

**Synthese und spektroskopische Untersuchung
Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen
und deren Anwendung in der Sensorik**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von
Rolf Tünnemann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2000

Dekan: Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. G. Jung

in der Zeit von März 1997 bis April 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die große Freiheit beim Bearbeiten des Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein Dank gilt

meinem Kollegen Philipp Grosche für die freundschaftliche Zusammenarbeit in 4E02, für Diskussionen über organische Chemie, für die tatkräftige Unterstützung bei der Entwicklung des „Braunschen Kapillarhalters“ und für den Muskelkater, der manchmal unvermeidlich war.

den Kollegen Dietmar Leipter und Jürgen Mack für die mir zur Verfügung gestellten Ausgangsverbindungen und für hilfreiche Ideen.

allen Kooperationspartnern vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Tübingen, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Hans-Martin Haake, Herrn Oliver Birkert und Herrn Martin Mehlmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gauglitz für Untersuchungen mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie und für die kreative Zusammenarbeit.
- Frau Frauke Palmer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hoffmann, die trotz des einen oder anderen Mißverständnisses noch mit mir redet, für die Cyclopeptid-IR-Messungen.
- Herrn Dr. Hans-Joachim Egelhaaf, der trotz chronischen Zeitmangels die Fluoreszenzuntersuchungen durchführte.

Herrn Dr. Stefan Pelzer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wohlleben für die hilfreiche Unterstützung bei der Vancomycin-Fermentation.

Herrn Roderich Süßmuth für die gute Zusammenarbeit bei der Vancomycin-HPLC-MS-Analytik.

Herrn Bernd Thern, Herrn Felix Reutter, Herrn Roderich Süßmuth, Herrn Dietmar Schmid und Herrn Tilmann Walk für die Aufnahme von Massenspektren.

Frau Ursula Becker für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei organisatorischen Fragen aller Art.

Herrn Eberhard Braun für die Konstruktion des Kapillarhalters und seine Hilfsbereitschaft.

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für das gute Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Kirstin und meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Allgemeiner Teil | 4 |
| 2.1. Markierungsfreie optische Detektion | 4 |
| 2.1.1. Reaktionen an Oberflächen | 5 |
| 2.1.2. Reflektometrische Interferenzspektroskopie | 6 |
| 2.1.2.1. Aufbau der Meßapparatur | 8 |
| 2.1.2.2. Parallelisierter Aufbau für das HTS | 10 |
| 2.2. Oberflächenmodifizierung | 11 |
| 2.2.1. Silanisierung von SiO ₂ -Oberflächen | 11 |
| 2.2.2. Oberflächenbeschichtungen für Synthesen und biologische Tests | 13 |
| 2.3. Fluoreszenzspektroskopie | 15 |
| 2.3.1. Fluoreszenzanisotropie | 15 |
| 2.3.2. Excimer-Fluoreszenz | 16 |
| 3. Online-Monitoring von Festphasensynthesen | 18 |
| 3.1. Einleitung | 18 |
| 3.1.1. Aufgabenstellung | 20 |
| 3.2. Ergebnisse und Diskussion | 21 |
| 3.2.1. Einfluß des Lösungsmittels | 21 |
| 3.2.2. Oberflächenmodifizierung | 23 |
| 3.2.3. Monitoring von Peptidsynthesen | 25 |
| 3.2.3.1. Referenzsynthese und –analytik | 25 |
| 3.2.3.2. Monitoring der Kupplung von Aminosäuren | 28 |
| 3.2.3.3. Monitoring der Synthese eines Hämagglutinin-Epitops mit anschließender Antikörper-Bindung | 35 |
| 3.2.4. Synthese von trisubstituierten 1,3,5-Triazinen | 39 |
| 3.2.4.1. Synthese-Monitoring | 40 |
| 3.2.4.2. Synthese in Mikrotiterplatten und Screening | 44 |
| 3.2.4.3. Referenzsynthese und –analytik | 51 |
| 3.2.5. Festphasensynthese eines Thrombininhibitors | 55 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 3.2.6. | Diskussion | 60 |
| 4. | Überwachung des Fermentationsprozesses von Glycopeptid-Antibiotika mit RfS | 63 |
| 4.1. | Einleitung | 63 |
| 4.1.1. | Glycopeptid-Antibiotika | 63 |
| 4.1.1.1. | Struktur und Wirkungsweise | 64 |
| 4.1.2. | Aufgabenstellung | 66 |
| 4.2. | Ergebnisse und Diskussion | 66 |
| 4.2.1. | Bestimmung der Vancomycin-Konzentration in Fermentationsproben mit RfS | 66 |
| 4.2.2. | Quantifizierung mit HPLC-MS-MS-Analytik | 71 |
| 4.2.3. | Zusammenfassende Diskussion | 75 |
| 5. | Untersuchungen von Cyclopeptid-Ligand-Wechselwirkungen und Charakterisierung beschichteter Oberflächen | 76 |
| 5.1. | Einleitung | 76 |
| 5.1.1. | Aufgabenstellung | 77 |
| 5.2. | Ergebnisse und Diskussion | 78 |
| 5.2.1. | Synthese von Cyclopeptiden | 78 |
| 5.2.2. | IR-spektroskopische Untersuchungen | 82 |
| 5.2.2.1. | Beschichtung des ATR-Kristalls | 84 |
| 5.2.2.2. | IR-Spektren der Cyclopeptide | 89 |
| 5.2.3. | Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Cyclohexapeptiden | 99 |
| 5.2.3.1. | Konformative Beweglichkeit von Cyclopeptiden in Lösung | 100 |
| 5.2.3.2. | Anbindung der Cyclopeptide auf Kieselgel | 103 |
| 5.2.3.3. | Untersuchung von Cyclopeptidschichten auf Kieselgel | 105 |
| 5.2.4. | Diskussion | 110 |
| 6. | Experimenteller Teil | 112 |
| 6.1. | Material und Methoden | 112 |
| 6.1.1. | Chemikalien und Lösungsmittel | 112 |
| 6.1.2. | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie | 112 |
| 6.1.3. | ES-Massenspektrometrie | 113 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 6.1.3.1. | HPLC-MS-MS-Analyse von Fermentationsproben | 113 |
| 6.1.4. | UV/VIS-Spektroskopie | 114 |
| 6.1.5. | Fluoreszenzspektroskopie | 114 |
| 6.1.6. | FT-ATR-IR-Spektroskopie | 114 |
| 6.1.7. | Reflektometrische Interferenzspektroskopie | 115 |
| 6.1.8. | Arbeitshilfe zur Synthese in Kapillaren | 115 |
| 6.1.9. | Puffer- und Nährlösungen | 116 |
| 6.1.10. | Bakterienstämme | 117 |
| 6.1.11. | Fermentationsprozeß | 117 |
| 6.1.12. | Kaiser-Test | 117 |
| 6.1.13. | Automatische Peptidsequenzierung | 117 |
| 6.1.14. | Automatisierte Synthese von Peptiden | 118 |
| 6.1.15. | Bestimmung der Beladung von Polymerharzen, Kieselgel und CPG | 118 |
| 6.2. | Modifizierung von SiO₂-Oberflächen | 118 |
| 6.2.1. | Beschichtung von CPG, Glasplättchen und Kapillaren | 118 |
| 6.2.1.1. | Silanisierung | 118 |
| 6.2.1.2. | Umsetzung mit Jeffamine ED 600 bzw. Diaminopropan | 119 |
| 6.2.1.3. | Anbindung des Rink-Amid-Linkers an CPG | 119 |
| 6.2.1.4. | Anbindung eines photolabilen Linkers an Kapillaren | 119 |
| 6.2.2. | Modifizierung von Silizium-Kristallen | 120 |
| 6.2.2.1. | Silanisierung | 120 |
| 6.2.2.2. | Beschichtung mit Peptiden | 120 |
| 6.2.3. | Beschichtung von Kieselgel mit Cyclopeptiden | 121 |
| 6.2.3.1. | Silanisierung | 121 |
| 6.2.3.2. | Cyclopeptid-Anbindung | 121 |
| 6.3. | Festphasensynthesen | 122 |
| 6.3.1. | Belegung von 2-Chlortritylchlorid-Harz mit Aminosäuren | 122 |
| 6.3.2. | Automatisierte parallele Peptidsynthese | 122 |
| 6.3.3. | Abspaltung und Aufarbeitung | 123 |
| 6.3.4. | Zyklisierung der seitenkettengeschützten Peptide in Lösung | 124 |
| 6.3.5. | Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen | 124 |
| 6.3.6. | Manuelle Synthese der Tri- und Tetrapeptide für die Anbindung auf Oberflächen | 124 |
| 6.3.7. | Synthese von cyclo[Lys-Dpr(Pyr)-Lys-Ala-Lys-Asn] | 125 |
| 6.3.8. | Synthese des Arginin-Polyethylenglycol-Konjugats | 126 |

IV

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.3.9. | Synthese von Peptiden auf CPG, Glasplättchen und RfS-Transducern | 126 |
| 6.3.10. | Synthese substituierter 1,3,5-Triazine | 127 |
| 6.3.10.1. | Polymerharzgebundene Synthesen | 127 |
| 6.3.10.2. | Synthese einer Triazin-Bibliothek in einer RfS-Mikrotiterplatte | 128 |
| 6.3.10.3. | Synthese auf modifizierten SiO ₂ -Oberflächen | 128 |
| 6.3.11. | Synthese von N-(N-Cyclooctyl-S- α -aspartyl)-2R,S-[N-(2-amidino)-4-piperidyl-oxylethyl]-piperidin am PS-Wang-Harz und am SASRIN-Harz | 129 |
| 7. | Zusammenfassung | 131 |
| 8. | Literatur | 134 |

Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurde entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.*, **1984**, *138*, 9-37] der Ein- oder Dreibuchstaben-Code verwendet.

| | |
|-------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| Ahx | 6-Aminohexansäure |
| AMD | Aminodextran |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATR | Abgeschwächte Totalreflexion |
| BMBF | Bundesministerium für Bildung und Forschung |
| Boc | tert.-Butyloxycarbonyl |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CE | Kapillarelektrophorese |
| Dde | 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl |
| DCM | Dichlormethan |
| DIC | N,N'-Diisopropylcarbodiimid |
| DIEA | Diisopropylethylamin |
| DMAP | N,N-Dimethylaminopyridin |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| EDT | Ethandithiol |
| ES | Elektrospray-Ionisation |
| FIA | Fließinjektionsanalyse |
| FT-ICR | Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| Fmoc-Atg-OH | α -(N-Fmoc- β -aminopropionyl)- ω -(carboxymethylcarbamoyl)-tetra(oxyethylen) |
| GC | Gaschromatographie |
| GOPTS | 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan |
| HA-Epitop | Aminosäure-Sequenz YPYDVPDYA aus dem Protein Hämagglutinin des Influenza-Virus |
| HFIP | Hexafluorisopropylalkohol |
| HOAc | Essigsäure |

VI

| | |
|---------------------|---|
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HOSu | N-Hydroxysuccinimid |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| HTS | <i>high throughput screening</i> |
| MALDI-TOF | <i>matrix assisted laser desorption-time of flight</i> |
| MAS | <i>magic angle spinning</i> |
| MeOH | Methanol |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMM | N-Methylmorpholin |
| NMR | magnetische Kernresonanzspektroskopie |
| NMP | N-Methylpyrrolidon |
| OVA | Ovalbumin |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PBS | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Pmc | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl |
| Pyr | 1-Pyrenearbonsäure |
| RIfS | Reflektometrische Interferenzspektroskopie |
| RT | Raumtemperatur |
| SASRIN [®] | <i>super-acid-sensitive-resin</i> |
| TBTU | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIS | Triisopropylsilan |
| Trt | Trityl |
| UV | Ultraviolett |

1. Einleitung

Die Kombinatorische Chemie hat sich zu einer etablierten Technik bei der Suche und der Optimierung von Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung entwickelt. Zur Herstellung der für diesen Zweck benötigten hohen Anzahl an Testverbindungen wurden in den letzten Jahren Syntheseverfahren an fester Phase in großem Umfang entwickelt [bal 96, her 96, frü 96, jun 96, tho 96, her 97, nef 97, jun 99]. Während bei der Leitstrukturoptimierung multiple parallele Synthesen im Milligramm- bis Gramm-Maßstab durchzuführen sind, erfordert das Primär-Screening extrem viele und miniaturisierte Syntheseansätze. Im Hinblick auf eine effiziente Lösung dieser Aufgabenstellung sollte die kombinatorische Synthese eng an den Screening-Prozeß nach aktiven Verbindungen gekoppelt werden [sal 97, bla 98, gan 98].

