

**Induktion von Sekundärstrukturen durch
den Einbau von Alanyl-PNA
in Peptide und Proteine**

Dissertation zu Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Fritz Heinrich Hoffmann
aus Altdorf bei Nürnberg

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Mai 2003 am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg und am Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Ulf Diederichsen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Freiheit, einhergehend mit einer stetigen Diskussionsbereitschaft, sowie für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit während der ganzen Zeit.

Herzlichen Dank für die gemeinsame Zeit in einem Labor gebührt auch Dr. Daniel Weicherding, Denise Leicht, Thomas Wagner, Roswitha Scheblein, Roberto Roda Bravo, Holger Guthmann, Brigitte Worbs, Björn Dietrich und als Praktikantenintermezzo Rudolf Rockenmayer.

Für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Interleukine 8 danke ich Frau Prof. A. Beck-Sickinger und Ralf David, für die Zusammenarbeit bei den Kristallisationsversuchen Herrn Prof. G. Sheldrick und Jose Cuesta.

Für die Unterstützung bei den massenspektroskopischen Untersuchungen danke ich Frau Dr. S. Diem und Herrn Dr. H. Frauendorf.

Am universitären Umfeld sind natürlich noch viele mehr beteiligt, Serviceeinrichtungen, z.B. Werkstatt oder Analytik-Abteilung, die Verwaltung, Kollegen

anderer Abteilungen etc., mit denen „auf der Treppe“ zwischendurch ein Problem diskutiert wird, auch ihnen allen gebührt natürlich mein Dank.

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	β -Faltblattstrukturen	4
3	Induktion von Sekundärstrukturen in Peptiden	7
3.1	Struktureigenschaften von Alanyl PNA	12
3.2	Synthese und Kristallisation von Guanin-Cytosin-Dimeren	18
3.2.1	Synthese und Kristallisation von H-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-OH	19
3.2.2	Synthese und Kristallisation von H-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH ₂	21
3.2.3	Synthese und Kristallisation von Lys-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH ₂	22
3.3	Xanthin- und Hypoxanthinderivate	26
4	Einfluss des Einbaus von Alanyl-PNA-Fragmenten in Peptide auf Struktur und Eigenschaft	30
4.1	Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Peptide	32
4.2	Ein Gramicidin-S-Alanyl-PNA-Hybrid-Analogon als Modellsystem für die Duplexbildung	40
4.3	Synthese und Charakterisierung eines Alanyl-PNA-Pentamer-Systems als Referenz	46
4.4	Interleukin 8 Derivate als Modellsysteme	50
4.4.1	N-Terminale Helix IL-8(65-77)	51
4.4.2	Interleukin-8 Derivate	52
5	Zusammenfassung und Ausblick	62
6	Experimenteller Teil	66
6.1	Allgemeine Arbeitstechniken	66
6.2	Synthesen	71
6.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	71
6.2.2	Synthese von Alanyl-Nucleoaminosäuren	75
6.2.3	Synthese von Alanyl-PNA Peptiden und deren Hybride	83

6.2.4	hIL8-Alanyl-Derivat	88
6.2.5	Kristallisationsversuche	91
7	Anhang	95
8	Literaturverzeichnis	106

Abkürzungen

Aa	Aminosäure
A	Adenin
abs.	absolutiert
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Acetanhydrid
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
br	breit
Bzl	Benzyl
C	Cytosin
c	Konzentration
CBD	Chitinbindende Domäne
CD	Circulardichroismus
δ	chemische Verschiebung
D	2,6-Diaminopurin
d	Dublett
DBU	1,8-Diazobicyclo[5.4.0.]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
deg	Grad
dest.	destilliert
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO, d ⁶	Hexadeuterodimethylsulfoxid
d. Th.	des Theoretischen
EE	Essigsäureethylester
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
equiv.	Mol-Äquivalent
ESI	Elektrosprayionisation
FC	Flash-Säulenchromatographie
G	Guanin
gef.	gefunden
gew. %	Gewichtsprozent
% H	prozentuale Hyperchromizität
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HCTU	<i>O</i> -(1H-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hIL-8	Humanes Interleukin 8
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOCl	6-Chloro-1-hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	Hochvakuum (0.05 Torr)
Hz	Hertz
I	Isoguanin
i. Rot.	im Rotationsverdampfer
J	skalare Kopplungskonstante
K	Kelvin

konz.	konzentriert
m	Multiplett
M	molar
M/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MBHA-PS	4-Methylbenzylhydramin-Polystyrol
MeOH	Methanol
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure
MHz	Megahertz
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MS	Massenspektrum
PAM	Phenylacetamidomethyl
ppm	parts per million
q	Quartett
rel.	relativ
Pg	Schutzgruppe
PyBrop®	Brom-tris-pyrrolidin-phosphonium-hexafluor-phosphat
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
t	Triplett
T _m	Schmelztemperatur von Oligonucleotiden und Peptidnucleinsäuren
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFMS	Trifluormethansulfonsäure

THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett-Spektroskopie
X	Xanthin

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*^{2,3,4} empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden sind kursiv geschrieben.

¹ Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210.

² IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1971** 10, 3983.

³ IUPAC-IUB (JCBN); Nomenclature and the Symbolism for Amino Acids and Peptides, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37.

⁴ IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Eigenschaft von Proteinen, als Rezeptoren, Enzyme bzw. infektiöse Elemente zu wirken, ist auf deren Fähigkeit zurückzuführen, genau definierte dreidimensionale Strukturen einzunehmen. Obwohl große Anstrengungen unternommen worden sind, ist der Mechanismus der Proteinfaltung immer noch nicht genau geklärt. Der Umstand, dass viele denaturierte Proteine im Reagenzglas problemlos in den nativen Zustand zurückfalten können, ist ein eindeutiger Beleg dafür, dass die gesamte benötigte konformelle Information in der Sequenz enthalten ist. Trotz großer Fortschritte in letzter Zeit kann die Struktur eines Peptids aber immer noch nicht aus der Sequenz vorrausgesagt werden. Somit ist das künstliche Design von Proteinstrukturen immer noch eine große Herausforderung.^[1] Weithin wird von einem hierarchischen Mechanismus ausgegangen: Zuerst faltet sich das Protein auf einer lokalen Ebene, wobei örtlich benachbarte Abschnitte miteinander wechselwirken.^[2] Diese formierenden *Nuclei* unterstützen dann Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bereichen und führen schließlich in einem kooperativen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Ausbildung der nativen Struktur.

Die gefaltete Struktur eines Proteins ist dann aus einfachen Unterstrukturelementen wie α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut. Mit dem Ziel ein besseres Verständnis zu erlangen, um molekulare Rezeptoren und Katalysatoren zu erzeugen und neue Pharmaka zu finden, haben Biologen und Chemiker Verbindungen dargestellt, die diese Strukturelemente imitieren.^[3]

Eine Änderung der Tertiärstruktur kann dramatische Folgen für biologische Systeme mit sich bringen. So ist der Nobelpreis von *S. Prusiner* für seine Arbeiten über sogenannte Prionen ein hervorstechendes Beispiel solcher Effekte.^[4,5]

Das Prion-Protein kann in zwei unterschiedliche Konformationen falten, eine, die zu krankhaften Veränderungen führt (*scrapie* PrP = PrP^{Sc}), und die

normalerweise vorliegende (PrP = PrP^c) Form. Die PrP^{Sc}-Form besitzt infektiöse Eigenschaften und kann eine Umfaltung auslösen, bei der aus dem normalen PrP^c-Protein die stabilere PrP^{Sc}-Form wird.

Da die Eigenschaften, bzw. die Aktivität von Biooligomeren durch ihre Struktur bestimmt wird, führt eine Einflussnahme auf die Konformation immer zu einer biologischen Wirkung. Ein zumindest teilweise entfalteter Zustand besitzt somit keine, bzw. eine geringere Aktivität. Eine Rückführung in die ursprüngliche Form führt dann wieder zur erhöhten Aktivität der nativen Konformation.

Durch ein „Umschalten“ der Konformation sollte so ein „Ein“- bzw. „Ausschalten“ der Aktivität möglich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, die Konformation von Peptiden durch den Einbau von Peptidnucleinsäure-(PNA)-Segmenten zu beeinflussen.

Aus bisherigen Arbeiten ist bekannt, dass Alanyl-PNA ein abgeschlossenes Paarungssystem mit eigenen Selektivitätsregeln darstellt.^[6] Alanyl-PNA besitzt im Duplex, d.h. mit geeignetem Gegenstrang, eine lineare, starre β -faltblattartige Struktur.^[7,8,9]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit Herrn *Prof. Sheldrick* (Göttingen) ein tieferes Verständnis der molekularen Struktur von Alanyl-PNA Hexameren durch Kristallisationsversuche erhalten werden.

Darüberhinaus sollte die Möglichkeit untersucht werden, mit Alanyl-PNA-Peptid-Hybriden Gramacidin S Analoga, darzustellen. Eine weitergehende Fragestellung war, inwieweit durch die Zugabe des geeigneten PNA-Gegenstrangs eine konformelle Änderung im Peptid induziert werden kann. So könnte ein molekularer Schalter erhalten werden, der Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins hat.

Als Weiterentwicklung der Hybride sollte in Zusammenarbeit mit Frau *Prof. Beck-Sickinger* (Leipzig) untersucht werden, ob PNA-Interleukin-8-Chimäre mittels *native chemical ligation* dargestellt werden können. An diesen sollte

dann die Änderung der Struktur durch Zugabe eines geeigneten PNA-Gegenstranges untersucht werden. Es könnte so ein „Schalten“ der Protein-Struktur und somit der biologischen Aktivität erreicht werden.

2 β -Faltblattstrukturen

Eine Helix eines Proteins ist aus einem einzelnen Sequenzabschnitt aufgebaut. Bei einem β -Faltblatt müssen dagegen mindestens zwei Sequenzabschnitte der Polymerkette zusammenkommen. Je nach Abfolge der Aminosäuren kann von paralleler bzw. antiparalleler Anordnung gesprochen werden (Abbildung 1, Abbildung 2).

Die Verknüpfung erfolgt über Wasserstoffbrücken, während sich für beide Ausrichtungen jeweils unterschiedliche H-Brücken ergeben. Die Seitenketten stehen alternierend oberhalb bzw. unterhalb des gewellten Faltblattes. Der gesamte Strang ist leicht in sich verdreht. β -Faltblätter kommen auch in globulären Proteinen vor. Der Anteil von β -Faltblättern im Insulin beträgt 12 Prozent, und in der Ribonuclease 38 Prozent.^[10]

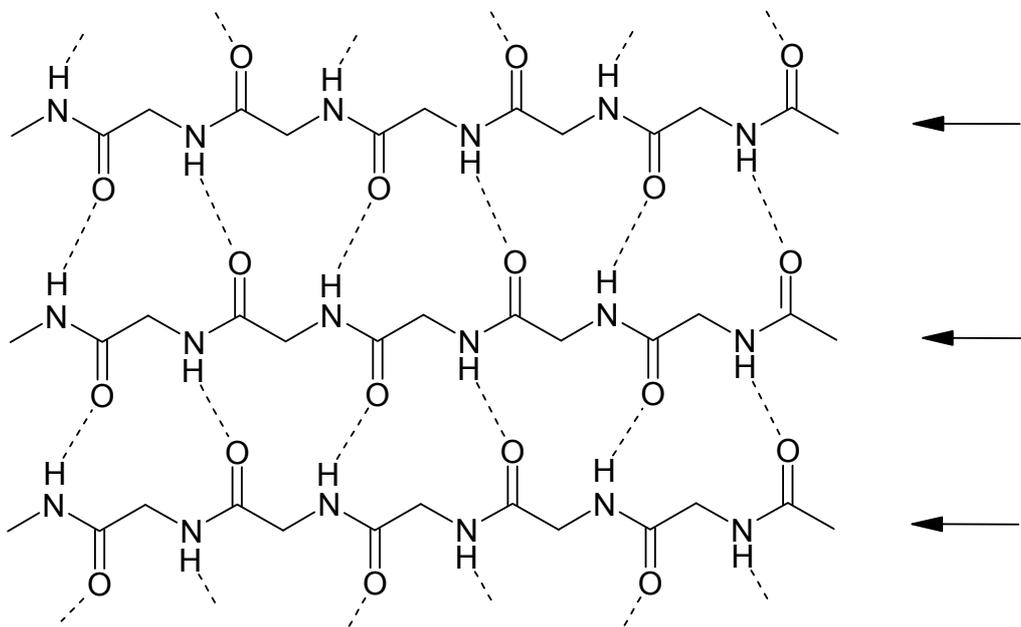


Abbildung 1: Idealisierte Darstellung eines parallelen Faltblattes.

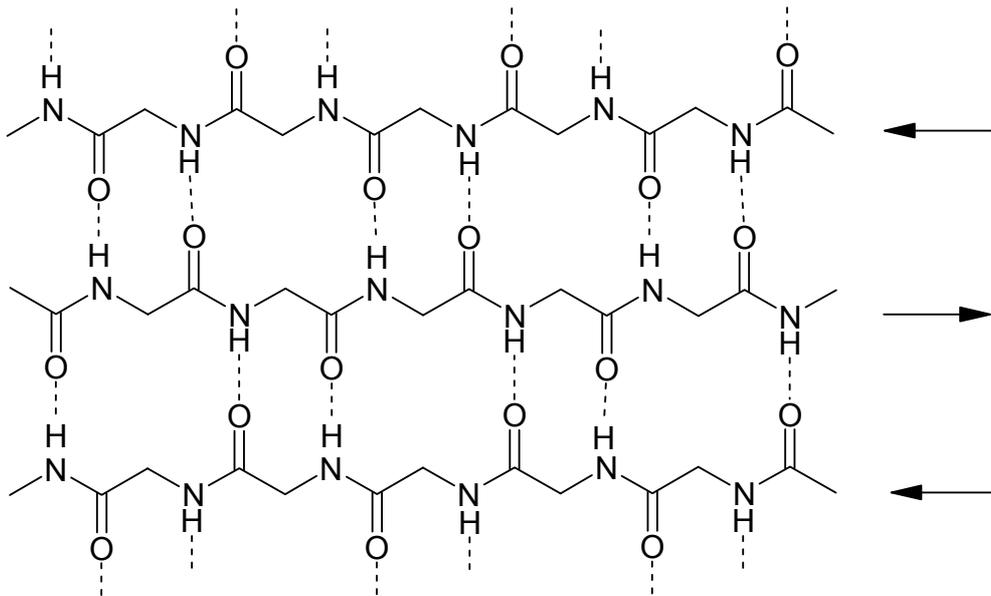


Abbildung 2: Idealisierte Darstellung eines antiparallelen Faltblattes.

Während α -helikale Strukturen bezüglich der energetischen Eigenschaften der Helixbildung breit untersucht wurden, liegen für β -Faltblätter aufgrund der Komplexität weniger theoretische Daten vor.

Selbst die einfachsten antiparallelen β -Faltblätter, ein einfacher β -Hairpin, besitzen noch mehrere Ebenen an Komplexität der energetischen Eigenschaften, bei denen zwischen dem Anteil des Turns und dem des Faltblattes unterschieden werden muss (Abbildung 3), was die theoretische Behandlung kompliziert.^[11]

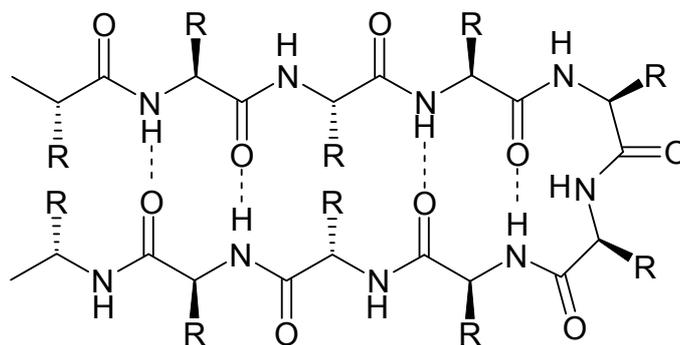


Abbildung 3: β -Hairpin.

Auch spielt die β -Faltblattbildung eine entscheidende Rolle bei vielen Krankheiten. Hier seien nur Alzheimer und die in der Einleitung schon erwähnten Prionen-Infektionen erwähnt.

Es gibt bereits Ansätze eine Blockierung der β -Faltblattbildung als therapeutischen Ansatz zu verwenden. Es wurden schon Peptidderivate benutzt um eine Dimerisierung der HIV-1 Protease zu blockieren bzw. die Bildung von β -Amyloiden zu verhindern.^[12,13]

3 Induktion von Sekundärstrukturen in Peptiden

Vor kurzem zeigte die Arbeitsgruppe von *L. Moroder* die Anwendung eines photochemischen Schalters in cyclisch verbrückten Peptiden.^[14] Die Bildung der Disulfidbrücken mancher Proteine in Eukaryonten bzw. Prokaryonten werden durch Proteindisulfid-Isomerasen (PDI) bzw. Disulfidbindungsproteine (Dsb) katalysiert. Im Zentrum der Proteine findet man das Motiv -Cys-Xaa-Yaa-Cys-. Es wurden von dieser Arbeitsgruppe Peptide dargestellt, die neben dieser Sequenz noch eine photoisomerisierbare Azobenzol-Einheit im Rückgrat enthalten. Unter Bestrahlung erfolgt eine Konformationsänderung durch die *cis-trans* Isomerisierung der Azo-Gruppe im Peptid, was zu unterschiedlichen Redoxpotentialen führt (Abbildung 4).

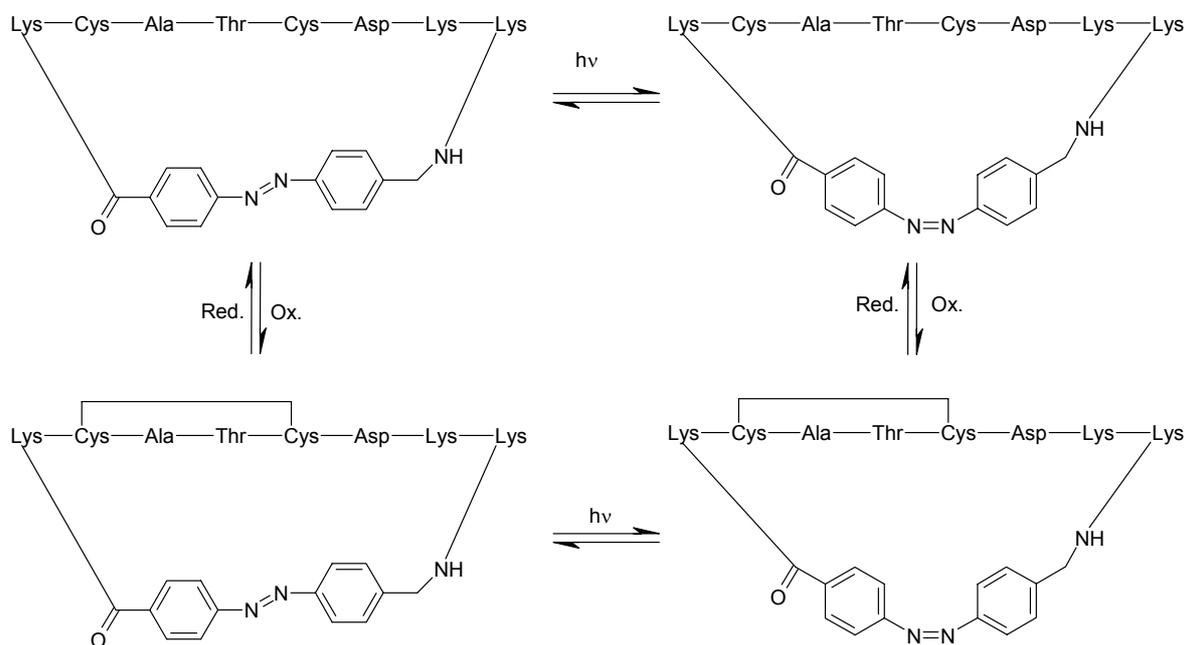


Abbildung 4: Cyclopeptid mit photochemisch schaltbarer Azobenzoleinheit.

Der Einbau artifiziieller Rezeptoren in die Seitenketten zur Regulierung oder Modulierung von Protein/Peptid Aktivitäten durch konformelle Änderungen der Struktur wurde von der Arbeitsgruppe um *I. Hamachi* verfolgt.^[15] Ribonuclease S (RNase S) entsteht bei der Hydrolyse von RNase A und besteht aus zwei

Fragmenten, dem S-Peptid und dem S-Protein.^[16,17,18] Diese beiden Fragmente, die unter denaturierenden Bedingungen getrennt werden können, rekomplicieren unter nativen Bedingungen wieder zum biologisch aktiven Komplex.^[19] Deswegen kann semisynthetische RNase S als Modell für den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine dienen, da S-Peptid Fragmente an fester Phase künstlich dargestellt werden können. Durch Zugabe des synthetischen S-Peptid-Analogons zum S-Protein erhält man modifizierte rekomplicierte RNase S. Als Rezeptor wurde eine nichtnatürliche Aminosäure mit einer Iminodiessigsäure (Ida⁴) in der Seitenkette gewählt (Abbildung 5), die mittels Fmoc-Festphasensynthese eingebaut wurde.^[20]

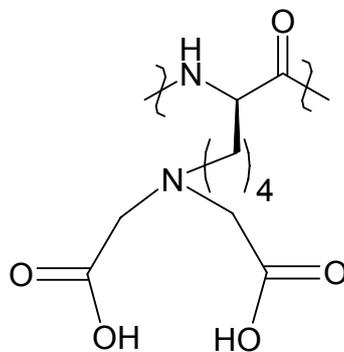


Abbildung 5: Iminodiessigsäure (Ida⁴).

Diese Seitenkette stellt einen starken „Chelator“ für Übergang-Metallionen in wässriger Lösung dar und ist unter physiologischen Bedingungen negativ geladen. Durch Zugabe von Fe(III) Ionen wird aus der negativen Seitenkette ein positiver Rest. Diese „*guest-induced Umpolung*“ wird genutzt, indem die nativen kationischen Aminosäuren Lys oder Arg gegen Ida⁴ ausgetauscht werden. Ohne Zugabe der Fe-Ionen ersetzt man also eine basische gegen eine saure Aminosäure. Die Änderung der Ladungsverteilung führt auch zu einer strukturellen Änderung des Proteins mit einer Verringerung der Aktivität des RNase S-Analogons als Folge. Durch Zugabe von Fe(III)-Ionen wird die saure Seitenkette Ida⁴ wieder „basisch“ und die ursprüngliche Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche wird nahezu wieder erlangt. Durch diese Umpolung findet

wieder ein konformeller Wechsel statt, und die Aktivität erreicht fast die der nativen RNase S (Abbildung 6).^[21]

Durch Zugabe von Eisen(III)-Ionen gelingt dieser Gruppe also ein Einschalten der Proteinaktivität.

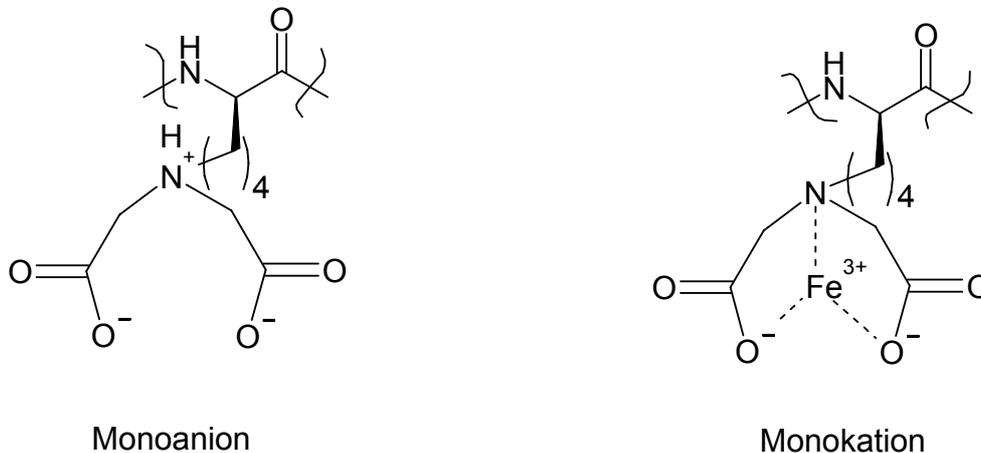


Abbildung 6: *Ida⁴* unter physiologischen Bedingungen und mit Fe (III)-Ionen chelatiert.

Die Arbeitsgruppe von I. Hamachi verwendete auch einen photochemischen Schalter. Eine von M. Goodmann entwickelte Aminosäure (Abbildung 7) wurde in die Helix des S-Peptides eingebaut.^[22,23] Nach Rekomplesxierung mit dem S-Protein wurde ein weiteres RNase S-Analogon erhalten.

Unter Bestrahlung mit UV-Licht liegt die *cis*-Form in der Seitenkette vor, bei Einwirkung sichtbaren Lichts die *trans*-Form. Es kann also von Ein- und Ausschalten, bzw. von Umschalten der Struktur in der Seitenkette gesprochen werden.^[24]

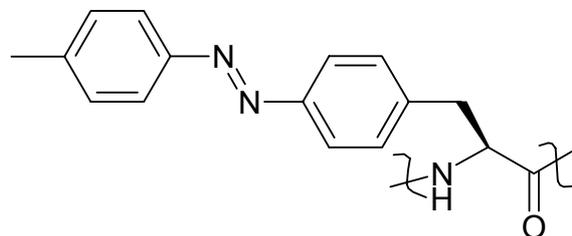


Abbildung 7: Photochemisch schaltbare Azabenzolaminosäure.

Bei einigen Derivaten wurde in der *cis*-Form keine Aktivität gemessen (ausgeschaltet), während die *trans*-Form Aktivität aufweist (eingeschaltet). Entscheidend, um einen Effekt zu erzielen ist, dass die Aminosäure in die

Berührungsebene zwischen S-Protein und S-Peptid eingebaut wird, nur dann führt die Konformationsänderung auch zu Aktivitätsänderungen. Anschaulich gesprochen bedeutet dies, ein in die Lösung stehender Rest ändert bei einer *cis-trans*-Isomerisierung nicht das Peptid-Rückgrat, eine zum Protein hin orientierte Seitenkette kann dagegen Änderungen erzielen.

Einen anderen Weg zur Induktion von Struktur verfolgt *J. S. Nowick* mit dem Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure Hao.^[25,26] Hao stellt ein β -Faltblatt-Mimetikum für drei Aminosäuren dar (Abbildung 8).

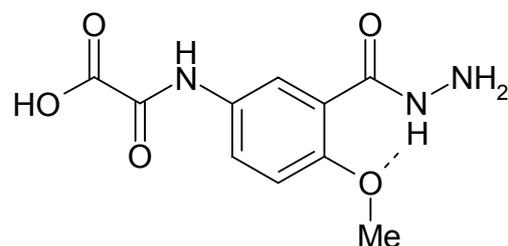
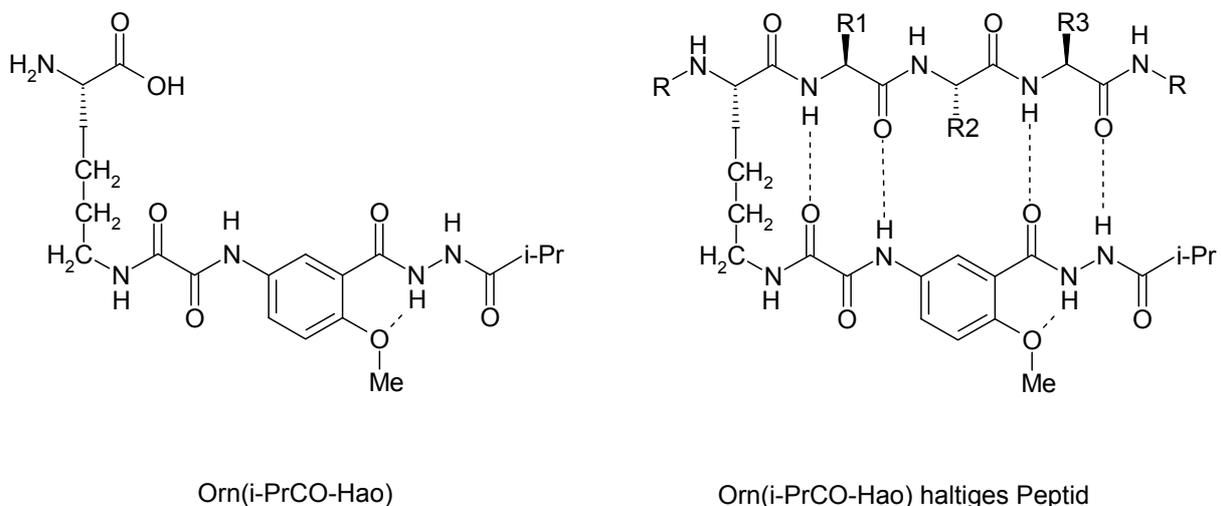


Abbildung 8: β -Faltblatt-Mimetikum Hao.

Einen Nachteil des direkten Einbaus als Aminosäuremimetikum stellt der Ersatz von drei natürlichen Aminosäuren durch eine Hao-Einheit dar. Dieses Problem wird umgangen, indem man die Aminosäure Hao über die Seitenkette eines Ornithins einfügt. Hierbei muss nur eine Aminosäure durch Orn(i-PrCO-Hoa) ersetzt werden und die Seitenkette induziert eine β -Faltblattstruktur in den drei C-terminal folgenden Aminosäuren (Abbildung 9).^[27]



Orn(i-PrCO-Hao)

Orn(i-PrCO-Hao) haltiges Peptid

Abbildung 9: Links β -Faltblatt induzierende Aminosäure Orn(i-PrCO-Hao) und rechts eingebaut Orn(i-PrCO-Hao) in Peptid.

Die Induktion erfolgt bei dieser Methode über Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrates. Bis jetzt wurde dieses Modell nur an kleinen nichtnatürlichen Peptiden getestet, ein Einbau in größere Biooligomere steht noch aus.

3.1 Struktureigenschaften von Alanyl PNA

Peptidnucleinsäuren sind Peptide, deren Aminosäure-Seitenketten mit Nucleobasen verknüpft sind. Allgemeines Interesse fanden sie 1991, als *Nielsen et al.* Aminoethylglycin-PNA **2** als Antisense-Therapeutikum vorschlug.^[28] Die ungeladene PNA bildet mit DNA und RNA stabile Paarungskomplexe aus. Gegenüber DNA/RNA Komplexen zeichnen sich diese durch hohe chemische, biologische (Abwesenheit geeigneter Proteasen gegenüber PNA) und thermische Stabilität aus.^[29]

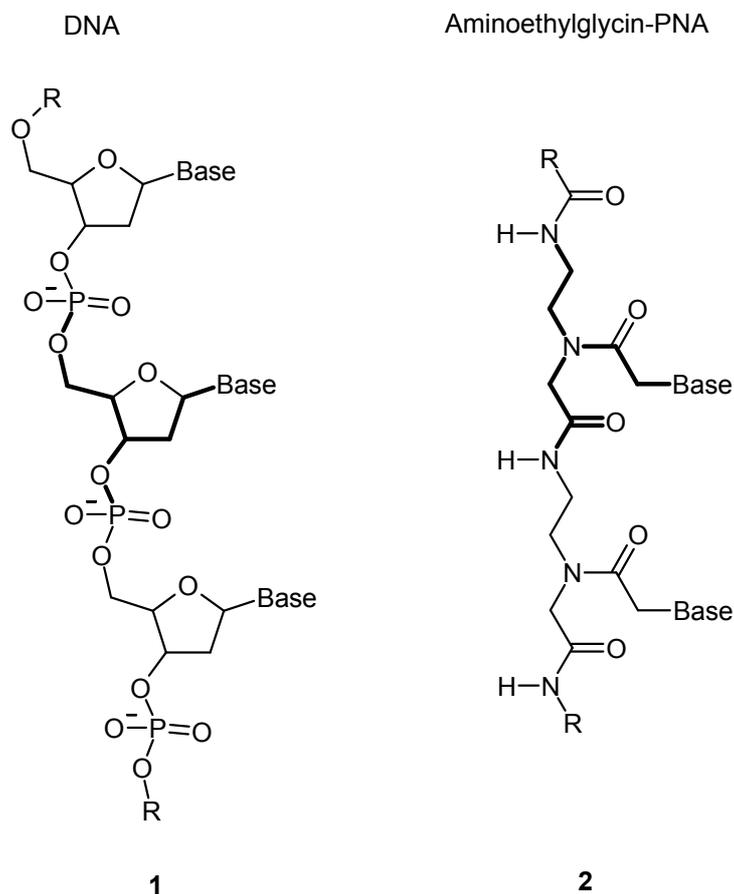


Abbildung 10: DNA **1** und Aminoethylglycin-PNA **2** (Nielsen-PNA). Die Isosterie des Rückgrats wird durch die hervorgehobenen Bindungen verdeutlicht.

Aus der DNA **1** werden in Aminoethylglycin-PNA nur die vier kanonischen Nucleobasen beibehalten. Die Seitenkette mit den Nucleobasen ist über ein

tertiäres Amin mit dem Peptidstrang verbunden. Der Peptidstrang selbst besitzt kein Stereozentrum. Eine Voraussetzung für die Paarungseigenschaften liegt in der Isosterie des Rückgrats. Eine Monomereinheit im Rückgrat des Strangs besteht aus 6 Bindungen, während die Nucleobasen über drei Bindungen mit dem Rückgrat verknüpft sind (Abbildung 10).^[30,31]

Die Antisense-Strategie beruht auf der spezifischen Erkennung der *messenger*-RNA und der Maskierung der *m*-RNA durch Doppelstrangbildung mit komplementären Oligonucleotiden. So wird die Expression der entsprechenden Proteine unterbunden.^[32,33,34] Darüberhinaus gibt es potentielle Anwendungen von PNAs in der Diagnostik, diese nützen teilweise die höhere Stabilität der Komplexe aus, die auf die fehlende Ladungsrepulsion der nicht vorhandenen Phosphatreste zurückzuführen ist.^[35,36,37]

Auch beim Ersatz des Zucker-Phosphat-Rückrats durch zwei Aminosäureeinheiten wird ein isomorphes PNA-Rückrat erhalten. Bei dieser Alanyl-PNA **3** alternieren eine basensubstituierte Nucleoaminosäure und Glycin (Abbildung 11).^[38] Obwohl das Isosterie-Kriterium erfüllt ist, bindet Alanyl-PNA **3** nicht an RNA oder DNA.^[39,40] Vermutlich wirkt sich die konformationelle Einschränkung durch zwei Amidbindungen pro Paarungseinheit und die vorhandenen Chiralitätszentren im Peptidstrang aus.

