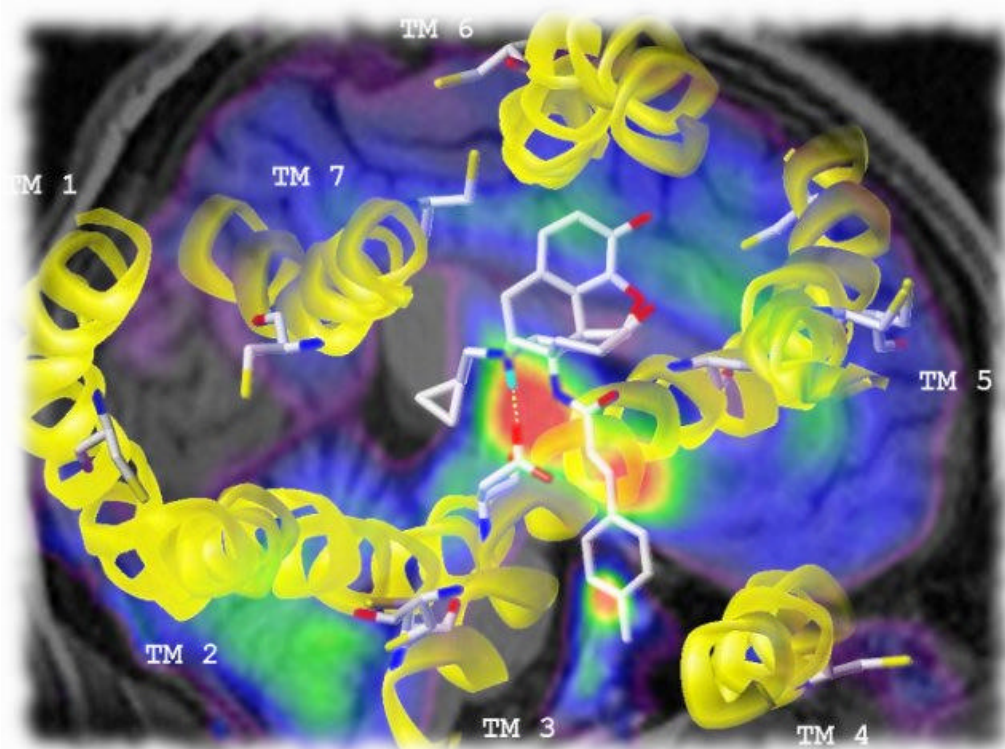


Peptidsynthese

(Cys^{8,13})-Dynorphin A (1-13) Amid



Modul Organische Biochemie:

Leitung: Prof. Dr. E. Bayer

Versuch: Dr. H. Echner

Versuchsprotokoll:

Torsten Barth

Stefan Mogk

Titelbild: Opioidrezeptoren

Hintergrund: Verteilungskarte im menschlichen Gehirn, sagittaler Querschnitt dargestellt mittels Positronen-Emissions-Tomographie. Vordergrund: Schematische Darstellung der Transmembran-domänen

1 Index

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Index.....	2
1.1	Inhaltsverzeichnis.....	2
1.2	Abbildungsverzeichnis.....	2
2	Einleitung.....	3
3	Material und Methoden.....	4
3.1	Chemikalien.....	4
3.2	Festphasenpeptidsynthese.....	5
3.3	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC).....	9
3.4	Zyklisierung über Disulfidbrücken.....	10
3.5	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI).....	11
4	Experimenteller Teil.....	13
4.1	Beladung des Harzes.....	13
4.2	Überprüfung der Kopplungseffizienz.....	13
4.3	Peptidsynthese.....	14
4.4	Schutzgruppenabspaltung, Abspaltung vom Harz.....	15
4.5	Reinigung des Peptids mittels HPLC.....	15
4.6	Zyklisierung des Peptids.....	16
4.7	Erneute Reinigung mittels HPLC.....	16
4.8	Massenspektrometrie.....	17
5	Literatur.....	17
A	Appendix.....	18

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Immobilisierung der Startaminosäure (hier: Cys) am Trägermaterial.....	6
Abbildung 2:	Aktivierung der zu koppelnden AS mittels TBTU zum Aktivester.....	7
Abbildung 3:	Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppen.....	8
Abbildung 4:	Abspaltung des komplettierten Peptids vom Träger.....	9
Abbildung 5:	Einführung von Disulfidbrücken zur Fixierung der Tertiärstruktur.....	10

2 Einleitung

Es wurde das Opioid (Cys^{8,13})-Dynorphin A (1-13) Amid mittels Festphasenpeptidsynthese unter Fmoc-Strategie synthetisiert, an einer HPLC gereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Die Aminosäuresequenz lautet: H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Cys-Arg-Pro-Lys-Leu-Cys-NH₂.

Opioide sind Arzneimittel einer chemisch heterogenen Untergruppe der Analgetika. Sie entfalten ihre Eigenschaften durch Wechselwirkung mit Opioidrezeptoren auf der Oberfläche der Nervenzellen. Der Name der Stoffgruppe leitet sich vom natürlichen Stoffgemisch Opium ab, dessen Bestandteile Opiate genannt werden, worunter unter anderem *Morphin* ist. Als Opioide werden auch Stoffe bezeichnet, die nicht den natürlichen Opiaten angehören, wie zum Beispiel das Methadon.

Die körpereigenen Liganden der *Opioidrezeptoren* sind endogene Peptide (Enkephaline, Endorphine, Endomorphine, Metorphamide und Dynorphine), die z.B. in der Stressantwort von Bedeutung sind. Die Opioidrezeptoren kommen cerebral am Boden des 4. Ventrikels (μ_1 , μ_2 , δ), spinal (μ_2 , δ) und peripher (z.B. im Darm) vor. Alle genannten Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt.

