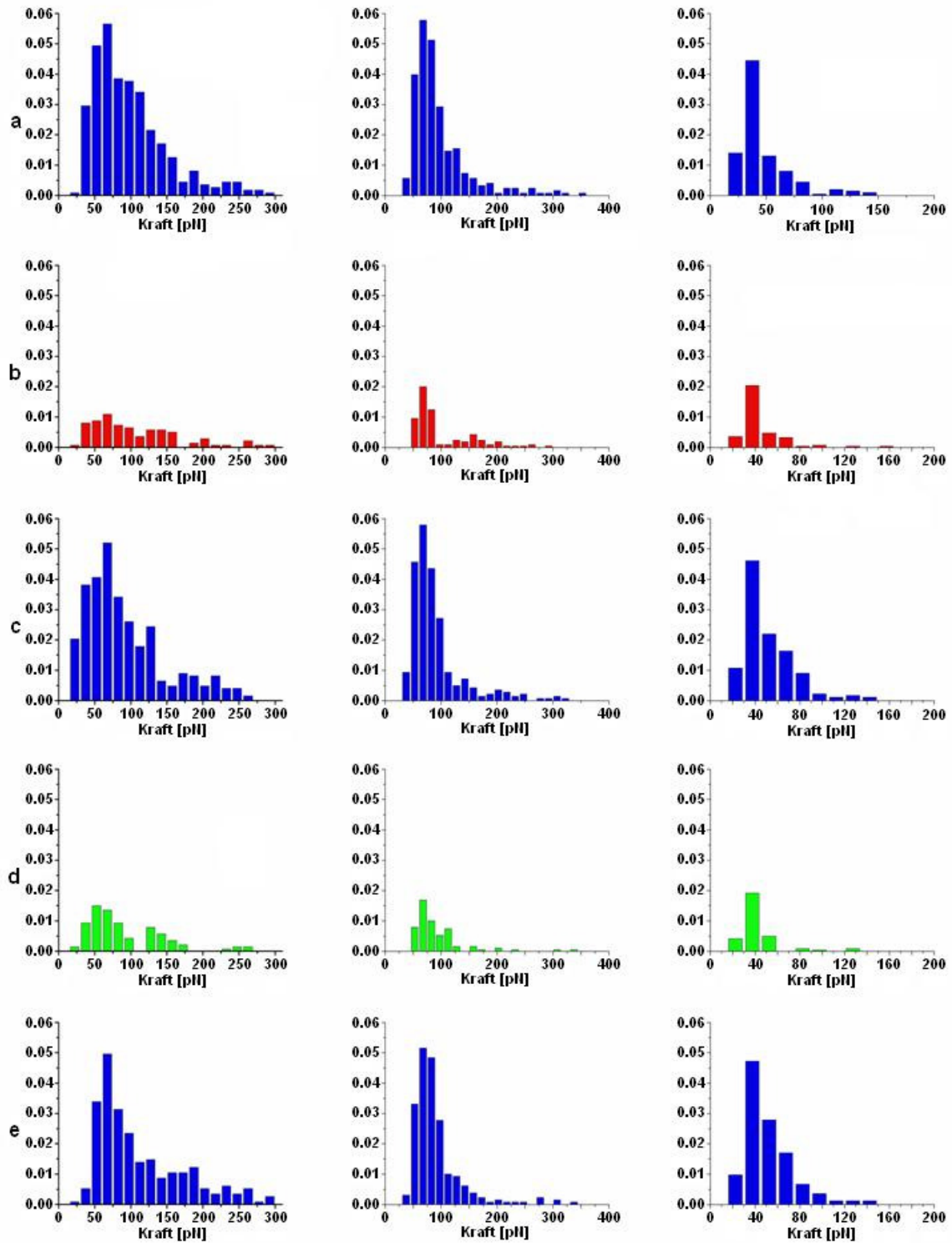


Abb. 65: Krafthistogramme der Konkurrenzexperimente. Standardpuffer: 100 mM KH_2PO_4 , 50 mM NaCl, pH 7,4. (a) Standardpuffer; (b) Konkurrenz mit 2-fachem Überschuß an freiem Peptid; (c) Standardpuffer; (d) Konkurrenz mit 12-fachem Überschuß an freier DNA; (e) Standardpuffer. Auf der Y-Achse ist die Bindungswahrscheinlichkeit dargestellt. Links PhoB(190-209), Mitte PhoB(190-209) R193A, rechts PhoB(190-209) H198A.^[539]

Es konnte also gezeigt werden, daß auch das Modell-Peptid, das nur aus dem zwanzig Aminosäuren kleinen Ausschnitt der PhoB-Sequenz besteht, bereits für spezifische Bindung an der DNA ausreicht.

4.1.5.3 Dynamische Kraftspektroskopie

Zur näheren Untersuchung der Dissoziations-Kinetik des Komplexes der nativen Peptidsequenz sowie der Mutanten PhoB(190-209) R193A und PhoB(190-209) H198A mit der DNA wurden dynamische Kraftspektroskopie-Experimente durchgeführt, es wurden also Messungen mit variierten Ziehgeschwindigkeiten gemacht. Die gemessenen Dissoziationskräfte der thermisch getriebenen Dissoziation eines metastabilen Komplexes unter Applikation einer äußeren Kraft hängen von der zeitlichen Kraftentwicklung auf den Komplex ab. ^[507,540,541] Diese wird als Beladungsrate (*loading rate*) bezeichnet und stellt das Produkt aus der molekularen Elastizität und der Ziehgeschwindigkeit dar. Die Ermittlung der molekularen Elastizität des Systems erfolgte durch einen Fit über 20 Datenpunkte am Ende der Abrisskurve, unmittelbar vor dem Abriß, wobei die Ziehgeschwindigkeit im Bereich von 10 – 6000 nm/s variiert wurde. Hierzu wurden jeweils ca. 200-300 Entbindungsereignisse gemessen, das Ergebnis dieser Experimente zeigt Abb. 66, in der die aus der Analyse der entsprechenden Histogramme resultierenden Entbindungskräfte halblogarithmisch gegen die *loading rate* aufgetragen sind.

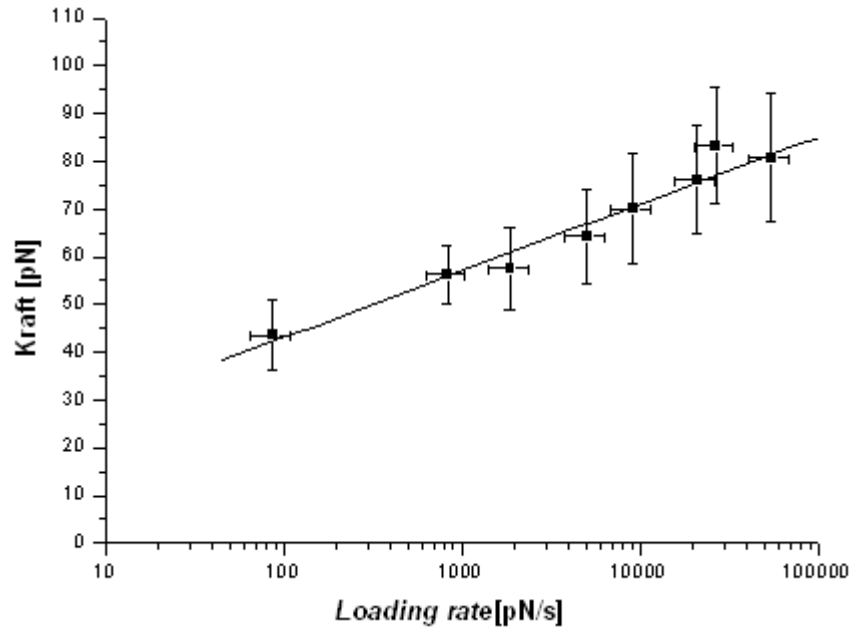


Abb. 66: Ergebnisse der dynamischen Kraftspektroskopie für die Bindung des PhoB-Peptids an DNA. Die wahrscheinlichsten Entbindungskräfte sind semilogarithmisch gegen die *loading rate* aufgetragen. Über die Steigung der Geraden durch die Messpunkte erhält man eine thermische *off*-Rate $k_{off} = (3,1 \pm 2,1) \text{ s}^{-1}$, korrespondierend mit einer Lebensdauer von 320 ms, und einen molekularen Längenparameter $x_\beta = (0,68 \pm 0,12) \text{ nm}$.^[11]

Die *loading rate* wurde als das Produkt aus der Elastizität des Polymerlinkers (erhalten durch einen Fit am Ende der Abrißkurve, unmittelbar vor dem Abriß) und der Ziehgeschwindigkeit bestimmt. Sie variierten dabei für PhoB(190-209) von 87 pN/s – 55000 pN/s. Die Histogramme können gemäß der Formel von Strunz gefittet werden.^[508]

$$F = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta \cdot r}{k_B T \cdot k_{off}} \quad (9)$$

Die wahrscheinlichste Entbindungskraft ist F , $k_B T = 4.11 \text{ pN nm}$ der Boltzmann Faktor bei 298 K ist, x_β molekulare Reaktionslänge, r die *loading rate* und k_{off} ist die thermische *off*-Rate bei einer Kraft von $F = 0$.

Der lineare Fit an die Messdaten erlaubt die Bestimmung verschiedener Parameter. Einerseits liefert die Extrapolation auf eine verschwindende externe Kraft $F = 0$ die thermische *off*-Rate k_{off} ,^[541] die für das PhoB-Peptid $k_{off} = (3.1 \pm 2.1) \text{ s}^{-1}$ beträgt und einer Lebensdauer der Bindung von etwa 320 ms entspricht. Dies weist auf eine schnelle Entbindung des kleinen Peptids hin. Der Zerfall der Bindung der Mutante PhoB(190-209) R193A zur DNA läuft mit $k_{off} = (0.071 \pm 0.053) \text{ s}^{-1}$ bedeutend langsamer ab, was sich umgekehrt in einer längeren Lebensdauer $\tau = 14.1 \text{ s}$ des Komplexes äußert. Das Peptid PhoB(190-209) H198A andererseits weist eine sehr hohe *off*-Rate $k_{off} = (49.5 \pm 21.2) \text{ s}^{-1}$

auf, entsprechend einer verkürzten Lebensdauer $\tau = 20$ ms für den Komplex. Der Grund hierfür dürfte im Austausch der basischen Aminosäure His¹⁹⁸ der nativen Sequenz gegen Alanin liegen. Der Wegfall dieses basischen Aminosäurerestes führt zum Wegfall einer ladungsbedingten Bindung. Der erste Schritt der Bindung an die DNA, die ladungskontrolliert Assoziation des Peptids an das Rückgrat der DNA, wird also abgeschwächt. Der zweite Teil dieses Ergebnisses, die niedrigere off-Rate und damit längere Lebensdauer des Peptids PhoB(190-209) R193A im Vergleich mit dem Peptid der nativen Sequenz ist schwieriger zu erklären. Der Austausch der basischen Aminosäure Arg¹⁹³ gegen Alanin, sollte eigentlich ähnliche Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit des Peptids haben wie beim vorherigen Peptid. Vermutlich wirkt sich der Austausch dieses Restes in irgendeiner Form sterisch günstig aus, und/oder er wirkt sich auf die Fähigkeit des Peptids zur Ausbildung der α -Helix aus.

Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} beeinflusst die Affinität der Wechselwirkung einer Rezeptor-Ligand-Bindung, die bei einer 1:1-Kinetik der Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation $K_D = k_{off}/k_{on}$ entspricht, stärker als die on-Rate k_{on} , die im allgemeinen nicht so stark variiert.^[508]

Wird für die Bindung eines Peptids an die Ziel-DNA diffusionskontrollierte Assoziation mit einer typischen Geschwindigkeitskonstante $k_{on} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[508,542] zu Grunde gelegt, lassen sich die Gleichgewichtskonstanten zu $K_D = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$ (native Sequenz), $K_D = 7 \times 10^{-8} \text{ M}$ (Mutante R193A) und $K_D = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Mutante H198A) abschätzen. Aus den so abgeschätzten Gleichgewichtskonstanten können gemäß $\Delta G^\circ = RT \ln K_D$ die freien Reaktionsenthalpien (Gibbs-Energien) für die Bildung des Komplexes zu $\Delta G^\circ = -31.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ (native Sequenz), $\Delta G^\circ = -40.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Mutante R193A) sowie $\Delta G^\circ = -24.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Mutante H198A) abgeschätzt werden.

Ein weiterer Parameter, der aus den Messungen extrahiert werden kann, ist die molekulare Reaktionslänge x_β . Diese ist über die inverse Steigung des linearen Fits an die Daten (Abb. 66) erhältlich. Für das native Peptid und die Mutante H198A ergeben sich Werte um 7 Å (Tab. 13). Für das Peptid R193A, das auch die längste Lebensdauer aufweist, wird jedoch ein Wert von $x_\beta = 9.3 \text{ Å}$ erhalten. Dieses Ergebnis paßt zu den übrigen Resultaten, es deutet darauf hin, daß die letzte Aktivierungsbarriere im Falle dieses Komplexes später auf der Reaktionskoordinate liegt. Der Komplex hat also, unter der Annahme mikroskopischer Reversibilität, über eine größere Distanz auf der Reaktionskoordinate die

Möglichkeit, erneut zu assoziieren. Dies steht im Einklang mit einer größeren Lebensdauer des Komplexes.

Die logarithmische Abhängigkeit gilt für den gesamten Bereich der *loading rate*, was einer einzelnen Barriere in der Energielandschaft (bei x_β) entspricht. Im Gegensatz dazu wurde in den Protein-DNA-Experimenten mit dem Protein ExpG aus *S. meliloti* für *loading rates* über 11 nN s^{-1} eine weitere Barriere gefunden.^[50]

Tab. 13: Vergleich der aus der dynamischen Kraftspektroskopie erhaltenen thermischen Off-Raten und molekulare Reaktionslängen

| Mutation | Peptidsequenz | $k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$ | $x_\beta / \text{Å}$ |
|----------|---|----------------------------------|----------------------|
| - | AC-VEDRTVDVHIRRLRKALEPG-Linker | 3.1 ± 2.1 | 6.8 ± 1.2 |
| R193A | AC-VED Δ TVDVHIRRLRKALEPG-Linker | 0.071 ± 0.053 | 9.3 ± 2.6 |
| H198A | AC-VEDRTVDV Δ IRRLRKALEPG-Linker | 49.5 ± 21.2 | 7.2 ± 3.5 |
| R203A | AC-VEDRTVDVHIRRL Δ KALEPG-Linker | - | - |

4.1.6 Vergleichende Diskussion der Ergebnisse der verschiedenen Methoden

Als erstes läßt sich ganz klar feststellen, daß die Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie zur Untersuchung der Bindungseigenschaften den Messungen im Ensemble offensichtlich überlegen ist. Sie erlaubt die Analyse spezifischer Bindung auch bei möglicher unspezifischer Bindung, ohne das auf letztere bei der Datenauswertung Rücksicht genommen werden muß da die Bindungsereignisse mit unspezifischer Bindung einfach vor der Analyse verworfen werden können. Aus diesem Grund muß man sich über das Versuchs-Setup über diesen Aspekt keine Gedanken machen. Aus der Kraftspektroskopie lassen sich die in Tab. 13 dargestellten Daten bestimmen.

Die Analyse über die Oberflächenplasmonresonanz ist mit dem Versuchs-Setup, das zur Kraftspektroskopie verwendet wurde, nicht möglich. Dies liegt an der Länge des DNA-Fragmentes, das zu viele unspezifische Bindungsereignisse ermöglicht.

Die CD-Spektroskopie liefert zumindest Anhaltswerte für die Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturtypen der Peptide in Lösung. Da die Anteile bei den unterschiedlichen Auswertemethoden stark variierende Werte liefern, sind auch diese unter Vorbehalt zu betrachten. Die zuverlässigsten Ergebnisse scheinen mit CDNN erzeugt zu werden. Die hiermit erzielten Ergebnisse zeigen, daß der helicale Anteil in Lösung beim PhoB(190-209) H198A [*E. coli*] mit 60% am größten ist, für die native Sequenz PhoB(190-209) [*E. coli*] liegt sie bei ungefähr 40% und für PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] ungefähr bei 20%. Hierbei fällt auf, daß mit fallendem helicalen Anteil in Lösung auch die *off*-Raten fallen.

Nur beim Peptid PhoB(190-209) R203A [*E. coli*] ist dies nicht der Fall, eventuell verhindert der Austausch dieser Aminosäure die Assoziation. Eventuell läßt sich die Abhängigkeit der Off-Raten von der Helicalität entropisch erklären, mit einem Entropiegewinn durch die bei der Bildung der α -Helix freigewordenen Wassermoleküle, die vorher über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptid wechselwirkten.

Eine Analyse der Änderungen der CD-Spektren bei der Bindung an DNA ist aus einem ähnlichen Grund wie die verlässliche Datenauswertung der Daten aus den Messungen der Oberflächenplasmonresonanz nicht Möglich. Der Größenunterschied der Peptids und der DNA ist einfach zu groß, um die Änderungen am Spektrum der Peptide zu erkennen, da zu viele nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Peptidmoleküle vorhanden sind, wenn für Messungen ausreichende Peptidkonzentrationen gewählt werden. Auch die Änderung am Spektrum der DNA kann nicht ordentlich beobachtet werden, da die Konzentration an DNA zu gering ist. Außerdem stört die viel höhere Konzentration an Peptidmolekülen in der Lösung, da diese schließlich überlagernde eigene Spektren liefern. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der Peptide an die spezifische Bindestelle und ein weiterer unspezifisch bindet. Es kann also bei einem so langen DNA-Stück nicht von der Änderung im Spektrum auf die Art der Bindung geschlossen werden.

4.2 Epitope-Mapping

4.2.1 Überlegungen zum Auffinden der DNA-bindenden Domäne in ExpG

Die Primärsequenz des Transkriptionsaktivators ExpG aus *S. meliloti* ist bekannt, jedoch ist das DNA-bindende Epitop bisher noch genau lokalisiert. Die Peptidsynthese in Verbindung mit Bindungsstudien, z.B. mittels Oberflächenplasmonresonanz, erlaubt es, jeweils kurze Peptide mit der Primärstruktur eines Abschnitts des Proteins zu synthetisieren, und anschließend die Wechselwirkungen dieser Peptide mit der DNA-Sequenz zu untersuchen, an die das Protein bindet. Nach mehreren Durchgängen sollte das am besten an die DNA bindende Peptid aufgefunden sein. Anschließend wäre es möglich, durch Mutationsexperimente am Protein zu überprüfen, ob das so aufgefundene Epitop wirklich entscheidend ist.

Dieser peptidchemische *bottom-up* Ansatz des *epitope mapping* bietet gegenüber einem biochemischen *top-down* Ansatz, bei dem durch Mutation auf der Ebene der Gene für das Protein kürzere Fragmente oder Proteine mit durch Variation der Aminosäuren inaktiven Bereichen hergestellt werden, mehrere Vorteile, z.B. ist die Geschwindigkeit dieser Art der Analyse höher, da sowohl die Synthesen als auch die Aufreinigung automatisiert werden können.

Bei einer Betrachtung der Primärstruktur des Proteins fällt zunächst eine Häufung basischer Aminosäurereste im Bereich der Aminosäuren 126-170 auf (Abb. 67). Hier liegen sie meist in einem Abstand von 2-4 Aminosäureresten, was als Hinweis auf amphiphile Helices betrachtet werden kann.

| | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | MERGMNHRIL | YPFADFGDTV | AILPANETQR | KGLDTPVDDR | DGDDSLVTYF | ELARVMERAS |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | RRFSGLLRAE | LTKLGVEDIG | PAQAMVLLAI | GAEELSVGEL | LDRGHYVGSN | ISYYLQQLAD |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | GDYIDRIASQ | RDKRSARIRL | SEKGRQLCAG | LRQAAKGYER | ALSHGDQDRR | NLETAFQTLH |
| | 190 | | | | | |
| | RLELVWGNAA | RYGI | | | | |

Abb. 67: Darstellung der Primärstruktur von ExpG aus *S. meliloti*, basische Aminosäurereste sind blau markiert.

ExpG zeigt Homologien zu den Transkriptionsaktivatoren der MarR Familie (Abb. 68).^[35]

Es ist bekannt, daß die Mitglieder dieser Familie über ein *helix-turn-helix* Motiv an DNA

binden.^[43,44] Eine Betrachtung des Sequenzvergleichs zeigt eine Häufung von Sequenzhomologien im Bereich der Aminosäuren 126-153, der Bereich, in dem auch ein DNA-bindendes *helix-turn-helix* Motiv für MarR vorhergesagt ist.^[45]

| | | | | | | | |
|------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ExpG | 1 | MERGMNHRIL | YPFADFGDTV | AILPANETQR | KGLDTPVDDR | DGDDSLVTYF | 50 |
| MarR | 1 | | | MKSTSDLFNE | 10 | | |
| ExpG | 51 | ELARVMERAS | RRFSGLLRAE | LTKLGVEDIG | PAQAMVLLAI | GEAELSVGEL | 100 |
| MarR | 11 | IIPLGRLIHM | VNQKKDRLLN | EYLSPLDITA | AQFKVLCSIR | CAACITPVEL | 60 |
| ExpG | 101 | LDRGHYVGSN | ISYYLQQLAD | GDYIDRIASQ | RDKRSARIRL | SEKGRQLCAG | 150 |
| MarR | 61 | KKVLSVDLGA | LTRMLDRLVC | KGWVERLPNP | NDKRGVLVKL | TTGGAAICEQ | 110 |
| ExpG | 151 | LRQAAKGYER | ALSHGDQDRR | NLETAFTLH | RLELVWGNA | RYGI | 194 |
| MarR | 111 | CHQLVGQDLH | QELTKNLTAD | EVATLEYLLK | KVLP | 144 | |

Abb. 68: Sequenzvergleich von ExpG aus *S. meliloti* und MarR aus *E. coli*.^[45] Der Bereich der für MarR vorhergesagten HTH-Motive ist fett gedruckt; Homologien in diesem Bereich sind gelb unterlegt.

Sowohl die Sequenzhomologie im Bereich der Aminosäurereste 126-153 als auch die Häufung der basischen Aminosäurereste im Bereich der Aminosäurereste 126-170 weisen schon auf einen potentiell DNA bindenden Bereich hin.

In einem ersten *epitope mapping* werden Peptide mit 15 Aminosäureresten synthetisiert, die sich jeweils um 10 Aminosäurereste überlappen. Mit diesen werden Bindungsanalysen durchgeführt, und im Bereich von Peptiden, die an die DNA binden, werden dann Peptide mit 20 Aminosäureresten und jeweils 17 überlappenden Aminosäureresten synthetisiert. Dieses iterative Vorgehen in mehreren Schritten und das Eingrenzen des zu untersuchenden Bereichs sollte das Verfahren schneller machen als eine sofortige Synthese von Peptiden mit 20 Aminosäureresten mit 19 Aminosäureresten Überlappung, da zum einen sehr viel weniger Bindungsstudien durchgeführt, und viel weniger Peptide synthetisiert werden müssen. Außerdem fallen die Produkte von Peptidsynthesen mit 15 Aminosäureresten im Allgemeinen in höherer Reinheit an als die von Synthesen mit 20 Aminosäureresten.

4.2.2 Synthese der 15-mer-Peptide

In einem ersten Schritt wurden 37 Peptide synthetisiert, die bis auf eines mit 14 Aminosäureresten jeweils 15 Aminosäurereste lang sind und sich immer um 10 Aminosäurereste überlappen (Tab. 14). Die Länge von 15 Aminosäuren bietet einen guten Kompromiß von möglichst kurzen Peptiden, die einfach aufzureinigen und schneller zu synthetisieren sind, und einer möglichst großen Länge, um eine stabile amphiphile α -Helix ausbilden zu können. Ein Weiterschreiten um 5 Aminosäuren bedeutet ungefähr 1.5 Windungen der α -Helix, was dazu führt, daß jeder Aminosäurerest einmal im Inneren, einmal im Bereich des *N*- und einmal im Bereich des *C*-Terminus in einem Peptid auftaucht. Dies sollte sicherstellen, daß kein mögliches DNA-bindendes Epitop übersehen wird, weil kein entsprechendes Peptid synthetisiert würde.

Tab. 14: Synthetisierte Peptidepitope von ExpG [*S. meliloti*].

| | Sequenz | AS | | Sequenz | AS |
|-----------|-----------------|----------|-----------|-----------------|-----------|
| 36 | MERGMNHRILYPFAD | 1 - 15 | 56 | LDRGHYVGSNISYYL | 101 - 115 |
| 37 | NHRILYPFADFGDTV | 6 - 20 | 57 | YVGSNISYYLKQLAD | 106 - 120 |
| 38 | YPFADFGDTVAILPA | 11 - 25 | 58 | ISYYLKQLADGDYID | 111 - 125 |
| 39 | FGDTVAILPANETQR | 16 - 30 | 59 | KQLADGDYIDRIASQ | 116 - 130 |
| 40 | AILPANETQRKGLDT | 21 - 35 | 60 | GDYIDRIASQRDKRS | 121 - 135 |
| | | | | | |
| 41 | NETQRKGLDTPVDDR | 26 - 40 | 61 | RIASQRDKRSARIRL | 126 - 140 |
| 42 | KGLDTPVDDRGDGDS | 31 - 45 | 62 | RDKRSARIRLSEKGR | 131 - 145 |
| 43 | PVDDRGDGDSLVTYF | 36 - 50 | 63 | ARIRLSEKGRQLCAG | 136 - 150 |
| 44 | DGDDSLVTYFELARV | 41 - 55 | 64 | SEKGRQLCAGLRQAA | 141 - 155 |
| 45 | LVTYFELARVMERAS | 46 - 60 | 65 | QLCAGLRQAAKGYER | 146 - 160 |
| | | | | | |
| 46 | ELARVMERASRRFSG | 51 - 65 | 66 | LRQAAKGYERALSHG | 151 - 165 |
| 47 | MERASRRFSGLLRAE | 56 - 70 | 67 | KGYERALSHGDQDRR | 156 - 170 |
| 48 | RRFSGLLRAELTKLG | 61 - 75 | 68 | ALSHGDQDRRNLETA | 161 - 175 |
| 49 | LLRAELTKLGVEDIG | 66 - 80 | 69 | DQDRRNLETAFTLH | 166 - 180 |
| 50 | LTKLGVEDIGPAQAM | 71 - 85 | 70 | NLETAFTLHRLELV | 171 - 185 |
| | | | | | |
| 51 | VEDIGPAQAMVLLAI | 76 - 90 | 71 | FQTLHRLELVWGNA | 176 - 190 |
| 52 | PAQAMVLLAIGEAEL | 81 - 95 | 72 | RLELVWGNAARYGI | 181 - 194 |
| 53 | VLLAIGEAELSVGEL | 86 - 100 | | | |
| 54 | GEAELSVGELDRGH | 91 - 105 | | | |
| 55 | SVGELDRGHYVGSN | 96 - 110 | | | |

Die Synthese wurde automatisiert im Syntheseautomaten am 2Cl-Trt-Harz durchgeführt. Die Kupplung erfolgte mittels Doppelkupplung mit 1.5 Äquivalenten der Fmoc-geschützten Aminosäure, 1.5 Äquivalenten TBTU und 3 Äquivalenten DIPEA. Die

temporäre Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 6% Piperazin in DMF (w/v) abgespalten. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 95% TFA, 2.5% Wasser und 2.5% TIPS. Die nach der Abspaltung angefertigten MALDI-ToF-MS Spektren und analytischen HPL-Chromatogramme zeigten, daß die Peptide alle relativ sauber sind. Die Peptide wurden nicht weiter aufgereinigt, sondern in Bindungsstudien eingesetzt. Dabei wird davon ausgegangen, daß der höchste Peak im HPL-Chromatogramm dem Produkt entspricht (Tab. 20, 21). Die einzuwiegende Menge für die Bindungsanalysen wurde dementsprechend berechnet.

4.2.3 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindung zwischen den überlappenden Epitopen aus der Primärstruktur von ExpG und der komplementären DNA aus *S. meliloti* wird mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Zur Untersuchung wurde auf einem Biacore SA-Chip über die Streptavidin/Biotin Bindung auf der Meßzelle das biotinylierte KF-Ge Fragment aus ExpG immobilisiert. Dieses Fragment enthält 177 Basenpaare, von denen 75 mit denen übereinstimmen (Abb. 69), die im entsprechenden Genom vorkommen, die übrigen Reste sind durch die PCR bedingt. Die komplette Sequenz ist unter 6.1.3.2 zu finden.^[51]

...GCTCAAGAGCA**CGCAATT**CGGGCAGGGTGTTAT**GAAATTA**CTTCAAGTTTGAAGTAATTT**CCGGAAT**GG..

Abb. 69: Sequenz der DNA, an die ExpG bindet. Dargestellt sind die 75 Basen, die mit der DNA aus dem Genom von *S. meliloti* übereinstimmen.^[51] Für die Bindung werden die beiden gelb markierten Boxen und auch die blau markierte palindrome Sequenz benötigt.^[51]

Auf der Referenzzelle wurde, analog zu den Messungen mit PhoB, das pFPR Fragment der EBNA-DNA immobilisiert, das die Bindungsstelle nicht enthält. Die komplette Sequenz ist unter 6.1.3.3 zu finden. Der Response der Referenzzelle wurde von dem der Meßzelle abgezogen, um zufällige unspezifische Wechselwirkungen mit der DNA herauszurechnen. Für die Untersuchungen wurden die Peptide so gelöst, daß eine 1 mM Lösung im Puffer erhalten wird. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer mit 100 mM KH₂PO₄ und 50 mM NaCl mit einem pH von 7.4 verwendet, der auch für die ersten Bindungsstudien mit PhoB verwendet wurde. Die Lösungen wurden zentrifugiert, und es wurde mittels MALDI-ToF-MS untersucht, ob das gewünschte Peptid in Lösung vorliegt. Aufgrund des hohen Salzgehaltes muß die Lösung 1:1000 (v/v) verdünnt werden, um ein aussagekräftiges Massenspektrum zu erhalten. In den Lösungen aller Rohprodukte waren die gewünschten

Peptide gelöst, selbst bei denen, wo sich nicht alles eingewogene Rohprodukt gelöst hat. Auch die Überstände dieser Peptide wurden untersucht, da davon ausgegangen werden kann, daß ein Peptid, das mit der DNA unter natürlichen Bedingungen wechselwirkt, wasserlöslich sein muß.

Die Messung erfolgte bei einem Fluß von 10 µl/min über 10 min, die anschließende Regeneration mit 0.5% SDS im Puffer bei einer Flußrate von 20 µl/min während 1 min.

Von den 37 Peptiden zeigten nur sechs Peptide überhaupt eine Bindung (Abb. 70), wobei das Peptid mit den Aminosäureresten 136-150 stark heraussticht, und fünf im Bereich der Aminosäuren 126-170 liegen (Tab. 15), der auch schon bei den Vorüberlegungen als möglicher DNA-bindender Bereich identifiziert wurde. Das Peptid ExpG(131-146) zeigte gar keine Bindung an die DNA, obwohl es 7 basische Reste enthält. Eventuell wird die Ausbildung einer amphiphilen Helix durch diese große Anzahl an basischen Resten verhindert.

Tab. 15: Vergleich der Sequenzen von ExpG aus *S. meliloti* und MarR aus *E. coli* sowie der bindenden 15-Peptide dargestellt in abnehmender Bindungsstärke, in der dritten Spalte ist Δ RU angegeben.^[35] Der Bereich der für MarR vorhergesagten HTH-Motive ist gelb unterlegt.^[45]

| ExpG | 126 | RIASQ | RDKRSARIRL | SEKGRQLCAG | LRQAAKGYER | ALSHGDQDRR | 170 | SPR (Δ RU) |
|------|-----|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------|-----|--------------------|
| | | | 136 ARIRL | SEKGRQLCAG | 150 | | | 2900 |
| | | | | 151 LRQAAKGYER | ALSHG | 165 | | 140 |
| | | | | 156 KGYER | ALSHGDQDRR | 170 | | 50 |
| | 126 | RIASQ | RDKRSARIRL | 140 | | | | 30 |
| | | | | 146 QLCAG | LRQAAKGYER | 160 | | 30 |
| MarR | 86 | RLPNP | NDKRGV LVKL | TTGGA ICEQ | CHQLV GQDLH | QELTKNLTAD | 130 | |
| | 6 | NHRILYPFADFGDTV | 20 | | | | | 20 |

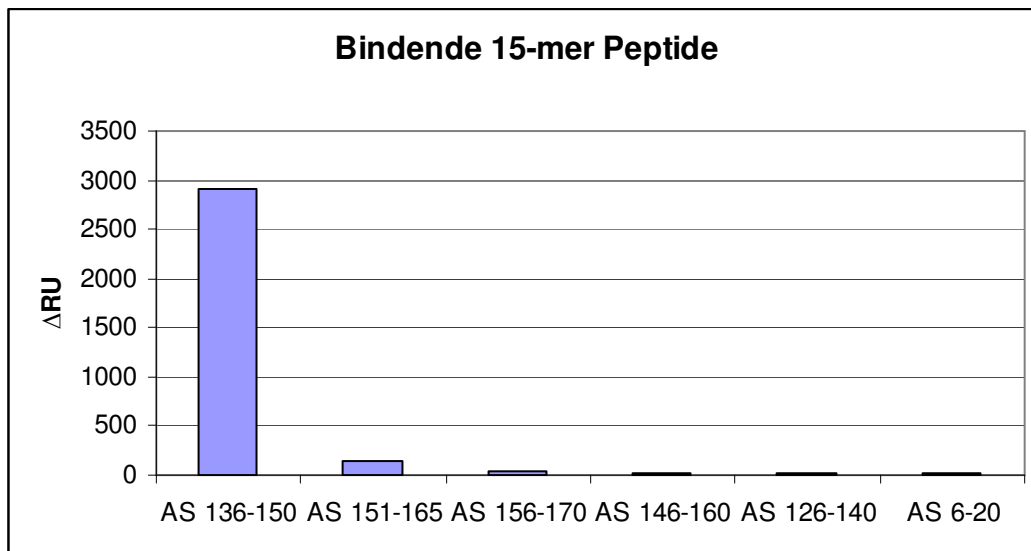


Abb. 70: Vergleich von ΔRU_{\max} der DNA-bindenden Peptide mit 15 Aminosäureresten.

4.2.4 Synthese der 20-mer-Peptide mit 17 überlappenden Aminosäuren

Nachdem sich der Bereich der Aminosäuren 126-170 auch in der ersten Runde des *epitope mapping* als Bereich herausgestellt hat, dessen Primärstruktur die DNA-bindenden Peptide beinhaltet, wurden Peptide aus diesem Bereich synthetisiert. Um die Anzahl der zu synthetisierenden Peptide klein zu halten, wurden Peptide mit 20 Aminosäureresten und jeweils 17 überlappenden Aminosäureresten im Bereich der Aminosäuren 131-174 synthetisiert (Tab. 16). Die Länge wurde auf 20 Aminosäuren erhöht, da auch das DNA-bindende Fragment aus PhoB [*E.coli*] und das für MarR [*E.coli*] vorhergesagte HTH-Motiv jeweils 20 Aminosäurereste lang ist.

Tab. 16: Synthetisierte 20-Peptide von ExpG aus *S. meliloti*.

| | Sequenz | AS |
|-----------|----------------------|-----------|
| 73 | RDKRSARIRLSEKGRQLCAG | 131 - 150 |
| 74 | RSARIRLSEKGRQLCAGLRQ | 134 - 153 |
| 75 | RIRLSEKGRQLCAGLRQAAK | 137 - 156 |
| 76 | LSEKGRQLCAGLRQAAKGYE | 140 - 159 |
| 77 | KGRQLCAGLRQAAKGYERAL | 143 - 162 |
| 78 | QLCAGLRQAAKGYERALSHG | 146 - 165 |
| 79 | AGLRQAAKGYERALSHGDQD | 149 - 168 |
| 80 | RQAAKGYERALSHGDQDRRN | 152 - 171 |
| 81 | AKGYERALSHGDQDRRNLET | 155 - 174 |

Die Synthese wurde automatisiert im Syntheseautomaten am 2Cl-Trt-Harz durchgeführt. Die Kupplung erfolgte mittels Doppelkupplung mit 1.5 Äquivalenten der Fmoc-

geschützten Aminosäure, 1.5 Äquivalenten TBTU und 3 Äquivalenten DIPEA. Die temporäre Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 6% Piperazin in DMF (w/v) abgespalten. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 95% TFA, 2.5% Wasser und 2.5% TIPS. Die Aufreinigung erfolgte mittels wiederholter HPLC-Läufe mit verschiedenen Gradienten.

4.2.5 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindungsstudien zeigen, daß nur die Peptide ExpG(134-153) und ExpG(137-156) stark an die DNA binden, während die übrigen nur sehr schwach oder gar nicht wechselwirken.

Diese Peptide liegen im Bereich großer Sequenzhomologie mit MarR (Tab. 17).^[35] Ausgehend vom oben angestellten Sequenzvergleich entspricht das Peptid mit den Aminosäureresten 134-153 dem vorhergesagten HTH-Motiv MarR-C.^[45] Da das Peptid ExpG(131-146) gar nicht gebunden hat, und die Aminosäurereste 154 und 155 Alaninreste sind, die nicht an die DNA binden können, also nicht zu einer verbesserten Bindung beitragen können, wird ExpG(134-153) als das DNA-bindende Epitop betrachtet. Dies Peptid zeigt auch eine ausgeprägte amphiphile α -helicale Struktur (Abb. 71)

Tab. 17: Sequenzvergleich von ExpG aus *S. meliloti* und MarR aus *E. coli* sowie der beiden am besten bindenden Peptide im für die Synthese der 20-Peptide ausgewählten Bereich,^[35] in der dritten Spalte ist Δ RU angegeben. Der Bereich des für MarR vorhergesagten HTH-Motives ist gelb unterlegt.^[45]

| | | | | | | | | |
|------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------|-------------------|
| ExpG | 131 | RDKRSARIRL | SEKGRQLCAG | LRQAAGYER | ALSHGDQDRR | NLET | 174 | SPR(Δ RU) |
| | | 134 | RSARIRL | SEKGRQLCAG | LRQ | | 153 | 2650 |
| | | 137 | RIRL | SEKGRQLCAG | LRQAAK | | 156 | 1650 |
| MarR | 91 | NDKRGV | LVKL | TTGGAAICEQ | CHQLVGQDLH | QELTKNLTAD | EVAT | 134 |

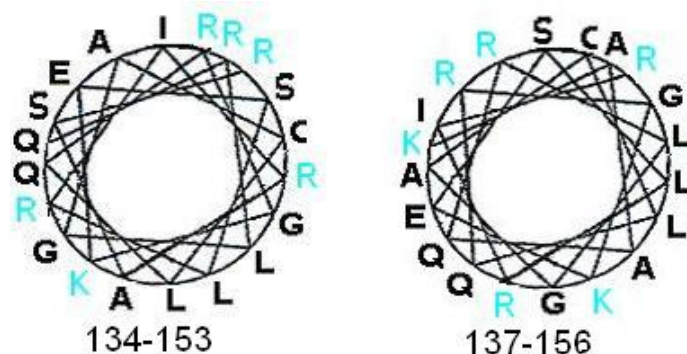


Abb. 71: Darstellung der Edmundson-Räder der Peptide aus ExpG mit den Aminosäureresten 134-153 und 137-156 aus der Primärstruktur des ExpG aus *E. coli*.

4.3 AzoTANDEM

4.3.1 Einleitung

Es soll ein photoschaltbares Analogon zum DNA-bindenden Bisinterkalator TANDEM synthetisiert werden (Abb. 72), wobei als photoschaltbare Einheit ein vorhandenes Azobenzolderivat, 4,4'-Diazenediyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin (Abb. 73),^[197] eingesetzt werden soll. Dieser basiert auf zwei über ein Diazen verbundene Phenylalanine.

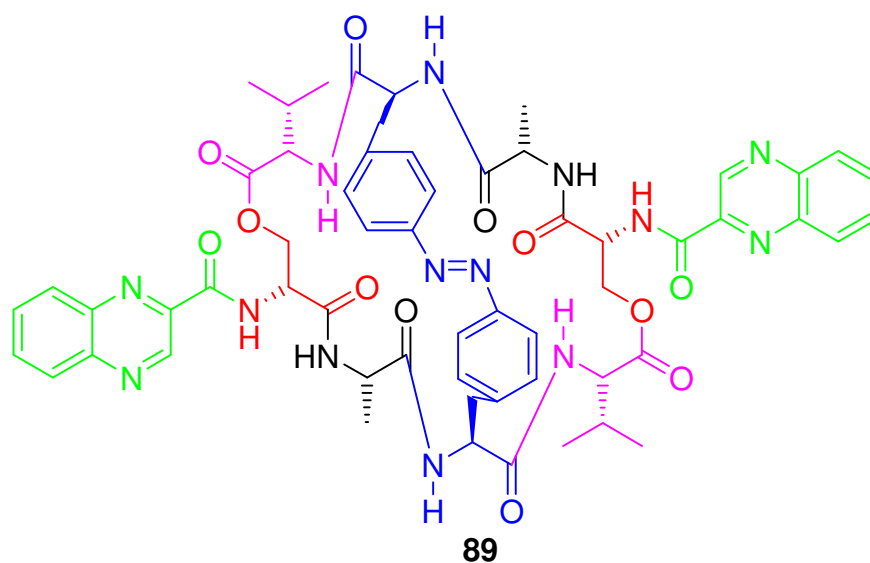


Abb. 72: Struktur des zu synthetisierenden, photoschaltbaren Derivates von TANDEM, *trans*-AzoTANDEM

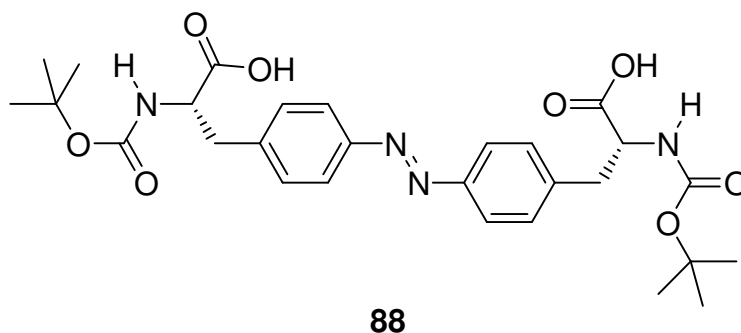


Abb. 73: 4,4'-Diazenediyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin^[197]

Die Entscheidung, die Phenylalanine an den *para*-Positionen über dem Diazen zu verbinden rührt aus energieminierten Strukturen von *ortho*-, *meta*- und *para*-verknüpftem AzoTANDEM (Abb. 74), da hier der Abstand der Chinoxalineinheiten (*ortho* 0,43 nm, *meta* 0,47 nm, *para* 0,51 nm) dem in Triostin (ca. 1,0 nm) am nächsten kommt.

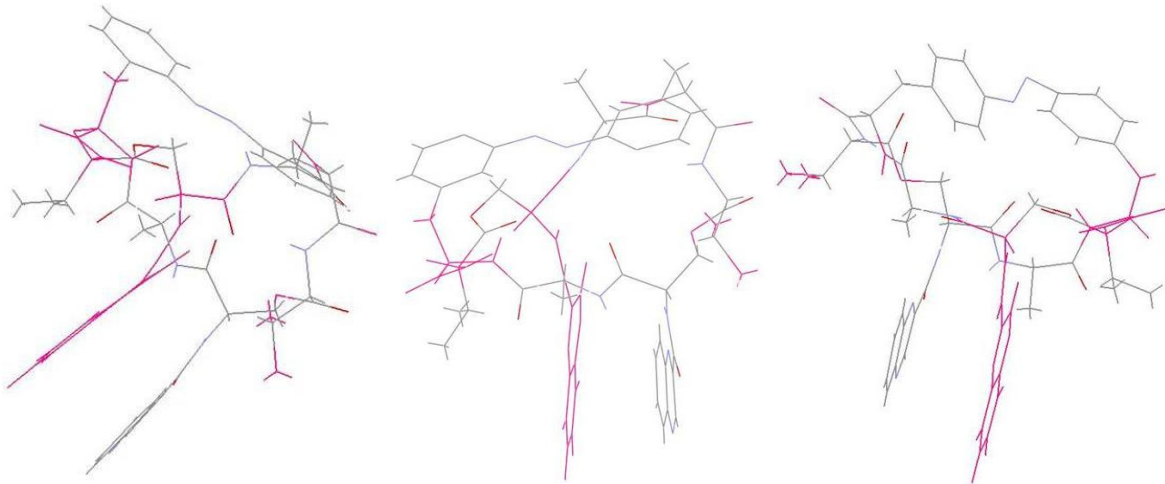


Abb. 74: Darstellung der bei der Energieminimierung mittels INSIGHT II in einem CHARMM Kraftfeld erhaltenen Strukturen. Mit einer *ortho*-Azobenzoleinheit beträgt der Abstand zwischen den Chinoxalinsystemen 0,43 nm (oben links), bei einer *meta*-Azobenzoleinheit 0,47 nm (oben) und bei einer *para*-Azobenzoleinheit 0,51 nm (links)

Durch die *cis/trans*-Isomerisierung soll die Molekülstruktur so geändert werden, daß die Chinoxalineinheiten nicht mehr parallel zueinander liegen, und damit nicht mehr durch Interkalation an der DNA binden können (Abb. 75).