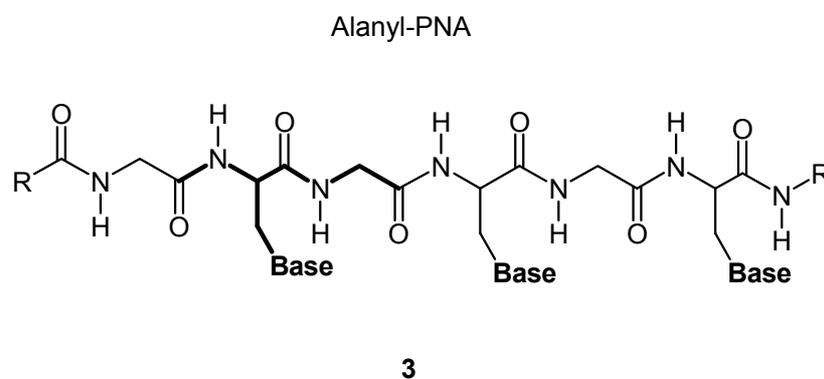


Abbildung 11: Alanyl-PNA **3** mit Glycin in jeder zweiten Position. Die Isosterie des Rückgrats mit DNA wird durch die hervorgehobenen Bindungen verdeutlicht.

Liegt ein Peptidstrang in einer regulären β -Faltblattstruktur vor, so beträgt der Abstand zweier benachbarter Seitenketten 3.6 Å. Dieser Abstand ist dem idealen Basenabstand für Stapelungswechselwirkungen in B-DNA von 3.4 Å sehr ähnlich.^[41] Werden nun für den Aufbau einer Alanyl-PNA nur basensubstituierte Aminosäuren mit je drei Atomen pro Repetiereinheit verwendet, so wird ein linearer PNA-Strang mit β -Faltblatt-Konformation erhalten.^[9]

Bei einheitlicher Konfiguration der Nucleoaminosäuren zeigen die Seitenketten jeweils in die entgegengesetzte Richtung (Abbildung 12). Bei Alternanz der Konfiguration der Nucleoaminosäuren entlang des Stranges ist es möglich, die Nucleobasen auf eine Seite des Peptids zu orientieren (Abbildung 12).

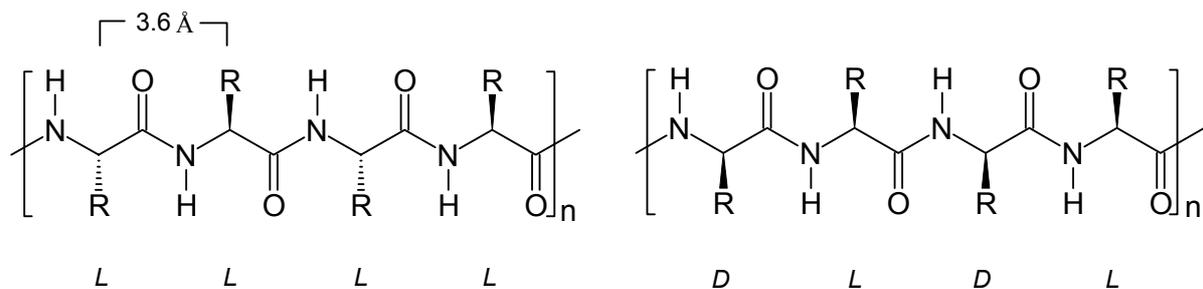
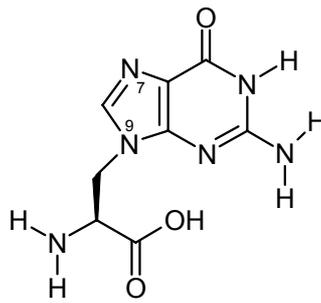


Abbildung 12: Linearer Peptidstrang mit gleichbleibender und alternierender Chiralität.

Bei dieser Alanyl-PNA sind die Nucleobasen über die Seitenkette in β -Position verknüpft (Abbildung 13). Sie stehen im Doppelstrang, der durch Wasserstoffbrücken- und Stapelungswechselwirkungen der Nucleobasen erhalten wird, nahezu orthogonal zu dem Peptidrückgrat.^[42]



4

Abbildung 13: Die Nucleoaminosäure H-AlaG-OH 4. In β -Position ist die Purinbase über N-9 mit Alanin verknüpft.

Als Folge all dieser Eigenschaften bilden sich bei alternierender Konfiguration in Alanyl-PNA lineare Paarungskomplexe aus.^[8]

Während bei einem B-DNA-Doppelstrang die Helixtopologie das Paarungsverhalten stark beeinflusst und zwischen den komplementären Strängen nur Watson-Crick Paarungsmodi realisiert werden (Abbildung 14), existieren für lineare Alanyl-PNA mehrere Parameter, die die Paarungselektivität beeinflussen. Es müssen die Paarungsmodi, die Strangorientierung und die Aminosäurekonfigurationen beachtet werden.

Watson-Crick Paarung von G-C und A-T

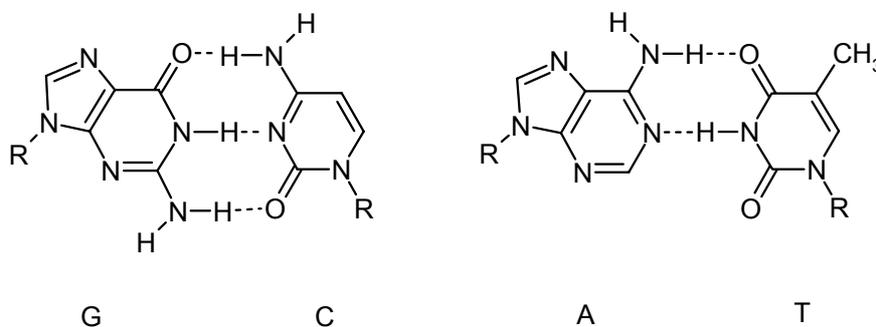


Abbildung 14 Watson-Crick Paarungsmodi der vier kanonischen Basen.

Neben natürlich vorkommender Nucleobasenpaarung zwischen Pyrimidinen und Purinen ist es bei linearen Systemen möglich, Purin-Purin oder Pyrimidin-Pyrimidin Wechselwirkungen zu untersuchen.^[8]

Peptide besitzen eine Richtung vom N- zum C-Terminus; es muss zwischen paralleler und antiparalleler Orientierung der Rückgratstränge zueinander unterschieden werden.

Die Alternanz der Konfiguration ermöglicht das Paaren von Nucleoaminosäuren gleicher (homochiral) oder unterschiedlicher (heterochiral) Konfiguration (Abbildung 15).

Der gleichzeitige Wechsel von Strangorientierung und Konfiguration jeder Aminosäure eines Peptids ändert die Seitenkettengeometrie nicht.^[43,44,45,46] Das als *Retro-Inverso*-Prinzip bekannte Konzept hat zur Folge, dass ohne Beeinflussung der Sekundärstruktur die Richtung eines der beiden Stränge umgekehrt werden kann. Werden in einem Strang alle Konfigurationen vertauscht, dann wird ein Wechsel von homochiraler zu heterochiraler (bzw. umgekehrt) Basenpaarung vollzogen. Das wird in Abbildung 15 anhand der G-C Paarungsmodi verdeutlicht.

Bei der in der gesamten Arbeit verwendeten Schreibweise steht Lys meist für das aus Löslichkeitsgründen C-terminal eingeführte Lysinamid und ein Buchstabe für einen Nucleoaminosäurebaustein (Bsp. $G \equiv AlaG$). Unterstrichene Bausteine oder Aminosäuren liegen in der D-Konfiguration vor.

Durch geeignete Wahl der Sequenz kann die Strangorientierung festgelegt werden. Ein Oligomer des Typs GGCGCC (G und C bilden dreizählige Wasserstoffbrücken aus) zeigt zum Beispiel eine deutliche Bevorzugung für die G-C-Paarung mit antiparalleler Strangorientierung gegenüber der G-G oder C-C Paarung mit paralleler Orientierung. (Abbildung 15).

Auch die bei pH 7 positiv geladenen Lysinseitenketten benachteiligen eine parallele Anordnung der Seitenketten und bevorzugen eine antiparallele Orientierung.

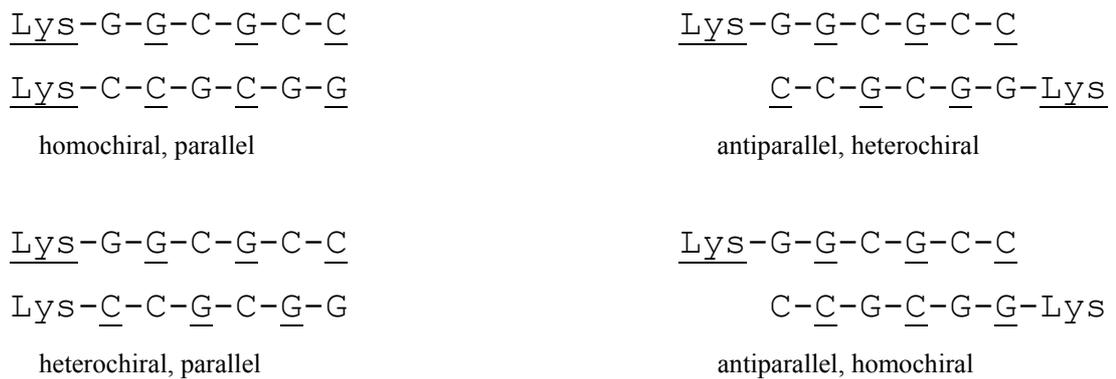


Abbildung 15: Darstellung der möglichen Paarungsmodi verschiedener Oligomere im System Guanin-Cytosin. Bei dieser Schreibweise entspricht ein Buchstabe einer Nucleoaminosäure. Es paaren jeweils die untereinanderstehenden Basen, unterstrichene Bausteine liegen in der D-Konfiguration, nicht unterstrichene in der L-Konfiguration vor. Der Wechsel von homochiral zu heterochiral bei Umkehr der Orientierung ist zu erkennen. Im Gegensatz zur Konvention bei Peptiden liegt links nicht immer der N-Terminus vor, die Orientierung des Peptides ist leicht am C-terminalen Lysinamid ersichtlich.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass für die G-C-Paarung bei antiparalleler, homochiraler Duplexbildung nur der Watson-Crick-Modus und für antiparallele, heterochirale Paarung nur der reverse Watson-Crick Modus denkbar ist.^[8]

Die Auswahl der Basen, die Orientierung der Rückgratstränge und deren Konfiguration beeinflussen demnach das Paarungsverhalten von Alanyl-PNA.

Zur Bestimmung der Stabilität der Doppelstränge, die auf Basenpaarung oder Stapelungswechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen beruhen, wird, wie von der Nucleinsäure-Chemie bekannt, temperaturabhängige UV-Spektroskopie benutzt.^[47] Der Übergang vom Doppel- zum Einzelstrang ist mit einer Entstapelung der Nucleobasen verbunden. Das hat einen Anstieg der Absorption (Hyperchromizität, H) im Absorptionsbereich der Nucleobasen (240 -280 nm) zur Folge. Die Entpaarung ist kooperativ und führt zu einem sigmoiden Kurvenverlauf bei Auftragung der UV-Absorption gegen die Temperatur. Der Wendepunkt dieser Kurve ist als Schmelztemperatur (T_m) definiert, und liefert ein Maß für die Stabilität des Paarungskomplexes.

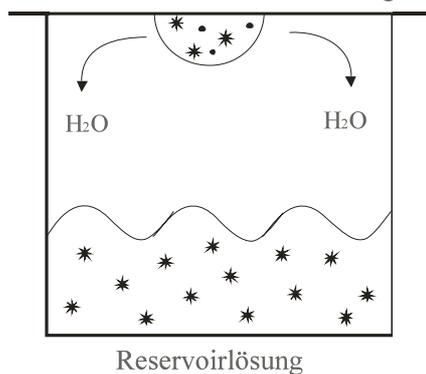
3.2 Synthese und Kristallisation von Guanin-Cytosin-Dimeren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht hexamere Nucleo-aminosäuresequenzen zu kristallisieren, um genaueren Aufschluss über die Struktur des Paarungskomplexes zu erhalten.

Bei der Kristallisation von Peptiden gehen diese von einem gelösten über einen übersättigten Zustand in eine feste Phase über.^[48,49,50] Als Arbeitstechnik hierfür hat sich die Gasdiffusionsmethode bewährt. In einem geschlossenen System liegen zwei getrennte Lösungen vor. Die Reservoirlösung besteht aus Puffer, ggf. einem Fällungsmittel und evtl. einem Additiv. Zusätzlich liegt noch die Mutterlauge vor, die aus einer Mischung der Reservoirlösung und einer Lösung der zu kristallisierenden Substanz im Verhältnis 1 :1 besteht.

Über die Gasphase findet Diffusion des Wassers statt, um die gestörte Gleichgewichtslage auszugleichen. Hierbei wird das Löslichkeitsprodukt des Peptides überschritten, ein übersättigter Zustand tritt ein und Keimbildung kann stattfinden (Abbildung 16).

Tropfen mit Reservoir- und Mutterlauge



Tropfen mit Kristall

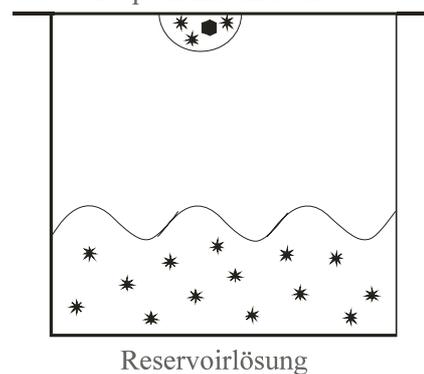


Abbildung 16: Prinzip des 'hanging drop'. Abbildung aus E. Alexopoulos, Diplomarbeit, Göttingen 2001.

Für den Versuch der Kristallisation bot sich eine hexamere Alanyl-PNA-Guanin-Cytosin Sequenz in Selbstpaarung an. Die Selbstpaarung hat den Vorteil, dass auf ein Einstellen der Äquimolarität der antiparallelen Stränge verzichtet werden kann. Selbst eine geringe Abweichung der Äquimolarität führt zu Problemen bei der Kristallisation. Aus früheren Arbeiten war die

Schmelztemperatur der Sequenz AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Lys-NH₂ **5** mit 40° C (12 μM, 0.1 M NaCl, 0.01 NaHPO₄/H₃PO₄, pH 7) bekannt.^[9] Dies sollte ausreichen um bei Raumtemperatur fast vollständig das Peptid als Doppelstrang vorliegen zu haben. Bei dem vorhandenen Paarungstyp handelt es sich um einen antiparallelen heterochiralen *reverse* Watson-Crick Paarungsmodus (Abbildung 17).

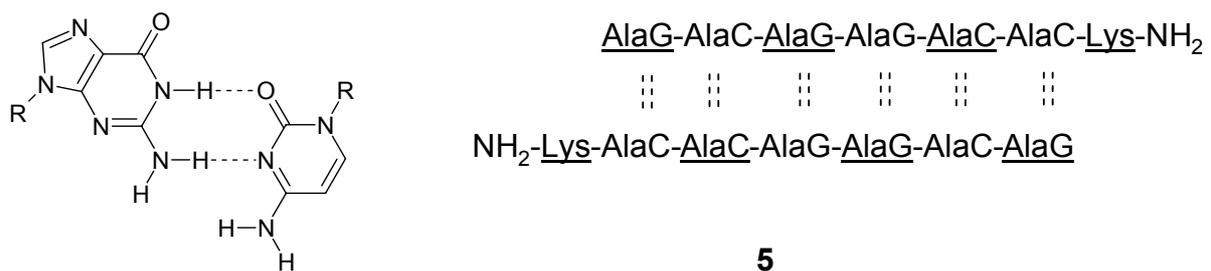


Abbildung 17: links: heterochiraler reverse Watson-Crick Paarungsmodus, rechts: Selbstpaarung des Oligomers **5**, antiparallel, heterochiral, reverse Watson-Crick.

Die Kristallisationsversuche wurden in Zusammenarbeit mit *Jose Cuesta* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Sheldrick* durchgeführt.

Hierbei erwiesen sich die erforderlichen Kristallisationsbedingungen als problematisch für die Duplexbildung. Bei Verlassen des Korridores, der einen pH-Wert zwischen 6.5 und 7.5 genauso wie die Anwesenheit von Salzionen verlangt, wurden keine Schmelzkurven mehr beobachtet. Es konnte also nicht mehr von einer Duplexbildung ausgegangen werden. Auch die Verwendung hoher Anteile organischer Lösungsmittel, wie es bei der Kristallisation von Peptiden üblich ist, führte zu einem Aufbrechen der gewünschten Aggregate.

3.2.1 Synthese und Kristallisation von H-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-OH **6**

Zuerst das Oligomer H-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-OH **6** ohne C-terminales Lysinamid dargestellt.

Für die Synthese wurde zuerst versucht, Merrifield Harz mit dem Cäsium Salz des D-Ala-C Bausteins zu belegen.^[51,52] Aufgrund der hohen Basizität der Seitenkette ergaben diese Versuche keine befriedigenden Ausbeuten.

Deswegen wurde eine Kupplung der Nucleoaminosäure an ein Hydroxymethyl Harz durchgeführt (Abbildung 18).^[53,54] Bei ungenügender Kontrolle der Reaktionsbedingungen wurde eine Racemisierung der Nucleoaminosäure beobachtet.

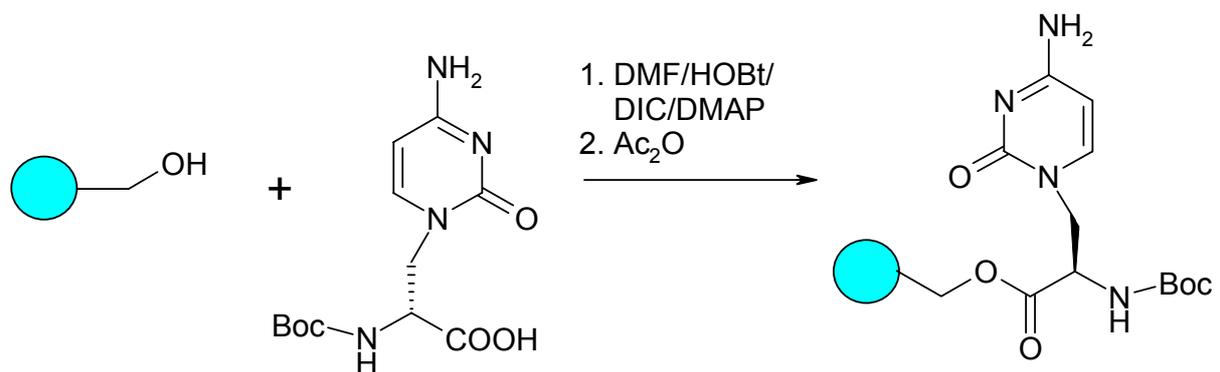


Abbildung 18: Kupplung von AlaC an Hydroxymethyl-Merrifield-Harz.

An diesem Harz wurde das Hexamer mittels Festphasensynthese dargestellt. Das erhaltene aufgereinigte Produkt **6** zeigte jedoch keine Duplexbildung (Schmelzkurve Abbildung 19). Wahrscheinlich verhindert das Zwitterion die Ausbildung eines geordneten Duplexes.

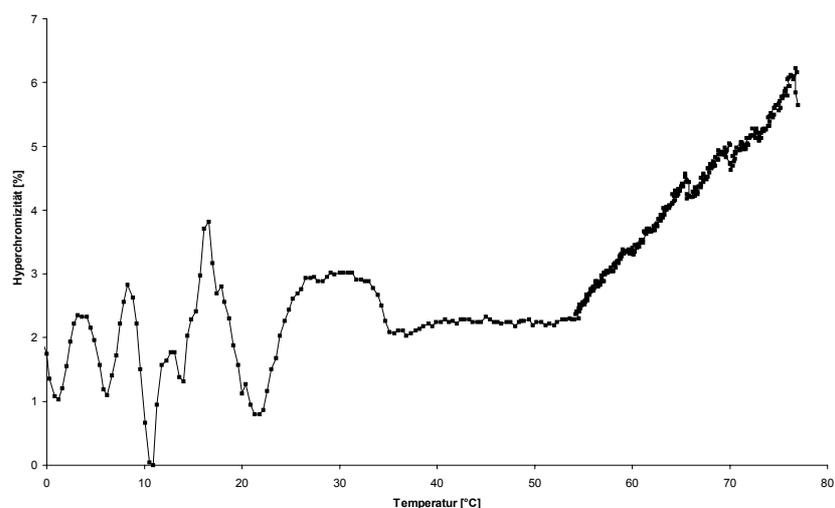


Abbildung 19: Keine Paarung von **6** ($c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$).

Darüberhinaus sollte die Löslichkeit für die Kristallisation mindestens bei 1 mg pro ml Lösungsmittel liegen, das Hexamer **6** liegt jedoch über einen Faktor 10 darunter.

Die Kristallisationsbedingungen sind im experimentellen Teil beschrieben, es wurden bisher keine Kristalle des Oligomers **6** erhalten.

3.2.2 Synthese und Kristallisation von H-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ **7**

Eine Erhöhung der Löslichkeit wurde mit dem Oligomer H-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ **7** erlangt. Die Schmelztemperatur in Phosphatpuffer entspricht mit 39°C nahezu dem Literaturwert von 40°C (Abbildung 20), trotzdem bleibt auch hier die Löslichkeit unter den Anforderungen für eine effektive Kristallisation zurück. Die Löslichkeit erreicht bei physiologischen Bedingungen nicht den kritischen Wert von 1 mg pro ml. Da Phosphatpuffer für die Kristallisation nicht sonderlich gut geeignet sind, er besitzt die Neigung Salzkristalle zu bilden, wurden auch Schmelzkurven ohne Puffer durchgeführt. Da diese Untersuchungen zu keinen Schmelzkurven führten, wurde auf Kristallisationsversuche bei wesentlich von pH 7 abweichenden Bedingungen verzichtet.

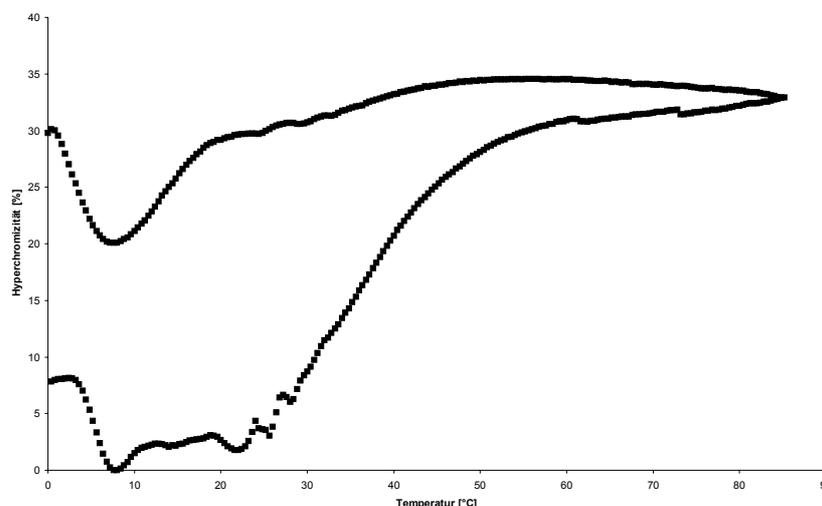


Abbildung 20: Oligomer **7**: $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, $T_m = 39 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Hysteresekurve wird hier dargestellt.

Es wurden unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen noch keine Kristalle des Oligomers **7** erhalten.

3.2.3 Synthese und Kristallisation von Lys-(AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ **8**

Zu einer starken Veränderung der Oligomereigenschaften führt die Verlängerung von **7** um ein N-terminales L-Lysin zu dem Peptid Lys-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ **8**. Nicht nur die Löslichkeit erhöhte sich um mehr als einen Faktor 10, was zu sinnvollen Konzentrationen für die Kristallisation führte, sondern auch die Schmelzkurven zeigten ein leicht verändertes Verhalten. Die Schmelztemperatur blieb gegenüber Peptid **7** nahezu unverändert, die Abkühlungskurve jedoch zeigte im Gegensatz zum Heptamer **7** nur eine geringer ausgebildete Hysterese (Abbildung 21). Messungen ergaben, dass bereits 10 min Inkubation bei -2 °C ausreichen, um eine Schmelzkurve zu erhalten. Dies deutet auf das schnellere Ausbilden eines Paarungskomplexes hin. Das veränderte Bildungskinetik des Duplexes kann auf eine Abstoßung der unter physiologischen Bedingungen terminal geladenen Lysinseitenketten im Einzelstrang zurückgeführt werden. Dies führt zu einer anderen Duplexbildungskinetik, die thermodynamischen Werte der Duplexbildung (T_m -Wert) bleiben dagegen nahezu unverändert.

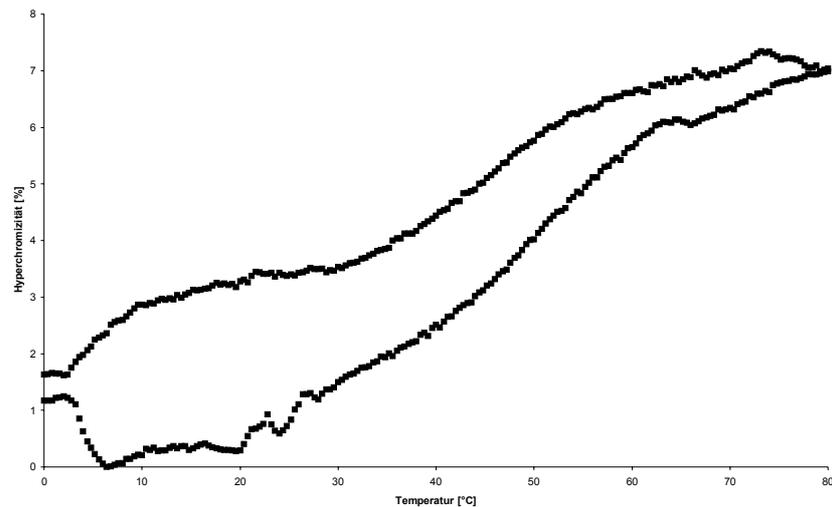


Abbildung 21: Oligomer **8** $c = 6 \mu\text{M}$, $0,1 \text{ M NaCl}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, Inkubation 10 min ; $T_m = 46 \text{ }^\circ\text{C}$. Die untere Kurve ist die Aufwärmkurve, die obere Kurve die der Abkühlung des Oligomers **8**. Es ist deutlich zu erkennen, dass hier bereits beim Abkühlen Duplexbildung stattfindet.

Ebenso wurden Schmelzkurven unter anderen Bedingungen durchgeführt, mit dem Ziel, deren Anwendbarkeit zu überprüfen. Exemplarisch wird dies anhand der Verwendung des HEPES Puffers dargestellt (Abbildung 22). Die Ergebnisse aller Schmelzkurven werden in Tabelle 1 aufgeführt, die restlichen Schmelzkurven mit den Bedingungen sind im Anhang zu finden.

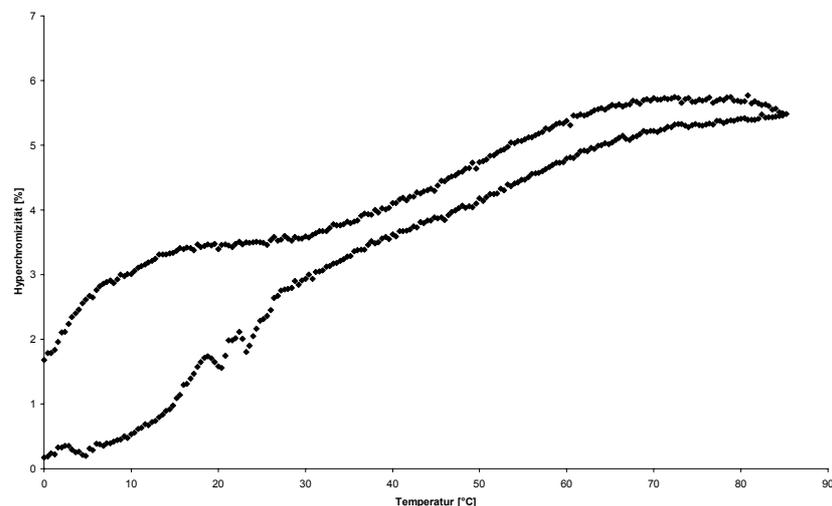


Abbildung 22: Oligomer **8** $c = 6 \mu\text{M}$, $0,1 \text{ M NaCl}$, $0,01 \text{ M HEPES}$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, Inkubation 10 min , $T_m = 45 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aus den Ergebnissen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind, kann geschlossen werden, dass die pH-Wertkontrolle entscheidend für die Duplexbildung ist. Darüber hinaus ist auch eine determinierte Salzkonzentration nötig. Bei

Abwesenheit von NaCl werden unter sonst identischen Bedingungen keine Kurven erhalten. Da im Gegensatz zu DNA bzw. RNA keine Ladungen aus den Phosphatgruppen im Strang abgesättigt werden müssen, deutet dies auf einen Effekt für die Wasserstoffbrückenbildung hin. Bereits ein kleiner Zusatz organischer Lösungsmittel stört das vorliegende Gleichgewicht, der T_m -Wert der Messung mit einem 10%igen Zusatz von MPD liegt unter sonst identischen Bedingungen schon mehr als 15° unter der Messung ohne dieses Additiv.

Hieraus wird ersichtlich, dass die Bedingungen für die Doppelstrangbildung sehr eingeschränkt sind, was wiederum die Möglichkeiten der Kristallisation unter physiologischen Bedingungen einschränkt.

Auch für Oligomer **8** wurden mit den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen noch keine Kristalle erhalten.

Lösungsmittel	0.01 M Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 7			0.01 M HEPES, pH 7		Wasser		
	0.1 M NaCl		Kein NaCl	0.1 M NaCl	Kein NaCl	Kein NaCl		
Inkubation	10min	3 h		3 h	3 h	3 h		
Organisches Additiv MPD	0 %	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %	10 %	0 %
<u>AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC</u> 6			k. S.					
<u>AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Lys</u> ¹ 7			39°C					
<u>Lys-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Lys</u> 8	44°C	25°C	44°C	24° C	45°C	k.S.	k.S.	k.S.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Schmelzkurven, c (Oligomer) = 6 μ M, λ = 280 nm; k. S. keine Schmelzkurve erhalten.

Die Möglichkeiten der Kristallisation dieser Sequenzen sind beschränkt, eine Erhöhung des T_m -Wertes könnte Abhilfe schaffen. Hierfür ist die Synthese längerer Sequenzen, oder die Duplexbildung im Watson-Crick Paarungsmodus

¹ Konzentration 3 μ M

mit dem entsprechenden Gegenstrang erforderlich. Darüber hinaus kann zur Kristallisation ein höherer Anteil an organischen Additiven benutzt werden.

3.3 Xanthin- und Hypoxanthinderivate

Der Einbau nicht kanonischer Nucleoaminsäuren in Alanyl-PNA kann zu erhöhten Schmelztemperaturen führen.^[55] Die Basenpaarungen Xanthin-Diaminopurin bzw. Hypoxanthin-Adenin sollten aufgrund der größeren π -Wechselwirkungen einer Purin-Purin-Paarung höhere Stabilitäten gegenüber einer Purin-Pyrimidin-Paarung erwarten lassen. Es wurde untersucht inwieweit die Synthese von Xanthin bzw. Hypoxanthinderivaten einen alternativen Zugang zu Nucleoaminsäuren darstellt, die die kanonischen Basen ersetzen können. Analog bereits bekannter Arbeiten wurde für die Synthese Serinlacton verwendet.^[56,57,58]

Die direkte Darstellung des (S)-*N*-tert-Butoxycarbonyl- β -(9-hypoxanthinyl)-alanin aus L-Serinlacton und Hypoxanthin gelang nicht, es wurde ein Produktgemisch der *N*-7, *N*-9 und *N*-3 Isomere erhalten (Abbildung 23), die chromatographisch weder direkt, noch als Methylester trennbar waren.

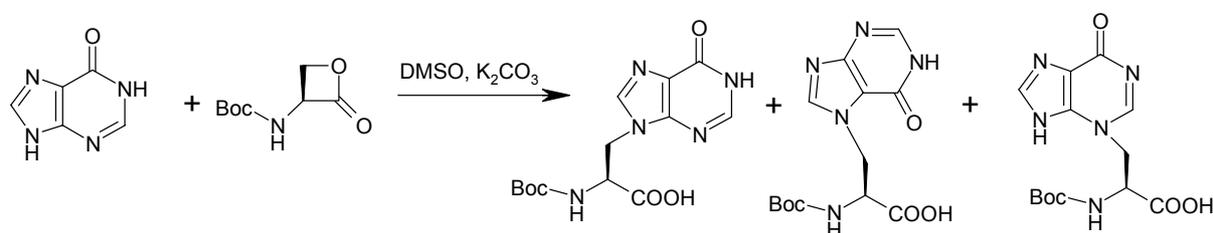


Abbildung 23: Direkte Umsetzung von Hypoxanthin mit Serinlacton.

Die Umsetzung von Serinlacton **10** mit 6-Chlorpurin **9** mit anschließendem Austausch des Chlors gegen Sauerstoff (basisch in 1 N Natronlauge) zu Produkt **11** erfolgte in 24 % Ausbeute (Abbildung 24). Die *N*-terminale Boc-Schutzgruppe war bei diesen Bedingungen stabil, eine anschließende Bestimmung der Enantiomerenreinheit ergab einen ee-Wert von 87 Prozent.

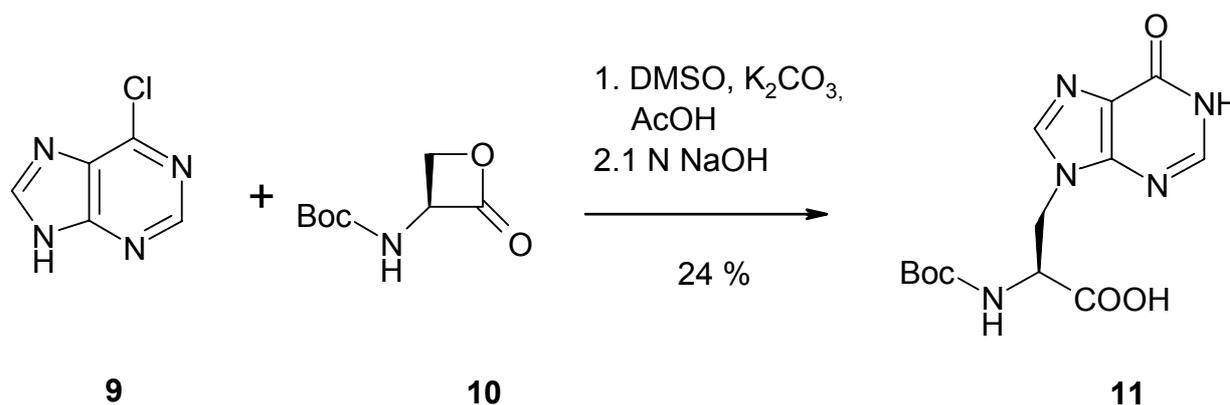


Abbildung 24: Darstellung von Boc-L-AlaH 11 aus 6-Chlorpurin 9 und L-Serinlacton 10.