Opioide werden zu Narkosezwecken eingesetzt, sind aber auch als Suchtmittel von Bedeutung. Die einzelnen Substanzen haben unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Rezeptortypen und können dort Wirkungen auslösen oder sie blockieren. Manche Opioide wirken dabei spezifisch nur auf einen einzigen Rezeptortyp, manche unspezifisch auf mehrere oder alle.

Falls eine Substanz beim Andocken eine aktivierende Wirkung am Rezeptor auslöst, spricht man von einem *Agonisten*. So sind z. B. Morphin und Heroin reine μ -Agonisten und bewirken somit ausgeprägte Schmerzstillung aber auch Atemdepression.

Antagonisten hemmen den Rezeptor kompetitiv ohne eine Wirkung zu vermitteln. So hebt beispielsweise Naloxon die Wirkung von Morphin und Heroin auf.

Dynorphin scheint das Suchtrisiko für Kokain herabzusetzen. Menschen, bei denen das Peptid stark exprimiert wird haben nach einmaligem Kokainkonsum ein geringeres Risiko mittelfristig abhängig zu werden. Solche „high output“ Probanden dabei weisen eine erhöhte Anzahl repetitiver DNA-Sequenzen in der Dynorphin-Promotor-Region auf.

Dynorphine haben eine höhere Affinität zu δ -Rezeptoren als zu anderen Opioidrezeptoren.

Dieser Rezeptor ist für die spinale Analgesie verantwortlich, allerdings auch für

Atemdepression, Sedation und Dysphorie. Dies erklärt möglicherweise, weshalb Dynorphine

in gewisser Weise entgegengesetzte Wirkung entfalten wie beispielsweise das Glückshormon Endorphin. Dynorphine stehen im Verdacht Depressionen zu fördern. Laborratten resignieren im wiederholten erzwungenen Schwimmtest wesentlich schneller als Dynorphin-geblockte Ratten. Dies wird als Depression gewertet, die das bei solchen Tests bekannte Motiv der „erlernten Hilflosigkeit“ unterstützt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

TentaGel - Polyethylenglykol-Spacer an Polystyrol-Matrix
TBTU - O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyl-Uronium
Tetraflouorborat

Lösungsmittel :

DMF - Dimethylformamid
DMSO - Dimethylsulfoxid
Acetonitril

Säuren und Basen :

DIPEA - Diisopropylethylamin 20% in DMF
Piperidin - 25 % Piperidin in DMF
Eisessig
Ammoniak
Ammoniumhydrogencarbonat

Aminosäuren : (Strukturformeln im Anhang)

Fmoc-Arg(Pbf)-OH - N α -Fmoc-N ω -Pbf-L-Arginin
Fmoc-Cys(Trt)-OH - N α -Fmoc-S-Trityl-L-Cystein
Fmoc-Gly-OH - Fmoc-Glycin
Fmoc-Leu-OH - Fmoc-L-Leucin
Fmoc-Lys(Boc)-OH - N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-Lysin
Fmoc-Phe-OH - Fmoc-L-Phenylalanin
Fmoc-Pro-OH - Fmoc-L-Prolin
Fmoc-Tyr(tBu)-OH - Fmoc-O-tert.-butyl-L-Tyrosin

HPLC-Puffer :

Puffer A - 0,07 % TFA (Triflouressigsäure) in Wasser
Puffer B - 0,059 % TFA in Acetonitril (CH₃CN)

3.2 Festphasenpeptidsynthese

In der Festphasenpeptidchemie wird die wachsende Peptidkette über einen Anker an einer Polystyrol-Matrix kovalent gebunden. Ausgehend von diesem festen, Lösungsmittel-inerten, jedoch für Reagenzien permeablen Trägermaterial können die mit der Anknüpfung neuer Aminosäuren verbundenen Operationen auf Dosierung der Reagenzien, sowie Auswaschen der Überschüsse reduziert werden.

Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt quantitativ mit einer Ausbeute von 99 % vom C- zum N-Terminus und damit entgegen der biologischen Syntheserichtung. Zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit werden in der Peptidchemie vier bis achtfache Überschüsse eingesetzt. Nicht umgesetzte Reagenzien werden aus der Reaktionskammer durch Filtration (Batch-Verfahren) oder durch kontinuierliches Waschen (Durchflussverfahren) entfernt. Nach Abschluss der Peptidknüpfung wird das gewünschte Peptid vom Träger abgespalten und gereinigt.

Im Vergleich zur Synthese in flüssiger Phase ergeben sich bei der Festphasensynthese folgende Vorteile: kurze Synthesezeiten, sowie die Möglichkeit der Automatisierung, Wegfall aufwändiger Reinigungsschritte. Allerdings können in der mehrstufigen Festphasensynthese vermehrt Nebenreaktionen auftreten.

Beim hier angewandten Batch-Verfahren wird die Matrix, an der das Peptid aufgebaut wird, in einem Gefäß mit Lösungsmittel sowie Reagenzien geschüttelt, um Diffusionskräfte zu überwinden und den Reaktionsablauf zu beschleunigen. Alternativ hierzu ist es möglich, Reagenzien und Lösungsmittel ständig durch eine Säule zu pumpen, die den polymeren Träger enthält (Durchflussverfahren).

Der *polymere Träger* muss folgende Voraussetzungen erfüllen: Möglichst chemische Inertheit sowie gute Permeabilität für Lösungsmittel und Reagenzien. Es kommen meist Polystyrol oder Polyacrylamid zum Einsatz. In diesem Versuch wurde ein das Pfropfpolymer TentaGel (PS-PEG) eingesetzt, das durch Aufpfropfen von Polyethylenglykol (PEG) als *Spacer* auf eine Matrix aus Polystyrolkugeln (PS) gewonnen wird. Diese Pfropfpolymeren sind druckstabil und können sowohl im Batch- als auch unter Durchflussverfahren eingesetzt werden. Bezüglich Reaktionsgeschwindigkeit und Mobilität sollte eine optimale PEG-Kette 2000-3000 Dalton wiegen. Dominiert werden die Eigenschaften der Polymere von den Eigenschaften des PEGs und nicht von der PS-Matrix selbst. Hervorzuheben sind die

ausgesprochen guten Quelleigenschaften der Pfropfpolymeren wie beinahe Lösungsmittelunabhängigkeit, was die Verwendung von TentaGel-Harzen in fast allen Lösungsmitteln ermöglicht.