Zwei Trends in diesem Bereich sind hierbei von Bedeutung: Der parallelen Synthese von charakterisierten Einzelverbindungen wird der Vorzug vor der Herstellung komplexer Substanzgemische gegeben, weil sich damit die Aussagekraft von Screening-Ergebnissen beträchtlich erhöht. Ein zweiter Trend besteht in der Miniaturisierung der Synthesen, um den Verbrauch an Synthonen, Reagenzien und Lösungsmitteln zu verringern [jun 99]. Wenn dabei zusätzlich ein Hochdurchsatzsyntheseverfahren realisiert wird, kann die erforderliche Lagerungsdauer der oft empfindlichen Verbindungsbibliotheken verkürzt werden.

Die mittlerweile etablierten *high-throughput-screening*-Systeme (HTS-Systeme), die in der pharmazeutischen Chemie am Anfang der Suche nach neuen Leitstrukturen stehen, beruhen auf der hohen Affinität und Selektivität biochemischer Rezeptor-Ligand-Systeme. Grundlage der meisten Screening-Verfahren für das HTS ist die Detektion biomolekularer Wechselwirkung, beruhend auf klassischen Verfahren der radioaktiven Markierung und optischen Methoden, wie Enzymassays oder fluoreszenzbasierten Techniken.

Der direkte Weg, sowohl die Synthese von Bibliotheken als auch das Screening nach darin enthaltenen aktiven Verbindungen zu verknüpfen, ist die Durchführung von beidem auf demselben Material. Die Anwendung fluoreszenzbasierter Detektionsmethoden erlaubt dabei die einfache Identifizierung der aktiven Verbindungen. Im einfachsten Fall werden nach einer „Split and Combine“-Synthese die harzgebundenen Verbindungen direkt einem Bindungsassay unterzogen [lam 91]. Durch Auslesen der fluoreszierenden Harz-Beads können die aktiven Verbindungen isoliert und charakterisiert werden. Dieses Vorgehen wurde durch die Entwicklung großporiger, hydrophiler Polyethylenglycolharze [mel 92, rad 99], die Enzymassays auch im Inneren der Beads erlauben, einem breiteren Anwendungsspektrum zugänglich gemacht. Eine interessante Alternative zum on-bead-Screening ist das Screening von

Microarrays auf funktionalisierten Oberflächen: Das bekannteste Beispiel sind DNA-Microarrays, die inzwischen routinemäßig für Expressions- und Genomanalysen verwendet werden. Hierbei werden Oligonucleotide direkt auf der Chipoberfläche synthetisiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten DNA-Segmenten auf mögliche Hybridisierung getestet.

Die Spot-Synthese von Peptidbibliotheken auf Cellulose-Membranen mit anschließendem fluoreszenzbasiertem Screening wurde von Frank et al. [fra 96] vorgestellt. In neueren Arbeiten wurde aufgrund der höheren chemischen Beständigkeit auch auf Polyethylenglycol-Membranen synthetisiert.

Alle bisher vorgestellten Varianten der Verknüpfung von Synthese und Screening erfordern eine Markierung von einem der Bindungspartner und erlauben keine kinetischen Studien, weder während der Synthese noch während des Bindungsassays. Dagegen erlauben die wenigen markierungsfreien Techniken, die sich in den letzten Jahren zur Detektion biomolekularer Erkennung durchsetzen konnten, bisher keine parallelisierte Analytik und sind daher für ein Screening nicht geeignet.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines BMBF-Projekts durchgeführt, dessen Ziel die Entwicklung eines HTS-Systems auf Basis einer markierungsfreien Technik, der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS), ist [bre 93, gau 93]. Innerhalb dieses Projekts wurde RIfS inzwischen parallelisiert, so daß ein Screening in speziellen Mikrotiterplatten mit 96 bzw. 384 Kavitäten möglich ist [rot 97, bre 98]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich Festphasensynthese und Screening auf einem Siliziumdioxid-Sensorsubstrat mit RIfS direkt aufeinanderfolgend analytisch verfolgen lassen. Ein Einsatz dieser Technik sowohl für die Verfolgung der Synthese von Wirkstoffbibliotheken sowie die anschließende Untersuchung der Wechselwirkungen mit biologischen Targets erscheint in hohem Maße attraktiv, da beide Operationen in ein und derselben Kavität ohne Abspaltung des Syntheseproduktes durchgeführt werden können. Im 3. Kapitel dieser Arbeit wird die Methodenentwicklung zu kombinatorisch chemischen Synthesen auf der Glasoberfläche der Mikrotiterplatten beschrieben.

In Kapitel 4 wird untersucht, ob RIfS zur Verfolgung von Biosynthese-Prozessen geeignet ist. Konventionelle analytische Methoden erlauben keine schnelle Prozesskontrolle oder kontinuierliche Umweltanalytik. Fällung, Zentrifugation, GC, HPLC, CE und andere zeitaufwendige Schritte der Analyse erstrecken sich über einen größeren Zeitraum. Die Forschung im Bereich der Sensorik gewinnt daher immer mehr an Bedeutung [spi 97, jun 99].

Am Beispiel der fermentativen Herstellung von Glycopeptid-Antibiotika werden die Grundlagen für ein Online-Monitoring der Produktbildung untersucht.

Ein jüngeres Anwendungsgebiet kombinatorisch chemischer Synthesen ist die Entwicklung synthetischer Rezeptorkollektionen im Hinblick auf das Auffinden molekularer Rezeptoren für die Chemosensorik. Chemosensoren sind kleine Meßwertempfänger für spezielle Anwendungsbereiche. Man benötigt hierzu chemisch sensitive Schichten, die durch Wechselwirkung mit dem zu erfassenden Stoff die physikalisch-chemischen Eigenschaften ändern. Diese Phänomene werden von mikroelektronischen Bauteilen in ein elektrisches Signal umgewandelt, das anschließend von Datenerfassungssystemen weiterverarbeitet werden kann [dic 94]. Niedermolekulare Analyte können nur schwer identifiziert werden, wenn sie lediglich schwache, unspezifische intermolekulare Wechselwirkungen mit Sensorsubstraten eingehen. Durch ein Screening synthetischer Rezeptorkollektionen mit den oben für das Pharmascreeing beschriebenen Methoden können wirkungsvolle Rezeptoren gefunden werden, die mit Transducern zu selektiven Chemosensoren kombiniert werden können.

Von Leipert et al. [lei 98a, lei 99] und Weiß et al. [wei 99] wurden zyklische Hexapeptide, die in hoher Diversität hergestellt werden können, als sensitive Schicht auf unterschiedlichen Sensorsubstraten verwendet. Hierbei wurde u. A. selektive Wechselwirkungen zwischen Arginin und Cyclopeptiden detektiert.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand nicht die Suche nach neuen Cyclopeptid-Ligand-Paaren, sondern der Versuch, ein genaueres Verständnis der erwähnten Wechselwirkungen zu erlangen. Kapitel 5 befaßt sich daher mit der Charakterisierung der beschichteten Oberflächen und der Untersuchung der Wechselwirkungsmechanismen. Hierfür werden IR- und fluoreszenzspektroskopische Methoden angewandt.

Zentrales Element aller in dieser Arbeit behandelten Themen sind chemisch funktionalisierte Siliziumoxidoberflächen. Ein Schwerpunkt wird deshalb auf die Charakterisierung der Beschichtungen bezüglich chemischer Reinheit, Beladungsdichte und Homogenität gelegt.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Markierungsfreie optische Detektion

Markierungsfreie Techniken zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen basieren zum Teil auf massensensitiven Prinzipien, z.B. Quarzmikrowaagen [gui 90], hauptsächlich aber auf optischen Verfahren, wie z.B. der Oberflächenplasmonen-Spektroskopie [lie 83, kno 98]. In dieser Arbeit wird ausschließlich die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) [bre 93, gau 93] näher betrachtet.

Die Nachweisgrenze der markierungsfreien Verfahren liegt deutlich über den Grenzen der Verfahren mit markierten Komponenten. Die Stärke der markierungsfreien Detektion liegt darin, daß die Bindungsprozesse an der Oberfläche unmittelbar beobachtet werden können, ohne daß eine Modifizierung der bindenden Komponente notwendig ist. Die Analyse der Bindungskurve erlaubt dann die kinetische und thermodynamische Charakterisierung der Wechselwirkung.

Es können direkte und indirekte Testformate angewendet werden. Beiden ist gemein, daß einer der wechselwirkenden Partner an die Transducer-Oberfläche gebunden ist.

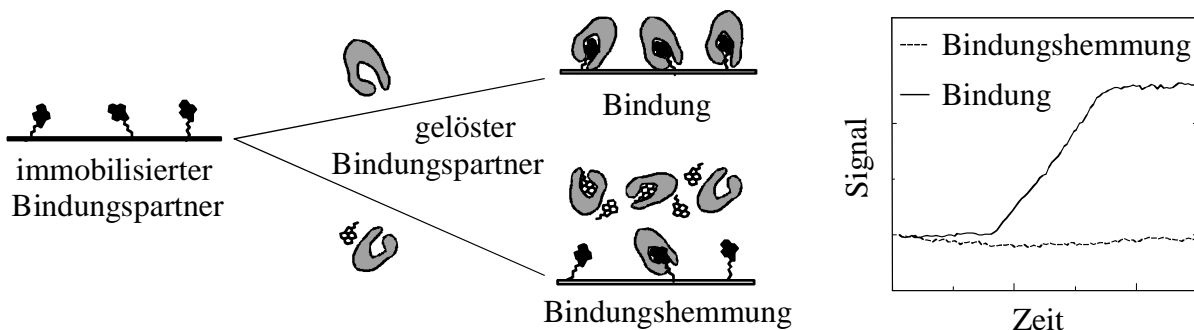


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Bindungshemmtests (links) und der resultierenden Bindungskurven (rechts): Die Bindung eines Biomoleküls an einen auf der Oberfläche immobilisierten Liganden kann durch Zugabe eines anderen bindenden Moleküls unterdrückt werden. Hierbei kann entweder die Leitstruktur oder die Testsubstanz auf der Oberfläche immobilisiert sein.

Üblicherweise wird die Bindung eines großen Biomoleküls an den auf der Oberfläche immobilisierten Liganden untersucht, da so höhere Signalintensitäten erhalten werden. Ist eine bekannte Leitstruktur vorhanden, kann diese auf der Oberfläche immobilisiert werden. Bei indirekten Verfahren wie dem Bindungshemmtest erhält man durch Vorinkubation von Testsubstanz und Targetprotein ein Gleichgewicht in Lösung, das von der Bindungskonstante, aber auch von den Konzentrationen der Partner abhängt. Dieses Gleichgewicht steht in

Konkurrenz zur Bindung des Targetproteins an die immobilisierte Leitstruktur. Je nach Größe der Bindungskonstante der beiden Gleichgewichte wird die Bindung des Targets zur Oberfläche möglich sein oder im Extremfall vollständig unterdrückt werden (Abb. 2.1).

Nachteil dieses Ansatzes ist, daß eine kuppelbare Leitstruktur vorhanden sein muß. Außerdem muß die Aktivität der Leitstruktur durch die Immobilisierung erhalten bleiben.

Ebenfalls möglich ist die umgekehrte Vorgehensweise. Die Teststruktur wird auf der Transducer-Oberfläche immobilisiert, und anschließend wird die Target-Bindung durch eine bekannte Leitstruktur gehemmt.

Allerdings muß kritisch betrachtet werden, daß die Wechselwirkung hier nicht in homogener Phase stattfindet, sondern an einer Grenzfläche zwischen einer Komponente, die z.B. an einem oberflächengebundenen Hydrogel immobilisiert ist, und der wechselwirkenden Komponente in der angrenzenden Lösung [sha 94, sch 96]. Diese Tatsache birgt einerseits das Problem, daß die Oberfläche ebenfalls in Wechselwirkung mit den Reaktionspartnern tritt (attraktiv / repulsiv), andererseits die Dynamik immobilisierter Moleküle eingeschränkt ist. Zur Messung der Bindung von Biomolekülen an modifizierte Glas-Oberflächen müssen diese deshalb gegen unspezifische Wechselwirkungen abgeschirmt sein. Hierzu werden meist polymere Beschichtungen verwendet.