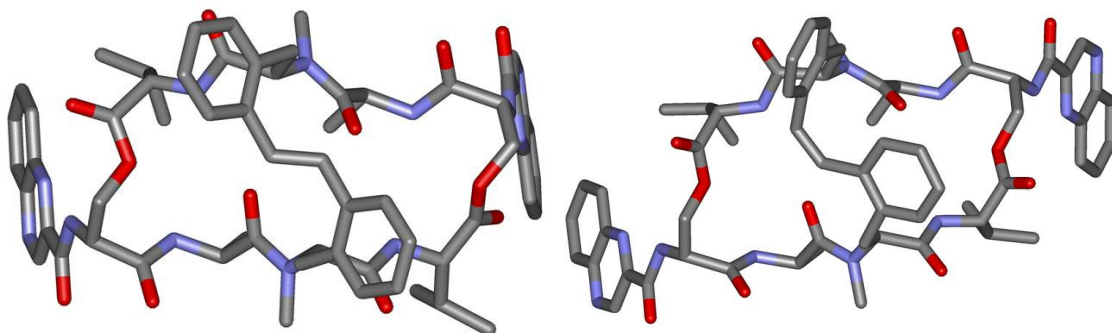


Abb. 75: Vergleich der *trans*- (links) und *cis*-Form (rechts) von Stilben-überbrücktem TANDEM. In der *cis*-Form liegen die Chinoxalinsysteme nicht mehr parallel zueinander und können deswegen nicht mehr zwischen Basenpaare interkalieren.

4.3.2 Synthese

Die in der Literatur bekannten Synthesen verlaufen prinzipiell alle über denselben Weg. Zuerst werden zwei Tetrapeptide mit geeigneten Schutzgruppen versehen synthetisiert. Anschließend werden diese Peptide verknüpft, und entweder zuerst die Disulfidbindung gebildet^[101] oder der Ringschluß des Peptids durchgeführt.^[102-105] Zuletzt wird die interkalierende Einheit, im Fall von TANDEM und Triostin A Chinoxalin,

eingeführt. Die Synthesen erfolgen alle in Lösung, mit Boc als temporärer Schutzgruppe (Abb. 76, 77). Der C-Terminus wird mit einer reaktiv mit Zink in Essigsäure abspaltbaren Schutzgruppe geschützt, entweder als β,β,β -Trichlorethylester^[101-104,543] oder mit einer *p*-Bromphenacylgruppe^[105]. Die Thiolgruppe im Cystein wird mittels einer Acetamidomethylgruppe^[101,102,104,105] oder im Falle des Einsatzes von *N*-Methylcystein mit einer Benzamidomethylgruppe geschützt.^[103] Der N-Terminus des D-Serins, an den abschließend die interkalierende Chinoxaloylgruppe gebunden wird, wird mit einer Benzyloxycarbonylgruppe^[102-105] oder der Fmoc-Gruppe geschützt.^[101]

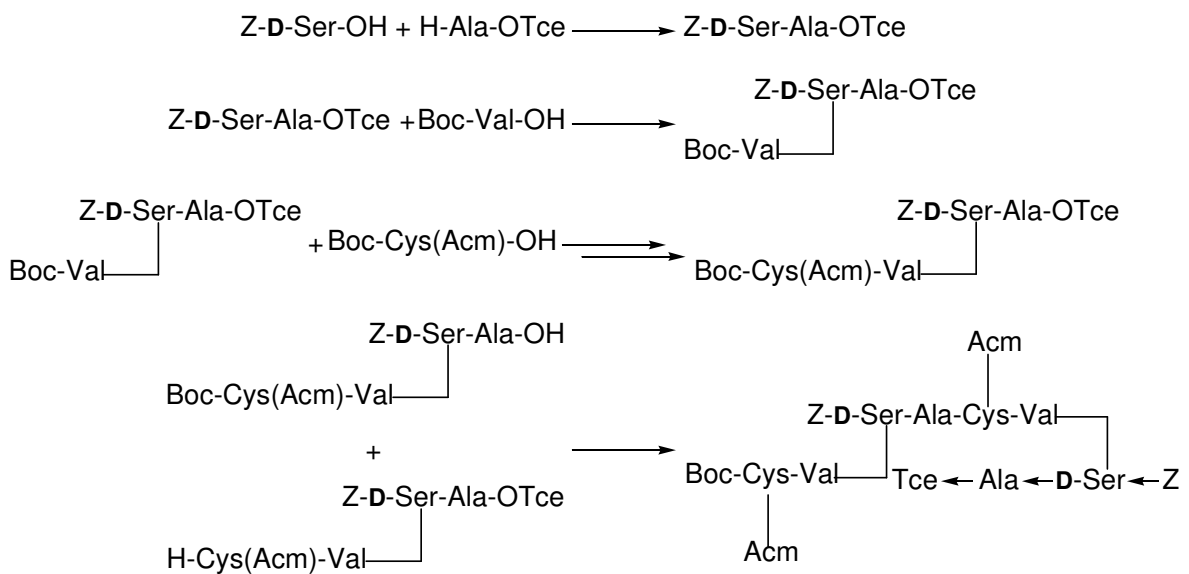


Abb. 76: Darstellung der Syntheseroute für die Tetradepsipeptide und deren Verknüpfung bei der ersten Synthese von TANDEM^[102]

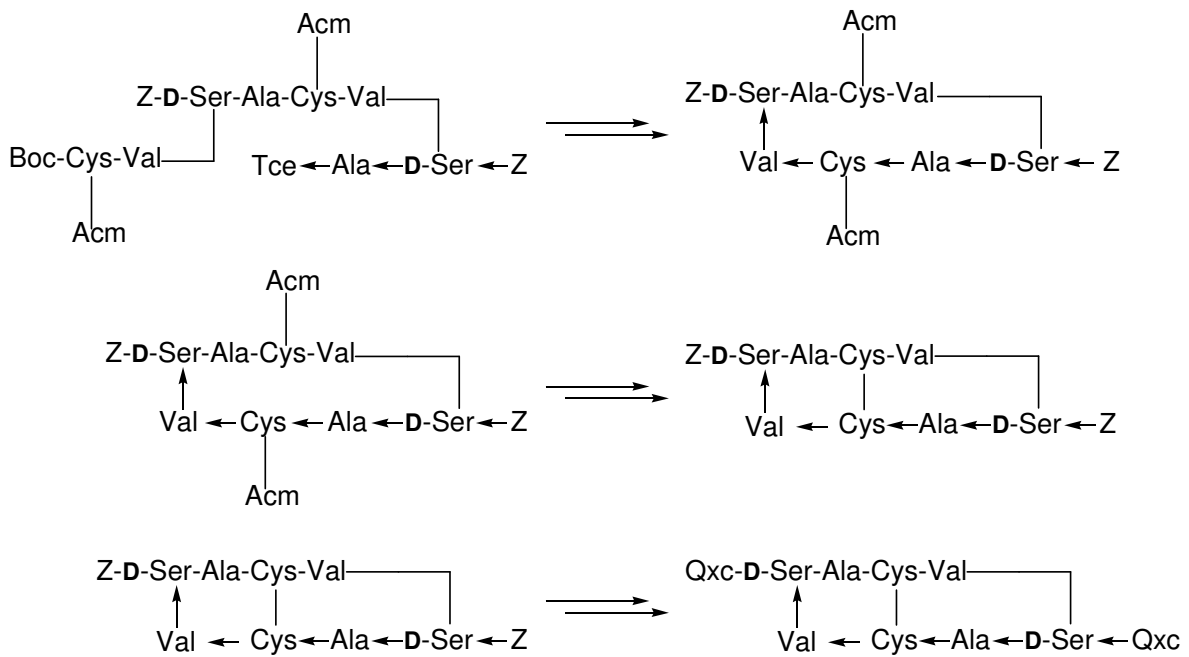


Abb. 77: Darstellung der Syntheseroute für die Ringschlüsse und des Einbaus der Chinoxaline bei der ersten Synthese von TANDEM^[102]

Da bei dem zu synthetisierenden photoschaltbaren TANDEM-Derivat die Cystin-Einheit durch das photoschaltbare Azobenzolderivat ersetzt werden soll, kommen die vorgenannten Syntheschemata nicht in Frage. Eine solche Syntheseroute wäre nur möglich, wenn analog zum Disulfid eine "Azo-Cyclisierung" möglich wäre. Statt dessen wird zuerst ein Chinoxalin-funktionalisiertes Tripeptid synthetisiert, das anschließend an beide freien Carboxygruppen des photoschaltbaren Azobenzolderivat gekuppelt wird. Abschließend erfolgt der Ringschluß (Abb. 78, 79).

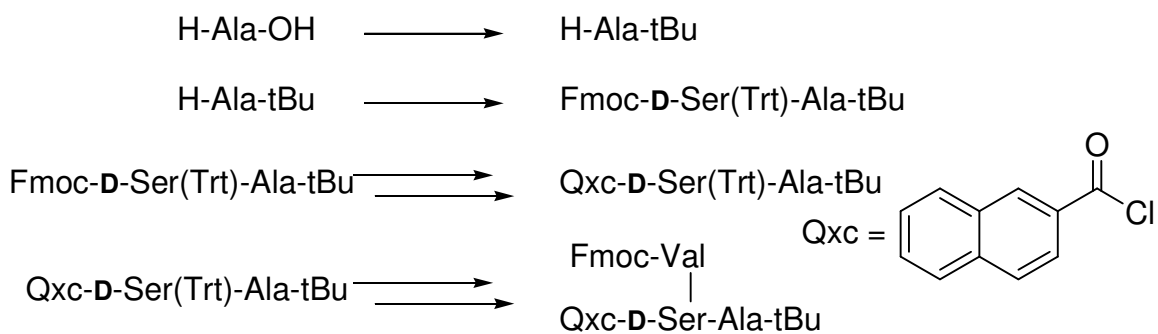


Abb. 78: Syntheschema zur Synthese des Chinoxalin-funktionalisierten Tripeptids

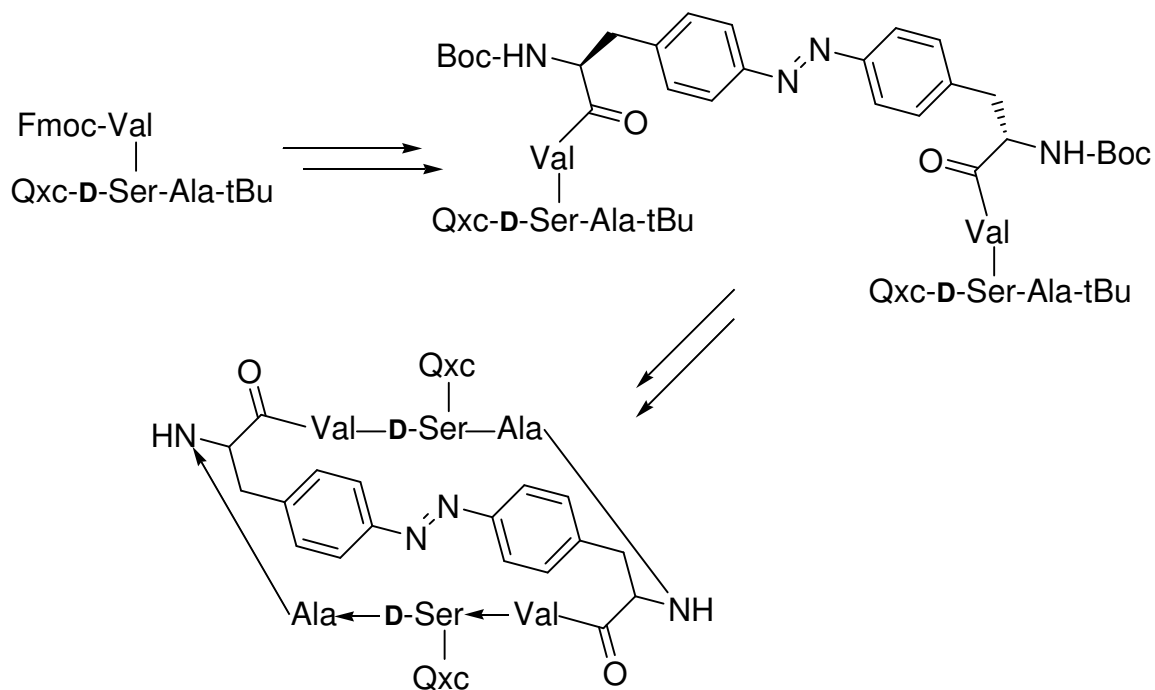


Abb. 79: Syntheschema zur Kupplung und zum Ringschluß zum AzoTANDEM

Beim abschließenden Ringschluß zum 26-gliedrigem Ring (**Abb. 80 I**) könnte als Nebenreaktion eine alternative Cyclisierung auftreten, bei der 13-gliedrige Ringe gebildet werden (**Abb. 80 II**). Dieser Prozeß sollte jedoch aufgrund der ungünstigen Ringgröße benachteiligt sein, da ein 13-gliedriger Ring gespannter ist als ein 26-gliedriger. Eine weitere mögliche Nebenreaktion wäre die Oligomerisierung von nicht cyclisierten Molekülen. Diese Nebenreaktion sollte sich durch hohe Verdünnung vermindern lassen, die durch eine Methode der Pseudohochverdünnung erreicht werden kann.^[544]

Kupplung des Fmoc-D-Ser(Trt) erfolgte mit TBTU und DIPEA, die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte wieder mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF.

4.3.2.1.2 Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu **92**

Die Kupplung des Chinoxaloylchlorids an H-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz erfolgte mit Triethylamin als Hilfsbase. Zur Kupplung wurde H-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz in DMF mit 1.1 Äquivalenten Chinoxaloylchlorid und 2.2 Äquivalenten Triethylamin umgesetzt.

4.3.2.1.3 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu **93**

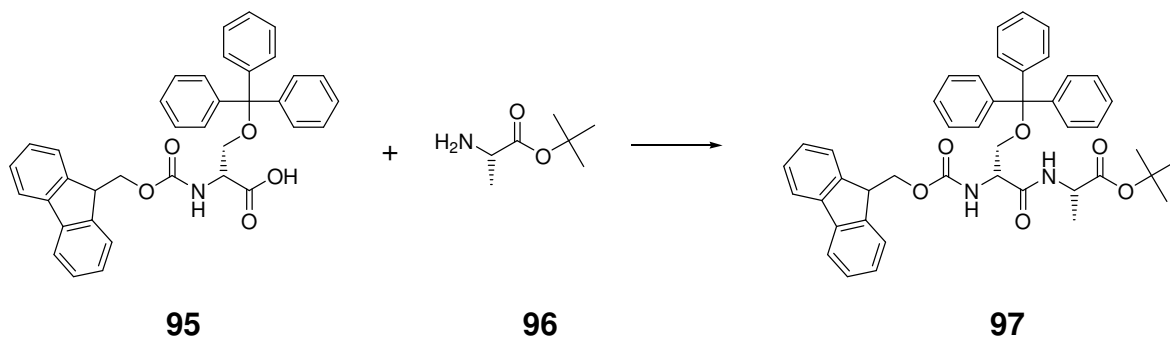
Die Abspaltung der Tritylschutzgruppe von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu erfolgte mittels 1% TFA in DCM.

4.3.2.1.4 Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val-)-Ala-O^tBu **94**

Die Esterkondensation zur Depsipeptidbindung erfolgte mit DCC in Pyridin als Lösungsmittel bei 0°C.

Es zeigte sich also, daß diese für die Lösungssynthese des Tridepsipeptids vorgesehenen Reaktionsschritte an der festen Phase durchführbar sind und dort quantitativ verlaufen.

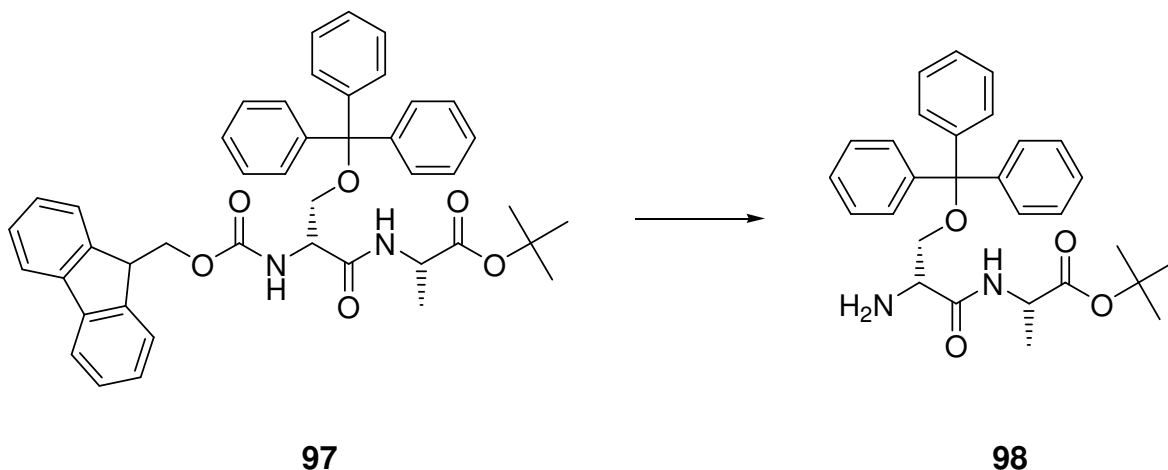
4.3.2.2 Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu



Die Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu erfolgte im ersten Versuch mit 3 Äq. DIC und katalytischen Mengen DMAP in DCM. Die Ausbeute nach einer

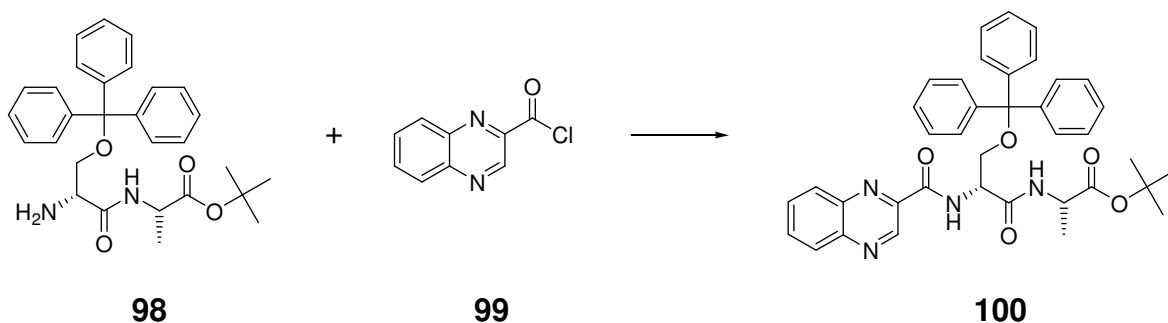
säulenchromatographischen (9/1 DCM/MeOH) und einer flashchromatographischen (DCM) Aufreinigung lag jedoch bei nur ca. 61 %. Die Kupplung unter Verwendung von 1.5 Äq. HATU, 0.1 Äq. HOAt und 3 Äq. DIPEA mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) verlief nahezu quantitativ.

4.3.2.3 Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu



Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe verlief sowohl mit 6% (w/v) Piperazin in DCM und säulenchromatographischer Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) als auch mit 20% (w/v) Diethylamin in DCM und flashchromatographischer Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) nahezu quantitativ.

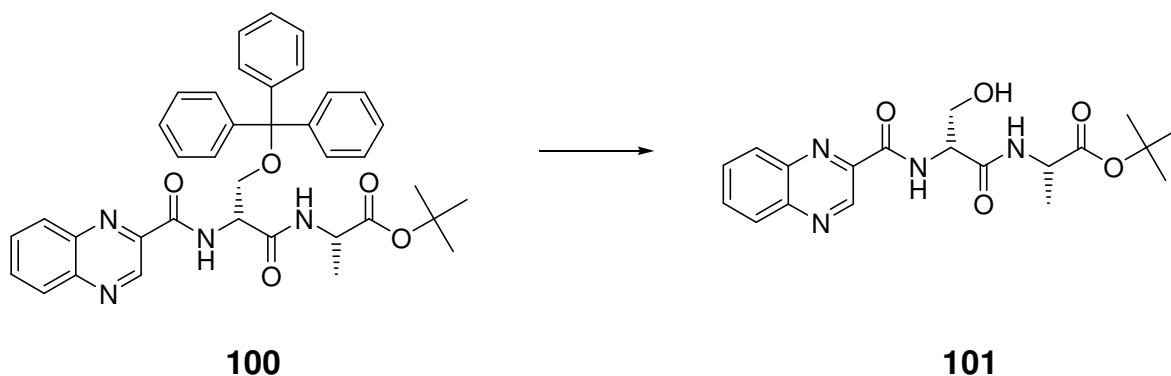
4.3.2.4 Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu



Die Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu erfolgte durch Reaktion von **98** mit 1.1 Äq. Chinoxaloylchlorid und 2.2 Äq. Triethylamin in DCM. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels MALDI-ToF-MS beobachtet, nach vollständigem Umsatz wurde das

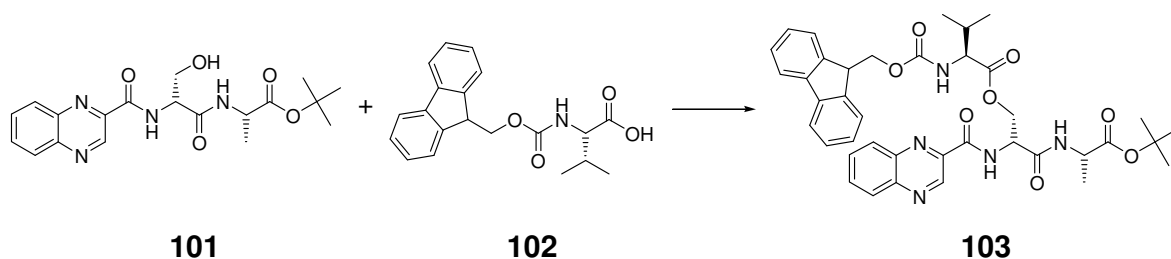
Reaktionsgemisch eingengt und ohne Aufreinigung als Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

4.3.2.5 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu

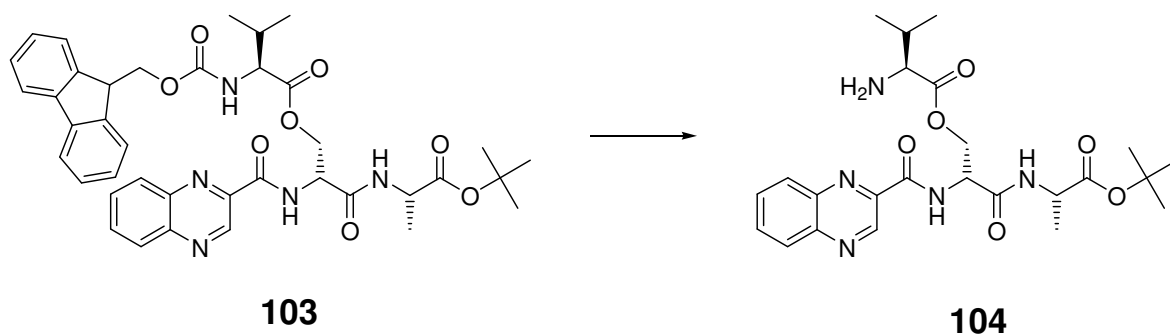


Die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe erfolgte mit einer Lösung von 0.5% (v/v) TFA in DCM. Nach 4 Tagen war die Reaktion vollständig und das Produkt wurde flashchromatographisch aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH). Die Ausbeute über 2 Stufen lag bei über 98%, damit können beide Reaktionen als quantitativ betrachtet werden. Eine Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte nur eine Ausbeute von etwa 40%, und eine Verwendung von 1% (v/v) TFA in DCM verkürzte die Reaktionsdauer auf ca. 4h, jedoch verringerte sich die Ausbeute auf 23%. Der Grund hierfür dürfte eine gewisse Säurelabilität der Bindung zur Chinoxalineinheit sein.

4.3.2.6 Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala-O^tBu

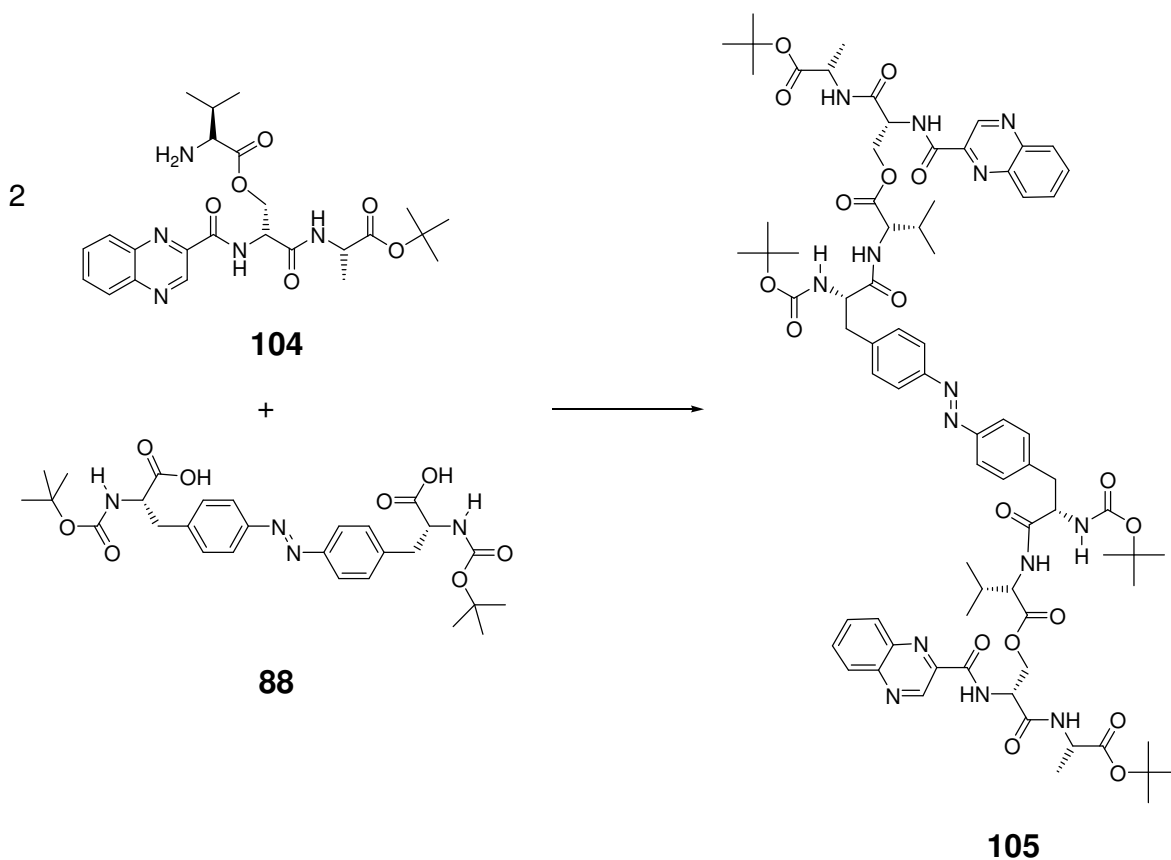


Die Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala-O^tBu erfolgte basenkatalysiert in Pyridin. Hierzu wurden **101** und 3 Äq. **102** in Pyridin gelöst, auf 0°C gekühlt und 3 Äq. DCC hinzugegeben. Nach 4h Rühren bei 0° wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, aufgearbeitet und mit HPLC aufgereinigt, die Ausbeute betrug 34%.

4.3.2.7 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu

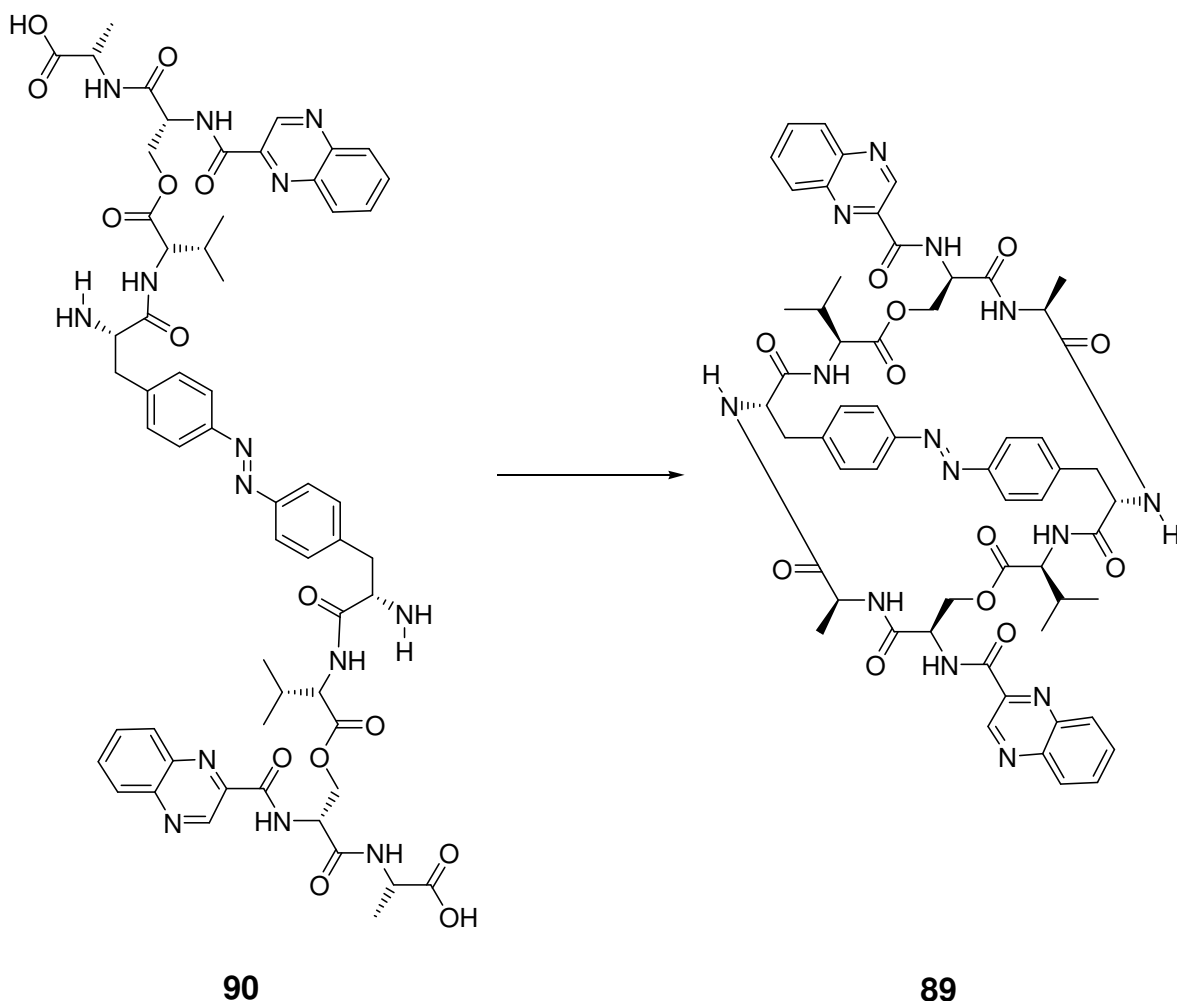
Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erwies sich als problematisch, da als Nebenreaktion eine basenkatalysierte Esterspaltung stattfinden kann. Ein erster Versuch mit 6% Piperidin in DCM führte nach 3h zu einer Ausbeute von 5% des gewünschten Produktes. Die Reaktion mit 20% Diethylamin in DCM ergab ein Produktgemisch, das neben dem gewünschten Produkt **104** auch noch das Produkt der Esterspaltung der Dipeptidbindung, **101**, enthielt. Um das Gemisch nicht verwerfen zu müssen, wurde das Rohprodukt dieses Versuches zur Abspaltung der Schutzgruppe mit einer Lösung von 7% Piperidin und 2% DBU in DMF versetzt und 20h geschüttelt. Nach flashchromatographischer Aufreinigung konnte **101** erneut in der vorausgehenden Reaktion eingesetzt werden. Ein weiterer Versuch mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF führte zu einer Ausbeute von nur 26% **104**. Die Abspaltung der Schutzgruppe nur mit 2% DBU in DMF war nicht möglich. Auch Versuche, die Schutzgruppe mittels TBAF abzuspalten, blieben erfolglos. Weder in THF noch in DMF führte eine Reaktion mit 6 Äquivalenten TBAF und 3 Äquivalenten Thioanisol zum gewünschten Produkt, auch eine zusätzliche Zugabe von DBU zum Reaktionsansatz in DMF änderte daran nichts. Eine zusätzliche Zugabe von 2% Piperidin und 2% DBU zu den Ansätzen führte zu einer Ausbeute von 29% **104**. Auch die Abspaltung mit *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethylpolystyrol Harz mit DBU in DCM brachte kaum Umsatz des Produktes. Letztendlich führte die Umsetzung für 4h mit 6% Piperazin in DCM zu der besten Ausbeute an reinem Produkt. Nach wiederholter chromatographischer Reinigung (Flashchromatographie 25/1 DCM/MeOH, Säulenchromatographie 5/1 DCM/MeOH) konnten 66% **104** isoliert werden.

4.3.2.8 Kupplung von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu an 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin



Die Kupplung erfolgte mittels einer Spritzenpumpe unter Pseudo-Hochverdünnung.^[544] Im Rundkolben wurde Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu und DIPEA in DMF vorgelegt. Aus der einen Spritze wurde 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin, aus der anderen HATU in DMF hinzugegeben. Um unnötige Substanzverluste durch chromatographische Aufreinigung zu vermeiden wurde das Rohprodukt für die nächste Stufe eingesetzt.

4.3.2.10 Synthese des AzoTANDEM



Die Cyclisierung erfolgte unter Pseudohochverdünnung mit Hilfe einer Spritzenpumpe, um Polymerisierung des uncyclisierten AzoTANDEM zu verhindern.^[544] Im Kolben wurde DIPEA in DMF vorgelegt, aus der einen Spritze wurden **90** in DMF, aus der anderen wurden HATU und HOAt in DMF hinzugegeben. Die Reinigung erfolgte mit HPLC, es wurde eine Ausbeute von 34% erreicht.

4.3.3 Spektroskopische Untersuchung

4.3.3.1 Einleitung

Die Azobenzoleinheit des AzoTANDEMs ermöglicht eine Photoschaltung des Cyclodepsipeptids, die UV-absorptionsspektroskopisch beobachtet werden kann. Das

UV-Absorptionsspektrum des unsubstituierten *trans*-Azobenzols zeigt 2 Maxima, einen intensiven, breiten Peak des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang bei 316 nm und einen sehr viel schwächeren Peak bei 444 nm, der vom $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang hervorgerufen wird. Das UV-Absorptionsspektrum des *cis*-Azobenzols zeigt ein Maximum bei 437 nm, hervorgerufen durch den $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang und einen breiten Peak mit einem Maximum bei 247 nm mit einer sichtbaren Schulter bei 270 nm. Diese werden durch $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergänge verschiedener Symmetrien hervorgerufen.^[545] Die Lage der Elektronenübergänge in substituierten Azobenzolderivaten verändert sich in Abhängigkeit der Substituenten. Im Fall der *ortho*-Substitution eines *trans*-Azobenzolderivates ist der $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang deutlich Rot-verschoben, der $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang Blau-verschoben, *para*-Alkylsubstituenten rufen einen gegenteiligen Effekt hervor. Beim *ortho*-substituierten *cis*-Azobenzolderivat ist der $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang Rot-verschoben, während der $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang im Gegensatz zum *trans*-Isomer Rot-verschoben ist. Die Rot-Verschiebung des $n \rightarrow \pi^*$ wird auf eine abstoßende Wechselwirkung zwischen dem *ortho*-Substituenten und dem freien Elektronenpaar des entfernteren Stickstoffs in der Diazen-Einheit zurück geführt, der Effekt wird bei größeren Substituenten teilweise durch eine Verdrehung der Phenylringe zueinander verringert. Die hierdurch hervorgerufene verringerte Konjugation erklärt die Blau-Verschiebung. Im Falle eines *para*-substituierten Azobenzolderivates ist die Verschiebung allein auf elektronische Effekte zurückzuführen, während beim *ortho*-substituierten Derivat hauptsächlich strukturelle Veränderungen für die Verschiebung verantwortlich sind.^[545]

4.3.3.2 UV-Spektroskopische Untersuchung der einzelnen Proben

Die Azobenzoleinheit des AzoTANDEM_s läßt sich mit Licht bei einer Wellenlänge von 360 nm vom *trans*- zum *cis*-Isomer schalten. Die Rückkehr zum *trans*-Isomer kann einerseits mit Licht bei ca. 450 nm oder thermisch erfolgen. Die Schaltung bei 360 nm wurde in einem Photoreaktor durchgeführt, die photochemische Rückschaltung mittels Sonnenlicht. Zur thermischen Rückschaltung wurden die Proben unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur (ca. 20°C) aufbewahrt.

Untersucht wurde das Spektrum im thermischen Gleichgewicht, anschließend die Photoschaltung zum *cis*-Isomer und die Rückschaltung mittels Sonnenlicht zum *trans*-Isomer. Um die Reproduzierbarkeit zu zeigen, wurden die Messungen nochmals

wiederholt, wobei in kürzeren Abständen Spektren aufgenommen werden sollen, um die Geschwindigkeit der Schaltung zu beobachten. Um die thermische Rückschaltung zu untersuchen, wurden nochmals alle Proben bestrahlt und unter Lichtausschluß aufbewahrt. Es wurden Messungen mit AzoTANDEM, 4,4'-Diazendiylidi(*N*-*tert*-butoxy-carbonyl)phenylalanin und Chinoxaloylchlorid durchgeführt. Da eine nachträgliche Subtraktion eines Hintergrundes mit der vorhandenen Software im UV-Betrieb nicht möglich ist, wurden bei allen Messungen auch Spektren des Lösungsmittels, in diesem Fall DMSO, aufgenommen. Es war keine ausreichende Anzahl an identischen Küvetten für alle Messungen vorhanden, deswegen wurde das AzoTANDEM in einer 0,1 cm Küvette gemessen, und die anderen beiden Proben in 1 cm Küvetten.

Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet, da sich das AzoTANDEM nur in DMSO und DMF löst, und DMSO aufgrund der höheren Photostabilität geeigneter erscheint. Um für beide Küvetten einen Hintergrund zu haben, wurde das DMSO sowohl in 0.1 cm als auch in 1 cm Küvetten gemessen. Alle Proben wurden durchgehend identisch gehandhabt, und außerhalb der Bestrahlungen unter Lichtausschluß aufbewahrt. Für die Messung wurde eine Konzentration von 0,01 mmol / L für alle Proben gewählt.

Aufgrund der nicht vorhandenen Löslichkeit des AzoTANDEMs in geeigneten Lösungsmitteln konnten keine CD-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden.

4.3.3.2.1 UV-Spektren des Lösungsmittels DMSO

Alle Spektren wurden in DMSO angefertigt. Die Spektren des DMSO ändern sich während der Messungen jedoch innerhalb der Messgenauigkeit nicht, so daß es ausreicht, sich einmal das Spektrum des DMSO zu vergegenwärtigen, und es bei der Betrachtung der Spektren im Hinterkopf zu behalten. In der 1 cm-Küvette ist eine starke Absorption bei 270 nm zu erkennen (Abb. **83**, **84**), in der 0.1-cm Küvette ist die Intensität dieser Bande viel geringer (Abb. **81**, **82**). Diese Bande des DMSO liegt jedoch nicht in dem für die Photoschaltung interessanten Bereich. Auch jenseits der 500 nm scheint sich das Spektrum zu verändern, jedoch ist kein Trend bei den Meßergebnissen zu erkennen. Da auch dieser Bereich für die Photoschaltung irrelevant ist, kann DMSO als Lösungsmittel verwendet werden.

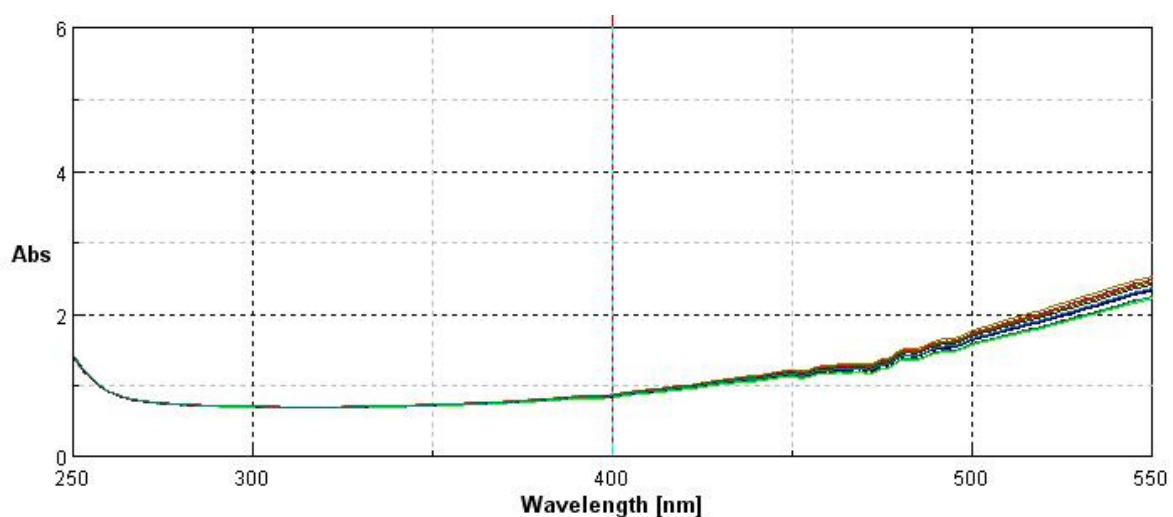


Abb. 81: Abbildung aller aufgenommenen UV-Absorptionsspektren von DMSO in der 0.1 cm Küvette.

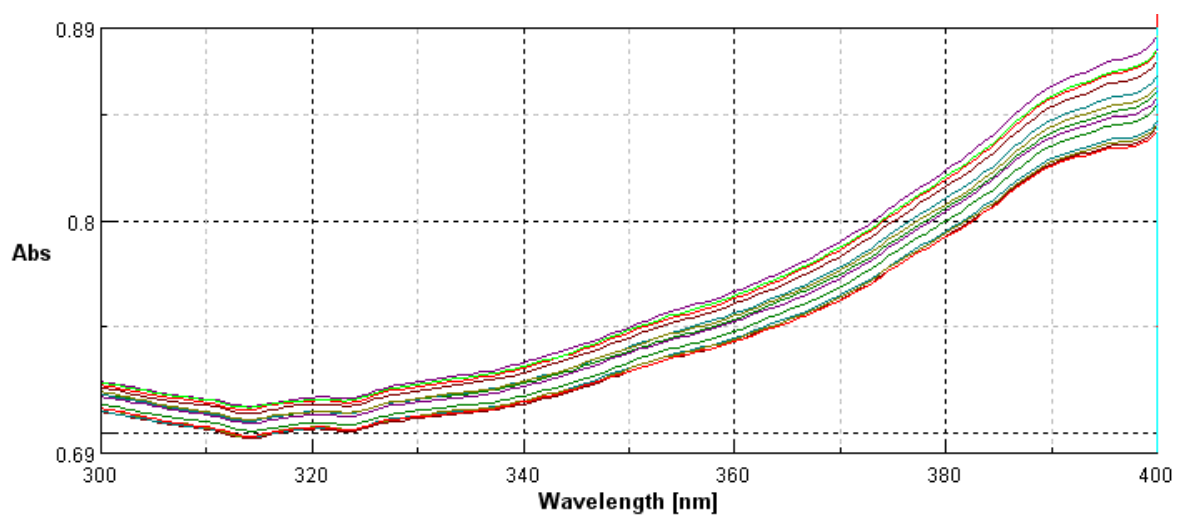


Abb. 82: Vergrößerung des entscheidenden Bereichs aller aufgenommenen UV-Absorptionsspektren von DMSO in der 0.1 cm Küvette.

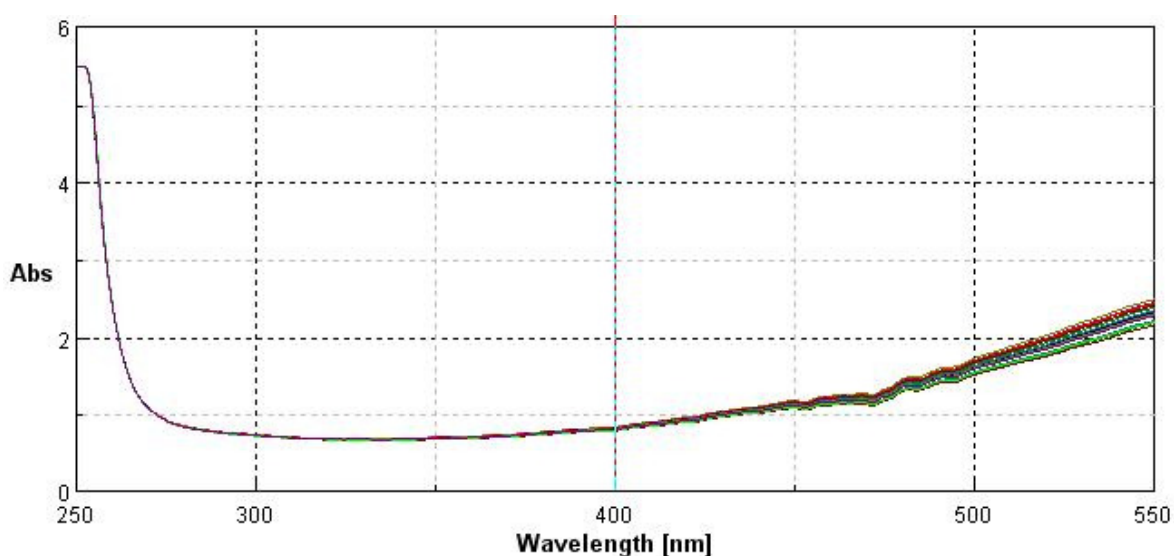


Abb. 83: Abbildung aller aufgenommenen UV-Absorptionsspektren von DMSO in der 1 cm Küvette.