Der *Linker* stellt ein bifunktionelles Molekül dar, das die Verbindung zwischen Matrix und Aminosäure realisiert. Er besitzt eine funktionelle Gruppe zur Anknüpfung des C-Terminus der C-terminalen Aminosäure (z.B. Benzylester bei Merrifield) und sollte einer permanenten Schutzgruppe im jeweiligen Syntheschema entsprechen. Der Linker soll nach dem Aufbau der Peptidkette mit einem passenden Reagenz abspaltbar sein; somit hängt die Wahl des Linkers von der Schutzgruppenkombination ab.

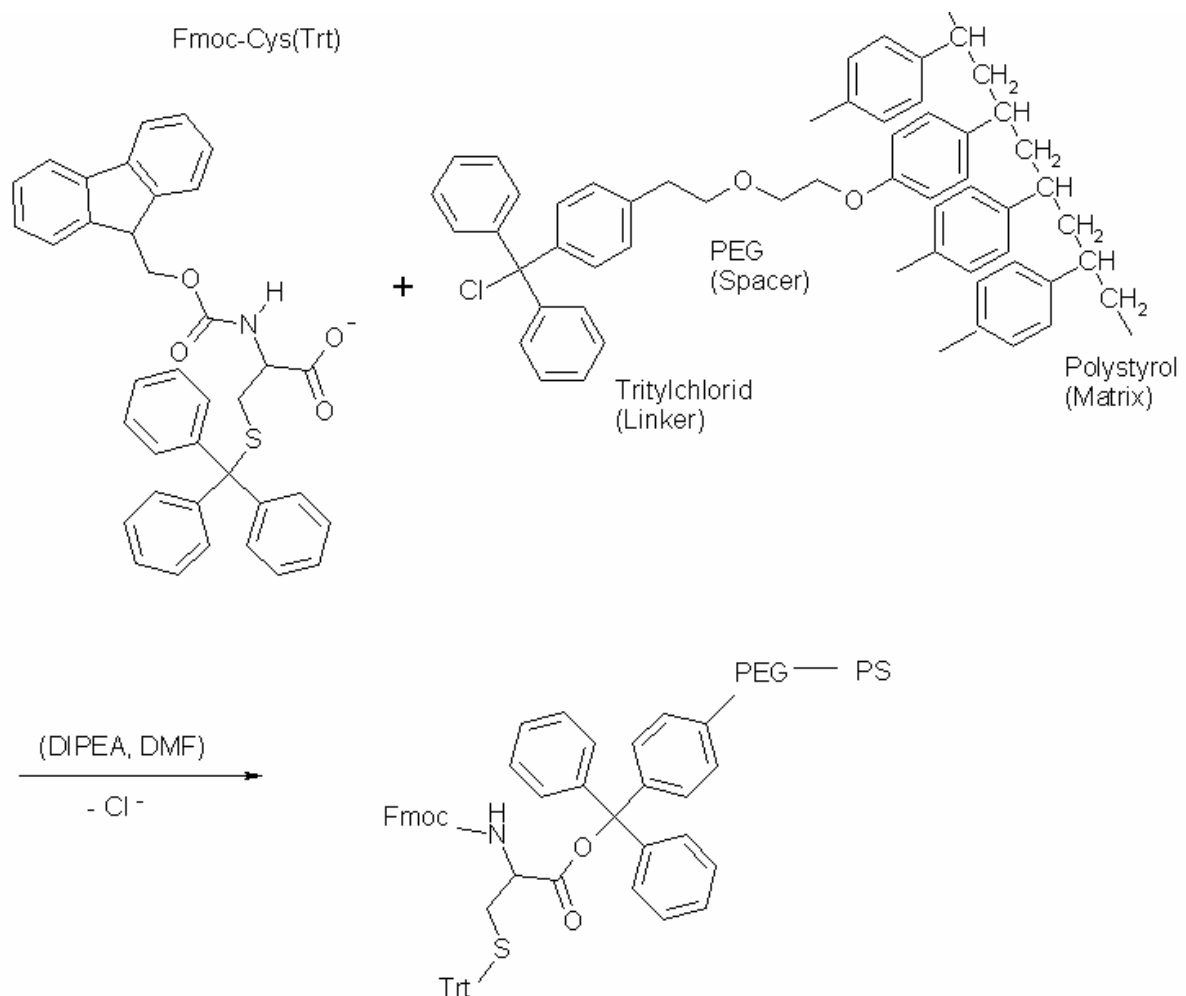


Abbildung 1: Immobilisierung der Startaminosäure (hier: Cys) am Trägermaterial

Die Beladung des Trägers, bzw. die Kopplung der Aminosäuren erfolgt in der Regel mit Kupplungsreagenzien wie HBTU, TBTU. BOP wird auf Grund seiner cancerogenen Eigenschaften nicht länger verwendet.