Polymere mit günstigen Eigenschaften für die biomolekulare Erkennung sind aus der Affinitätschromatographie bekannt [her 92]. Häufig verwendete Polymere in diesem Bereich sind Polysaccharide (Agarose, Zellulose), Polyacrylamide, Methacrylate und Polyethylenglycole. Für die Modifizierung von Transduceroberflächen ist Dextran, der Baustein der Agarose, erfolgreich eingesetzt worden [löf 90]. Neben der geringen unspezifischen Wechselwirkung ist vor allem die hohe Hydratisierung und Flexibilität dieses Polymers für Affinitätsreaktionen günstig. Ein weiteres wichtiges Polymer in diesem Zusammenhang ist Polyethylenglycol (PEG), das durch den effektiven Ausschluß anderer Polymere in wäßriger Umgebung sehr geringe Wechselwirkung mit Proteinen zeigt und damit eine effektive Abschirmung der Oberfläche erlaubt [har 92].

2.1.1. Reaktionen an Oberflächen

Die Bindung eines gelösten Reaktionspartners B an eine auf der Oberfläche immobilisierte Substanz A unter Bildung des Komplexes AB gehorcht im einfachsten Fall folgender Kinetik:



wobei k_a die Assoziations- und k_d die Dissoziationsratenkonstante bezeichnet.

Unter Durchflußbedingungen und bei hohen Überschüssen bleibt die Konzentration von B im Volumen konstant. Es ergibt sich somit ein Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung:

$$d\Gamma/dt = k_a (\Gamma_{\max} - \Gamma) - k_d \Gamma \quad (2)$$

mit Γ als Oberflächenbeladung an AB , Γ_{\max} als maximaler Bedeckung und c als Konzentration von A im Volumen. Integration ergibt:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot \left(1 - e^{-k_s t}\right) \quad (3)$$

mit der konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten k_s :

$$k_s = k_a \cdot c + k_d \quad (4)$$

und der Gleichgewichtsbeladung (Langmuir Isotherme):

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{\max} \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (5)$$

K ist hierbei die thermodynamische Gleichgewichtskonstante.

Dieses Verhalten gilt nur, wenn der Transport an die Oberfläche, d. h. die Diffusion keine Rolle spielt. Für Makromoleküle trifft dies nicht mehr zu, für die beim Reaktionsmonitoring verwendeten Synthesebausteine kann die Diffusion jedoch vernachlässigt werden.

2.1.2. Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) [bre 93, gau 93] basiert auf der Mehrfachreflexion von polychromatischem Licht an dünnen Schichten. In der Praxis wird ein Glaschip, der mit einer Interferenzschicht bedampft ist von unten durch einen Lichtleiter beleuchtet. Das reflektierte Licht wird über denselben Lichtleiter auf ein Diodenarray geleitet und somit spektral detektiert.

Beim Lichteinfall auf die Oberfläche bildet sich ein Reflexionsspektrum mit einem Interferenzmuster, das von den optischen Schichtdicken der einzelnen Schichten abhängt. In Abb. 2.2 ist zur Verbesserung der Übersichtlichkeit ein schräger Einfall des Lichtstrahls eingezeichnet, prinzipiell ändert sich bei senkrechtem Lichteinfall jedoch nichts.

Bei einer Änderung der optischen Schichtdicke nd einer der Interferenzschichten, z.B. durch Bindung von Molekülen an die Oberfläche, verschiebt sich das Interferogramm und damit auch die zur Auswertung herangezogenen Extrempunkte. Diese Änderung kann mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zeitaufgelöst gemessen werden (Abb. 2.3).

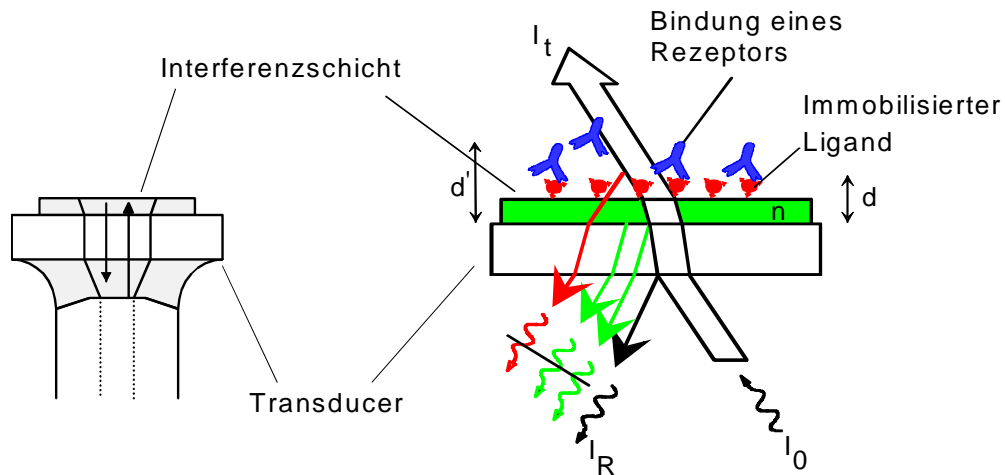


Abb. 2.2: Beleuchtung und Aufbau des Transducers: Beleuchtung und Detektion erfolgen durch einen Lichtleiter von der Unterseite des Transducers. Zwischen Lichtleiter und Transducer befindet sich ein Immersionsöl. An jeder Phasengrenze wird ein Teil des Primärlichts reflektiert. Die Interferenzschicht besteht aus Ta_2O_5 und SiO_2 und besitzt eine Dicke im Bereich der Wellenlänge sichtbaren Lichts. I_0 : Intensität des Primärlichts, I_R : Intensität des reflektierten Lichts, I_t : Intensität des durchgehenden Lichts.

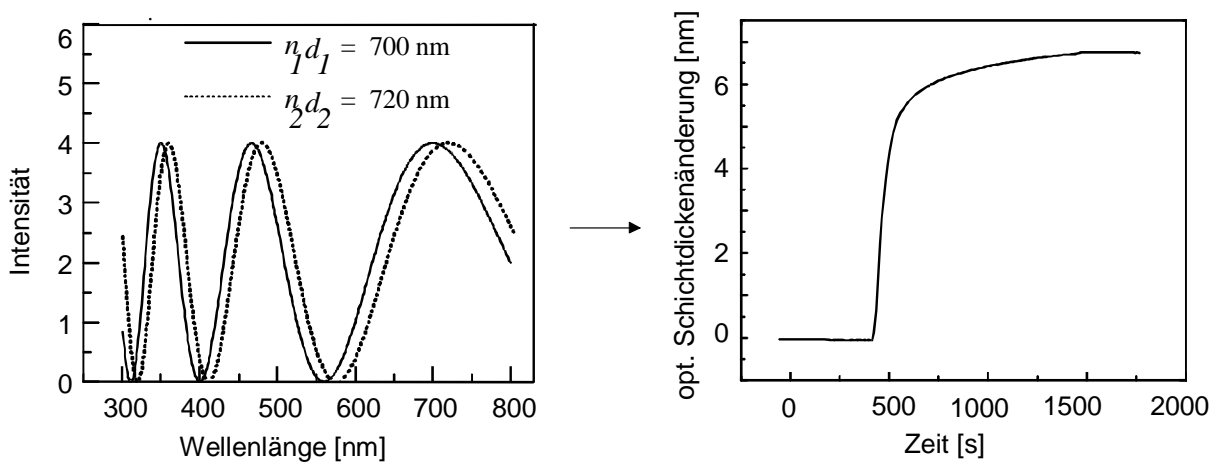


Abb. 2.3: Verschiebung des Interferenzmusters in Abhängigkeit von der optischen Schichtdicke und daraus resultierende Bindungskurve bei zeitaufgelöster Betrachtung.

Die optische Schichtdicke erhält man bei bekannter Ordnung und Lage eines Extremums. Dabei wird die Lage des Extremums durch Anpassung eines Polynoms zweiter Ordnung bestimmt. Falls an der Grenzfläche keine Phasensprünge auftreten, gilt für die Phasenverschiebung δ bei senkrechtem Strahleneinfall auf eine Schicht mit Brechungsindex n_1 und Dicke d_1 :

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d_1}{\lambda} \quad (6)$$

Dabei entspricht der Lichtweg der zweifachen optischen Schichtdicke $n_1 d_1$.

Man erhält für die reflektierte Intensität bei Interferenz der reflektierten Teilstrahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos \frac{4\pi n_1 d_1}{\lambda} \quad (7)$$

Die reflektierte Intensität ist wellenlängenabhängig. Für das Auftreten von Minima und Maxima der Intensität des reflektierten Lichts ergeben sich folgende Bedingungen:

$$m_{\text{extrem}} = \frac{2nd}{\lambda} \quad \text{mit } m_{\text{extrem}} = m_{\text{max}} = 1, 2, 3, \dots \quad (8)$$

und $m_{\text{extrem}} = m_{\text{min}} = 1/2, 3/2, 5/2, \dots$

Mit diesen Voraussetzungen kann die Ordnung eines Extremums aus der Lage zweier Extrema bestimmt werden. Aus Gleichung (4) erhält man für die Ordnung eines Extremums

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{\lambda_2 - \lambda_1} \quad (9)$$

Dabei sind λ_1 und λ_2 die Wellenlängen der Extrema, Δm die Differenz der Ordnungszahlen m_1 und m_2 . Also muß zur Bestimmung der Schichtdicke der Bereich zwischen zwei Extrema aufgezeichnet und ausgewertet werden.

Weiterhin hängt die Intensität des reflektierten Lichts vom Einfallswinkel ab. Die höchste Intensität ergibt sich bei senkrechtem Einfall.

Die genannten Beziehungen gelten streng genommen nur bei Betrachtung einer einzelnen Schicht. Bei Mehrschichtsystemen läßt sich unter Annahme der Gültigkeit von Gleichung (7) allerdings eine *scheinbare* Schichtdicke des Schichtsystems aus dem Interferenzmuster bestimmen.

2.1.2.1. Aufbau der Meßapparatur

Beim typischen Aufbau eines Einkanalmeßsystems wird das Licht einer Halogenlampe in einen Lichtleiter eingekoppelt und auf den Transducer geführt. Das reflektierte Licht wird mit demselben Lichtleiter über einen 2:1 Koppler in den Eingang eines Diodenarrayspektrometers geführt. Erfassung und Auswertung der Spektren sowie die Ansteuerung des Probenhandhabungssystems erfolgt über einen Personal Computer.

Der Laboraufbau für das Online-Monitoring einer automatisierten Synthese (vgl. Kapitel 3) ist in Abb. 2.4 gezeigt. Es wurde eine Durchflußmeßzelle verwendet, um die Zugabe der Reagenzien zu erleichtern und ein effektives Waschen der Transduceroberfläche nach den einzelnen Reaktionsschritten zu gewährleisten. Während der Reaktionszeit wurde allerdings

in statischem also ungerührtem Zustand gearbeitet. Die Zelle besitzt ein Volumen von $0,25 \text{ mm}^3$, die Größe der für die Synthese zugänglichen Oberfläche beträgt 5 mm^2 . Bei Annahme einer Oberflächenbeladung von 5 pmol/mm^2 und einer Konzentration der Reagenzien von $0,1 \text{ mol/l}$ wäre im Reaktionsvolumen ein Reagenzienüberschuß von 10^6 Äquivalenten bezüglich der reaktiven Gruppen auf der Oberfläche vorhanden. Dies bedeutet, daß die Verarmung der Reaktanden in der Lösung während der Reaktion vernachlässigbar ist und mit ruhenden Lösungen gearbeitet werden kann. Zudem ist der Verbrauch an Chemikalien aufgrund des kleinen Zellenvolumens sehr gering. Da die Meßzelle geschlossen ist, spielt das Verdampfen der Lösungsmittel auch bei längeren Reaktionszeiten keine Rolle.