Für die Darstellung von Boc-AlaX⁹-OH wurde ebenfalls eine Syntheseroute über eine chloresubstituierte Purinbase gewählt.

Bei Umsetzung von 2,6-Dichlorpurin 12 mit Serinlacton 9 erhält man ausschließlich das N-9 Substitutionsprodukt 13.^[59] Ermutigt durch die Ergebnisse der Darstellung von Boc-AlaH-OH 11 wurde versucht die Dichlorpurinnukleoaminosäure 13 basisch zu verseifen, man erhielt ausschließlich das an 6 Stellung durch Sauerstoff substituierte Produkt 14, da die Position 6 gegenüber der Position 2 eine erhöhte Reaktivität besitzt.^[60]

Der Versuch, die beiden Chloratome mit einer photochemischen Reaktion zu ersetzen, zeigte keinen Umsatz. Deswegen wurde eine aus der Nucleotidchemie bekannte Reaktion verwendet. Beide Chloratome können durch einen Überschuss an Benzylalkoholat substituiert werden.^[61] Diese Bedingungen scheinen jedoch zu basisch zu sein, da das erwünschte Produkt 15 neben dem β -Eliminierungsprodukt 16 nur als Nebenprodukt in einer Ausbeute von 11 % Prozent vorlag (Abbildung 25). Das Benzylgeschützte Produkt 15 konnte anschließend mit Palladium-Kohlenstoff in einer Wasserstoffatmosphäre entschützt werden und das gewünschte Produkt Boc-AlaX⁹-OH 17 wurde erhalten.

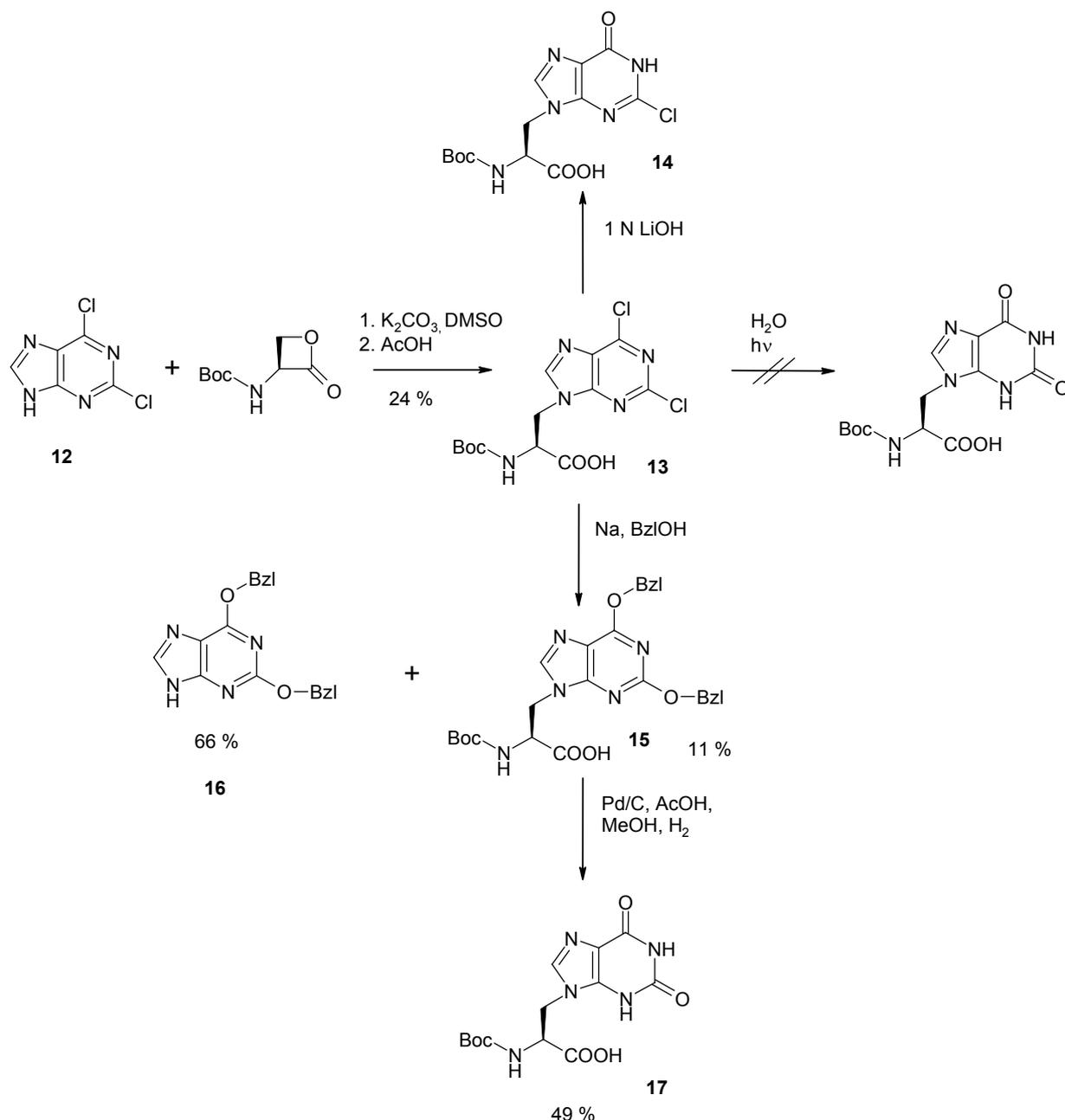


Abbildung 25: Darstellung von *N*-Boc-*N*-9-AlaX 17.

Die Umsetzung des Eliminierungsproduktes **16** mit Serinlacton lieferte ein Isomerengemisch der *N*-7 und *N*-9 substituierten Derivate. Eine Erhöhung der Gesamtausbeute des Zielproduktes über den Umweg des Eliminierungsproduktes **16** konnte somit nicht erreicht werden (Abbildung 26).

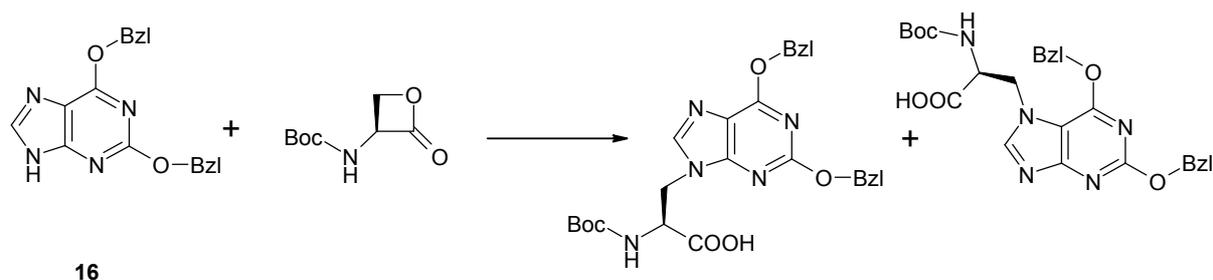


Abbildung 26: Umsetzung von Serinlacton mit 2,6-Dibenzylxanthin **16**.

Der Zugang zum *N*-7 substituierten Produkt **19** ist über die direkte Umsetzung des Xanthins **18** mit Serinlacton möglich (Abbildung 27).^[113]

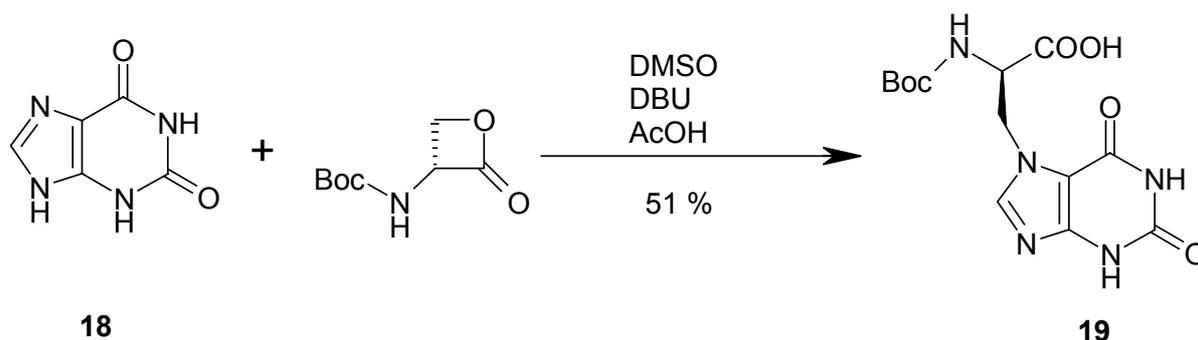


Abbildung 27: Zugang zum *N*-7 substituierten Ala⁷X.

Aus der Koinjektion der des Boc-AlaX⁷ **19** und Boc-AlaX⁹ **17** Bausteine in die HPLC und den unterschiedlichen ¹³C-Verschiebungen war ersichtlich, dass ein Zugang zu beiden Isomeren gefunden worden ist.

Der Zugang zum Boc-AlaH und Boc-Ala-*N*-9-X (Boc-AlaX⁹-OH) kann wegen zu geringen ee-Werten, bzw. zu geringen Ausbeuten als nicht zufriedenstellend bezeichnet werden. Deswegen wurde auf den Einbau dieser Monomere in Alanyl-PNA verzichtet.

4 Einfluss des Einbaus von Alanyl-PNA-Fragmenten in Peptide auf Struktur und Eigenschaft

Bisher gibt es keine Beispiele für den Einbau von Alanyl-PNA-Fragmenten in größere Peptide. Im Rahmen älterer Arbeiten wurde der Einbau einzelner Aminosäuren in Alanyl-PNA-Hexamere und deren Einfluss auf die Bindungsstabilitäten berichtet.^[62] Der Hintergrund dieser Arbeiten lag in der Untersuchung der Bedeutung einzelner Wechselwirkungen auf die Stabilität der Duplexe. So haben van der Waals Kontakte, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedlichen Einfluss.^[63]

Die Arbeitsgruppe von *H. Mihara* baute sowohl eine, als auch zwei L-konfigurierte Homoalanylbausteine in Peptide ein.^[64,65,66] In einem von *Zhou et al.* entworfenen künstlichen Dipeptidsystem QQ wurden jeweils zwei natürliche Aminosäuren durch die Nucleoaminosäuren ersetzt.^[67] Hierbei sind die A-T Paare so angeordnet, dass die Wasserstoffbrücken zu einer Stabilisierung der α -Helix beitragen.

In weiteren Arbeiten wurde von dieser Arbeitsgruppe untersucht, ob Peptid-Nucleoaminosäure-Hybride erhöhte RNA-Bindungsaffinitäten besitzen. Der Austausch einzelner natürlicher Aminosäuren gegen Nucleoaminosäuren in der HIV-1 Rev-Helix zeigte in Circular-Dichroismus Untersuchungen keine Veränderung der α -Helix-Struktur. Je nach ausgetauschter Aminosäure im 17mer konnte jedoch eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber RRE IIB RNA im Vergleich zum nativen Peptid beobachtet werden.

Darüberhinaus untersuchte diese Arbeitsgruppe den Einfluss der Aktivität einzelner eingebauter Homoalanylaminosäuren auf die Bindungsaktivität des HIV-1 Nucleocapsid Proteins NCp7 gegenüber der *Stem-Loop* (SL3) Region der HIV-1 Ψ -RNA.^[68] Da dieses Peptid mit 55 Aminosäuren zu groß für eine Totalsynthese war, wurden die Derivate mittels *native chemical ligation*

aufgebaut. Die Bindungsaffinitäten gegenüber dem unveränderten Wildtyp NCp7 lagen bis zu 9fach höher.

Die Arbeitsgruppe um *P. Herdewijn* erzielte mit nichtnatürlichen Peptiden, in denen einzelne Alanyl-PNA-Monomere eingebaut wurden, erhöhte Bindungsselektivitäten gegenüber doppelsträngiger DNA. Diese DNA-bindenden Peptide enthalten in den Seitenketten weitere heterocyclische Seitenketten.^[69,70,71]

Bei allen hier berichteten Arbeiten handelt es sich um den vollsynthetischen Aufbau von Peptiden. Deswegen wird im folgenden Kapitel auf verschiedene Möglichkeiten zum Aufbau von Peptiden mit nichtnatürlichen Aminosäuren eingegangen.

4.1 Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Peptide

Die Synthese größerer Peptide stellt trotz großer Fortschritte bei der Synthese auf fester Phase immer noch eine große Herausforderung dar. Die Darstellung der HIV Protease durch *Kent* stellte einen Meilenstein dar, zeigte aber auch deren Grenzen und Beschränktheit bezüglich Ausbeute und Auftrennbarkeit auf.^[72,73] Um diese Hürden zu überwinden fand in den letzten zehn Jahren eine rasante Entwicklung statt, die durch die Kombination biologischer und chemischer Methoden das Repertoire zur Lösung dieser Probleme erweiterte.

Suppressionsmethoden

Einzelne L-konfigurierte Aminosäuren lassen sich durch *in vitro suppression* mittels eines zellfreien Transkriptions-/Translationssystems in Proteine einbauen.^[74,75] Hier wird das Codon der einzubauenden nichtnatürlichen Aminosäure durch eines der drei Stop-Codons ersetzt, das sich vom Codon zur Beendigung der Translation unterscheiden muss. Die korrespondierende *suppressor* tRNA, mit der gewünschten Aminosäure beladen, wird chemisch synthetisiert. Diese synthetische Amino-Acyl-tRNA wird dann benutzt, um die Beendigung der Synthese beim ausgewählten Codon im zellfreien System zu unterdrücken. Mit dieser Technologie wurden bereits mehrere Aminosäuren eingebaut.^[76,77] Neben der Limitierung auf L-konfigurierte Aminosäuren stellen die mangelnde Effizienz der Unterdrückung, die aufwendige Synthese der modifizierten t-RNA und geringe Ausbeuten des Einbaus die Hauptprobleme dieses Ansatzes dar.

Chemische Synthese

Die bahnbrechende Einführung der Festphasensynthese (Abbildung 28) brachte zusammen mit der Entwicklung geeigneter Schutzgruppentechniken die Möglichkeit, Peptide bis zur Größenordnung von 50 Aminosäuren routinemäßig herzustellen.^[78] Durch Verwendung großer Überschüsse an Reagenzien und

Wiederholung einzelner Schritte können die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen optimiert werden. Der entscheidende Vorteil dieser iterativen Methode liegt in der enormen Freiheit, was den Einbau von unterschiedlich konfigurierten Aminosäuren, nichtnatürlichen Aminosäuren, oder Aminosäureanaloga angeht.

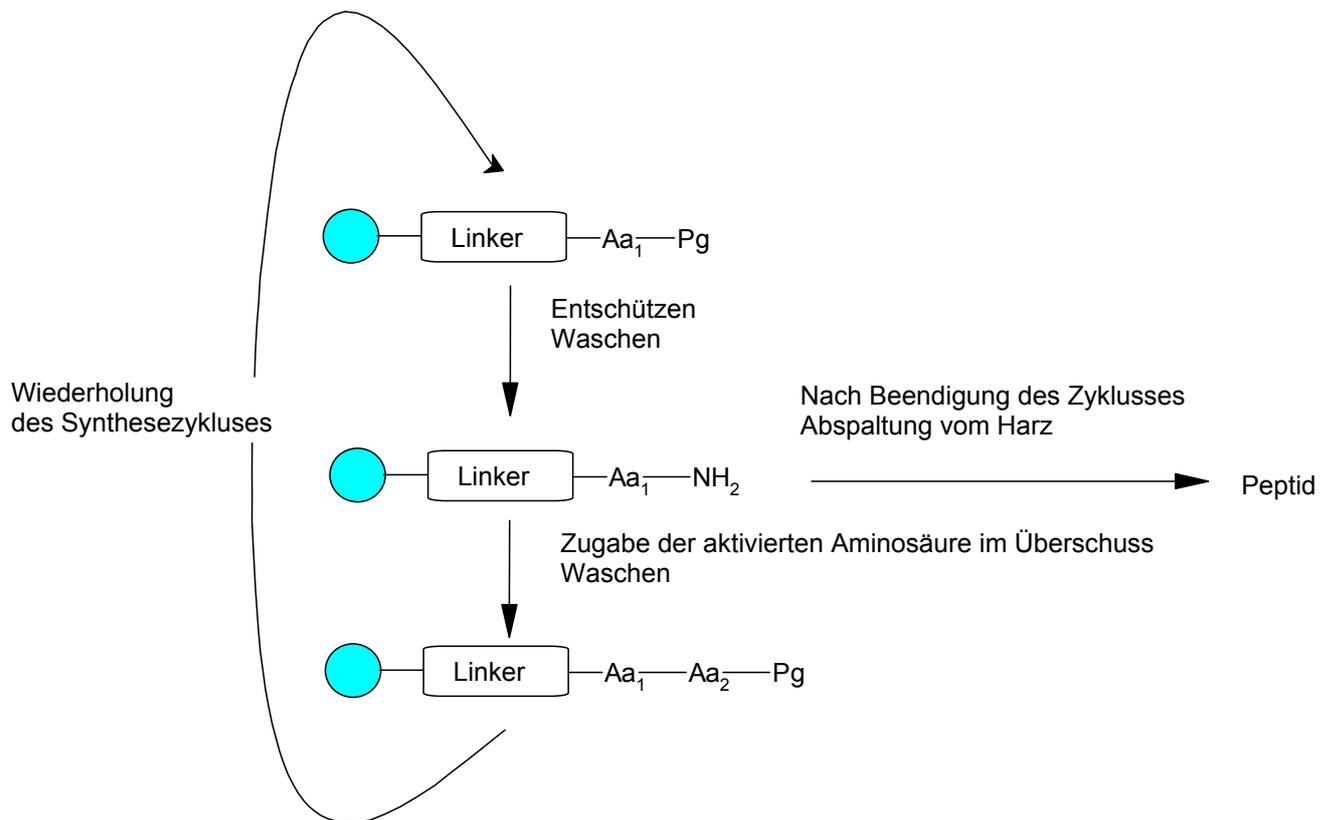


Abbildung 28: Festphasenzyklus: Je nach Linker und Schutzgruppenstrategie können seitenkettengeschützte Peptide, C-terminale Amide, C-terminale Aldehyde und vieles mehr erhalten werden.

Darstellung größerer Peptide durch chemische Ligation von Fragmenten

Eine enorme Steigerung bei der Größe von synthetisierten Peptiden konnte durch die Einführung von Ligationsmethoden kleiner Fragmente erzielt werden. Chemische Ligationsmethoden weisen gegenüber enzymatischen Methoden, trotz großer Fortschritte bei enzymatischen Methoden zur Fragmentsynthese, eine größere Vielseitigkeit auf.^[79,80]

Verschiedene Ansätze für die chemische Ligation wurden hierfür entwickelt. Als am vielseitigsten hat sich die sogenannte *native chemical ligation*

erwiesen.^[81,82,83,84,85,86] Eine Erweiterung dieses Konzepts ermöglicht die Kupplung zweier ungeschützter Peptidfragmente. Bei Synthese auf einem Thioester-Harz wird nach Abspaltung das C-terminale Thioesterpeptid erhalten.^[87,88,89] Das zweite Fragment mit einem N-terminalen Cysteinrest kann durch Standardmethoden auf fester Phase erhalten werden. Der C-Terminus des ersten Fragments wird durch Zugabe eines Thiolreagenzes umgeestert. Danach findet eine weitere Umesterung mit dem N-terminalen Cystein des zweiten Peptidstranges statt. Eine folgende Umlagerung erzeugt dann die kovalente Peptidbindung zwischen den beiden Fragmenten (Abbildung 29).

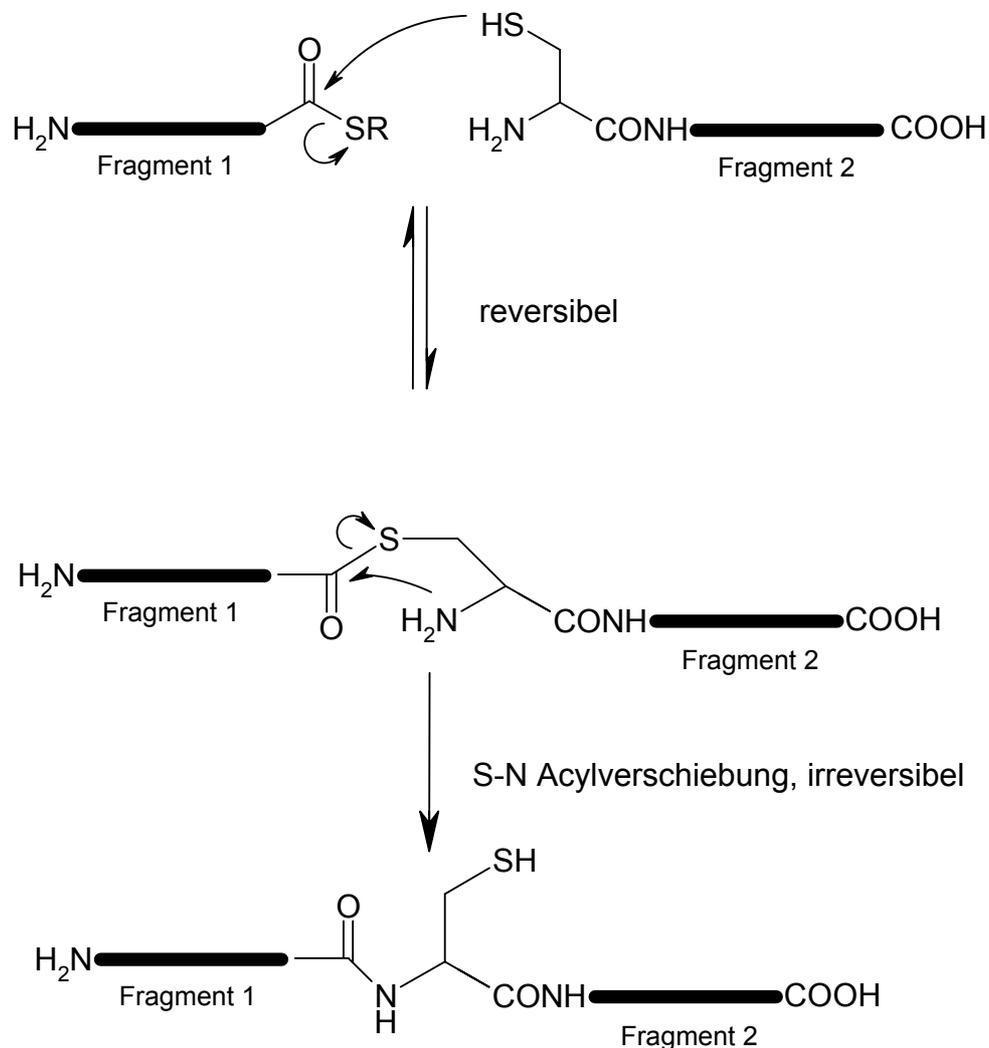


Abbildung 29: Mechanismus der native chemical ligation.

Mit Hilfe dieser Technologie konnten größere Peptide dargestellt werden. Eine weitere Erweiterung erhielt das Methodenrepertoire durch Ligation und

anschließende Entschwefelung des Oligomers, so dass an Stelle des Cysteins jetzt Alaninreste erhalten werden.^[90,91]

Die „21. Aminosäure“, das Selenocystein, wurde ebenfalls bereits durch *native chemical ligation* eingebaut, da auch das Selenocystein in der Lage ist, den Thioester nukleophil anzugreifen.^[92,93]

Auch Konjugate von Peptiden mit DNA, RNA und Nielsen-PNA wurden durch diese Technik schon dargestellt.^[94,95,96]

Der vielversprechendste Ansatz für größere Peptide aber ist die Kombination biosynthetischer Methoden mit chemischen Synthesen. Der biosynthetische Weg besitzt zumindest theoretisch keine Grenzen in Menge und Größe des Peptids, solange nur natürlich vorkommende Aminosäuren Verwendung finden. Die *native chemical ligation* erfordert, wie oben beschrieben, die Herstellung eines N-terminalen Fragments mit einem C-terminalen Thioester und ein C-terminales Fragment mit einem N-terminalen Cystein. Eine Möglichkeit hierfür ist die chemische Synthese des Thioesters und die Expression des anderen Fragmentes in Bakterien (z. Bsp. durch proteolytische Spaltung eines Fusionsproteins). Dieser Weg ist viel versprechend bei notwendigen Modifikationen im N-terminalen Teil des Peptids.

Handelt es sich bei dem zu modifizierenden Teil des Peptides um die C-terminale Region, so muss die Strategie geändert werden. Da noch keine Wege zur Verfügung stehen um die C-terminale Säuregruppe eines Proteins in einen Thioester zu überführen, muss ein anderer Weg beschritten werden.

Die Lösung dieses Problems liegt in der Verwendung des natürlich vorkommenden Prozesses des Proteinsplicens.^[97,98]

Proteine, bei denen ein intramolekularer Splicingprozess stattfindet, besitzen eine N-Extein-Intein-C-Extein Struktur und beim Splicen findet ein Herausschneiden des Inteinteils unter Bildung eines C-Extein-N-Extein-Proteins statt (Abbildung 30).

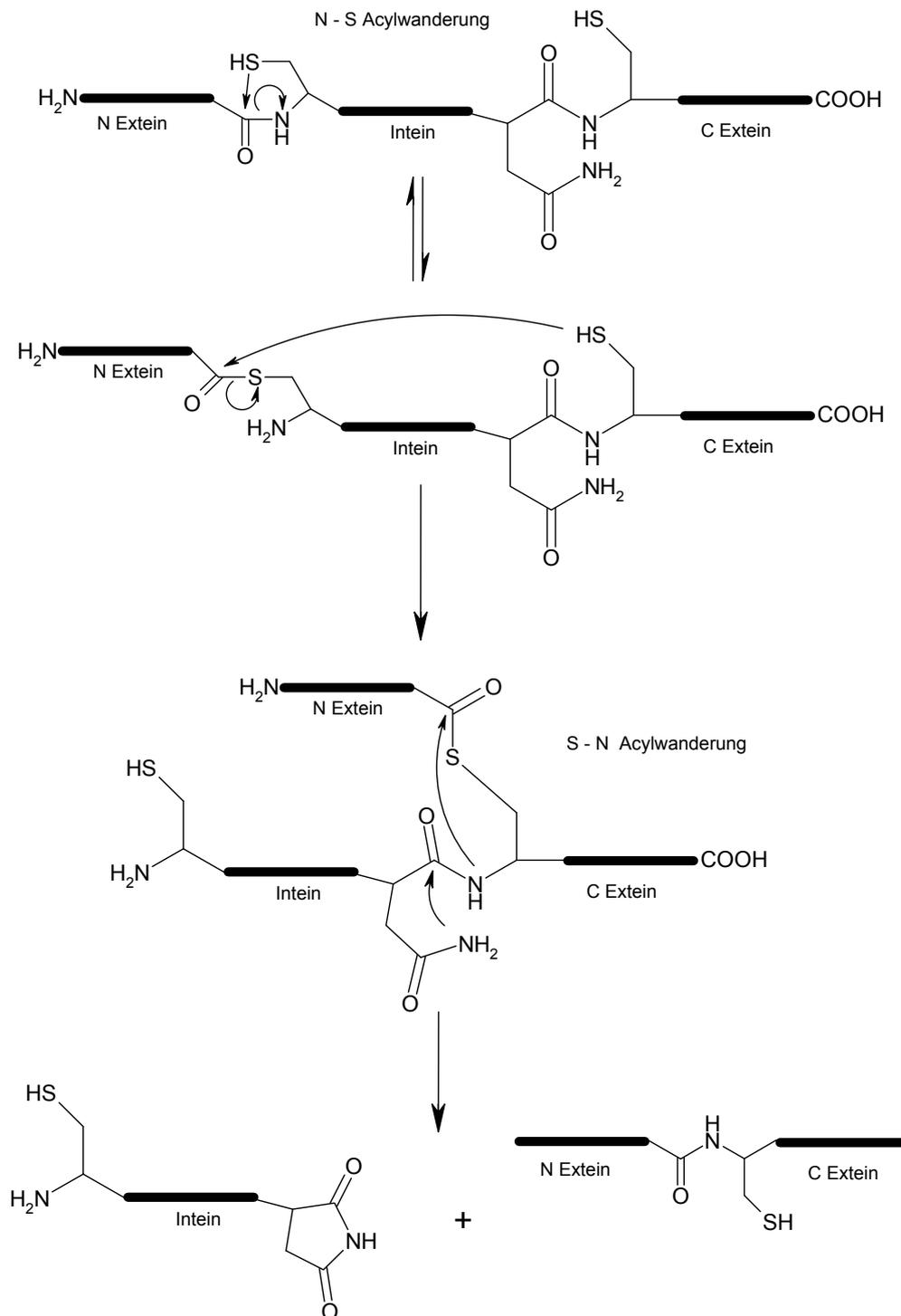


Abbildung 30: Mechanismus des intramolekularen Spliceprozesses von Proteinen.

Bei diesem Prozess finden folgende Schritte statt: 1) N → S-Acylwanderung am Cysteinrest der ersten N-Extein-Intein-Verknüpfungsstelle; 2) Umesterung mit einem Cysteinrest an der N-Extein-Intein-Verknüpfungsstelle, wodurch eine Verknüpfung des N-Exteins zum C-Extein über eine Thioesterbindung erfolgt; 3) S → N Acylwanderung des C-terminalen Restes des Inteins, was zur

Freisetzung des Inteins mit C-terminalen Succinimid und eines Proteins bestehend aus den kovalent verknüpften Exteinen führt.

Es werden mutante Intein Proteine hergestellt, bei denen nur der erste Schritt stattfindet. Das thioesterverbrückte Produkt kann dann mit Thiolreagenzien abgespalten werden, das gewünschte Produkt wird dann direkt als Thioester erhalten.^[99]

Dieser allgemeine Ansatz wird als *Expressed Protein Ligation* (EPL) bezeichnet und eine Reihe von Beispielen belegen seine Effektivität.^[100,101,102]

Eine weitere Vereinfachung der Vorgehensweise erfolgt durch Einbau eines *affinity tags* in das Intein-Fragment, das eine Immobilisierung auf fester Phase vor der Thiol induzierten Abspaltung ermöglicht (Abbildung 31). Meist wird eine Chitin-bindende-Domäne (CBD) gewählt. Neben anderen Beispielen konnte unter anderem bereits *H. Mihara* Proteine mit dieser Technologie darstellen, bei der einzelne Nucleoaminosäurebausteine im Peptid die Bindungsaffinität an RNA erhöhen konnten.^[68]

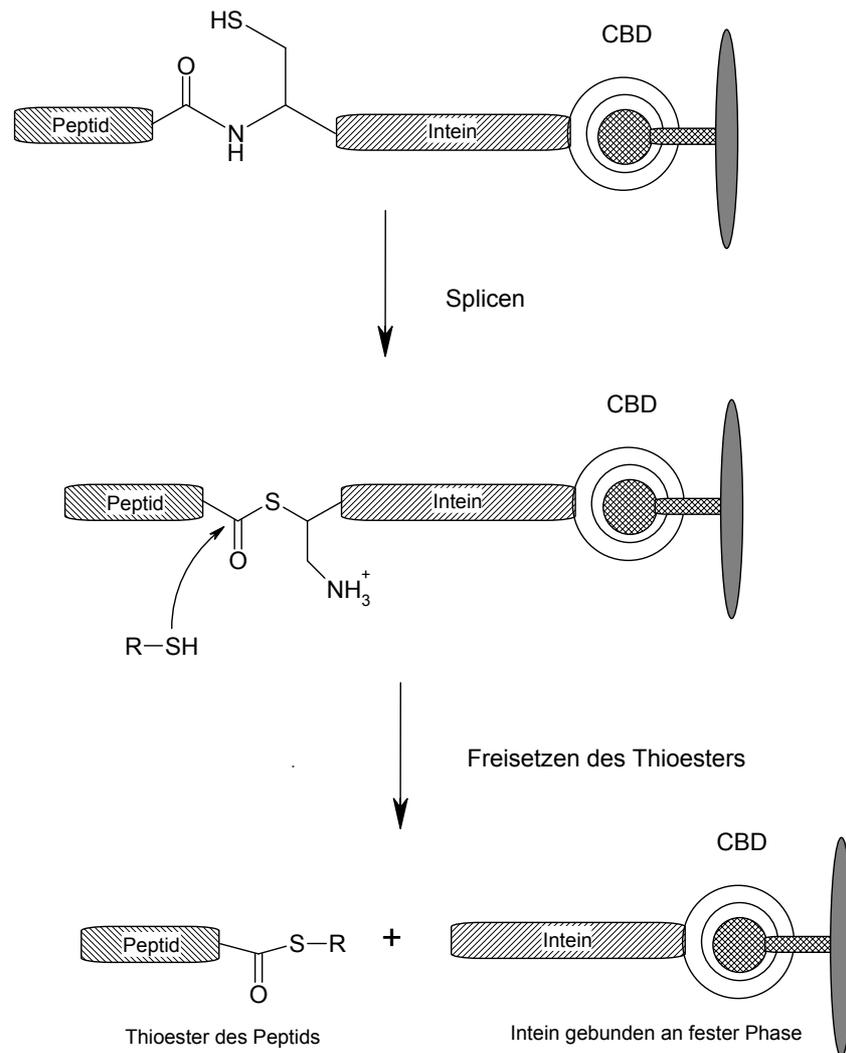


Abbildung 31: Darstellung eines Thioesters über Expressed Protein Ligation.