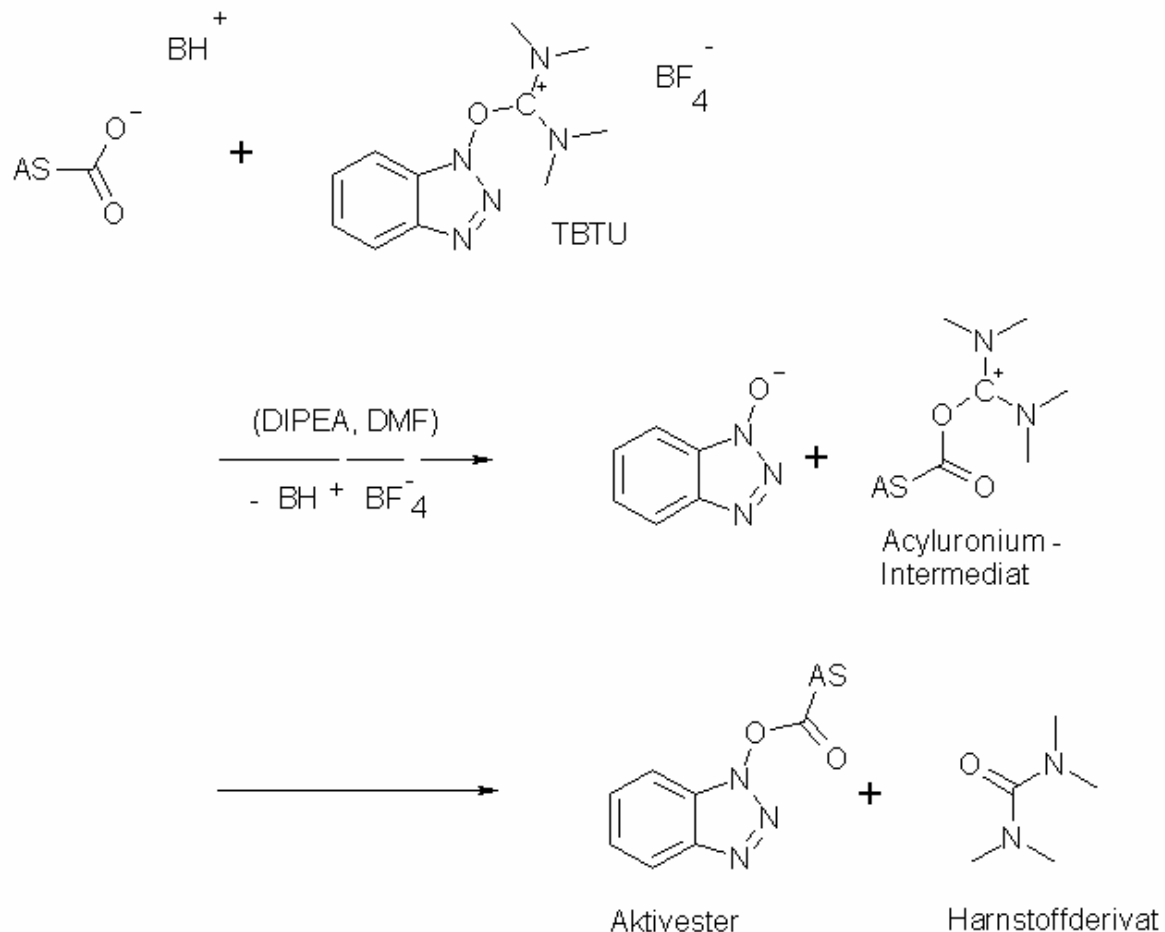


Abbildung 2: Aktivierung der zu koppelnden AS mittels TBTU zum Aktivester

Um unerwünschte Nebenreaktionen bei der Kopplung zu vermeiden werden sowohl die α -Amino-Funktion, als auch die Seitenketten geschützt. Als $\text{N}\alpha$ -Schutzgruppen haben sich Derivate der Carbamidsäure vom Urethan-Typ bewährt. Sie sind als temporäre Schutzgruppen unter vergleichsweise milden Bedingungen abspaltbar, und verringern zusätzlich die Polarität der Aminosäuren, wodurch ihre Löslichkeit in organischen Lösemitteln erhöht wird. Die beschriebene Synthese erfolgte unter Fmoc (9-Flourenylmethoxycarbonyl-) Strategie. Andere gängige Verfahren sind die Boc (tert.-Butyloxycarbonyl-) und Z- (Benzyloxycarbonyl-) Strategie.