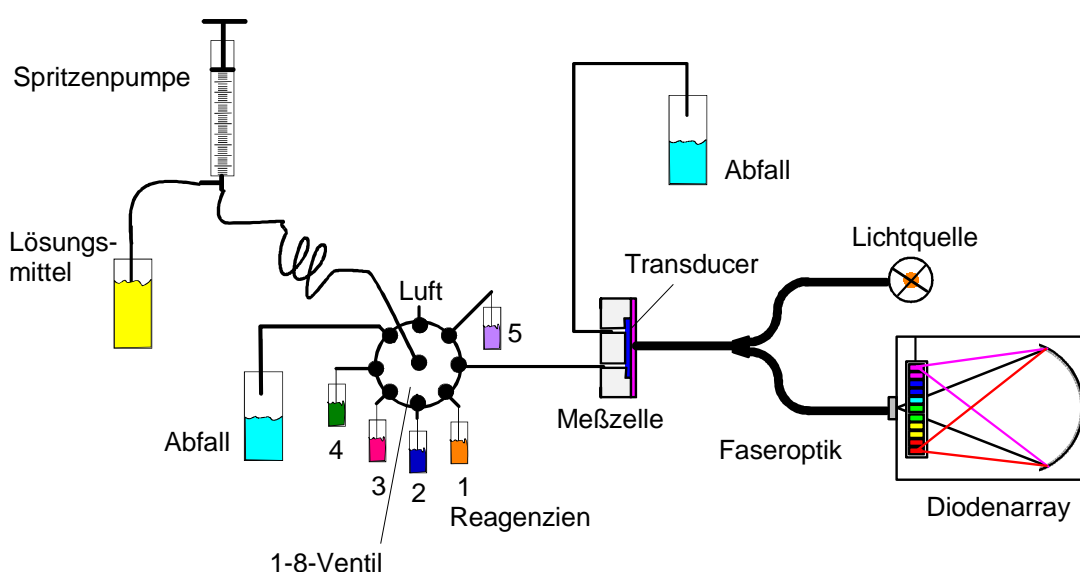


Abb. 2.4: Skizze des Meßaufbaus für das Online Reaktionsmonitoring: Über ein 8-Wege-Ventil können Lösungsmittel und bis zu 5 Reagenzien in die Meßzelle gepumpt werden. Während der Reaktionsdauer ruht die Reaktionslösung. Die Ansteuerung der Spritzenpumpe und des Ventils erfolgt über einen Personal Computer.

Über ein 8-Wege-Ventil können Lösungsmittel und bis zu 5 Reagenzien in die Meßzelle gepumpt werden. Über den letzten Ausgang des Ventils können verschiedene Fraktionen durch Luftsegmente getrennt werden. Da es bei diesem Aufbau nicht möglich ist, nacheinander mehrere Reagenzien für eine Reaktionsstufe zuzugeben, müssen vorgemischte Lösungen verwendet werden. Falls diese nicht über längere Zeiträume stabil sind, können sie unter Verwendung mehrerer Ausgänge des Ventils kurz vor der Reaktion gemischt werden.

2.1.2.2. Parallelisierter Aufbau für das HTS

Die reflektometrische Interferenzspektroskopie konnte durch Parallelisierung unter Verwendung des Standard-Mikrotiterplattenformats an die Erfordernisse des HTS angepaßt werden [rot 97, bre 98]. Hierzu werden spezielle Mikrotiterplatten benötigt, deren Boden aus einem Glas-Transducer besteht. Auf diese Glasplatte ist mit einem Silikonkleber die Kavitätenplatte aufgeklebt (Abb. 2.5). In dieser Arbeit wurden Mikrotiterplatten mit einer Kavitätenplatte aus Polypropylen verwendet, da diese im Gegensatz zu den häufig verwendeten Polystyrolplatten gegenüber den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln stabil sind.

Die Detektion erfolgt von der Transducerunterseite so, daß die Probenhandhabung von oben mittels eines Pipettierautomaten erfolgen kann. Der Einsatz von Standard-Mikrotiterplatten gestattet die Nutzung konventioneller Roboterlinien, macht allerdings die Verwendung von Fließinjektionssystemen unmöglich, so daß in ruhendem Probenvolumen (*stopped flow*) gemessen werden muß. Bei diffusionskontrollierten Reaktionen weisen die Bindungskurven wegen der Ausbreitung der Diffusionsgrenzschicht demnach eine \sqrt{t} -Gesetzmäßigkeit auf.

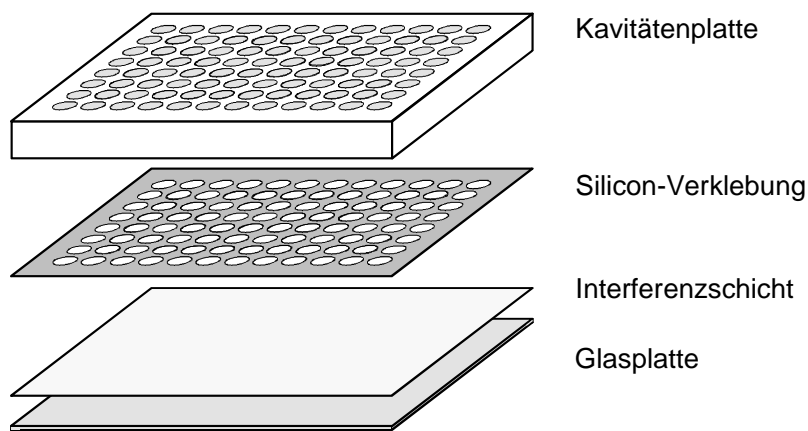


Abb. 2.5: Aufbau der RfS-Mikrotiterplatte. Die Kavitätenplatte aus Polystyrol oder Polypropylen ist mit einem Silikonkleber auf den Transducer geklebt. Die Polypropylenplatten sind gegenüber den meisten organischen Lösungsmitteln stabil.

Das optische Detektionsprinzip über eine CCD-Kamera macht das System formatunabhängig. Dadurch ist eine Erhöhung des Parallelisierungsgrades von 96 auf 384 Wells schon alleine durch die Anpassung der Software möglich, und die Beobachtung von hochparallelisierten Mikrotiterplatten auf der Basis von 1536 Wells ist denkbar.

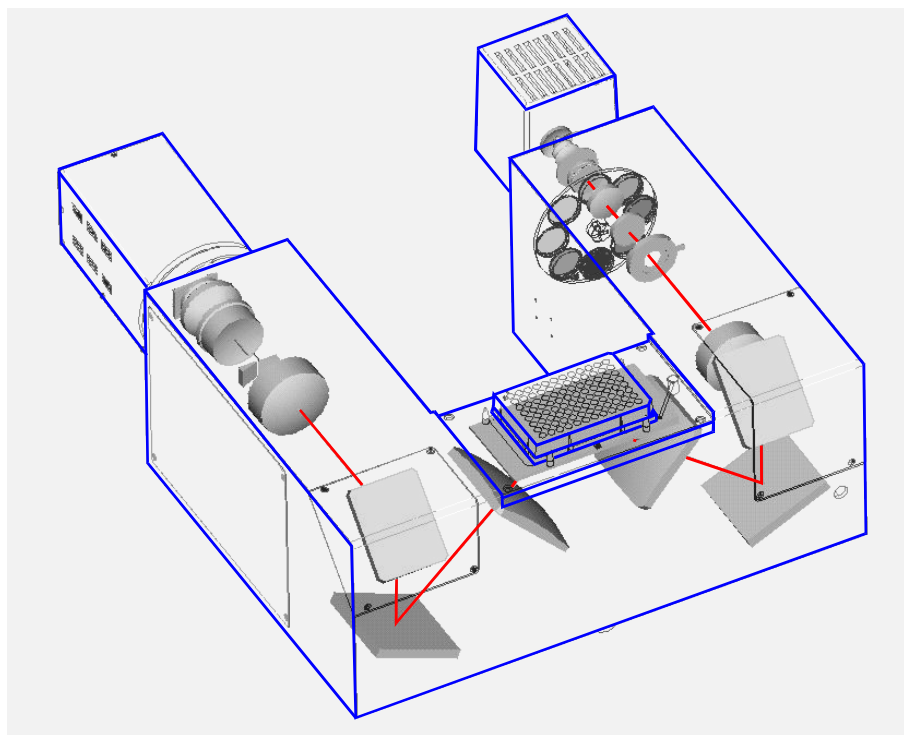


Abb. 2.6: Detektionsmodul (Biospec, Carl Zeiss), bestehend aus Halogenlampe, Filterrad, Optik zur Lichtstrahlaufweitung, Mikrotiterplattenklemmung und CCD-Kamera. Eingezeichnet ist die Mikrotiterplatte und der Strahlengang. Das Detektionsmodul ist konzipiert für den Einsatz in Verbindung mit einem Mikrotiterplatten-Handling-System.

Der Meßaufbau ist in Abb. 2.6 gezeigt: Das Licht einer Halogenlampe wird durch Interferenzfilter monochromatisiert, anschließend polarisiert und fällt nach Aufweitung des Lichtstrahls auf die Mikrotiterplatte. Die von der Mikrotiterplatte reflektierten, interferierenden Strahlen werden auf einen CCD-Chip abgebildet. Das Minimum im Reflexionsspektrum wird anhand der durch verschiedene Filter gewonnenen Reflexionskoeffizienten für jede Kavität bestimmt. Die Änderung der Lage des Minimums gibt die Änderung der optischen Schichtdicke wieder. Die Dauer einer Messung (Detektion der Bindung und Regenerierung) beträgt 10–15 min pro Platte; das entspricht im 96-er Format ungefähr 10 s pro Probe.

2.2. Oberflächenmodifizierung

2.2.1. Silanisierung von SiO_2 -Oberflächen

In diesem Kapitel wird die Beschichtung der verwendeten Glas-, Silizium- oder Silica-Oberflächen mit Organosilanen beschrieben. Die weitere Funktionalisierung dieser aktivierten Oberflächen ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

Es gibt mehrere Methoden für die chemische Modifizierung von Glasoberflächen. Besonders gut erforscht sind diese im Bereich der Chromatographie für die Beschichtung von Kieselgel

oder *controlled pore glass* (CPG) [naw 97, bus 98]. Die häufigste Methode ist die Silanisierung, also die Reaktion zwischen Silanolgruppen der Oberfläche und einem Organosilan, das hydrolysierbare funktionelle Gruppen trägt, wie Chlor-, Alkoxy- oder Amino-Gruppen. Organosilane können als anorganisch / organische Hybridverbindungen verstanden werden, die zwischen anorganischer und organischer Welt vermitteln können [plu 90]. Die allgemeine Formel der in dieser Arbeit verwendeten Silane ist



wobei mit R die hydrolysierbare Gruppe bezeichnet ist, die die Bindung zur Oberfläche herstellt, R' Alkylgruppen sind, und RY eine funktionelle Gruppe ist, wie z.B. eine Epoxygruppe, die zur späteren Modifizierung der Oberfläche dient (Abb. 2.7).

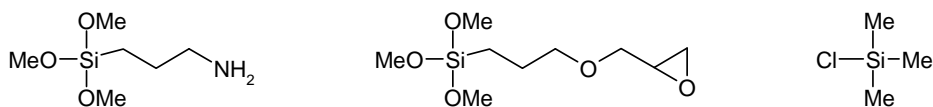


Abb. 2.7: Zur Oberflächenmodifizierung eingesetzte Organosilane.

Die Art und Funktionalität des Silans haben einen großen Einfluß auf die Struktur der Beschichtung. Die Modifizierung der Oberfläche mit Monoalkoxy- oder Monochlorsilanen führt zu monomeren Strukturen, während höher funktionelle Silane zu komplizierten quervernetzten Oberflächenbelegungen führen [ung 76, bus 98]. Demgegenüber zeigte Stevens [ste 99], daß im Fall von Trichloralkylsilanen bei Ausbildung einer Monolage aufgrund sterischer Hinderung der Alkylreste eine Quervernetzung nicht möglich ist.

Für den Bindungsmechanismus (Abb. 2.8) der Silane wird angenommen, daß vor der eigentlichen Reaktion eine Hydrolyse des Silans stattfindet. Unpolare Lösungsmittel werden deshalb gezielt mit Wasser gesättigt, polare Lösungsmittel weisen meist einen so hohen Wassergehalt auf, daß sie vor Gebrauch getrocknet werden müssen [til 88]. Die Oberflächen können ebenfalls hydratisiert werden und einen physisorbierten Wasserfilm tragen, welcher das zur Hydrolyse benötigte Wasser direkt auf der Oberfläche bereitstellt [thi 87]. Häufig wird aber auf den Einsatz von Lösungsmitteln verzichtet, und das Silan in reiner Form verwendet [kin 84]. Im Anschluß erfolgt die Kondensation der durch H-Brücken gebundenen Silane. Um eine vollständige Bindung der möglichen Siloxanbindungen zur Oberfläche sicherzustellen, wird besonders bei Alkoxysilanen von manchen Autoren bei erhöhter Temperatur gearbeitet [kes 91]. Chlorsilane weisen gegenüber Alkoxysilanen eine erhöhte Reaktivität auf, so daß eine erhöhte Temperatur nicht erforderlich ist [sil 91]. Stabile Beschichtungen wurden aber auch bei Alkoxysilanen ohne ein Arbeiten bei erhöhter Temperatur erhalten [tsu 99].