Biosynthese

Eine weitere Methode bietet die Erweiterung der Fähigkeiten des biosynthetischen Zellapparates andere nichtkanonische Aminosäuren einzubauen.^[103] Durch Modifikationen der Aminoacyl-tRNA Synthetasen kann die Spezifität verringert werden und es werden L-Analoga eingebaut.^[104] Hierfür muss das Medium, in dem die Bakterien wachsen und ihre Proteine darstellen, statt der natürlichen Aminosäure das nichtnatürliche Analogon enthalten. In einer aktuellen Arbeit konnte die Arbeitsgruppe von *Tirell* die Wirksamkeit dieser Methode anhand von Phenylalaninanaloga zeigen (Abbildung 32).^[105]

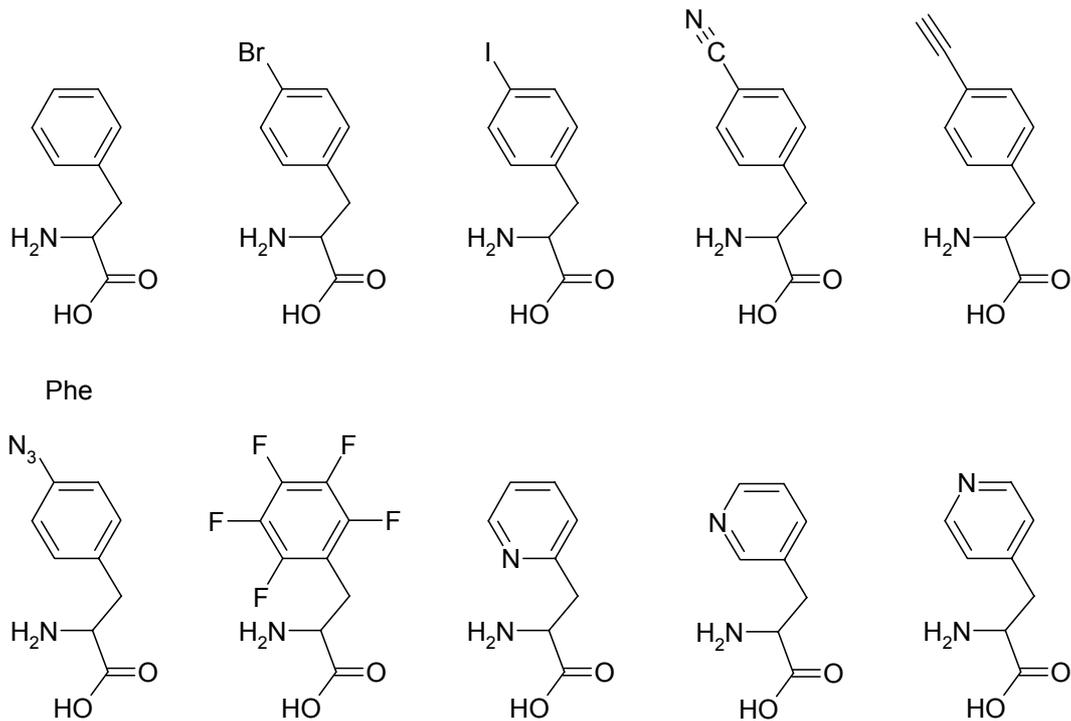


Abbildung 32: Von Tirrell durch Biosynthese eingebaute Analoga des L-Phe.

Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Beschränkung des Austauschs eines einzigen Aminosäuretyps je Peptid bzw. Protein. Darüberhinaus wird bei Anwesenheit der natürlichen Aminosäure diese bevorzugt eingebaut, so dass der komplette Austausch eines Restes nur selten erreicht wird.

4.2 Ein Gramicidin-S-Alanyl-PNA-Hybrid-Analogon als Modellsystem für die Duplexbildung

Bei den Gramicidinen handelt es sich um eine Klasse natürlich vorkommender Peptide mit antibiotischen Eigenschaften. Das Gramicidin S (cyclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂) wurde erstmals vor fast 60 Jahren isoliert (Abbildung 33).^[106] Neben seinen, mechanistisch immer noch nicht verstandenen, antibiotischen Eigenschaften hat es auch den Vorteil, dass nur zwei Proteasen bekannt sind, die es abbauen.^[107,108,109] Die Struktur besteht, wie schon 1957 von *Hodgkin* vorgeschlagen, aus einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt, das durch zwei II' β -Turns fixiert wird.^[110]

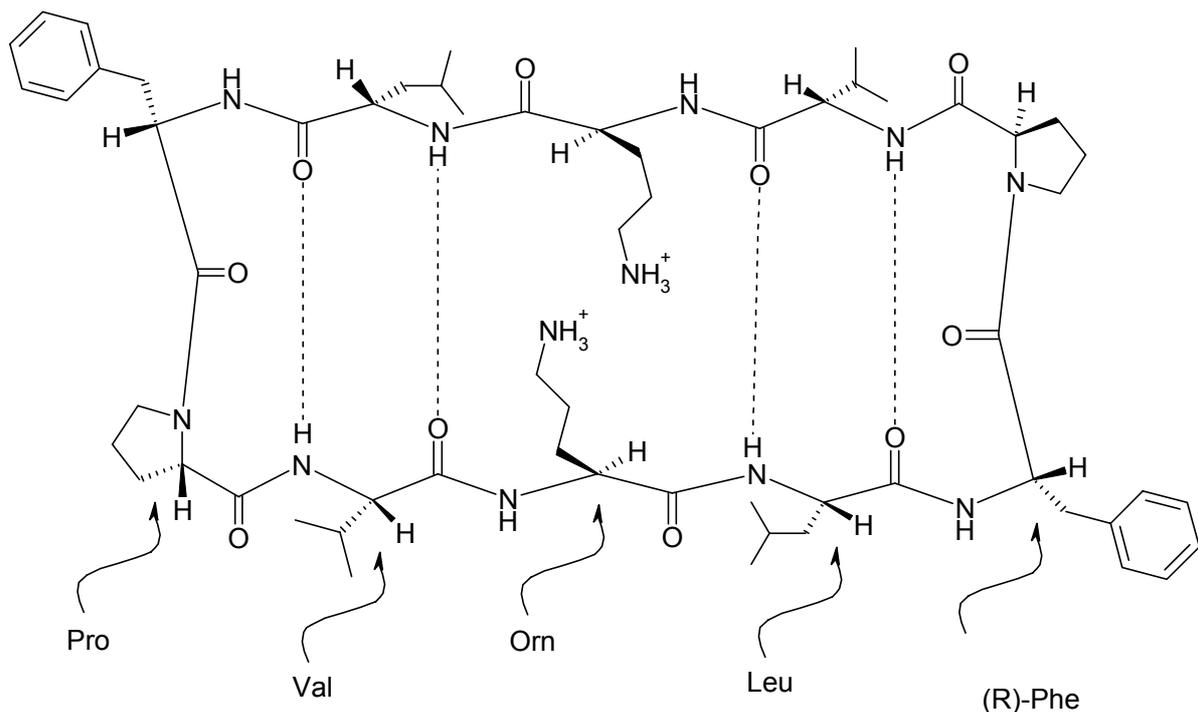


Abbildung 33: Gramicidin S in der Keilstrichschreibweise, die Wasserstoffbrücken sind angedeutet.

Bedingung für die Aktivität von Analoga sind basische Reste auf der hydrophilen Seite des Moleküls, die Möglichkeit eine β -Faltblattstruktur einzugehen und eine insgesamt hohe Hydrophobizität.^[108,111]

Hodges konnte zeigen, dass eine Vergrößerung der Cyclen bei Beibehaltung der oben genannten Anforderungen die Aktivität nicht beeinflussen.^[112] Er konnte auch belegen, dass zwischen zwei Turns (die D-Xaa-Pro Sequenz) eine gerade Zahl von Aminosäuren vorliegen muss, da sonst keine Aktivität gefunden werden konnte.

Anhand dieser Vorkenntnisse sollte ein Gramacidin-S Analogon synthetisiert werden mit einer N-terminalen Alanyl-PNA Sequenz. Bei Zugabe einer geeigneten Gegensequenz kann sich ein Doppelstrang mit β -faltblattartiger Struktur ausbilden und Strukturveränderungen hervorrufen.

Um nach einem ‚Aufschneiden‘ des cyclischen Gramacidin S einen weiteren Turn einbauen zu können und die Paarungsseite des Alanyl-PNA-Rests zugänglich zu machen, musste das Analogon gegenüber dem natürlichen Gramacidin S verlängert werden. Bei Beibehaltung der Konfigurationen und der Ladungsverteilung im Peptid entstand so die Sequenz **20** (AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-D-Phe-Pro-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-Phe-NH₂) (Abbildung 34), die die oben genannten Bedingungen erfüllt. Analog dem ‚Vorbild‘ liegen alle hydrophoben Seitenketten auf einer Seite und alle hydrophilen Seitenketten auf der anderen Seite des Peptids. Aus der Abbildung ist auch zu erkennen, dass alle Nucleobasen auf der gleichen Seite liegen.

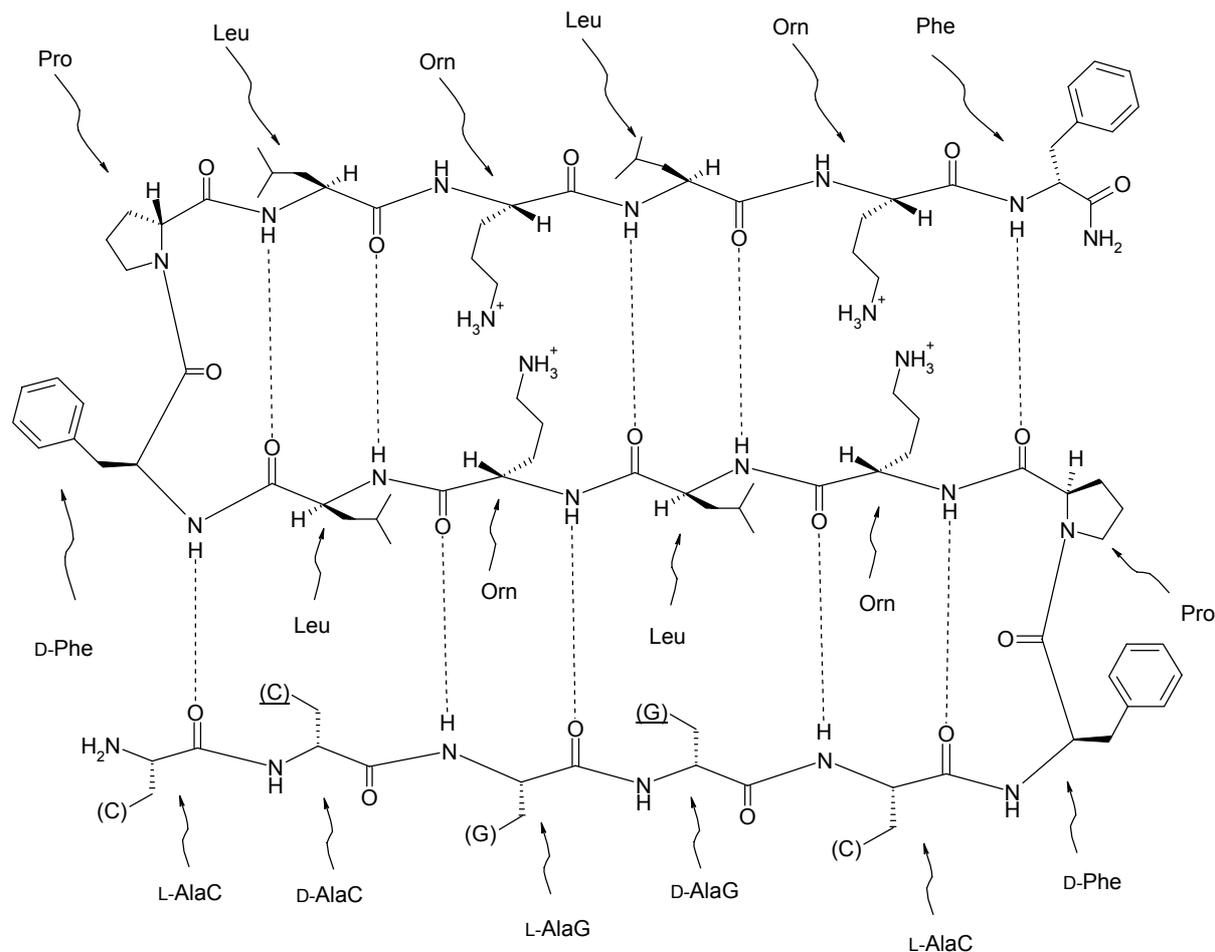


Abbildung 34: Modellvorstellung der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen des Gamicidin S Analogons **20** mit N-terminal eingebauten Nucleoaminosäuren.

Dieses Analogon liegt in einem Größenbereich, bei dem sich die Synthese an fester Phase anbot. Das Analogon **20** konnte in guter Ausbeute an MBHA-Harz dargestellt werden. Es erfolgten temperaturabhängige UV-Untersuchungen mit und ohne Gegenstrang. Während bei den Schmelzkurven ohne Gegenstrang keine T_m -Werte beobachtet werden konnten, konnte bei der Mischung des Analogons **20** mit Gegenstrang **21** (Abbildung 35) eine Duplexbildung mit einer Schmelztemperatur von 49°C beobachtet werden, die nicht der Superposition der Einzelstränge entspricht (Abbildung 37). Dieser T_m -Wert korreliert gut mit den bekannten Werten von hexameren Guanin-Cytosin-Alanyl-PNAs. Bei Watson-Crick-Paarungsmodus wird ein Wert von 58°C gefunden, bei *reverse*-Watson-Crick ein Wert von 41°C.^[8] Bei der Mischung des Gamicidin-S-

Analogons **20** mit dem Gegenstrang **21** liegt ein pentamerer Watson-Crick-Paarungssystem vor. Somit ist die um 9 Grad geringere Schmelztemperatur gegenüber dem hexameren Watson-Crick-Paarungssystem auf die geringere Anzahl von Wasserstoffbrücken und π -Wechselwirkungen zwischen den Nucleobasen zurückzuführen.



Abbildung 35: Gegenstrang **21** zum PNA-Strang in Peptid **20**.

Der Gegenstrang **21** wurde so gewählt, dass ein antiparalleler homochiraler Watson-Crick Paarungsmodus entstehen konnte (Abbildung 36).

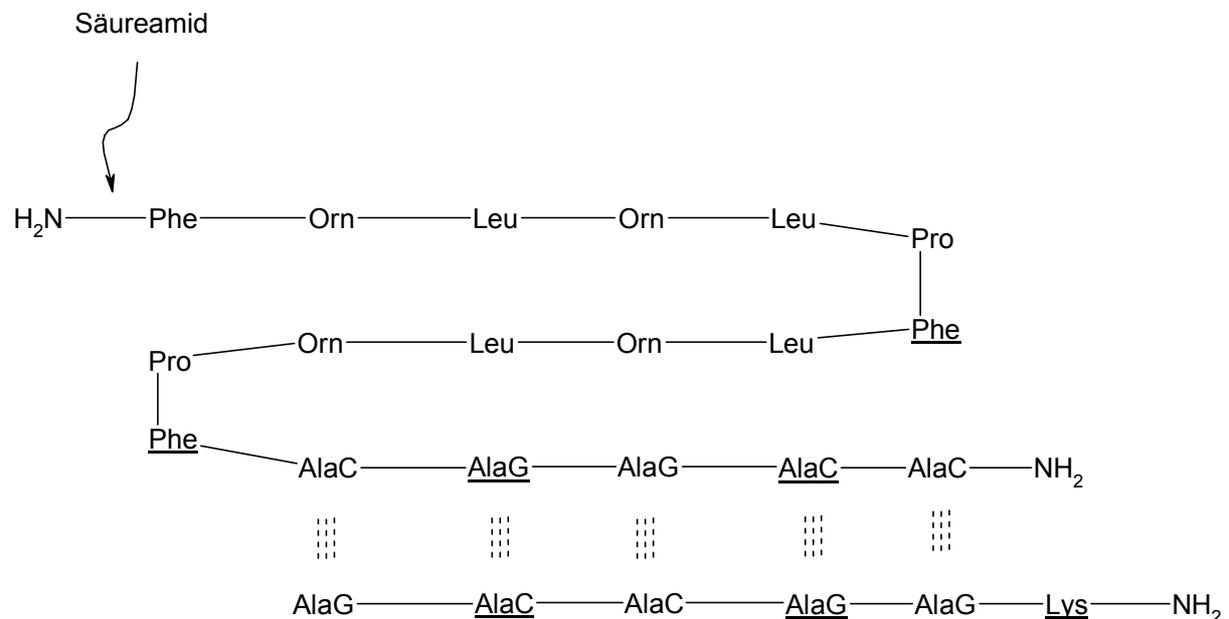


Abbildung 36: **20** und **21** in antiparallelen homochiralen Watson-Crick Paarungsmodus, die WC Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet..

Durch temperaturabhängige CD-Messungen konnte jedoch kein eindeutiger Beleg für Induktion eines β -Faltblattes erbracht werden. Messungen in Wasser ohne Puffer oder in Phosphatpuffer mit 5 Prozent TFE-Zusatz zeigten keine Schmelzkurven bzw. CD-Spektren.

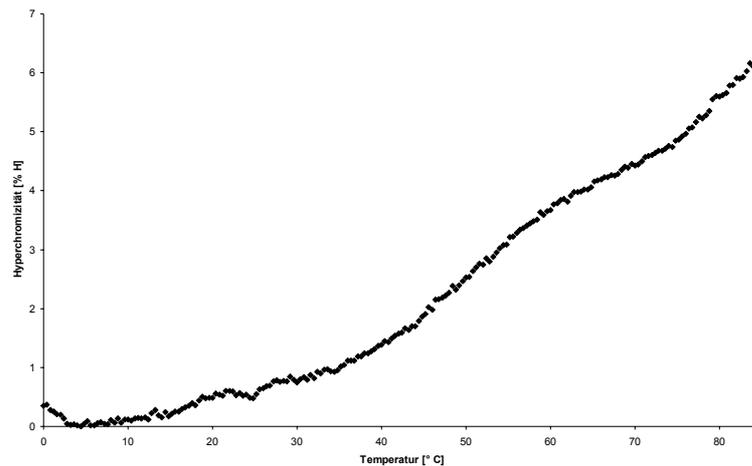


Abbildung 37: Peptid **20** und Peptid **21** je $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 10 h Inkubation, $T_m = 49 \text{ }^\circ\text{C}$, der zweite Anstieg ab 75°C ist auf Verdunstungseffekte zurückzuführen.

CD-Spektroskopie in Puffer bei verschiedenen Temperaturen mit und ohne Gegenstrang zeigten kein typisches Verhalten für das Vorliegen eines β -Faltblattes (siehe Anhang).

Die Synthese eines weiteren Analogons **22** mit 7-Xanthinyl- und 9-Diaminopurinalaninbausteinen statt der Guanin- und Cytosinbausteine scheiterte an den geringen Kupplungsausbeuten dieser Bausteine und wurde nicht weiter verfolgt (Abbildung 38).^[113]

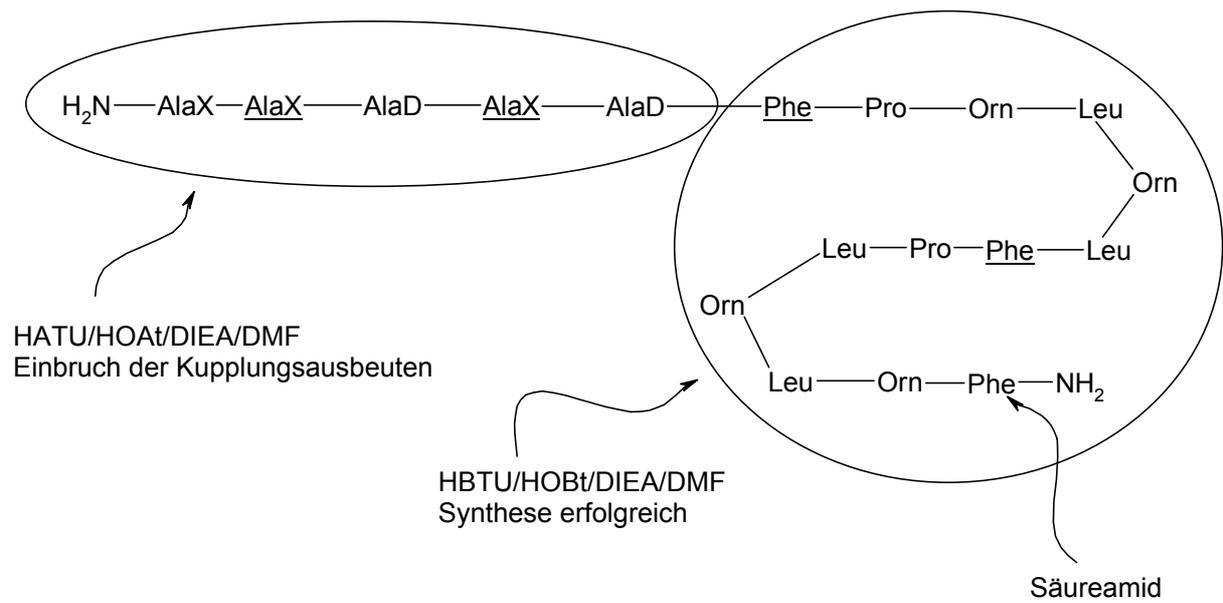


Abbildung 38: Einbruch der Synthese eines weiteren Analogons 22 bei Verwendung von AlaD und (N-7)-AlaX.

4.3 Synthese und Charakterisierung eines Alanyl-PNA-Pentamer-Systems als Referenz

Um eine Validierung der Ergebnisse des Gramacidin-S-Analogons **20** vorzunehmen bot es sich an, den Duplex der eingebauten Sequenz zusammen mit der komplementären homochiralen Sequenz direkt zu vermessen. Hierfür wurden die Pentamere AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ **23** und AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21** synthetisiert.

Anhand dieser Sequenzen wurden auch verschiedene Aktivierungsmethoden für die Peptidsynthese reiner Guanin-Cytosinhaltiger Alanyl-PNA verglichen. Versuche die Nucleoaminosäurebausteine mit HBTU/HOBt bzw. HATU/HOAt vor der Kupplung zu präaktivieren führten zum Einbruch der Synthese.^[114,115,116]

Auch der Einsatz von PyBrop[®], das für schwierige Kupplungsschritte entwickelt wurde, führte nicht zum Erfolg.^[117] Als effektivste Methode erwies sich die *in-situ* Aktivierung mit HOAt und HATU mit DIPEA als Base, trotz der Gefahr der Guanidinierung der freien Amine.^[118] Auch eine Doppelkupplung der Guaninbausteine zeigte eine Verbesserung der Ausbeute. Ein Entstapeln der Basen mit Pyridin ist unbedingt erforderlich, hierbei wirkt das Pyridin zum einen als Base, um das freie Amin zu erhalten und zum anderen bricht das aromatische Pyridin π -Wechselwirkungen zwischen den Basen auf.

Die Sequenz AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ **23** zeigte mit 46°C eine im Vergleich zu AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21** (T_m-Wert: 26°C) höhere Schmelztemperatur. Da das Paarungsmuster nicht eindeutig definiert ist, kann man die beiden Werte auch nicht direkt miteinander vergleichen (Abbildung 39).



Analogon der in Peptide eingebauten Sequenz **23**

$$T_m = 46^\circ\text{C}$$

Gegenstrang **21**

$$T_m = 26^\circ\text{C}$$

Abbildung 39: *Alanyl-PNA-Pentamer 23 und Alanyl-PNA-Pentamer 21.*

Die Sequenz AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ **23** besitzt, bei Ausschluss des aus topologischen Gründen nicht möglichen *Mismatches* von Purin-Purin mit Purin-Pyrimidin Basenpaarungen in einer Paarungssequenz, noch zwei Paarungsmöglichkeiten. Einen parallelen mit drei zweizähligen *reverse*-Watson-Crick Paarungen und einen antiparallelen mit vier zweizähligen *reverse* Watson-Crick Paarungen (Abbildung 42).



Abbildung 40: *Denkbare Paarungsmodi des Oligomers 23, links: homochiral, parallel, reverse Watson-Crick; rechts: heterochiral, antiparallel, reverse Watson-Crick.*

Beide Anordnungen erklären den hohen T_m -Wert von 46°C nicht und lassen keinen genauen Rückschluss auf den vorliegenden Komplex zu (Abbildung 41).

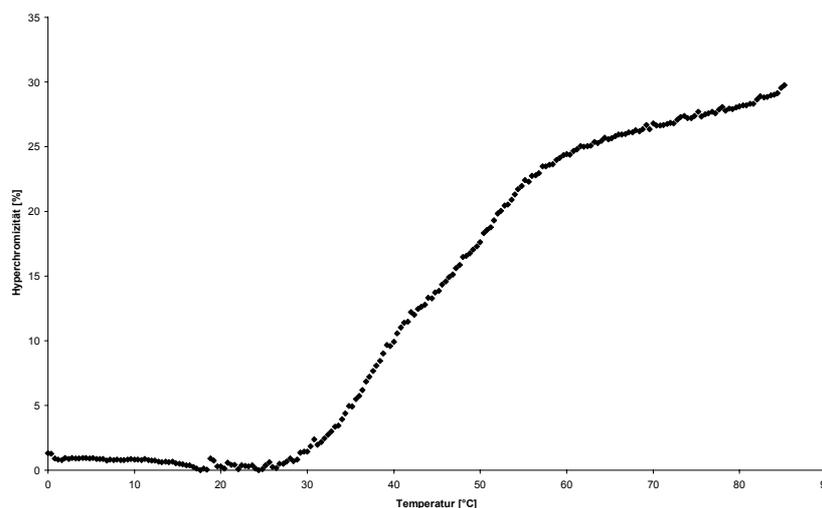


Abbildung 41: *Olimger 23: c = 6 μM, 0.1 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄/H₃PO₄, pH 7, λ = 280 nm, 3 h Inkubation, T_m = 46 °C.*

Bei der Sequenz AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21** sind unter den gleichen Prämissen, kein Mismatch von Purin-Purin Paarungen mit Purin-Pyrimidin Paarungen, zwei Paarungsmodi denkbar (Abbildung 42).

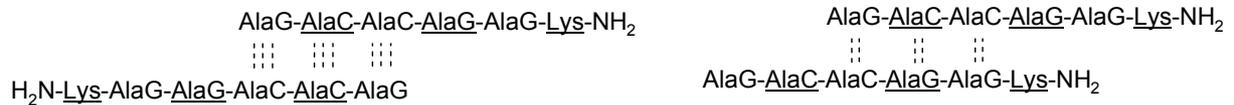


Abbildung 42: Denkbare Paarungsmodi des Oligomers **21**, links: homochiral, antiparallel, Watson-Crick; rechts: homochiral, parallel, reverse Watson-Crick.

Der T_m -Wert liegt mit 26°C wesentlich niedriger (Abbildung 43). Auch hier ist die Sequenz somit nicht eindeutig definiert.

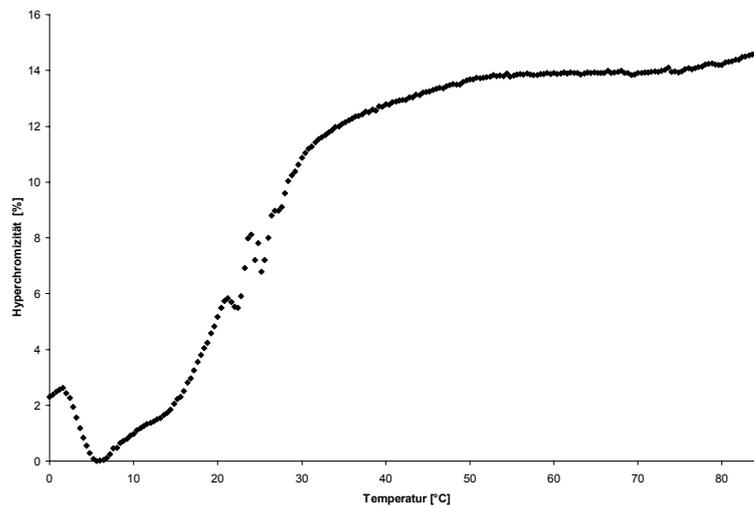


Abbildung 43: Oligomer **21**: $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, T_m -Wert = 26 °C.

Die Mischung beider Oligomere ergibt eine fünffache Watson-Crick Paarung (Abbildung 44).

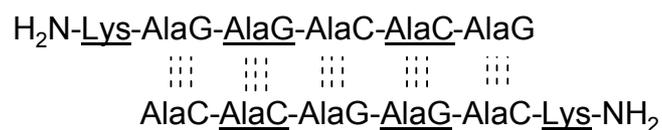


Abbildung 44: Erwartete Paarung bei Mischung der Oligomere **21** und **23**; antiparallel, homochiral, Watson-Crick.

Die Schmelzkurve zeigt jedoch zwei Wendepunkte (T_m 41° und 68 °C) auf. 41° C entspricht den Erwartungen im Vergleich mit den Werten des Hexamers, der

höhere Wert kann jedoch nicht erklärt werden. Die Verwendung eines Pentamers statt eines Hexamers scheint die Bildung höherer Aggregate zu fördern. Eine genaue Beschreibung des Zustandes der vorliegenden Spezies ist deswegen nicht möglich (Abbildung 42).

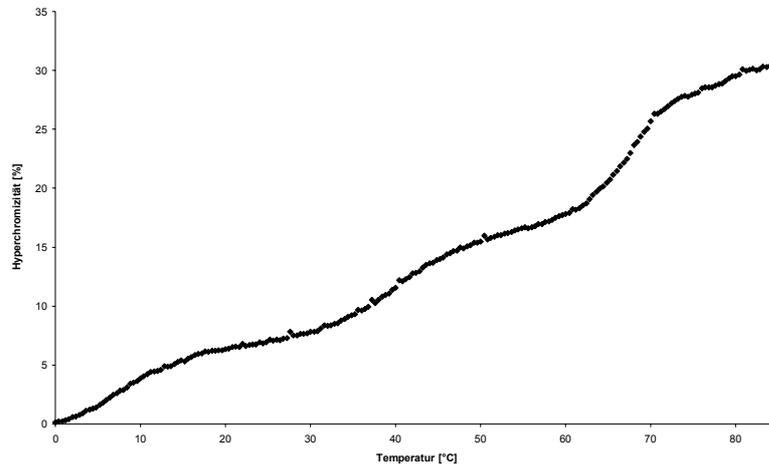


Abbildung 45: Mischung von **21** und **23** je $c = 3\ \mu\text{M}$, $0.1\ \text{M NaCl}$, $0.01\ \text{M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280\ \text{nm}$, $3\ \text{h}$ Inkubation, $T_{m1} = 41\text{ °C}$ und $T_{m2} = 68\text{ °C}$.

Als Referenzsystem für die Paarung von Peptid-Alanyl-PNA ist es jedoch geeignet, da der allgemeine Gegenstrang einen niedrigeren T_m -Wert besitzt und die Hybride meist keine Schmelzkurven aufzeigen.

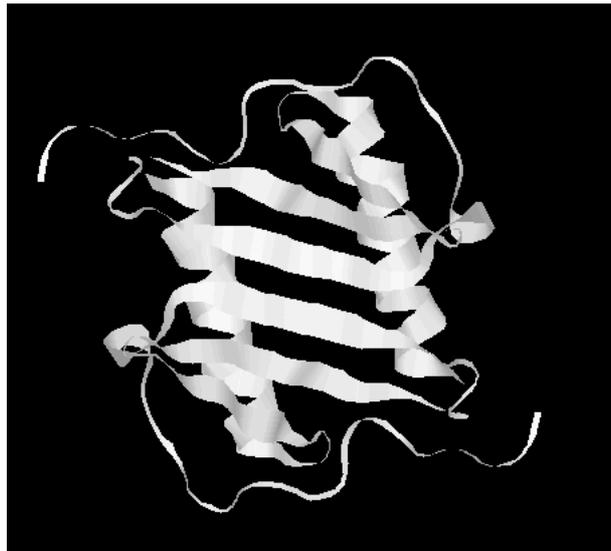


Abbildung 47: Struktur des IL-8, hinter den dimerisierten β -Faltblättern sind deutlich die beiden α -Helices zu erkennen.

Dieses Cytokin, das eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Entzündungskrankheiten spielt, gehört zur Familie der CXC Chemokine. Es bindet an die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2.^[123]

Im Rahmen dieser Arbeit sollten IL8 Analoga mit eingebauter Alanyl-PNA dargestellt werden. Durch die Zugabe des komplementären PNA-Gegenstranges sollten dann konformelle Änderungen des Gesamtsystems erzeugt werden können, die einen Einfluss auf die Aktivitäten haben.

4.4.1 N-Terminale Helix IL-8(65-77) 25

Es wurde die N-terminale Helix IL-8(65-77) 25 mit eingebauter Alanyl-PNA Sequenz dargestellt (Abbildung 48).

Ac—Arg—Val—Val—AlaC—AlaG—AlaG—AlaC—AlaC—Arg—Ala—Glu—Asn—Ser—OH

Abbildung 48: N-terminale Helix IL-8 65-77 25 mit N-Acyliertem Ende.

Die Synthese erfolgte mit der Boc-Strategie an Ser(OBzl) belegtem PAM-Harz. Natürliche Aminosäuren wurden mit HBTU/HOBt in DMF präaktiviert. Nucleoaminosäuren wurden analog den Pentameren mit HATU/HOAt *in situ* in kleinen Säulen aktiviert. Im Gegensatz zu reinen Alanyl-PNA-Sequenzen

wurden hier guanidierte Fehlsequenzen bei der *in-situ* Aktivierung der Nucleoaminosäurebausteine nachgewiesen (Abbildung 49).

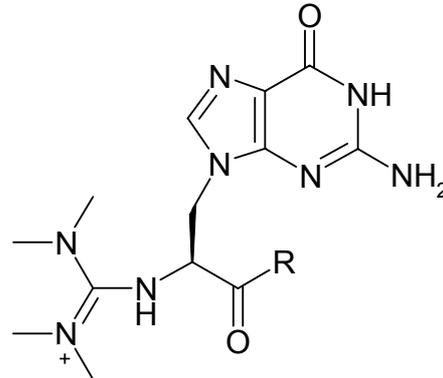


Abbildung 49: Guanidierter Guaninbaustein nach *in-situ* Aktivierung mit HATU.

Die Sequenz **25** zeigte keine Schmelzkurven, auch die Zugabe des Gegenstranges führte zu keiner Schmelzkurve, die dem erwarteten Duplex entsprach. Die gemessene Schmelzkurve (Abbildung 50) entsprach einer Superposition der Einzelstränge.