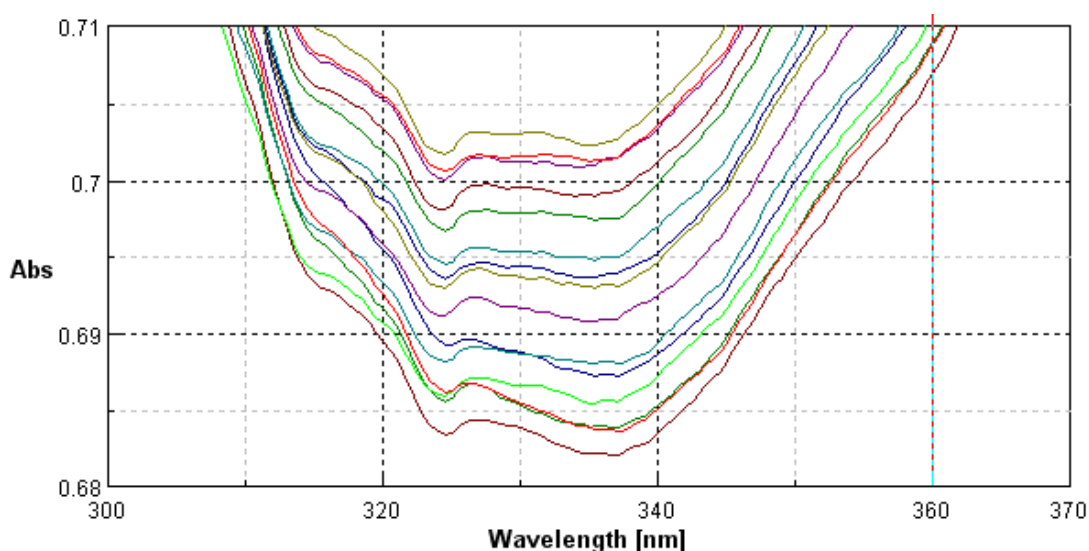


Abb. 84: Vergrößerung des entscheidenden Bereichs aller aufgenommenen UV-Absorptionsspektren von DMSO in der 1 cm Küvette.

4.3.3.2.2 UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanins

Das UV-Spektrum des *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin zeigt ein Maximum bei 337 nm, das dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang zugeordnet werden kann, und ein viel Geringeres bei 449 nm, hervorgerufen durch den $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang (Abb. 85). Diese Verschiebungen sind im Einklang mit der Theorie,^[545] wobei die Rotverschiebung des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergangs sehr stark ausfällt.

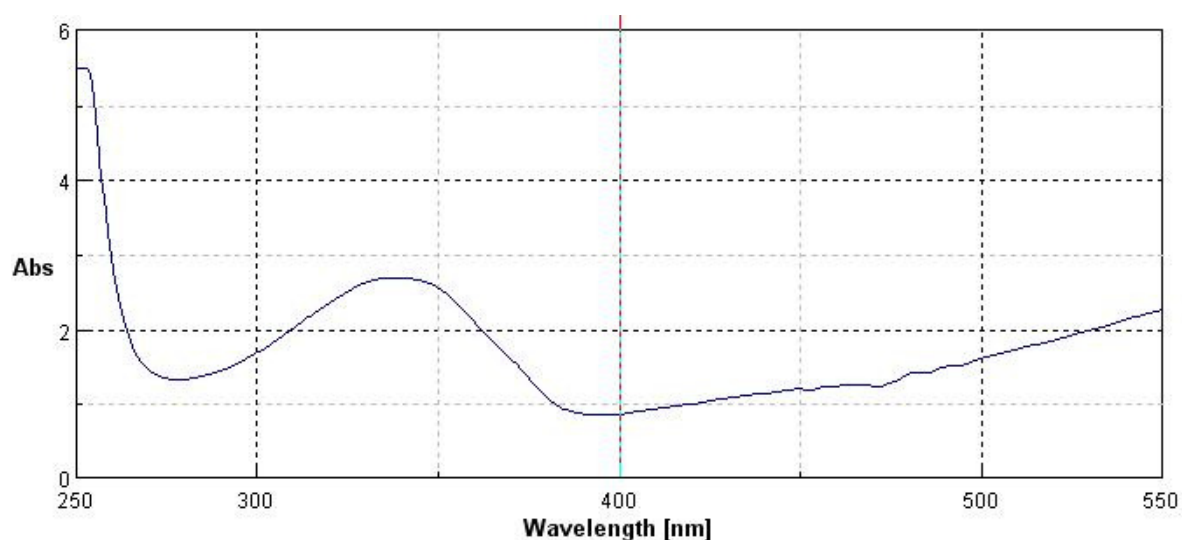


Abb. 85: UV-Spektrum des *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im thermischen Gleichgewicht in DMSO in der 1 cm Küvette.

Das UV-Spektrum des *cis*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin zeigt ein schwaches Maximum bei 438 nm, hervorgerufen durch den $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang. Das Maximum und die Schulter des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergangs wird vom Signal des DMSO überlagert, und ist deswegen nicht sichtbar (Abb. 86).

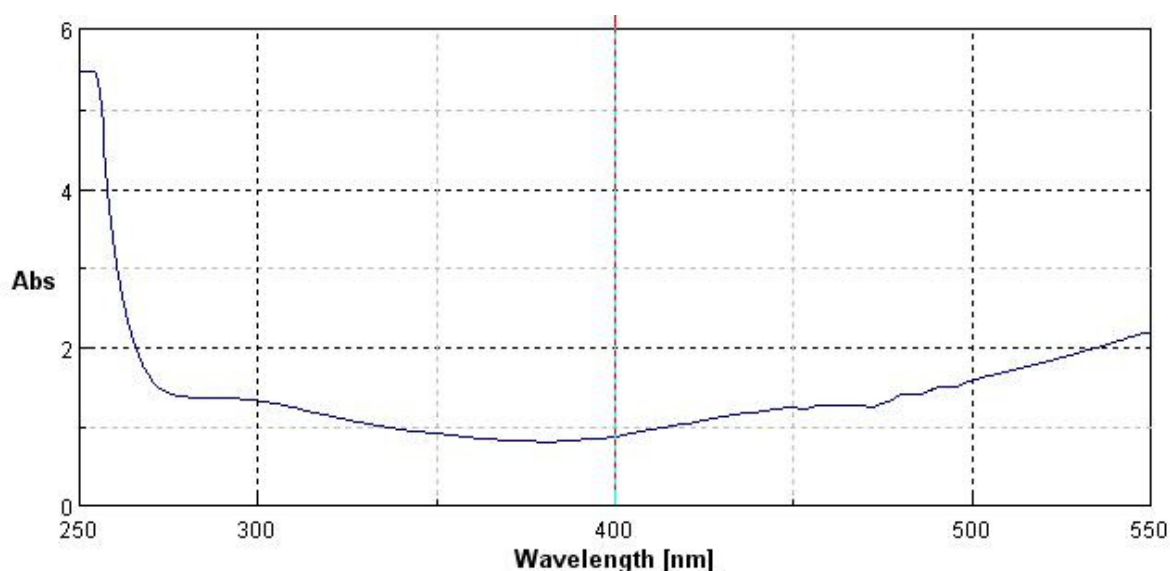


Abb. 86: UV-Spektrum des *cis*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin nach 30minütiger Bestrahlung im Photoreaktor in DMSO in der 1 cm Küvette.

4.3.3.2.3 UV-Spektrum des Chinoxaloylchlorids

Das UV-Spektrum des Chinoxaloylchlorids zeigt eine Absorptionsbande mit einem Maximum bei 316 nm, die dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang zugeordnet wird, mit einer Schulter bei 328 nm, die dem $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang entspricht (Abb. 87). Der $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang ist im Vergleich zum Chinoxalin, wo dieser bei 315 nm liegt,^[546] nur leicht verschoben, innerhalb der Meßgenauigkeit des Gerätes. Der $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang ist stark verschoben, im Chinoxalin liegt er bei 339 nm.^[547]

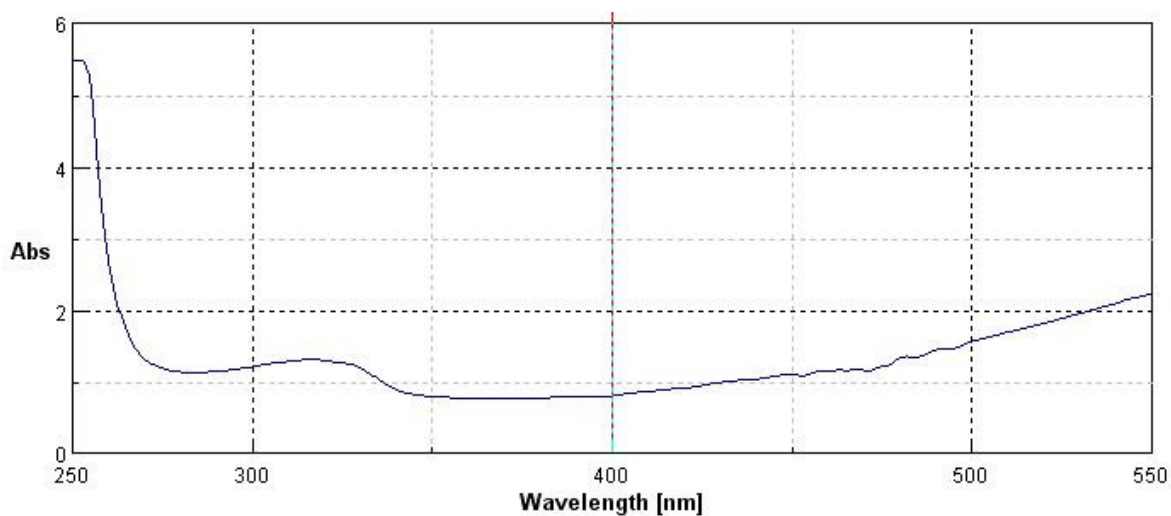


Abb. 87: UV-Spektrum des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette.

4.3.2.2.4 UV-Spektrum des AzoTANDEMs

Das UV-Spektrum des AzoTANDEMs im thermischen Gleichgewicht zeigt ein Maximum bei 330 nm, eines bei 450 nm und eine Schulter bei 317 nm (Abb. 88).

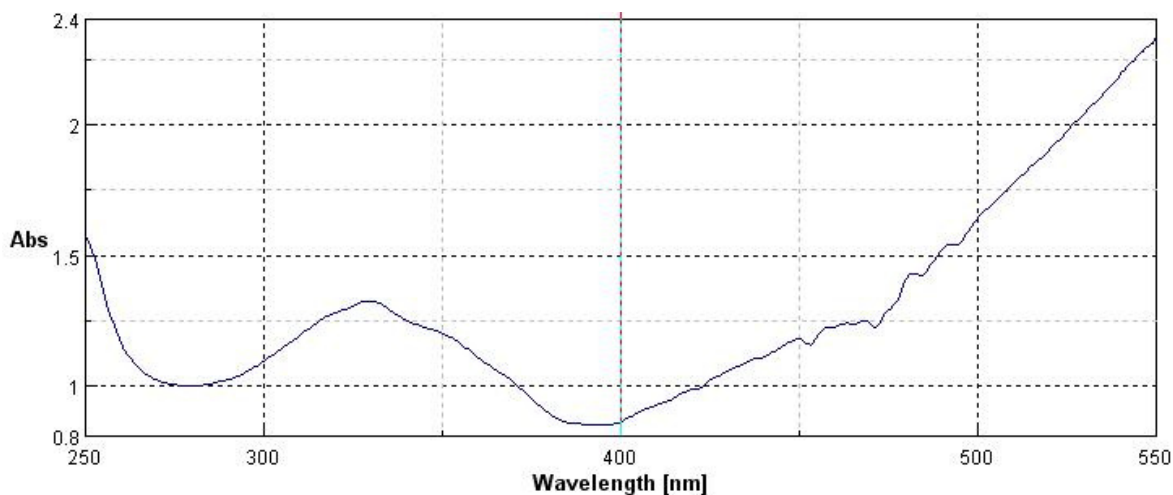


Abb. 88: UV-Spektrum des *trans*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette.

Das Maximum bei 330 nm kann dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang des *trans*-4,4'-Diazendiylyphenylalanin zugeordnet werden. Die Verschiebung im Vergleich zum Azobenzol fällt hier nicht so stark aus wie im *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin. Dies läßt sich mit der stärkeren Verdrehung der Phenylringe zueinander erklären, die für einen Ringschluß im sterisch gehinderten Molekül nötig ist. Sie führt zu einer Blau-Verschiebung im Vergleich zum *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin.^[545] Die Intensität dieser Bande ist im Vergleich zum *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin viel geringer, sie beträgt nur ungefähr ein Viertel (Abb. 89). Dies bedeutet eine längere Lebensdauer für den angeregten Zustand des AzoTANDEMs im Vergleich zum *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin, was sich auch bei den Photoschaltungs-Experimenten zeigt.^[548]

Ein weiteres Maximum liegt bei 450 nm, hervorgerufen durch den $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang. Dieser ist im Vergleich zum *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin kaum verschoben, auch die Intensität bleibt gleich.

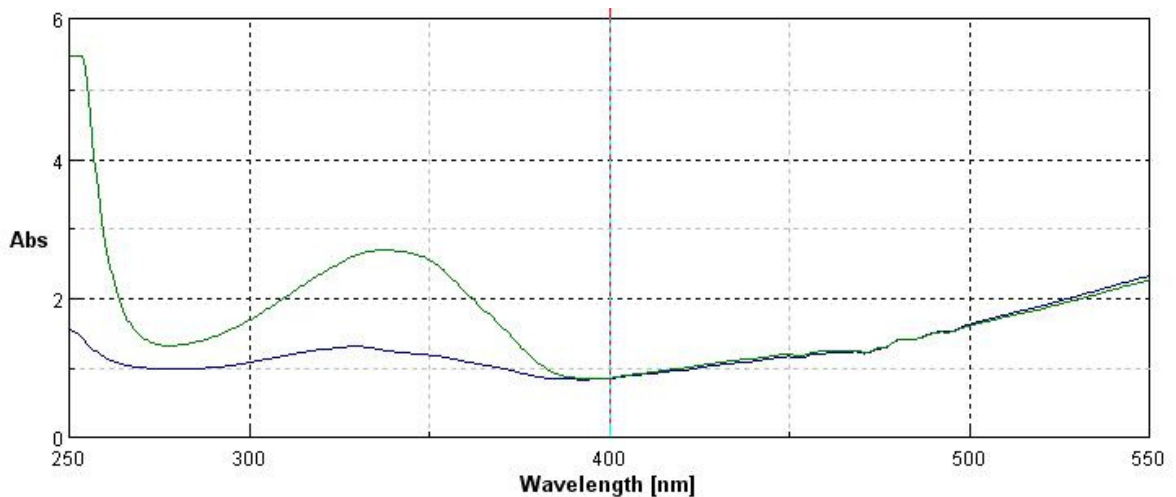


Abb. 89: Vergleich der UV-Spektren des *trans*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette (blau) und des *trans*-4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin in DMSO in der 1 cm Küvette (grün).

Die Schulter bei 317 nm läßt sich dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der beiden Chinoxalin-Einheiten zuordnen, und ist im Vergleich zum Chinoxaloylchlorid kaum verschoben. Auch die Intensität ist sehr ähnlich (Abb. 90).

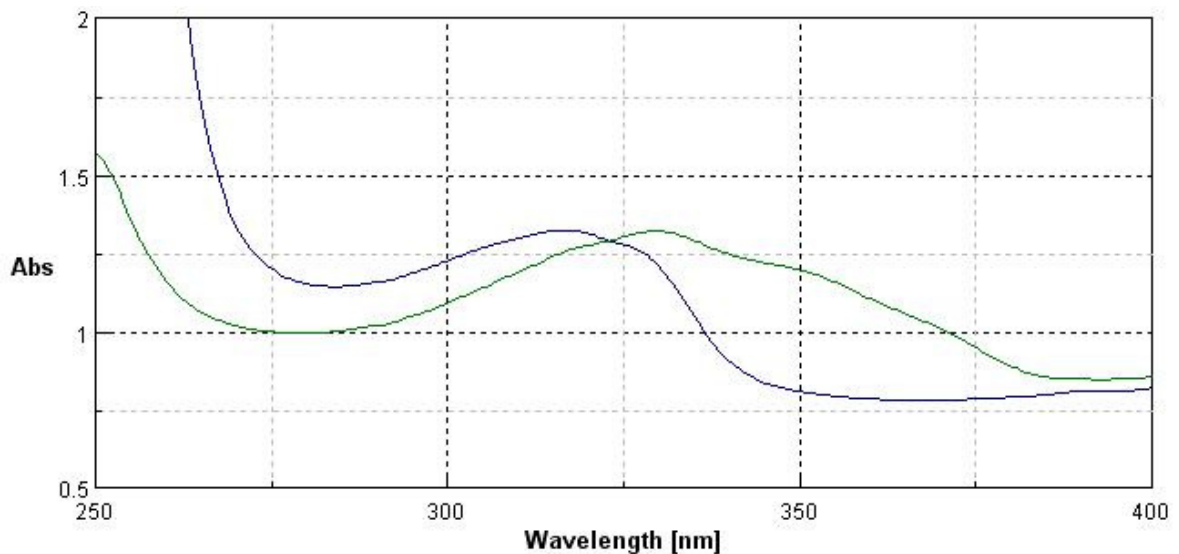


Abb. 90: Vergleich der UV-Spektren des *trans*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette (grün) und des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette (blau).

Das UV-Spektrum des AzoTANDEMs nach der Photoschaltung zum *cis*-Isomer nach 30 min im Photoreaktor zeigt ein Maximum bei 328 nm, eine Schulter bei 318 nm und eine bei 437 nm (Abb. 91, 92).

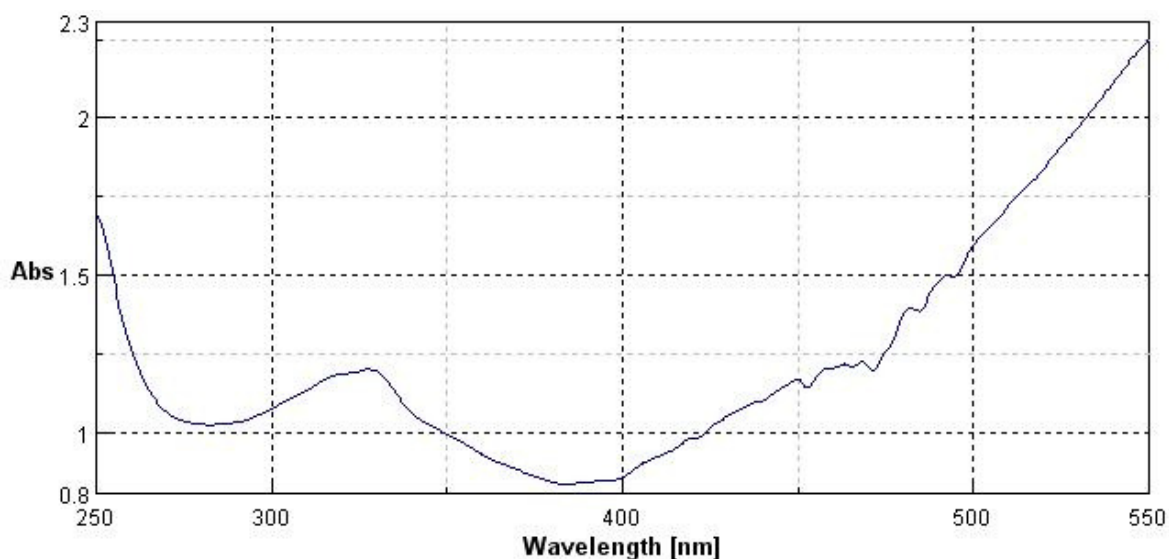


Abb. 91: UV-Spektrum des *cis*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette.

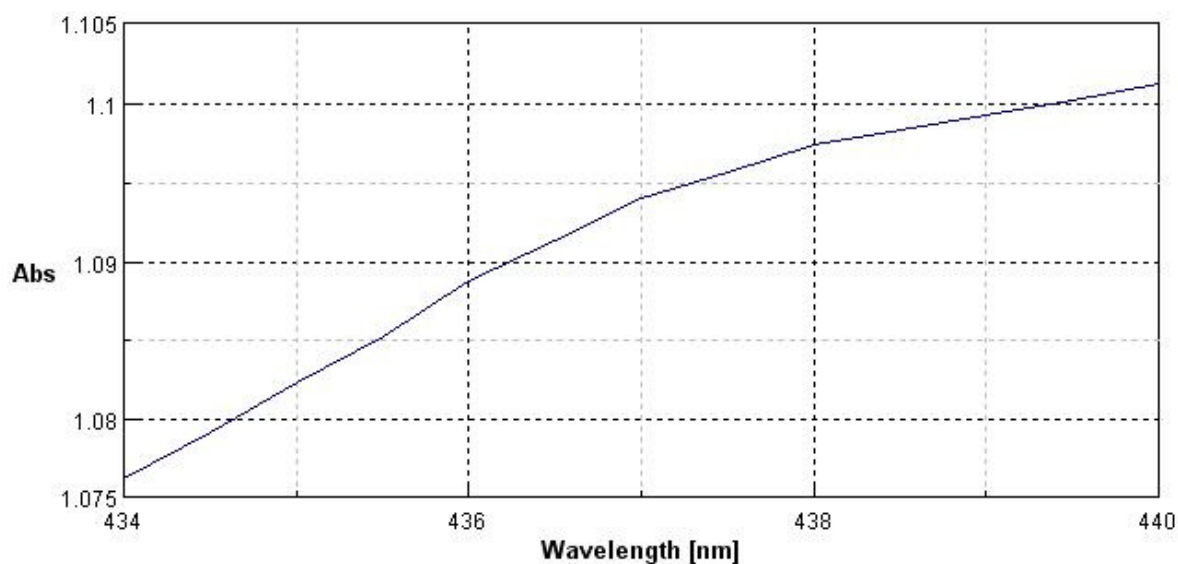


Abb. 92: Vergrößerung des UV-Spektrum des *cis*-Isomers von AzoTANDEM in DMSO in der 0.1 cm Küvette.

Die Schulter bei 437 nm läßt sich dem $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang des *cis*-4,4'-Diazendiylphenylalanin zuordnen (Abb. 93). Das Maximum und die Schulter des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergangs wird vom Signal des DMSO überlagert, und ist deswegen nicht sichtbar.

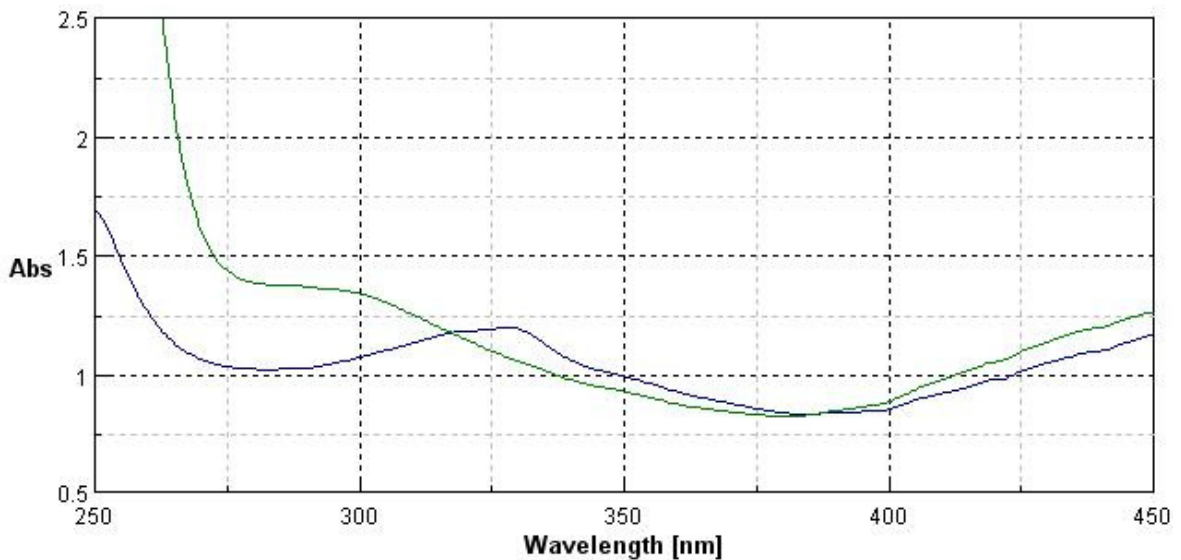


Abb. 93: Vergleich der UV-Spektren des *cis*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette (blau) und des *cis*-4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin in DMSO in der 1 cm Küvette (grün).

Die Schulter bei 318 nm läßt sich dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der beiden Chinoxalin-Einheiten zuordnen, und ist im Vergleich zum Chinoxaloylchlorid kaum verschoben. Auch die Intensität ist sehr ähnlich (Abb. 94).

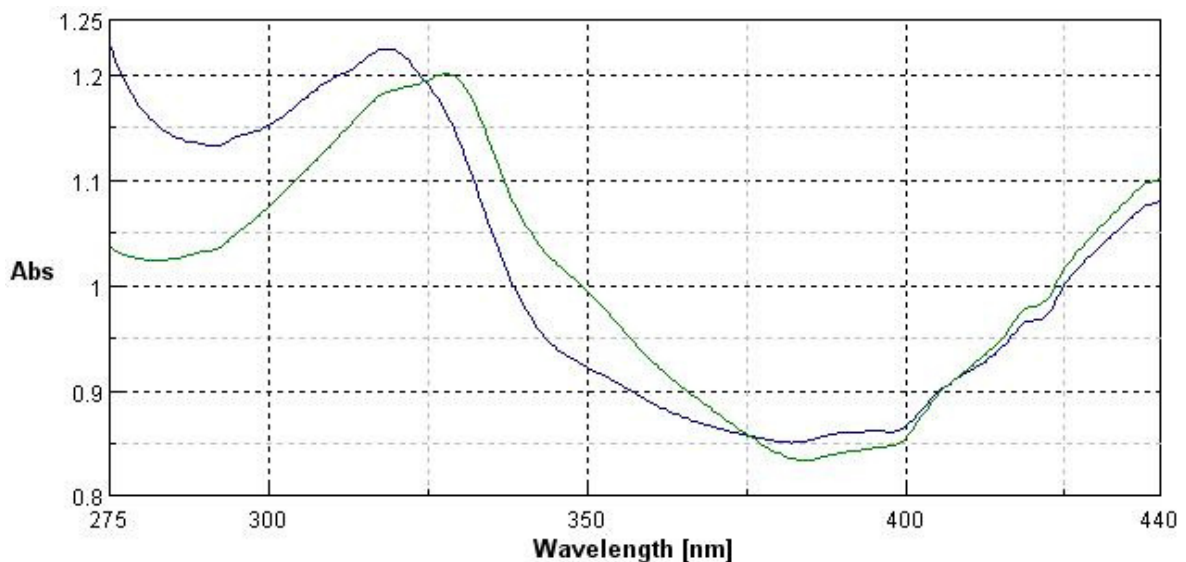


Abb. 94: Vergleich der UV-Spektren des *cis*-Isomers des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette (grün) und des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette (blau).

Das Maximum bei 328 nm deutet darauf hin, daß das AzoTANDEM nicht zu 100% in der *cis*-Form vorliegt, sondern zum Teil noch das *trans*-Isomer vorliegt. Dann könnte das Maximum mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang des *trans*-4,4'-Diazendiylphenylalanin erklärt werden.

4.3.3.3 Erste Photoschaltung mittels Photoreaktor *trans*-Isomer \rightarrow *cis*-Isomer

Die erste Photoschaltung erfolgte aus dem thermischen Gleichgewicht nach der Synthese und anschließender Aufreinigung. Die Messungen erfolgen zu Beginn (0 min), und dann nach 5, 10 und 30 min.

Die Schaltung vom *trans*-Isomer zum *cis*-Isomer ist sowohl beim 4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin (Abb. 94), als auch beim AzoTANDEM deutlich sichtbar (Abb. 95). Beim AzoTANDEM ist eine Abnahme der Intensität des Maximums bei 328 nm zu beobachten, jedoch verschwindet diese Bande nicht vollständig, so daß die Annahme, daß das Azotandem nach der Bestrahlung nicht vollständig als *cis*-Isomer vorliegt, berechtigt erscheint.

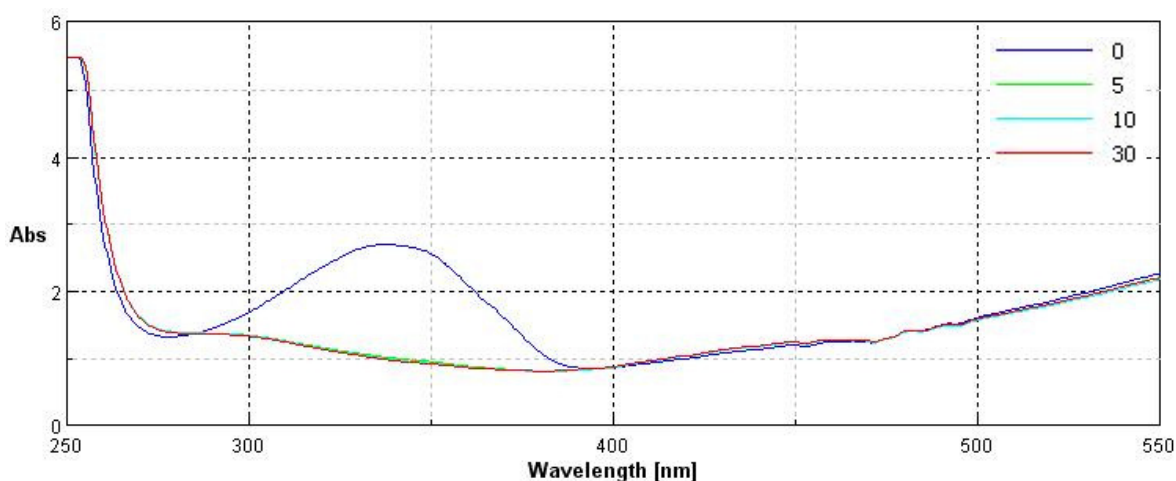


Abb. 95: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der ersten Photoschaltung im Photoreaktor nach 0, 5, 10 und 30 min.

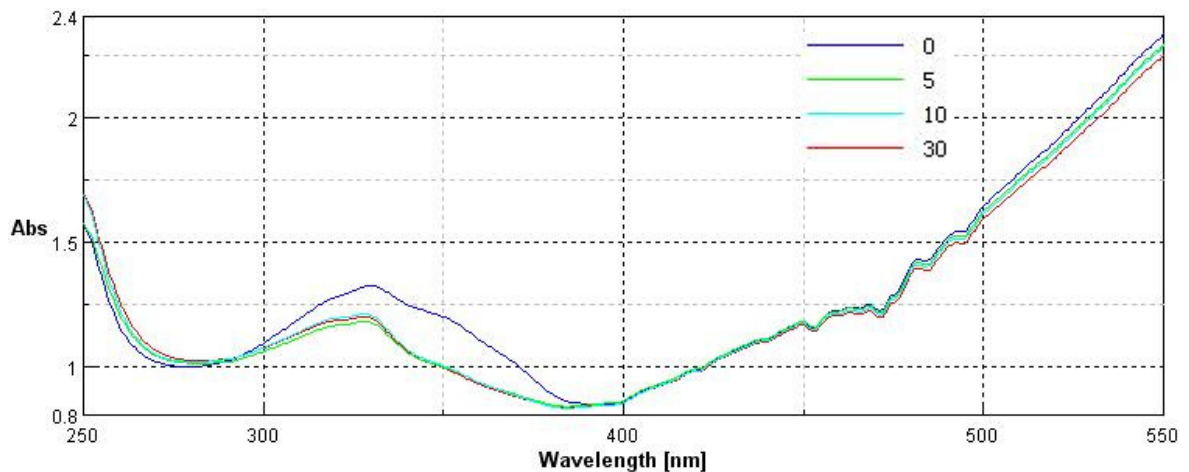


Abb. 96: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der ersten Photoschaltung im Photoreaktor nach 0, 5, 10 und 30 min.

Der Vergleich der Spektren des Chinoxaloylchlorids zeigt eine Veränderung zwischen der ersten Messung und zweiten Messung (Abb. 97), danach ändert sich das Spektrum nicht mehr, was auf eine Art Photobleichen der Chinoxalineinheit hindeutet.

Es zeigt sich, daß die Abstände zwischen den Messungen zu groß gewählt sind, da sich die Spektren der Messungen nach 5, 10 und 30 min im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht unterscheiden.

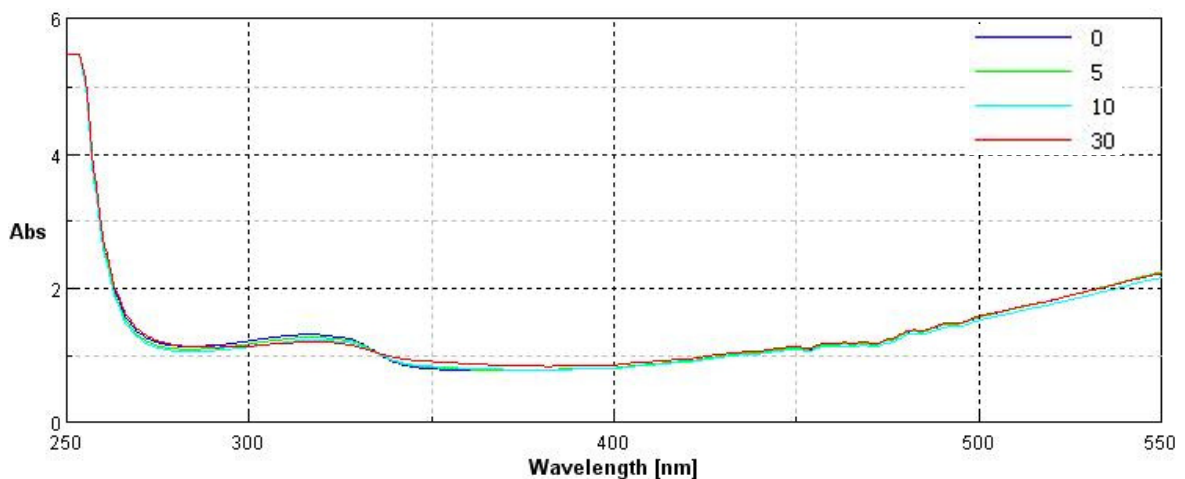


Abb. 97: Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der ersten Photoschaltung im Photoreaktor nach 0, 5, 10 und 30 min.

4.3.3.4 Zweite Photoschaltung mittels Sonnenlicht *cis*-Isomer → *trans*-Isomer

Mit der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht wurde die 4,4'-Diazendiyphenylalanin-Einheit vom *cis*-Isomer zum *trans*-Isomer geschaltet. Zu diesem Zweck wurden die Proben zuerst 20 min, nach der ersten Messung nochmals 40 min dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt.

Auch hier ist die Schaltung vom *cis*-Isomer zum *trans*-Isomer sowohl beim 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin als auch beim AzoTANDEM deutlich sichtbar. Die Schaltung des 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin erreicht nicht das Ausgangsniveau im thermischen Gleichgewicht (Abb. 98, 99), nach 60 min Bestrahlung ist die Intensität am Maximum sogar etwas geringer als nach 20 min. Im Gegensatz dazu steigt die Intensität am Maximum beim AzoTANDEM über den Ausgangswert im thermischen Gleichgewicht, und ist nach 60 min höher als nach 20 min (Abb. 100, 101). Dies deutet darauf hin, daß die 4,4'-Diazendiyphenylalanin-Einheit im AzoTANDEM stärker gespannt ist, und die Schaltung vom *cis*-Isomer zum *trans*-Isomer gehindert ist. Auch die Tatsache, daß das AzoTANDEM im thermischen Gleichgewicht einem geringeren Teil in der *trans*-Form vorliegt als nach der Photoschaltung, deutet darauf hin, daß dessen Struktur einen Einfluß auf die Stabilität der Isomere hat, und das *trans*-Isomer im Vergleich zum 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin benachteiligt ist.

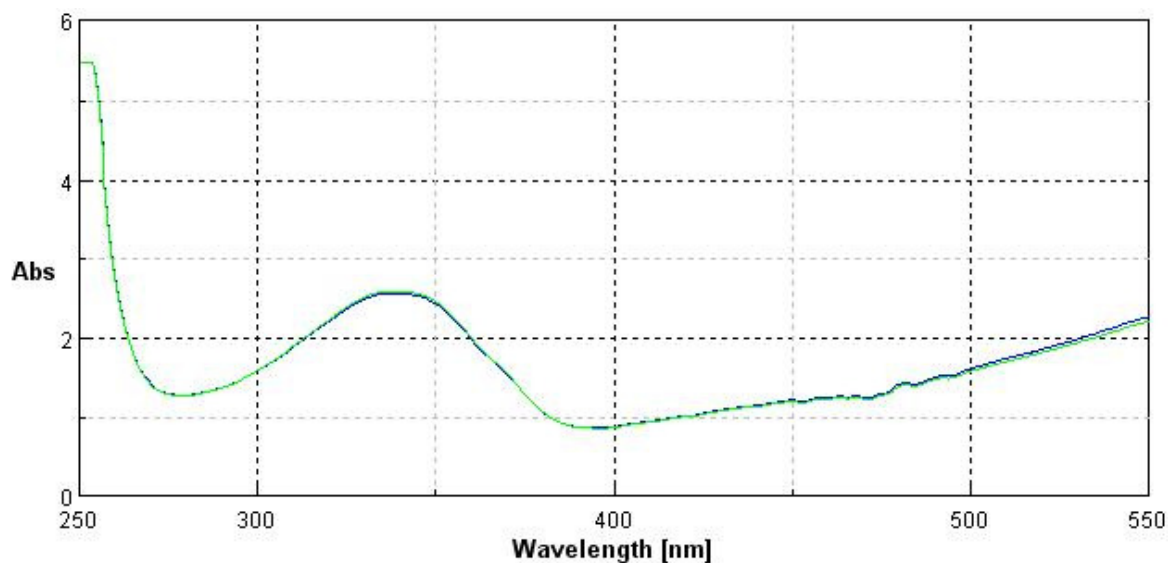


Abb.98: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht nach 20 min (grün) und 60 min (blau).

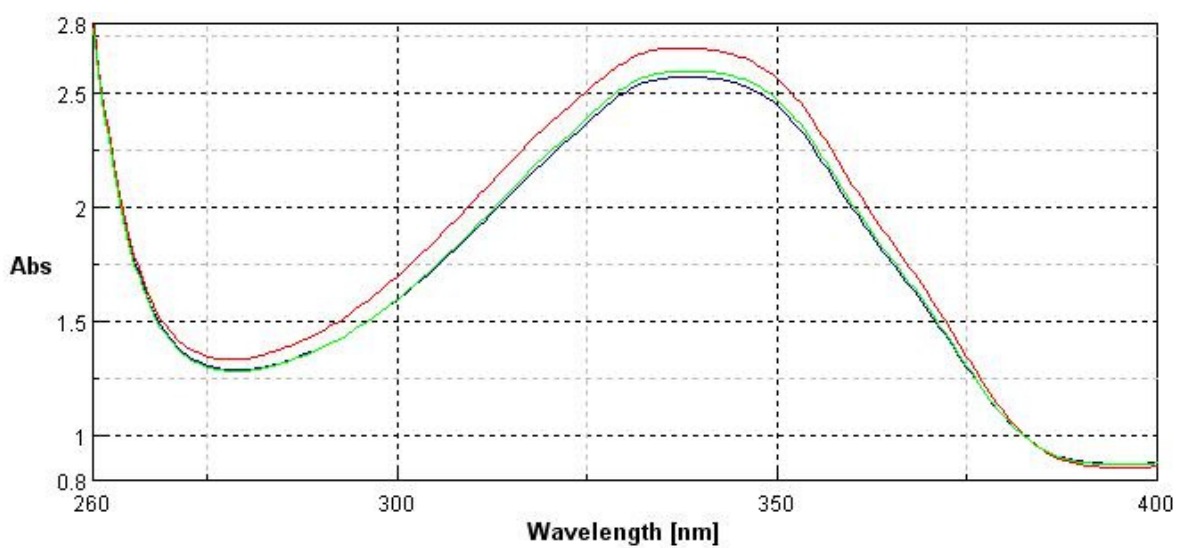


Abb.99: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht nach 20 min (grün) und 60 min (blau) und Vergleich mit dem Spektrum im thermischen Gleichgewicht vor der ersten Schaltung (rot).

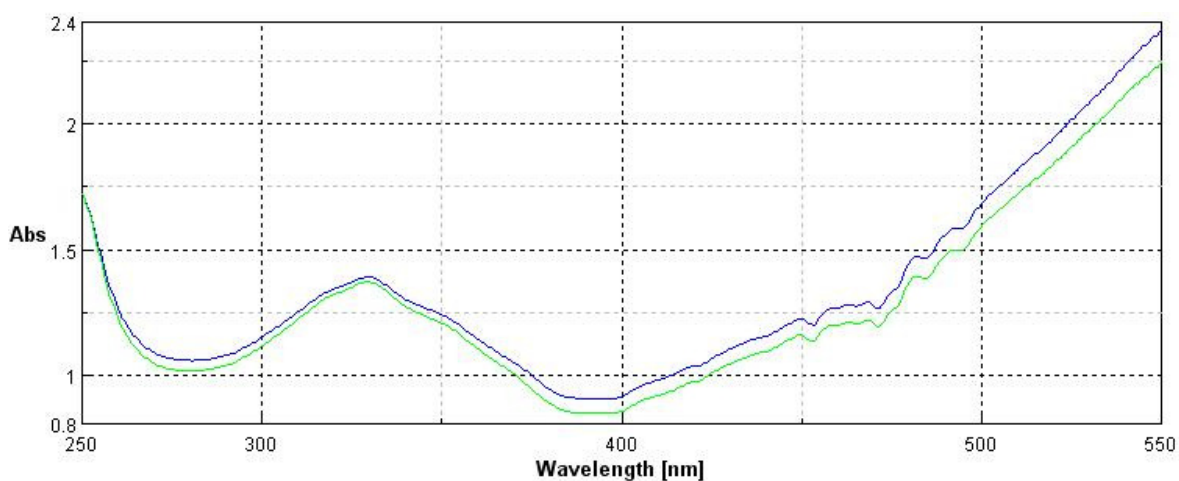


Abb. 100: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht nach 20 min (grün) und 60 min (blau).

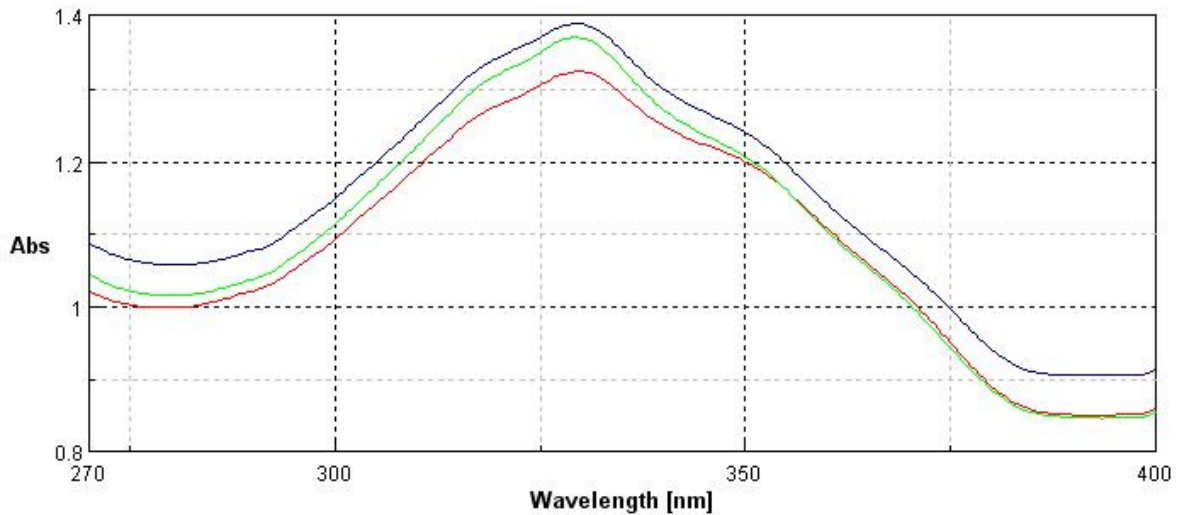


Abb. 101: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht nach 20 min (grün), 60 min (blau) und Vergleich mit dem Spektrum im thermischen Gleichgewicht vor der ersten Schaltung (rot).

Der Vergleich der Spektren des Chinoxaloylchlorids zeigt keine weitere Veränderung (Abb. 102).

Wie in der ersten Photoschaltung zeigt sich hier, daß die Abstände zwischen den Messungen zu groß gewählt sind, da sich die Maxima der Spektren der Messungen nach 20 und 60 min kaum unterscheiden, und dem Spektrum im thermischen Gleichgewicht bereits sehr ähnlich sind.