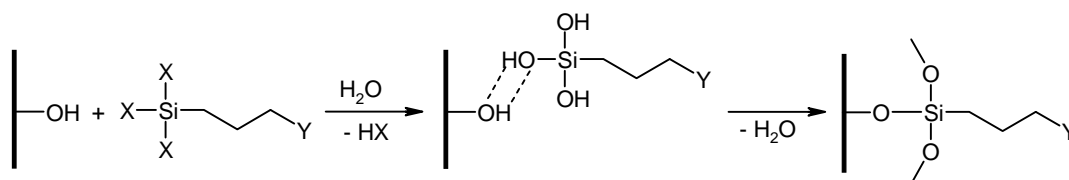


Abb. 2.8: Reaktionsschema zur Grenzflächenfunktionalisierung mit Silanen.

Zur Beschichtung von chromatographischen Trägermaterialien wie Kieselgel oder CPG werden organische Basen wie Morpholin oder Pyridin zur Aktivierung verwendet [kin 84, sup 87], wodurch hohe und gleichmäßige Beladungen erreicht werden [bus 98]. Die Base bindet einerseits die entstehende Säure, andererseits wird ein aktiviertes Zwischenprodukt durch Substitution der reaktiven Gruppe des Silans gebildet.

Die auf diese Weise eingebrachten funktionellen Gruppen können in weiteren Reaktionsschritten zur endgültigen Belegung umgesetzt werden.

Die Beschaffenheit der unbehandelten SiO_2 -Oberfläche ist stark von der Vorgeschichte des Materials beeinflusst. Abhängig von Produktionsprozess und Lagerung liegen Siloxanbindungen anstelle von Silanolgruppen vor [naw 97]. Wichtig ist deshalb eine Vorbehandlung des Trägermaterials mit Basen und Säuren, um die Oberfläche von Verunreinigungen zu befreien und die Benetzbarkeit zu verbessern. Zusätzlich wird die Oberfläche chemisch angegriffen, und es entstehen neue Silanolgruppen, die als weitere Bindungsstellen zu einer höheren Belegung führen. Frisch gereinigtes Kieselgel oder Glas kann eine Silanolgruppen-Dichte von bis zu $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ aufweisen [naw 97].

Planare Glasträger werden zur Aktivierung zunächst mehrere Stunden mit verdünnter Natronlauge, danach mit schwefelsaurer H_2O_2 -Lösung behandelt, jeweils mit Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Da die 1,0,0-Oberfläche von Si-Kristallen von Alkalilauge stark angegriffen wird [jak 91], muß die Natronlauge in diesem Fall durch salzsaure und ammoniakalische H_2O_2 -Lösung ersetzt werden. Außerdem wird dadurch eine Verstärkung der Oxidschicht erhalten, wodurch die Silanisierung von Silizium erst möglich wird. Kieselgel ist hauptsächlich mit Spuren von Metallen verunreinigt [naw 91], die durch Waschen mit 20 % HCl entfernt werden können [bus 92]. Zur Trocknung wird anschließend Wasser durch Destillation mit Toluol entfernt.

2.2.2. Oberflächenbeschichtungen für Synthesen und biologische Tests

Da im Anschluß an das in Kapitel 3 beschriebene Synthese-Monitoring ein biologischer Assay durchgeführt werden sollte, muß die Oberfläche gegen unspezifische Adsorption der Biomoleküle abgeschirmt sein. In Kapitel 2.1 wurden einige Beschichtungsmethoden vor-

gestellt, mit denen Wechselwirkungen der Biomoleküle mit den Transducern unterdrückt werden. Diese Beschichtungen müssen zusätzlich gegenüber den erforderlichen Reaktionsbedingungen inert sein.

Aminodextranbeschichtungen bieten durch Ausbildung eines polymeren Netzwerks auf der Transduceroberfläche ein tiefes Volumen in dem viele reaktive Gruppen genutzt werden können. Die prinzipielle Eignung von AMD als Träger wird durch zahlreiche Arbeiten belegt, in denen ähnliche Strukturen als Trägermaterial für Synthesen verwendet wurden. Beispiele hierfür sind die Spot-Synthese auf Cellulose-Membranen [fra 96, rei 99] oder Papier [fra 88, eic 89] und Peptidsynthesen auf Sepharose-Beads [teg 97]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Verwendung von AMD als Oberflächenbeschichtung aufgrund der geringen Säurestabilität verzichtet. Außerdem liegen neben den Aminogruppen für die Anbindung des ersten Synthesebausteins noch viele Hydroxy-Gruppen vor. Wird als Beispiel die Peptidsynthese betrachtet, so ist die Reaktivität von Hydroxy-Gruppen bezüglich der Kupplung einer Aminosäure zwar wesentlich niedriger, ein nicht geringer Anteil an Esterbindungen wird aber dennoch geknüpft. Es werden in jedem Synthesesyklus weitere Gruppen umgesetzt und damit wird ein neues, um eine Aminosäure verkürztes Peptid begonnen, so daß ein uneinheitliches Produktgemisch entsteht. Unproblematisch ist dies, wenn die Produkte am Ende der Synthese vom Träger abgespalten werden sollen. Nach Anbindung eines Linkers an erster Stelle werden die oben erwähnten Nebenprodukte nicht abgespalten.

Aminopolyethylenglycoloberflächen bieten eine geringere Beladung als Aminodextranbeschichtungen, da nur die Oberfläche und nicht das Volumen der Beschichtung für die Synthese oder den Bioassay zur Verfügung steht. Für die Messung der Bindung von Biomolekülen an die Oberfläche ist die erreichbare Beladungsdichte ausreichend. Die Tauglichkeit von PEG-Beschichtungen für die Synthese wird durch einen Vergleich mit PEG-Polymerharzen [mel 92, rad 99] deutlich, die in der Festphasensynthese bisher zwar nur eine untergeordnete Bedeutung besitzen, aber aufgrund ihrer guten Quelleigenschaften in protischen Lösungsmitteln inzwischen größere Aufmerksamkeit erfahren haben.

Oberflächen, die mit Diaminopropan beschichtet sind, bieten nur eine unzureichende Abschirmung gegen unspezifische Wechselwirkung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dennoch Diaminopropan-Oberflächen zur Synthese verwendet, wenn im Anschluß kein biologischer Assay stattfinden sollte.

2.3. Fluoreszenzspektroskopie

2.3.1. Fluoreszenzanisotropie

Das für Absorptions- oder Emissionsprozesse maßgebliche Übergangsdipolmoment besitzt eine definierte Richtung bezüglich der Molekülgeometrie. Regt man statistisch verteilte Fluorophore mit linear polarisiertem Licht an, so ist das emittierte Licht ebenfalls zu einem gewissen Grad polarisiert. Erfolgt die Messung in 90°-Anordnung, so ergibt sich folgendes Bild:

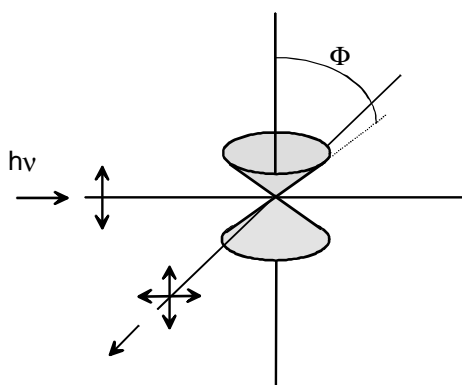


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Meßanordnung. Das Fluorophor befindet sich im Ursprung des Koordinatensystems. Der Doppelkegel deutet die eingeschränkte Bewegungsfreiheit oberflächengebundener Moleküle an.

Bei vertikaler Anregung ergibt sich die Gesamtintensität des Fluoreszenzlichts zu

$$I_F = I_v + 2I_h \quad (10)$$

und die Anisotropie r zu

$$r = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h} \quad (11)$$

Hieraus ergeben sich die Extremfälle von $r = 0,4$ für vollständige Polarisation und $r = 0$ für vollständige Depolarisation.

Bei zeitaufgelösten Messungen nimmt die Anisotropie nach Gleichung (12) exponentiell ab:

$$r(t) = \sum_i A_i \cdot e^{-6D_{R,i}t} + r_\infty \quad (12)$$

Hierbei ist i bei Gemischen gleich der Anzahl der Komponenten, A_i die Amplitude der jeweiligen Komponente und D_R der Rotationsdiffusionskoeffizient ($D_R = 1/(6\tau_R)$, τ_R ist die Rotationskorrelationszeit).

Die exponentielle Anpassung der Anisotropie-Abklingkurven nach Gleichung (12) liefert die Rotationsdiffusionskoeffizienten D_R sowie die Restanisotropie r_∞ . Mit $r_0 = r(t=0)$ und Gleichung (13) erhält man die Kegelöffnungswinkel der Rotationsbewegung der Fluorophore („wobble in cone“-Modell).

$$\frac{r_\infty}{r_0} = [0.5 \cdot (\cos^2 \theta + \cos \theta)]^2 \quad (13)$$

2.3.2. Excimer-Fluoreszenz

Als Excimere werden Dimere bezeichnet, die im elektronisch angeregten Zustand stabil, im Grundzustand jedoch instabil sind. Durch die Aggregation der Moleküle werden die entarteten Anregungszustände der Monomere aufgespalten, was zu einer Energieerniedrigung des tiefsten angeregten Excimerzustands führt. Die Excimerfluoreszenz ist damit gegenüber der Fluoreszenz eines Monomers zu höheren Wellenlängen verschoben.

Die Bildung eines Excimers ist ein bimolekularer Prozeß, der den Zusammenstoß eines elektronisch angeregten Moleküls mit einem Molekül im Grundzustand voraussetzt. Ist die Aktivierungsenergie für die Bildung des Excimeren sehr klein, führt jeder Zusammenstoß zur Reaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dann durch die Häufigkeit der Kollisionen bestimmt. Die Excimerbildung wird als diffusionskontrolliert bezeichnet, wenn die Kollisionsraten von der Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle bestimmt werden [win 93].

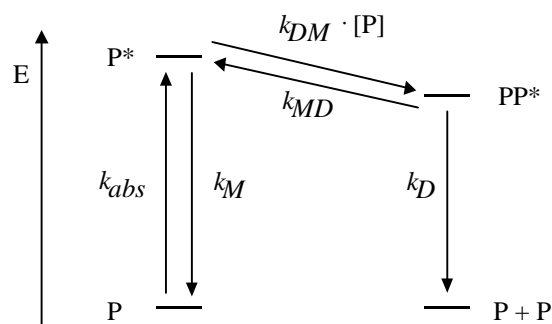


Abb. 2.10: Energieschema zur Excimerbildung (P = Pyren).

Das Energieschema [bir 70] für die Excimerbildung ist in Abb. 2.10 gezeigt. Ein angeregtes Pyren*-Molekül P* kann durch Fluoreszenz oder durch strahlungslose Desaktivierung wieder in den Grundzustand gelangen. Die Geschwindigkeitskonstante der Energieabgabe ergibt sich damit zu

* Die Excimer-Fluoreszenz wird hier am Beispiel des in dieser Arbeit untersuchten Pyrens beschrieben (P = Pyren).

$$k_M = k_{FM} + k_{LM} \quad (14)$$

wobei k_{FM} und k_{LM} die Ratenkonstanten der Fluoreszenz bzw. der Fluoreszenzlöschung des Monomers bezeichnen.