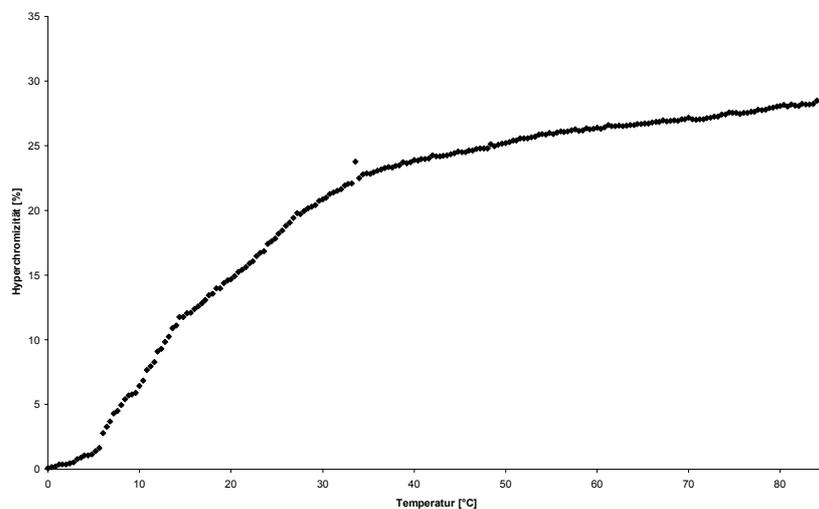


Abbildung 50: Mischung der N-terminalen Helix **25** mit dem Pentamer **21**, je $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation , $T_m = 18 \text{ }^\circ\text{C}$, die Schmelzkurve entspricht der Überlagerung der beiden Einzelstränge.

4.4.2 Interleukin-8 Derivate

Für die Herstellung der Derivate bot sich die *native chemical ligation* an, da hierbei nur eine Teilsequenz totalsynthetisch dargestellt werden musste. Der

Thioester konnte biochemisch dargestellt werden. Von den 4 vorhandenen Cysteinen wurde der Schnitt am letzten (Cys⁵⁵) durchgeführt. Der N-terminale Abschnitt mit den Aminosäuren 55 bis 77 wurde synthetisch dargestellt. Die Synthesen der N-terminalen Sequenzen wurden mit Boc-Strategie durchgeführt. Der Thioester IL8(1-54) **31** wurde durch *Expressed Protein Ligation* (EPL) und anschließender Aufreinigung an einer Affinitätssäule mittels *Chitin-Tags* in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Beck-Sickinger in Leipzig dargestellt. Die Methode wird im experimentellen Teil beschrieben.

4.4.2.1 Synthese der Interleukin-8 (56-77) Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere 56-77 Interleukin-8 Derivate synthetisiert. Die Verwendung von *N*-Boc geschützten Nucleoaminosäuren machte den Einsatz der Boc-Strategie erforderlich. Es gab mehrere Schutzgruppenstrategien für den Einbau des N-terminal erforderlichen Cysteins. Die Verwendung der besonders stabilen Acm-Schutzgruppe (S-Acetamidomethyl) sollte die chromatographische Aufarbeitung des Peptids erleichtern.^[124] Für die beiden ersten Sequenzen (Abbildung 52) wurde die Acm-Schutzgruppe verwendet. Asparagin und Glutamin wurden nicht geschützt, die sauren Aminosäuren mit der Benzylschutzgruppe versehen. Trotz der nur bedingten Säurestabilität wurde für Arginin die Mts (2,4,6-Trimethylbenz磺onyl) Schutzgruppe gewählt (Abbildung 51).^[125,126]

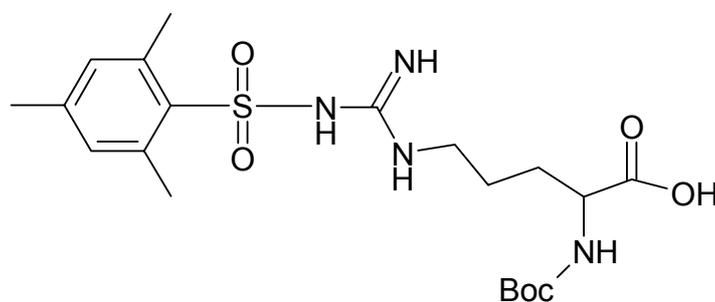


Abbildung 51: Mts seitenkettengeschütztes Arginin für die Festphasensynthese nach der Boc-Strategie.

Als geeignete Schutzgruppe für das Tryptophan erwies sich die Formylgruppe, die jedoch den Abspaltungbedingungen mit TFMSA widersteht und deswegen

einen zusätzlichen Entschützungsschritt mit 20 % iger Piperidinlösung erforderlich machte.^[127,128,129]

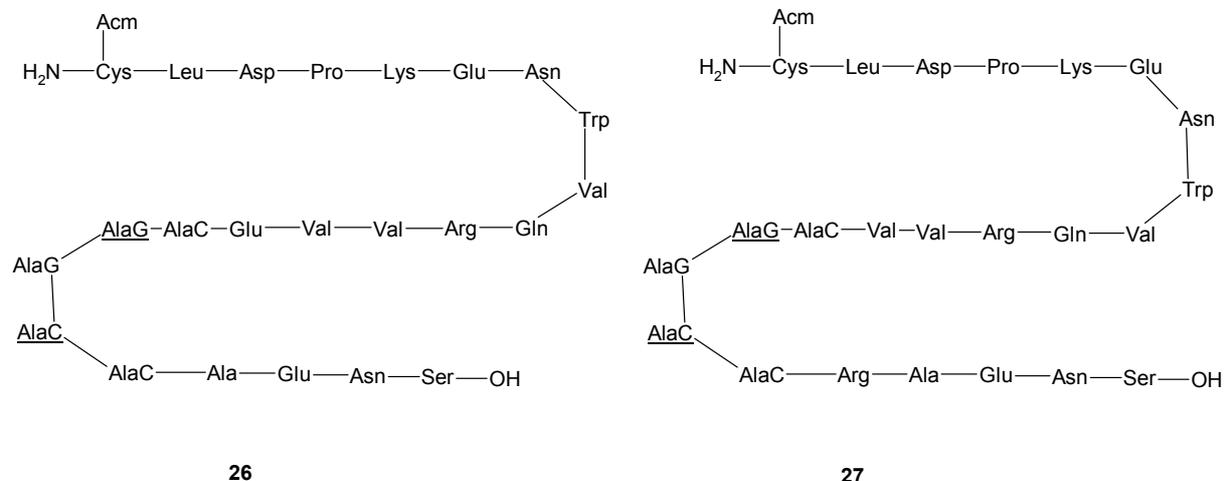


Abbildung 52: Sequenzen der beiden Oligomere **26** und **27** nach Abspaltung vom Harz mit vorhandener Acm-Schutzgruppe.

Als Harz wurde PAM-Harz (Phenylacetamidomethyl-Harz) gewählt, da es gegenüber dem Merrifield Harz eine 100-fach höhere Säurestabilität aufweist, das Peptid aber dennoch mit TFMSA abgespalten werden kann (Abbildung 53).^[130]

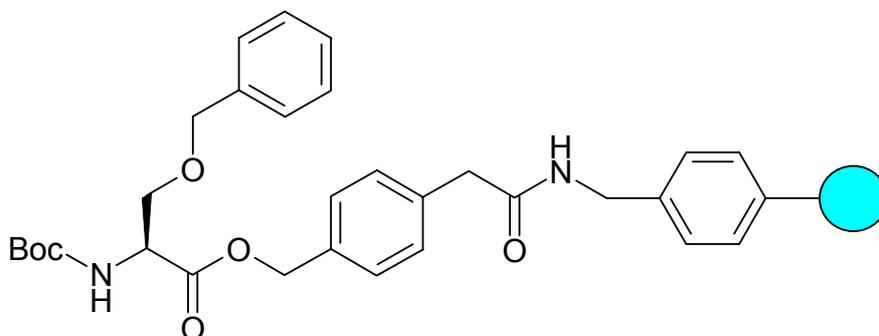


Abbildung 53: *L*-Ser(Bzl) beladenes PAM-Harz (Boc-*L*-serin-benzyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl Harz).

Nucleoaminosäuren wurden mit HATU/HOAt *in situ* und natürliche Aminosäuren mit HBTU/HOBt präaktiviert und doppelt gekuppelt. Die Gesamtausbeute der Oligomere **26** und **27** war nicht zufriedenstellend. Weitere Probleme ergaben sich beim Entschützen der Acm-Gruppe. Die Entschützung erfolgte bei pH 4 unter Einwirkung von Hg(II)Ac₂. Die Ausbeuten lagen unter 10 %, und eine chromatographische Trennung vom geschützten Peptid konnte

nicht erzielt werden. Der Versuch die Ligation ohne Trennung durchzuführen scheiterte ebenfalls, was wahrscheinlich auf die noch störend anwesenden Quecksilbersalze zurückzuführen ist.

Deswegen wurde die Acm-Schutzgruppe gegen die Tritylgruppe ausgetauscht, die gleichzeitig bei der Abspaltung des Peptides vom Harz entfernt wird. Eine eventuelle Oxidation der Sulfidgruppe beeinträchtigte die Ligation nicht, da vorher mit Phosphin (TCEP) und Thiol (MESNA) eine Reduktion durchgeführt wurde.

Die Sequenz **28** (Trityl- statt Acm-geschützt) sollte wieder mit HBTU/HOBt und Doppelkupplungen der natürlichen Aminosäuren durchgeführt werden (Abbildung 54). Wie jedoch LC-MS-Untersuchungen ergaben, traten geringe Kupplungsausbeuten bei den Resten 16 (Trp) und 17 (Asn) auf, so dass an diesen Positionen nach Behandlung mit Acetanhydrid das acetylierte Produkt erhalten wurde. Bei den *in situ* aktivierten Nucleoaminosäurebausteinen wurde wieder Guanidierung beobachtet. Die durchgeführten Kaiser Tests hatten hier jeweils in falsch negativen Ergebnissen die Abwesenheit freier Aminogruppen angezeigt.

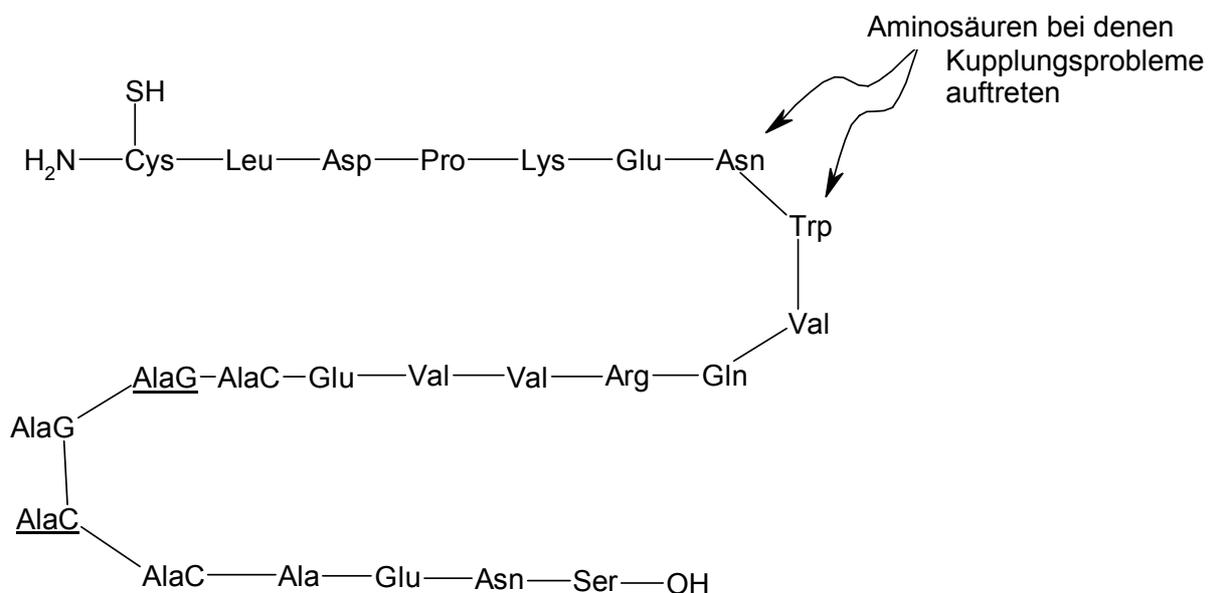


Abbildung 54: Problematische Stufen bei der Synthese von **28**.

Auch die Verwendung des neuen Aktivierungsreagenzes HCTU/HOCT (Abbildung 55) bei der erneuten Synthese der gleichen Sequenz **28** (Abbildung

54) führte wieder zu den beiden oben beschriebenen Fehlkupplungen bei Asn und Trp(For). Die erhöhte Reaktivität der entstehenden HOCT-Ester liegt in dem geringeren pK_a -Wert des HOCTs begründet.^[131,132]

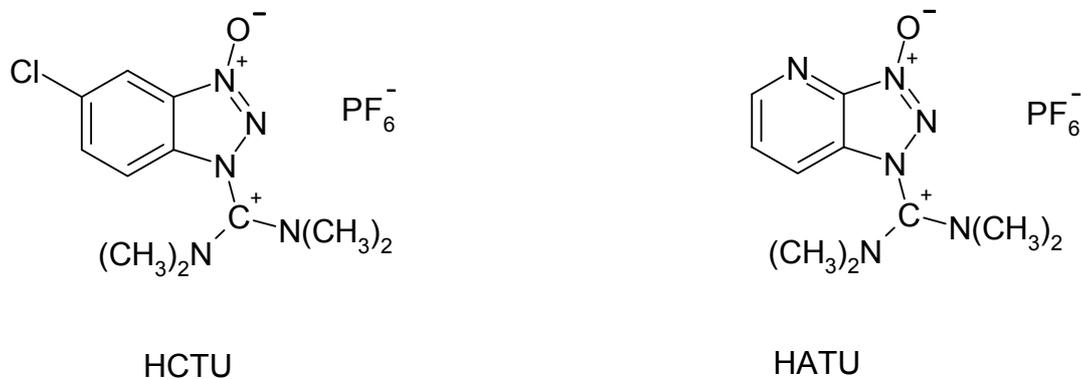


Abbildung 55: Die Uroniumreagenzien HCTU und HATU für die Aktivierung der Aminosäuren.

Erst durch die Verwendung von HATU/HOAt und erhöhter Kupplungs-Temperatur konnte das Peptid **29** dargestellt werden (Abbildung 56).^[133]

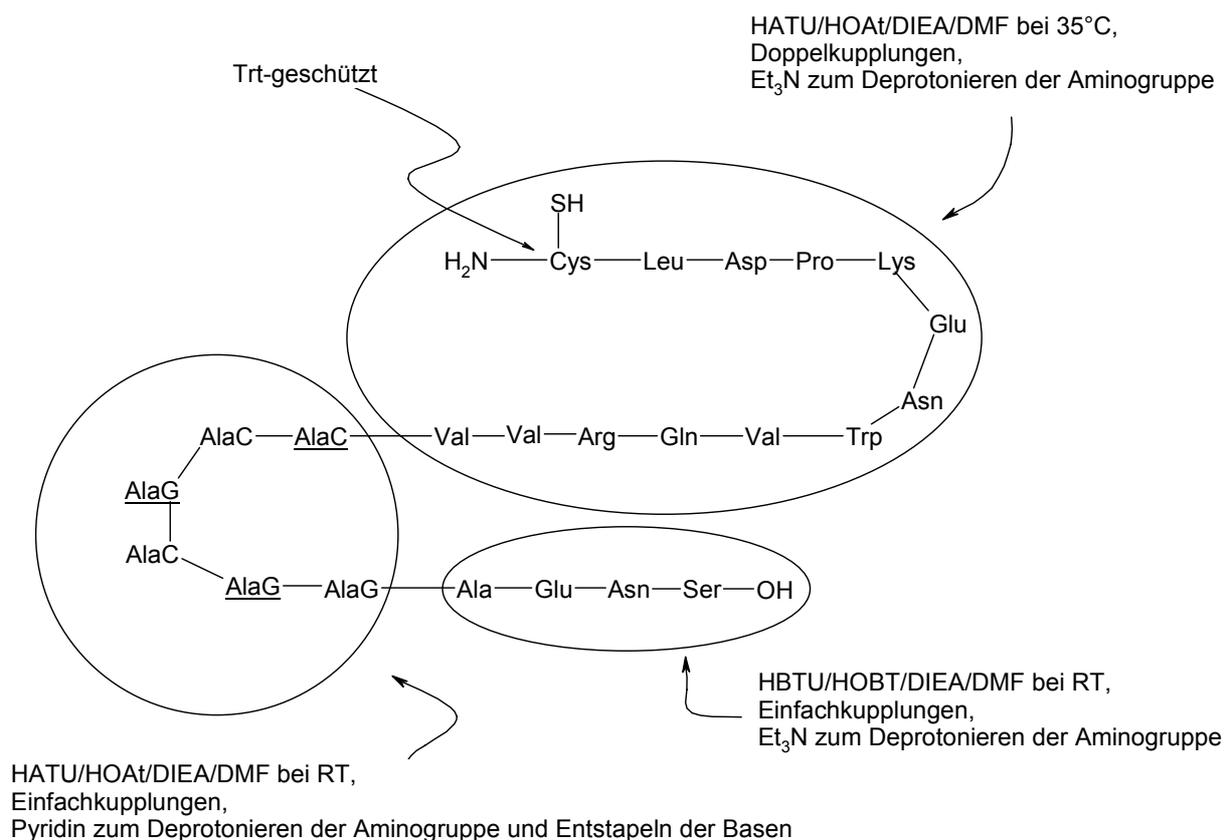


Abbildung 56: Synthese des Peptides **29**.

Die Gesamtausbeute lag unter 5 % der theoretisch möglichen und war somit nicht zufrieden stellend. Darüber hinaus war es wichtig, bei der Abspaltung vom

Harz leicht reduktive Bedingungen einzuhalten. Wurde reines *m*-Kresol als Scavenger eingesetzt, so konnte das Produkt nicht isoliert werden. Nur bei Verwendung von EDT/Thioanisol und Abspaltung bei 0° C wurde nach Auftrennung der verschiedenen Oligomere 1 mg des Produktes **29** erhalten.

4.4.2.2 Native Chemical Ligation

Das hIL-8-Alanyl-PNA Konjugat **30** (Abbildung 57) sollte durch Ligation der Oligomere **29** und des Thioesters **31** dargestellt werden.

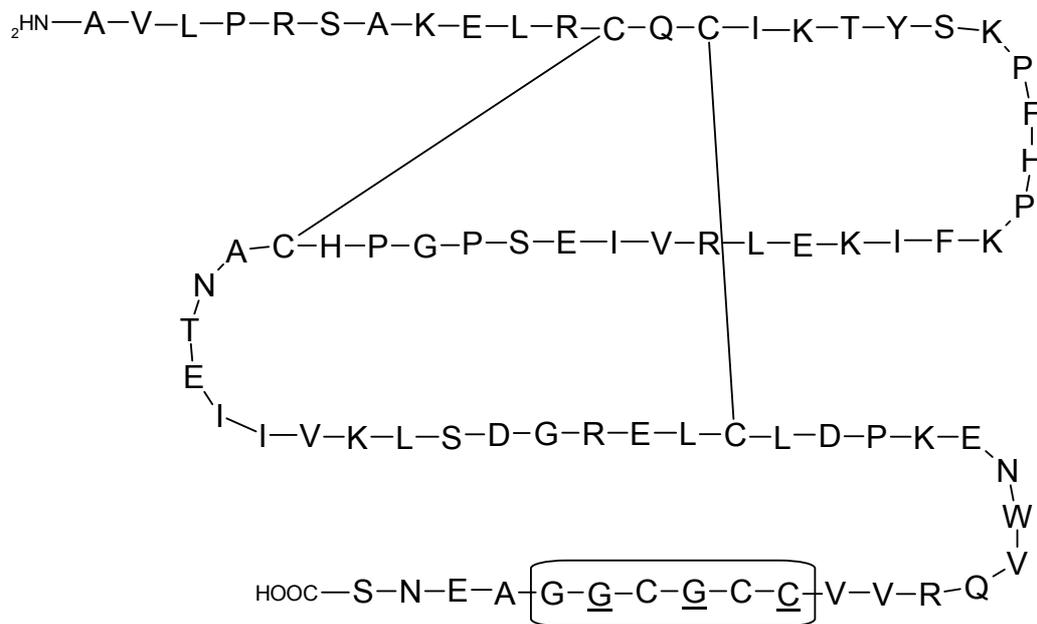


Abbildung 57: hIL-8 Derivat **30** mit eingebauter Alanyl-PNA an den Positionen 68 bis 73, die eingebaute Alanyl-PNA ist von dem Kasten umrahmt..

Das hIL-8(1-54) Thioesterfusionsprotein wurde durch Expression in *E. coli* erhalten und durch Zugabe von Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) wurde der Thioester **31** erhalten.

Da der rekombinante Thioester **31** in Wasser schlecht löslich ist, wurde bei der Expression der Lösungsvermittler Harnstoff in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Ohne diese Additive ist das Peptid **31** nur schlecht wieder in Lösung zu bringen. Deswegen wurde nach der Expression der Thioester **31** in Lösung gefroren aufbewahrt. Nach Auftauen wurde das Peptid **31** ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

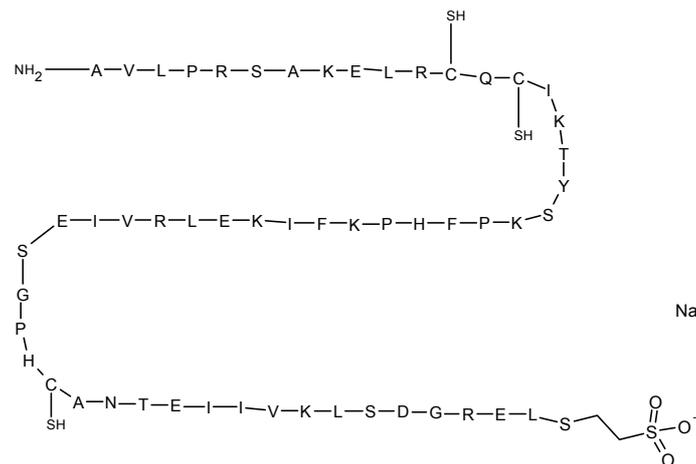


Abbildung 58: Durch EPL erhaltener Thioester **31** mit reduzierten Cysteinen.

Die Ligationsbedingungen waren je 0.25 mM des Peptides **29** und des Thioesters **31**, Harnstoff mit je 1.5, 3 und 6 molarer Konzentration bei Raumtemperatur in der Anwesenheit von MESNA (0.2 M) und TCEP (10 mM). Das Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) diente zur Reduktion eventuell oxidierter Cysteinreste. Anschließend wurde der pH Wert auf 8 eingestellt und nach unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und mittels SDS-Page analysiert. Der leicht basische pH-Wert begünstigt zwar die Hydrolyse des Thioesters, die Ligation verläuft jedoch schneller als die Hydrolyse.

Der Reaktionsfortschritt wurde durch SDS-Page (Abbildung 59) verfolgt und die Reaktion nach 48 h abgebrochen. Bei dem Gel handelte es sich um ein Tricin-Gel nach Schlagger, als Größenstandard wurde der Broad Range Standard von Biorad verwendet.^[134] Das Peptid **29** mit dem N-terminalen Cystein (Molekulargewicht 3185) liegt in zwei Banden vor, eine Bande entspricht ca. einer Molekulargewicht von 3000, die zweite Bande einem Molekulargewicht von 6000. Dies deutet darauf hin, dass das Oligomer **29** eventuell dimerisiert, bzw. eine Disulfidbrücke eingegangen ist. Bereits nach 5 min ist eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 9000 sichtbar. Nach 48 h ist noch Thioester vorhanden.

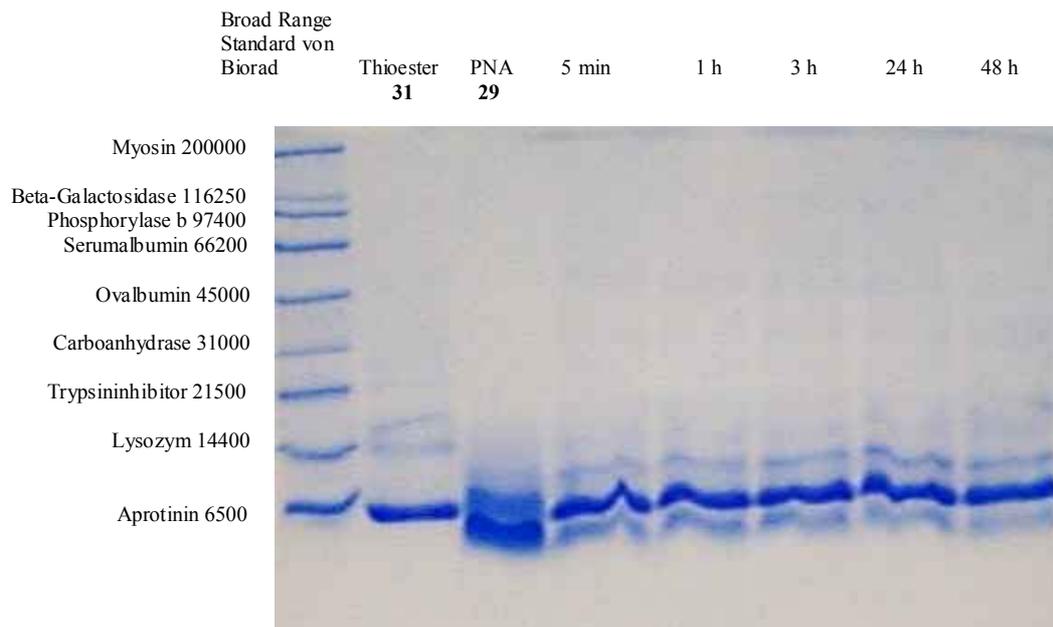


Abbildung 59: SDS-PAGE Gel nach Schagger, Reaktionsbedingungen, 1ml, 3 M Harnstoff, 0.2 M MESNA, 0.01 M Tris-carboxyethyl-phosphin, 0.6 mg Thioester und 0.3 mg PNA. Es ist deutlich die Bande des Thioesters **31** bei einem Molekulargewicht von ca. 6500 zu erkennen, rechts daneben das Peptid **29** mit einer Doppelbande bei ca. 6000 und einem kleineren Wert. Bereits nach 5 min. Reaktionszeit ist eine schwache Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 9000 zu erkennen.

Die drei Ansätze wurden mittels einer ESI-LC-MS untersucht. Die gefundenen Massen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Massendifferenzen lassen sich auf die Isotopenverteilung (hier sind die exakten Massen berechnet) und auf den Umstand zurückführen, dass der Massenbereich des ESIs auf 2000 Dalton beschränkt ist, durch Hochrechnung der unterschiedlich geladenen Spezies können so kleinere Abweichungen entstehen. Insofern sind die gefundenen Abweichungen von 10 Masseneinheiten im Rahmen der Messgenauigkeit.

Retentionszeit	Gef. Peptid	Theor. Masse	1.5 M Harnstoff	3 M Harnstoff	6 M Harnstoff
9.3 min	?	?	3255	3254	3254
10.0 min	?	?	3318	3320	3320
11.0	Hydr. Thioester	6142	6154	6155	6154
11.3	Thioester 31	6265	6274	6275	6274
12.0	?		6414	6415	6414
12.0	?		6321	6321	6321
12.5	Ligationsprodukt 30	9307	9319	9320	9319
13.0	„Thioester 31 “	6265	6278	6275	6275

Tabelle 2: Tabelle der gefundenen Massen des Ligationsansatzes in einer LC-MS von Peptid **29** mit Thioester **31** (5 → 60 % Acetonitril in 30 min) .

Das C-terminale Peptid **29** (exakte Masse 3185) wurde nach 48 h Reaktionszeit nicht mehr gefunden, stattdessen wurden etwas größere Massen gefunden, wahrscheinlich reagierte das Cystein mit vorhandenen Elektrophilen. Daneben wurde noch Thioester **31** (exakte Masse 6265) und hydrolysiertes Thioester (exakte Masse 6142) gefunden. Auch das Ligationsprodukt **30** (exakte Masse 9307) wurde detektiert. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Masse des Thioesters **31** bei zwei verschiedenen Retentionszeiten gefunden wurde, könnte eine nichtkovalente Dimerisierung des IL-8-Derivates **30** mit dem Thioester **31** sein. Aus der LC-MS ist ebenso ersichtlich, dass die Konzentration des Harnstoffes keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Eine vollständige Auftrennung der einzelnen Produkte mittels semipräparativer HPLC konnte nicht erzielt werden. Thioesters **31** und der hydrolysierte Thioester konnten abgetrennt werden. Das Ligationsprodukt **30** aber konnte nicht vom Thioester **31** und dessen Hydrolyseprodukt abgetrennt werden. Bei massenspektroskopischen Untersuchungen konnten die Massen des IL-8-Derivates **30** (9307) und des Thioesters **31** (6265) nur nebeneinander nachgewiesen werden. Das IL-8-Derivat **30** konnte auch nicht durch

Größenausschlusschromatographie vom Thioester **31** abgetrennt werden, da die verwendeten Superdex[®]-Säulen aus Dextran aufgebaut sind und IL-8 an Zucker bindet. *In vivo* bindet das Interleukin an die extrazelluläre Matrix um einen Konzentrationsgradienten aufzubauen. Der gleiche Effekt ist auf der Säule zu beobachten, so dass das Produkt nicht mehr von der Säule gespült werden konnte. Zur Optimierung des Trennungproblemes mit anderem Säulenmaterial, z. B. Acrylamidbeads stand nicht mehr genügend Substanz zur Verfügung.

Es konnte gezeigt werden, dass die *native chemical ligation* von Alanyl-PNA-Hybriden mit Thioestern grundsätzlich möglich ist, geringe Ausbeuten und Trennprobleme verhinderten jedoch bisher die weitergehende Untersuchung des Einflusses eines Alanyl-PNA-Gegenstranges auf Struktur und biologische Aktivität eines IL-8 Hybrids.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aktivität von Biooligomeren wird wesentlich beeinflusst von deren molekularer Struktur bzw. Konformation. Eine Einflussnahme auf die Struktur sollte deswegen auch mit einer Aktivitätsveränderung einhergehen, ein „Schalten“ von Struktur somit ein „Schalten“ von Aktivität nach sich ziehen.

Alanyl-PNA ist ein Oligopeptid alternierender Konfiguration mit Nukleobasen in β -Position der Alanyl-Einheiten, das durch Wasserstoffbrückenbildung und π -*Stacking* mit einem komplementären Strang Paarungsduplexe mit β -faltblattartiger linearer Struktur eingeht. Der Einbau eines Alanyl-PNA-Stranges in ein Peptid oder Protein und Zugabe des korrespondierenden Gegenstranges sollte zu einer lokalen Induktion eines β -Faltblattes führen und strukturelle Veränderungen im Gesamtpeptid hervorrufen. Es kann dann von einem molekularen Schalter gesprochen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vom cyclischen Peptidantibiotikum Gramacidin S abgeleitete 18mer-Peptid-Alanyl-PNA-Chimäre **20** mit eingebautem Alanyl-PNA-Pentamer dargestellt. Es konnte mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie gezeigt werden, dass sich bei Zugabe des komplementären Gegenstranges nichtkovalente Duplexe bilden. CD-spektroskopische Untersuchungen dieses Dimers lieferten keine eindeutigen Beweise für das Vorliegen eines β -Faltblattes.

Es konnte anhand des humanen Interleukins 8 gezeigt werden, dass der Einbau von Alanyl-PNA durch die Technik der *native chemical ligation* in größere Peptide möglich ist. Hierfür wurde der N-terminale Thioester **31** des humanen Interleukins hIL8(1-55) durch Expression des Fusionsproteines in *E.coli* und *Expressed Protein Ligation* dargestellt. Nach Umsetzung des Thioesters **31** mit einem Alanyl-PNA-Peptid-Hybrid **29**, das N-terminal mit einem freien Cystein substituiert ist, wurde durch *native chemical ligation* ein von dem humanen

Interleukin 8 abgeleitetes 77 Aminosäuren enthaltendes Peptid **30** mit eingebauter Alanyl-PNA erhalten.

Darüber hinaus wurden mit keinem, einem oder zwei Lysinen substituierte Alanyl-PNA-Hexamere dargestellt und Strukturuntersuchungen unterworfen. Es konnte mittels temperaturabhängiger UV-Spektroskopie gezeigt werden, dass der Einbau zweier Lysine sowohl die Löslichkeit als auch die Bildungskinetik verändert, die Stabilität (T_m -Wert) der Duplexe jedoch unverändert lässt. Diese Hexamere wurden Kristallisationsversuchen unterworfen, bisher konnten noch keine Kristalle erhalten werden.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen sollte es in Zukunft darüber hinaus möglich sein, genaueren Aufschluss über die Struktur von Alanyl-PNA zu erhalten. Die Erhöhung der Löslichkeit von Alanyl-PNA durch Einbau zweier Lysine ermöglicht nicht nur weitere Kristallisationsversuche, sondern man gelangt auch in Konzentrationsbereiche, in denen NMR-Untersuchungen an Alanyl-PNA möglich werden, die bisher aufgrund zu schlechter Löslichkeit zu keinen zufrieden stellenden Ergebnissen geführt haben.

Durch weitere Optimierung der *native chemical ligation* und Bereitstellung größerer Mengen von Interleukin 8 Derivaten mit eingebauter Alanyl-PNA sollte es in Zukunft möglich sein, den Einfluss des komplementären Alanyl-PNA-Stranges auf die Struktur des Gesamtsystems und dessen biologischer Aktivität zu untersuchen. Durch Variation und Optimierung der Sequenz und des örtlichen Einbaus der Alanyl-PNA kann so vielleicht das Fernziel eines molekularen strukturellen Schalters für Peptide bzw. Proteine erreicht werden.

Ebenso ist es denkbar, dass durch den Einbau von Alanyl-PNA in zwei verschiedene Peptide bzw. Proteine nichtkovalente Protein-Protein-Komplexe erhalten werden können.

Summary

Activity and properties of biooligomers depend mainly on their molecular structure and conformation. Changing structure causes also a change of activity. Therefore, “switching” structure results in “switching” activity.

Alanyl-PNA is an oligopeptide consisting of amino acids with alternating configuration with nucleobases attached to the β -position of an alanyl unit. Addition of a complementary peptide strand induces a β -sheet like conformation in the backbone of the duplex by hydrogen bonding and π -stacking. Incorporation of alanyl-PNA into a peptide or protein and addition of a complementary sequence should induce a β -sheet like structure and produce structural changes in the entire system. For this effect the term *molecular switch* can be used.

In this work a peptide-alanyl-PNA chimera **20** consisting of a sequence of 18 amino acids, which was derived from the cyclic antibiotic Gramicidin S, has been synthesized. It contained a terminal alanyl-PNA pentamere. Using temperature dependent UV-spectroscopy it could be proven that addition of the complementary strand led to noncovalent duplexes. Investigations by CD-spectroscopy did not give clear evidence for the existence of a β -sheet.