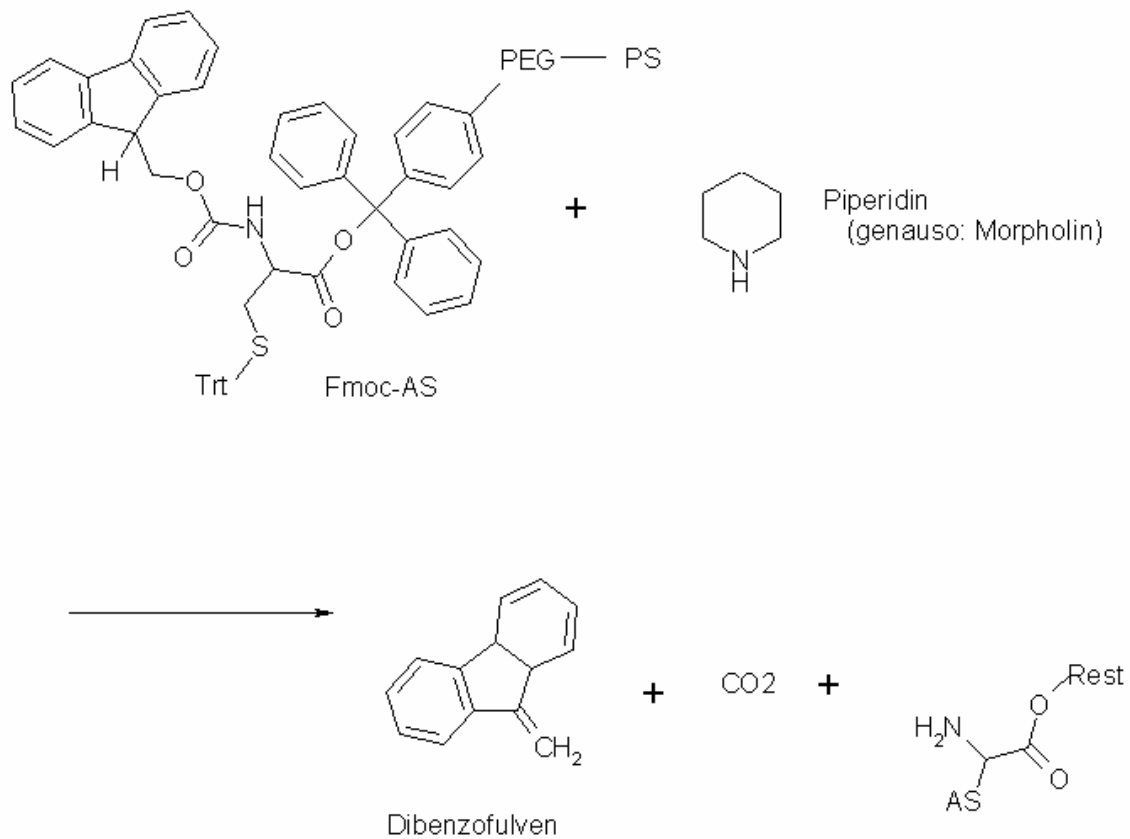


Abbildung 3: Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppen

Das jeweilige Reaktionsschema bestimmt neben unterschiedlichen Abspaltungsbedingungen auch die Auswahl der permanenten Seitenkettenschutzgruppen: Zum Einsatz kamen Pbf (2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-yl-sulfonyl-), Trt (Trityl-/Triphenylmethyl-), Boc (tert.-Butyloxycarbonl-) und tBu (tert.-Butyl-). Die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen, sowie die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit TFA.

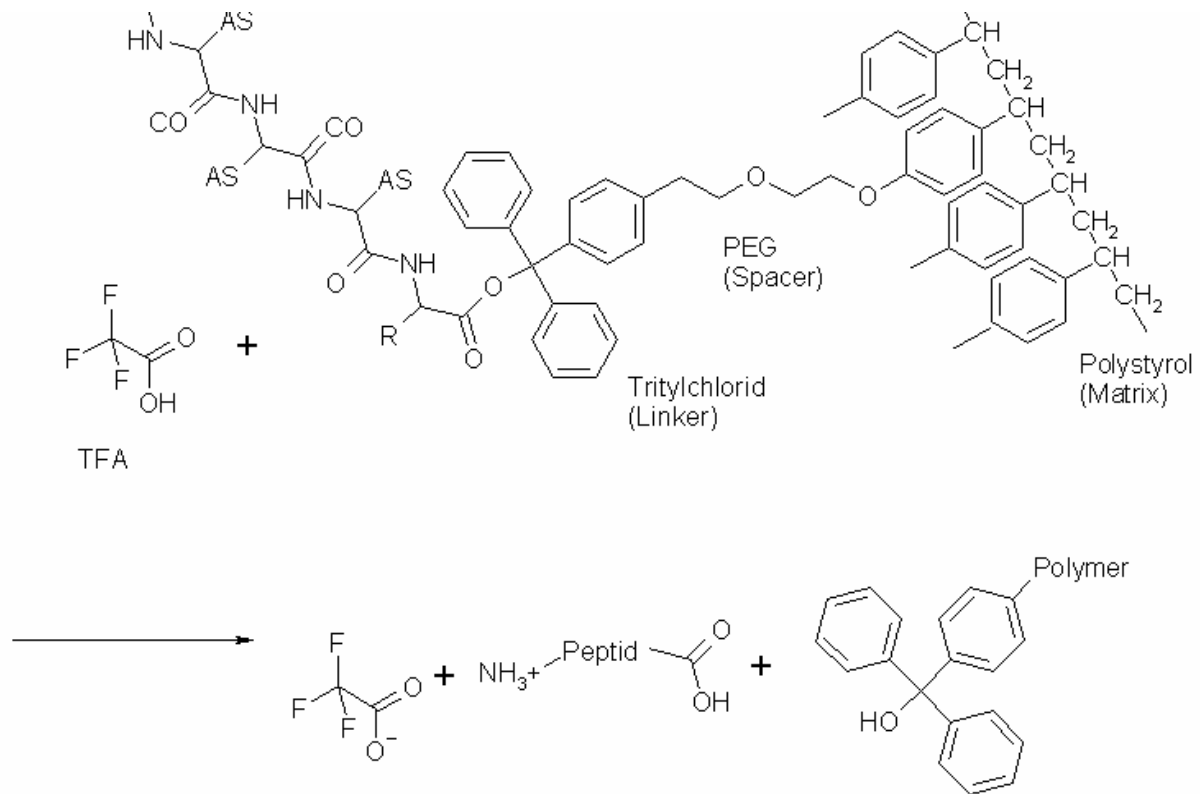


Abbildung 4: Abspaltung des komplettierten Peptids vom Träger

3.3 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die Begriffe FPLC (Fast performance) und HPLC benennen in ihrer allgemeinsten Form eine pumpengestützte Chromatographie. Die erhebliche Packungsdichte erlaubt hochaufgelöste Trennungen und bedingen die Durchführung bei hohem Druck. In der Praxis beschreibt FPLC meist eine Molekularsiebchromatographie, während es sich bei HPLC und Reversed-Phase-HPLC um verteilungschromatographische Verfahren handelt.

Bei der HPLC wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der mobilen Phase (\rightarrow *Eluent*) durch eine so genannte Trennsäule mit der stationären Phase gepumpt. Üblicherweise geht der Trennsäule eine Vorsäule vorher, die wesentlich billiger als die Trennsäule ist und zur Abhaltung von Verunreinigungen dient. Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule, andernfalls verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke der Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (\rightarrow *Retentionszeiten*) am Ende der Trennsäule, wo sie dann (meist photometrisch) nachgewiesen werden können.

Es werden zwei Methoden unterschieden: Normal Phase (NP) und Reversed Phase (RP). Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z.B. Silikagele/Kieselgel) genutzt. Die Stärke der Elutionskraft der mobilen Phase ist im allgemeinen abhängig von der Polarität. Die verschiedenen Lösungsmittel sind nach steigender Polarität in der *eluotropen Reihe* angeordnet. Je polarer eine mobile Phase ist, desto schneller wird eine Substanz eluiert. Polare Moleküle werden auf der Säule länger retardiert als unpolare Moleküle und verlassen deshalb später die Säule.

Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. 70% aller analytischen HPLC-Trennungen sind RP-Trennungen. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet und die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität. Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren läßt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen (oft C-18) überzogen, also die Polarität umgekehrt. Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser und Acetonitril. Bei *isokratischen* Trennungen bleibt die Zusammensetzung der Mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei *Gradiententrennungen* wird die Polarität des Fließmittelgemisches während der Analyse verändert.

3.4 Zyklisierung über Disulfidbrücken

Zur oxidativen Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke würde theoretisch ein alkalischer pH genügen. Allerdings soll die intermolekulare Disulfidbildung (Dimerisierung) verhindert werden, weshalb im stark verdünnten, leicht alkalischen Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer mit DMSO als Oxidationsmittel gearbeitet wird.

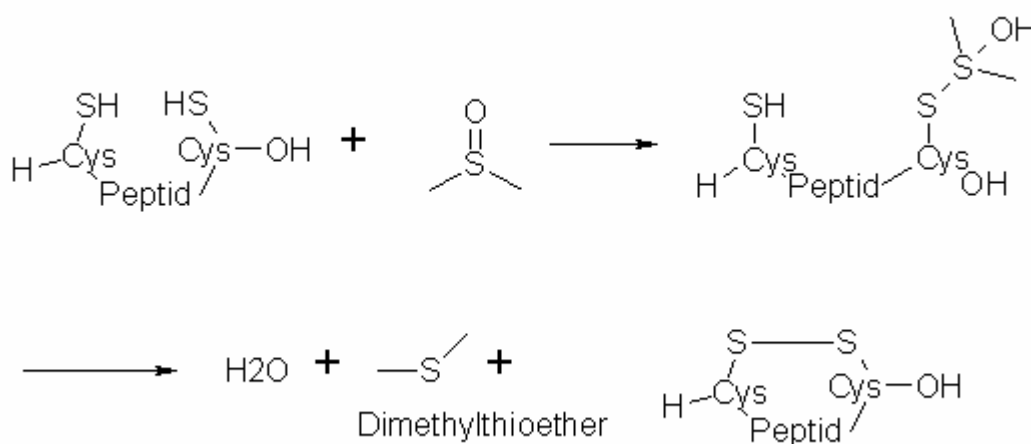


Abbildung 5: Einführung von Disulfidbrücken zur Fixierung der Tertiärstruktur

3.5 Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI)

Der Begriff der Elektrospray Ionisation geht auf Arbeiten von Dole (1968) zurück und wurde durch John B. Fenn¹ etabliert (Nobelpreis für Chemie 2002).

Elektrospray Ionisation ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen. Es gehört wie auch die APCI zu den Ionisationsverfahren, bei denen die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet. Es ist das bevorzugte Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, da es schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentationen führt. Außerdem ist es auch für die Ionisierung sehr große Moleküle wie z.B. Proteine sehr gut geeignet. Anwendungsgebiete für ESI sind die Bestimmung der Molekülmasse, die Analyse und Sequenzierung von Proteinen und Oligonukleotiden und die quantitative Bestimmung von Arzneimitteln oder Pestiziden.

Bei der Elektrospray Ionisation wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines *Taylor-Cone* als feines Aerosol (ca. 10 µm Tropfengröße) aus der Kapillare austreten. Ein neutrales Trägergas wie Stickstoff wird häufig benutzt um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfen-Oberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog. *Rayleigh-Limit* wird, zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (→ Coulomb-Explosionen) in kleinere Tröpfchen.

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Das *Charge Residue Model* (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht davon aus, dass letztlich winzige Tropfen von ca. 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Beim *Ion Evaporation Model* (IEM, Ionenemissionsmodell) werden bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert.

Die erzeugten Ionen werden durch die Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Orifice in das Massenspektrometer gelenkt.

¹ Fenn et al, *Science*. **1989** Oct 6; 246 (4926): 64-71
Electrospray Ionisation for mass spectrometry of large biomolecules

Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die erzeugt werden. Durch eine positive Spannung werden Kationen erzeugt und durch eine negative Spannung negativ Anionen. Bei der Elektrospray-Ionisierung handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionenerzeugung, bei der auch empfindliche Moleküle und nicht kovalente Aggregate ionisiert werden können. Typischer Weise werden Quasimolekül-Ionen detektiert ($[M+H]^+$ bei positiver Spannung; $[M-H]^-$ bei negativer Spannung). Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI ist die Bildung von Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder Puffers ($[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$). Diese Adduktbildung ist ebenfalls mit Bestandteilen der Probenmatrix möglich.

In einer *Ionenfalle* werden die erzeugten Ionen festgehalten. Die Speicherung der Ionen ohne Kontakt zu einer Oberfläche. Es gibt zwei verschiedene Ausführungen der Ionenfalle: die Paul-Falle und die Penning-Falle.

In der *Paul-Falle* wird ein zeitlich veränderliches elektromagnetisches Feld verwendet um Ionen festzuhalten. Hat dieses Feld die Form eines Quadrupols², wird die Falle auch als Quadrupol-Falle bezeichnet. Das Feld wird in diesem Fall durch drei rotationssymmetrische Elektroden erzeugt: zwei Endkappenelektroden und eine mittlere Ringelektrode. Zwischen der Ringelektrode und den Endkappenelektroden liegt eine Überlagerung einer Gleich- und einer Wechselspannung an. Während einer Analyse wird die Amplitude des Wechselspannungsanteils erhöht. Je nach Ionen-Masse werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor. In der *Penning-Falle* führt eine Kombination von zeitlich konstantem elektrischem Feld und ebenfalls zeitlich konstantem Magnetfeld zu einer Speicherung der Ionen.