Als Konkurrenzprozeß tritt Excimerbildung auf. Bei üblichen Anregungslichtquellen ist der Anteil der angeregten Moleküle an der Gesamtpopulation so gering, daß die Zahl der Moleküle im Grundzustand in guter Näherung unverändert bleibt. Die Rückreaktion verläuft bei Raumtemperatur wesentlich langsamer als alle anderen Prozesse und kann daher vernachlässigt werden [van 74]. Für die Geschwindigkeit der Excimerbildung gilt demnach:

$$d(PP^*)/dt = k_{DM}[P] - k_D[PP^*] \quad (15)$$

mit k_{DM} als Geschwindigkeitskonstante der Aggregatbildung und

$$k_D = k_{FD} + k_{LD}. \quad (16)$$

als Geschwindigkeitskonstante der Desaktivierung des Excimers. k_D ist wie die Geschwindigkeitskonstante des Monomers gleich der Summe aus den Konstanten der Fluoreszenz und der Fluoreszenzlöschung.

Die Fluoreszenzintensitäten des Monomers und des Excimers werden durch die Gleichungen (17) und (18) beschrieben:

$$I_{FM}(t) = -d(P^*)/dt = k_{FM}[P^*] \quad (17)$$

$$I_{FD}(t) = -d(PP^*)/dt = k_{FD}[PP^*] \quad (18)$$

Dimere, die sich nach dem oben beschriebenen Schema bilden, werden „dynamische“ Excimere genannt, d. h. Aggregation findet nach Anregung eines Moleküls P nach P* erst nach einer gewissen Zeit statt. Bei zeitaufgelösten Messungen im Nanosekundenbereich wird dabei eine An- und eine Abklingphase der Fluoreszenz beobachtet. Demgegenüber bestehen „statische“ Excimere aus im Grundzustand aggregierten Molekülen, so daß keine Fluoreszenzanklingphase auftritt. Zudem können statische Excimere im Gegensatz zu dynamischen im Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektrum nachgewiesen werden.

3. Online-Monitoring von Festphasensynthesen*

3.1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Projekts LIBRARIAN II, dessen Ziel die Entwicklung eines auf RfS basierenden HTS-Systems im Mikrotiterplatten-Format war, durchgeführt. Die verwendeten Mikrotiterplatten besitzen einen Boden aus Glas, der als Träger für organisch-chemische Reaktionen dienen kann. Ziel dieser Arbeit war die Methodenentwicklung zu kombinatorisch chemischen Synthesen auf der Glasoberfläche der Mikrotiterplatten, so daß anschließend ein biochemischer oder biologischer Assay ohne eine Abspaltung der Syntheseprodukte vom Träger möglich ist.

Vergleichbare glasartige Trägermaterialien sind *controlled pore glass* (CPG) oder Kieselgel. Beide spielen für die Festphasensynthese aber nur eine untergeordnete Rolle. CPG wurde schon früh für die Peptidsynthese eingesetzt [par 74, alb 89], konnte sich aber aufgrund der geringen erreichbaren Beladung gegenüber polymeren Trägern nicht durchsetzen. Für die Oligonucleotidsynthese ist CPG jedoch das Standard-Trägermaterial [kös 83, ada 83]. Da keine Diffusionseffekte die Reaktionskinetik beeinflussen, werden sehr kurze Reaktionszeiten und Synthesesyklen erreicht.

Kieselgel ist hauptsächlich als chromatographische Phase von Bedeutung, wurde aber auch als feste Phase für die organische Synthese eingesetzt [bay 70, suc 98]. Hier wurde der Vorteil der hohen Druck- bzw. Temperaturstabilität im Vergleich zu Polymer-Harzen ausgenutzt. Nachteil aller glasartigen Trägermaterialien ist die geringe Stabilität in basischen Medien.

Als zusätzlicher Aspekt sollten die auf planaren Glasträgern durchgeführten Reaktionen mit RfS online analytisch überwacht werden. Im Idealfall wäre ein System zu wünschen, bei dem die automatisierte Synthese in Mikrotiterplatten online mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie überwacht wird, und anschließend dieselbe Methode zur Detektion der Erkennung biologischer Zielmoleküle durch die oberflächengebundenen Ligandenmoleküle angewandt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt das Online-Monitoring an einem nicht parallelisierten System durchgeführt.

Die analytische Überwachung von Festphasensynthesen auf Polymerharzen wird üblicherweise offline durchgeführt. Die einfachste Möglichkeit ist, nach jeder Stufe die polymergebundenen Substrate abzuspalten und mit MS, NMR und HPLC zu untersuchen. Weniger

* Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn Dipl.-Chem. Hans-Martin Haake und Herrn Dipl.-Chem. Oliver Birkert aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Gauglitz am Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

zeitaufwendig, wenn auch mit höherem apparativen Aufwand verbunden, sind Methoden der on-bead-Analytik wie MALDI-TOF-Massenspektrometrie [egn 95], IR- und NMR-Spektroskopie [luo 98]. Im Bereich der NMR-Spektroskopie eignen sich besonders ^1H - und ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie, da hier geringere Linienbreiten als bei Gelphasen-NMR-Spektroskopie erhalten werden [weh 96, pur 96]. FT-IR- bzw. ATR-IR-Spektroskopie stellen, wenn charakteristische IR-Schwingungen bzw. Veränderungen derselben auftreten, eine schnelle und zuverlässige Methode zur polymergebundenen Analytik dar [yan 99]. Die FT-IR-Mikroskopie ermöglicht außerdem die Vermessung einzelner Harzbeads [yan 96, haa 98]. Besonders für automatisierte Synthesen sind Verfahren interessant, die eine kontinuierliche Kontrolle des Reaktionsverlaufs erlauben. Die Detektion des Reaktionsendes ermöglicht nicht nur eine zeitsparende Durchführung der Synthese, sondern reduziert auch unerwünschte Nebenreaktionen. Im Bereich der organischen Festphasenchemie sind bisher nur wenige Arbeiten bekannt, bei denen die Probenahme nicht offline, also durch Ziehen einzelner Proben zu verschiedenen Reaktionszeiten, sondern online durch direktes Messen im Reaktor erfolgt: Pivonka et al. [piv 96] benutzten ein FT-IR-Mikroskop mit einer Durchflußzelle, um organische Reaktionen auf einzelnen Harzbeads zu verfolgen. Da bei diesem Aufbau ebenso das Lösungsmittel vermessen wird, können nur "IR-freundliche" Lösungsmittel wie Chloroform oder Dichlormethan verwendet werden.

In der automatisierten Peptidsynthese wurden verschiedene Methoden zur Reaktionsverfolgung entwickelt. Die meisten Verfahren basieren auf UV-Detektion und Leifähigkeitsmessungen [fer 91], mit denen Veränderungen in der Reaktionslösung gemessen werden. Die UV-spektroskopische [cam 87] oder konduktometrische [fox 91] Verfolgung der Fmoc-Abspaltung erlaubt das Monitoring der Entschützungsreaktion. Bei langsamer Abspaltung der Schutzgruppe kann auf eine erschwerte Kupplung im nächsten Syntheszyklus geschlossen werden. Die Einführung von HOBt-Aktivestern [ath 86] zur Unterdrückung der Racemisierung der Aminosäuren während der Kupplung bot zusätzlich die Möglichkeit die Kupplung online zu verfolgen. Das durch Deprotonierung von HOBt durch freie Aminogruppen entstehende Anion absorbiert stark bei 440 nm. Die Abnahme der Konzentration an Aminogruppen kann entsprechend der Abnahme dieser Absorptionsbande verfolgt werden.

Eine Möglichkeit zur parallelisierten online-Analytik von Harz-Beads wurde kürzlich von Fischer und Tran [fis 99] vorgestellt: durch Verwendung einer NIR-Camera mit 320x240 Pixel und eines akustooptischen Monochromators kann bei Peptidsynthesen durch Verfolgung der Amino- bzw. Amidbanden eine Reaktionsverfolgung durchgeführt werden.

Mit Ausnahme des letzten Beispiels bieten alle oben aufgeführten Techniken keine Möglichkeit zur analytischen Überwachung parallelisierter Synthesen. Die bisher etablierten Methoden zur Verfolgung von Peptidsynthesen basieren auf Techniken, die Änderungen in der Reaktionslösung, aber nicht auf der festen Phase messen. Da bei Synthesen auf planaren Glaträgern aufgrund der geringen Oberflächenbeladung nur sehr kleine Stoffmengen umgesetzt werden und sich die Konzentrationen damit praktisch nicht verändern, sind solche Methoden in diesem Fall unbrauchbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Reflektometrische Interferenzspektroskopie, die erfolgreich zum Nachweis von Bindungsvorgängen in wäßrigen Lösungen eingesetzt wurde, zur Detektion bei Festphasensynthesen geeignet ist.

3.1.1. Aufgabenstellung

Zunächst sollte untersucht werden, unter welchen Rahmenbedingungen ein Online-Monitoring mit RfS möglich ist. Hierzu gehören Reaktionsbedingungen wie Lösungsmittel und Temperatur, aber auch die Modifizierung der Glasoberfläche, deren Beschichtung chemische Synthesen zulassen, bzw. gegenüber vielen Reagenzien stabil sein muß.

Auf Basis der etablierten Peptidchemie sollte überprüft werden, welche durch chemische Reaktionen – wie z. B. die Verlängerung der Peptidkette oder Schutzgruppen-Anheftung und -Abspaltung – hervorgerufenen Änderungen in der Molekülgröße reflektometrisch noch detektierbar sind, und welche Beladungsdichten hierzu eingehalten werden müssen. Gegebenenfalls sollte eine Funktionalisierung der Oberfläche erarbeitet werden, die zu einer ausreichenden Beladungsdichte führt. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollten auf die Synthese kleiner nichtpeptidischer Moleküle übertragen werden.

Da die chemische Analytik der auf RfS-Transducern synthetisierten Verbindungen aufgrund der sehr geringen Substanzmengen nicht möglich ist, sollten die Reaktionsbedingungen an vergleichbaren Trägermaterialien erarbeitet werden, die eine Analytik der Reaktionsprodukte bezüglich ihrer Qualität, aber auch die Bestimmung der Oberflächenbeladung erlauben. Es sollten sowohl Methoden zur Analytik der an die Oberfläche gebundenen Moleküle, als auch die Möglichkeit der Abspaltung und Analytik in Lösung untersucht werden.

Anhand der Synthesen einer längeren Peptidsequenz und eines Herbizids sollte die Möglichkeit des Online-Monitorings und direkt anschließendem biologischen Assay mit RfS demonstriert werden. Dabei konnte auf im Arbeitskreis vorhandene Testsysteme, die auf der Bindung von Antikörpern beruhen, zurückgegriffen werden. Im nächsten Schritt sollten die Synthesen auf die Mikrotiterplatten für das parallelisierte Messsystem übertragen und die erhaltenen Verbindungen in High-Throughput-Assays getestet werden.

Zuletzt sollte die Festphasensynthese eines Thrombininhibitors an polymeren Trägermaterialien erarbeitet und anschließend auf die RfS-Transducer übertragen werden.

3.2. Ergebnisse und Diskussion

3.2.1. Einfluß des Lösungsmittels

Bei der reflektometrischen Detektion von Schichtdickenänderungen an der Oberfläche trägt das gesamte Schichtsystem zum erhaltenen Signal bei. Der Brechungsindex des Lösungsmittels hat deshalb einen deutlichen Einfluß auf die Signalqualität. Je ähnlicher die Brechungsindizes von Interferenzschicht ($n \approx 1,49$) und Lösungsmittel sind, desto geringer wird die Intensität des Interferenzspektrums und desto höher das Rauschen der daraus erhaltenen optischen Schichtdicke. In Abb. 3.1 wird dies verdeutlicht. Die Detektion des Minimums des Interferenzspektrums wird bei geringer Intensität des reflektierten Lichts sehr ungenau.

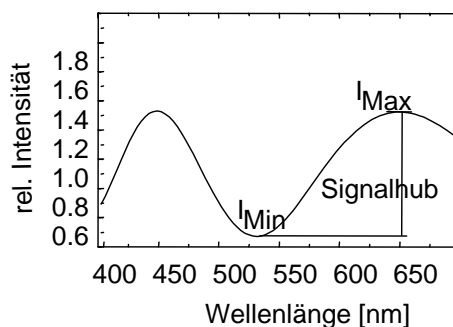


Abb. 3.1: Zur Bestimmung des Minimums wird die Kurve mit einem Polynom 2. Ordnung angepasst. Bei geringerem Signalhub wird dabei der Fehler größer.