To accomplish the incorporation of alanyl-PNA into larger peptides the technique *native chemical ligation* has been applied. Alanyl-PNA has been incorporated into the 77 amino acids containing peptide human interleukine 8 (hIL8). The N-terminal thioester hIL8(1-55) **31** was expressed by a fusion-protein in *E.coli* and worked up by *Expressed Protein Ligation*. After reaction of the thioester **31** with an alanyl-PNA-peptide hybrid **29**, N-terminally substituted with a free cysteine, a new analogue **30** of hIL-8 could be obtained by *native chemical ligation*.

Furthermore, alanyl-PNA hexamers containing up to two lysines have been synthesized and subjected to structural examinations. Using temperature dependent UV-spectroscopy it could be shown that the incorporation of two

lysines not only increased the solubility of the oligomers substantially but also had strong influence on the kinetics of the duplex formation, whereas the stability of the pairing complex (defined by the T_m value) did not change. Attempts to crystallize these hexamers have not been successful up to the present.

On the basis of these results it should be possible to obtain in the future more detailed information about the structure of alanyl-PNA. Due to the poor solubility, previous NMR examinations did not give satisfying results. The increase in solubility by addition of a second lysine to alanyl-PNA will allow in future further crystallisation experiments and more promising NMR investigations.

By optimization of the native chemical ligation and supply of larger amounts of interleukine 8 derivatives with incorporated alanyl-PNA it should be possible to examine the influence of a complementary alanyl-PNA strand on the structure of the entire system and its biological activity. By variation and optimization of the sequence and the local incorporation of alanyl-PNA moieties the objective of a *molecular switch* for peptides and proteins might be reached.

The incorporation of alanyl-PNA into two different peptides or proteins might also result in the formation of noncovalent protein-protein-complexes mediated by hydrogen bonding.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Chromatographie

1. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Kontrollen und R_f -Wert-Bestimmungen wurden mit *Merck* DC Kieselgel 60 F-254 Aluminium-Folien durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm und/oder durch 5 %ige ethanolische Ninhydrinlösung und anschließender Wärmebehandlung.

2. Flash-Säulenchromatographie (SC)

Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (40-63 μ m) der Firma *Merck* bei 1.0 - 1.3 bar Überdruck durchgeführt. Die Trennung erfolgte nach dem von *Still* beschriebenen Verfahren mit 50-100 fachen Überschuss an Kieselgel.^[135] Die zu trennende Substanz wurde entweder als Lösung im Laufmittel, oder nach Aufziehen auf Kieselgel 60 der Firma *Merck* (63-200 μ m), auf die Säule aufgetragen. Die Säulendimension und das Laufmittel sind angegeben.

3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Trennungen wurden mittels *reversed-phase*-Chromatographie an Geräten der Firma *Pharmacia Biotech* (*Äkta Basic 900*) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte meist bei 214 nm, 254 nm und 280 nm. Es wurden, soweit nicht explizit anders angegeben, folgende Säulen verwendet: *Sephasil Peptide* (250 \times 4.6 mm, S-5 μ m, C-18) und *YMC-Pack ODS-A* (250 \times 4.6 mm, S-5 μ m, C-18; 250 \times 45 mm, S-5 μ m, C18 und 100 \times 2 mm, S-5 μ m, C-18 für die LC-Ms).

Die analytischen Proben wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min, die semipräparativen mit 10 ml/min und die LC-Ms mit 300 μ l/min eluiert. Als

Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser und einem 90 %igen Acetonitril-Wassergemisch mit jeweils 0.1 % TFA im Gradientenbetrieb. Bei den LC-Ms Untersuchungen wurde Ameisensäure statt Trifluoressigsäure zugegeben, da so Ionenpaarbildung besser unterdrückt werden kann. Die Gradienten sind angegeben.

4. Reverse Phase Chromatographie (RP)

Für die RP-Chromatographie wurde RP-Kieselgel der Firma YMC (ODS-A, 60 Å, S-50 µm, C18) verwendet. Die zu reinigende Substanz wurde in Wasser gelöst bzw. suspendiert auf die mit Wasser equilibrierte Chromatographiesäule aufgegeben. Der Anteil an Methanol wurde nach den entsprechenden Eluierungsbedingungen schrittweise erhöht. Die Detektion erfolgte durch DC Kontrolle.

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Die Messungen wurden mit einem *Jasco* J500A Spektralphotometer mit folgenden Messparametern durchgeführt:

Data Mode: CD, *band width*: 1.0 nm, *slit width*: auto, *sensitivity*: 5 mdeg, *step resolution*: 0.1 nm, *scan speed*: 50 nm/min, Küvettenlänge: 1 cm, 5 Akkumulationen. Die PNA-Konzentrationen sind jeweils in der optischen Dichte bei 20 °C bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm angegeben. Die Lösungsmittel sind jeweils angegeben.

Hyperchromizität

Die Hyperchromizität (% H) bei einer Temperatur errechnet sich gemäß folgender Formel:

$$\% H(T) = \frac{(A(T) - A_0) \cdot 100}{A_0}$$

A_0 stellt den kleinsten ermittelten Absorptionswert einer Schmelzkurve dar. Die Temperaturprogramme für die temperaturabhängigen UV-Messungen sind jeweils angegeben.

Infrarotspektroskopie

IR-Spektren wurden an einem Gerät 1600 FTIR der Firma *Perkin-Elmer* gemessen.

Lösungsmittel

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Absolutes Dimethylformamid, Methanol und Tetrahydrofuran wurden puriss. abs. von Fluka bezogen, die restlichen Lösungsmittel nach den gängigen Verfahren getrocknet.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden in Kolben mittels Stickstoff gefroren und an einer *Christ* Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Kleine Volumina wurden in *Eppendorf*-Caps an einer *Christ* RVC-2-18 Zentrifuge gefriergetrocknet.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden durch Laser-Desorption (MALDI) oder *electrospray ionisation* (ESI) erhalten. HPLC-ESI-MS Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System *Flux-Instruments Rheos 4000* (Säulenmaterial *YMC-Pack ODS-A* (100 × 2 mm, S-5 μm, C-18) durchgeführt. Die ESI-Spektren werden in der Form „**X**(**Y**)[**M** + **Z**]“ angegeben, wobei die Molekülmasse **X** mit der Intensität **Y** % detektiert wurde. **X** entspricht dabei dem Anlagerungsprodukt aus dem untersuchten Molekül mit dem Molekulargewicht **M** und dem Kation **Z**⁺.

NMR-Spektroskopie

Die NMR Spektren wurden soweit nicht anders angegeben an einem *Bruker* AMX 300 gemessen.

Optische Drehung

Die Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin Elmer* gemessen. Der Drehwert wurde über jeweils 15 Messungen gemittelt. Der spezifische Drehwert errechnet sich nach folgender Formel:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

Hierbei sind α der gemessene Drehwert bei 20 °C und der Wellenlänge D (Natriumlinie 589 nm), c die Konzentration in [g/100 ml] und l die Küvettenlänge in [dm].

Peptidsynthese

Die Peptidsynthese wurde manuell ausgeführt. Die verwendeten DMF puriss. und DCM puriss. wurden vor Gebrauch mit Bromphenolblau auf die Anwesenheit von Dimethylamin und anderen Aminen getestet. Alanyl-PNA-Synthesen wurden in kleinen Glassäulen durchgeführt. Peptidsynthesen mit proteinogenen Aminosäuren in Einmalspritzen der Firma *Becton-Dickinson*. Die hierfür benötigten PE-Fritten stammten von der Firma *Vetter Labortechnik*.

Reagenzien

Die verwendeten Harze wurden von *Novabiochem* bezogen. Aminosäurederivate wurden von den Firmen *Bachem* und *Novabiochem* bezogen und bei -20 °C aufbewahrt. Alle anderen Reagenzien stammen von den Firmen *Merck*, *Fluka* und *Avocado* und entsprachen, soweit nicht anders angegeben, der Qualität zur 'Synthese'.

Reaktionen

Sämtliche luft- oder hydrolyseempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Stickstoff/Argonatmosphäre durchgeführt.

Schmelzkurven

Die Schmelzkurven wurden mit einem UV/Vis-Spektrometer Lambda 10 der Firma *Perkin-Elmer* bzw, einem UV/Vis-Spektrometer V-550 der Firma *JASCO* aufgenommen. Soweit nicht anders angegeben betrug die Wellenlänge 280 nm. Die Schmelztemperatur T_m einer Peptidnucleinsäure ist durch die halbmaximale Zunahme der Hyperchromizität definiert. Bei dem Gerät der Firma *Perkin-Elmer* wurde die Temperatur mit einem Messfühler in Lösung gemessen, bei dem Gerät der Firma *JASCO* durch einen Messfühler im Heizblock.

Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer *Büchi* Schmelzpunktapparatur bestimmt und sind nicht korrigiert.

6.2 Synthesen

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Kupplung der ersten Aminosäure an das MBHA-Harz

1.00 g MBHA-Polystyrolharz (Belegungsdichte 0.66 mmol/g, 1 % DVB, 200-400 mesh) wurden in eine 20 ml Spritze mit PE-Fritte eingewogen und in 15 ml DCM suspendiert. Nach 1 h wurden 2.00 mmol eines mit 642 mg TBTU (2.00 mmol), 306 mg HOBt·H₂O (2.00 mmol) und 684 µl DIPEA (4.00 mmol) präaktivierten N-terminal Boc-geschützten Aminosäurederivats in 10 mL DMF zugegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Durch mehrmalige Zugabe von DIPEA wurde der pH-Wert bei 8.0 - 8.5 gehalten, bis keine pH-Wert-Änderung mehr beobachtet wurde. Nach fünfmaligen Spülen mit jeweils DMF, DCM, IPA, DCM und DMF wurde die Reaktion mit gleicher Ansatzgröße wiederholt (Doppelkupplung). Nach abschließendem Spülen mit DMF, DCM, IPA und DCM wurde im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Belegungsdichte gravimetrisch bestimmt:

$$n = \frac{m_{\text{ges}} - m_{\text{Harz}}}{(M_{\text{Xaa}} - M_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot m_{\text{Harz}}} \cdot 1000$$

mit:

n	Belegungsdichte bezogen auf eingesetztes Harz [mmol/g]
m _{ges}	Gesamtmasse des Polymers nach der Ankupplung [g]
m _{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]
M _{Xaa}	Molmasse der Boc geschützten Aminosäure [g/mol]
M _{H₂O}	Molmasse von Wasser [18.2 g/mol]

AAV2: Kupplung der ersten Aminosäure an das Merrifield**Hydroxylharz**

Das Hydroxymethylharz (Belegungsdichte 0.66 mmol/g, 1 % DVB, 200-400 mesh, 1 Äquivalent) wurde in einem Rundkolben suspendiert. In einem zweiten Kolben wurden 1.5 Äquivalente der Aminosäure in DMF zusammen mit 1.5 Äquivalenten HOBt gelöst. 1 Äquivalent DIC wurden zu der Aminosäure zugetropft, daraufhin 0.1 Äquivalente DMAP zugegeben. Nach 3 h auf einem mechanischen Schüttler unter Feuchtigkeitsausschluss wurden 2 Äquivalente Essigsäureanhydrid/Pyridin zugegeben und für weitere 30 min bewegt. Nach Filtration und Waschen mit DMF, DCM, IPA und DCM wurde das Harz im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Beladungsdichte gravimetrisch bestimmt.

AAV3: Festphasensynthesen der Alanyl-PNA

Die Festphasensynthese nach Merrifield der Alanyl-PNAs wurde (wenn nicht anders angegeben) mit *N*-Boc-D-Lys(Z)-MBHA-PS-Harz in kleinen Glassäulen durchgeführt. Je Kupplungszyklus wurden 5 Äquivalente eines *N*-terminalen Boc-geschützten Aminosäurederivates verwendet und für die Bildung des Aktivesters mit 4.5 Äquivalente HATU und 5 Äquivalente HOAt versetzt.

Nach vollständigem Lösen der Reagenzien in DMF wurden für die Aktivierung 10 Äquivalente DIPEA zugegeben. Nach 20 min Reaktionszeit wurde 1 Äquivalente DIPEA zusätzlich zugegeben.

Die Kupplungen erfolgten nach folgendem Schema:

Entschützen

Peptid am Harz wird mit TFA/DCM/*m*-Kresol 60:35:5 gespült und anschließend zweimalig mit der derselben Abspaltungslösung für jeweils 8 min zur Reaktion gebracht.

Waschen und Entstapeln

Fünfmaliges Spülen des Harzes mit jeweils 2 mL Pyridin und Trockenblasen mit Stickstoff.

Kuppeln

Das *N*-Boc-Aminosäurederivat wurde zusammen mit HATU trocken zum Harz gegeben und mit 200-400 μ L DMF bedeckt. Anschließend wurde die entsprechende Menge HOAt (0.1 M in DMF) zugegeben und nach 15 minütigem Schütteln DIPEA zugegeben. Nach weiteren 20 min wurden weitere 20 % DIPEA extra zugegeben. Bei den Guaninbausteinen wurden, soweit nicht anders angegeben, Doppelkupplungen durchgeführt. Die Kupplungszeiten betragen für die AlaG-Derivate 2h und für die AlaC-Derivate 1h.

Capping

Nach Spülen mit DMF, DCM, IPA und DCM wurden 2 mL Cappinglösung (Ac_2O /DIPEA in DMF, 50 Äquivalente/50 Äquivalente bzgl. Beladung). zugegeben und die Suspension für 15 min geschüttelt.

Waschen

Das Harz wurde mit DMF, DCM, IPA und DCM gewaschen.

Trocknen

Bei Darstellung eines Alanyl-PNA-Hybrides wurde das Harz nach dem letzten Spülschritt über Nacht im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Das trockene Harz wurde dann weiterverwendet.

Abspalten vom Harz

Das getrocknete Harz wurde bei Anwesenheit einer Formyl-Schutzgruppe des Tryptophans bei 0°C für 2 h mit 20 %iger Piperidinlösung behandelt, anschließend filtriert und mit DMF, DCM, IPA und DCM gewaschen und erneut mind. 6 h im Vakuum getrocknet.

Das entschützte und über P_2O_5 getrocknete Harz wurde in einem Kolben bei -5 °C inkubiert, nach 10 min erfolgte die Zugabe von *m*-Kresol (0.1 ml pro g Harz), nach weiteren 10 min die Zugabe von TFA (0.8 mL pro g

Harz), nach weiteren 10 min die vorsichtige Zugabe von TFSMA (0.1 ml pro g Harz). Nach 15 min wurde die Kühlung entfernt und die Reaktionslösung für 2 h gerührt. Die erfolgreiche Abspaltung konnte an einer schwarzgrünen Abspalllösung beobachtet werden.

Bei Verwendung der Tritylschutzgruppe für das Cystein wurden leicht reduktive Abspaltbedingungen eingehalten. 100 mg des getrockneten Harzes wurden in einem Rundkolben bei 0° mit 200 µL Thioanisol und 100 µL EDT versetzt. Nach Zugabe von 2 ml TFA wurde für 10 min gerührt. 200 µL TFSMA wurden unter Rühren langsam zugetropft und nach 30 min das Kältebad entfernt. Nach weiteren 90 min wurde wie unten beschrieben weiter aufgearbeitet.

Die Abspalllösung wurde vom Harz abfiltriert und das Harz dreifach mit jeweils 2 mL reiner TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum eingeengt und die PNA mit 5-20 ml frisch destilliertem eisgekühlten Ether ausgefällt, zentrifugiert und die Diethyletherlösung abgenommen. Nach dreifachem Waschen mit Diethylether wurde das Rohprodukt in 2 ml dest. Wasser aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC an C18 Säule gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das org. Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand lyophilisiert.

AAV4: Allgemeine Festphasensynthese

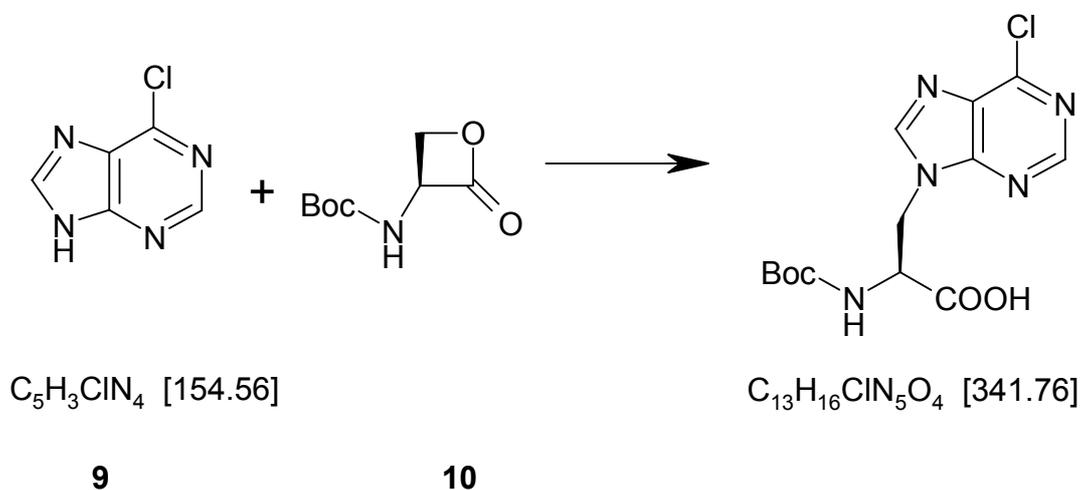
Bei Aminosäurederivaten, bei denen es sich nicht um Nucleoaminosäuren handelte, wurde obiges Protokoll in leicht abgewandelter Form verwendet. Der letzte Spülschritt vor der Kupplung erfolgte mit 10 %iger Triethylaminlösung in DMF (2 mal 15 min) statt mit Pyridin. Die Aktivierung erfolgte vor Zugabe des Derivats zum Harz mit Phosphoniumsalzen HBTU/HOBt/DIPEA, bzw. HCTU/HOAt/DIPEA, bzw. HATU/HOAt/DIPEA (4.5 Äquivalente/5 Äquivalente/10 Äquivalente), nach 20 minütiger Reaktionszeit erfolgte die

Zugabe von weiteren 20 % DIPEA. Die Kupplungszeiten betragen 1 h, Doppelkupplungen erfolgten (so nicht anders angegeben) nur bei negativem Kaiser-Test.

Bei Alanyl-PNA-Chimären wurde der Sequenzteil mit natürlichen Aminosäuren in Spritzen durchgeführt.

6.2.2 Synthese von Alanyl-Nucleoaminosäuren

(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(6-chloro-9-puriny)-alanin



Es wurden 1.33 g L-Serinlacton (7.2 mmol) **10** mit 1.64 g 6-Chlorpurin (10.6 mmol) **9** und 2.00 g K_2CO_3 (14.2 mmol) über Nacht am Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 25 ml abs. DMSO wurde für 6 h gerührt und nach DC-Kontrolle auf Anwesenheit von Serinlacton das DMSO im Vakuum entfernt. Das erhaltene glasartige Produkt wurde mehrfach mit Wasser, Essigsäure und Toluol koevaporiert.

Nach FC (100g, Essigester/Methanol, 8/2, je 500ml 1 % AcOH) und Kodestillation der Essigsäure wurden 1.25 g Produkt (3.65 mmol, 51 % d. Th.) erhalten.

Analytische Daten

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0.55$

Schmp.: >275 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3378, 2979, 2362, 1681, 1599, 1569, 1518, 1443, 1402, 1343, 1252, 1197, 1165, 1062, 1019, 949, 857, 778, 637, 568

$[\alpha]_{589}^{20}$ = - 40.3 (0.070, MeOH)

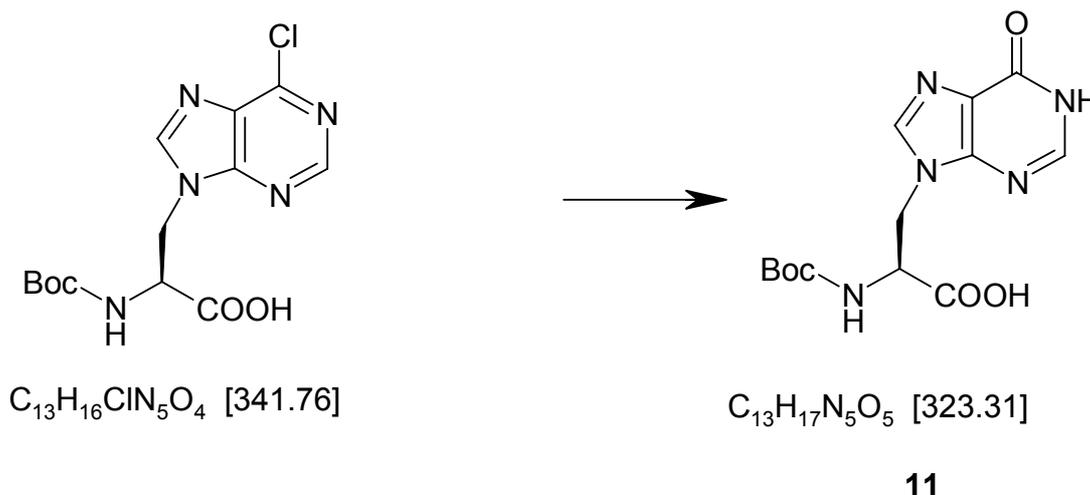
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d⁶)

δ = 1.22 (s, 9 H, H_{Boc}), 4.41 (m, 2 H, H_{C α} & C _{β}), 4.71 (dd, 1 H, H_{C β} ; J = 15 Hz), 7.56 (s, 1 H, H_{C8}), 7.79 (s, 1 H, H_{C2})

HPLC-Gradient: 5 % auf 60 % innerhalb von 30 min. (Sephasil-Peptide)

Retentionszeit: 17.8 min

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(9-hypoxanthyl)-alanin **11**



Es wurden 500 mg (1.46 mmol) in 20 ml 1 N NaOH gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von konz. HCl (bis pH 5) wurde das Wasser und überschüssiges HCl im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde in 5 g Kieselgel aufgenommen und eine FC (50 g Kieselgel, Essigester/Methanol, 8/2, je 500 ml 1 % AcOH Stufengradient) durchgeführt. Das Produkt wurde mit Toluol kdestilliert um vorhandene Essigsäure zu entfernen. Es wurden 230 mg eines weißlichen Pulvers **11** erhalten (0.71 mmol, 48 % d. Th.).

Analytische Daten

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0,18$

Schmp.: $>275\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3424, 2977, 2925, 2362, 1697, 1588, 1520, 1368, 1215, 1164, 1059, 856, 790, 648, 611$

$[\alpha]_{589}^{20} = -28.6$ (0.052, MeOH)

ESI-MS m/z (%): 669.7 (100) $[2M + Na]^+$, 346.6 (21) $[M + Na]^+$, 992.4 (18) $[3M + Na]^+$

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

$\delta = 1.22$ (s, 9 H, H_{Boc}), 3,8 - 3,95 (m, 2 H, $\text{H}_{\text{C}\alpha}$ & $\text{C}\beta$), 4.4 (dd, 1 H, $\text{H}_{\text{C}\beta}$; $J = 15$ Hz), 5.92 (s, 1 H, H_{NH}), 7.82 (s, 1 H, $\text{H}_{\text{C}8}$), 7.95 (s, 1 H, $\text{H}_{\text{C}2}$)

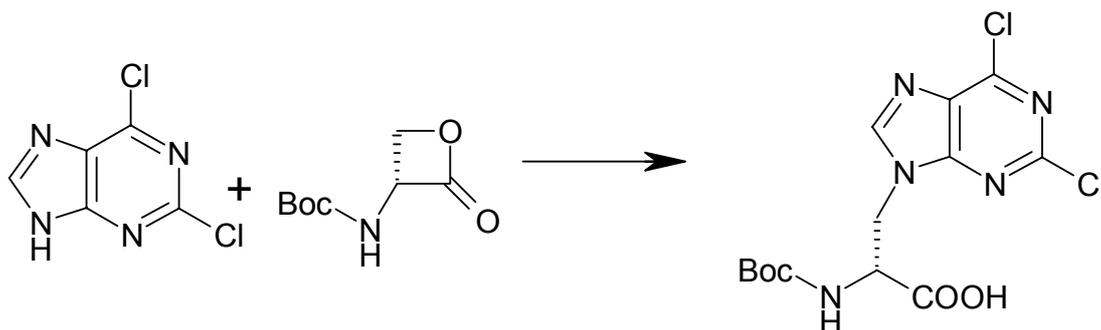
$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)

$\delta = 28.0$ ($\text{C}_{\text{CH}(\text{Boc})}$), 44.4 ($\text{C}\beta$), C 53.8 ($\text{C}\alpha$), 78.2 ($\text{C}_{\text{C}(\text{Boc})}$), 123.8 (C_5), 140.6 (C_8), 145.3 ($\text{C}_{\text{CO}(\text{Boc})}$), 148.6 (C_4), 155.0 (C_2), 156.6 (C_6), 171.3 (C_{COOH})

HPLC-Gradient: 5 % auf 60 % innerhalb von 30 min. (Sephasil-Peptide)

Retentionszeit: 11.7 min

Enantiomerenüberschuss: 87 % ee.

(R)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(2,6-dichloro-9-purinyl)-alanin**12****13**

In zwei Kolben wurden 1.50 g 2,6-Dichlorpurin **12** (7.9 mmol, 1.2 Äquivalente) zusammen mit 1.04 g K_2CO_3 (7.5 mmol, 1.1 Äquivalente) und 1.30 g D-Serinlacton (6.9 mmol, 1.0 Äquivalente) über Nacht im Vakuum getrocknet. Die Nucleobase wurde in 15 ml DMSO abs. gelöst und für 15 min. gerührt. Das in 8 ml DMSO gelöste Serinlacton wurde bei RT in 15 min. zutropft und die Lösung 4,5 h gerührt. Nach Zugabe von 429 μl AcOH wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch FC An Kieselgel (l 25 cm, Ø 7cm, Eluent Essigester/Methanol 9:1, Gradient 1 % Essigsäure pro 500 mL). Es wurden 630 mg (1.7 mmol, 24.6 % d. Th.) Produkt **13** erhalten.

Analytische Daten

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0,55$

Schmp.: $>275\text{ }^\circ\text{C}$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3393, 2980, 2933, 2362, 1698, 1596, 1520, 1356, 1234, 1161, 1061, 1023, 961, 882, 786$

$[\alpha]_{589}^{20} = -28.6$ (0.25, MeOH)

ESI-MS m/z (%): 376 (36) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 320 (100) $[\text{M} - \text{tBu} + 2\text{H}]^+$

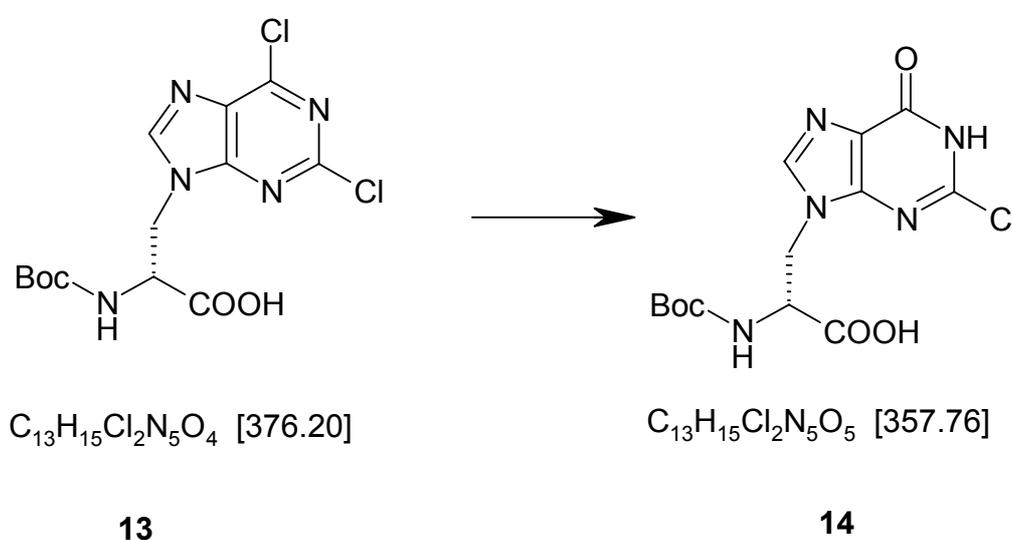
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)

$\delta = 1.20$ (s, 9 H, H_{Boc}), 4.03-4.30 (m, 2 H, $H_{\text{C}\alpha}$ & $\text{C}\beta$), 4.69 (m, 1 H, $H_{\text{C}\beta}$; $J = 15$ Hz), 8.57 (s, 1 H, $H_{\text{C}8}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d^6)

$\delta = 27.8$ ($\text{C}_{\text{CH}(\text{Boc})}$), 46.8 ($\text{C}\beta$), $\text{C} 55.0$ ($\text{C}\alpha$), 77.7 ($\text{C}_{\text{C}(\text{Boc})}$), 130.1 (C_5), 149.0 (C_8), 150.6 ($\text{C}_{\text{CO}(\text{Boc})}$), 154.1 (C_4), 154.1 (C_2), 154.6 (C_6), 171.3

(S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2-chloro-6-oxo-9-puriny)-alanin 14



Es wurden 420 mg (R)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2,6-dichloro-9-puriny)-alanin (1.12 mmol) **13** in 10 ml 1 N LiOH gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von 10 ml 1 N HCl wurde das Wasser und überschüssiges HCl im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde in Kieselgel aufgenommen und eine FC (50 g Kieselgel, Essigester/Methanol/AcOH, 80:20:0.1) durchgeführt. Das Produkt wurde mit Toluol kdestilliert und anschließend an einer RP-Säule entsalzt. Es wurden 145 mg eines weißlichen Pulvers (S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2-chloro-6-oxo-9-puriny)-alanin **14** (0.41 mmol, 36 % d. Th.) erhalten.

Analytische Daten

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0.24$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3442, 2924, 2854, 2363, 1737, 1650, 1458, 587$

$[\alpha]_{589}^{20} = -3.8$ (0.053, MeOH)

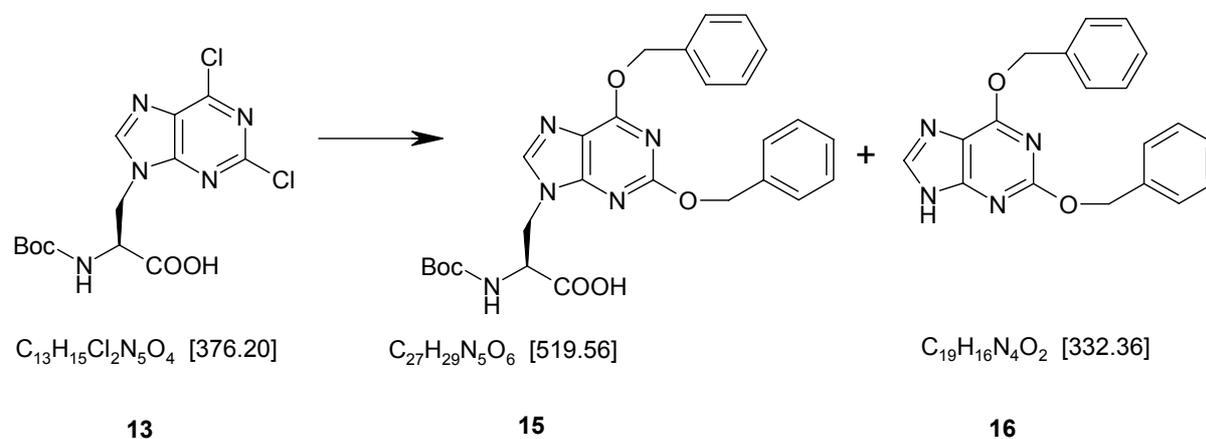
ESI-MS m/z (%): 358.1 (100) $[M + H]^+$, 714.9 (21) $[2M + NH]^+$

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

$\delta = 1.22$ (s, 9 H, H_{Boc}), 3.42 (m, 2 H, $H_{C\alpha}$ & $C\beta$), 4.65 (m, 1 H, $H_{C\beta}$), 7.04 (s, 1 H, H_{NH}), 8.49 (s, 1 H, H_{C8})

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

$\delta = 28.3$ ($C_{\text{CH(Boc)}}$), 48.6 (C_{β}), C 53.8 (C_{α}), 77.8 ($C_{\text{C(Boc)}}$), 122.6 (C_5), 138.9 (C_8), 150.9 ($C_{\text{CO(Boc)}}$), 155.0, 172.7 (C_{COOH})

(S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2,6-dibenzyl-9-puriny)-alanin

Es wurden 525 mg Na (22,80 mmol, 13.7 Äquivalente) in 30 ml frisch destillierten Benzylalkohol gelöst, anschließend wurden 628 mg (R)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2,6-dichloro-9-puriny)-alanin **13** (1.66 mmol, 1.0 Äquivalente) zu der Lösung gegeben und für 4 h bei 80° C gerührt. Die Lösung wurde mit 1 N HCl neutralisiert, überschüssiger Benzylalkohol im Vakuum entfernt

Die Reinigung erfolgte durch FC An Kieselgel (l 25 cm, Ø 3cm, Eluent Essigester/Methanol 9:1, Gradient 1 % Essigsäure pro 500 mL). Es wurden 362 mg (1.1 mmol, 66.3 % d. Th.) 2,6-Bis-benzyloxy-9H-purine **16** und 95 mg (S)-*N-tert*-Butoxycarbonyl-β-(2,6-dibenzyl-9-puriny)-alanin **15** (0.18 mmol, 10.8 % d. Th) erhalten

Analytische Daten 2,6-Bis-benzyloxy-9H-purine **16**

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0,60$

Schmp.: 125 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2948, 2783, 2554, 1719, 1621, 1590, 1498, 1394, 1354, 1266, 1215, 1115, 958, 740, 696$

ESI-MS m/z (%): 333.5 (20) $[M + H]^+$, 355.6 (14) $[M + Na]^+$, 665.2 (74) $[2 M + H]^+$, 687.3 (51) $[2 M + Na]^+$, 996.8 (100) $[3 M + H]^+$, 1018.7 (48) $[3 M + Na]^+$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

$\delta = 5.40$ (s, 2 H, CH₂), 5.58 (s, 2 H, CH₂), 7.3-7.6 (m, 10 H, CH_{arom}), 8.18 (s, 1 H, H_{C8}), 13.20 (s, 1 H, NH)

¹³C-NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

$\delta = 68.37$ (CH₂), 68.68 (CH₂), 127.73 (C_{benzyl}), 127.83 (C_{benzyl}), 128.05 (C_{benzyl}), 128.23 (C_{benzyl}), 128.28 (C_{benzyl}), 128.36 (C_{benzyl}), 128.50 (C_{benzyl}), 136.17, 136.87, 160.07

Analytische Daten *N-tert*-Butoxycarbonyl-β-(2,6-dibenzyl-9-puriny)-alanin **15**

DC (Essigester/Methanol/Wasser/Essigsäure 10:1:1:0.5, ges. NaCl Ninhydrin):

$R_f = 0.73$

Schmp.: 120 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3422, 2926, 2363, 1706, 1595, 1403, 1349, 1239, 1163, 1060, 791, 735, 698$

ESI-MS m/z (%): 520.5 (100) [M + H]⁺, 542.5 (74) [M Na]⁺, 1039.1 (48) [2 M + H]⁺

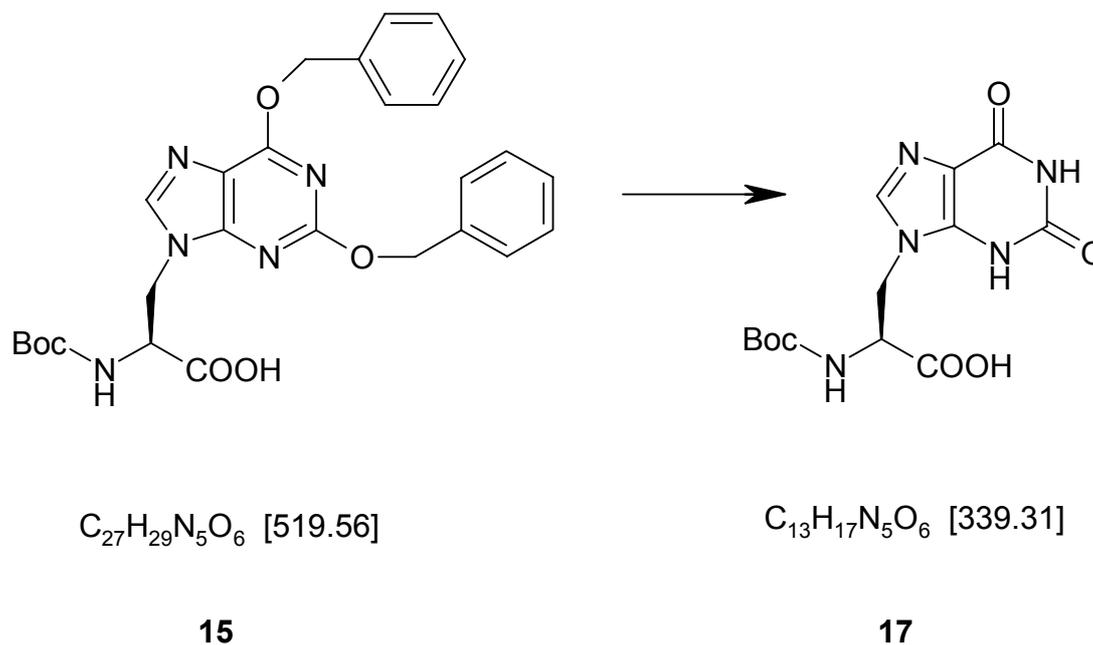
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d⁶)

δ = 1.20 (s, 9 H, H_{Boc}), 4.20-4.44 (m, 2 H, H_{Cα} & C_β), 4.60 (m, 1 H, H_{Cβ}), 5.40 (s, 2 H, H_{CH2}), 5.58 (s, 2 H, H_{CH2}), 6.64 (s, 1 H, NH), 7.10 - 7.50 (m, 10 H, H_{benzyl}), 8.02 (s, 1 H, H_{C8})

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d⁶), gemessen an INOVA-600

δ = 27.91, 65.19, 67.74, 68.61, 77.95, 116.18, 127.23, 127.55, 127.83, 128.02, 128.12, 128.16, 128.21, 128.35, 128.37, 128.80, 136.19, 136.25, 136.66, 136.69, 136.83, 142.76, 142.80, 154.04, 155.53, 159.95, 160.39, 171.86

(S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-β-(9-xanthyl)-alanin **17**



Es wurden 13 mg Pd/C (10 %ig) in 0.3 ml abs. MeOH suspendiert, der Kolben kurz evakuiert, mit Wasserstoff begast und für 30 min gerührt. Es wurden 13 mg *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-β-(2,6-dibenzyl-9-purinyloxy)-alanin **15** (0.025 mmol) in 0.5 ml MeOH abs. und 0.2 ml AcOH gelöst und zum Katalysator gegeben. Nach 4 h unter Wasserstoffatmosphäre konnte kein Edukt mehr DC-analytisch detektiert werden. Die Lösung wurde mit einem Mikrofilter filtriert und drei mal mit

MeOH nachgewaschen. Nach Kodestillation mit Toluol anschließender Gefriertrocknung aus Wasser wurden 4,5 mg Produkt (S)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(9-xanthyl)-alanin **17** (0.013 mmol, 49.5 % d. Th.) erhalten.