Daneben existieren auch *Flugzeit-Massenspektrometer* (TOF, time of flight), die ausnutzen, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und leichte Ionen deshalb schneller sind als schwere.

Als *Detektoren* eignen sich Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher) oder Faraday-Detektoren, bei denen der Ionenstrom auf einen auf konstantem Potential gehaltenen Metallbecher trifft, was sich als Spannungsabfall an einem hochohmigen Zufluss-Widerstand bemerkbar macht.

² **Quadrupol:** Anordnung zweier gleicher Dipole in entgegengesetzter Orientierung (antiparallel), so dass die einzelnen Ladungen/Magnetpole die Ecken eines Rechtecks beschreiben.

4 Experimenteller Teil

4.1 Beladung des Harzes

Für die Synthese wurde ein TentaGel-Harz mit einem Linker aus Tritylchlorid verwendet, das den C-Terminus voll schützt. Die Startamino­säure Fmoc-Cys(Trt)-OH wurde im 4-fachen Überschuss eingesetzt, um die Kopplungseffizienz zu erhöhen. Folgende Substanzen wurden in einen Schüttelkolben gegeben:

0,1 mmol	TentaGel	(400 mg)
0,4 mmol	Fmoc-Cys(Trt)-OH	(234 mg)
0,8 mmol	DIPEA	(699 µl)

Diisopropylethylamin dient als Hilfsbase zum Abfangen des entstehenden HCl. Es wurde eine Stunde im Batch-Gefäß geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 ml Methanol zum Abfangen von Tritylgruppen.

4.2 Überprüfung der Kopplungseffizienz

Die erfolgreiche Kopplung der Startamino­säure an die Matrix ist Voraussetzung für die weitere Peptidsynthese. Alle künftigen Kopplungsschritte verlaufen nahezu quantitativ. Der Test beruht auf der Absorption des aromatischen Dibenzofulvens im ultravioletten Spektralbereich. Es entsteht bei der Abspaltung der Fmoc Schutzgruppen mit Piperidin. 1,35 mg des Harzes wurden entnommen, in eine Küvette mit 3ml Piperidin-DMF überführt, und 10 Minuten inkubiert. Eine weitere Küvette mit Piperidin-DMF diente als Referenz.

$$E_{290\text{nm}, \text{Sample}} = 0,571$$

$$E_{290\text{nm}, \text{Blank}} = 0,331$$

Die Beladung des Harzes³ Z [mmol/g] errechnet sich aus:

$$Z = (E_{\text{Sample}} - E_{\text{Blank}}) * X / (e * Y * l) \quad [\text{mmol} / \text{g}]$$

$$E : \quad \text{Extinktion} \quad \quad \quad DE = 0,240$$

$$X : \quad \text{Volumen des Lösemittel [ml]} \quad \quad \quad X = 3 \text{ ml}$$

³ aus: Fluka Chemika, Colorimetric tests for quantitative monitoring of coupling efficiency

Y:	Gewicht des Harzes [g]	Y = 1,35 mg
l:	Küvettenlänge [cm]	l = 1 cm
e:	molarer Extinktionskoeffizient	e = 5800 [l / (mol * cm)]

Somit lag eine Beladung von 0,092 mmol / g Harz vor, oder absolut (bei einem Einsatz von 400 mg Harz) eine Beladung von 0,037 mmol. Dies entspricht einer Ankopplungseffizienz von ca. 37 %.

4.3 Peptidsynthese

Die Ankopplung der Aminosäuren zwei bis zehn erfolgte vollautomatisch über Nacht in einem Peptidsyntheseautomaten. Zur Aktivierung der Carboxyfunktion der anzukoppelnden Aminosäuren wurden diese zunächst mit TBTU (O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-Tetra-Methyluroniumtetrafluoroborat) in intermediäre Aktivester überführt.

Folgende Chemikalien wurden jeweils in Plastikröhrchen mit Septum gegeben:

0,4 mmol Fmoc-AS (vgl. Tabelle 1)

0,4 mmol TBTU (125 mg)

Tabelle 1: Eingesetzte Substanzmengen der Aminosäuren

Aminosäure	Molekulargewicht	eingesetzte Menge
Fmoc-Leu-OH	353,4 g/mol	128,4 mg
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5 g/mol	187,4 mg
Fmoc-Pro-OH	337,5 g/mol	135,0 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8 g/mol	259,5 mg
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,8 g/mol	234,3 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8 g/mol	259,5 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8 g/mol	259,5 mg
Fmoc-Leu-OH	353,4 g/mol	141,4 mg
Fmoc-Phe-OH	387,5 g/mol	155,0 mg
Fmoc-Gly-OH	297,5 g/mol	119,0 mg
Fmoc-Gly-OH	297,5 g/mol	119,0 mg
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459,5 g/mol	183,8 mg

Als problematisch erwies sich, dass die Abdeckung eines Röhrchens undicht war, so dass mit einer fehlerhaften Reaktion gerechnet werden musste. Um welche Auswirkungen es sich im Detail handelte zeigte erst die massenspektrometrische Untersuchung.

Es wurde 20 % DIPEA in DMF (v/v) hergestellt, von der pro Kupplung 0,8 mmol als Hilfsbase automatisch zugegeben wurden. Ein Synthesezyklus umfasst folgende Arbeitsschritte: waschen (50 s), Abspaltung mit Piperidin (2-6 min), waschen (100 s), AS-Aktivierung (4 min), Kupplung (40 min), waschen (50 s)

4.4 Schutzgruppenabspaltung, Abspaltung vom Harz

Unter Zusatz von TFA kommt es zu einer Simultanabspaltung der Schutzgruppen sowie des Peptids vom Träger. Bei Säurespaltung ist darauf zu achten, dass reaktive Carbokationen als Alkylierungsmittel entstehen, weshalb folgende Scavenger zum Einsatz kommen:

Ethandithiol für Cys, Anisol für Phe (geeigneter Kationenfänger, da das Peptid kein Methionin enthält) und Wasser zum Quenchen von Tritylkationen.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde das vom Harz abgespaltene ungeschützte Peptid in eiskaltem Ether gefällt und zunächst auf Eis gehalten. Die Lösung wurde über eine Glasfritte abfiltriert und mit eiskaltem Diethylether gewaschen. Trocknung erfolgte im Vakuumexsikator. Anschliessend wurde wässrige Essigsäurelösung zugegeben und lyophilisiert.