In Abb. 3.2 werden Signalhub und Schichtdickenrauschen häufig verwendeter Lösungsmittel verglichen. Je besser das Signal-Rausch-Verhältnis ist, um so höher wird die Empfindlichkeit der Messung und um so kleiner können die detektierbaren Schichtdickenänderungen sein. 1,2-Dimethoxyethan (DME, $n_D = 1,38$) erwies sich als gut geeignet, Dimethylformamid (DMF, $n_D = 1,43$) als brauchbar. N-Methylpyrrolidon (NMP, $n_D = 1,47$) ist ungeeignet. Bei Dichlormethan (DCM, $n_D = 1,42$) können sich wegen des geringen Siedepunkts Gasblasen in der Meßzelle bilden, so daß die Verwendung von DCM vermieden wurde. Soll die Synthese jedoch nicht online verfolgt werden, können alle gängigen Lösungsmittel verwendet werden. Wie sich herausstellte, wirken sich langfristige Schwankungen wie Drift-Effekte wesentlich stärker auf die erreichbare Auflösung auf, als das Schichtdickenrauschen. Bei Verwendung von Diamino-PEG beschichteten Oberflächen wurden Driften von bis zu 20 pm/h für DME

bzw. 30 pm/h für DMF bestimmt. Besonders bei kleinen Molekülen liegen diese Werte im Bereich der erwarteten Gesamtänderung des Signals.

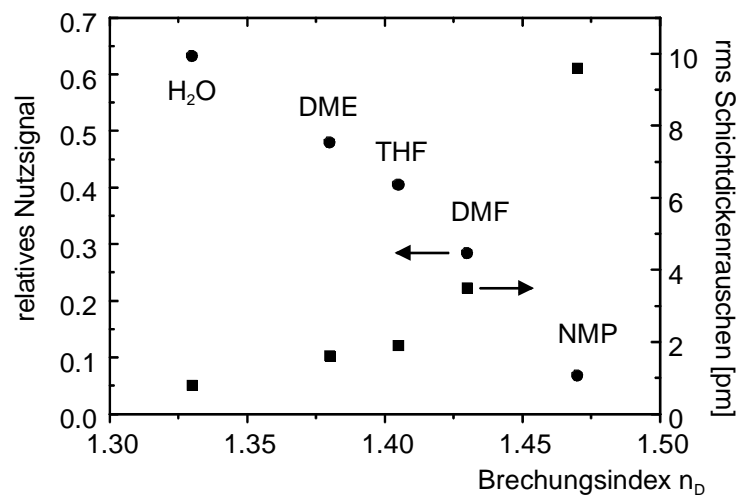


Abb. 3.2: Relatives Nutzsignal (●) und Rauschen (■) bei Messung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln. Deutlich ist der sinkende Signalhub und das steigende Rauschen bei steigendem Brechungsindex des Lösungsmittels.

Zusätzlich ändert sich die Empfindlichkeit der Messung in Abhängigkeit vom Brechungsindex der Reaktionslösung. Zum Vergleich der Empfindlichkeit einer Messung unter DMF bzw. PBS-Puffer wurde die Adsorption von Ovalbumin (OVA) an eine hydrophob silanisierte Oberfläche gemessen (Abb. 3.3). Hierzu wurde die Meßzelle abwechselnd mit PBS-Puffer bzw. DMF gespült. Die scheinbare optische Schichtdicke steigt beim Wechsel von PBS auf DMF aufgrund des unterschiedlichen Dispersionsverhaltens der Lösungsmittel um 1,6 nm. Nach der Injektion von OVA in PBS nimmt die optische Schichtdicke durch Adsorption des Proteins an die Oberfläche um ca. 1,8 nm zu. Beim Spülen mit DMF wird ein Teil des Proteins wieder abgelöst, was durch das anschließend gesunkene Signal unter Puffer zu erkennen ist. Nach weiteren Lösungsmittelwechseln bleibt die Signalhöhe für beide Lösungsmittel konstant. Es ergibt sich eine Zunahme der optischen Schichtdicke bei Ovalbumin-Adsorption von 2,6 nm unter DMF und 1,3 nm unter PBS-Puffer. Die Empfindlichkeit ist bei Verwendung von DMF also ungefähr doppelt so hoch wie bei PBS-Puffer, wodurch die erhöhten Unsicherheiten durch Rauschen des Meßsignals teilweise kompensiert werden.

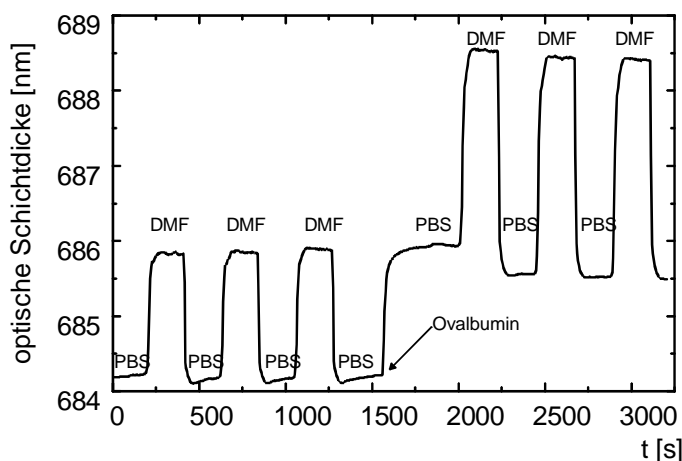


Abb. 3.3: Vergleich der Schichtdicke unter PBS bzw. unter DMF bei Adsorption von Ovalbumin an eine hydrophob silanierte Schicht.

3.2.2. Oberflächenmodifizierung

Für das Monitoring von Synthesen wurden ausschließlich Oberflächen verwendet, die mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) silanisiert waren. Die Grundlagen der Silanisierung von Glasoberflächen wurden in Kapitel 2 beschrieben.

Als Ausgangsfunktionalisierung für die Synthesen in dieser Arbeit wurden Aminogruppen gewählt. Diese können in einfacher Weise durch eine nucleophile Epoxidöffnung mit Diaminoverbindungen wie Diamino-PEG oder Diaminopropan erhalten werden (Abb. 3.4). Durch Einsatz einer konzentrierten Lösung oder der reinen Aminokomponente kann eine Zyklisierung, also die Bindung beider Aminogruppen auf die Oberfläche, vermieden werden.

Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Diamine eingesetzt. Diaminopropan und O,O'-Bis-(2-aminopropyl)-polyethylenglykol 500 (Jeffamine ED 600) wurden für Referenzsynthesen auf Glasplättchen (Deckgläser für dem Mikroskopiebedarf) und CPG verwendet. Die GOPTS-modifizierten Träger wurden direkt nach ihrer Herstellung eingesetzt. Deckgläser wurden hierfür nach Behandlung mit reinem GOPTS zunächst mit Aceton gewaschen, im Stickstoff-Strom getrocknet und danach mit der reinen Aminkomponente umgesetzt. Bei CPG wurde sowohl die Silanisierung als auch die Umsetzung mit dem Diamin mit einer Lösung des entsprechenden Reagenzes in Toluol durchgeführt.

Diamino-PEG wurde für die RfS-Transducer verwendet, da hiermit die beste Abschirmung der Oberfläche gegen unspezifische Wechselwirkungen erhalten wird. Die Präparation der Schichten wurde durch Aufschmelzen von Diamino-PEG 2000 im Trockenschrank beim Kooperationspartner durchgeführt [pie 00].

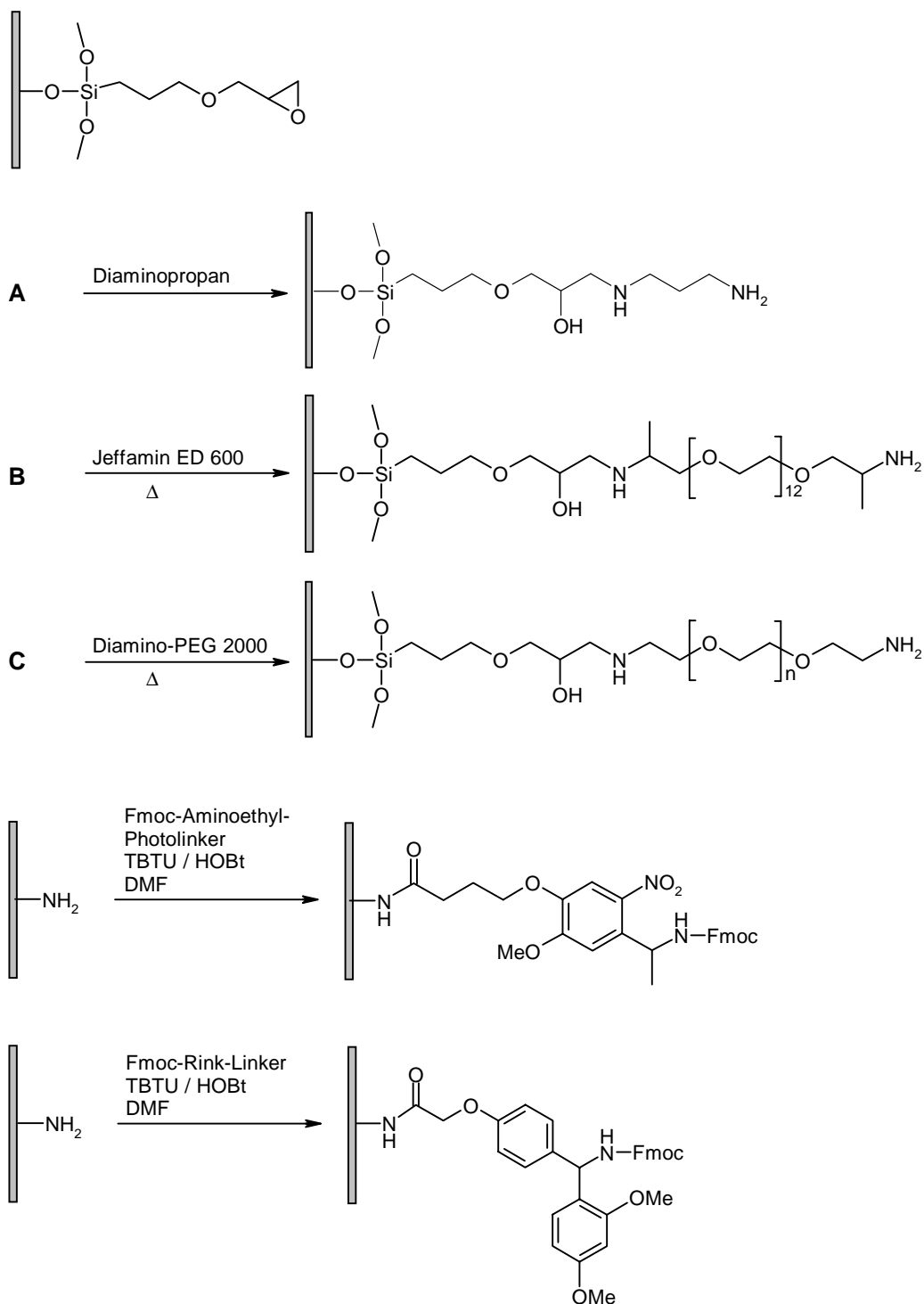


Abb. 3.4: Umsetzung von GOPTS-modifizierten Oberflächen zu aminofunktionalisierten Syntheseträgern. Die Oberflächenmodifizierungen **A** und **B** wurden für Referenzsynthesen verwendet, **C** für das Synthesemonitoring. Um in Vergleichssynthesen abspaltbare Produkte zu erhalten, wurden der Rink-Linker und ein Photolinker eingesetzt.

Bei allen hier gezeigten Oberflächen ist anzumerken, daß verschiedene reaktive Gruppen für die Synthese zur Verfügung stehen: durch die Epoxidöffnung entstehen zusätzlich zur primären Aminogruppe ein sekundäres Amin und eine Hydroxygruppe. Im Fall von Diamino-

PEG sollten diese aber durch die dichte bürstenartige Struktur der Beschichtung für Reaktionen sehr schlecht zugänglich sein. Diaminopropanoberflächen wurden trotz dieser Tatsache aufgrund der einfachen und schnellen Präparation für Referenzsynthesen und für grundlegende Untersuchungen zum Reaktionsmonitoring verwendet.