Analytische Daten

DC (Isopropanol/Wasser/Essigsäure, ges. NaCl 5:2:1, Ninhydrin): $R_f = 0.10$

ESI-MS m/z (%): 340 (100) $[M + H]^+$, 678.8 (24) $[2M + H]^+$, 284.1 (90) [?]

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d^6), Gerät INOVA 500

$\delta = 27.84$ ($C_{CH(Boc)}$), 44.36 (C_β), C 52.39 (C_α), 78.49 ($C_{C(Boc)}$), 115.37 (C5), 137.32 (C8), 140.45 (C4), 150.69 (C2), 154.94 (C6), 157.77 ($C_{C(CO)Boc}$), 170.74 (C_{COOH})

HPLC-Gradient: 5 % auf 25 % innerhalb von 30 min. (Jsphere ODS/H80 25 cm)

Retentionszeit: 17.4 min.

Bei Koinjektion von **16** unter den gleichen Bedingungen mit (R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(7-xanthyl)-alanin werden zwei Peaks erhalten, 17.3 min für **16**, und 20.28 min für (R)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(7-xanthyl)-alanin.

6.2.3 Synthese von Alanyl-PNA Peptiden und deren Hybride

6.2.3.1 Alanyl PNA

H-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-OH **6**

$C_{45}H_{50}N_{30}O_{13}$, [1219.09], exakte Masse 1218

Die Synthese erfolgte nach AAV2 und AAV3 mit 53 mg Harz (0.608 mmol/g).

Auf Doppelkupplungen der Guaninbausteine wurde verzichtet.

HPLC (Gradient: 5 % B - 15% B in 30 min, $\lambda = 280$ min) $t_R = 20.2$ min

ESI-MS m/z (%): 1219.4 (72) $[M + H]^+$, 610.6 (100) $[M + 2H]^{2+}$, 1217.7 (100) $[M - H]^-$

H-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ 7

C₅₁H₆₃N₃₃O₁₃, [1346,28], exakte Masse 1345

Die Synthese erfolgte nach AAV1 und AAV3 mit 50 mg Harz (0.58 mmol/g).
Auf Doppelkupplungen wurde verzichtet.

HPLC (Gradient: 5 % B – 15 % B in 30 min, $\lambda = 280$ min) $t_R = 22.7$ min

ESI-MS m/z (%): 674.3 (100) $[M + 2H]^{2+}$, 685.3 (84) $[M + H + Na]^{2+}$, 696.2 (64) $[M + 2 Na]^{2+}$

Lys-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ 8

C₅₇H₇₅N₃₅O₁₄, [1474,46], exakte Masse 1473

Die Synthese erfolgte nach AAV1 und AAV3 mit 50 mg Harz (0.58 mmol/g).
Der N-terminale Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH Baustein wurde doppelt gekuppelt.

HPLC (Gradient: 5 % B - 18% B in 30 min, $\lambda = 280$ min) $t_R = 20.1$ min

ESI-MS m/z (%): 738.2 (100) $[M + 2H]^{2+}$, 749.3 (44) $[M + H + Na]^{2+}$

H-(AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG)-Lys-NH₂ 21

C₄₄H₅₅N₂₉O₁₁, [1166.12], exakte Masse 1165

Die Synthese erfolgte nach AAV1 und AAV3 mit 57 mg Harz (0.58 mmol/g).
Die Guaninbausteine wurden doppelt gekuppelt.

HPLC (Gradient: 5% B – 15% B in 30 min, $\lambda = 280$ min) $t_R = 21.38$ min

ESI-MS m/z (%): 584.4 (100) $[M + H]^+$, 1166.6 (52) $[M + 2H]^{2+}$

H-(AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Lys-NH₂ 23

C₄₃H₅₅N₂₇O₁₁, [1126.09], exakte Masse 1125

Die Synthese erfolgte nach AAV1 und AAV3 mit 48 mg Harz (0.58 mmol/g).

Die Guaninbausteine wurden doppelt gekuppelt.

HPLC (Gradient: 5% B – 25% B in 30 min, $\lambda = 280$ nm) $t_R = 12.4$ min

ESI-MS m/z (%): 564.5 (100) [M + H]⁺, 1126.7 (76) [M + 2H]²⁺, 1127.6 [M + 2H]²⁺

6.2.3.2 Alanyl-PNA-Peptid Hybride

H-(AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC)-D-Phe-Pro-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-Phe-NH₂ 20

C₁₁₈H₁₆₈N₄₂O₂₃, [2542.92], exakte Masse 2540

Die Synthese erfolgte nach AAV1, AAV3 und AAV4 mit 88 mg Harz (0.61 mmol/g). Doppelkupplungen fanden nicht statt, Ornithin war Z-geschützt.

HPLC (Gradient: 20% B – 40% B in 30 min, $\lambda = 280$ min,) (YMC-Säule: YMC-Pack ODS 250 × 4,5 mm, 5 μ m, Durchflussgeschwindigkeit 1 mL/min) $t_R = 12.4$ min

ESI-MS m/z (%): 848.6 (100) [M + 3 H]³⁺, 636.9 (84) [M + 4 H]⁴⁺, 1272.4 (48) [M + 2 H]²⁺

Ac-Arg-Val-Val-(AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser-OH 25

C₇₆H₁₀₉N₃₉O₂₄, [1952.96], exakte Masse 1951

Die Synthese erfolgte nach AAV3 und AAV4 mit 103 mg Pam-Ser(OBzl)-NHBoc-Harz (Novabiochem) (0.58 mmol/g). Als geschützte Bausteine wurden Boc-Glu(OBzl)-OH und Boc-Arg(Mts)-OH eingesetzt. Alle natürlichen Aminosäuren wurden mit HBTU/HOBt doppelgekuppelt. Die Kupplungen aller Nucleoaminosäuren wurden mit HATU/HOAt durchgeführt, nur die Guaninbausteine wurden doppelgekuppelt. Als *Scavenger* bei der Abspaltung diente *m*-Cresol.

HPLC (Gradient: 5% B – 25% B in 30 min, $\lambda = 280$ min,) $t_R = 19.7$ min

ESI-MS m/z (%): 978.1 (100) [M + 2H]²⁺, 989.1 (14) [M + H + Na]²⁺, 652.2.4 (8) [M + 3H]³⁺

**H₂N-Cys(Acm)-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-
AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser-OH 27**

C₁₃₁H₁₉₂N₅₄O₄₀S, [3195.39], exakte Masse 3192

Die Synthese erfolgte nach AAV3 und AAV4 mit 103 mg Pam-Ser(OBzl)-NHBoc-Harz (Novabiochem) (0.58 mmol/g). Als geschützte Bausteine wurden Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Arg(Mts)-OH, Boc-Trp(For)-OH, Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH und Boc-Cys(Acm)-OH eingesetzt. Ansonsten verlief die Synthese Analog zu **25**.

HPLC (Gradient: 20% B – 30% B in 30 min, $\lambda = 280$ min,) $t_R = 19.2$ min

ESI-MS m/z (%): 1066.1 (100) [M + 3H]³⁺, 1066.8 (48) [M + 3H]³⁺ 1598.2 (52) [M + 2H]²⁺

**H₂N-Cys(Acm)-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-Glu-
AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Ala-Glu-Asn-Ser-OH 26**

C₁₃₀H₁₈₇N₅₁O₄₂S, [3168.32], exakte Masse 3165

Die Synthese erfolgte nach AAV3 und AAV4 mit 103 mg Pam-Ser(OBzl)-NHBoc-Harz (Novabiochem) (0.58 mmol/g). Ansonsten verlief die Synthese Analog zu **25**.

HPLC (Gradient: 5% B – 80% B in 30 min, $\lambda = 280$ min,) $t_R = 14.1$ min

ESI-MS m/z (%): 1055.5 (100) [M + 3H]³⁺, 792.5 (58) [M + 4H]⁴⁺

H₂N-Cys-Leu-Asp-Pro-Lys-Glu-Asn-Trp-Val-Gln-Arg-Val-Val-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Ala-Glu-Asn-Ser-OH 29

C₁₃₀H₁₈₃N₅₅O₄₀S, [3188.32], exakte Masse 3185

Die Synthese erfolgte nach AAV3 und AAV4 mit 88 mg Pam-Ser(OBzl)-NH-Boc-Harz (*Novabiochem*) (0.58 mmol/g). Als geschützte Bausteine wurden eingesetzt Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Arg(Mts)-OH, Boc-Trp(For)-OH, Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH und Boc-Cys(Trt)-OH.

Nach der Zugabe von 20 extra Prozent DIPEA nach 20 min Reaktionszeit wurde die Kupplung bei 35°C fortgesetzt. Bei den Nucleoaminosäuren wurden nur die Guaninbausteine doppelgekuppelt. Die Aminosäuren 2 bis 4 wurden mit HBTU/HOBt aktiviert, alle weiteren mit HATU/HOAt. Bei Verwendung von *m*-Cresol als *Scavenger* wurde das Produkt nicht gefunden, deswegen wurde das *Scavenger*-System Ethandithiol/Thioanisol im Verhältnis 1:2 verwendet.

HPLC (Gradient: 20% B – 30% B in 30 min, $\lambda = 280$ nm,) $t_R = 19.2$ min

ESI-MS m/z (%): 1063.6 (100) $[M + 3H]^{3+}$, 1064.5 (33) $[M + 3H]^{3+}$ 1594.4 (25) $[M + 2H]^{2+}$

6.2.4 hIL8-Alanyl-Derivat 30

Expression des Thioesterfusionsproteins:

Mit einem pTXB1-hIL-8(1-54) Plasmid transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in Ampicillin enthaltendem LB-Medium gezüchtet, bis sie die Mid-Log Phase erreichten und die Expression wurde dann mit Isopropylthiogalactosid (IPTG, 0.4 mM) induziert. Nach 5 h bei 37° C wurden die Zellen abzentrifugiert und die Bakterien für 1 h bei 4° C in einem Puffer A

(20 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8) unter der Gegenwart von Triton X-100 (0.1%), Phenylmethylsulfonylfluorid, (20 μ M), Tris(2-carboxyethyl)-phosphine (0.7 mM) und Lysozym (15 μ g/ml) einer Lyse unterzogen. Durch Zugabe von 10 μ g/ml DNase I und MgCl₂ (5 mM) und Agitation für 1h wurde die Viskosität der Lösung verringert. Mit Ultraschallpulsen wurde die Lyse vollendet (3 \times 50 s). Das unlösliche Fusionsprotein wurde durch Zentrifugation isoliert und von den Einschlusskörpern durch wiederholte 2 stündige Behandlung mit 6 M Harnstofflösung in Puffer A bei Raumtemperatur extrahiert.

Isolierung und Reinigung des hIL-8(1-54) Thioester **31**:

Eine Säule mit Chitin *Beads* wurde bei Raumtemperatur mit dem 10fachen Volumen an Puffer A mit 2 M Harnstoff equilibriert. Der Fusionsproteinextrakt wurde mit Puffer auf eine 2.5 M Konzentration an Harnstoff verdünnt. Bei 4° C wurde die Säule gravimetrisch beladen und die aufgefangene Probe erneut aufgebracht. Nach Waschen der säule mit dem 5fachen Volumen an Puffer A mit 1.5 M Harnstoff wurde die Säule mit Puffer B (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1.5 M Harnstoff, pH 6) gewaschen, um andere nichtspezifisch gebundene *E. coli* Proteine von der Säule zu spülen.

Die Inteinspaltung wurde durch ein 3faches Volumen von Puffer B mit 0.2 M MESNA induziert. Nach 72 h bei 4° C wurde das Protein mit Puffer B von der Säule gespült und sofort tiefgefroren.

Ligation

Peptid **29** wurde zu einer Lösung des Thioesters **31** in Tris-Puffer (20 mM) mit Harnstoff (1.5, 3.0 und 6.0 M), MESNA (0.2 M) und TCEP (10 mM) gegeben,

so dass beide Peptide jeweils eine Konzentration von ca. 0.25 mM erreichen. Der pH-Wert wurde auf 8.0 eingestellt und die Lösung für 48 h geschüttelt.

Zur Reaktionskontrolle mittels SDS-Page wurden jeweils Proben nach 1 h, 3h, 24 h und 48 h entnommen. Im Anschluss wurden eine ESI-LC-MS der drei Proben durchgeführt. Das Peptid **30** wurde in der LC-MS gefunden. Auftrennungsversuche mittels semipräparativer HPLC (YMC-Pack ODS-A (250 × 45 mm, S-5 µm, C18) misslingen, es konnten nur Gemische mit dem Thioester und dem hydrolysierten Thioester erhalten werden.

HPLC (Gradient: 5 % B – 60 % B in 30 min, $\lambda = 280$ nm,) $t_R = 20.1$ min

LC-MS (Gradient 5 % B – 60 % B in 30 min), ESI-MS m/z (%):

9.25 min: (M = 3254) 815.1 (100) $[M + 4 H]^{4+}$, 1086.0 (95) $[M + 3 H]^{3+}$, 1628.7 (12) $[M + 2 H]^{2+}$

10.0 min: (M = 3318) 830.8 (88) $[M + 4 H]^{4+}$, 1106.9 (100) $[M + 3 H]^{3+}$, 1659.9 (8) $[M + 2 H]^{2+}$

10.5 min: (M = 3230) 809.0 (90) $[M + 4 H]^{4+}$, 1077.8 (100) $[M + 3 H]^{3+}$, 1616.1 (14) $[M + 2 H]^{2+}$

11.0 min: (M = 6154) 685.0 (66) $[M + 9 H]^{9+}$, 770.4 (100) $[M + 8 H]^{8+}$, 879.9 (65) $[M + 7 H]^{7+}$, 1026.2 (55) $[M + 6 H]^{6+}$, 1231.1 (35) $[M + 5 H]^{5+}$, 1538.5 (18) $[M + 4 H]^{4+}$

11.5 min: (M = 6274) 785.7 (72) $[M + 8 H]^{8+}$, 897.6 (100) $[M + 7 H]^{7+}$, 1046.9 (93) $[M + 6 H]^{6+}$, 1256.0 (35) $[M + 5 H]^{5+}$, 1569.5(18) $[M + 4 H]^{4+}$

12.4 min: (M = 9319) 719.6 (46) $[M + 13 H]^{13+}$, 778.1 (84) $[M + 12 H]^{12+}$, 848.8 (100) $[M + 11 H]^{11+}$, 933.3 (95) $[M + 10 H]^{10+}$, 1036.7 (80) $[M + 9 H]^{9+}$, 1166.2 (54) $[M + 8 H]^{8+}$, 1332.6 (35) $[M + 7 H]^{7+}$, 1554.4 (35) $[M + 6 H]^{6+}$, 1864.8 (10) $[M + 5 H]^{5+}$

6.2.5 Kristallisationsversuche

Kristallisationsversuche

Für die Kristallisation der Oligomere **6**, **7** und **8** wurden jeweils 146 Konditionen getestet. Die Konditionen entsprachen denen der von der Firma *Hampton Research*TM erhältlichen Kristallisations-Kits *Crystal Screen I*, *Crystal Screen II* und *Natrix* und sind unten aufgeführt (Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5). Die Kristallisationen wurden in der Hanging-Drop-Methode durchgeführt.

Kondition	Salt	Buffer	Precipitant
1	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2	None	None	0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3	None	None	0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
4	None	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	2.0 M Ammonium Sulfate
5	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7	None	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% v/v iso-Propanol
9	0.2 M Ammonium Acetate	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10	0.2 M Ammonium Acetate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11	None	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
12	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	30% v/v iso-Propanol
13	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% v/v Polyethylene Glycol 400
14	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	28% v/v Polyethylene Glycol 400
15	0.2 M Ammonium Sulfate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16	None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17	0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% Polyethylene Glycol 4000
18	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	20% Polyethylene Glycol 8000
19	0.2 M Ammonium Acetate	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% v/v iso-Propanol
20	0.2 M Ammonium Sulfate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	30% v/v Polyethylene Glycol 400
24	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20% v/v iso-Propanol
25	None	0.1 M Imidazole pH 6.5	1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26	0.2 M Ammonium Acetate	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	20% v/v iso-Propanol
28	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29	None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
30	0.2 M Ammonium Sulfate	None	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31	0.2 M Ammonium Sulfate	None	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32	None	None	2.0 M Ammonium Sulfate
33	None	None	4.0 M Sodium Formate
34	None	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	2.0 M Sodium Formate
35	None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate
36	None	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37	None	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38	None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39	None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	2% v/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
40	None	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	20% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
41	. None	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	10% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
42	0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	None	20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43	None	None	30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44	None	None	0.2 M Magnesium Formate
45	0.2 M Zinc Acetate dihydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46	0.2 M Calcium Acetate hydrate	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47	None	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	2.0 M Ammonium Sulfate
48	None	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
49	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	None	2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50	0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	None	15% w/v Polyethylene Glycol 8000

Tabelle 3: Bedingungen des Crystal Screens I der Firma Hampton Research.

	Salt	Buffer	Precipitant
1	2.0 M Sodium chloride	None	10% w/v PEG 6000
2	0.01 M Hexadecyltrimethylammonium Bromide	None	0.5 M Sodium Chloride, 0.01 M Magnesium Chloride hexahydrate
3	None	None	25% v/v Ethylene Glycol
4	None	None	35% v/v Dioxane
5	2.0 M Ammonium Sulfate	None	5% v/v iso-Propanol
6	None	None	1.0 M Imidazole pH 7.0
7	None	None	10% w/v Polyethylene Glycol 1000
8	1.5 M Sodium Chloride	None	10% v/v Ethanol
9	None	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	2.0 M Sodium Chloride
10	0.2 M Sodium Chloride	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v MPD
11	0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.0 M 1,6 Hexanediol
12	0.1 M Cadmium Chloride dihydrate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v Polyethylene Glycol 400
13	0.2 M Ammonium Sulfate	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
14	0.2 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	2.0 M Ammonium Sulfate
15	0.5 M Ammonium Sulfate	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
16	0.5 M Sodium Chloride	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	2% w/v Ethylene Imine Polymer
17	None	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	35% v/v tert-Butanol
18	0.01 M Ferric Chloride hexahydrate	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	10% v/v Jeffamine M-600®
19	None	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	2.5 M 1,6 Hexanediol
20	None	0.1 M MES pH 6.5	1.6 M Magnesium Sulfate heptahydrate
21	0.1 M Sodium dihydrogen phosphate mono	0.1 M MES pH 6.5	2.0 M Sodium Chloride
22	None	0.1 M MES pH 6.5	12% w/v Polyethylene Glycol 20,000
23	1.6 M Ammonium Sulfate	0.1 M MES pH 6.5	10% v/v Dioxane
24	0.05 M Cesium Chloride	0.1 M MES pH 6.5	30% v/v Jeffamine M-600®
25	0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	0.1 M MES pH 6.5	1.8 M Ammonium Sulfate
26	0.2 M Ammonium Sulfate	0.1 M MES pH 6.5	30% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 5000
27	0.01 M Zinc Sulfate heptahydrate	0.1 M MES pH 6.5	25% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
28	None	None	1.6 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 6.5
29	0.5 M Ammonium Sulfate	0.1 M HEPES pH 7.5	30% v/v MPD
30	None	0.1 M HEPES pH 7.5	10% w/v Polyethylene Glycol 6000, 5% v/v MPD
31	None	0.1 M HEPES pH 7.5	20% v/v Jeffamine M-600®
32	0.1 M Sodium Chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	1.6 M Ammonium Sulfate
33	None	0.1 M HEPES pH 7.5	2.0 M Ammonium Formate
34	0.05 M Cadmium Sulfate hydrate	0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M Sodium Acetate
35	None	0.1 M HEPES pH 7.5	70% v/v MPD
36	None	0.1 M HEPES pH 7.5	4.3 M Sodium Chloride
37	None	0.1 M HEPES pH 7.5	10% w/v Polyethylene Glycol 8000, 8% v/v Ethylene Glycol
38	None	0.1 M HEPES pH 7.5	20% w/v Polyethylene Glycol 10,000
39	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	0.1 M TRIS pH 8.5	3.4 M 1,6 Hexanediol
40	None	0.1 M TRIS pH 8.5	25% v/v tert-Butanol
41	0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	0.1 M TRIS pH 8.5	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
42	1.5 M Ammonium Sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	12% v/v Glycerol anhydrous
43	0.2 M mono Ammonium dihydrogen Phosphate	0.1 M TRIS pH 8.5	50% v/v MPD
44	None	0.1 M TRIS pH 8.5	20% v/v Ethanol
45	0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	0.1 M TRIS pH 8.5	20% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000
46	0.1 M Sodium Chloride	0.1 M Bicine pH 9.0	20% w/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
47	None	0.1 M Bicine pH 9.0	2.0 M Magnesium Chloride hexahydrate
48	2% v/v Dioxane	0.1 M Bicine pH 9.0	10% w/v Polyethylene Glycol 20,000

Tabelle 4: Bedingungen des Crystal Screens II der Firma Hampton Research.

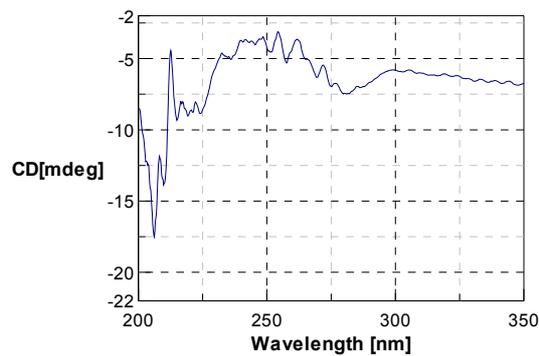
	Salt	Buffer	Precipitant
1	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M MES pH 5.6	2.0 M Lithium Sulfate monohydrate
2	0.01 M Magnesium Acetate	0.05 M MES pH 5.6	2.5 M Ammonium Sulfate
3	0.1 M Magnesium acetate	0.05 M MES pH 5.6	20% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
4	0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Sulfate	0.05 M MES pH 5.6	10% v/v Polyethylene Glycol 400
5	0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M MES pH 5.6	5% w/v Polyethylene Glycol 8000
6	0.1 M Ammonium Sulfate, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M MES pH 5.6	20% w/v Polyethylene Glycol 8000
7	0.02 M Magnesium Chloride	0.05 M MES pH 6.0	15% v/v iso-Propanol
8	0.1 M Ammonium Acetate, 0.005 M Mg Sulfate	0.05 M MES pH 6.0	0.6 M Sodium Chloride
9	0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M MES pH 6.0	10% v/v Polyethylene Glycol 400
10	0.005 M Magnesium Sulfate	0.05 M MES pH 6.0	5% w/v Polyethylene Glycol 4000
11	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
12	0.01 M Magnesium Sulfate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	1.8 M Lithium Sulfate monohydrate
13	0.015 M Magnesium Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	1.7 M Ammonium Sulfate
14	0.1 M Potassium Chloride, 0.025 M Mg Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	15% v/v iso-Propanol
15	0.04 M Magnesium Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	5% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
16	0.04 M Magnesium Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
17	0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	10% w/v Polyethylene Glycol 4000
18	0.01 M Magnesium Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	1.3 M Lithium Sulfate monohydrate
19	0.01 M Magnesium Sulfate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	2.0 M Ammonium Sulfate
20	0.1 M Ammonium Acetate, 0.015 M Mg Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	10% v/v iso-Propanol
21	0.2 M Potassium Chloride, 0.005 M Mg Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	10% w/v 1,6 Hexanediol
22	0.08 M Magnesium Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15% v/v Polyethylene Glycol 400
23	0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	10% w/v Polyethylene Glycol 4000
24	0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Ca Chloride	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	10% w/v Polyethylene Glycol 4000
25	0.08 M Magnesium Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
26	0.2 M Potassium Chloride, 0.1 M Mg Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	10% w/v Polyethylene Glycol 8000
27	0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Acetate	0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
28	0.05 M Magnesium Sulfate Aq.	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	1.6 M Lithium Sulfate monohydrate
29	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	4.0 M Lithium Chloride anhydrous
30	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	1.6 M Ammonium Sulfate
31	0.005 M Magnesium Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	25% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
32	0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	20% w/v 1,6 Hexanediol
33	0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	30% w/v 1,6 Hexanediol
34	0.1 M Potassium Chloride, 0.005 M Mg Sulfate Aq.	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	15% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
35	0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	5% v/v Polyethylene Glycol 400
36	0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	10% v/v Polyethylene Glycol 400
37	0.2 M Potassium Chloride, 0.025 M Mg Sulfate Aq.	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	20% v/v Polyethylene Glycol 200
38	0.2 M Ammonium Acetate, 0.15 M Mg Acetate	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	5% w/v Polyethylene Glycol 4000
39	0.1 M Ammonium Acetate, 0.02 M Mg Chloride	0.05 M HEPES - Na pH 7.0	5% w/v Polyethylene Glycol 8000
40	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	1.6 M Ammonium Sulfate
41	0.1 M Potassium Chloride, 0.015 M Mg Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	10% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
42	0.01 M Magnesium Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	5% v/v iso-Propanol
43	0.05 M Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	10% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
44	0.2 M Potassium Chloride, 0.05 M Mg Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	10% w/v Polyethylene Glycol 4000
45	0.025 M Magnesium Sulfate Aq.	0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	1.8 M Ammonium Sulfate
46	0.005 M Magnesium Sulfate Aq.	0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	35% w/v 1,6 Hexanediol
47	0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% v/v Polyethylene Glycol 400
48	0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	30% w/v Polyethylene Glycol 4000

Tabelle 5: Bedingungen des Matrix-Screens der Firma Hampton Research.

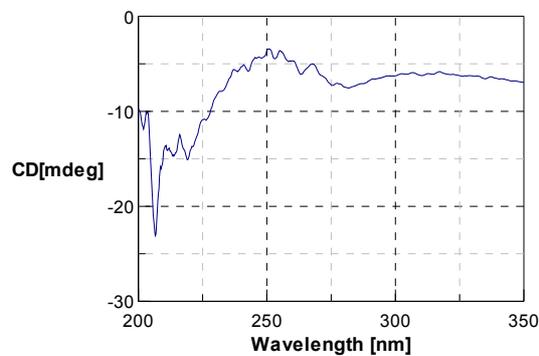
7 Anhang

CD-Spektren:

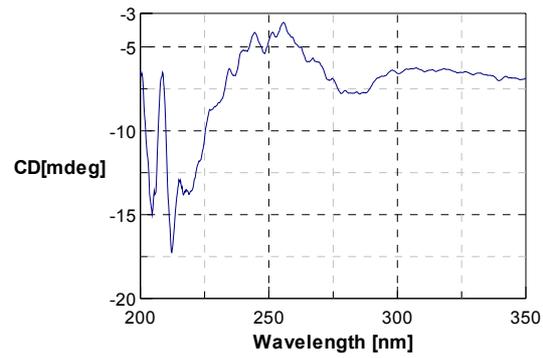
AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-D-Phe-Pro-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-Phe-NH₂ und AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **20**



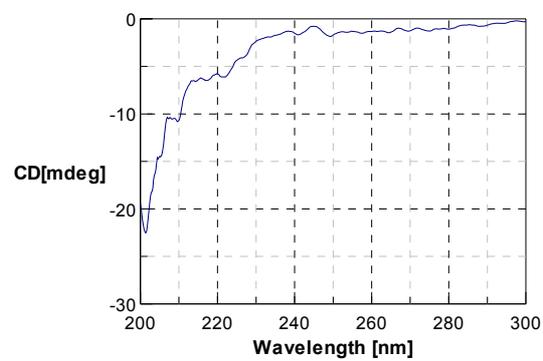
Anhang 1: Oligomer **20** in reinem Wasser bei 20° C, $c = 3 \mu\text{M}$.



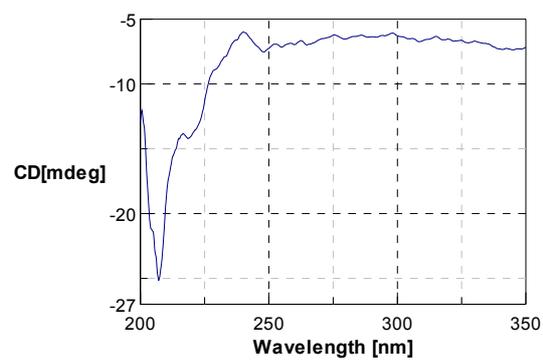
Anhang 2: Oligomer **20** in reinem Wasser bei 27° C, $c = 3 \mu\text{M}$.



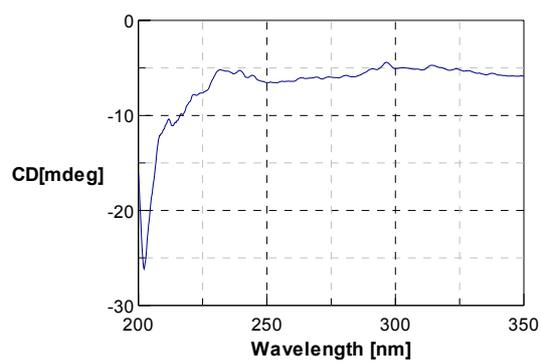
Anhang 3: Oligomer 20 in reinem Wasser bei 50° C, $c = 3 \mu\text{M}$.



Anhang 4: Oligomer 20 in Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄/H₃PO₄, pH 7) 0° C, $c = 3 \mu\text{M}$.



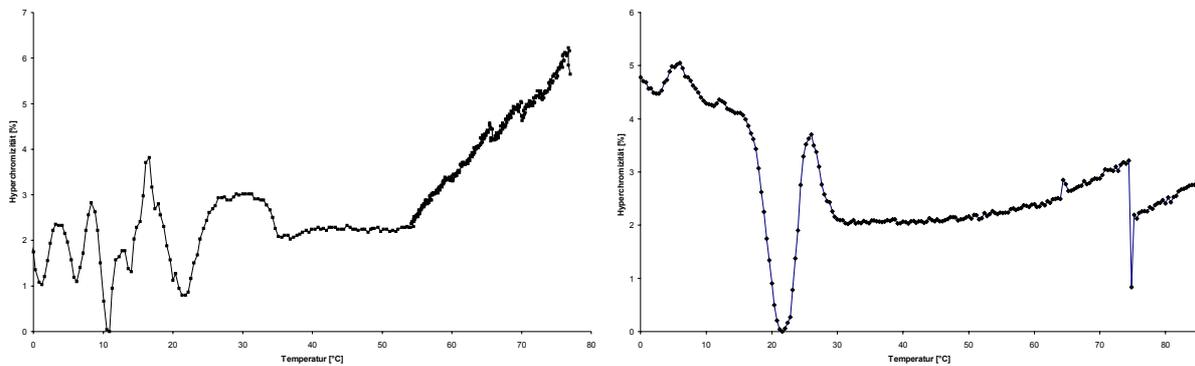
Anhang 5: Oligomer 20 in Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄/H₃PO₄, pH 7) 20° C, $c = 3 \mu\text{M}$.