4.5 Reinigung des Peptids mittels HPLC

Eluiert wurde mittels eines Gradienten von 90% Puffer A / 10 % Puffer B nach 10 % Puffer A / 90 % Puffer B. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf 4 ml / min gehalten, woraus sich ein Druck von 80-140 kg/cm² (entsprechend 80-140 bar) ergab.

Die Detektion der eluierten Peptide erfolgte photometrisch im ultravioletten Spektralbereich bei 214 nm. Bei dieser Wellenlänge lassen sich $n \rightarrow \pi^*$ - Übergänge der Peptidbindungen nachweisen. Das Peptid lag durch den Zusatz von Trifluoressigsäure protoniert vor, was durch Ionenpaarbindung die erhaltenen Peaks sehr eng hält und eine Normalverteilung nach Gauss verhindert.

Die kontinuierliche Steigung der gemessenen Extinktion, die normalerweise aufgrund des angelegten Acetonitrilgradienten und dessen Eigenabsorption entstehen würde, kann durch eine Abnahme der TFA Konzentration von Puffer A nach Puffer B minimiert werden.

Es wurde sowohl das unter 4.1-4.4 synthetisierte Peptid gereinigt, das aufgrund des undichten Röhrchens vermutlich nicht korrekt vorlag (Probe: „Dyn. fehl“), als auch ein analog synthetisiertes Dynorphin A aus vorhergegangenen Praktika. Letzteres diente als Ausgangsstoff für die weiter beschriebenen Arbeitsschritte.

Während des Reinigungszyklus wurden jeweils die Eluate des für die Substanz in Frage kommenden Peaks aufgefangen (Elutionszeit Fehlpeptid: 16 min, vollständiges Peptid: 20 min), die übrigen Fraktionen direkt verworfen. Die im Lösungsmittelüberschuss gereinigten Rohpeptide wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Es wurden 22 mg des korrekt synthetisierten Rohpeptids erhalten.

4.6 Zyklisierung des Peptids

Es wurden 220 ml einer 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung (1,739 g) mit 20 % DMSO in einem 250 ml Rundkolben vorgelegt und mit Ammoniak auf pH 8,2 eingestellt. Nach Zugabe des Rohpeptids (22 mg) wurde für 7 Stunden unter Eiskühlung gerührt.

Überblick :

220 ml	Aqua dest.	
100 mM	Ammoniumhydrogencarbonat	(1,739 g)
11 ml	DMSO	
22 mg	Rohpeptid, rein	

Die Zyklisierungsreaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von Eisessig gestoppt, wobei unter Bildung von Ammonacetat der pH-Wert auf 7 abgesenkt wurde.

Mit Hilfe einer RP-Chromatographie an LiChrosep RP18 wurde DMSO und Salz aus der Reaktionslösung entfernt. Die Säule wurde mit Wasser konditioniert, im Anschluss beladen, gespült und mit 80 % Acetonitril eluiert. Das erhaltene Produkt wurde wiederum lyophilisiert.

4.7 Erneute Reinigung mittels HPLC

Aufgrund möglicher Nebenreaktionen bei der Zyklisierung wurde nun das Produkt wiederum durch HPLC aufgereinigt. Das Vorgehen gestaltete sich analog zu der unter 4.5 beschriebenen Reinigung. Das zuletzt erhaltene reine Peptid wurde erneut lyophilisiert.

4.8 Massenspektrometrie

Es wurden mit einem ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer die Massenspektren der Produkte (offenkettig, Peptid mit unbekannter Fehlstelle, sowie beide cyclischen Reinigungsprodukte der finalen HPLC) aufgenommen:

Probe	Theoretische Masse (g/mol)	Messwert	Erläuterung
offen	1567	1567	Dynorphin A(1-13) Amid
fehl	unbekannt	1512	ungekoppeltes Glycin
cycl. Peak1	1565	1565	(Cys ^{8,13})-Dynorphin A(1-13) Amid
cycl. Peak2	unbekannt	3135	Dimer

Bei allen Werten handelt es sich um Rundungen, die für die Beurteilung des Syntheseerfolges ausreichen, allerdings nicht die Messgenauigkeit der verwendeten Geräte repräsentieren. Für detaillierte Werte unter Berücksichtigung der monoisotopischen bzw. durchschnittlichen Molekülmassen sei auf die entsprechenden Datenblätter im Anhang verwiesen.

5 Literatur

Design and Synthesis of Highly Potent and Selective Cyclic Dynorphin A Analogues
Kawasaki et al, J. Med. Chem. 1990, 33, 1874-1879

Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl Sulfoxide, Scope and Applications
Tam et al, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6657-6662

Echner, Bayer. Praktikumsskriptum zur Peptidsynthese.
http://www.pci-uni-tuebingen.de/bayer/Aktuell/Versuche/OBC_Peptidsynthesen.htm

Electrospray Ionisation for mass spectrometry of large biomolecules
Fenn et al, Scienc. 1989 Oct 6; 246 (4926): 64-71

A Appendix

Strukturformeln aller eingesetzten Aminosäuren

Messwerte ESI:

Sequence Information

Display Report, Sample „Dynorphin offen“

Display Report, Sample „Fehl Dynorphin offen“ (ohne Gly)

Display Report, Sample „Dynorphin cycl. Peak 1“

Display Report, Sample „Dynorphin cycl. Peak 2“ (Dimerisiert)