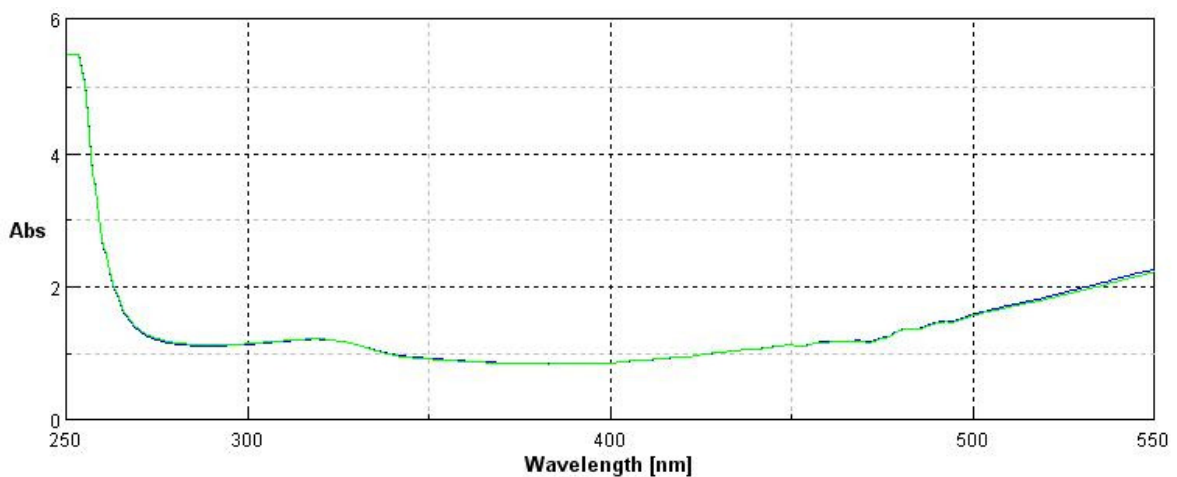


Abb. 102: Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der zweiten Photoschaltung im Sonnenlicht nach 20 min (grün) und 60 min (blau).

4.3.3.5 Dritte Photoschaltung mittels Photoreaktor *trans*-Isomer → *cis*-Isomer

Mit der dritten Photoschaltung sollte versucht werden, die Geschwindigkeit der Schaltung vom *trans*-Isomer zum *cis*-Isomer zu bestimmen. Die Messungen erfolgten nach 30, 60, 90, 150 und 300 Sekunden Bestrahlung im Photoreaktor.

Im Falle des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin ist zu erkennen, daß die Schaltung nach 30 s nahezu vollkommen erfolgt ist, die Spektren der Messungen danach sind im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch (Abb. 103).

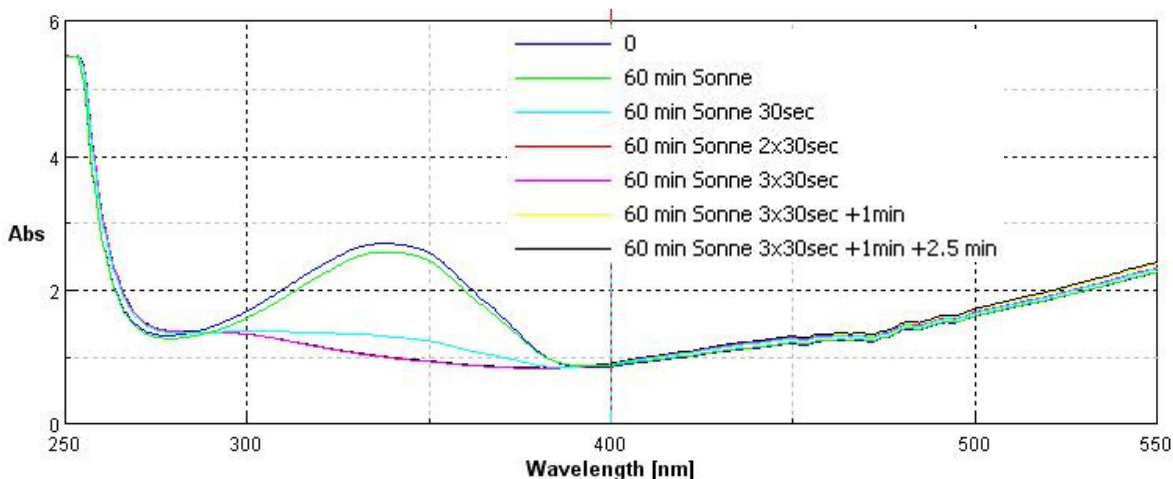


Abb. 103: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der dritten Photoschaltung im Photoreaktor mit Messungen nach 30, 60, 90, 150 und 300 Sekunden sowie den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht.

Die Photoschaltung des AzoTANDEM_s erfolgt sichtbar langsamer, erst nach 90 s sind die Spektren der dann erfolgten Messungen identisch. Auch hierin zeigt sich wieder, daß die Schaltung im sterisch gehinderten, stark gespannten System des AzoTANDEM_s langsamer erfolgt (Abb. 104).

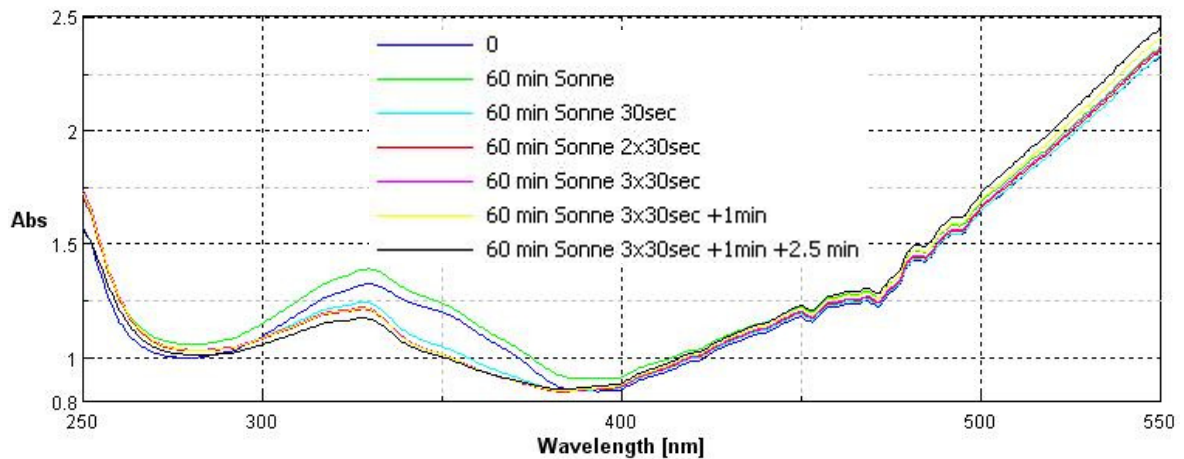


Abb. 104: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der dritten Photoschaltung im Photoreaktor mit Messungen nach 30, 60, 90, 150 und 300 Sekunden sowie den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht.

Das Spektrum des Chinoxaloylchlorids zeigt keine weitere Veränderung (Abb. 105).

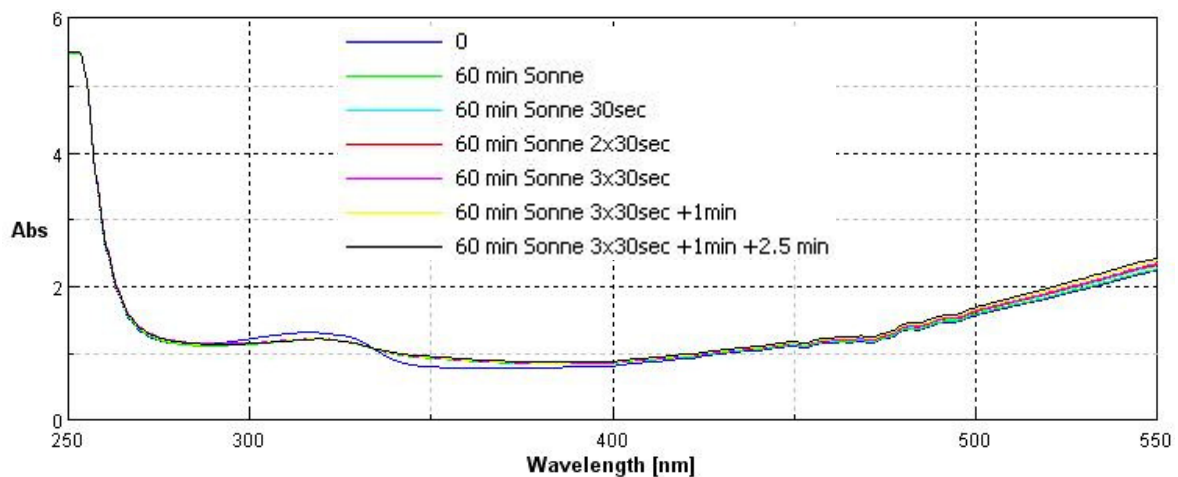


Abb. 105: Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der dritten Photoschaltung im Photoreaktor mit Messungen nach 30, 60, 90, 150 und 300 Sekunden sowie den Spektren im thermischen Gleichgewicht (0) und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht.

4.3.3.6 Vierte Photoschaltung mittels Sonnenlicht *cis*-Isomer → *trans*-Isomer

Diese Photoschaltung diente zur Untersuchung der Geschwindigkeit der Schaltung vom *cis*-Isomer zum *trans*-Isomer. Zu diesem Zwecke erfolgten die Messungen nach 30 und 90 Sekunden sowie nach 40 Minuten. Hier zeigte sich, daß die Zeit zwischen den Messungen noch zu lang gewählt worden ist, jedoch sind noch kürzere Bestrahlungszeiten an der

Sonne kaum reproduzierbar zu machen. Bereits nach 30 Sekunden hat das Maximum der Banden des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der *trans*-4,4'-Diazendiyphenylalanin-Einheit beim 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin ihr photochemisch erreichbares Maximum erreicht (Abb. 106, 107).

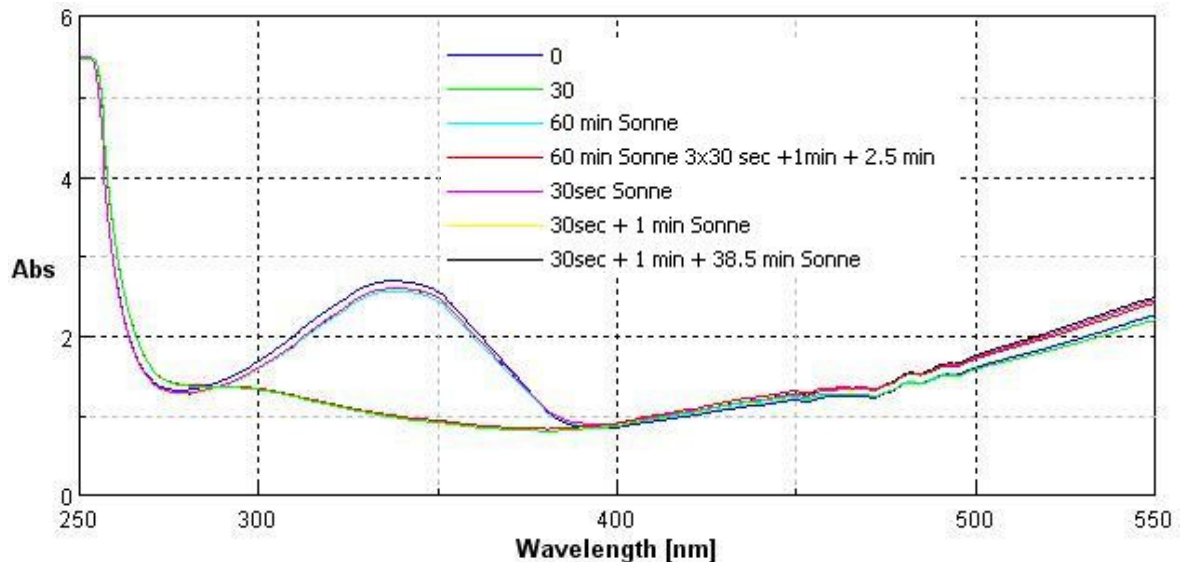


Abb. 106: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht mit Messungen nach 30 und 90 Sekunden sowie nach 40 Minuten und den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht. Als Ausgangsspektrum dient das Spektrum nach 300 Sekunden Bestrahlung im Photoreaktor.

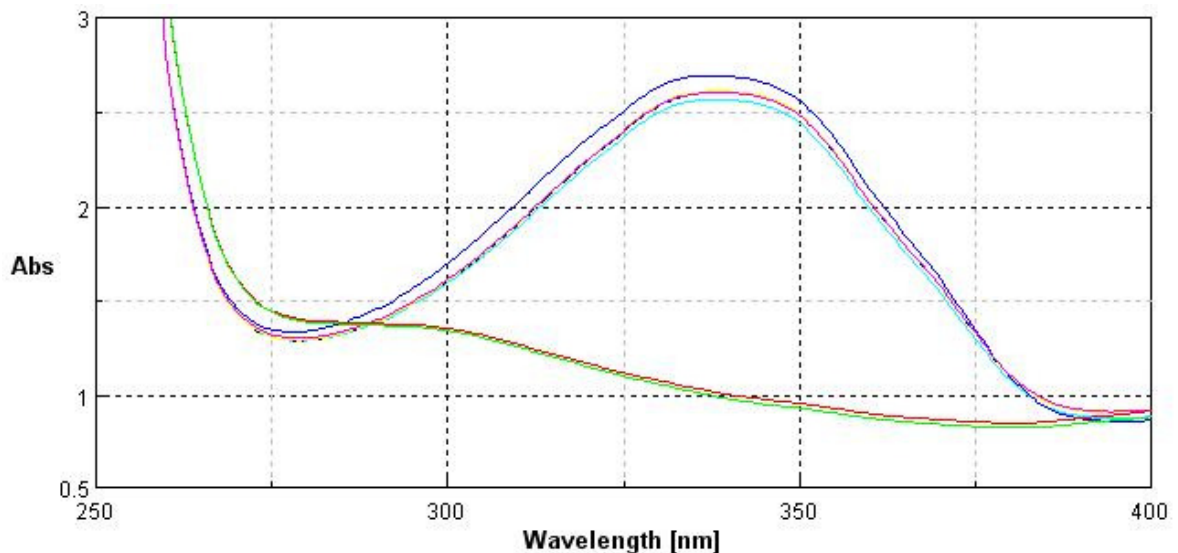


Abb. 107: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiydi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht (Legende siehe oben).

Beim AzoTANDEM dauert dies länger, nach 30 und 90 Sekunden sind die Spektren im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch, und liegen im Bereich des thermischen Gleichgewichts (Abb. 108, 109). Erst nach 40 Minuten werden die Ausgangswerte im Rahmen der Meßgenauigkeit erreicht.

Im Falle des 4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin ist die erreichte Intensität wieder geringer als im thermische Gleichgewicht, beim AzoTANDEM größer.

Auch hier zeigt sich, daß die Schaltung des AzoTANDEMs viel langsamer erfolgt, wobei zu erkennen ist, daß die Werte des thermischen Gleichgewichts sehr schnell erreicht werden, bereits nach der ersten Messungen, die Schaltung darüber hinaus jedoch länger dauert. Auch dies ist wieder als Hinweis auf die erschwerte Schaltung im unter Spannung stehenden, sterisch anspruchsvollen AzoTANDEM zu werten. Im Gegensatz dazu kann das frei bewegliche, ungehinderte 4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin sehr viel schneller geschaltet werden.

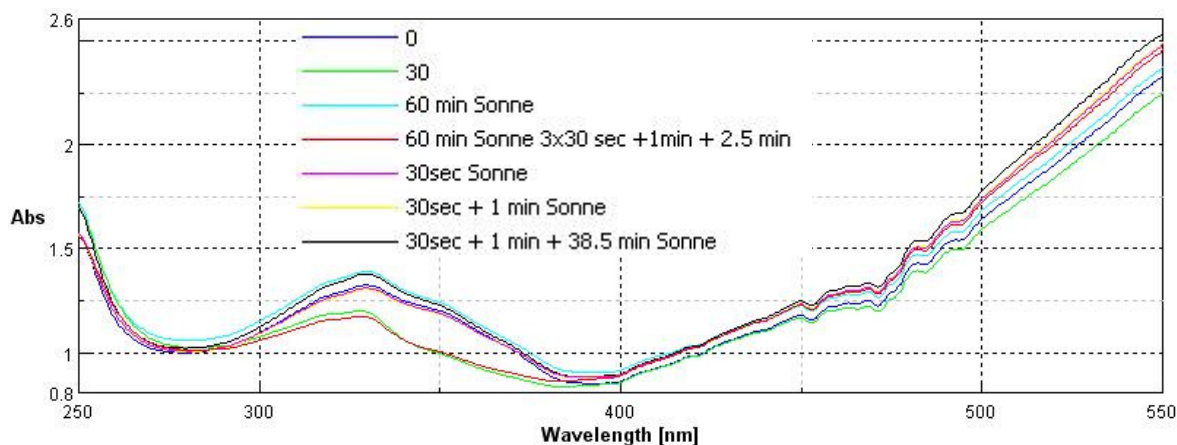


Abb. 108: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht mit Messungen nach 30 und 90 Sekunden sowie nach 40 Minuten und den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht. Als Ausgangsspektrum dient das Spektrum nach 300 Sekunden Bestrahlung im Photoreaktor.

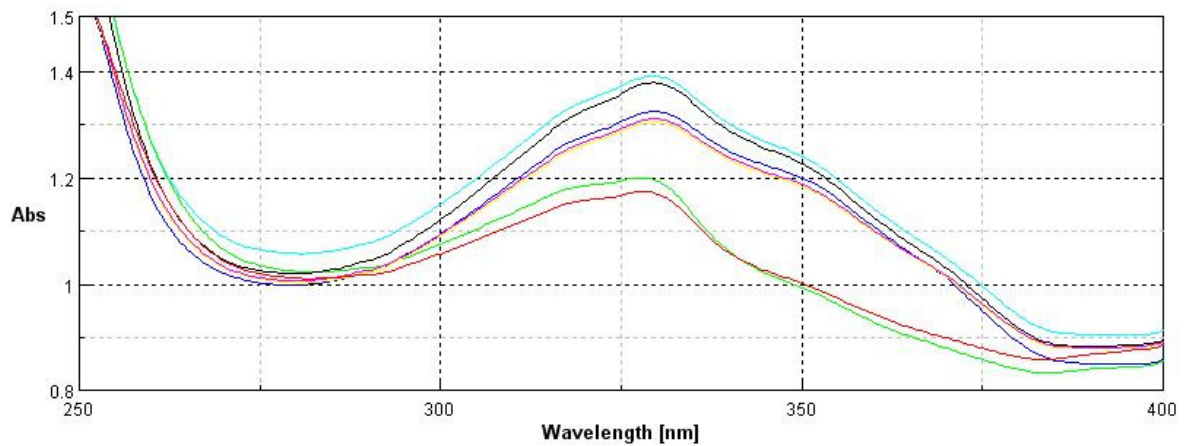


Abb. 109: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht (Legende siehe unten).

Im Spektrum des Chinoxaloylchlorids treten keine weiteren Änderungen auf (Abb. **110**, **111**).

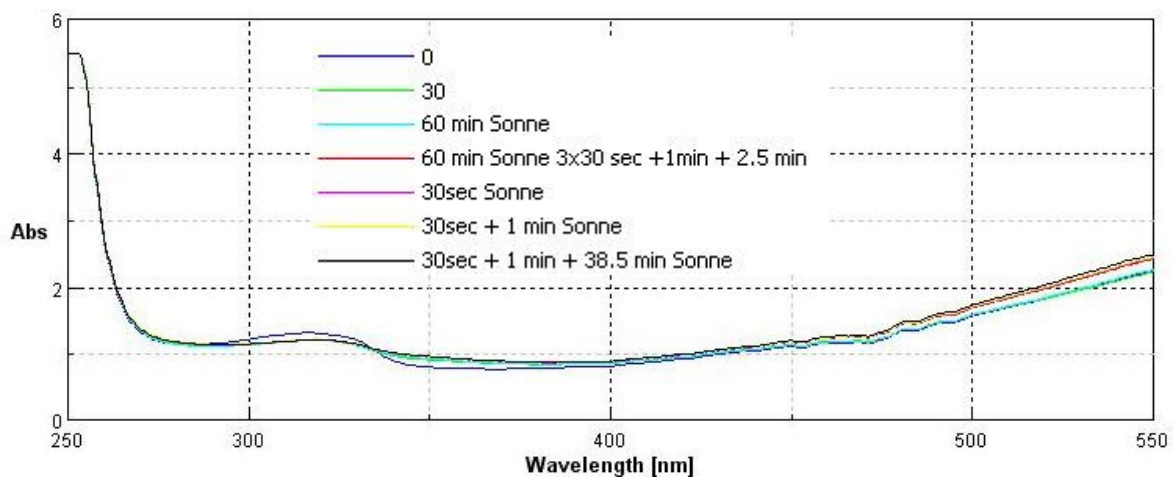


Abb. 110: Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht mit Messungen nach 30 und 90 Sekunden sowie nach 40 Minuten und den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht. Als Ausgangsspektrum dient das Spektrum nach 300 Sekunden Bestrahlung im Photoreaktor.

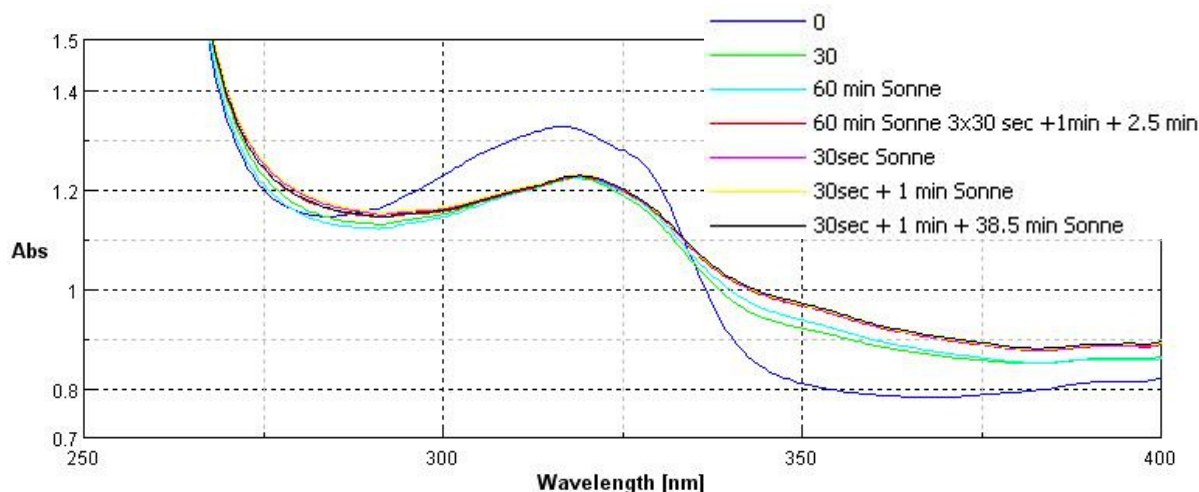


Abb. 111: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der vierten Photoschaltung im Sonnenlicht mit Messungen nach 30 und 90 Sekunden sowie nach 40 Minuten und den Spektren im thermischen Gleichgewicht und nach 60 min Bestrahlung im Sonnenlicht. Als Ausgangsspektrum dient das Spektrum nach 300 Sekunden Bestrahlung im Photoreaktor.

4.3.3.7 Thermische Schaltung *cis*-Isomer → *trans*-Isomer

Um die thermische Schaltung zwischen dem *cis*-Isomer und dem *trans*-Isomer der 4,4'-Diazendiylphenylalanin-Einheit beim AzoTANDEM und dem 4,4'-Diazendiyl-di(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin zu untersuchen, wurden die Proben zuerst im Photoreaktor bei 360 nm für 5 Minuten bestrahlt. Anschließend wurden die Proben im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Untersuchung wurden in regelmäßigen Abständen Messungen vorgenommen, nach 2, 5, 15, 30 und 75 min sowie nach 2,5, 4, 6, 12, 24, 30, 45, 54, 69, 76, 94, 100, 123, 130, 142, 148, 168 und 192 Stunden und eine abschließende Messung nach 70 Tagen. Auf die Darstellung der Legenden für die kompletten Übersichten wird verzichtet, da die einzelnen Spektren nicht zu unterscheiden wären weil die Software nur 8 Spektren verschieden darstellen kann. Jedoch ist das Spektrum mit der nächsthöheren Intensität immer das Spektrum, was direkt anschließend aufgenommen wurde. Einzige Ausnahme hierbei ist das Spektrum nach 70 Tagen. Hier zeigt sich eine deutliche Veränderung des Spektrums des DMSO, und auch eine Veränderung im Bereich der Proben, was auf eine Zersetzung des DMSO und der Proben hindeutet. Die thermische Schaltung geht in beiden Systemen mit der 4,4'-Diazendiylphenylalanin-Einheit recht langsam voran.

Im Falle des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin verläuft die thermische Schaltung nicht linear, zu Beginn ist sie deutlich schneller als zum Ende hin (Abb. 112, 113).

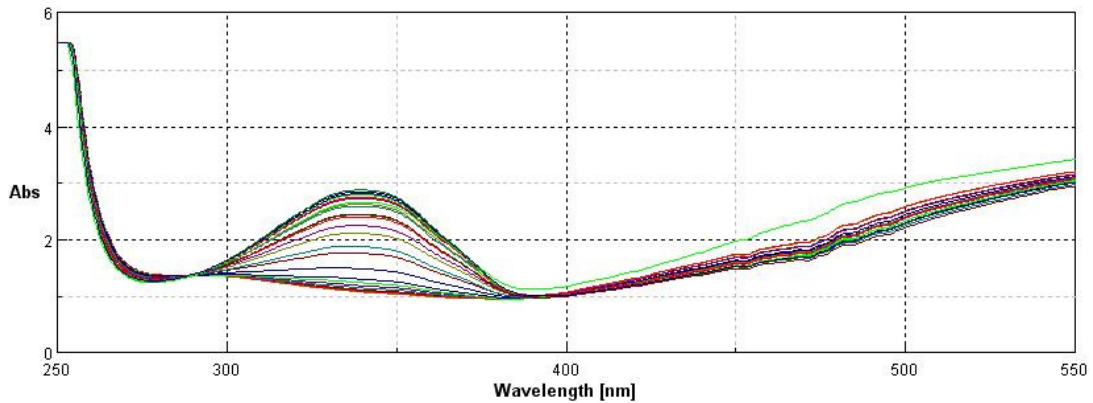


Abb. 112: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der thermischen Schaltung. Auf die Darstellung der Legenden wird verzichtet, da die einzelnen Spektren nicht zu unterscheiden wären weil die Software nur 8 Spektren verschieden darstellen kann. Jedoch ist das Spektrum mit der nächsthöheren Intensität immer das Spektrum, was direkt anschließend aufgenommen wurde.

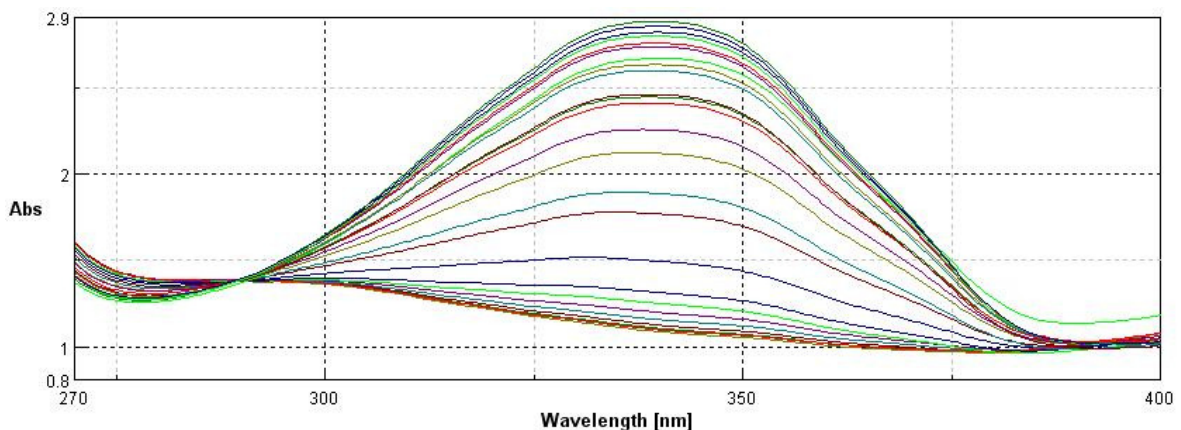


Abb. 113: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der thermischen Schaltung. Auf die Darstellung der Legenden wird verzichtet, da die einzelnen Spektren nicht zu unterscheiden wären weil die Software nur 8 Spektren verschieden darstellen kann. Jedoch ist das Spektrum mit der nächsthöheren Intensität immer das Spektrum, was direkt anschließend aufgenommen wurde.

Erstaunlicherweise wird nach 130h eine größere Intensität als im thermischen Gleichgewicht erreicht (Abb. 114), die auch weiterhin ansteigt. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, daß die Proben vor der allerersten Messung nicht immer unter Lichtausschluß gehalten wurden. Die Proben könnten deswegen auch durch Sonnenlicht

bestrahlt worden sein, dessen Strahlung bei 360 nm eine gewisse Rückschaltung bewirken könnte.

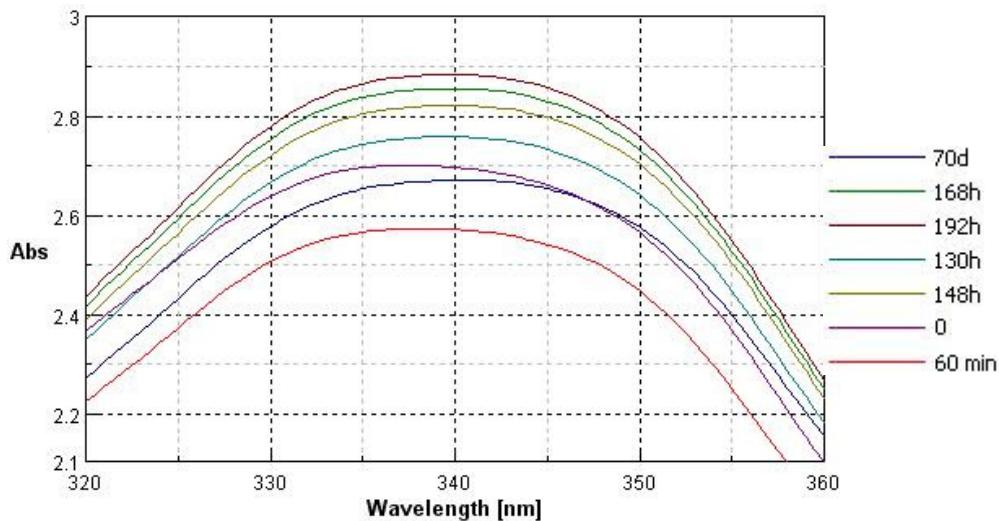


Abb. 114: Vergrößerte Darstellung ausgewählter UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin im Verlauf der thermischen Schaltung. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0), ein Spektrum nach 60 min Sonnenbestrahlung nach der ersten Photoschaltung im Photoreaktor und die Spektren der Messungen nach 130, 148, 168 und 192 Stunden sowie nach 70 Tagen unter Lichtausschluss.

Auch die thermische Schaltung des AzoTANDEM_s verläuft nicht linear, jedoch verläuft sie zu Beginn deutlich langsamer als die des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanins (Abb. 115, 116).

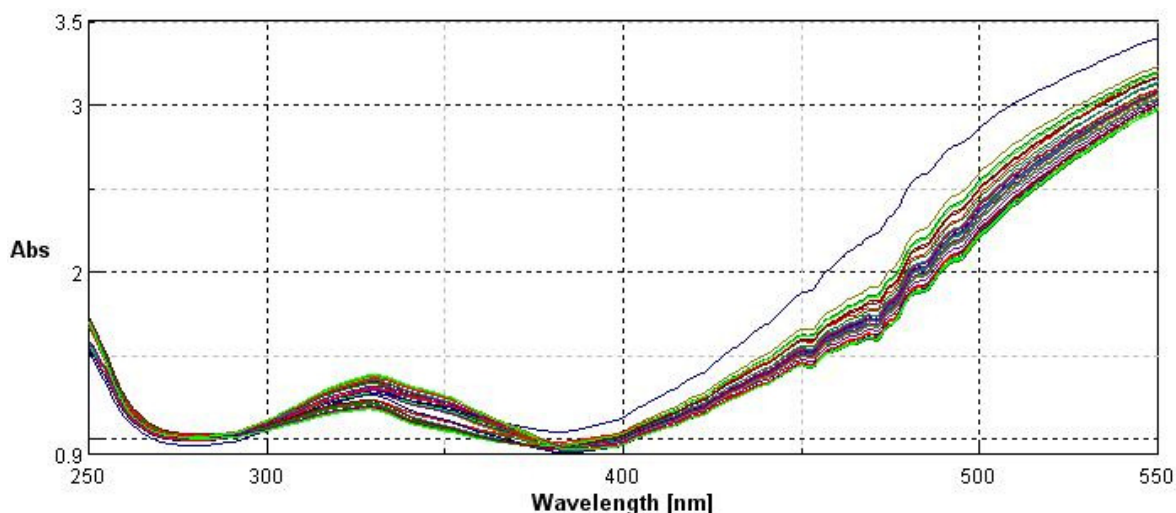


Abb. 115: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEM_s in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der thermischen Schaltung. Auf die Darstellung der Legenden wird verzichtet, da die einzelnen Spektren nicht zu unterscheiden wären weil die Software nur 8 Spektren verschieden darstellen kann. Jedoch ist das Spektrum mit der nächsthöheren Intensität immer das Spektrum, was direkt anschließend aufgenommen wurde.

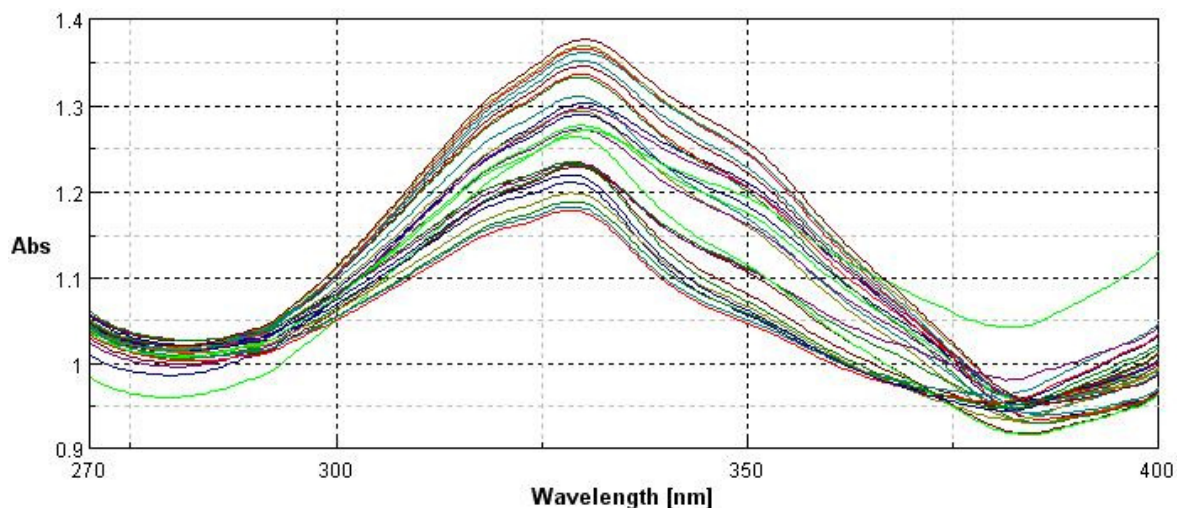


Abb. 116: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs in DMSO in der 0.1 cm Küvette im Verlauf der thermischen Schaltung. Das Spektrum, das von den anderen abweicht, ist das nach 70 Tagen. Auf die Darstellung der Legenden wird verzichtet, da die einzelnen Spektren nicht zu unterscheiden wären weil die Software nur 8 Spektren verschieden darstellen kann. Jedoch ist das Spektrum mit der nächsthöheren Intensität immer das Spektrum, was direkt anschließend aufgenommen wurde.

Die Intensität der Bande des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der 4,4'-Diazendylphenylalanin-Einheit des AzoTANDEM erreicht den höchsten Wert nach 148 Stunden. Die Intensität ist hier geringer als nach 60 Minuten direkter Sonnenbestrahlung, und fällt dann bei längerer Lagerung unter Lichtausschluß wieder ab, wobei sie unter den Wert im thermischen Gleichgewicht vor der allerersten Messung fällt (Abb. 117). Der Wert nach 70 Tagen ist noch geringer, so daß dieser Effekt eventuell bereits auf eine Zersetzung des AzoTANDEMs hinweist.

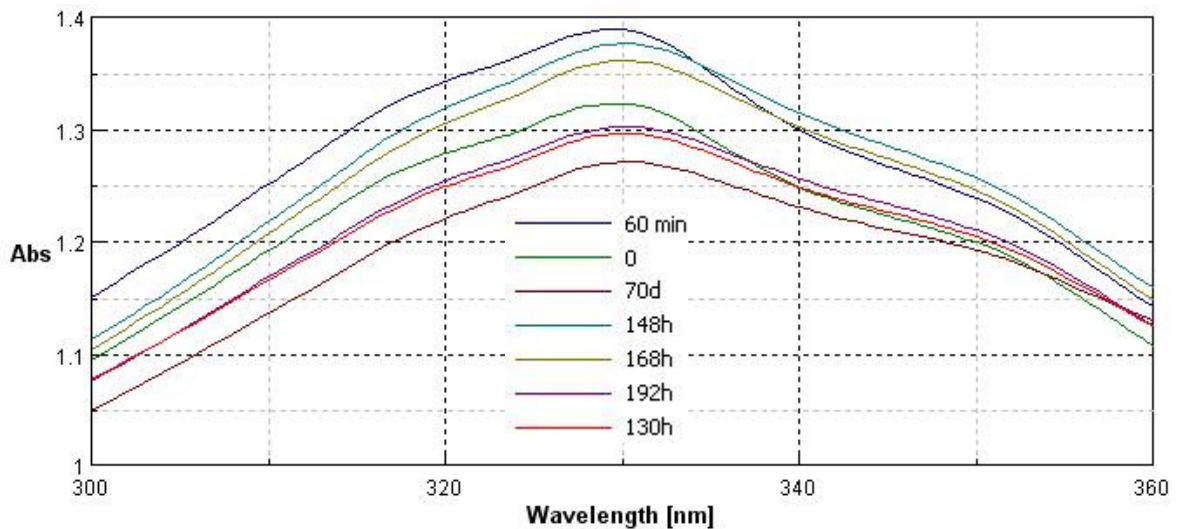


Abb. 117: Vergrößerte Darstellung ausgewählter UV-Spektren des AzoTANDEM im Verlauf der thermischen Schaltung. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0), ein Spektrum nach 60 min Sonnenbestrahlung nach der ersten Photoschaltung im Photoreaktor und die Spektren der Messungen nach 130, 148, 168 und 192 Stunden sowie nach 70 Tagen unter Lichtausschluß.

Das Spektrum des Chinoxaloylchlorids ändert sich wiederum nicht (Abb. 118, 119). Nur das nach 70 Tagen aufgenommene Spektrum zeigt ähnliche Änderungen wie die übrigen nach 70 Tagen aufgenommenen auch, was in diesem Fall hauptsächlich auf eine mögliche Zersetzung des DMSO zurückzuführen ist.

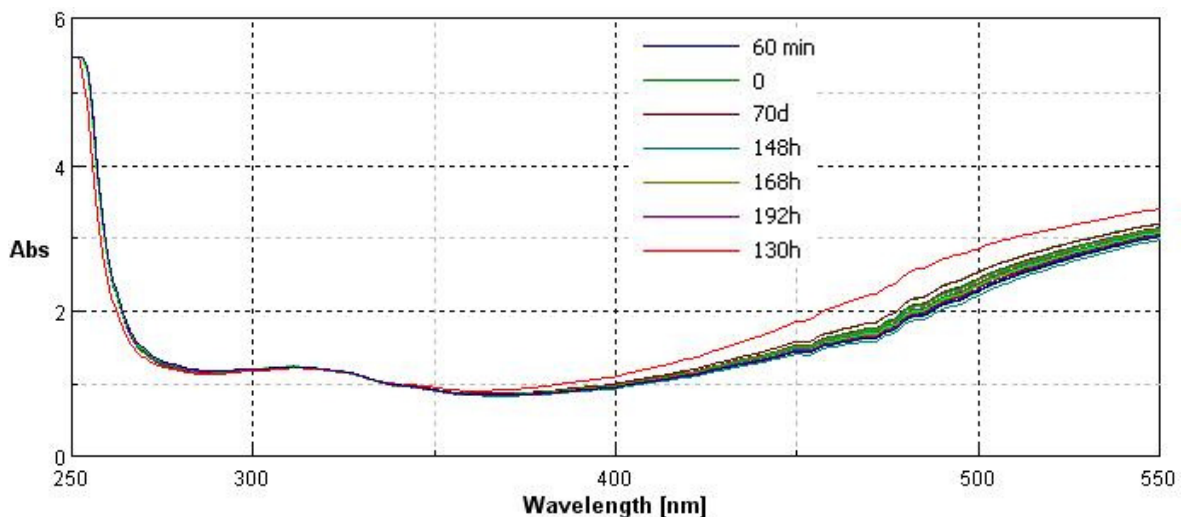


Abb. 118: Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der thermischen Schaltung. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0), ein Spektrum nach 60 min Sonnenbestrahlung nach der ersten Photoschaltung im Photoreaktor und die Spektren der Messungen nach 130, 148, 168 und 192 Stunden sowie nach 70 Tagen unter Lichtausschluß.

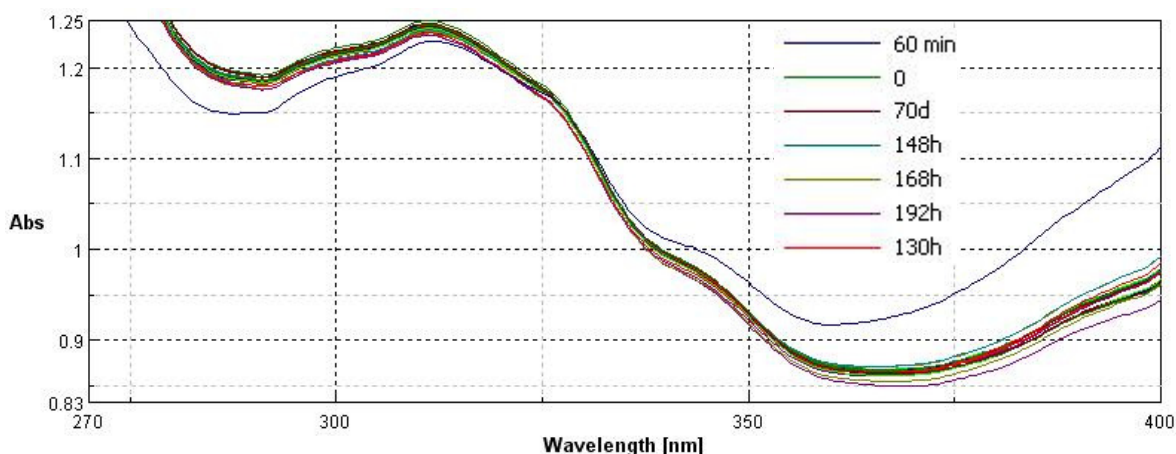


Abb. 119: Vergrößerte Darstellung der UV-Spektren des Chinoxaloylchlorids in DMSO in der 1 cm Küvette im Verlauf der thermischen Schaltung. Das einzige Spektrum, das signifikant von den anderen abweicht, ist das nach 70 Tagen. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0), ein Spektrum nach 60 min Sonnenbestrahlung nach der ersten Photoschaltung im Photoreaktor und die Spektren der Messungen nach 130, 148, 168 und 192 Stunden sowie nach 70 Tagen unter Lichtausschluß.

4.3.3.8 Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Photoschaltungen

Bei der Betrachtung der Spektren der Endpunkte aller Schaltungen des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin ist zu erkennen, daß sich die Spektren des *cis*-Isomers kaum ändern (Abb. 120). Bei den Spektren des *trans*-Isomers sind jedoch deutliche Unterschiede zu erkennen. Die höchste Intensität erreicht die Bande des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der 4,4'-Diazendiyphenylalanin-Einheit bei thermischer Schaltung unter Lichtausschluß. Diese ist ein wenig höher als die im thermischen Gleichgewicht vor der allerersten Messung und der Messung nach 70 Tagen. Die Intensität dieser Bande nach Schaltung mittels Sonnenlicht ist im Rahmen der Meßgenauigkeit immer identisch. Die Spektren zeigen zwei isosbestischen Punkte, bei 285 nm und 391 nm, was auf eine reproduzierbare Reaktion hindeutet. Die Spektren der späteren Messungen laufen nicht mehr genau durch diese Punkte, was auf eine Zersetzung des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)phenylalanin oder eher noch auf eine des DMSO hindeutet, da bei einer veränderten Intensität auch diese Spektren durch die Punkte laufen würden. Die isosbestischen Punkte sind in den Spektren der einzelnen Photoschaltungen deutlicher zu erkennen, da die Messungen in diesen Fällen zeitlich näher beieinander erfolgten, und die Zersetzung des Lösungsmittels in diesem Fall keine so große Rolle spielt.