Anhang 6: Oligomer **20** in Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄/H₃PO₄, pH 7) 40° C, c = 3 μM.

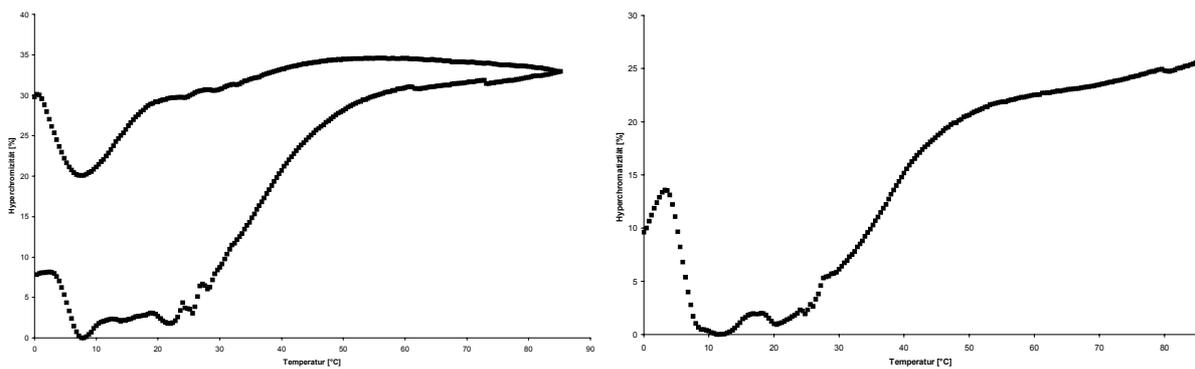
Schmelzkurven:

H-(AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-OH 6

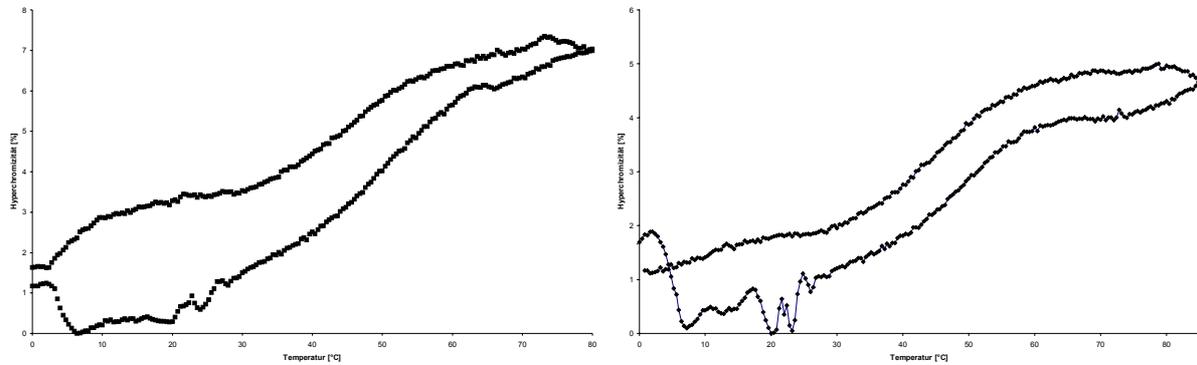


Anhang 7: Oligomer 6 jeweils $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation.

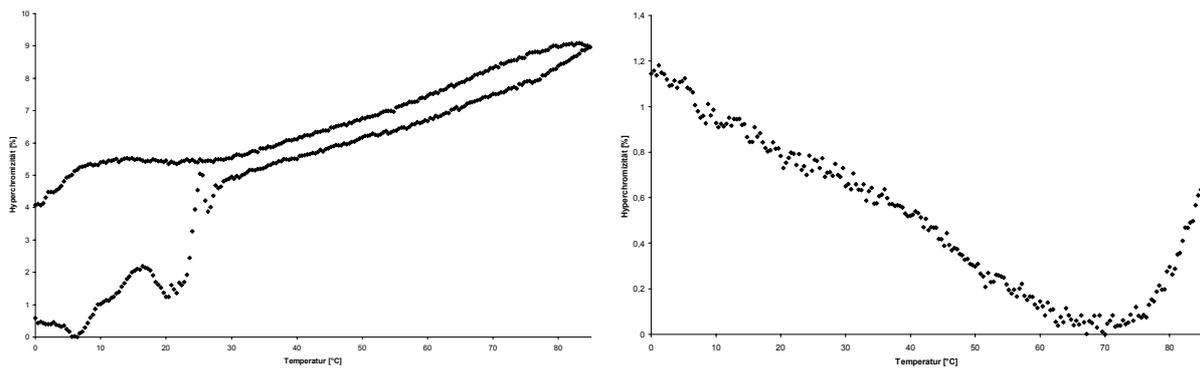
AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Lys-NH₂ 7



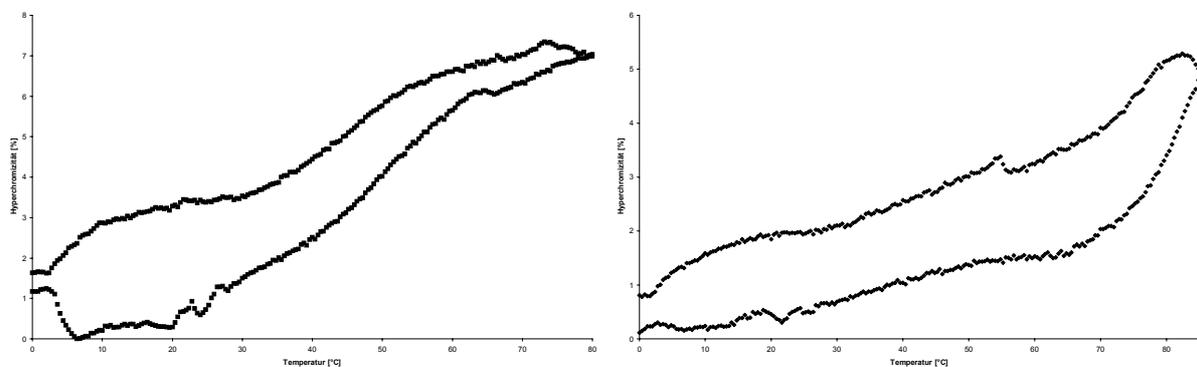
Anhang 8: Oligomer 7 jeweils $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation $T_m = 39 \text{ }^\circ\text{C}$, links mit Hysteresekurve, obere Kurve ist Abkühlungskurve.

Lys-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC-Lys-NH₂ **8**

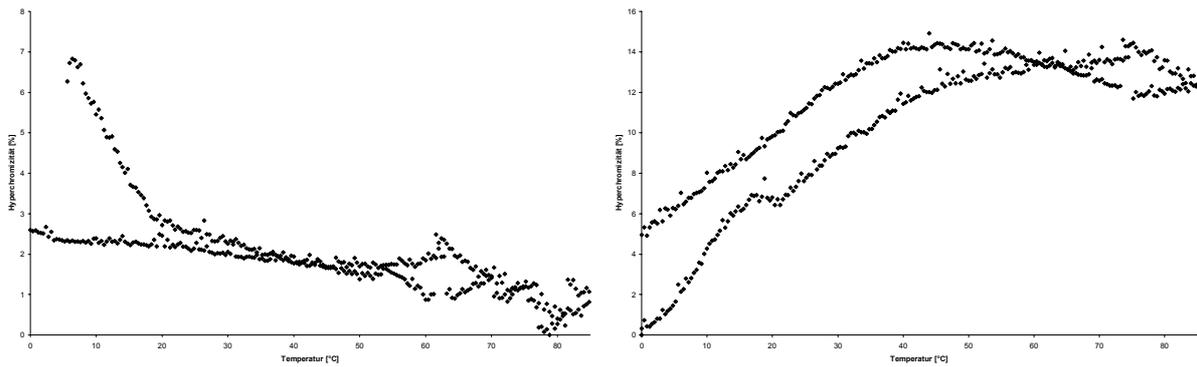
Anhang 9: Oligomer **8** jeweils $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, links 10 min Inkubation, rechts 3 h Inkubation, $T_m = 44^\circ\text{C}$.



Anhang 10: Oligomer **8** links: $c = 6 \mu\text{M}$, $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, $T_m = 24^\circ\text{C}$; rechts: $c = 6 \mu\text{M}$, H_2O , $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, kein T_m -Wert.

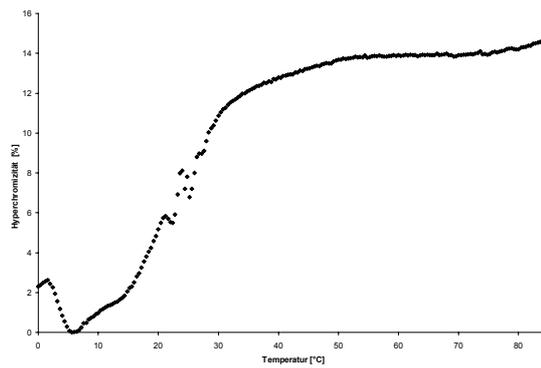


Anhang 11: Oligomer **8** links: $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , 0.01 M HEPES , $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, $T_m = 45^\circ\text{C}$; rechts: $6 \mu\text{M}$, 0.01 M HEPES , $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, kein T_m -Wert.

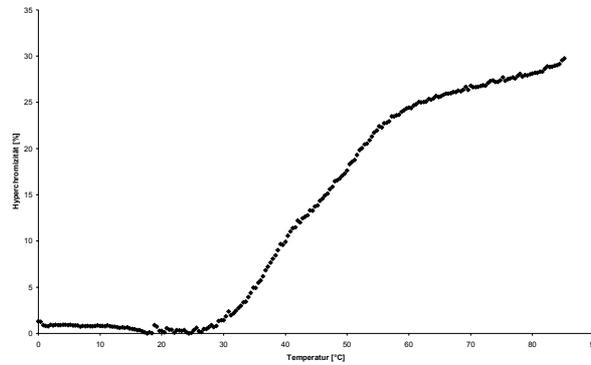


Anhang 12: Oligomer **8** links: $c = 6 \mu\text{M}$, MPD/ Wasser 1:9, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, kein T_m -Wert; rechts: $c = 6 \mu\text{M}$, MPD/(0.1 M NaCl, 0.01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) 1:9, pH 7, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, $T_m = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

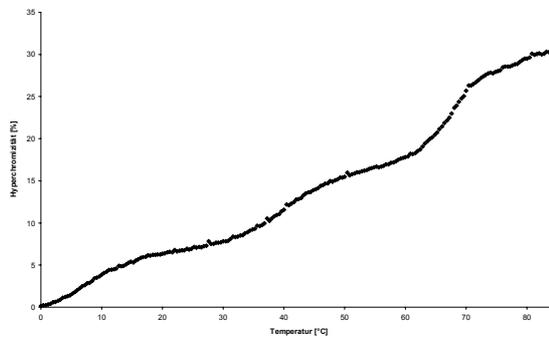
AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21**



Anhang 13: Oligomer **21** $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl, 0.01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 7, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, T_m -Wert = 26 $^\circ\text{C}$.

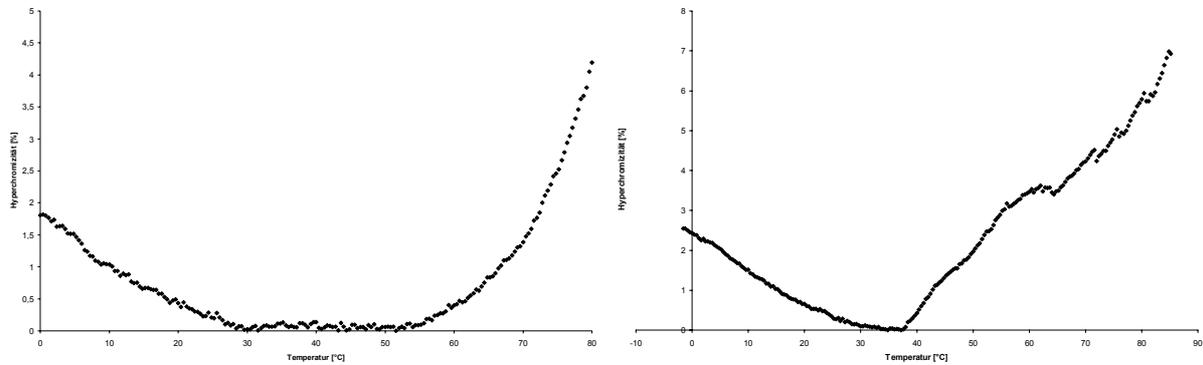
AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ **23**

Anhang 14: Oligomer **23** $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation , $T_m = 46 \text{ }^\circ\text{C}$.

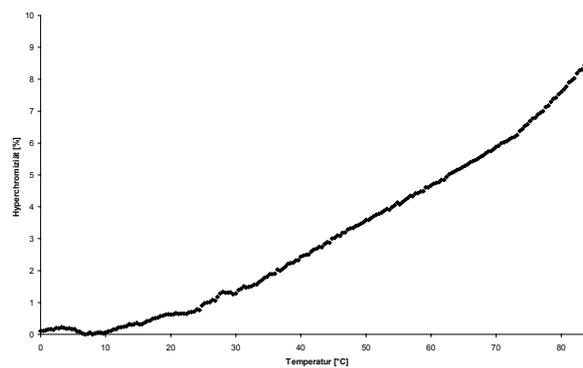
AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21** und AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ **23**

Anhang 15: Oligomer **21** und Oligomer **23** je $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation , $T_{m1} = 41 \text{ }^\circ\text{C}$ und $T_{m2} = 68 \text{ }^\circ\text{C}$.

AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-D-Phe-Pro-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-Phe-NH₂ **20**

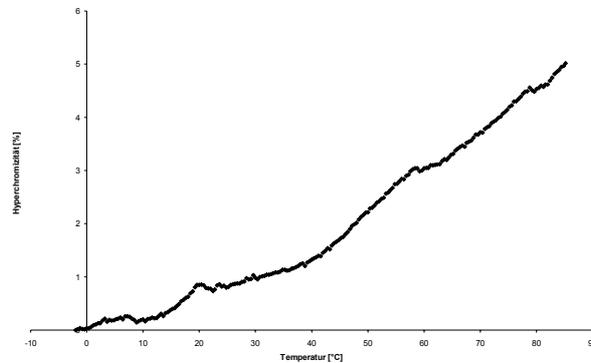


Anhang 16: Oligomer **20** je $c = 12 \mu\text{M}$, H_2O , $\lambda = 280 \text{ nm}$, links 3 h Inkubation, rechts 10 h Inkubation, keine T_m -Werte.

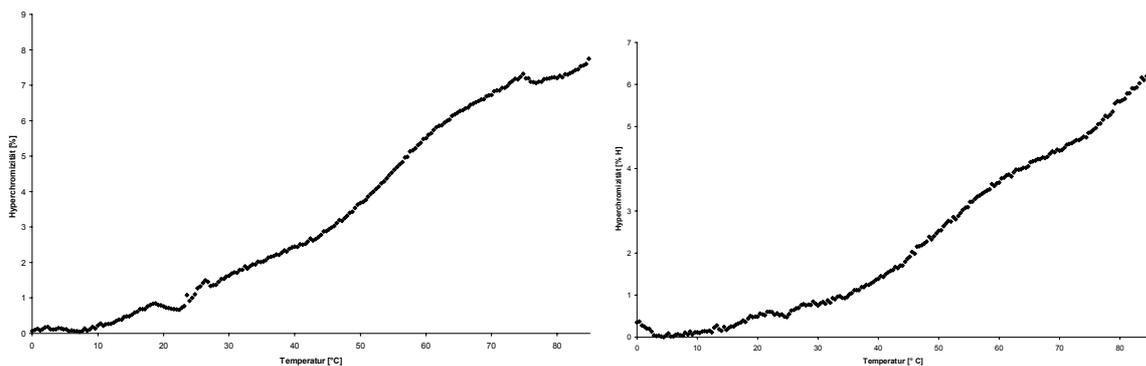


Anhang 17: Oligomer **20** $c = 12 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 10 h Inkubation, kein T_m -Wert.

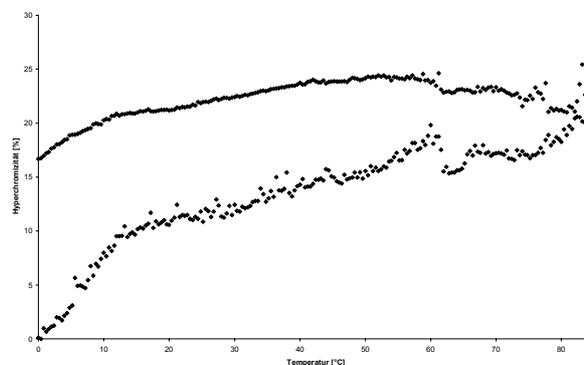
AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-D-Phe-Pro-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-Phe-NH₂ **20** und AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21**



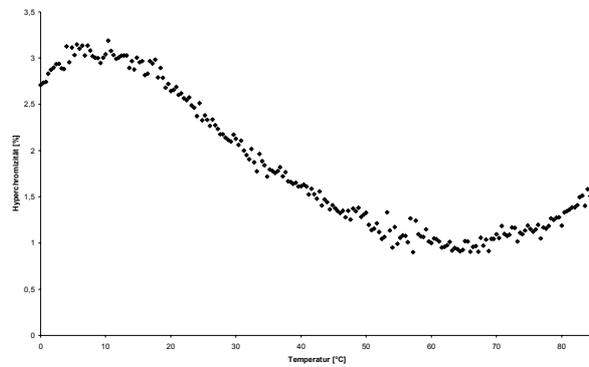
Anhang 18: Oligomer **20** und Oligomer **21** je $c = 6 \mu\text{M}$, H_2O , $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, kein T_m -Wert.



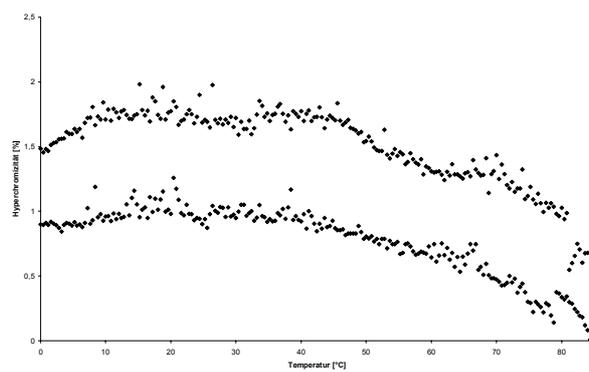
Anhang 19: Oligomer **20** und Oligomer **21** links: je $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 7, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, $T_m = 57 \text{ }^\circ\text{C}$; rechts: je $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 7, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 10 h Inkubation, $T_m = 49 \text{ }^\circ\text{C}$.



Anhang 20: Oligomer **20** und Oligomer **21** je $c = 6 \mu\text{M}$, $\text{TFE}/(0.1 \text{ M NaCl}, 0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4)$ 1:19, pH 7, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation, kein T_m -Wert.

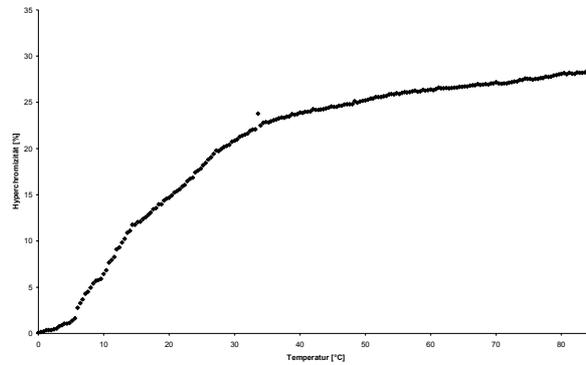
Ac-Arg-Val-Val-(AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser-OH **25**

Anhang 21: Oligomer **25** $c = 6 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation.



Anhang 22: Oligomer **25** $c = 6 \mu\text{M}$, H_2O , $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation mit Hysteresekurve.

Ac-Arg-Val-Val-(AlaC-AlaG-AlaG-AlaC-AlaC)-Arg-Ala-Glu-Asn-Ser-OH **25**
und AlaG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **21**



Anhang 23: Oligomer **25** und Oligomer **21** je $c = 3 \mu\text{M}$, 0.1 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, 3 h Inkubation , $T_m = 18 \text{ }^\circ\text{C}$.

8 Literaturverzeichnis

- [1] W. F. van Gunsteren, R. Burgi, C. Peter, X. Daura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 352-355.
- [2] R. L. Baldwin, G. Rose, *Trends. Biochem. Sci.* **1999**, 24, 26-33.
- [3] B. L. Iverson, *Nature* **1997**, 385, 113-115.
- [4] S. Prusiner, Prix Nobel 1998, Volume Date 1997, 268-323.
- [5] F. Edenhofer, S. Weiss, E.L. Winnacker, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1748-1769.
- [6] U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1743-1746.
- [7] U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2395-2397.
- [8] U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 458-461.
- [9] U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1886-1889.
- [10] G. Ebert, 'Biopolymere: Struktur und Eigenschaft', Teubner Verlag, Stuttgart, **1993**.
- [11] M. S. Searle, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **2001**, 1001-1020.
- [12] R. Zutshi, J. Franciskovich, M. Shultz, B. Schweitzer, P. Bishop, M. Wilson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4841-4845.
- [13] L. O. Tjernberg, J. Näslund, M. Linqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8545-8548.
- [14] A. Cattani-Scholz, C. Renner, C Cabrele, R. Berhrendt, D. Oesterhelt, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 299-303.
- [15] I. Hamachi, J. Watanabe, R. Eboshi, T. Hiraoka, S. Shinkai, *Biopolymers* **2001**, 55, 459-468.
- [16] B. Imperiali, R. S. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12083-12084.
- [17] R. T. Raines, *Chem Rev.* **1998**, 98, 1045-1065.
- [18] R. S. Roy, B. Imperiali, *Protein Eng.* **1997**, 10, 691-698.
- [19] F. M. Richard, P. J. Vithayathil, *J. Mol. Biol.* **1959**, 234, 1459-1465.
- [20] I. Hamachi, Y. Yamada, R. Eboshi, T. Hiraoka, S. Shinkai, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1503-1511.
- [21] I. Hamachi, R. Eboshi, J. Watanabe, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4530-4531.
- [22] M. Goodman, A. Kossoy, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5010-5015.

- [23] I. Hamachi, T. Hiraoka, Y. Yamada, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1998**, 537-538.
- [24] I. Willner, S. Rubin, A. Piklin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3321-3325.
- [25] J. S. Nowick, J. H. Tsai, Q.-C. D. Bui, S. Maitra, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8409-8410.
- [26] J. S. Nowick, D. M. Chung, K. Maitra, S. Maitra, K. D. Stigers, Y. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7654-7661.
- [27] J. S. Nowick, K. S. Lam, T. V. Khasanova, W. E. Kemnitzer, S. Maitra, H. T. Mee, R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4972-4973.
- [28] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
- [29] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954-2983.
- [30] S. B. Huang, J. S. Nelson, D. D. Weller, *J. Org. Chem.* 1991, 56, 6007-6018.
- [31] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 114, 1895-1887.
- [32] E. Uhlmann, A. Peymann, *Chem. Rev.* 1990, 90, 543-581.
- [33] J. Engels, *Nachr. Chem. Tech.* 1991, 39, 1250-1254.
- [34] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* 1993, 105, 697-723.
- [35] J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7667-7670.
- [36] A. Geiger, A. Lester, J. Kleiber, H. Orum, *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17, 1717-1724.
- [37] P.E. Nielsen, *Curr. Op. Biotech.* **2001**, 12, 16-20.
- [38] A. Lenzi, G. Reginato, M. Taddei, E. Trifileiff, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1717-1718.
- [39] A. Löbberding, B. Mielke, C. Schwemler, E. Schwenner, U. Stropp, W. Springer, A. Kretschmer, T. Pötter, EP 0 646595 A1, **1995**.
- [40] A. Löbberding, B. Mielke, C. Schwemler, E. Schwenner, U. Stropp, W. Springer, A. Kretschmer, T. Pötter, EP 0 646596 A1, **1995**.
- [41] R. M. Wing, H. R. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature*, **1980**, 287, 755-758.
- [42] Björn Dietrich, *Wechselwirkungen in hexameren PNA-Doppelsträngen, ein theoretischer Ansatz*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2002**.
- [43] V. Prelog, H. Gerlach, *Helv. Chim. Acta* **1964**, 47, 2288-2294.

- [44] H. Gerlach, J. A. Owtschinnikow, V. Prelog, *Helv. Chim. Acta.* **1964**, *47*, 2294-2302.
- [45] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 523-529.
- [46] M. Chorev, M Goodman, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266-273.
- [47] D. Pörschke, *Biopolymers* **1971**, *10*, 1989-2016.
- [48] A. McPherson, *Crystallisation of Biological Macromolecules*, CHSL Press, New York **1998**.
- [49] A. A. Ducruix, *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*, Oxford University Press Inc., New York **1992**.
- [50] T. M. Bergfords, *Protein Crystallisation*, IUL Biotechnology Series, La Jolla, California **1999**.
- [51] B.F. Gisin, *Helv. Chim. Acta*, **1973**, *56*, 1476-1482.
- [52] S. S. Wang, B. F. Gisen, , D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kolesha, C. Tzougraki, J. Meinhoffer, *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 1286-1290.
- [53] G. E. Martin, M. Shambhu, S. R. Shakhshir, G. A. Digenis, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4571-4574.
- [54] J. M. J. Fréchet, M. D. de Smet, M. J. Farall. *Polymer* **1979**, *20*, 675-680.
- [55] M. F. H. Hoffmann, A. M. Brückner, T. Hupp, B. Engels, U. Diederichsen, *Helv. Chim. Acta.* **2000**, *43*, 2580-2593.
- [56] P.Lohse, B. Oberhauser, B. Oberhauser-Hofbauer, G. Baschang, A. Eschenmoser, *Croatia Chim. Acta.* **1996**, *69*, 535-562.
- [57] L. D. Arnold, T. H. Kalantar, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7105-7109.
- [58] L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2237-2240.
- [59] A. M. Brückner, *Purin-Purin-Paarungen des Isoguanins in Alaninyl-Peptidnucleinsäuren*, Diplomarbeit, Universität Würzburg **2000**.
- [60] M. R. Harnden, R. L. Jarvest, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 2207-2213.
- [61] K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann. A. Holzner, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 375-474.
- [62] Daniel P. Weicherding, *Synthese von Alaninyl- und Homoalaninyl-Peptidnucleinsäuren-Untersuchung der Homologie, der Wechselwirkungen mit Aminosäuren und des photoinduzierten Elektronentransfers*, Doktorarbeit, Technische Universität München, **2000**.
- [63] G. Némethy, *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 260-271.

- [64] S. Matsumura, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Comm.* **2000**, 1615-1616.
- [65] T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, *Biorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 991-1000.
- [66] T. Takahashi, K. Hamasaki, I. Kumagai, A. Ueno, H. Mihara, *Chem. Comm.* **2000**, 349-350.
- [67] N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 500-512.
- [68] T. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, *ChemBioChem* **2002**, 3, 543-549.
- [69] P. Chaltin, E. Lescrinier, T. Lescrinier, J. Rocenski, C. Hendrix, H. Rosemeyer, R. Busson, A. van Aerschot, P. Herdewijn, *Helv. Chim. Acta.* **2002**, 85, 2258-2283.
- [70] Z. Zhang, P. Chaltin, A. Van Aerschot, J. Lacey, J. Rozenski, R. Busson, P. Herdewijn, *Biorg. Med. Chem.* 2002, 10, 3401-3413.
- [71] P. Chaltin, F. Borgions, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 47-50.
- [72] E. Breslow, *Chemtracts Biochemistry and Molecular Biology*, **1992**, 3, 219-222.
- [73] S. B. H. Kent, D. Alewood, P. Alewood, P. Alewood, M. Baca, A. Jones, M. Schmolzer, *Innovation Perspect. Solid. Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp.*, 2nd **1992**.
- [74] J.A. Ellman, D. Mendel, S. Antony-Cahill, C.J. Noren, P.G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1991**, 202, 301-336.
- [75] J. A. Ellmenn, B. F. Volkman, D. Mendel, P. G. Schultz, D.E.Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7959-7961
- [76] V.W. Cornish, D.R. Benson, C. A. Altenbach, K Hideg, W. L. Hubbel, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2910-2914.
- [77] J.S. Thorson, E. Chapman, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9361-9362.
- [78] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [79] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266, 243-247.
- [80] F.Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4817-4868.
- [81] C.F. Liu, J.P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6584-6588.
- [82] P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B. Kent, *Science* **1994**, 266, 766-779.
- [83] T.W. Muir, P.E.Dawson, S.B. Kent, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 266-298.
- [84] J.P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers* **1999**, 51, 311-332.

- [85] Z. Machinova, C. Mühle, U. Krauss, R. Trekin, A. Koch, H. P. Merkle, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2002**, 3, 672-677.
- [86] P.E. Dawson, S.B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923-960.
- [87] D. Swinnen, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2439-2442.
- [88] R. Quaderer, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3181-3184.
- [89] A. Sewing, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3503-3505.
- [90] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526-533.
- [91] R. Quaderer, D. Hilvert, *ChemComm.* 2002, 2260-2261.
- [92] R. J. Hondal, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5140-5141.
- [93] R. Quaderer, A. Sewing, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1197.
- [94] M. McPherson, M. C. Wright, P. A. Lohse, *Synlett* **1999**, 978-980.
- [95] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4900-4908.
- [96] M. C. de Koning, D. V. Filippov, N. Meeuwenoord, M. Overhand, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Synlett* **2001**, 10, 1516-1518.
- [97] H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 375-386.
- [98] H. Paulus, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 447-496.
- [99] S. Chong, F. B. Mersha, D.G. Comb, M.E. Scott, D. Landry, L.M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R-B. Kucera, C. A. Hirvonen, J.J. Pelletier, H. Paulus, M.Q. Xu, *Gene* **1997**, 192, 271-281.
- [100] T.W. Muir, D. Sondhi, P A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705-6710.
- [101] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 253-261.
- [102] M. Huse, T. W. Muir, *Methods Enzymol.* **2001**, 339, 41-54.
- [103] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 545-552.
- [104] P. Kast, H. Hennecke, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 99-124.
- [105] K. Kirshenbaum, I. S. Carrico, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2002**, 3, 235-237.
- [106] G. G. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature*, **1944**, 154, 703.
- [107] L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, R. E. W. Hancock, R. S. Hodges, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, 47, 460-466.
- [108] Y. A. Ovchinnikow, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **1975**, 31, 2177-2209.
- [109] T. Maeda, M. Takagi, T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 75, 173-177.
- [110] D. C. Hodgkin, B. M. Oughton, *Biochem. J.* **1957**, 65, 752-756.
- [111] S. Ando, H. Nishikawa, H. Takiguchi, S. Lee, G. Sugihara, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1147, 42-49.

- [112] L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, C. M. Kay, R. E. W. Hancock, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 25261-25268.
- [113] M. F. H. Hoffmann, *Darstellung und Paarungsuntersuchung von Alanyl-PNA-Oligomeren mit Xanthin und Diaminopurin-Nucleobasen*, Diplomarbeit, Technische Universität München, **1999**.
- [114] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 695-698.
- [115] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 457-461.
- [116] R. Knorr, A. Treciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tet. Lett.* **1989**, 30, 1927.
- [117] J. Coste, M. N. Dufour, A. Pantaloni, B. Castro *Tet. Lett.* **1990**, 31, 669-672.
- [118] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678-9683.
- [119] M. Baggiolini, A. Walz, S. L. Kunkel, *J. Clin. Invest.* **1989**, 84, 1045.
- [120] M. Baggiolioni, I. Clark-Lewis, *FEBS Lett.* **1992**, 307, 97-101.
- [121] G. M. Clore, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, 29, 1689-1696.
- [122] E. T. Baldwin, I. T. Weber, R. St Charles, J. C. Xuan, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, B. F. Edwards, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 502-506.
- [123] M. Baggiolioni, B. Dewald, B. Moser *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, 15, 675-705.
- [124] D.F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5456-5461.
- [125] M. Fujino, M. Wakimasu, C. Kitada, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 2825-2831.
- [126] J. Yajima et. al., *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 3752.
- [127] M. Ohno, S. Tsukamaoto, S. Sato, N. Izumiya *Bull Chem. Soc. Jpn.* **1973**, 46, 3280-3285.
- [128] W. F. Heath, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 896-897.
- [129] G. R. Matsueda, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, 20, 26-34.
- [130] A. R. Mitchel, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7357-7362.

-
- [131] G. Sabatino, et. al., Poster A56 presented at the 27th European Peptide Symposium, Sorrento, **2002**.
- [132] O. Marder, et. al, Poster presented at The Gordon Conference, Ventura, 2002.
- [133] L. M. Varanda, M. T. M. ;Miranda, *J. Pept. Res.* **1997**, 50, 102-108.
- [134] H. Schagger, G. von Jagow, *Anal.Biochem.* **1987**, 166(2), 368-379.
- [135] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.

Lebenslauf

- 1973 Geboren am 15.09.1973 in Nürnberg als zweites Kind von Walter Hoffmann und Irene Hoffmann geb. Odörfer
- 1980-1984 Besuch der Hans-Dötsch Grundschule in Altdorf bei Nürnberg
- 1984-1993 Besuch des naturwissenschaftlichen Leibniz-Gymnasiums Altdorf
- 1993-1996 Chemiestudium an der Friedrich-Alexander-Universität-Erlangen-Nürnberg mit Vordiplom im November 1995
- 1996-1999 Chemiestudium an der Technischen Universität München, Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. H. Kessler unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Diederichsen
- 1997-1998 8-monatiger Studienaufenthalt am Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull Barcelona
- 1998 3-monatiges Forschungspraktikum bei Novartis Pharma Basel
- 2000 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. U. Diederichsen an der Bayrischen Julius-Maximilians Universität Würzburg
- 2001-2003 Fortsetzung der Dissertation unter Prof. Dr. U. Diederichsen an der Georg-August-Universität Göttingen
- 2000-2001 Assistent im organischen Praktikum für Chemiker
- 2001-2002 Assistent im organischen Praktikum für Biologen und Lehramtskandidaten