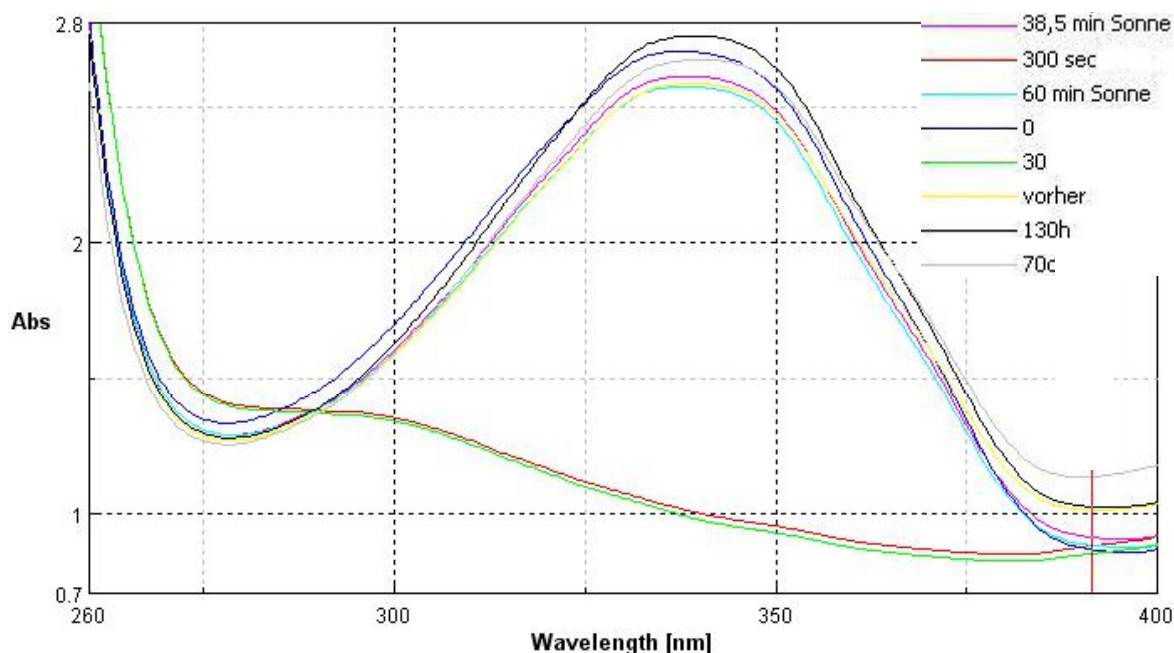


Abb. 120: Darstellung der UV-Spektren des 4,4'-Diazendiyldi(*N*-tert-butoxycarbonyl)phenylalanin am Ende aller Schaltvorgänge. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0) und vor den Messungen zur Untersuchung der thermischen Rückschaltung (vorher), jeweils ein Spektrum nach 40 (38,5 min Sonne) und 60 min Sonnenbestrahlung, sowie eins nach 4 (30) und 30 min (30) Bestrahlung im Photoreaktor, eins nach 130 Stunden und eins nach 70 Tagen unter Lichtausschluß.

Der Vergleich der entsprechenden Spektren des AzoTANDEM_s zeigt, daß die Intensität des Übergangs bei Sonnenbestrahlung am höchsten ist, und sie bei thermischer Schaltung unter Lichtausschluß fast genau so groß ist (Abb. 121). Nach längerem Stehen im thermischen Gleichgewicht mit oder ohne Lichtausschluß nähert sich die Intensität dieser Banden auch wieder an. Auch die Spektren des *cis*-Isomers unterscheiden sich in den Intensitäten. Es sind zwei isosbestische Punkte bei 288 nm und 385 nm zu erkennen, die eine reproduzierbare Reaktion andeuten. Jedoch sind diese im Fall des AzoTANDEM_s nicht so deutlich zu erkennen wie beim 4,4'-Diazendiyldi(*N*-tert-butoxycarbonyl)phenylalanin, es sind eher etwas weitere Bereiche. Die unterschiedlichen Intensitäten und die schlechter ausgeprägten isosbestischen Punkte könnten darauf hindeuten, daß bei der Photoschaltung strukturell verschiedene *cis*- und *trans*-Isomere entstehen können, zum Beispiel mit verschiedenen verdrehten Phenylringen. Es könnte auch darauf hin deuten, daß die Schaltung und das Ausprägen der endgültigen Form längere Zeit dauert, was sich mit der stark gespannten, sterisch sehr anspruchsvollen Struktur erklären ließe. Eine so langsame Veränderung der Struktur, mehr als 5 Tage, wäre jedoch schon außergewöhnlich.

Die Tatsache, daß die Intensität der Bande des $\pi \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang der 4,4'-Diazendiyldi-phenylalanin-Einheit nach längerer Zeit immer einen Wert unter dem durch

Bestrahlung oder thermischer Schaltung unter Lichtausschluß erreicht, deutet wiederum darauf hin, daß im Gleichgewicht ein Gemisch beider Isomere vorliegt.

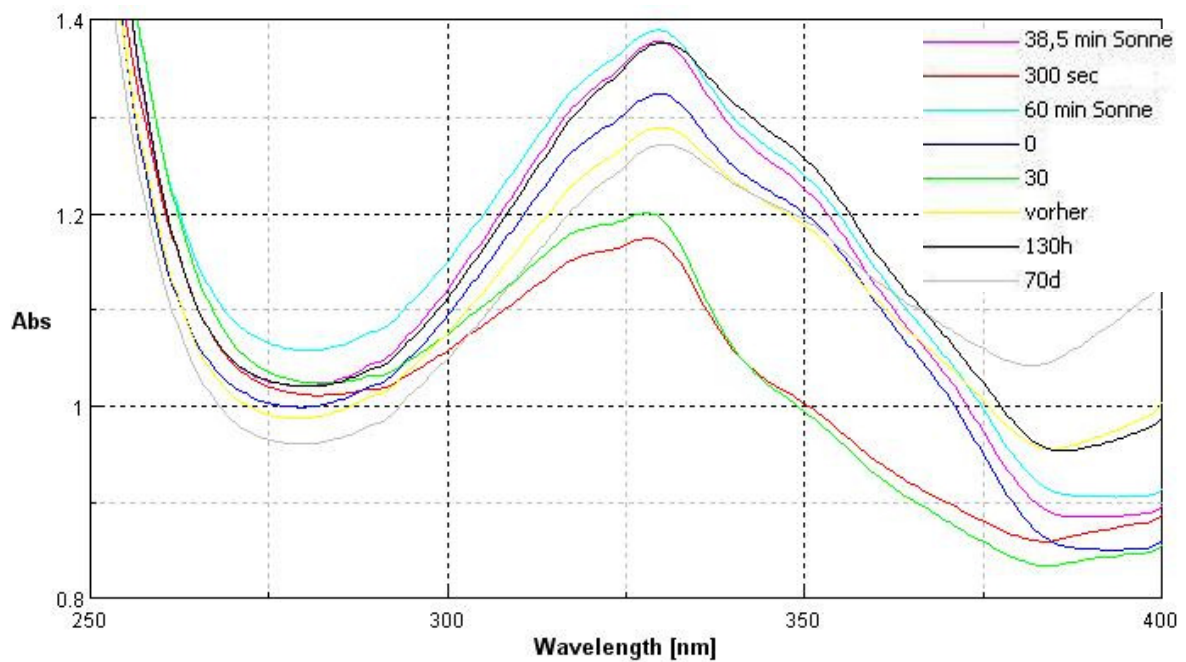


Abb. 121: Darstellung der UV-Spektren des AzoTANDEMs am Ende aller Schaltvorgänge. Dargestellt ist das thermische Gleichgewicht vor der allerersten Messung (0) und vor den Messungen zur Untersuchung der thermischen Rückschaltung (vorher), jeweils ein Spektrum nach 40 (38,5 min Sonne) und 60 min Sonnenbestrahlung, sowie eins nach 4 (300) und 30 min (30) Bestrahlung im Photoreaktor, eins nach 130 Stunden und eins nach 70 Tagen unter Lichtausschluß.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Steuerung der Proteinexpression erfolgt auf der Ebene der Transkription von der DNA zur mRNA über Transkriptionsfaktoren, die entweder aktivierend als Transkriptionsaktivator oder inhibierend als Transkriptionsinhibitor wirken. Diese Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die mit der DNA interagieren. Diese Wechselwirkungen müssen sehr spezifisch sein, da schließlich nur ein bestimmtes Gen zur Expression einer bestimmten mRNA und damit zur Produktion eines bestimmten Proteins aktiviert werden darf. Könnte die Biosynthese von an pathogenen Prozessen beteiligten Proteinen durch künstliche Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden, wäre dies eine Möglichkeit, in den Verlauf des entsprechenden pathogenen Prozeß einzugreifen. Die Entwicklung von künstlichen Transkriptionsfaktoren, die an spezifische DNA-Sequenzen binden, ist also wünschenswert. Hierzu ist zuerst die Identifikation des natürlich vorkommenden Transkriptionsfaktors, der den pathogenen Prozeß steuert, nötig. Anschließend muß das DNA-bindende Epitop in diesem gefunden werden. Zuletzt müssen die Wechselwirkungen von Proteinen und DNA auf submolekularer Ebene aufgeklärt werden, um künstliche Transkriptionsfaktoren konstruieren zu können. Wenn erst eine gewisse Datenbasis vorhanden ist, sollte es möglich sein, aus der vorhandenen Datenbasis bei Kenntnis des DNA-Bereichs, an den das Protein bindet, direkt mögliche künstliche Transkriptionsfaktoren zu entwickeln. Weiterhin wäre es sehr nützlich, die künstlichen Transkriptionsfaktoren so zu modifizieren, daß sie von außen aktiviert oder deaktiviert werden können.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese eines modifizierten Peptids, das dem DNA-bindenden Epitop des *phosphate regulatory protein* PhoB entspricht. Die an der Bindung dieses Proteins an DNA beteiligten Aminosäurereste sind aus NMR- und Röntgenstrukturen bekannt. Darüber hinaus wurden weitere Peptide synthetisiert, bei denen jeweils einer der beteiligten Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht ist (Ala-Scan). Weiterhin wurde versucht, durch einen Austausch geeigneter Aminosäurereste gegen Arginin die Affinität zur DNA zu erhöhen (Arg-Scan). Mit diesen Peptiden wurden Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz-Messungen und Kraftspektroskopie sowie Strukturanalysen mit Hilfe der CD-Spektroskopie durchgeführt. Weiterhin wird eine Methode zum Auffinden DNA-bindender Epitope in einem Protein durch wiederholte

Peptidsynthese und Affinitätsuntersuchungen vorgestellt. Als Drittes wird noch die Synthese sowie UV-spektroskopische Untersuchungen eines photoschaltbaren Interkalators beschrieben.

Die Synthese des Peptids PhoB (190-209), das dem DNA-bindenden Epitop des Proteins, der amphiphilen α -Helix α^3 , entspricht, erfolgte im Syntheseautomaten. Die Modifizierung des Harzes mit anschließender Beladung mit der ersten Aminosäure erwies sich als beste Methode und erlaubt die Synthese C-terminal modifizierter Peptide. Auf diesem Weg wurden alle Peptide für den Ala-Scan und den Arg-Scan synthetisiert.

Diese Peptide wurden auf makroskopischer Ebene in Bindungsstudien mit Oberflächenplasmonresonanz untersucht, sowie auf Einteilmolekülniveau mit Kraftspektroskopie. Die Bindungsstudien mit Oberflächenplasmonresonanz zeigten, daß das für optimale Ergebnisse bei der Kraftspektroskopie gewählte Versuchs-Setup mit einem ziemlich langen DNA-Fragment nicht gut für makroskopische Experimente geeignet ist, da es ein hohes Maß an unspezifischer Bindung erlaubt. Alle gewählten Methoden zur Datenanalyse mit den bei diesem Setup erstellten Konzentrationsreihen weisen einen sehr großen Fehler auf, so daß die Ergebnisse als nicht zuverlässig betrachtet werden können.

Der Arg-Scan ergibt keine verbesserte spezifische Bindung der Peptide an die DNA, allerdings scheint die Assoziation schneller und die Dissoziation langsamer zu verlaufen, was durch eine bessere Assoziation und schnellere Rückbindung an die immobilisierte DNA erklärt werden kann. Dies beruht vermutlich auf einer erhöhten Amphiphilie der DNA-bindenden α -Helix durch die zusätzlich eingeführten basischen Aminosäurereste. Der Ala-Scan ergibt eine Verbesserung der Bindung des Peptids PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] im Vergleich mit dem Peptid mit der nativen Sequenz PhoB(190-209) [*E. coli*]. Die anderen Peptide binden mit geringerer Affinität.

Als Ausblick bleibt zum ersten Projekt, den Bindungsstudien von PhoB [*E. coli*] an der komplementären DNA, zu sagen, daß Messungen mit einem viel kürzeren DNA-Strang, z.B. dem mit der Sequenz, die auch für die Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde, mit der Sequenz GAGCTGTCATAAAGTTGTCACGG. Dies Fragment hat nur 23 bp, würde also nur 2 Molekülen Platz zur Bindung geben. Da es außerdem 2 spezifische Bindungsstellen enthält, könnte unspezifische Bindung nahezu ausgeschlossen werden. Die Vergleichbarkeit mit den aus der Kraftspektroskopie erhaltenen Daten ist dann nicht wirklich zulässig, da ein anderes System vermessen wird. Trotzdem sollten diese Messungen Sensogramme liefern, aus denen bei der Datenanalyse brauchbare kinetische

Daten extrahiert werden können. Mit einem so kurzen Fragment sollten auch CD-spektroskopische Untersuchungen zur Konformationsanalyse möglich sein, da der Größenunterschied des Peptids und der DNA nicht mehr so groß ist.

Die kraftspektroskopischen Untersuchungen wurden mit vier ausgewählten Peptiden durchgeführt, von denen das PhoB(190-209) R193A [*E. coli*] mit höherer Affinität bindet als das mit der nativen Sequenz PhoB(190-209) [*E. coli*]. PhoB(190-209) H198A [*E. coli*] zeigte kaum Bindung, und PhoB(190-209) R203A [*E. coli*] zeigte so wenige Bindungsereignisse, daß keine statistische Auswertung möglich war. Für die übrigen Peptide ergeben sich für die thermische *off*-Rate und die molekulare Reaktionslängen die in Tab. 18 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 18: Vergleich der aus der dynamischen Kraftspektroskopie erhaltenen thermischen *off*-Raten und molekulare Reaktionslängen.

| Mutation | Peptidsequenz | k_{off} / s^{-1} | $x_{\beta} / \text{\AA}$ |
|----------|---|--------------------|--------------------------|
| - | AC-VEDRTVDVHIRRLRKALEPG-Linker | 3.1 ± 2.1 | 6.8 ± 1.2 |
| R193A | AC-VED A TVDVHIRRLRKALEPG-Linker | 0.071 ± 0.053 | 9.3 ± 2.6 |
| H198A | AC-VEDRTVDV A IRRLRKALEPG-Linker | 49.5 ± 21.2 | 7.2 ± 3.5 |

Es zeigt sich, daß die Untersuchung auf Einzelmolekülniveau mittels Kraftspektroskopie der Untersuchung der Bindungseigenschaften im Molekülensemble offensichtlich überlegen ist.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war das Auffinden des DNA-bindenden Epitops des Transkriptionsaktivators ExpG mittels *epitope mapping*. Hierzu wurden Peptide synthetisiert, die jeweils 15 Aminosäureresten aus der 194 Aminosäurereste langen Primärsequenz des Proteins entsprechen. Diese überlappen sich um jeweils 10 Aminosäurereste, so daß der gesamte Sequenz-Raum durchgescannt wird. Mit diesen Peptiden wurden Affinitätsuntersuchungen an der zum ExpG komplementären DNA durchgeführt. Dabei wurden nur 6 Peptide gefunden, die überhaupt an die DNA binden. Aus den Messungen und Analysen der Primärstruktur resultiert der Bereich der Aminosäurereste 131 - 174 als möglicher Bereich für das DNA- bindende Epitop.

Aus der Serie der 20-Peptide mit jeweils 17 überlappenden Aminosäureresten zeigten ExpG(134-153) und ExpG(137-156), signifikante Bindung. Damit wird vorgeschlagen, daß die DNA-bindende Region von ExpG in den Bereich der Aminosäuren 134-153 liegt. In diesem Epitop liegen 6 basische Reste, es entspricht bei einem Sequenzvergleich mit

MarR einem bei diesem vorhergesagten HTH-Motiv, MarR-C. Für die Zukunft wären vergleichende Bindungsstudien mit dem Protein ExpG und der DNA interessant.

Weiterhin wurde im Rahmen der Dissertation ein photoschaltbarer Bis-Interkalator synthetisiert. Als natürliche Vorlage diente dafür das GC-selektive Triostin A und das AT-selektive TANDEM. In dem mit AzoTANDEM bezeichneten, photoschaltbaren Derivat wurde die Cystin-Einheit durch ein Azobenzolderivat, 4,4'-Diazendiylphenylalanin ersetzt (Abb. 122).

Die Syntheseroute verläuft über mit Chinoxalin modifizierte Tripeptide, die unter Pseudo-Hochverdünnung zuerst an das geschützte, photoschaltbare Azobenzolderivat gekuppelt und anschließend, wiederum unter Pseudo-Hochverdünnung, cyclisiert werden.

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß das Molekül mittels Bestrahlung bei 360 nm reproduzierbar vom *trans*-Isomer zum *cis*-Isomer geschaltet werden kann, und daß die Rückschaltung entweder durch Sonnenlicht, oder, allerdings viel langsamer, thermisch erfolgen kann.

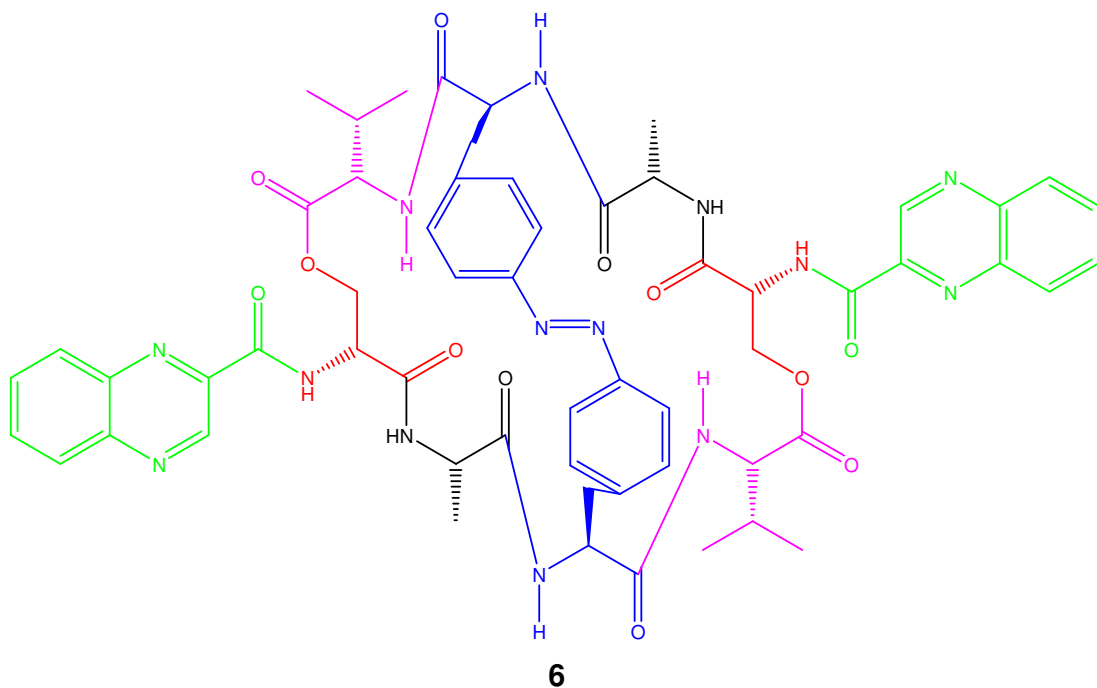


Abb. 122: Struktur des photoschaltbaren Derivates *trans*-AzoTANDEM

Für die Zukunft wären eine NMR-Konformationsanalyse beider Isomere des AzoTANDEMS interessant, und auch eine Röntgenstrukturanalyse im Komplex mit der DNA. Die Syntheseroute für das AzoTANDEM sollte dahingehend überarbeitet werden, daß noch mehr orthogonale Schutzgruppen verwendet werden. Als *N*-terminale

Schutzgruppe des Val sollte, wenn möglich, Fmoc nicht benutzt werden, da dessen Abspaltung immer auch einen gewissen Anteil an basenkatalysierter Spaltung der Esterbindung hervorruft. Eventuell würde der Einsatz der leicht hydrogenolytisch abspaltbaren Z-Schutzgruppe die Synthese an dieser Stelle vereinfachen. Die Funktionalisierung des AzoTANDEMs mit einem Linker, um es für Kraftspektroskopie an die Spitze oder auf der Oberfläche zu immobilisieren erscheint schwer möglich, da kaum eine funktionelle Gruppe im Molekül vorhanden ist, die nicht an der Bindung beteiligt ist. Es könnte jedoch die Bindungsart durch Zugexperimente mit AT-reicher DNA identifiziert werden. Hierzu würde die DNA am einen Strang auf der Oberfläche, mit dem anderen an der Spitze immobilisiert und die Spitze von der Oberfläche entfernt, sowohl nur im Lösungsmittel als auch in Anwesenheit des AzoTANDEMs. Durch die Unterschiede in den erzielten Kraft-Distanz Kurven ließe sich die Bindungsart bestimmen.

Wenn es möglich wäre, während der Messung die Meßzelle mit unterschiedlichen Wellenlängen zu bestrahlen, sollte die Abhängigkeit der Bindung von der Struktur des AzoTANDEMS untersucht werden.

6. Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Materialien

6.1.1 Geräte

| | |
|-------------------------------|--|
| Peptidsynthesizer: | ACT 496 Multiple Organic Synthesizer, Fa. Advanced ChemTech Software: Multiple Organic Synthesis 1.33.12 |
| MALDI-ToF-Massenspektrometer: | Voyager-DE, Fa. PerSeptive Biosystems Laser: Stickstofflaser $\lambda = 337 \text{ nm}$ Delay-Time: 100 ns Accelerating Voltage: 20 000 V Grid Voltage: 93.8 % Guide Wire Voltage: 0.05 % Scans: jeweils 10, 2 - 4 akkumulieren Matrix: 2,5-Dihydroxy- benzoesäure Externe Kalibrierung der Spektren gegen PEG Mix oder Insulin β -Kette |
| ESI-Massenspektrometer: | APEX III FT-ICR, Fa. Bruker, Magnet: 7.0 T Trägergas: Stickstoff Trockengas: Stickstoff |
| Oberflächenplasmonresonanz: | Biacore [®] 3000, Fa. Biacore AV Sensorchips: SA-Sensorchip Software: BIAcore 3000 Control Software 4.1 BIAevaluation Version 4.1 Microsoft [®] Excel 2000 Datafit 8.1 |

| | | |
|--------------------|---|-----------------------------------|
| CD-Spektrometer: | Spektropolarimeter: | J-810, Fa. JASCO |
| | Peltiereinheit: | CD 74265, Fa. JASCO |
| | CD-Messungen: | |
| | Data pitch | 0.2 mm |
| | Band width: | 1 mm |
| | Response: | 1 s |
| | Sensitivity: | Low |
| | Scan Speed: | 50 mm/s |
| | Accumulation: | 5 |
| | Temperature: | 298 K |
| | Sensitivity (Em): | 0V |
| | UV-Messungen: | |
| | Data pitch | 0.5 mm |
| | Band width: | 1 mm |
| | Response: | 1 s |
| | Sensitivity: | Standard |
| | Scan Speed: | 200 mm/s |
| | Accumulation: | 1 |
| | Temperature: | 298 K |
| | Sensitivity (Em): | 0V |
| AFM: | Nanoscope III, Fa. Digital Instruments, luftkissengedämpft | |
| | Scanner: | J Scanner (160 µm) |
| | Cantilever: | Silizium, Tip Radius ca. 10 nm |
| | Resonanzfrequenz des Cantilevers: | ca. 300 kHz |
| | Amplitude: | ca. 2 V |
| IR-Spektrometer: | FT/IR-410, Fa. JASCO | |
| NMR-Spektroskopie: | AM 250, Fa. Bruker | |
| | Messtemperatur: | 303K |
| | Basisfrequenz für ¹ H: | 249.9 MHz |
| | Basisfrequenz für ¹³ C: | 62.9 MHz |

| | |
|-------------------------------------|--|
| | DRX 500, Fa. Bruker |
| Messtemperatur: | 298K |
| Basisfrequenz für ^1H : | 499.9 MHz |
| Basisfrequenz für ^{13}C : | 125.7 MHz |
| | Avance 600, Fa. Bruker |
| Messtemperatur: | 298K |
| Basisfrequenz für ^1H : | 600.13 MHz |
| Basisfrequenz für ^{13}C : | 150.90 MHz |
| UV-Spektrometer: | He λ ios Gamma & Delta, Fa. Spectronic Unicam |
| Schmelzpunktbestimmung: | Melting Point B-540, Fa. Büchi |
| Schüttler: | KS 130 basic, Fa. IKA [®] |
| Stickstoffgenerator: | NGM-11, Fa. CMC Instruments |
| Ultraschallbad: | Sonorex Super 10 P, Fa. Bandelin |
| Zentrifuge: | Centrifuge 5810 R, Fa. Eppendorf |
| Analytische Umkehrphasen-HPLC: | |
| Software: | Chromquest |
| Autosampler: | Thermo Separation Products AS 100 |
| Pumpe: | Thermo Separation Products P 4000 |
| Controller: | Thermo Separation Products SN 4000 |
| Detektor: | Thermo Separation Products UV 6000 LP, Detektion bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ |
| Säule: | A: Vydac [™] 300 C18 (218TPB), 5 μm , 250 x 4 mm, Fa. Phenomenex B: Jupiter 4u Proteo 90A, 250x4,6 mm 4u micron, Fa. Phenomenex |
| Flußrate: | 1 mL / min |
| Eluent A: | 5 % H_2O , 95 % Acetonitril, 0.1 % TFA |
| Eluent B: | 95 % H_2O , 5 % Acetonitril, 0.1 % TFA |

Verwendete Methoden für die analytische Umkehrphasen - HPLC:

HPLC-Methode 1: Fluß 1 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|--------------|----------|----------|
| 0 – 3 min | 0 % | 100 % | 0 % | 100 % |
| 3 – 10 min | 0 % | 100 % | 25 % | 75 % |
| 10 – 35 min | 25 % | 75 % | 40 % | 60 % |
| 35 – 45 min | 40 % | 60 % | 100 % | 0 % |
| 45 – 50 min | 100 % | 0 % | 0 % | 100 % |
| 50 – 55 min | 0 % | 100 % | 0 % | 100 % |

Semipräparative Umkehrphasen-HPLC:

| | |
|-------------|--|
| Software: | Chromquest |
| Pumpe: | Thermo Separation Products P 4000 |
| Controller: | Thermo Separation Products SN 4000 |
| Detektor: | Thermo Separation Products UV 1000 LP, Detektion bei $\lambda = 220$ nm |
| Säule: | A: Vydac TM 218 TP 1022 Efficiency, Protein & Peptide C18, 250 x 22 mm, Fa. Phenomenex B: Jupiter 10u Proteo 90A, 250x21.2 mm, Fa. Phenomenex |
| Eluent A: | 95 % H ₂ O, 5 % Acetonitril, 0.1 % TFA |
| Eluent B: | 5 % H ₂ O, 95 % Acetonitril, 0.1 % TFA |

Verwendete Methoden für die semipräparative Umkehrphasen - HPLC:

HPLC-Methode 1: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|--------------|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | 0 % | 100 % |
| 5 – 10 min | 0 % | 100 % | 10 % | 90 % |
| 10 – 30 min | 10 % | 90 % | 40 % | 60 % |
| 30 – 33 min | 40 % | 60 % | 100 % | 0 % |
| 33 – 35 min | 100 % | 0 % | 0 % | 100 % |
| 35 – 37 min | 0 % | 100 % | 0 % | 100 % |

HPLC-Methode 2: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B | bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |
| 5 – 20 min | 0 % | 100 % | | 45 % | 55 % |
| 20 – 40 min | 45 % | 55 % | | 100 % | 0 % |
| 40 – 50 min | 100 % | 0 % | | 0 % | 100 % |
| 50 – 60 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |

HPLC-Methode 3: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B | bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |
| 5 – 15 min | 0 % | 100 % | | 40 % | 60 % |
| 15 – 45 min | 40 % | 60 % | | 100 % | 0 % |
| 45 – 50 min | 100 % | 0 % | | 0 % | 100 % |
| 50 – 55 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |

HPLC-Methode 4: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B | bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |
| 5 – 10 min | 0 % | 100 % | | 16 % | 84 % |
| 10 – 30 min | 16 % | 84 % | | 31 % | 69 % |
| 30 – 35 min | 31 % | 69 % | | 100 % | 0 % |
| 35 – 40 min | 100 % | 0 % | | 0 % | 100 % |
| 40 – 45 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |

HPLC-Methode 5: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B | bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |
| 5 – 40 min | 0 % | 100 % | | 100 % | 0 % |
| 40 – 45 min | 100 % | 0 % | | 0 % | 100 % |
| 45 – 50 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |

HPLC-Methode 6: Fluß 13 mL/min

| Gradient: | Eluent A | Eluent B | bis | Eluent A | Eluent B |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|
| 0 – 5 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |
| 5 – 10 min | 0 % | 100 % | | 35 % | 65 % |
| 10 – 40 min | 35 % | 65 % | | 43 % | 57 % |
| 40 – 45 min | 43 % | 57 % | | 100 % | 0 % |
| 45 – 50 min | 100 % | 0 % | | 0 % | 100 % |
| 50 – 55 min | 0 % | 100 % | | 0 % | 100 % |

6.1.2 Materialien

6.1.2.1 Chromatographie

| | |
|-----------------------------|---|
| Dünnschichtchromatographie: | DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F ₂₅₄), Fa. Merck |
| | Detektion: UV (254 nm), MinUVIS, Fa. Desaga, Ninhydrin (1mg/mL in EtOH/AcOH 100:3, anschließend Erhitzen) |
| Flashchromatographie: | Kieselgel 60 (40-63 µm), Fa. Merck |
| Säulenchromatographie: | Kieselgel 60 (63-200 µm), Fa. Merck |

6.1.2.2 Lösungsmittel

Die Lösungsmittel werden vor Gebrauch destilliert und nach gängigen Methoden absolutiert.

| | |
|-------------------------------|--|
| Chloroform: | Fluka p.a., direkt vor der Verwendung durch 2 cm hoch mit basischem Aluminiumoxid gefüllte Pipette filtriert |
| Dichlormethan: | Calciumchlorid, anschließend Calciumhydrid |
| Diethylether: | Kaliumhydroxid, anschließend Natrium |
| <i>N,N</i> -Dimethylformamid: | Ninhydrin, anschließend Vakuumdestillation bei 55 mbar |
| Ethylacetat: | Calciumchlorid |
| THF: | Kaliumhydroxid, Calciumhydrid, abschließend Natrium |
| Acetonitril für HPLC: | Merck (gradient grade) |
| Wasser, reinst: | Reinstwasseranlage Milli-Q Biocell, Fa. Millipore |
| TFA für HPLC: | Solvay Fluor and Derivative GmbH |

6.1.2.3 Chemikalien

Aminosäurederivate, Harze und Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen Advanced ChemTec, Aldrich, Bachem, Biacore, Fluka, Iris Biotech, Merck und Novabiochem erworben.

| | |
|---------------------------|---|
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure: | Fluka purum. sublimiert |
| Iodacetonitril: | Fluka p.a., direkt vor der Verwendung durch eine 2 cm hoch mit basischem Aluminiumoxid gefüllte Pipette filtriert |

Zur Herstellung der Puffer wurden folgende Chemikalien verwendet:

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| NaCl: | AppliChem, für die Zellkultur |
| KH ₂ PO ₄ : | Fluka Biochemika, MicroSelect |
| NaOH: | Fluka Biochemika, MicroSelect |
| HCl: | Merck, Titrisol |

6.1.3 DNA-Sequenzen

6.1.3.1 DNA-Sequenz EcoPho1-1 als komplementäre DNA für PhoB

```
CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTACCGTCAT
CTTCGGCTACTTTTTCTCTGTACAGAAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAAT
GTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTAAATCAGACTGAAGACTTTATCTCTCTGT
CATAAACTGTCATATTCCTTACATATAACTGTCACCTGTTTGTCCTATTTTGCTTCTCGT
AGCCAACAAACAATGCTTTATGAATCCTCCAGGAGACATTATGAAAGTTATGCGTACCAC
CGTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
```

6.1.3.2 DNA-Sequenz Kofra Ge als komplementäre DNA für ExpG

```
CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTGCTCAAGA
GCACGCAATTTTCGGGGCAGGGGTGTTATGAAATTAAGTTTGAAGTAATTTCCG
GAATTGGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
```


6.1.3.3 DNA-Sequenz pFPR- Fragment aus EBNA als Referenz-DNA

CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCT
GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGGGATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGAGCTT
ATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAGATCCATTTTGGCTTGAAGCCAATATGATG
GATCTAGAGGATCCATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATAGGATCCAATTCTTGAAGACG
AAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAG
GGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT

6.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

6.2.1 Beladung des Safety-Catch-Harzes^[155]

Das aliphatische Safety-Catch-Harz wird in Chloroform gequollen. Es werden fünf Äquivalente (auf die Beladung des Harzes bezogen) DIPEA und drei Äquivalente der Fmoc-geschützten Aminosäure hinzugegeben. Nach 10 min Rühren wird das Gemisch auf -20 °C gekühlt (Aceton / Trockeneis). Nach weiteren 20 min werden drei Äquivalente PyBoP dazugegeben. Nach 8 h Rühren bei -20 °C wird abgesaugt und die Mischung dreimal mit je 5 mL Chloroform gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

6.2.2. Beladung des 2-Cl-Trt-Harzes

6.2.2.1 Beladung des 2-Cl-Trt-Harzes^[549]

Es werden 1.1 Äquivalente der Aminosäure (auf die Beladung des Harzes bezogen) in 10 mL getrocknetem DCM pro Gramm Harz gelöst, die Lösung wird zu im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknetem 2-Cl-Trt-Harz gegeben und 5 min geschüttelt. Nach Zugabe von 1.5 Äquivalenten DIPEA wird weitere 60 min geschüttelt. Zum Cappen eventuell vorhandener, nicht abreagierter Linker auf dem Harz werden 15 Äquivalente MeOH hinzugegeben und weitere 15 min lang geschüttelt. Zur Reinigung wird dreimal mit je 3 mL DCM, zweimal mit je 3 mL DMF, zweimal mit je 3 mL DCM und dreimal mit je 3 mL MeOH gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

6.2.2.2 Modifizierung des 2-Cl-Trt-Harzes mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan

Das Harz wird 30 min in DCM gequollen. Anschließend werden 10mL /g Harz 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan zu Harz gegeben und 1h geschüttelt. Abschließend wird das überstehende 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan entfernt und mehrfach mit DCM gewaschen. Anschließend werden 10mL DCM und 1mL Methanol pro g Harz hinzugegeben und über Nacht geschüttelt um mögliche nicht abreagierte Bindungsstellen zu deaktivieren. Anschließend wird das Harz mehrfach mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.2.2.3 Beladung des modifizierten 2Cl-Trt-Harz mit der ersten Aminosäure

Um die erste Aminosäure an das mit dem Linker modifizierte 2Cl-Trt-Harz zu koppeln, wird dies 30 min in DMF gequollen. Anschließend werden 1.5 Äquivalente TBTU, 1.5 Äquivalente der Aminosäure und 3 Äquivalente DIPEA in DMF hinzugegeben, jeweils bezogen auf die Beladung des Harzes. Nach 2h Schütteln wird das Reaktionsgemisch vom Harz entfernt, und das Harz mehrmals mit DMF und anschließend mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.2.3 Spektrophotometrische Bestimmung der Beladung des Harzes^[550]

Ungefähr 1 mg trockenes Harz wird eingewogen und in 3 mL einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % v/v) mehrere Minuten geschüttelt (Fmoc-Leu-SC mind. 4 min, Fmoc-Arg(Pbf)-SC mind. 20 min). Nachdem sich das Harz abgesetzt hat, wird gegen eine Lösung von Piperidin in DMF (20 % v/v) die Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes bei 290 nm gemessen. Nach der Formel

$$c = \frac{A}{1.65 \times m} \quad (10)$$

mit c als Konzentration, A als Absorption und m als der eingewogenen Masse des Harzes, wird die Beladung berechnet.

6.2.4 Manuelle Kupplung der Aminosäuren

Das Harz wird 20 min in DMF quellen gelassen. Es werden 3 Äquivalente der Aminosäure, auf die Beladung des Harzes bezogen, und 3 Äquivalente TBTU, in jeweils 0.75 mL DMF gelöst, sowie sechs Äquivalente DIPEA hinzugegeben. Nach 60 min Schütteln wird abgesaugt und viermal mit je 5 mL DMF gewaschen.

6.2.5 Manuelle Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Das Harz wird 15 min mit 5 mL einer Lösung von 5 % Piperidin und 5 % DBU in DMF behandelt, zweimal mit je 5 mL DMF gewaschen, nochmals 15 min mit 5 mL einer

Lösung von 5 % Piperidin und 5 % DBU in DMF behandelt, und viermal mit je 5 mL DMF gewaschen.

6.2.6 Acetylierung des Peptids

Das Harz wird 30 min in 5 mL DMF quellen gelassen. Anschließend werden, auf die Beladung des Harzes bezogen, 1 Äquivalent Essigsäureanhydrid sowie 2 Äquivalente Pyridin hinzugegeben und 1 h lang geschüttelt. Dann wird fünfmal mit je 5 mL DMF und dreimal mit je 5 mL DCM gewaschen. Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet.

6.2.7 Aktivierung des Safety-Catch-Harzes nach der Peptidsynthese^[155]

Das Harz wird in NMP quellen gelassen, fünf Äquivalente DIPEA und 20 Äquivalente Iodacetonitril werden zum Reaktionsgemisch gegeben. Das Reaktionsgefäß wird vor Licht geschützt und mit Argon gespült. Es wird 24 h lang geschüttelt, abgesaugt und fünfmal mit je 10 mL NMP, jeweils mindestens 10 min, dreimal mit je 5 mL DCM und dreimal mit je 5 mL DMF gewaschen.

6.2.8 Präparation der harzgebundenen Proben für MALDI-ToF-MS Untersuchungen

Wenige Harzkügelchen werden 10 min mit einer Lösung von 1.5 % TFA in DCM behandelt, bis eine deutliche Verfärbung auftritt. 2 µL der enthaltenen Lösung werden mit 1 µL einer DHB-Lösung (1% w/v) in Wasser vermischt und auf den Probenträger gegeben. Dieser wird im Wasserstrahlpumpenvakuum im Exsiccator getrocknet.

6.2.9 Automatische Synthese der Peptide

Die Synthese der geschützten Peptide erfolgt mit Hilfe eines Syntheseautomaten mit dem folgendem Syntheseprotokoll für die Kupplung:

- Entschützung der harzgebundenen Aminosäure
- Waschen
- Kupplung der nächsten Aminosäure
- Waschen

Das beladene Harz muß vor dem ersten Zyklus der Peptidsynthese quellen.

Die letzte Aminosäure wird entschützt und anschließend gewaschen.

6.2.9.1 Quellen des Harzes

In die mit beladenem Harz befüllten Reaktionskammern werden je 5 mL DMF injiziert, und 30 min ruhen gelassen. Anschließend wird das DMF entfernt.

6.2.9.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

6.2.9.2.1 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 1

Das gequollene Harz wird 3 min lang mit 5 mL einer Lösung aus 2 % Piperidin und 2 % DBU in DMF geschüttelt und die Lösung anschließend entfernt. Erneut werden 5 mL der Abspalllösung zugegeben und abwechselnd insgesamt dreimal 3 min geschüttelt und zweimal 2 min stehen gelassen, bevor die Lösung vom Harz entfernt wird.

6.2.9.2.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 2

Das gequollene Harz wird 4 min lang mit 5 mL einer Lösung von 20 % Piperidin in DMF (v/v) geschüttelt und die Lösung anschließend entfernt. Erneut werden 5 mL der Abspalllösung zugegeben und abwechselnd insgesamt dreimal 4 min geschüttelt und zweimal 2 min stehen gelassen, bevor die Lösung vom Harz entfernt wird.

6.2.9.2.3 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Methode 3

Das gequollene Harz wird 4 min lang mit 5 mL einer Lösung von 6% Piperazin in DMF (w/v) geschüttelt und die Lösung anschließend entfernt. Erneut werden 5 mL der Abspalllösung zugegeben und abwechselnd insgesamt dreimal 4 min geschüttelt und zweimal 2 min stehen gelassen, bevor die Lösung vom Harz entfernt wird.

6.2.9.3 Waschen nach der Abspaltung der Schutzgruppe

Das Harz wird neunmal mit je 4 mL DMF unter Schütteln gewaschen.

6.2.9.4 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure

6.2.9.4.1 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure Methode 1

Es werden 3 Äquivalente der Fmoc-Aminosäurelösung, 3 Äquivalente TBTU-Lösung und 6 Äquivalente DIPEA, jeweils in DMF gelöst, hinzugegeben. Innerhalb von 54 min wird abwechselnd geschüttelt und stehengelassen. Danach wird die Reaktionsmischung entfernt.

6.2.9.4.2 Kupplung der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure Methode 2, Doppelkupplung

Es werden 1.5 Äquivalente der Fmoc-Aminosäurelösung, 1.5 Äquivalente TBTU-Lösung und 3 Äquivalente DIPEA, jeweils in DMF, gelöst hinzugegeben. Innerhalb von 45 min wird abwechselnd geschüttelt und stehengelassen. Danach wird die Reaktionsmischung entfernt. Der Vorgang wird wiederholt, und nochmals 1.5 Äquivalente der Fmoc-Aminosäurelösung, 1.5 Äquivalente TBTU-Lösung und 3 Äquivalente DIPEA, jeweils in DMF gelöst, werden hinzugegeben. Nach 45 min abwechselndem Schütteln und Ruhen lassen wird das Reaktionsgemisch entfernt.

6.2.9.5 Waschen nach der Kupplung

Das Harz wird insgesamt viermal mit je 4 mL DMF gewaschen.

6.2.9.6 Trocknen nach der Synthese

Zum Trocknen des Harzes nach der Synthese wird für 30 min N₂ durch das Harz geleitet.

6.2.10 Abspaltung des Peptids vom aktivierten Safety-catch-Harz

Es werden 3 Äquivalente *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan zum in DMF unter Argon gequollenen Harz hinzugegeben. Nach Schütteln über Nacht wird das Harz abfiltriert und 6x mit jeweils 4 mL DMF und 2x mit jeweils 4 mL DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockne eingengt.

6.2.11 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz

6.2.11.1 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 1

Das 30 min in DCM gequollene Harz wird 10x mit jeweils 2 mL einer Lösung von 1% TFA in DCM behandelt. Anschließend wird das Harz noch 10x mit jeweils 2 mL DCM gewaschen, und die organischen Phasen bis zur Trockne im Vakuum eingengt.

6.2.11.2 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 2

Das Harz wird 10x mit jeweils 5 mL DCM gewaschen, das DCM wird verworfen. Es wird 3x mit je 3 mL HFIP/DCM 1/4 (v/v) behandelt und anschließend 6x mit jeweils 4 mL DCM gewaschen. Die organischen Phasen werden bis zur Trockne im Vakuum eingengt.

6.2.11.3 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 3

Das 30 min in DCM gequollene Harz wird 10x mit jeweils 2 mL einer Lösung von 0.5% TFA in DCM behandelt. Anschließend wird das Harz noch 10x mit jeweils 2 mL DCM gewaschen, und die organischen Phasen bis zur Trockne im Vakuum eingengt.

6.2.11.4 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 4

Das 30 min in DCM gequollene Harz wird 5x abwechselnd mit jeweils 5 mL 5% TFA in DCM und DCM behandelt. Abschließend wird noch 3x mit jeweils 10 mL DCM gewaschen, und die organischen Phasen bis zur Trockne im Vakuum eingengt.

6.2.11.5 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 5

Zu dem 30 min in DCM gequollenen Harz werden 5 mL/g Harz einer Lösung von 95% TFA, 2.5% TIPS und 2.5% gegeben. Nach 3h Schütteln wird die vom Harz getrennte Lösung in 50 mL eiskalten Et₂O getropft und 20 min zur Präzipitation im Kühlschrank stehen gelassen. Anschließend werden 40 mL Wasser hinzugegeben, 3 min geschüttelt und die Et₂O-Phase abgetrennt. Letztere wird noch 3x mit jeweils 10 mL Wasser ausgeschüttelt. Die wäßrigen Phasen werden vereinigt und lyophilisiert.

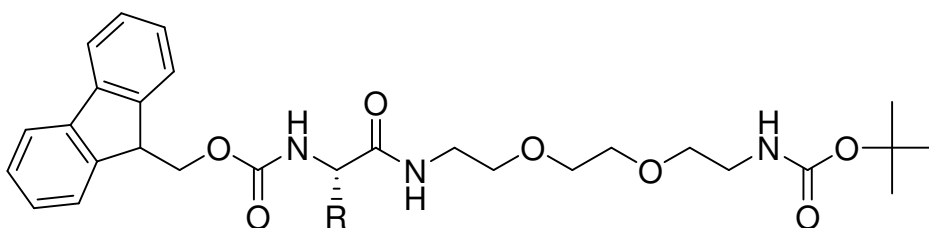
6.2.11.6 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 6

Das 30 min in DCM gequollene Harz wird 4x mit jeweils 5 mL einer Lösung aus 50% TFA, 47.5% DCM und 2.5% TIPS für jeweils 10 min behandelt. Anschließend wird das Harz noch 5x mit jeweils 5 mL DCM für jeweils 10 min gewaschen, und die organische Phase wird auf ca. 5 mL eingengt. Die Lösung wird in 50 mL-Zentrifugen-Röhrchen getropft, die mit 40 mL eiskalten Ether gefüllt sind. Nach Präzipitation im Kühlschrank über Nacht werden die Röhrchen bei 0°C und 4000 rpm (3220 x g) 1h zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und das Präzipitat in Wasser gelöst. Abschließend wird die Lösung lyophilisiert.

6.2.11.7 Abspaltung des Peptids vom 2Cl-Trt-Harz Methode 7

Das für 30 min in DCM gequollene Harz wird 4x mit jeweils 5 mL einer Lösung aus 95% TFA, 2.5% DCM und 2.5% TIPS für jeweils 10 min behandelt. Anschließend wird das Harz noch 5x mit jeweils 5 mL DCM für jeweils 10 min gewaschen, und die organischen Phasen werden auf ca. 5 mL eingengt. Der Rest wird in 50 mL-Zentrifugen-Röhrchen getropft, die mit 40 mL eiskalten Ether gefüllt sind. Nach Präzipitation im Kühlschrank über Nacht werden die Röhrchen zentrifugiert (3220 x g), der Überstand dekantiert, und das Präzipitat in Wasser gelöst. Abschließend wird die Lösung lyophilisiert.

6.2.12 Kondensation von Fmoc-Xaa-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan



19

Zur Kondensation von Fmoc-Xaa-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan werden 1.5 Äquivalent EDC•HCl und 1.5 Äquivalent NMM in auf 0°C gekühltem DCM gelöst. Es werden 1.5 Äquivalent HOBt•H₂O und 1 Äquivalent Fmoc-

Xaa-OH in DCM hinzugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wird 1 Äquivalent des mono-geschützten Linkers *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaocan in wenig DCM hinzugegeben. Nach 2h Rühren im Eisbad werden 50 mL DCM hinzugegeben, und 3x mit 10% Zitronensäure in Wasser (w/v) sowie je 2x mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Anschließend wird über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne im Vakuum eingeeengt.

6.2.13 Aufreinigung der Peptide mittels semipräparativer RP-HPLC

Zur Reinigung wird das lyophilisierte Rohpeptid in möglichst wenig Wasser unter Zugabe von wenig TFA gelöst, jedoch maximal 50 mg Rohprodukt in 1 mL Lösung. Für den ersten Lauf mit einem Peptid wird immer die Standard-Methode 1 verwendet. Bei diesem Lauf wird jeder Peak aufgefangen und anschließend mittels MALDI-ToF-MS untersucht. Anhand der in den jeweiligen Fraktionen bei der Untersuchung gefundenen Peptide wird die HPLC-Methode für die übrigen Läufe mit diesem Rohpeptid entsprechend abgeändert. Hierbei wird die t_R der gewünschten Peptide ($t_{R\text{ Pep}}$) betrachtet, von diesem die t_R des Injektionspeak ($t_{R\text{ Inj}}$) abgezogen, und dann berechnet, welches Verhältnis der Eluenten zu diesem Zeitpunkt $t_{R\text{ Ber}}$ vorliegt.

$$t_{R\text{ Ber}} = t_{R\text{ Pep}} - t_{R\text{ Inj}} \quad (11)$$

Als neue Methode wird dann eine Methode verwendet, bei der innerhalb von 5 min der Gradient auf das Verhältnis erhöht wird, das in der ursprünglichen Methode 5 Minuten vor dem bestimmten Verhältnis liegt. Anschließend wird der Gradient über 30 min so verändert, daß er am Ende dem Wert 5 min nach dem bestimmten Verhältnis entspricht. Um die Säule komplett zu reinigen, wird dann innerhalb von 5 Minuten auf 100% Eluent B erhöht, und anschließend über 5 Minuten auf 100% Eluent 1 umgestellt.

| Zeit | Eluent A | Eluent B |
|--------|--|----------|
| 0 | 100% | 0% |
| 5 min | Verhältnis wie bei $t_{R\text{ Ber}} - 5\text{ min}$ | |
| 35 min | Verhältnis wie bei $t_{R\text{ Ber}} + 5\text{ min}$ | |
| 40 min | 0% | 100% |
| 45 min | 100% | 0% |

Dies führt zu einer besseren Trennung der Peptide in dem für das jeweilige Peptid interessanten Bereich. Sollte die Reinheit nach dem ersten Reinigungslauf des Peptides nicht ausreichend sein, kann diese Prozedur so lange wiederholt werden, wie noch zu reinigendes Peptid wiedergewonnen werden kann. Hierbei kann auch das Zeitintervall weiter verringert werden, von ± 5 min auf einen beliebig kleinen Bereich. Bei den meisten Peptiden reichten zwei aufeinanderfolgende Läufe mit verschiedenen Gradienten, nur selten wurden mehrere, bis zu fünf, Läufe benötigt.

Nach der Reinigung wird die Reinheit des Peptids mittels analytischer RP-HPLC mit Methode 1 bestimmt, die Fraktionen entsprechend vereinigt und das Produkt lyophilisiert.

6.3 Peptidsynthesen

6.3.1 Versuch der Synthese von AcPhoB(190-209)Linker aus *E. coli* Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker am Safety-catch-Harz 5

Der Versuch der Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.1** mit Fmoc-Gly-OH beladenen Safety-catch-Harz. Die Synthese des Peptids wird automatisiert im Peptidsynthesizer durchgeführt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF versetzt. Die Kupplung erfolgt mit 3 Äquivalenten TBTU und 6 Äquivalenten DIPEA sowie 3 Äquivalenten des entsprechenden Aminosäurederivates bezogen auf die Beladung des Harzes. Die Acetylierung erfolgt nach **6.2.6**. Die Aktivierung des Safety-catch-Harzes wird entsprechend **6.2.7** durchgeführt, die anschließende Abspaltung erfolgt nach **6.2.10**.

Um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, wird der Rückstand in 5 mL einer Lösung von 5% TIPS in TFA gelöst und 6 h geschüttelt.

Nach der Abspaltung ist kein Produkt in den Spektren des MALDI-ToF-MS zu sehen.

6.3.2 Synthese des N-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus *S. meliloti* Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-OH am 2Cl-Trt-Harz 6

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt Harz. Sie wird automatisiert im Syntheseautomaten durchgeführt, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Die Abspaltung des voll geschützten Peptids erfolgt nach **6.2.11.1**. Anschließend wird das Peptid mittels RP-HPLC aufgereinigt. Das Produkt konnte erst nach mehreren Läufen von der HPLC eluiert werden, war jedoch nicht rein.

6.3.3 Versuch einer Synthese des C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)**Linker aus *S.meliloti* Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH am Safety-catch-Harz 7**

Der Versuch der Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.1** mit Fmoc-Ser(^tBu)-OH beladenen Safety-catch-Harz. Die Synthese des Peptids wird automatisiert im Peptidsynthesizer durchgeführt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF versetzt. Die Kupplung erfolgt mit 3 Äquivalenten TBTU und 6 Äquivalenten DIPEA sowie 3 Äquivalenten des entsprechenden Aminosäurederivates bezogen auf die Beladung des Harzes. Die Aktivierung des Safety-catch-Harzes wird entsprechend **6.2.7**, die anschließende Abspaltung erfolgt nach **6.2.10**.

Um die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten, wird der Rückstand in 5 mL einer Lösung von 5% TIPS in TFA gelöst und 6 h geschüttelt. Nach der Abspaltung ist kein Produkt in den Spektren des MALDI-ToF-MS zu sehen.

6.3.4 Manuelle Synthese des C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus *S. meliloti* Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH am 2Cl-Trt-Harz 8

Die manuelle Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-Ser(^tBu)-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt nach **6.2.5**, die Kupplung nach **6.2.4**. Die Abspaltung des voll geschützten Peptids erfolgt nach **6.2.11.2**. Eine Aufreinigung erfolgt nicht, da das Rohprodukt eingesetzt werden soll.

Summenformel: C₁₀₃H₁₄₇N₁₇O₂₀S₂

Molmasse berechnet: 2007.5559

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2008.0 (M+H⁺), 2030.0 (M+Na⁺)

Ausbeute: 92.2 mg (0.05 mmol, 35%)

6.3.5 Versuch einer Synthese des C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus *S. meliloti* Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OH am 2Cl-Trt-Harz 9

Der Versuch der Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-Ser(^tBu)-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Sie wird automatisiert im Syntheseautomaten durchgeführt. Die Kupplung erfolgt mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Von der einen Hälfte des Harzes wird das Peptid nach **6.2.11.2** abgespalten, es soll das Rohprodukt verwendet werden. Das vollgeschützte Peptid konnte nicht erhalten werden, da laut MALDI-ToF-MS auch eine Tritylschutzgruppe abgespalten wurde.

6.3.6 Versuch einer Synthese des C-terminal Trityl-geschützten C-terminalen Fragmentes von AcPhoB(190-209)Linker aus *S. meliloti* Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-OTrt 10

Zur Einführung der C-terminalen Schutzgruppe wird das Rohprodukt des Peptids **8** in 2 mL DMF gelöst. Für die Berechnung der einzusetzenden Äquivalente der Reagenzien wird von 100% Reinheit des Rohproduktes ausgegangen. Dementsprechend wird bei vollständigem Einsatz der 92 mg von 0.05 mmol Peptid ausgegangen, und es werden 0.20 mmol (36µL) DIPEA dazugegeben, 17 mg (0.06 mmol) 2ClTrt-Cl in 500 µL DMF gelöst, dazugegeben und mit 500µL DMF nachgespült. Es können kein Produkt und keine definierten Fragmente im MALDI-ToF-MS nachgewiesen werden.

6.3.7 Versuch einer Fragmentkondensation des C-terminalen Fragmentes 10 und des N-terminalen Fragment 6 zu AcPhoB(190-209)Linker [*S. meliloti*] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 11a am 2Cl-Trt-Harz

Zur Fragmentkondensation wird ein Aliquot des harzgebundenen Peptids **9** in 500 µL DMF quellen gelassen. Zu der Lösung von **9** werden 5 µL (0.026 mmol) DIPEA gegeben. Es werden 23.5 mg (0.013 mmol) **8** in 750 µL DMF und 5 mg (0.013 mmol) HATU in 500µL DMF gelöst. Die HATU-Lösung wird zu **9** gegeben, anschließend die Lösung von

8. Bei beiden wird mit 500 μ L DMF nachgespült. Nach 18 h ist kein Produkt in den Spektren des MALDI-ToF-MS zu sehen. Nach 2 Tagen werden nochmals 5 mg (0.013 Äquivalente HATU) dazugegeben. Es ist kein vollgeschütztes Peptid im MALDI-ToF-MS zu finden, nur noch undefinierbare Fragmente.

6.3.8 Versuch der Synthese des PhoB(190-209) [*S. meliloti*] am 2Cl-Trt-Harz mit anschließender C-terminaler Funktionalisierung 11b

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-(Bzl)-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz im Syntheseautomaten mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF zur Abspaltung der temporären Schutzgruppe und mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA sowie 3 Äquivalenten des entsprechenden Aminosäurederivates bezogen auf die Beladung des Harzes zur Kupplung. Es gelingt weder mit **6.2.11.2** noch mit **6.2.11.3** oder mit 0.5 %TFA in DCM das Peptid vollständig geschützt abzuspalten.

6.3.9 Synthese der PhoB-Varianten am 2Cl-Trt-Harz mit modifizierter C-terminaler Aminosäure

6.3.9.1 Kondensation von Fmoc-Leu-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan 12

Die Kondensation erfolgt entsprechend **6.2.12**. Zur Abspaltung der C-terminale Boc-Schutzgruppe wird das Rohprodukt in 5 mL EtOAc gelöst und 2 mL TFA dazu gegeben. Nach 90 min ist die Abspaltung noch nicht komplett. Es wird zur Trockne eingengt, in 5mL DCM aufgenommen und 2 mL TFA dazu gegeben. Nach 90 min ist die Umsetzung vollständig, und es wird zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch mit EtOAc als Lösungsmittel.

Summenformel: $C_{27}H_{37}N_3O_5$

Molmasse berechnet: 483.5998

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 485.1 ($M+H^+$), 508.5 ($M+Na^+$)

Ausbeute: 409 mg (0.84 mmol, 88%)

R_f (EtOAc): 0.59

6.3.9.2 Kondensation von Fmoc-Ser(Bzl)-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan 13

Die Kondensation erfolgt entsprechend **6.2.12**. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch mit EtOAc. Es werden 0.267 g noch geschütztes Konstrukt erhalten. Zur Abspaltung der C-terminale Boc-Schutzgruppe wird das Rohprodukt in 5mL DCM aufgenommen und 2 mL TFA dazu gegeben. Nach 90 min ist die Umsetzung vollständig, und es wird zur Trockne eingengt. Das Produkt wird in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Summenformel: C₃₁H₃₇N₃O₆

Molmasse berechnet: 547.6420

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 549.3 (M+H⁺), 571.5 (M+Na⁺), 587.3 (M+K⁺)

Ausbeute: 202 mg (0.42 mmol, 42%)

R_f (EtOAc): 0.15

6.3.9.3 Kondensation von Fmoc-Gly-OH mit *N*-tert-Butoxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan 14

Die Kondensation erfolgt entsprechend **6.2.12**. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch mit EtOAc. Zur Abspaltung der C-terminalen Boc-Schutzgruppe wird das Rohprodukt in 5mL DCM aufgenommen und mit 2 mL TFA versetzt. Nach 90 min ist die Umsetzung vollständig, und es wird zur Trockne eingengt. Das Produkt wird in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Summenformel: C₂₃H₂₉N₃O₅

Molmasse berechnet: 427.4935

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 428.7 (M+H⁺)

Ausbeute: 466 mg (0.92 mmol, 92%)

R_f (EtOAc): 0.47

6.3.9.4 Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [*S. meliloti*] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 15

Die Beladung des Harzes erfolgt entsprechend **6.2.2.1** mit der modifizierten Aminosäure Fmoc-Ser(Bzl)-Linker. Die Peptidsynthese erfolgt im Syntheseautomaten mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure bei der Kupplungsreaktion, die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit je 2% DBU und Piperidin in DMF. Die Acetylierung erfolgt entsprechend **6.2.6**, die Abspaltung entsprechend **6.2.11.4**. Um die Schutzgruppen vollständig zu entfernen, wird das Produkt über Nacht in 10mL 76% TFA, 13% Wasser, 8% Thioanisol und 3% TIPS 18 h geschüttelt. Anschließend werden 40 mL Wasser hinzugegeben, und zur Trockne eingengt. Es wird in wenig DCM aufgenommen und die Lösung in eiskalten Ether getropft. Es wird 1 h bei 4000 rpm (3220 x g) und 0°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Produkt in Wasser gelöst und lyophilisiert. Zur Abspaltung der Bzl-Schutzgruppe wird das Rohprodukt in 2 mL MeOH und 2 mL Wasser gelöst. Es werden 22 mg Pd/Aktivkohle (10% Pd) dazugegeben und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 18 h Rühren wird zur Trockne eingengt, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Anschließend wird das Peptid HPL-chromatographisch gereinigt.

Summenformel: C₁₀₈H₁₈₂N₃₅O₃₂

Molmasse berechnet: 2482.8796

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2482.8 (M+H⁺), 2504.6 (M-H⁺+2534.52x Na⁺)

Ausbeute: 0.8 mg (0.3 µmol, 0.05%)

6.3.9.5 Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [*E. coli*] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 16

Die Beladung des Harzes erfolgt entsprechend **6.2.2.1** mit der modifizierten Aminosäure Fmoc-Gly-Linker. Die Peptidsynthese erfolgt im Syntheseautomaten mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure, die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit je 2% DBU und Piperidin in DMF. Das Harz wird geteilt. Das Peptid der einen Hälfte des Harzes wird manuell mit Fmoc-Val-OH verlängert, nach **6.2.4** und **6.2.5**. Die Acetylierung erfolgt entsprechend **6.2.6**, die Abspaltung entsprechen **6.2.11.5**. Abschließend wird mittels HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₀₉H₁₉₀N₃₇O₃₂

Molmasse berechnet: 2530.9679

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2538.0 (M+H⁺), 2560.7 (M+Na⁺)

Ausbeute: 22.4 mg (8.9 µmol, 6%)

t_R: 14.1 min

6.3.9.6 Versuch der Synthese der V190M Variante von AcPhoB(190-209)Linker *E. coli* Ac-Met-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 17

Die andere Hälfte des Harzes von **16** wird manuell mit Fmoc-Met-OH verlängert, nach **6.2.5** und **6.2.4** Die Acetylierung erfolgt entsprechend **6.2.6**, die Abspaltung entsprechend **6.2.11.5**. Abschließend wird mittels HPLC aufgereinigt. Es kann kein Produkt isoliert werden.

6.3.10 Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [*E. coli*] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 18 am modifizierten 2Cl-Trt-Harz

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.2** modifizierten und nach **6.2.2.3** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure.. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Nach Acetylierung entsprechend **6.2.6** erfolgt die Abspaltung nach **6.2.11.6**. Anschließend wird das Peptid mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₀₉H₁₉₀N₃₇O₃₂

Molmasse berechnet: 2530.9679

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2529.32 (M+H⁺), 2551.02 (M+Na⁺)

Ausbeute: 2.53 mg (1 µmol, 1%)

t_R: 21.0 min

6.3.11 Versuch der Synthese von AcPhoB(190-209)Linker [*S. meliloti*] Ac-Val-Asp-Glu-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Val-Gly-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Asn-Phe-Ser-Linker 19 am modifizierten 2Cl-Trt-Harz

Der Versuch der Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.2** modifizierten und nach **6.2.2.3** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Sie wird automatisiert im Syntheseautomaten durchgeführt, mit 3 Äquivalenten TBTU, 6 Äquivalenten DIPEA und 3 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, also zweimal nacheinander ohne zwischenzeitliche Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Nach Acetylierung entsprechend **6.2.6** erfolgt die Abspaltung nach **6.2.11.6**. Es kann kein Produkt nachgewiesen werden.

6.3.12 Synthese der Peptide für den Ala-Scan und den Arg-Scan

Die Synthese der Peptide erfolgt am nach **6.2.2.2** modifizierten und nach **6.2.2.3** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Nach Acetylierung entsprechend **6.2.6** erfolgt die Abspaltung nach **6.2.11.7**. Anschließend werden die Peptide mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Tab. 19: Synthetisierte Derivate von PhoB(190-209) [*E. coli*]

| | Sequenz | M _{gem} MALDI-TOF MS | M _{ber} | t _R | Ausbeute |
|-----------|----------------------|-------------------------------|------------------|----------------|----------|
| 20 | VADRTVDVHIRRLRKALEPG | 2475.40 (M+H ⁺) | 2472.9303 | 13.6 min | 3 % |
| 21 | VEDATVDVHIRRLRKALEPG | 2446.48 (M+H ⁺) | 2445.8586 | 14.3 min | 4 % |
| 22 | VEDRAVDVHIRRLRKALEPG | 2500.80 (M+H ⁺) | 2500.9411 | 13.7 min | 7 % |
| 23 | VEDRTVDVAIRRLRKALEPG | 2485.45 (M+Na ⁺) | 2464.9051 | 18.7 min | 8 % |
| 24 | VEDRTVDVHIARLRKALEPG | 2447.00 (M+H ⁺) | 2445.8586 | 16.1 min | 7 % |
| 25 | VEDRTVDVHIRALRKALEPG | 2485.6 (M+K ⁺) | 2445.8586 | 16.7 min | 9 % |
| 26 | VEDRTVDVHIRRLAKALEPG | 2445.73 (M+H ⁺) | 2445.8586 | 24.7 min | 24% |
| 27 | VEDRTVDVHIRRLRAALEPG | 2512.50 (M+K ⁺) | 2473.8720 | 14.3 min | 8 % |
| 31 | VEDRTVRVHIRRLRKALEPG | - | 2572.0667 | - | - |
| 32 | VEDRTVDRHIRRLRKALEPG | 2584.46 (M+H ⁺) | 2588.0231 | 15.0 min | 9 % |
| 33 | VEDRTVDVHIRRLRKALRPG | 2558.66 (M+H ⁺) | 2558.0396 | 14.8 min | 8 % |
| 34 | VEDRTVRVHIRRLRKALRPG | 2594.45 (M+H ⁺) | 2599.1384 | 13.2 min | 9 % |
| 35 | VEDRTVDRHIRRLRKALRPG | 2612.80 (M+H ⁺) | 2615.0948 | 13.2 min | 5 % |

6.3.13 Synthese von AcPhoB(190-209) [*E. coli*] Ac-Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-OH 28

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Nach Acetylierung entsprechend **6.2.6** erfolgt die Abspaltung nach **6.2.11.7**. Anschließend wird das Peptid mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₀₃H₁₇₆N₃₅O₃₁

Molmasse berechnet: 2400.7763

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2396.38 (M+H⁺), 2418.57 (M+Na⁺)

Ausbeute: 4.9 mg (2 µmol, 2%)

t_R: 13.9 min

6.3.14 Synthese von PhoB(190-209)Linker [*E. coli*] Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-Linker 29

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.2** modifizierten und nach **6.2.2.3** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Die Abspaltung erfolgt nach **6.2.11.7**. Anschließend wird das Peptid mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₀₇H₁₉₂N₃₇O₃₁

Molmasse berechnet: 2492.9618

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2497.51

Ausbeute: 13.7 mg (5.5 µmol, 5.5%)

t_R: 13.0 min

6.3.15 Synthese von PhoB(190-209) [*E. coli*] Val-Glu-Asp-Arg-Thr-Val-Asp-Val-His-Ile-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Glu-Pro-Gly-OH 30

Die Synthese des Peptids erfolgt am nach **6.2.2.1** mit Fmoc-Gly-OH beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Die Abspaltung erfolgt nach **6.2.11.7**. Anschließend werden die Peptide mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₀₁H₁₇₅N₃₅O₃₀

Molmasse berechnet: 2359.7464

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 2355.86 (M+H⁺), 2377.64 (M+Na⁺)

Ausbeute: 21.8 mg (9.2 µmol, 9.2 %)

t_R: 13.0 min

6.3.16 Synthese der 15er Peptide aus ExpG [*S. meliloti*]

Die Synthese der Peptide erfolgt am nach **6.2.2.1** mit der entsprechenden C-terminalen Aminosäure beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Die Abspaltung erfolgt nach **6.2.11.7**. Anschließend wird Reinheit der Peptide mittels RP-HPLC bestimmt.

Tab. 20: Für das Epitope Mapping synthetisierte 15mer- und 16mer-Peptide

| | Sequenz | M _{gem} MALDI-ToF MS | M _{ber} | Reinheit gemäß RP-HPLC (%) |
|-----------|-----------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| 36 | MERGMNHRILYPFAD | 1848.8763 | 1848.4 | 13 |
| 37 | NHRILYPFADFGDTV | 1763.8631 | 1763.1 | 10 |
| 38 | YPFADFGDTVAILPA | 1595.7872 | 1595.5 | 14 |
| 39 | FGDTVAILPANETQR | 1630.8315 | 1630.4 | 11 |
| 40 | AILPANETQRKGLDT | 1625.8737 | 1624.4 | 27 |
| | | | | |
| 41 | NETQRKGLDTPVDDR | 1742.8547 | 1744.5 | 12 |
| 42 | KGLDTPVDDRDGDDS | 1603.6962 | 1603.8 | 10 |
| 43 | PVDDRDGDDSLVTF | 1712.7530 | 1711.0 | 34 |

Tab. 21: Für das Epitope Mapping synthetisierte 15mer- und 16mer-Peptide

| | Sequenz | M _{gem} MALDI-ToF MS | M _{ber} | Reinheit gemäß RP-HPLC (%) |
|----|------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| 44 | DGDDSLVTYFELARV | 1698.8101 | 1699.3 | 23 |
| 45 | LVTYFELARVMERAS | 1783.9291 | 1783.5 | 15 |
| | | | | |
| 46 | ELARVMERASRRFSG | 1763.9213 | 1767.8 | 33 |
| 47 | MERASRRFSGLLRAE | 1777.9370 | 1775.2 | 17 |
| 48 | RRFSGLLRAELTKLG | 1716.0159 | 1716.0 | 26 |
| 49 | LLRAELTKLGVEDIG | 1625.9352 | 1626.4 | 22 |
| 50 | LTKLGVEDIGPAQAM | 1541.8123 | 1541.6 | 35 |
| | | | | |
| 51 | VEDIGPAQAMVLLAI | 1521.8351 | 1544.1 | 5 |
| 52 | PAQAMVLLAIGEAEI | 1524.8222 | 1526.6 | 58 |
| 53 | VLLAIGEAEISVGEL | 1511.8447 | 1513.6 | 12 |
| 54 | GAEISVGEIILDRGH | 1580.7795 | 1580.3 | 17 |
| 55 | SVGEIILDRGHVGSN | 1601.7798 | 1599.5 | 22 |
| | | | | |
| 56 | LDRGHVGSNISYYL | 1755.8503 | 1756.1 | 12 |
| 57 | YVGSNISYYLKQLAD | 1732.8672 | 1733.1 | 7 |
| 58 | ISYYLKQLADGDYID | 1775.8618 | 1776.6 | 24 |
| 59 | KQLADGDYIDRIASQ | 1691.8479 | 1640.4 | 12 |
| 60 | GDYIDRIASQRDKRS | 1778.9024 | 1777.4 | 11 |
| | | | | |
| 61 | RIASQRDKRSARIRL | 1825.0871 | 1824.6 | 52 |
| 62 | RDKRSARIRLSEKGR | 1827.0663 | 1827.0 | 46 |
| 63 | ARIRLSEKGRQLCAG | 1656.9206 | 1656.5 | 18 |
| 64 | SEKGRQLCAGLRQAA | 1586.8311 | 1586.1 | 28 |
| 65 | QLCAGLRQAAKGYER | 1662.8624 | 1664.2 | 10 |
| | | | | |
| 66 | LRQAAKGYERALS HG | 1655.8856 | 1655.4 | 58 |
| 67 | KGYERALS HGDQDRR | 1786.8823 | 1786.7 | 12 |
| 68 | ALS HGDQDRRNLETA | 1681.8132 | 1682.0 | 27 |
| 69 | DQDRRNLETA FQTLH | 1842.8973 | 1843.3 | 13 |
| 70 | NLETA FQTLHRLELV | 1782.9628 | 1783.1 | 26 |
| | | | | |
| 71 | FQTLHRLELVWGNA A | 1753.9264 | 1752.3 | 37 |
| 72 | RLELVWGNAARYGI | 1616.8787 | 1617.3 | 21 |

6.3.17 Synthese der 20er Peptide mit 17 überlappenden Aminosäureresten aus ExpG**[S. meliloti]**

Die Synthese der Peptide erfolgt am nach **6.2.2.1** mit der entsprechenden C-terminalen Aminosäure beladenen 2Cl-Trt-Harz. Die Kupplung wird als Doppelkupplung durchgeführt, mit 1.5 Äquivalenten TBTU, 3 Äquivalenten DIPEA und 1.5 Äquivalenten

der jeweiligen Aminosäure. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppe erfolgt mit 6% Piperazin in DMF. Die Abspaltung erfolgt nach **6.2.11.7**. Anschließend werden die Peptide mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Tab. 22: Für das Epitope Mapping synthetisierte 20mer-Peptide

| | Sequenz | M _{gem} MALDI-TOF MS | M _{ber} | t _R |
|-----------|----------------------|----------------------------------|------------------|----------------|
| 73 | RDKRSARIRLSEKGRQLCAG | 2297.85 (M+H ⁺) | 2300.7020 | 19.9 min |
| 74 | RSARIRLSEKGRQLCAGLRQ | 2294.80 (M+H ⁺) | 2298.7294 | 18.6 min |
| 75 | RIRLSEKGRQLCAGLRQAAK | 2253.24 (M+H ⁺) | 2254.7163 | 12.6 min |
| 76 | LSEKGRQLCAGLRQAAKGYE | 2177.18 (M+H ⁺) | 2178.5254 | 14.6 min |
| 77 | KGRQLCAGLRQAAKGYERAL | 2188.20 (M+H ⁺) | 2189.5974 | 18.2 min |
| 78 | QLCAGLRQAAKGYERALSHG | 2128.73 (M+H ⁺) | 2129.4546 | 12.8 min |
| 79 | AGLRQAAKGYERALSHGDQD | 2142.65 (M+H ⁺) | 2143.3304 | 20.1 min |
| 80 | RQAAKGYERALSHGDQDRRN | 2324.97 (M+H ⁺) | 2328.5205 | 18.8 min |
| 81 | AKGYERALSHGDQDRRNLET | 2313.63 (M+H ⁺) | 2316.5042 | 17.7 min |

6.4 Synthese des AzoTANDEM

6.4.1 Probesynthese des Tripeptids am Wang-Harz

6.4.1.1 Synthese von H-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz 91

Für die Beladung des Wang-Harzes mit Fmoc-Ala-OH werden 207 mg des Harzes in 2.7 ml DCM und 0.3 ml DMF gequollen. 2.5 Äquivalente Fmoc-Ala-OH (161 mg, 0.518 mmol) und 2.5 Äquivalente HOBt (79 mg, 0.518 mmol) werden in 500 μ L DMF gelöst. Dazu wird ein Äquivalent DIC (0.207 mmol, 32.05 μ L) und 2.52 mg (0.021 mmol) DMAP gegeben, und die Lösung zum Harz gegeben. Nach 2.5 h wird das Harz zum Cappen mit 2 je Äquivalenten Ac₂O und Pyridin für 1 h geschüttelt, anschließend je 3 x mit jeweils 5 mL DMF, DCM und MeOH gewaschen und an der Ölpumpe getrocknet. Die Verlängerung des Peptids erfolgt entsprechend **6.2.4** und **6.2.5**.

Das Produkt H-D-Ser(Trt)-Ala-OH ist nach Abspaltung mit TFA im MALDI-ToF MS nachweisbar.

6.4.1.2 Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-Wang-Harz 92

Zur Modifizierung von **91** mit Chinoxalin wird es 30 min in DMF quellen gelassen. Anschließend wird es in 200 μ L DMF suspendiert, 1.1 Äquivalente Chinoxaloylchlorid (12 mg, 0.06 mmol) in 100 μ L DMF und 2.2 Äquivalente Triethylamin (8.3 μ L, 0.12 mmol) werden hinzugegeben und die Mischung wird 2 h geschüttelt. Anschließend wird 5x mit jeweils 5 mL DMF und 3x mit je 5 mL DCM gewaschen.

Das Produkt Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-OH ist nach Abspaltung mit TFA im MALDI-ToF MS nachweisbar.

6.4.1.3 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-Wang-Harz 93

Zur Abspaltung der Tritylschutzgruppe von **92** wird dieses sehr kurz mit 1% TFA in DCM behandelt.

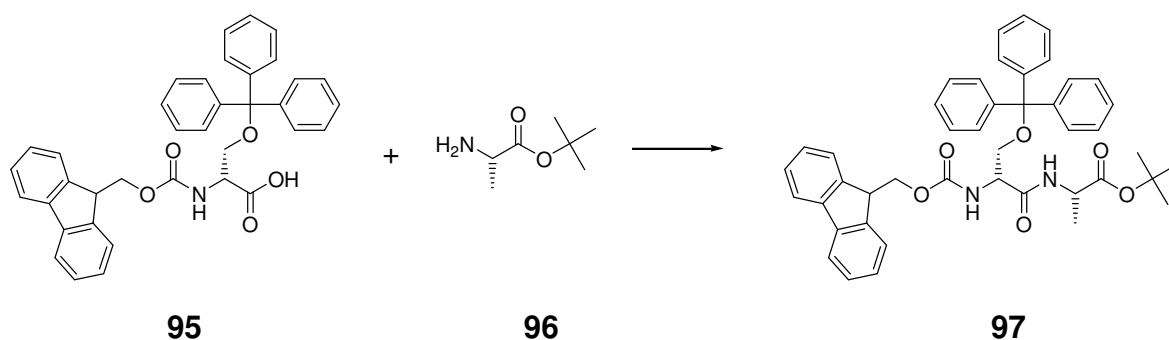
Das Produkt Qxc-D-Ser-Ala-OH ist nach Abspaltung mit TFA im MALDI-ToF MS nachweisbar.

6.4.1.4 Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val-)-Ala-Wang-Harz 94

Zur Bildung der Depsipeptidbindung wird **93** in 2 mL Pyridin bei 0°C suspendiert. Es werden je 1 Äquivalent DCC (0.06 mmol, 12.4 mg) und Fmoc-Val-OH (0.06 mmol, 21 mg) dazugegeben. Nach 18 h Schütteln zeigt sich im MALDI-ToF MS nach Abspaltung mit TFA, daß auch diese Probereaktion erfolgreich war.

6.4.2 Synthese des AzoTANDEMs

6.4.2.2 Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu



6.4.2.2.1 Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu Variante 1

100 mg (0.55 mmol) **96** werden in 10 mL DCM gelöst und mit 255 µL (1.65 mmol) DIC, 10.1 mg (0.0825 mmol) DMAP sowie 626 mg (1.1 mmol) **95** versetzt. Nach einer säulenchromatographischen (9/1 DCM/MeOH) und einer flashchromatographischen (DCM) Aufreinigung liegt die Ausbeute bei 61 %.

Summenformel: C₄₄H₄₄N₂O₆

Molmasse berechnet: 696.8300

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 700.89 (M+H⁺), 720.05 (M+Na⁺)

Ausbeute: 440 mg (0.63 mmol, 61%)

R_f (9/1 DCM/MeOH): 0.84

R_f (DCM): 0.26

6.4.2.2.2 Synthese von Fmoc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu Variante 2

150 mg (0.82 mmol) **96** werden in 10 mL DCM gelöst und mit 112 mg (0.82 mmol) HOAt, 468 mg (1.23 mmol) HATU sowie 467 mg (0.82 mmol) **95** versetzt. Nach Zugabe von gerade so viel DMF, daß alles gelöst ist, werden 421 µL (2.46 mmol) DIPEA dazugegeben und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird eingeeengt und säulen-chromatographisch aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH). Die Reaktion erfolgt nahezu quantitativ.

Summenformel: C₄₄H₄₄N₂O₆

Molmasse berechnet: 696.8300

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 719.00 (M+Na⁺), 735.03 (M+K⁺)

Ausbeute: 572 mg (0.82 mmol, 100%)

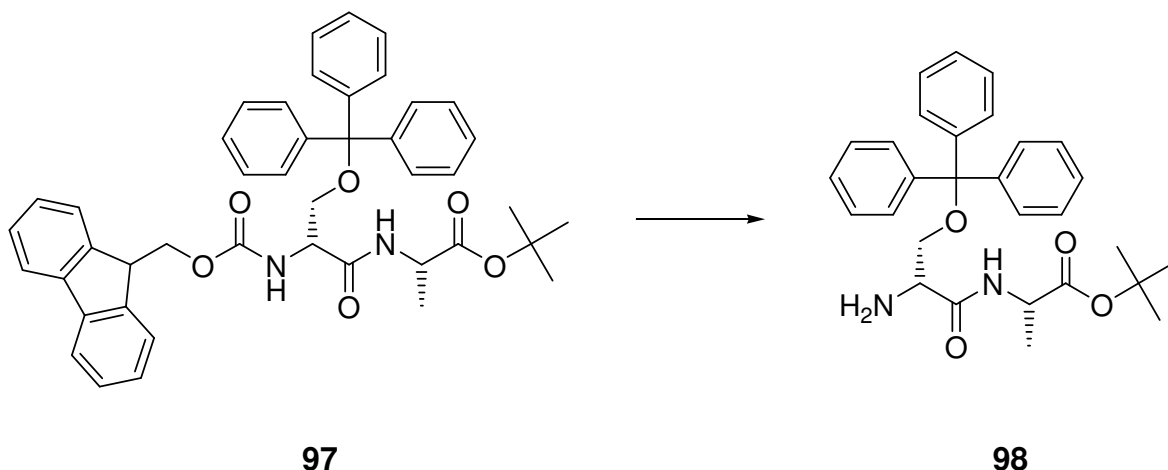
R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.82

¹H-NMR (500 MHz, D₆-DMSO, TMS): 1.34 (d, 3H, ³J = 7.0 Hz, CH₃_{Ala}), 1.47 (s, 9H, CH₃_{tBu}), 3.62-3.65 (m, 2H, CH₂_{Ser}), 4.19 (s, 1H, CH_{Fmoc}), 4.34 (d, 1H, ³J = 7.0 Hz, CH_{Ala}), 4.51 (s, 2H, CH₂_{Fmoc}), 6.86-6.88 (m, 1H, CH_{Ser}), 7.22-7.27 (m, 15H, CH_{Trityl}), 7.28-7.43 (m, 4H, CH_{Fmoc}), 7.55 (d, 2H, ³J = 6.0 Hz, CH_{Fmoc}), 7.75 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz, CH_{Fmoc}), 7.90-7.99 (m, 1H, NH_{Ser}), 8.87-8.89 (m, 1H, NH_{Ala}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, D₆-DMSO, TMS): 18.6 (CH₃_{Ala}), 28.0 (CH₃_{tBu}), 47.6 (CH_{Fmoc}), 48.8 (CH_{Ala}), 54.6 (CH_{Ser}), 63.6 (CH₂_{Ser}), 67.2 (CH₂_{Fmoc}), 77.0 (C_{tBu}), 87.2 (C_{Trityl}), 125.0 (C_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 141.3 (q C_{Fmoc}), 143.4 (q C_{Fmoc}) 143.7 (q C_{Trityl}), 155.9 (C=O_{Fmoc}), 169.1 (C=O_{Ala}), 171.8 (C=O_{Ser}).

IR (KBr, cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3410, 3336, 3060, 2978, 2932, 2878, 2360, 1732, 1672, 1508, 1492, 1449, 1393, 1368, 1319, 1253, 1224, 1151, 1079, 1033, 1002, 979, 900, 846, 760, 741, 706, 648, 633.

6.4.2.3 Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu



6.4.2.3.1 Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu Variante 1

Zu Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden 440 mg (0.63 mmol) **97** aus **6.4.2.2.1** in 10 mL einer Lösung von 6% Piperazin (w/v) in DCM 18 h gerührt. Nach Einengen und säulenchromatographischer Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) wird ein farbloses Öl erhalten.

Summenformel: C₂₉H₃₄N₂O₄

Molmasse berechnet: 474.5913

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 497.92 (M+Na⁺), 514.18 (M+K⁺)

Ausbeute: 315 mg (0.63 mmol, 100%)

R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.26

6.4.2.3.2 Synthese von D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu Variante 2

Zu Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden 2.7 g (3.9 mmol) **97** aus **6.4.2.2.2** in 20 mL einer Lösung von 20% Diethylamin in DCM 18 h geschüttelt. Nach Einengen und flashchromatographischer Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) wird das Produkt erhalten.

Summenformel: C₂₉H₃₄N₂O₄

Molmasse berechnet: 474.5913

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 497.54 (M+Na⁺), 514.18 (M+K⁺)

Ausbeute: 2.54 g (3.9 mmol, 100%)

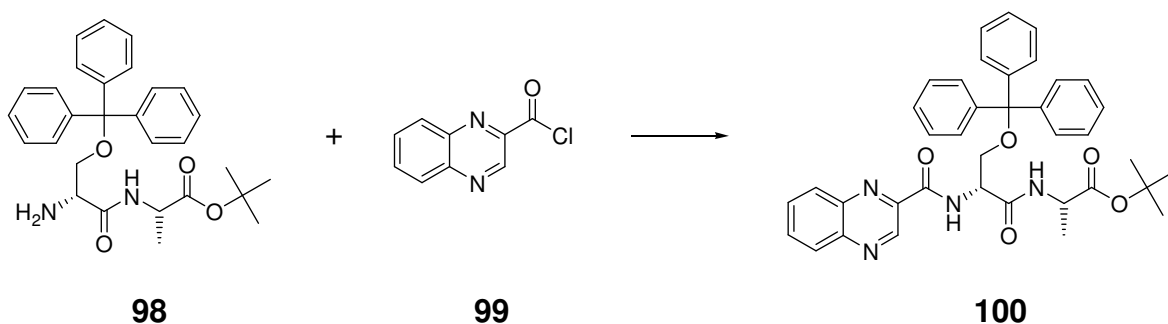
R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.22

¹H-NMR (500 MHz, D₆-DMSO, TMS): 1.36-1.38 (m, 3H, CH₃ Ala), 1.44 (s, 9H, CH₃ tBu), 1.65 (s, 2H, NH₂), 3.36-3.37 (m, 2H, CH₂ Ser), 3.46-3.48 (m, 1H, CH_{Ser}), 4.47 (s, 1H, CH Ala), 7.20-7.30 (m, 15H, CH_{Trityl}), 7.42-7.44 (m, 1H, NH_{Ala}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, D₆-DMSO, TMS): 18.6 (CH₃ Ala), 28.0 (CH₃ tBu), 48.4 (CH_{Ala}), 55.2 (CH_{Ser}), 65.7 (CH₂ Ser), 77.0 (C_{tBu}), 85.8 (C_{Trityl}), 127.1 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 143.8 (q C_{Trityl}), 172.0 (C=O_{Ala}), 172.2 (C=O_{Ser}).

IR (KBr, cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3372, 3319, 3059, 3032, 2978, 2933, 2877, 1961, 1734, 1672, 1597, 1510, 1492, 1449, 1362, 1368, 1344, 1310, 1225, 1151, 1072, 1033, 990, 932, 901, 874, 847, 762, 747, 708, 647, 633.

6.4.2.4 Synthese von Qxc-D-Ser(Trt)-Ala-O^tBu

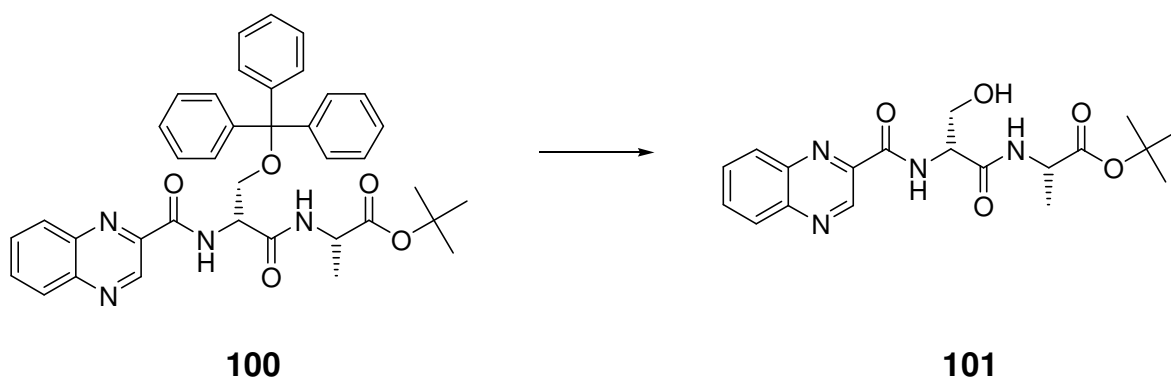


Für die Synthese von **100** werden 1.5 g (3.15 mmol) **98** in 15 mL DCM gelöst. 2.2 Äq. Triethylamin NEt₃ (6.95 mmol, 963 µl) und 1.1 Äquivalenten **99** (3.48 mmol, 670 mg) werden hinzugegeben und die Mischung gerührt. Der Verlauf der Reaktion wird mittels MALDI-ToF-MS beobachtet, nach 18 h wird das Reaktionsgemisch eingengt und ohne Aufreinigung als Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Summenformel: C₃₈H₃₈N₄O₅

Molmasse berechnet: 630.7321

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 653.63 (M+Na⁺), 669.65 (M+K⁺)

6.4.2.5 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu6.4.2.5.1 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu Variante 1

Zur Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe wird das Rohprodukt **100** aus **6.4.2.4** in 30 mL einer Lösung von 0.5% (v/v) TFA in DCM gelöst. Nach 4 Tagen ist die Reaktion vollständig und das Produkt wird flashchromatographisch mit 2 aufeinander folgenden Läufen aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH). Die Ausbeute über 2 Stufen liegt bei über 98%, damit können beide Reaktionen als quantitativ betrachtet werden.

Summenformel: C₁₉H₂₄N₄O₅

Molmasse berechnet: 388.4177

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 390.76 (M+H⁺), 411.37 (M+Na⁺)

Ausbeute: 1.54 g (3.98 mmol, 98%)

R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.29

¹H-NMR (500 MHz, D₆-DMSO, TMS): 1.38 - 1.44 (m, 12H, CH₃_{Ala} und CH₃_{tBu}), 2.55 (s, 1H, OH), 4.31-4.33 (m, 2H, CH₂_{Ser}), 4.46-4.49 (m, 1H, CH_{Ala}), 4.74 (s, 1H, CH_{Ser}), 7.26 (s, 2H, C_{Ar}_{Qxc}), 7.88-7.92 (m, 2H, C_{Ar}_{Qxc}), 8.18-8.22 (m, 1H, NH_{Ser}), 8.87-8.89 (m, 1H, NH_{Ala}), 9.67 (s, 1H, CH_{Qxc}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, D₆-DMSO, TMS): 18.1 (CH₃_{Ala}), 27.9 (CH₃_{tBu}), 49.1 (CH_{Ala}), 54.5 (CH_{Ser}), 62.9 (CH₂_{Ser}), 77.0 (C_{tBu}), 129.4 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 131.9 (C_{Ar}), 132.7 (C_{Ar}), 140.3 (q C_{Qxc}), 142.1 (q C_{Qxc}), 143.6 (q C_{Qxc}), 143.9 (q C_{Qxc}), 164.1 (C=O_{Qxc}), 170.1 (C=O_{Ala}), 171.8 (C=O_{Ser}).

IR (KBr, cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3495, 3382, 3069, 2980, 2936, 2360, 1733, 1660, 1525, 1494, 1456, 1410, 1369, 1305, 1231, 1151, 1055, 1014, 981, 911, 846, 805, 776, 755, 668, 628.

6.4.2.5.2 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu Variante 2

Zur Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe wird das Rohprodukt **100** in 10 mL einer Lösung von 0.5% (v/v) TFA in DCM gelöst. Nach 4 Tagen ist die Reaktion vollständig und das Produkt wird mittels semipräparativer RP-HPLC mit Methode 2 gereinigt.

Summenformel: C₁₉H₂₄N₄O₅

Molmasse berechnet: 388.4177

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 390.55 (M+H⁺), 411.53 (M+Na⁺)

Ausbeute: 100 mg (0.26 mmol, 40%)

t_R: 23.2 min

6.4.2.5.3 Synthese von Qxc-D-Ser-Ala-O^tBu Variante 3

Zur Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe wird das Rohprodukt **100** in 50 mL einer Lösung von 1% (v/v) TFA in DCM gelöst. Nach 4 h ist die Reaktion vollständig und das Produkt wird flashchromatographisch aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH).

Summenformel: C₁₉H₂₄N₄O₅

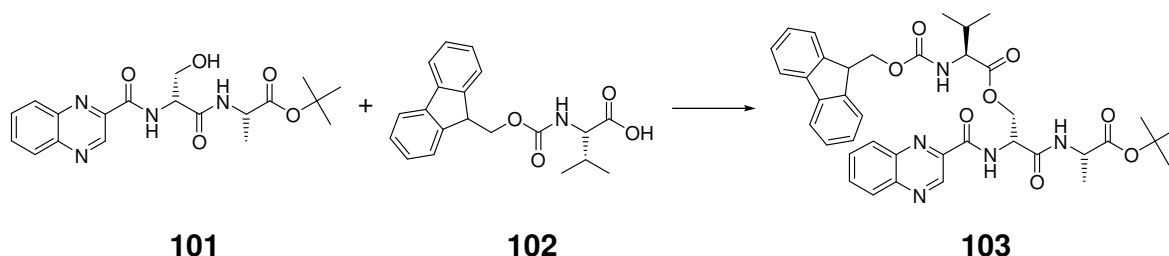
Molmasse berechnet: 388.4177

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 390.45 (M+H⁺), 411.37 (M+Na⁺)

Ausbeute: 468 mg (1.21 mmol, 23%)

R_f (25/1 DCM/MeOH): 0.26

6.4.2.6 Synthese von Qxc-D-Ser(Fmoc-Val)-Ala-O^tBu



101 mg (0.26 mmol) **101** und 265 mg (0.78 mmol) **102** werden in 5 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann werden 161 mg (0.78 mmol) DCC hinzugegeben und für 4h bei 0°

gerührt. Anschließend wird 18h bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und bis zur Trockne eingengt. Das resultierende gelbe Öl wird in wenig EtOAc aufgenommen, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und die organische Phase 1x mit 4 mL Wasser, 1x mit 4 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, 2x mit je 2 mL einer Lösung von 10% Zitronensäure in Wasser (w/v), 1x mit 4 mL NaHCO₃ und 1x mit 4 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird die organische Phase eingengt und das Produkt mittels semipräparativer RP-HPLC mit Methode 3 aufgereinigt.

Summenformel: C₃₉H₄₃N₅O₈

Molmasse berechnet: 709.7874

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 732.81 (M+Na⁺), 748.82 (M+K⁺)

Ausbeute: 63 mg (0.09 mmol, 34%)

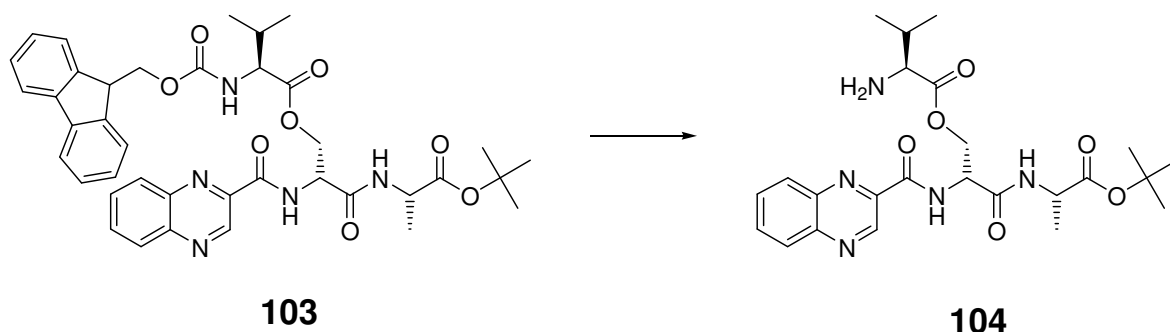
t_R: 38.0 min

¹H-NMR (500 MHz, D₆-DMSO, TMS): 0.89-0.98 (m, 6H, CH₃ Val), 1.38 - 1.47 (m, 12H, CH₃ Ala und CH₃ tBu), 4.18 (t, 1H, ³J = 7.0 Hz, CH_{Fmoc}), 4.30-4.40 (m, 3H, CH₂ Ser und CH_{Val}), 4.45-4.49 (m, 2H, CH_{Ala} und CH_{Val} Seitenkette), 4.54-4.57 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.71-4.74 (m, 1H, CH_{Ser}), 7.26-7.30 (m, 4H, C_{Ar} Qxc und C_{Ar} Fmoc), 7.36-7.40 (m, 2H, C_{Ar} Fmoc), 7.53- 7.57 (m, 2H C_{Ar} Fmoc), 7.73-7.75 (m, 2H, C_{Ar} Fmoc), 7.81-7.89 (m, 2H, C_{Ar} Qxc), 8.18-8.22 (m, 1H, NH_{Ser}), 8.70 (s, 1H, NH_{Ala}), 8.71 (s, 1H, NH_{Val}), 9.66 (s, 1H, CH_{Qxc}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, D₆-DMSO, TMS): 17.6 (CH₃ Val), 18.4 (CH₃ Ala), 27.9 (CH₃ tBu), 29.7 (CH_{Val} Seitenkette), 47.1 (CH_{Fmoc}), 49.1 (CH_{Ala}), 52.4 (CH_{Ser}), 59.1 (CH_{Val}), 64.4 (CH₂ Ser), 67.1 (CH₂ Fmoc), 77.0 (C_{tBu}), 119.0 (C_{Ar}), 125.0 (C_{Ar}), 127.1 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 132.0 (C_{Ar}), 141.2 (q C_{Qxc}), 143.7 (q C_{Fmoc}), 143.9 (q C_{Qxc}), 156.3 (C=O_{Fmoc}), 163.9 (C=O_{Qxc}), 167.4 (C=O_{Ala}), 171.6 (C=O_{Val}), 171.9 (C=O_{Ser}).

IR (KBr, cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3356, 3065, 2971, 2360, 1732, 1672, 1520, 1494, 1452, 1393, 1369, 1338, 1310, 1231, 1152, 1106, 1033, 906, 845, 803, 759, 742, 622.

6.4.2.7 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu



6.4.2.7.1 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 1

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt durch Reaktion von 63 mg **103** mit 10 mL einer Lösung von 6% Piperazin in DCM. Nach 11h Rühren wird die Lösung eingeeengt und das Peptid mittels semipräparativer RP-HPLC mit Methode 4 gereinigt.

Summenformel: C₂₄H₃₂N₅O₆

Molmasse berechnet: 487.5487

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 489.25 (M+H⁺), 510.27 (M+Na⁺)

Ausbeute: 3.2 mg (6.6 μmol, 7.4 %)

t_R: 18.2 min

6.4.2.7.2 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 2

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt durch Reaktion von 3.49 g ungereinigten Rohproduktes von **103** in 10 mL einer Lösung von 20% Diethylamin in DCM. Nach 18 h Rühren wird die Lösung eingeeengt und das Peptid säulenchromatographisch aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH).

Die Reaktion ergibt ein Produktgemisch, das neben dem gewünschten Produkt **104** auch noch das Produkt der Esterspaltung der Depsipeptidbindung, **101**, enthält. Um das Gemisch nicht verwerfen zu müssen, wird das Rohprodukt dieses Versuches zur Abspaltung der Schutzgruppe mit einer Lösung von 2% Piperidin und 2% DBU in DMF versetzt und 20h geschüttelt. Nach flashchromatographischer Aufreinigung kann **101** erneut in der vorausgehenden Reaktion **6.4.2.6** eingesetzt werden.

Summenformel: $C_{24}H_{32}N_5O_6$

Molmasse berechnet: 487.5487

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 488.68 ($M+H^+$), 510.70 ($M+Na^+$)

6.4.2.7.3 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 3

Die Abspaltung erfolgt durch Lösen von 346 mg **103** in 10 mL einer Lösung von 2% DBU und 2% Piperidin in DMF. Nach 20h Rühren wird die Lösung eingeeengt und das Peptid säulenchromatographisch aufgereinigt (50/1 DCM/MeOH).

Summenformel: $C_{24}H_{32}N_5O_6$

Molmasse berechnet: 487.5487

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 509.90 ($M+Na^+$)

Ausbeute: 173 mg (0.35 mmol, 26%)

R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.17

6.4.2.7.4 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 4

Die Abspaltung erfolgt durch Lösen von 100 mg **103** in 5 mL einer Lösung von 5% DBU in DMF. Nach 18 h Schütteln ist keine Umsetzung zu sehen, es werden 850 μ L (0.850 mmol) einer 1M TBAF-Lsg in THF und 500 μ L (0.423 mmol) Thioanisol zugegeben und geschüttelt. Es erfolgt keine vollständige Umsetzung.

6.4.2.7.5 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 5

Es werden 100 mg (0.141 mmol) **103** in 2 mL THF gelöst, 282 μ L (0.282 mmol) einer 1M TBAF-Lsg in THF und 167 μ L (0.141 mmol) Thioanisol zugegeben. Nach 3 h ist die Umsetzung noch nicht vollständig, und es werden nochmals 282 μ L (0.282 mmol) einer 1M TBAF-Lsg in THF und 167 μ L (0.141 mmol) Thioanisol zugegeben. Nach weiteren 3h ist die Umsetzung immer noch nicht vollständig, und es werden ein drittes Mal 282 μ L (0.282 mmol) einer 1M TBAF-Lsg in THF und 167 μ L (0.141 mmol) Thioanisol hinzugegeben. Nach 2 Tagen Schütteln ist kein Edukt mehr vorhanden. Deswegen wird nach **6.4.2.7.6** ein Ansatz im großen Maßstab durchgeführt, zur Aufarbeitung sollen beide vereinigt werden.

6.4.2.7.6 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 6

383 mg (0.540 mmol) **103** werden in 8 mL THF gelöst, und 3.24 mL (3.240 mmol) einer 1M TBAF-Lsg in THF sowie 1.92 mL (1.620 mmol) Thioanisol hinzugegeben. Nach 2 Tagen schütteln ist keine Umsetzung zu erkennen.

Die Ansätze **6.4.2.7.4**, **6.4.2.7.5** und **6.4.2.7.6** werden vereinigt, und es werden 20 mL einer Lösung von 2% Piperidin und 2% DBU in DMF zu den Ansätzen gegeben. Säulenchromatographische Aufreinigung (50/1 DCM/MeOH) führt zu einer Ausbeute von 29% **104**.

Summenformel: C₂₄H₃₂N₅O₆

Molmasse berechnet: 487.5487

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 489.07 (M+H⁺), 510.93 (M+Na⁺)

Ausbeute: 76.5 mg (0.157mmol, 29%)

R_f (50/1 DCM/MeOH): 0.19

6.4.2.7.7 Synthese von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu Variante 7

172.7 mg (0.24 mmol) **103** werden in 7 mL DCM gelöst. Dazu werden 343 mg (0.72 mmol) *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethyl-polystyrol Harz mit einer Beladung von 2.1 mmol / g) gegeben. Es werden 36 µL DBU und 64 µL Acetonitril gemischt und davon 10 µL (0.024 mmol) dazu gegeben. Nach 5h Schütteln unter Argon ist kaum Umsetzung erfolgt. Es werden nochmals 10 µL (0.024 mmol) der DBU-Lösung dazugegeben, nach 24h ist kein weiterer Umsatz zu beobachten, und es werden erneut 343 mg (0.72 mmol) *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethyl-polystyrol Harz und 20 µL (0.048 mmol) der DBU-Lösung hinzugegeben. Nach 72h war keine weitere Umsetzung zu erkennen, und das Reaktionsgemisch wird vom Harz entfernt und zur Trockne eingengt.

Der Rückstand wird in einer Lösung von 6% Piperazin in DCM gelöst, 4h geschüttelt und eingengt. Nach wiederholter chromatographischer Reinigung (Flashchromatographie 25/1 DCM/MeOH, Säulenchromatographie 5/1 DCM/MeOH) können 66% **104** isoliert werden.

Summenformel: C₂₄H₃₂N₅O₆

Molmasse berechnet: 487.5487

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 489.48 (M+H⁺), 510.39 (M+Na⁺)

Ausbeute: 78.6 mg (0.16 mmol, 66%)

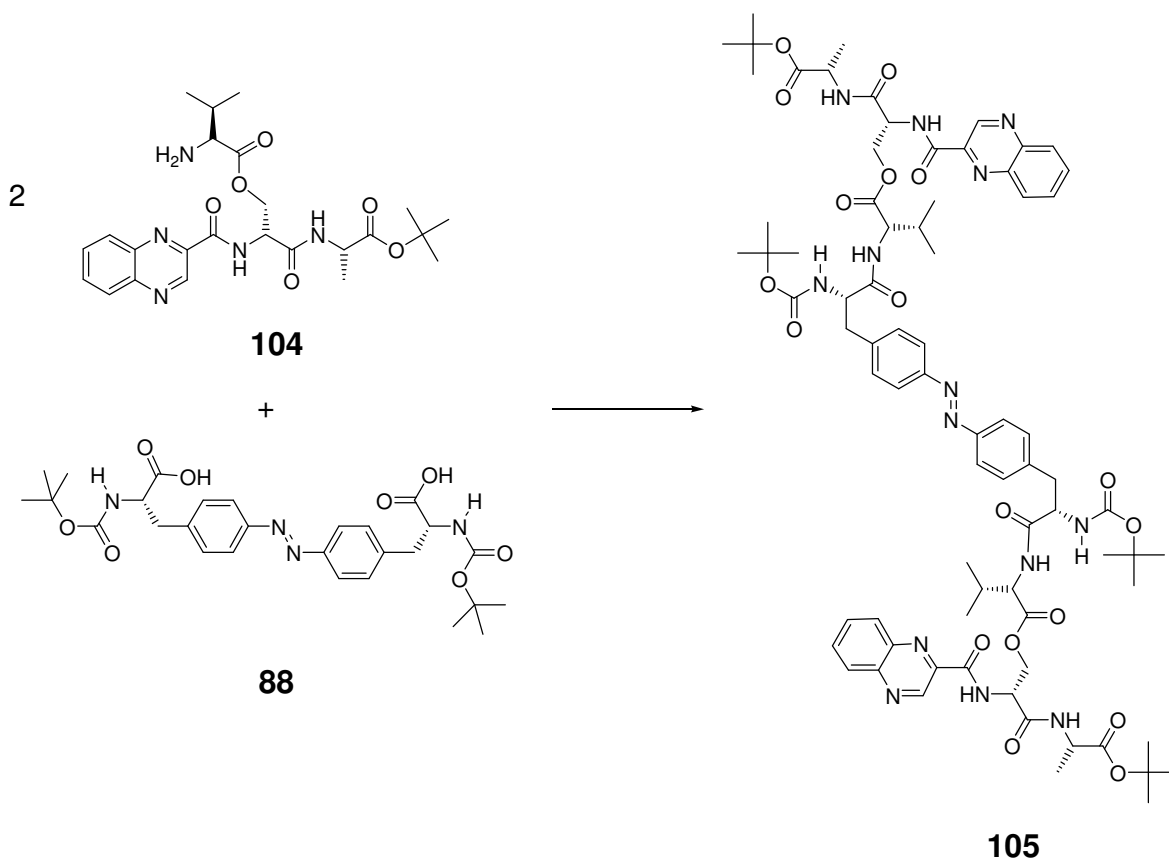
R_f(25/1 DCM/MeOH): 0.33

R_f(5/1 DCM/MeOH): 0.78

¹H-NMR (500 MHz, D₆-DMSO, TMS): 0.85-0.96 (m, 6H, CH₃_{Val}), 1.40 (d, 3H, CH₃_{Ala}), 1.44 (s, 9H, CH₃_{tBu}), 3.18 (s, 1H, CH_{Val} Seitenkette), 3.51 (d, 1H, ³J = 9.7 Hz, CH_{Val}), 4.47-4.51 (m, 3H, CH₂_{Ser} und CH_{Ala}), 4.64-4.65 (m, 1H, CH_{Ser}), 7.38 (d, 2H, ³J = 7.6 Hz, C_{Ar}_{Qxc}), 7.87-7.91 (m, 2H, C_{Ar}_{Qxc}), 8.16-8.19 (m, 1H, NH_{Val}), 8.18-8.21 (m, 1H, NH_{Ser}), 8.70 (s, 1H, NH_{Ala}), 9.66 (s, 1H, CH_{Qxc}).

IR (KBr, cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3853, 3736, 3384, 2960, 2929, 2360, 2341, 1736, 1671, 1520, 1493, 1457, 1368, 1228, 1151, 1017, 979, 847, 776, 669.

6.4.2.8 Kupplung von Qxc-D-Ser(Val)-Ala-O^tBu an 4,4'-Diazendiyldi(*N*-*tert*-butoxy-carbonyl)phenylalanin



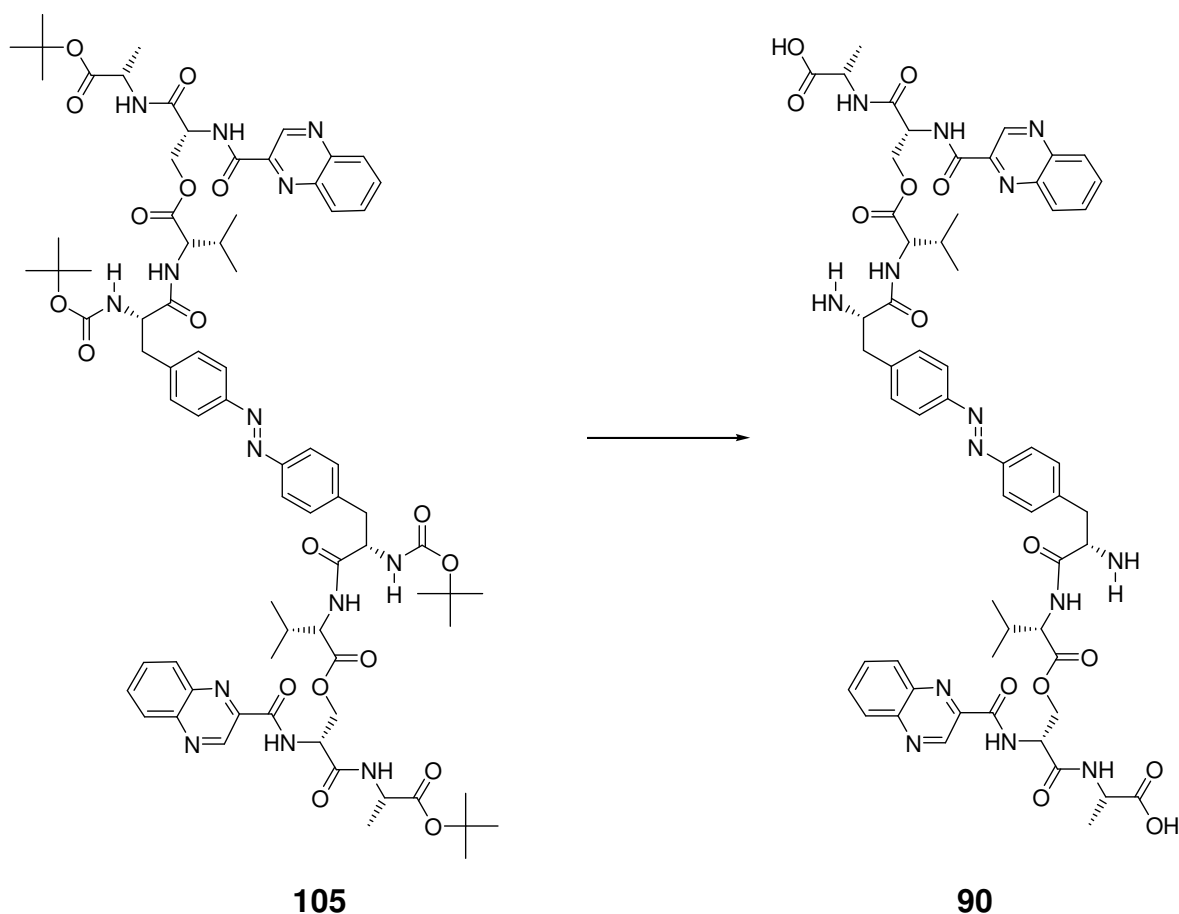
78 mg (0.16 mmol) **104** in 10 mL DMF und 66.7 mL (0.39 mmol) DIPEA werden im Reaktionskolben vorgelegt. Die Kupplung erfolgt mittels einer Spritzenpumpe unter Pseudo-Hochverdünnung. Aus der einen Spritze werden 61 mg (0.16 mmol) HATU in 2.5 mL DMF, aus der anderen 72 mg (0.13 mmol) **88** in 2.5 mL DMF bei einer Geschwindigkeit von 0.11 mL/h hinzugegossen. Entsprechend einer Reaktionskontrolle mittels MALDI-ToF-MS ist noch nur einfach gekuppeltes **88** im Reaktionsgemisch vorhanden. Deshalb werden nochmals 33 μ L (0.19 mmol) DIPEA und 30 mg (0.08 mmol) HATU zugegeben und bis zu vollständigen Umsetzung gerührt. Nach Einengen wird ein gelbes Öl erhalten. Um unnötige Substanzverluste durch chromatographische Aufreinigung zu vermeiden wird das Rohprodukt für die nächste Stufe eingesetzt.

Summenformel: C₇₆H₉₈N₁₄O₁₈

Molmasse berechnet: 1495.6743

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 1495.72 (M+H⁺), 1517.21 (M+Na⁺)

6.4.2.9 Abspaltung der Boc-Schutzgruppen vom nicht cyclisierten AzoTANDEM



Das Rohprodukt von **105** wird mit 6 mL TFA versetzt und 30 min geschüttelt. Anschließend wird eingengt und säulenchromatographisch (DCM/MeOH 1/1) aufgereinigt. Abschließend erfolgt noch eine Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC. Ein Teil des Rohproduktes wird mit Methode 5, der andere mit Methode 6 gereinigt.

Summenformel: $C_{58}H_{66}N_{14}O_{14}$

Molmasse berechnet: 1183.2300

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 1184.75 ($M+H^+$), 1206.58 ($M+Na^+$)

Ausbeute: 28.9 mg (0.024 mmol, 30%)

t_R (Methode 5): 19.1 min

t_R (Methode 6): 19.7 min

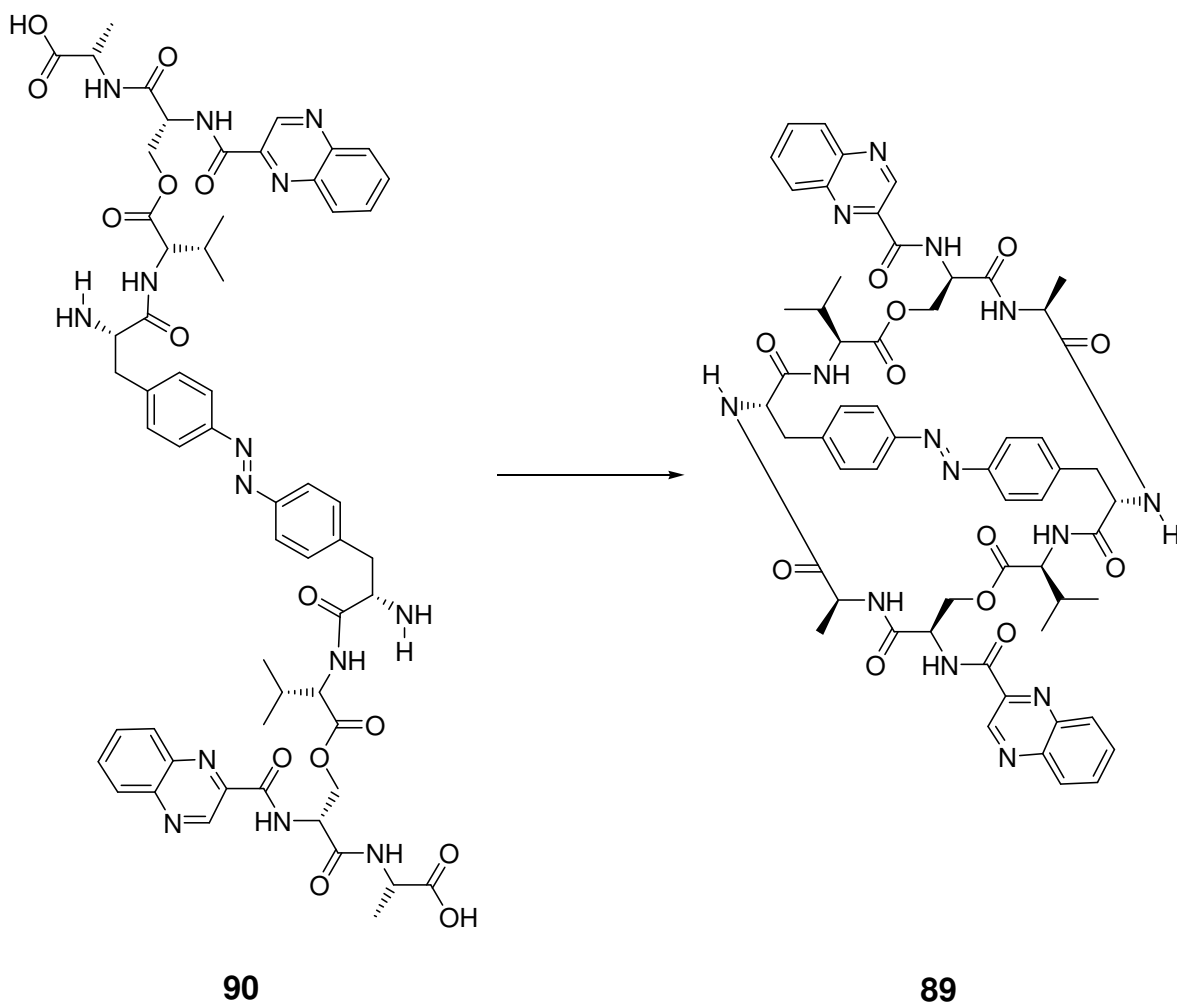
1H -NMR (500 MHz, D_6 -DMSO, TMS): 0.91-0.93 (m, 12H, CH_3 Val), 1.41 (d, 6H, $^3J = 7.2$ Hz, CH_3 Ala), 2.14-2.16 (m, 4H, NH_2), 3.10-3.12 (m, 4H, CH_2 Phe), 3.18-3.20 (m, 2H,

CH_{Val} Seitenkette), 3.29-3.31 (m, 2H, CH_{Phe}), 4.19-4.22 (m, 2H, CH_{Ala}), 4.41-4.44 (m, 2H, CH_{Val}), 4.59-4.63 (m, 4H, CH_{2Ser}), 5.07-5.10 (m, 2H, CH_{Ser}), 7.30 (d, 4H, ³J = 8.4 Hz, C_{Ar Qxc}), 7.71 (d, 4H, ³J = 8.4 Hz, CH_{Ar Phe}), 7.86-7.90 (m, 4H, CH_{Ar Phe}), 8.07 (d, 4H, C_{Ar Qxc}), 8.09 (s, 2H, NH_{Val}), 8.61 (s, 2H, NH_{Ser}), 8.63 (s, 2H, NH_{Ala}), 9.39 (s, 2H, CH_{Qxc}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, D₆-DMSO, TMS): 17.6 (CH_{3Val}), 18.4 (CH_{3Ala}), 32.6 (CH_{Val} Seitenkette), 38.4 (CH_{2Phe}), 49.2 (CH_{Ala}), 53.5 (CH_{Ser}), 55.1 (CH_{Phe}), 59.3 (CH_{Val}), 65.9 (CH_{2Ser}), 124.3 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}) 131.0 (C_{Ar}), 131.5 (C_{Ar}), 132.0 (C_{Ar}), 132.5 (C_{Ar}), 133.4 (C_{Ar}), 138.8 (C_{Ar}), 144.4 (q C_{Qxc}), 153.1 (q C_{Qxc}), 165.3 (C=O_{Qxc}), 169.5 (C=O_{Phe}), 170.1 (C=O_{Ala}), 171.0 (C=O_{Ser}), 172.0 (C=O_{Val}), 175.8 (COOH).

IR (KBr, cm⁻¹): 3853, 3749, 3446, 3066, 2967, 2736, 22371, 2358, 2341, 2322, 2293, 1991, 1943, 1919, 1890, 1869, 1845, 1828, 1793, 1770, 1734, 1716, 1671, 1558, 1540, 1523, 1508, 1497, 1472, 1457, 1438, 1418, 1396, 1373, 1338, 1313, 1202, 1141, 1068, 1043, 1014, 983, 908, 838, 801, 776, 756, 722, 668, 657.

6.4.2.10 Synthese des AzoTANDEM



Zur Cyclisierung werden im Reaktionskolben 6 μL (0.036 mmol) DIPEA in 5 mL DMF vorgelegt. Aus der einen Spritze wurden 14 mg (0.012 mmol) **90** in 10 mL DMF, aus der anderen 7 mg (0.018 mmol) HATU und 0.3 mg (0.0018 mmol) HOAt in 10 mL DMF mit einer Geschwindigkeit von 0.5 mL/h zugetropft. Nach positiver Reaktionskontrolle mittels MALDI-ToF-MS wird dieser Ansatz wiederholt. Beide Ansätze werden vereinigt, und mittels semipräparativer RP-HPLC mit Methode 5 gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{58}\text{H}_{62}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$

Molmasse berechnet: 1147.1995

Molmasse gemessen MALDI-ToF-MS: 1147.61 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1168.31 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

Ausbeute: 4.8 mg (0.004 mmol, 33%)

t_{R} (Methode 1): 30.8 min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$, TMS): 1.02-1.30 (m, 18H, CH_3), 3.03-3.11 (m, 4H, CH_2 Phe), 3.15-3.22 (s, 2H, CH_{Val} Seitenkette), 4.01-4.08 (m, 2H, CH_{Phe}), 4.14-4.20 (m, 2H, CH_{Ala}), 4.23-4.28 (m, 2H, CH_{Val}), 4.53-4.71 (m, 4H, CH_2 Ser), 4.95-5.00 (m, 2H, CH_{Ser}), 7.41-7.48 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.75-7.83 (m, 6H, CH_{Ar}), 8.02-8.11 (m, 6H, C_{Ar}), 8.19 (s, 2H, NH_{Val}), 8.25 (s, 2H, NH_{Ser}), 8.30 (s, 2H, NH_{Ala}), 8.97 (s, 2H, NH_{Phe}), 9.60 (s, 2H, CH_{Qxc}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$, TMS): 17.0 (CH_3_{Val}), 19.0 (CH_3_{Ala}), 30.8 (CH_{Val} Seitenkette), 38.6 (CH_2_{Phe}), 52.4 (CH_{Ala}), 52.5 (CH_{Ser}), 55.6 (CH_{Phe}), 58.4 (CH_{Val}), 67.0 (CH_2 Ser), 122.9 (C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 132.7 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 143.5 (C_{Ar}), 144.5 (q C_{Qxc}), 144.9 (C- N_{Azo}), 151.2 (q C_{Qxc}), 164.5 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Qxc}}$), 168.7 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Phe}}$), 170.2 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ala}}$), 171.1 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ser}}$), 172.3 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Val}}$).

7. Literaturverzeichnis

- [1] N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Berman, J. M. Thornton, *Gen. Biol.* **2000**, *1*, 1.
- [2] A. L. Lehninger, D.L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, New York **1998**.
- [3] D. S. Johnson, D. L. Boger, *DNA-binding Agents* in J. M. Lehn, Y. Murakami, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Series Pergamon Press, Oxford **1996**, Vol 4, 73.
- [4] <http://www.tulane.edu/~biochem/nolan/lectures/rna/redblue.htm> 05.11.2004
- [5] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structures*, Ed. R. Cantor, Springer, New York, **1984**.
- [6] N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Nucleic Acids Research*, **2001**, *29*, 2860.
- [7] C. W. Garvie, C. Wolberger, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 937.
- [8] A. Sarai, H. Kono, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 379.
- [9] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 804.
- [10] Y. Mandel-Gutfreund, O. Schueler, H. Margalit, *J. Mol. Biol.* **1995**, *253*, 370.
- [11] B. W. Matthews, *Nature* **1988**, *335*, 294.
- [12] C. O. Pabo, L. Nekludova, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 597.
- [13] R. Marmorstein, M. X. Fitzgerald, *Gene* **2003**, *304*, 1.
- [14] S. C. Harrison, *Nature* **1991**, *353*, 715.
- [15] B. F. Luisi, *DNA-protein interaction at high resolution* in D. M. J. Lilley, *DNA Protein Structural Interactions*. New York, Oxford University Press, **1995**, 1-48.
- [16] P. S. Freemont, A. N. Lane, M. R. Sanderson, *Biochem. J.* **1991**, *278*, 1.
- [17] S. C. Harrison, A. K. Aggarwal, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 933.
- [18] R. G. Brennan, B. W. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1903.
- [19] S. C. Harrison, A. K. Aggrawal, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 933.
- [20] C. O. Pabo, R. T. Sauer, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1053.
- [21] T. A. Steitz, *Protein-nucleic acid interactions*, Cambridge, Cambridge University Press **1993**.
- [22] G. H. Jacobs, *EMBO J.* **1992**, *11*, 4507.
- [23] B. F. Luisi, *Nature* **1992**, *356*, 379.
- [24] S. Jones, P. van Heyningen, H. M. Berman, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 877.
- [25] S. R. Long, *Plant. Physiol.* **2001**, *125*, 69.
- [26] H. P. Spink, *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 257.
- [27] V. Oke, S. R. Long, *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 641.

- [28] J. A. Leigh, D. L. Coplin, *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 307.
- [29] J. A. Leigh, G. C. Walker, *Trends Genet.* **1994**, *10*, 63.
- [30] J. Glazebrook, G. C. Walker, *Cell* **1989**, *56*, 661.
- [31] J. E. Gonzales, B. L. Reuhs, G. C. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8636.
- [32] L. X. Wang, Y. Wang, B. Pellock, G. C. Walker, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6788.
- [33] S. Long, J. W. Reed, J. Himawa, G. C. Walker, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 4239.
- [34] G. R. Her, J. Glazebrook, G. C. Walker, V. N. Reinhold, *Carbohydr. Res.* **1990**, *198*, 305.
- [35] A. Becker, S. Rüberg, H. Küster, A. A. Roxlau, M. Keller, T. Ivashina, H. P. Cheng, G. C. Walker, A. Pühler, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 1375.
- [36] S. Rüberg, A. Pühler, A. Becker, *Microbiology* **1999**, *145*, 603.
- [37] S. G. Astete, J. A. Leigh, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1996**, *9*, 395.
- [38] M. Keller, A. Roxlau, W. M. Weng, M. Schmidt, J. Quandt, K. Niehaus, D. Jording, W. Arnold, A. Pühler, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1995**, *8*, 267.
- [39] H. J. Zhan, S. B. Levery, C. C. Lee, J. A. Leigh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3055.
- [40] B. J. Pellock, M. Teplitski, R. P. Boinay, W. D. Bauer, G. C. Walker, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5067.
- [41] H. J. Zhan, C. C. Lee, J. A. Leigh, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 7391.
- [42] A. Becker, A. Pühler, *Production of Exopolysaccharides*, in *The rhizobiaceae*, Ed. H. P. Spaink, Dordrecht **1998**, 97-118.
- [43] S. P. Cohen, H. Hachler, S. B. Levy, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 1484.
- [44] M. C. Sulavik, L. F. Gambino, P. F. Miller, *Mol. Med. 1*, **1995**, 436.
- [45] M. N. Alekshun, S. B. Levy, *Trends Microbiol.* **1999**, *7*, 410.
- [46] P. F. Miller, M. C. Sulavik, *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 441.
- [47] P. G. Egland, C. S. Harwood, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2102.
- [48] H. Komeda, M. Kobayashi, S. Shimizu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4267.
- [49] J. Oscarsson, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, D. J. Haydon, *Mol. Microbiol.* **1996**, *20*, 191.
- [50] F. W. Bartels, B. Baumgarth, D. A. Anselmetti, R. Ros, A. Becker, *J. Struct. Biol.* **2003**, *143*, 145.
- [51] B. Baumgarth, F. W. Bartels, D. A. Anselmetti, A. Becker, R. Ros, *Microbiology* **2005**, *151*, 259.
- [52] N. N. Rao, A. Kornberg, *Inorganic Polyphosphate Regulates Responses of Escherichia coli to Nutritional Stringencies, Environmental Stresses and Survival in the Stationary Phase*, in *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 23, H. C. Schröder, W. E. G. Müller, Springer Verlag Berlin Heidelberg **1999**, 183-195.

- [53] J. A. Hoch, T. J. Silhavy, *Two-Component Signal Transduction*, Washington, DC, American Society for Microbiology Press, **1995**.
- [54] K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, M. Yamasa, A. Nakata, *J. Mol. Biol.* **1989**, *210*, 551.
- [55] D. W. Ellison, W. R. McCleary, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6592.
- [56] K. Volz, *Structure* **2002**, *10*, 602.
- [57] A. G. Blanco, M. Sola, F. X. Gomis-Rüth, M. Coll, *Structure* **2002**, *10*, 701.
- [58] H. Shinagawa, K. Makino, A. Nakata, *J. Mol. Biol.* **1983**, *168*, 477.
- [59] T. Aoyama, A. Oka, *FEBS* **1990**, *263*, 1.
- [60] B. L. Wanner, Phosphate signalling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, 104-128, in S. Silver, W. Walden, *Metal ions in gene regulation*, Chapman and Hall Ltd., Sterlin, VA, **1997**.
- [61] E. Martínez-Hackert, A. M. Stock, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 301.
- [62] H. Okamura, S. Hanaoka, A. Nagadoi, K. Makino, Y. Nishimura, *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 1225.
- [63] W. Liu, F. M. Hulett, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6302.
- [64] K. Shindoh, K. Maenaka, T. Akiba, H. Okamura, Y. Nishimura, K. Makino, Y. Shirakihara, *Acta Cryst.* **2002**, *D58*, 1862.
- [65] Brookhaven Datenbank: 1QQI.
- [66] K. Hiratsu, A. Nakata, H. Shinagawa, K. Makino, *Gene* **1995**, *161*, 7.
- [67] K. Makino, M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, M. Suzuki, *J. Mol. Biol.*, **1996**, *259*, 15.
- [68] K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, A. Nakata, *J. Mol. Biol.* **1986**, *190*, 37.
- [69] M. Kasahara, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, H. Shinagawa, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 549.
- [70] D. M. Crothers, *Biopolymers* **1968**, *6*, 575.
- [71] S. Arnott, P. J. Bond, R. Chandrasekaran, *Nature* **1980**, *287*, 561.
- [72] S. N. Rao, P. A. Kolman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5735.
- [73] L. P.G. Wakelin, *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 275.
- [74] T. Yoshida, K. Katagiri, *Biochemistry* **1969**, *8*, 2645.
- [75] J. Shoji, K. Katagiri, *J. Antibiot., Set. A* **1961**, *14*, 335.
- [76] H. Otsuka, J. Shoji, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1535.
- [77] R. K. Olsen, *The Quinoxaline Depsipeptide Antibiotics*, in M. Dekker, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Weinstein New York, **1983**,
- [78] M. J. Waring, K. R. Fox, in S. Neidle, M. J. Waring, *Molecular Aspects of anticancer Drug Action*, Verlag Chemie, Weinheim, **1983**, 127-156.

- [79] M. J. Waring, in B. Pullman, J. Jortner, Kluwer, *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions*, Dordrecht, **1990**, 225-245.
- [80] M. J. Waring in *Molecular Aspects of anticancer Drug-DNA Interactions*, Ed. S. Neidle, M. J. Waring, CRC, Ann Arbor, MI, **1993**, 1, 213-241.
- [81] M. J. Waring, L. P. G. Wakelin, *Nature*, **1974**, 252, 653.
- [82] D. C. Ward, E. Reich, I. H. Goldberg, *Science* **1965**, 149, 1259.
- [83] K. Katagiri, T. Yoshida, K. Sato, *Antibiotics*, Eds. J. W. Corcoran, F. E. Hahn, Springer, Heidelberg. **1975**, vol. 3, 234.
- [84] F. J. Takusagawa, *J. Antibiot.* **1985**, 1596.
- [85] K. J. Address, J. Feigon, *Biochemistry* **1994**, 33, 12386.
- [86] K. J. Address, J. Feigon, *Biochemistry* **1994**, 33, 12397.
- [87] K. R. Fox, M. J. Waring, *Biochem. Biophys. Acta* **1981**, 654, 279.
- [88] K. J. Address, J. S. Sinsheimer, J. Feigon, *Biochemistry* **1993**, 32, 2498.
- [89] R. Powers, R. K. Olsen, D. G. Gorenstein, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, 7, 515.
- [90] K. J. Address, D. E. Gilbert, R. K. Olsen, J. Feigon, *Biochemistry* **1992**, 31, 339.
- [91] J. L. Leroy, X. Gao, V. Misra, M. Gueron, D. J. Patel, *Biochemistry* **1992**, 31, 1407.
- [92] C. Marchand, C. Bailly, M. J. MacLean, S. E. Morony, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 5601.
- [93] M. S. Viswamitra, O. Kennard, W. B. T. Cruse, E. Egert, G. M. Sheldrick, P. G. Jones, M. J. Waring, L. P. G. Wakelin, R. K. Olsen, *Nature* **1981**, 289, 817.
- [94] C. M. L. Low, K. R. Fox, R. K. Olsen, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 2015.
- [95] K. Waterloh, R. K. Olsen, K. R. Fox, *Biochemistry* **1982**, 31, 6246.
- [96] M. Lavesa, R. K. Olsen, K. R. Fox, *Biochem. J.* **1993**, 289, 605.
- [97] K. R. Fox, R. K. Olsen, M. J. Waring, *Biochem. Biophys. Acta* **1982**, 696, 315.
- [98] C. M. L. Low, K. R. Fox, R. K. Olsen, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 2015.
- [99] M. B. Hossain, D. van der Helm, R. K. Olsen, P. G. Jones, G. M. Sheldrick, E. Egert, O. Kennard, M. J. Waring, M. A. Viswamitra, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 3401.
- [100] B. Dietrich, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 70, 147.
- [101] K. B. Lorenz, U. Diederichsen, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3917.
- [102] T. L. Ciardelli, R. K. Olsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2806.
- [103] P. K. Chakravarty, R. K. Olsen, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1613.
- [104] T. L. Ciardelli, P. K. Chakravarty, R. K. Olsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7684.
- [105] M. K. Dhaon, J. H. Gardner, R. K. Olsen, *Tetrahedron* **1982**, 38, 57.
- [106] G. N Ramachandran, *Aspects of peptide conformation*, in *Peptides, Polypeptides, and Proteins*, 14-34, Wiley-Interscience, New York, **1974**.

- [107] D. J. Barlow, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1988**, *201*, 601.
- [108] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [109] A. L. Lehninger, D.L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, New York **1998**.
- [110] G. Barany, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7363.
- [111] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg **1993**.
- [112] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [113] E. Fischer, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2094.
- [114] J. C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
- [115] B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102.
- [116] S. Nozaki, *J. Peptide Research* **1999**, *54*, 162.
- [117] Die hier beschriebene "Razemisierung" ist im klassischen Sinn eine Epimerisierung, jedoch hat sich in der Peptidchemie der Begriff Razemisierung etabliert, und wird in dieser Arbeit beibehalten, auch wenn diese eigentlich die Entstehung eines Epimerengemisch beschreibt.
- [118] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [119] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [120] M. Crisma, G. Valle, V. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, F. Albericio, *Lett. Pep. Sci.* **1998**, *5*, 247..
- [121] K. Barlos, D. Papaionnou, D. Theodoropoulos, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1984**, *23*, 300.
- [122] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foyman, M. J. Vela, P. Henlein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253.
- [123] R. D. Gandour, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 295.
- [124] V. Dourtoglou, B. Groß, *Synthesis* **1984**, 572.
- [125] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [126] B. Castro, J. R. Dormay, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219.
- [127] J. Coste, D. Le Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
- [128] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 695.
- [129] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henlein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 458.
- [130] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.
- [131] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [132] J. D. Wade, J. Belford, R.C. Sheppard, G. W. Tregaer, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 194.

- [133] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801.
- [134] D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *36*, 255.
- [135] D. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guidon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- [136] C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661.
- [137] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399.
- [138] E. Oliveira, A. Miranda, F. Albericio, D. Andreu, A. C. M. Paiva, C. R. Nakaie, M. Tominaga, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 300.
- [139] M. Narita, S. Honda, H. Umeyama, S. Obana, *Bull. Chem. Soc. Japan* **1988**, *61*, 281.
- [140] M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145.
- [141] T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218.
- [142] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369.
- [143] C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Peptide Res.* **1994**, *43*, 431.
- [144] M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656.
- [145] W. R. Sampson, H. Patsiouras, N. J. Ede, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 403.
- [146] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [147] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [148] K. Barlos et al., *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943.
- [149] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732.
- [150] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1575.
- [151] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318.
- [152] M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 979.
- [153] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2559-2560.
- [154] G. W. Kenner, J. R. Dermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1971**, 636.
- [155] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322.
- [156] T. Wieland, C. Birr, B. Fleckenstein, *Liebigs Ann. Chem* **1972**, *756*, 14.
- [157] A. Routledge, C. Abell, S. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1227.
- [158] U. Grether, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 959.
- [159] M. Patek, M. Lebl, *Biopolymers (Peptide Science)* **1998**, *47*, 353.
- [160] C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. G. Milbradt, L. Moroder, *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 4.

- [161] O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Acc. Chem. Res* **2001**, *34*, 9.
- [162] I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 347.
- [163] G. S. Kumar, D. C. Neckers, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1915.
- [164] A. Natansohn, P. Rochon, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4139.
- [165] V. Shibaev, A. Bobrovsky, N. Boiko, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 729.
- [166] A. Harada, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 456.
- [167] A. M. Caamaño, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3234.
- [168] C. Cabrele, A. Cattani-Scholz, C. Renner, R. Behrend, D. Oesterhelt, L. Moroder, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2144.
- [169] R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 519.
- [170] M. Schütt, S. Krupka, A. G. Milbradt, S. Deindl, E.-K. Sinner, D. Oesterholt, C. Renner, L. Moroder, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 487.
- [171] C. Renner, R. Behrendt, N. Heim,, L. Moroder, *Biopolymers* **2002**, *63*, 382.
- [172] L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8466.
- [173] R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterholt, L. Moroder, *Angew. Chem.* **1999**, *11*, 2941.
- [174] C. Renner, R. Behrendt,, S. Spörlein, J. Wachtveitl, L. Moroder, *Biopolymer* **2000**, *54*, 489.
- [175] C. Renner, J. Cramer, R. Behrendt, L. Moroder, *Biopolymer* **2000**, *54*, 500.
- [176] O. Pieroni, A. Fissi, J. L. Houben, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2990.
- [177] R. Cerpa, F. E. Cohen, I. D. Kuntz, *Fold. Des.* **1996**, *1*, 91.
- [178] O. Pieroni, J. L. Houben, A. Fissi, P. Constantino, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5913.
- [179] J. L. Houben, A. Fissi, D. Bacciola, N. Rosato, O. Pieroni, F. Ciardelli, *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 94.
- [180] F. Ciardelli, O. Pieroni, A. Fissi, J. L. Houben, *Biopolymers* **1984**, *23*, 1423.
- [181] M. Sisido, Y. Ishikawa, K. Itoh, S. Tazuke, *Macromolecules* **1991**, *24*, 3993.
- [182] O. Pieroni, D. Fabbri, A. Fissi, F. Ciardelli, *Macromol. Chem., Rapid. Commun.* **1988**, *9*, 637.
- [183] M. Higuchi, A. Takizawa, T. Kinoshita, Y. Tsujita, *Macromolecules* **1987**, *20*, 2888.
- [184] A. Ueno, J. Anzai, T. Osa, Y. Kadoma, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1979**, *52*, 549.
- [185] A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6410.
- [186] A. Ueno, K. Adachi, J. Nakamura, T. Osa, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* **1990**, *28*, 1161.
- [187] M. Goodman, A. Kossoy, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 501.
- [188] M. Goodman, M. L. Falxa, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3863.

- [189] M. Goodman, E. Benedetti, *Biochemistry* **1968**, 7,4226.
- [190] E. Benedetti, A. Kossoy, M. L. Falxa, M. Goodman, *Biochemistry* **1968**, 7, 4234.
- [191] E. Benedetti, M. Goodman, *Biochemistry* **1968**, 7, 4242.
- [192] D. G. Flint, J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 391.
- [193] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 2379.
- [194] J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Walley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3803
- [195] J. R. Kumita, D. G. Flint, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Protein Eng.* **2002**, 15, 561.
- [196] N. Angelini, B. Corrias, A. Fissi, O. Pieroni, F. Lenci, *Biophys. J.* **1998**, 74, 2601.
- [197] J. Juodaityte, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 127.
- [198] Z. Zhang, D. C. Burns, J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Biocon. Chem.* **2003**, 14, 824.
- [199] R. Frank, M. Jakob, F. Thuncke, G. Fischer, M. Schutkowski, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 1120.
- [200] J. Zhao, D. Wildemann, M. Jakob, C. Vargas, C. Schiene-Fischer, *Chem. Commun* **2003**, 22,2810.
- [201] J. Helbing, H. Bregy, J. Bredenbeck, R. Pfister, P. Hamm, R. Huber, J. Wachtveitl, L. De Vico, M. Olivucci, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8823.
- [202] H. Rau, *Azo compounds* in H. Dürr, H. Bonas-Laurent, *Studies in Organic Chemistry: Photochromism, Molecules and Systems, Vol. 40.* 165-192, Elsevier, Amsterdam **1990**.
- [203] I. K. Lednev, T.-Q. Ye, R. E. Hester, J. N. Moore, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13338.
- [204] I. K. Lednev, T.-Q. Ye, P. Matousek, M. Towrie, P. Foggi, F. V. R. Neuwahl, S. Umapathy, R. E. Hester, J. N. Moore, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 290, 68.
- [205] R. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 272 489.
- [206] T. Fujino, Y. S. Arzhantsev, T. Tahara, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 8123.
- [207] H. Satzger, S. Spörlein, C. Root, J. Wachtveitl. W. Zinth, P. Gilch, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 372, 216.
- [208] H. Rau, *Photoisomerisation of azobenzenes* in J. F. Rabek, *Photochemistry and Photophysics*, 119-141, CRC Press, Boca Raton, **1990**.
- [209] G. C. Hampson, J. M. Robertson, *J. Chem. Soc.* **1941**, 409.
- [210] M. E. Vázquez, A. M. Caamaño, J. L. Mascareñas, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338.
- [211] M. J. Guille, G. G. Kneale, *Mol. Biotechnol.* **1997**, 8, 35.
- [212] M. Fivash, E. M. Towler, R. J. Fisher, *Curr. Opin. Biotech.* **1998**, 9, 97.
- [213] R. W. Wood, *Phil. Mag.* **1912**, 23, 310.
- [214] U. Fano, *J. Opt. Soc. Am.* **1941**, 31, 213.
- [215] E. A. Stern, R. A. Farrell, *Phys. Rev.* **1960**, 120, 130.

- [216] I. Pockrand, J. D. Swalen, J. G. Gordon, M. R. Philpott, *Science* **1978**, 74, 237.
- [217] J. G. Gordon, M. R. Ernst, *Surface Sci.* **1980**, 101, 499.
- [218] C. Nylander, B. Liedberg, I. Lundström, *Sens. Actuat.* **1983**, 4, 299.
- [219] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Biosensors Bioelectron.* **1995**, 10, i.
- [220] Z. Salomon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 117.
- [221] P. Schuck, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 541.
- [222] J. Hornola, S. S. Yeem G. Gauglitz, *Sens. Actuat. B* **1999**, 54, 3.
- [223] I. Lundström, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9, 725.
- [224] A. D. Boardman, Ed., *Electromagnetic surface modes*, Chichester: Wiley, **1982**.
- [225] H. E. de Bruijm, R. P. H. Kooyman, J. Greve, *Appl. Opt.* **1992**, 31, 440.
- [226] J. Hornola, I. Koudela, S. S. Yee, *Sens. Act. B.* **1999**, 54, 16.
- [227] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* **1968**, 23A, 2135.
- [228] A. Otto, *Z. Physik* **1968**, 216, 398.
- [229] E. Kretschmann, *Z. Phys.* **1971**, 241, 313.
- [230] nach [http://www. Biacore.com](http://www.Biacore.com), ins Deutsche übertragen.
- [231] L. G. Fagerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, I. Ronnberg, *J. Chromatogr.* **1992**, 597, 397.
- [232] Z. Salomon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 131.
- [233] J. Davies, *Nanobiology* **1994**, 3, 5
- [234] E. Sternberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 143, 513.
- [235] P. B. Garland, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, 29, 91.
- [236] F. Markey, *BIA J.* **1999**, 6, 14
- [237] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, *Sensors Actuators* **1982**, 3, 79.
- [238] R. J. Green, R. A. Frazier, K. m. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, *Biomaterials* **2000**, 21, 1823.
- [239] I. Pockrand, *Surf. Sci.* **1978**, 12, 577.
- [240] T. Linnert, P. Mulvaney, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 679.
- [241] H. E. de Bruijn, R. P. H. Kooyman, J. Greve, *Appl. Opt.* **1990**, 29, 1974.
- [242] P. S. Vukusic, J. R. Sambles, J. D. Wright, *J. Mater. Chem.* **1992**, 2, 1105.
- [243] Th. Wagner, S. Roth, *Synth. Met.* **1993**, 54, 307.
- [244] X. L. Yang, P. Dutta, G. K. Wong, J. B. Ketterson, *Thin Solid Films* **1992**, 219, 210.
- [245] S. J. Cooke, G. G. Roberts, *Thin Solid Films* **1992**, 210/211, 685.
- [246] H. J. Merle, B. Alberti, M. Schwendler, I. R. Peterson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1992**, 25, 15556.

- [247] R. Advincula, E. Aust, W. Meyer, W. Knoll, *Langmuir* **1996**, *12*, 3536.
- [248] W. Huber, J. Hurst, D. Schlatler, *Euro. J. Biochem.* **1995**, *227*, 647.
- [249] F.-T. Schmitt, L. Haussling, H. Ringsdorf, W. Knoll, *Thin Solid Films* **1992**, *210/211*, 815.
- [250] L. Haussling, H. Ringsdorf, F.-J. Schmitt, W. Knoll, *Langmuir* **1991**, *7*, 1837.
- [251] M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whiteside, *Langmuir* **1995**, *11*, 4383.
- [252] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490.
- [253] V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, *J. Colloid. Interface Sci.* **1997**, *185*, 94.
- [254] G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1997**, *13*, 2749.
- [255] R. A. Frazier, G. Matthijs, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, *Biomaterials* **2000**, *21*, 957.
- [256] R. J. Green, S. Tasker, J. Davies, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, *Langmuir* **1997**, *13*, 6510.
- [257] X. Chen, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11537.
- [258] X. Chen, M. C. Davies, C. J. Roberst, K. M. Shakesheff, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1451.
- [259] R. A. Frazier, M. C. Davies, G. Matthijs, *Langmuir* **1997**, *13*, 7115.
- [260] R. J. Green, S. Corneillie, M. C. Davis, *Langmuir* **2000**, *16*, 2744.
- [261] P. A. Drake, P. W. Bohn, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1766.
- [262] A. Voskoboinikov, N. Nakhodkin, Y. Kryn Ko, S. Kulik, P. Melnik, D. Seka, *Solid State Commun.* **1994**, *90*, 27.
- [263] M. Malmqvist, *Nature* **1993**, *261*, 186.
- [264] B. Liedberg, I. Lundström, E. Stenberg, *Sensors Actuators B* **1993**, *11*, 63.
- [265] U. Jonsson, I. Fagerstam, S. Lofas, *Ann. Biol. Clin.* **1993**, *51*, 19.
- [266] H. Tamamura, T. Ishihara, A. Otaka, T. Murakami, T. Ibuka, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, N. Fuji, *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1298*, 37.
- [267] R. Schier, J. Nye, G. Apell, A. McCall, G. P. Adams, M. Malmqvist, L. M. Weiner, J. D. Marks, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 28.
- [268] M. B. Medina, *J. Agricultural Food Chem.* **1997**, *45*, 389.
- [269] G. W. Oddie, L. C. Gruen, G. A. Odgers, L. G. King, A. A. Kortt, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 301.
- [270] D. G. Myszka, T. A. Morton, M. L. Doyle, I. M. Chaiken, *Biophys. Chem.* **1997**, *64*, 127.
- [271] M. Autiero, M. Gaubin, J.-C. Mani, C. Castejon, M. Martin, S. El Marhomy, J. Guardiola, D. Piatier-Tonneau, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 208.
- [272] F. L. Rock, D. Peterson, B. C. Weig, R. A. Kastelein, J. F. Bazan, *Horm. Metab. Res.* **1996**, *28*, 748.

- [273] S. M. Alam, P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson, N. R. J. Gascoigne, *Nature* **1996**, *381*, 616.
- [274] B. J. Chen, T. Hage, W. Sebald, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 252.
- [275] H. Wu, D. G. Myszka, S. W. Tendian, C. G. Brouillette, R. W. Sweet, I. M. Chaiken, W. A. Hendrickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 15030.
- [276] B. Cheskis, L. P. Freedman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3309.
- [277] K. K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5072.
- [278] C. R. MacKenzie, T. Hirama, K. K. Lee, E. Altman, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5533.
- [279] Z. Lin, E. Eisenstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1977.
- [280] M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3641.
- [281] P. A. van der Merwe, D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, S. J. Davis, *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 393.
- [282] R. Karlsson, *J. Mol. Recogn.* **2004**, *17*, 151.
- [283] M. Lackmann, T. Bucci, R. J. Mann, L. A. Kravets, E. Viney, F. Smith, R. I. Moritz, W. Carter, R. J. Simpson, N. A. Nicola, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6, 2523.
- [284] D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 390.
- [285] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotech.* **2000**, *11*, 54.
- [286] P.-O. Markgren, M. Hämäläinen, U. Danielson, *Anal Biochem.* **1999**, *265*, 340.
- [287] T. A. Morton, D. G. Myszka, *Methods Enzymol.* **1998**, *295*, 268.
- [288] D. G. Myszka, M. D. Jonsen, B. J. Graves, *Anal. Biochem.* **1998**, *265*, 326.
- [289] G. Zeder-Lutz, A. R. Neurath, M. H. van Regenmortel, *Biologicals* **1999**, *27*, 29.
- [290] H. Roos, R. Karlsson, H. Nilshans, A. Perrson, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 204.
- [291] D. L. Boger, K. W. Sainz, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 315.
- [292] L.-P. Lin, L.-S. Huang, C.-W. Lin, C.-K. Lee, J.-L. Chen, S.-M. Hsu, S. Lin, *Current Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* **2005**, *5*, 61.
- [293] F. A. Tanious, D. Ding, D. A. Patrick, G. Bailly, R. R. Tidwell, W. D. Wilson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12091.
- [294] L. Wang, C. Bailly, A. Kumar, D. Ding, M. Bajic, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12.
- [295] F. A. Tanious, W. D. Wilson, D. A. Patrick, R. R. Tidwell, P. Colson, C. Houssier, C. Tardy, C. Bailly, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3455.
- [296] C. Bailly, C. Tardy, L. Wang, B. Armitage, K. Hopkins, A. Kumar, G. B. Schuster, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9770.
- [297] P. Bilik, F. Tanious, A. Kumar, W. D. Wilson, D. W. Boykin, P. Colson, C. Houssier, M. Facompre, C. Tardy, C. Bailly, *ChemBiochem.* **2001**, *2*, 559.

- [298] L. Wang, C. Carnasco, A. Kumar, C. B. Stephens, C. Bailly, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2511.
- [299] B. Nguyen, C. Tardy, C. Billy, P. Colson, C. Houssier, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Biopolymers* **2002**, *63*, 281.
- [300] C. Carrasco, F. Rosu, V. Gabelica, C. Houssier, E. D. Pauw, C. Garbay-Jaureguiberry, B. Roques, W. D. Wilson, J. B. Chaires, M. J. Waring, C. Bailly, *ChemBiochem* **2002**, *3*, 1235.
- [301] C. Carrasco, M. Facompre, J. D. Chrisholm, D. L. V. Vraaken, W. D. Wilson, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1774.
- [302] M. P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Giuttat, C. Bailly, P. Alberti, J. L. Mergny, A. David, J. N. Lehn, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4732.
- [303] R. Gambari, G. Ferriotto, C. Rutigliano, N. Bianchi, C. Mischiati, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 370.
- [304] M. L. Ciolkowski, M. M. Fang, M. E. Lund, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 1037.
- [305] M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. A. Tanious, S. H. Gowan, A. P. Reszka, W. D. Wilson, L. R. Kelland, S. Neidle, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **2001**, *98*, 4844.
- [306] P. Y. Tsoi, M. Yang, *Biosens. Bioelect.* **2004**, *19*, 1209.
- [307] R. J. Fisher, M. Fivash, L. Casas-Finet, J. W. Erickson, A. Kondoh, S. V. Bladen, C. Fisher, D. K. Watson, T. Papas, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 257.
- [308] M. Haruki, E. Noguchi, S. Kanaya, R. J. Crouch, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22015.
- [309] M. Oda, K. Furukawa, A. Sarai, H. Nakamura, *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 288.
- [310] J. E. Gestwicki, H. V. Hsieh, J. B. Pitner, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5732.
- [311] A. J. Stokka, T. Flatmark, *J. Biochem.* **2003**, *369*, 509.
- [312] S. R. Weinberger, T. S. Mords, M. Pawlak, *Pharmacogenomics* **2000**, *1*, 395.
- [313] J. L. Asensio, H. S. Dosanjh, T. C. Jenkins, A. N. Lanem, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15188.
- [314] J. K. Stuart, D. G. Myszka, L. Joss, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22506.
- [315] C. J. Thomas, A. Surolia, *FEBS Lett.* **1999**, *445*, 420.
- [316] F. Schubert, H. Zetl, W. Häfner, G. Krauss, G. Krausch, *Biochemistry* **2003**, *42*, 10288.
- [317] B. Johnsson, S. Lofas, G. Lindquist, *Anal. Biochem. Field* **1991**, *198*, 268.
- [318] S. Löfkås, B. Johansson, *J. Chem. Soc, Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1526.
- [319] S. Löfkås, M. Malmqvist, I. Rönnerberg, E. Stenberg, B. Liedberg, *Sens. Actuat.. B.* **1991**, *5*, 79.
- [320] E. Wünsch, F. Dress, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 100-104.
- [321] F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforsch. B* **1966**, *21*, 426.
- [322] B. Johansson, S. Löfkås, G. Lindqvist, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268.

- [323] T. A. Morton, D. B. Benet, E. R. Appelbaum, D. M. Cusimane, K. O. Johanson, *J. Mol. Recogn.* **1994**, 7, 47.
- [324] D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burke, K. Peck, *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 132.
- [325] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 554.
- [326] B. Johansson, S. Löfkås, G. Lindqvist, A. Edström, R.-M. M. Hillgren, *J. Mol. Recogn.* **1995**, 8, 125.
- [327] R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson, *J. Immunol. Methods*, **1991**, 145, 229.
- [328] J. L. Pellequer, M. H. V. van Regenmortel, *J. Immunol. Methods* **1993**, 166, 133.
- [329] L. Nieba, S. R. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Plückthun, *Anal. Biochem.* **1997**, 252, 217.
- [330] J. J. Ramsden, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 523.
- [331] C. I. Webster, M. A. Cooper, L. C. Packman, D. H. Williams, J. C. Gray, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 1618.
- [332] J.-P. Jost, O. Munch, T. Andersson, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 2788.
- [333] B. Persson, K. Stenhag, P. Nilsson, A. Larsson, M. Uhlen, P. A. Nygren, *Anal. Biochem.* **1997**, 246, 34.
- [334] M. Burgener, M. Sängler, U. Candrian, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 749.
- [335] R. Karlsson, A. Sjödin, WO 2004/086046 A1.
- [336] B. Goldstein, D. Coombs, X. He, A. R. Pineda, C. Wofsy, *J. Mol. Recogn.* **1999**, 12, 293.
- [337] D. R. Hall, D. J. Cann, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1997**, 244, 152.
- [338] D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, T. A. Morton, B. Goldstein, *Biophys. J.* **1998**, 75, 583.
- [339] P. Schuck, *Biophys. J.* **1996**, 70, 1230.
- [340] P. Schuck, A. P. Minton, *Anal. Biochem.* **1996**, 240, 262.
- [341] R. J. Fisher, M. Fivash, L. Casas-Finet, S. V. Bladen, K. L. Nitt, *Methods* **1994**, 6, 121.
- [342] R. Karlsson, H. Roos, L. Fagerstam, B. Persson, *Methods* **1994**, 6, 99.
- [343] L. L. H. Christensen, *Anal. Biochem.* **1997**, 249, 153.
- [344] P. M. Richalet-Secordel, N. Rauffer-Bruyere, L. L. Christensen, B. Ofenloch-Haehnle, C. Seidel, M. H. Regenmortel, *Anal. Biochem.* **1997**, 249, 165.
- [345] R. W. Glaser, *Anal. Biochem.* **1993**, 213, 152.
- [346] D. R. Hall, D. J. Cann, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1996**, 235, 175
- [347] P. A. van der Merwe, A. N. Barclay, D. W. Mason, E. A. Davies, B. P. Morgan, *Biochemistry* **1994**, 33, 10149.
- [348] P. Schuck. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 541.

- [349] D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, 8, 50.
- [350] D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12, 279.
- [351] K. Andersson, M. Hämäläinen, M. Malmqvist, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2475.
- [352] A. Bernard, H. R. Bosshard, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 230, 416.
- [353] P. R. Edwards, A. Gill, D. V. Pollard-Knight, M. Hoare, P. E. Buckle, *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 210.
- [354] D. J. O'Shannessey, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1996**, 236, 275.
- [355] J. Witz, *Anal. Biochem.* **1999**, 270, 201.
- [356] P. A. van der Merwe, A. N. Barclay, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, 257.
- [357] N. L. Kalinin, L. D. Ward, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1995**, 228, 238.
- [358] C. R. MacKenzie, T. Hirama, S. J. Deng, D. R. Bundle, S. A. Narang, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1527.
- [359] D. J. O'Shannessey, M. Birgham-Burke, K. K. Soneson, P. Hensley, I. Brooks, *Anal. Biochem.* **1993**, 212, 457.
- [360] A. Heding, R. Gill, Y. Ogawa, P. De Meyts, R. M. Shymko, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 13948.
- [361] E. Persson, M. Ezban, R. M. Shymko, *Biochemistry* **1995**, 34, 12775
- [362] A. Gertler, J. Grosclaude, C. J. Strasburger, S. Nir, J. Dijane, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 24482.
- [363] L. Masson, Y. J. Yu, A. Mazza, R. Brousseau, M. J. Adnang, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 20309.
- [364] M. Edlund, I. Blikstad, B. Obrink, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1393.
- [365] M. Raghavan, Y. Wang, P.-J. Bjorkman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11200.
- [366] M. Raghavan, V. R. Bonagura, S. L. Morrison, P. J. Bjorkman, *Biochemistry* **1995**, 34, 1649.
- [367] T. Sasaki, W. Gohring, T. C. Pan, M. L. Chu, R. Timpl, *J. Mol. Biol.* **1995**, 254, 892.
- [368] T. A. Morton, D. G. Myszka, I. M. Chaiken, *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 176.
- [369] L. D. Roden, D. G. Myszka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 225, 1073.
- [370] R. Karlsson, A. Falt, *J. Immunol. Methods* **1997**, 200, 121.
- [371] S. Sjölander, C. Urbanczky, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2338.
- [372] D. G. Myszka, P. G. Arulanantham, T. Sana, Z. Wu, T. A. Morton, T. L. Ciardelli, *Protein. Sci.* **1996**, 5, 2468.
- [373] D. G. Myszka, T. A. Morton, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 149.
- [374] www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.html
- [375] A. J. Alder, N. J. Greenfield, G. D. Fasman, *Meth. Enzymology* **1973**, 27, 675.
- [376] C. Djerassi, McGraw-Hill, New York, 1960; Chapter by A. Moscovitz, 150.

- [377] M. Bloemendal, W. C. Johnson jr., *Structural Information on proteins from Circular Dichroism Spectroscopy: Possibilities and Limitations in Physical methods to characterize pharmaceutical proteins* **1995**, 65.
- [378] C. Toniolo, *J. Phys. Chem.* **1970**, 74, 1390.
- [379] N. Sreerama, R. W. Woody, *Methods Enzymol., Numerical Methods part D* **2004**, 287, 243.
- [380] W. C. Johnson jr., I. Tinoco jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4389.
- [381] B. A. Wallace, R. W. Janes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 567.
- [382] M. Manning, R. W. Woody, *Biopolymers* **1991**, 31, 569.
- [383] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2744.
- [384] G. Yoder, A. Polese, R. A. G. D. Silva, F. Formaggio, M. Crisma, Q. B. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10278.
- [385] E. K. S. Vijayakumar, T. S. Sudha, P. Balaram, *Biopolymers* **1984**, 23, 877.
- [386] N. H. Anderson, Z. Liu, K. S. Prickett, *FEBS Lett.* **1996**, 399, 47.
- [387] T. Iwata, S. Lee, O. Oishi, H. Aoyagi, M. Ohno, K. Anzai, Y. Kirino, G. Sugihara, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 4928.
- [388] T. S. Sudha, E. K. S. Vijayakumar, P. Balaram, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1983**, 22, 464.
- [389] T. Scott Yokum, T. J. Gauthier, R. P. Hammer, M. L. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1167.
- [390] R. W. Woody, I. Tinoco jr., *J. Chem. Phys.* **1967**, 46, 4927.
- [391] G. D. Fasman (ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press New York, London, **1996**, 112.
- [392] U. Ludescher, R. Schywzer, *Helv. Chim. Acta* **1971**, 54, 1637.
- [393] <http://www.newark.rutgers.edu/chemistry/grad/chem585/lecture1.html>.
- [394] C. Krittanai, W. C. Johnson jr., *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 57.
- [395] P. Manavalan, W. C. Johnson jr., *J. Biosci. (Suppl.)* **1985**, 8, 141.
- [396] A. Toumadje, S. W. Alcorn, W. C. Johnson jr., *Anal. Biochem.* **1992**, 200, 321.
- [397] www.newark.rutgers.edu/chemistry/grad/chem585/lecture1.html
- [398] R. W. Woody, *The peptides* **1985**, 7, 15.
- [399] R. W. Woody, *Adv. Biophys. Chem.* **1992**, 2, 37.
- [400] W. C. Johnson jr., *Methods Biochem. Anal.* **1985**, 31, 61.
- [401] W. C. Johnson jr., *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1988**, 17, 145.
- [402] W. C. Johnson jr., *Proteins* **1990**, 7, 205.
- [403] J. T. Yang, C.-S. C. Wu, H.M. Martinez, *Methods Enzymol.* **1986**, 30, 208.

- [404] S. Y. Venyaminov, J. T. Yang, *Determination of Protein Structure in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, G. D. Fasman (Ed.), 1. Auflage, Plenum Press, New York and London, **1996**.
- [405] S. Brahms, J. Brahms, *J. Mol. Biol.* **1980**, 138, 149.
- [406] N. J. Greenfield, *Anal. Biochem.* **1996**, 235, 1.
- [407] M. C. Manning, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, 7, 1103.
- [408] C. T. Chang, C.-S. C. Wu, J. T. Yang, *Anal. Biochem.* **1978**, 91, 13.
- [409] B. Davidson, N. M. Tooney, G.D. Fasman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, 23, 156.
- [410] R. Townend, T. F. Kumosinski, S. N. Timasheff, G. D. Fasman, B. Davidson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, 23, 163.
- [411] P. Sarkar, P. Doty, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **1966**, 55, 981.
- [412] B. Davidson, G. D. Fasma, *Biochemistry* **1967**, 6, 1616.
- [413] N. J. Greenfield, B. Davidson, G. D. Fasman *Biochemistry* **1967**, 6, 1630.
- [414] N. J. Greenfield, G. D. Fasman *Biochemistry* **1969**, 8, 4108.
- [415] M. E. Magar, *Biochemistry* **1968**, 7, 617.
- [416] H. Rosenkranz, W. Scholten, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1971**, 352, 896.
- [417] W. C. Johnson jr., I. Tinoco jr. *Journal Am. Chem. Soc* **1972**, 94, 4389.
- [418] J. P. Hennessey jr., W. C. Johnson jr, *Biochemistry* **1981**, 20, 1085.
- [419] V. P. Saxena, D. B. Wetlaufer, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1971**, 68, 969.
- [420] Y.-H. Chen, J. T. Yang, H. M. Martinez, *Biochemistry* **1972**, 11, 4120.
- [421] Y.-H. Chen, J. T. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1971**, 44, 1285.
- [422] Y.-H. Chen, J. T. Yang, *Biochemistry* **1974**, 13, 3350.
- [423] I. A. Bolotina, V. O. Chekhov, V. Y. Lugauskas, A. V. Finkelstein, O. B. Ptitsyn, *Mol. Biol.* (Engl. transl.) **1980**, 14, 701.
- [424] I. A. Bolotina, V. O. Chekhov, V. Y. Lugauskas, O. B. Ptitsyn, *Mol. Biol.* (Engl. transl.) **1980**, 14, 709.
- [425] I. A. Bolotina, V. O. Chekhov, V. Y. Lugauskas, O. B. Ptitsyn, *Mol. Biol.* (Engl. transl.) **1981**, 15, 130.
- [426] I. A. Baikalov, Analysis of the methods of determination of proteins secondary structure from CD spectra, [in Russisch], M.S. thesis, Institute of Protein research, Pushchino, USSR, **1985**.
- [427] S. W. Provencher. J. Glöckner, *Biochemistry* **1981**, 20, 33.
- [428] S. W. Provencher, *Comput. Phys. Commun.* **1982**, 27, 213.
- [429] S. W. Provencher, *Comput. Phys. Commun.* **1982**, 27, 229.
- [430] P. Manavalan, W. C. Johnson jr., *Anal. Biochem.* **1987**, 167, 76.

- [431] I. H. M. van Stokkum, H. J. W. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle, F. C. A. Goren, *Anal. Biochem.* **1990**, *191*, 110.
- [432] P. Pancoska, M. Blazek, T. A. Keiderling, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10250.
- [433] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **1993**, *209*, 32.
- [434] P. Pancoska, T. A. Keiderling, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6885.
- [435] P. Pancoska, S. C. Yasui, T. A. Keiderling, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5089.
- [436] A. Perczel, M. Hollósi, G. Tusnády, G. D. Fasman, *Protein Eng.* **1991**, *4*, 669.
- [437] A. Perczel, K. Park, G. D. Fasman, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1992**, *3*, 57.
- [438] K. Park, A. Perczel, G. D. Fasman, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1032.
- [439] A. Perczel, K. Park, G. D. Fasman, *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 38.
- [440] G. Böhm, R. Muhr, R. Jaenicke, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 191.
- [441] M. A. Andrade, P. Chacon, J. J. Merelo, F. Morán, *Protein Eng.* **1993**, *6*, 383.
- [442] B. Dalmas, G. J. Hunter, W. H. Bannister, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *34*, 17.
- [443] J. Reed, T. A. Reed, *Anal. Biochem.* **1997**, *254*, 36.
- [444] N. Sreerama, R. W. Woody, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 497.
- [445] N. R. Kallenbach, E. J. Spek, *Methods Enzymol.* **1998**, *295*, 26.
- [446] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 252.
- [447] G. Deléage, C. Geourjon, *Comput. Appl. Biosci.* **1993**, *9*, 192.
- [448] A. Lobley, B. A. Wallace, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 373a.
- [449] A. Lobley, L. Whitmore, B. A. Wallace, *Bioinformatics* **2002**, *18*, 211.
- [450] L. Whitmore, B. A. Wallace, *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 668.
- [451] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov, R. W. Woody, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 370.
- [452] L. A. Compton, W. C. Johnson jr., *Anal. Biochem.* **1986**, *155*, 155.
- [453] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252.
- [454] I. A. Bolotina, V. O. Chekhov, V. Y. Lugauskas, Yu, O. B. Ptitsyn, *Mol. Biol. (USSR)* **1982**, *14*, 902.
- [455] N. J. Greenfield, *Num. Comp. Meth.* **2004**, 282.
- [456] N. J. Greenfield, CD Spectroscopy, <http://www2.umdj.edu/cdrwjweb/handout.pdf> **2004**.
- [457] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 243.
- [458] D. M. Gray, *Circular Dichroism of Protein-Nucleic Acid Interactions in Circular Dichroism and the conformational Analysis of Biomolecules*, G. D. Fasman (Ed.), 1. Auflage, Plenum Press, New York and London, **1996**.
- [459] R. C. Lawson jr., S. S. York, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4867.
- [460] M. G. Fried, H.-M. Wu, D. M. Crothers, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 2479.

- [461] B. Blazy, F. Culard, J. C. Maurizot, *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 175.
- [462] R. M. Wartell, S. Adhya, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11531.
- [463] L. Altschmied, W. Hillen, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 2171.
- [464] F. Culard, J. C. Maurizot, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5175.
- [465] I. A. Taylor, K. G. Davis, D. Watts, G. G. Kneale, *EMBO J.* **1994**, 5772.
- [466] C. Torigoe, S. Kidokoror, M. Takimoto, Y. Kyogoku, A. Wada, *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 733.
- [467] M. P. Kirpichnikov, A. P. Yartzev, L. E. Minhenkova, B. K. Chernov, I. V. Ivanov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *3*, 529.
- [468] F. Connor, P. D. Cary, C. M. Read, N. S. Preston, P. C. Driscoll, P. Denny, C. Crane-Robinson, A. Ashworth, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3339.
- [469] A. R. Ferré-D' AmaréP. Pognonec, R. G. Roeder, S. K. Burley, *EMBO J.* **1994**, *13*, 180.
- [470] D. E. Fisher, L. A. Parent, P. A. Sharp, *Cell* **1993**, *72*, 467.
- [471] R. V. Talanian, C. J. Knight, P. S. Kim, *Science* **1990**, *249*, 769.
- [472] N. P. Johnson, J. Lindstrom, W. A. Baase, P. H. Hippel, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1994**, *91*, 4840.
- [473] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3346.
- [474] G. Binning, C.F. Quate, Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
- [475] S. Thalhammer, R. W. Stark, S. Müller, J. Wienberg, W. M. Heckl, *J. Struct. Es.* **1997**, *119*, 232.
- [476] D. Fotiadis, D. J. Müller, G. Tsiotis, L. Hasler, P. Tittmann, T. Mini, P. Jenö, H. Groß, A. Engel, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 83.
- [477] D. J. Müller, G. Büldt, A. Engel, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 239.
- [478] A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Müller, *Current Biology* **1999**, *9.4*, 133.
- [479] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, D. Anselmetti, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1968.
- [480] S. Khan, M. P. Sheetz, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 785.
- [481] D. Leckband, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 1.
- [482] C. J. Roberts, P. M. Williams, M. C. Davies, D. E. Jackson, S. J. B. Tendler, *TIBTECH* **1994**, *12*, 127.
- [483] P. K. Hansma, V. B. Elings, O. Marti, C. E. Bracker, *Science* **1988**, *242*, 209.
- [484] T. R. Albrecht, C. F. Quate, *J. Appl. Phys.* **1987**, *62*, 2599.
- [485] S. Gould, *Nature* **1988**, *332*, 332.
- [486] F. J. Giessibl, *Science* **1995**, *267*, 68.
- [487] H. Fuchs, *J. Mol. Struct.* **1992**, *292*, 29.
- [488] R. Lal, S. A. John, *Am. J. Physiol.* *266 (Cell Physiol. 35)* **1994**, C1.

- [489] H. G. Hansma, J. H. Hoh, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 115.
- [490] G. J. Leggett, C. J. Roberts, P. M. Williams, M. C. Davies, D. E. Jackson, S. J. B. Tendler, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8852.
- [491] H. D. Göbel, J. K. H. Hörber, C. Gerber, A. Leitner, T. W. Hänsch, *Ultramicroscopy* **1992**, *42-44*, 1260.
- [492] S. M. Lindsay, *J. Vac. Sci. Technol.* **1993**, *A11*, 808.
- [493] W. Stocker, S. N. Maganov, H. J. Cantow, J. C. Wittman, B. Lotz, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5915.
- [494] W. Häberle, J. K. H. Hörber, F. Ohnesorge, D. P. E. Smith, G. Binnig, *Ultramicroscopy* **1992**, *42-44*, 1161.
- [495] S. Scheuring, D. J. Müller, H. Stahlberg, H.-A. Engel, A. Engel, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 172.
- [496] C. Bustamante, C. Rivetti, D. J. Keller, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 709.
- [497] C. Wyman, I. Rombel, A. K. North, C. Bustamante, S. Kustu, *Science* **1997**, *275*, 1658.
- [498] K. Rippe, M. Guthold, P. H. von Hippel, C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 125.
- [499] M. Stolz, D. Stoffler, U. Aebi, C. Goldsbury, *J. Struct. Biol.* **2000**, *131*, 171.
- [500] C. H. Chen, D. O. Clegg, H. G. Hansma, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8262.
- [501] H. G. Hansma, K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allan, S. M. Parsons, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 99.
- [502] A. Jeremic, M. Kelly, S.-J. Cho, M. H. Stromer, B. P. Jena, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2035.
- [503] J. K. H. Hörber, M. J. Miles, *Science* **2003**, *302*, 1002.
- [504] H. G. Hansma, L. Pietrasanta, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 579.
- [505] D. P. Allison, P. Hinterdorfer, W. Han, *Current Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 47
- [506] G. Binnig, *Ultramicroscopy* **1997**, *42-44*, 7.
- [507] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1541.
- [508] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9972.
- [509] M. Carrion-Vasquez, A. Oberhauser, S. Fowler, P. Marszalek, S. Broedel, J. Clarke, J. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3694.
- [510] J. Fritz, A. G. Katopodis, F. Kolbinger, D. Anselmetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12283.
- [511] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *276*, 1109.
- [512] T. Boland, B. D. Ratner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5297.
- [513] T. Han, J. M. Williams, T. P. Beebe, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *307*, 365.

- [514] M. Ludwig, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Micosc. Microanal. Microstruct.* **1994**, 5, 321.
- [515] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub. *Science* **1994**, 264, 415.
- [516] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* **1994**, 10, 354.
- [517] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, H. E. Gaub, *Nat. Cell. Biol.* **2000**, 2, 313.
- [518] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann, H. Gaub, *Biophys. J.* **1998**, 24, 2398.
- [519] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool. M. Kashlev, P. Hansma, *Biochemistry* **1997**, 36, 461.
- [520] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, G. N. Misevic, *Science* **1995**, 267, 1173.
- [521] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, H.-J-Güntherodt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11277.
- [522] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7402.
- [523] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H.-J. Güntherodt, *Biophys. J.* **1996**, 70, 2437.
- [524] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3477.
- [525] W. Baumgartner, P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler, D. Drenckhahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 4005.
- [526] G. Kada, L. Blayney, L. H. Jeyakumar, F. Kienberger, V.P. Pastushenko, S. Fleischer, H. Schindler, F. A. Lai, P. Hinterdorfer, *Ultramicroscopy* **2001**, 86, 129.
- [527] A. Raab, W. Han, B. Badt, S. J. Smith-Gill, S. M: Lindsay, H. Schindler, P. Hinterdorfer, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 901.
- [528] R. Eckel, R. Ros, B. Decker, J. Mattay, D. Anselmetti, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 484.
- [529] F. Kühner, L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2004**, 87, 2683.
- [530] R. Krautbauer, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3912.
- [531] D. Anselmetti, J. Fritz, B. Smith, X. Fernandez-Busquets, *Single Mol.* **2000**, 1, 17
- [532] R. Krautbauer, S. Fischerländer, S. Allen, H. E. Gaub, *Single Mol.* **2002**, 3, 97.
- [533] R. Krautbauer, L. H. Pope, T. E. Schrader, S. Allen, H. E. Gaub, *FEBS Lett.* **2002**, 510, 154.
- [534] A. Lebrun, R. Lavery, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1998**, 16, 593.
- [535] S. D. Wilking, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 109.
- [536] Novabiochem, Catalog & Peptide Synthesis Handbook 2000, S28.
- [537] G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci* **1949**, 51, 660.
- [538] Persönliche Mitteilung Frédéric Heitz

- [539] R. Eckel, S.D. Wilking, A. Becker, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 3921.
- [540] G. I. Bell, *Science* **1978**, *200*, 618.
- [541] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, *Nature* **1999**, *397*, 50.
- [542] M. Schlosshauer, D. Baker, *Protein Science* **2004**, *13*, 1660.
- [543] R.B. Woodward, K. Heusler, J. Gostelli, P. Naegell, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, H. Vorbrüggen, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 852.
- [544] M. Malešević, U. Strijowski, D. Bächle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73.
- [545] C. L. Forber, E. C. Kelusky, N. J. Bunce, M. C. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5884.
- [546] H.-H. Perkampus, *Z. Naturf. A* **1962**, *17*, 614.
- [547] S. F. Mason, *J. Chem. Soc.* **1962**, 493.
- [548] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage **1995**, 5.
- [549] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Paqaphotiv, P. Sotiri, Y. Wenqing, W. Schafer, *Tetrahedron Lett.* 1989, **30**, 3943.
- [550] Novabiochem, *Catalog & Peptide Synthesis Handbook 2000*, P4.

8. Anhang

8.1 Sekundärstrukturanalysen aus den Daten der CD-Spektroskopie

Tab. 23: Ergebnis der verschiedenen Analysemethoden für den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturen für PhoB(190-209).

| | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | Coil |
|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|------|
| Fasman | 32,3 | 11,5 | 0,0 | 56,2 |
| Chen | 16,1 | -3,4 | 0,0 | 87,3 |
| Bolotina | 37,0 | -18,5 | 70,4 | 11,1 |
| Chang | 19,1 | 3,2 | 24,2 | 53,5 |
| Yang I | 14,0 | 32,5 | 0,0 | 53,5 |
| Yang II | 23,7 | 0,0 | 12,3 | 64,2 |
| über die Mol. El. | 45,5 | | | |

Tab. 24: Ergebnis der verschiedenen Analysemethoden für den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturen für PhoB(190-209) R193A.

| | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | Coil |
|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|------|
| Fasman | 29,0 | 11,9 | 0,0 | 59,1 |
| Chen | 11,5 | 8,1 | 0,0 | 80,3 |
| Bolotina | 26,6 | -1,1 | 51,8 | 22,7 |
| Chang | 15,7 | 11,3 | 25,4 | 47,6 |
| Yang I | 15,7 | 26,2 | 0,0 | 58,1 |
| Yang II | 18 | 10 | 72 | 56,5 |
| über die Mol. El. | 38,5 | | | |

Tab. 25: Ergebnis der verschiedenen Analysemethoden für den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturen für PhoB(190-209) R203A.

| | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | Coil |
|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|------|
| Fasman | 33,7 | 7,9 | 0,0 | 58,4 |
| Chen | 9,6 | 7,7 | 57,0 | 25,7 |
| Bolotina | 18,6 | 11,3 | 47,5 | 22,6 |
| Chang | 11,2 | 35,0 | 15,5 | 38,2 |
| Yang I | 21,2 | 20,6 | 0,0 | 58,2 |
| Yang II | 24,4 | 0 | 0 | 75,6 |
| über die Mol. El. | 62,5 | | | |

Tab. 26: Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse mittels CDNN für PhoB(190-209)

| | 190-260 nm | 195-260 nm | 200-260 nm | 205-260 nm | 210-260 nm |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| α -Helix | 28,60% | 30,80% | 36,40% | 40,60% | 35,80% |
| β -Faltblatt antiparallel | 20,50% | 12,80% | 8,00% | 6,50% | 7,60% |
| β -Faltblatt parallel | 8,00% | 8,20% | 7,40% | 7,20% | 8,10% |
| β -Turn | 19,00% | 17,70% | 16,70% | 15,70% | 16,40% |
| Coil | 26,40% | 27,40% | 27,10% | 28,30% | 31,50% |
| Summe | 102,40% | 96,90% | 95,60% | 98,30% | 99,50% |

Tab. 27: Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse mittels CDNN für PhoB(190-209) R193A..

| | 190-260 nm | 195-260 nm | 200-260 nm | 205-260 nm | 210-260 nm |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| α -Helix | 23,00% | 23,20% | 22,40% | 24,20% | 20,60% |
| β -Faltblatt antiparallel | 33,00% | 20,00% | 13,60% | 10,50% | 13,00% |
| β -Faltblatt parallel | 9,40% | 10,70% | 11,60% | 12,30% | 12,80% |
| β -Turn | 20,40% | 19,50% | 19,80% | 18,50% | 19,70% |
| Coil | 29,90% | 33,10% | 36,90% | 40,50% | 43,50% |
| Summe | 115,70% | 106,50% | 104,30% | 106,00% | 109,60% |

Tab. 28: Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse mittels CDNN für PhoB(190-209) R203A..

| | 190-260 nm | 195-260 nm | 200-260 nm | 205-260 nm | 210-260 nm |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| α -Helix | 31,80% | 35,70% | 41,30% | 46,90% | 37,80% |
| β -Faltblatt antiparallel | 22,10% | 11,80% | 7,40% | 5,60% | 7,20% |
| β -Faltblatt parallel | 6,50% | 6,50% | 5,90% | 5,90% | 7,80% |
| β -Turn | 19,40% | 17,40% | 16,50% | 15,00% | 16,10% |
| Coil | 18,90% | 20,00% | 21,00% | 24,30% | 30,30% |
| Summe | 98,70% | 91,40% | 92,20% | 97,70% | 99,10% |