Aufgrund der meist niedrigen Stoffmengen ist eine Quantifizierung der Oberflächenbeladungen schwierig bzw. nur ungenau möglich. Für die Glasplättchen konnte nach Synthese eines Peptids auf der Oberfläche mittels Edman-Abbau die Belegungsichte abgeschätzt werden (Kapitel 3.2.3.1). Genauere Ergebnisse können bei CPG erhalten werden: Nach Anbindung einer Fmoc-Aminosäure wurde die Beladung durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe und UV-photometrischer Bestimmung des erhaltenen N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidin-Adduktes [mei 79] zu 0,04 mmol/g bestimmt.

3.2.3. Monitoring von Peptidsynthesen

Die prinzipielle Machbarkeit der Reaktionsverfolgung von Festphasensynthesen mit RfS wurde am Beispiel der seit langem etablierten Peptidchemie untersucht. Hierzu wurden Peptide nach der Fmoc/tBu-Strategie auf den RfS-Transducern synthetisiert.

3.2.3.1. Referenzsynthese und –analytik

Da eine Synthesekontrolle auf RfS-Transducern nicht möglich war, wurden einige Peptide zum Vergleich auf ähnlichen Trägermaterialien synthetisiert. Die Analytik erfolgte durch Edman-Abbau der oberflächengebundenen Peptide in einem automatischen Gasphasensequenator, wie er zum N-terminalen Sequenzieren von Peptiden und Proteinen eingesetzt wird. Die Sequenzierung konnte nicht direkt von den Transducern erfolgen, da diese eine zu große Dicke aufweisen und nicht in die Blot-Kammer des Sequenators passen.

Für einen ersten Versuch wurde CPG verwendet, da es als Trägermaterial bekannt ist und mit den üblichen Arbeitstechniken der Festphasensynthese gearbeitet werden kann. Auf einer Diaminopropanoberfläche wurde mit Fmoc/tBu-Strategie und DIC/HOBt-Aktivierung (0,3 M in DMF) das Peptid DQPAKK synthetisiert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abb. 3.5 gezeigt. Es wurde eine Kupplungseffizienz von 96-98 % pro Aminosäure bestimmt. Auffällig ist die Abnahme der sequenzierten Stoffmenge bei späteren Zyklen. Da der erste Schritt des Edman-Abbaus, die Umsetzung des Peptids mit Phenylisothiocyanat, unter basischen Bedingungen abläuft, kann es durch Hydrolyse der Siloxanbindung zur Abspaltung des Peptids vom Träger kommen. Der Probenverlust im Verlauf der Sequenzierung durch Auswaschen abgespaltener Peptide ist dann unvermeidlich [ste 92].

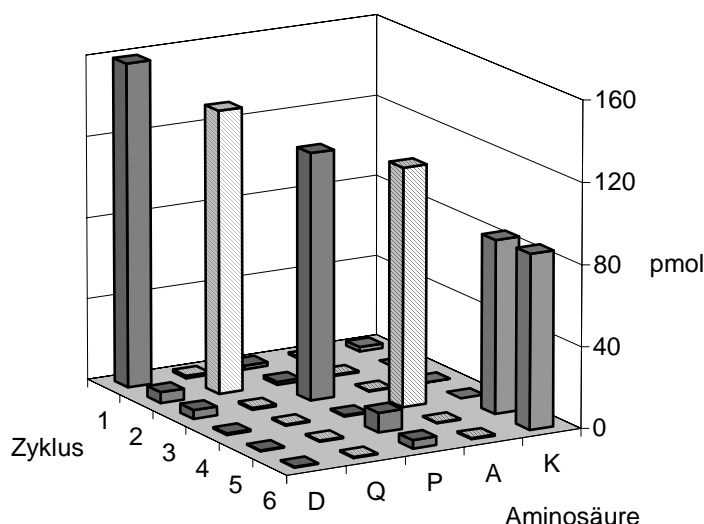


Abb. 3.5: Ergebnis des Edman-Abbaus von auf CPG synthetisiertem DQPAKK.

Eine bessere Vergleichbarkeit zu den Transducern ist allerdings bei Verwendung von planaren Glasplättchen gegeben. Es wurden handelsübliche Deckgläser aus dem Mikroskopiebedarf auf eine Größe von ca. $0,25 \text{ cm}^2$ zurechtgeschnitten, so daß sie in die Blot-Kammer des Sequenators passen. Auf den Plättchen, die wie das CPG Diaminopropan-beschichtet waren, wurde beidseitig die kurze Peptidsequenz FAL synthetisiert. Aufgrund des geringen zu erwartenden Gesamtsignals wurden zwei Lysinverzweigungen eingeführt, so daß die Oberflächenbeladung vervierfacht wurde. Jeweils drei Glasplättchen mit einer Oberfläche von ca. $0,5 \text{ cm}^2$ wurden dann gemeinsam sequenziert. Abb. 3.6 und Abb. 3.7 zeigen die Ergebnisse des Edman-Abbaus für unter unterschiedlichen Bedingungen synthetisierte Peptide.

Auch hier wird die Abnahme der gemessenen Stoffmengen bei späteren Sequenzierungszyklen deutlich. Dieser Effekt ist stärker als bei CPG. Zusätzlich zur Abspaltung der Peptide liegt hier vermutlich eine schlechtere Zugänglichkeit der Peptide für die Edman-Reagenzien in der Nähe der Oberfläche vor. Hierauf deutet auch die schlechtere Kupplungseffizienz bei der Synthese hin. In Tab. 3.1 ist eine Abschätzung der Kupplungsausbeuten gegeben: hierfür wurde die gesamte gemessene Stoffmenge pro Zyklus auf 1 normiert. Im Fall der N-terminalen Aminosäure Phenylalanin ergibt sich daraus direkt die Kupplungsausbeute. Für Alanin wurden die Werte der ersten beiden Zyklen addiert und auf die nachfolgenden Sequenzpositionen bezogen. Bei Leucin ist aufgrund der schlechten Sequenzierung in den folgenden Zyklen keine sinnvolle Angabe möglich. Obwohl diese Synthesergebnisse auf Glasplättchen (ungefähr 90 % Umsatz pro Zyklus) schlechter sind als bei einer üblichen

Peptidsynthese auf Polymerharzen unter gleichen Reaktionsbedingungen, ist zumindest bei kürzeren Peptiden (bis zu 10 AS) und bei Wahl längerer Reaktionszeiten die erreichbare Produktreinheit ausreichend für einen Bioassay.

Das relativ hohe *lag* (eine Aminosäure wird nicht nur im erwarteten Zyklus gefunden, sondern auch in den nachfolgenden) ist wahrscheinlich auf eine schlechte Benetzung der Oberfläche mit den Edman-Reagenzien in den Zwischenräumen der teilweise aufeinanderliegenden Plättchen zurückzuführen. Eine genaue Beladungsbestimmung anhand des Edman-Abbaus ist aufgrund der schlechten Oberflächen-Zugänglichkeit und der damit verbundenen unvollständigen Sequenzierung nicht möglich. Eine Abschätzung ergibt Werte zwischen 0,5 und 1 pmol/mm². Dies ist um ca. 1 Größenordnung weniger als die mögliche Beladung auf z. B. Kieselgel [naw 97.]

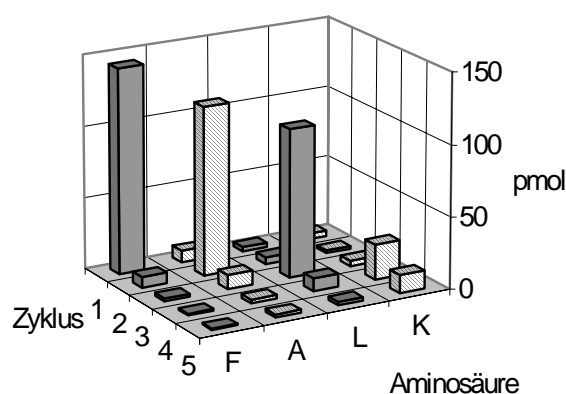


Abb. 3.6: Ergebnis des Edman-Abbaus von auf Glasplättchen synthetisiertem FALK. Die Kupplung erfolgte mit DIC/HOBt-Aktivierung (0,3 M in DMF). Die Reaktionszeit betrug 1,5 h.

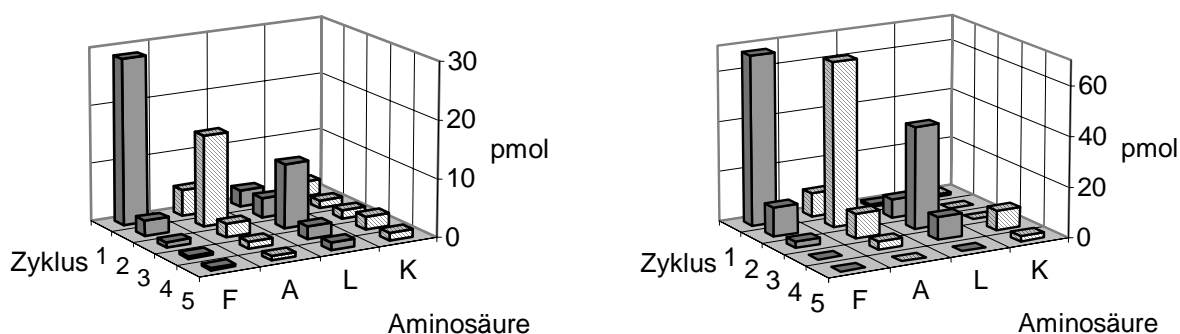


Abb. 3.7: Ergebnis des Edman-Abbaus von auf Glasplättchen synthetisiertem FALK. Links: Kupplung mit DIC/HOBt, rechts: Kupplung mit TBTU/HOBt, in beiden Fällen mit 0,1 M Lösungen und einer Reaktionszeit von 1,5 h.

Tab. 3.1: Aus dem Edman-Abbau bestimmte Kupplungseffizienz [%] für unterschiedliche Kupplungsreagenzien und Konzentrationen. Die Reaktionszeit betrug immer 1,5 h.

| Aminosäure | DIC/HOBt | | TBTU/HOBt |
|------------|----------|-------|-----------|
| | 0,3 M | 0,1 M | 0,1 M |
| F | 90 | 74 | 86 |
| A | 93 | 89 | 89 |

Bei einem Vergleich der Gesamtstoffmenge der sequenzierten Aminosäuren kann eine Abhängigkeit von der Konzentration festgestellt werden. Während bei der Kupplung mit 0,3 M Lösung 100-150 pmol der Aminosäuren erhalten werden, sind es bei Kupplung mit 0,1 M Lösung weniger als 60 pmol. Da die Kupplungsausbeute bei geringen Konzentrationen nicht wesentlich schlechter wurde, muß in beiden Fällen von einem gleichen Grad der Umsetzung ausgegangen werden. Vermutlich liegen auf der Oberfläche unterschiedliche Reaktionszentren vor, von denen die schwerer zugänglichen erst bei höheren Konzentrationen erreicht werden.

Da die Konzentration der Reaktionslösung einen starken Einfluß auf den Brechungsindex und damit auf das Interferenzsignal bei RIfS hat, wurden niedrige Konzentrationen vorgezogen, um möglichst nahe am Brechungsindex des reinen Lösungsmittels zu arbeiten. Mit dem stärkeren Kupplungsreagenz TBTU wurden bei geringer Konzentration etwas bessere Ergebnisse erzielt. Die Verfolgung von Peptidsynthesen mit RIfS wurde aufgrund des nur geringen Unterschieds der mit TBTU bzw. DIC erreichten Synthesergebnisse (Tab. 3.1) wahlweise mit beiden Kupplungsreagenzien durchgeführt.

3.2.3.2. Monitoring der Kupplung von Aminosäuren

Die erwarteten Signale, d. h. die Steigerungen der optischen Schichtdicke bei Anbindung einer Aminosäure, hängen von mehreren Faktoren ab. In erster Linie wird der Schichtdickenzuwachs von der Molekülgröße der angekuppelten Verbindung und der Beladungsdichte der Oberfläche bestimmt. Als Grenzfälle zur Ermittlung der nötigen Molekülgröße dienten die Aminosäuren Fmoc-Gly-OH, die das kleinste Signal für Fmoc-Aminosäuren liefern sollte, und Fmoc-Arg(Pbf)-OH, eine voluminöse Aminosäure mittlerer Größe.

Zusätzlich spielt – neben der oben beschriebenen Abhängigkeit vom Lösungsmittel – das Brechungsindexinkrement der gelösten Aminosäure eine große Rolle. Die theoretischen Empfindlichkeiten für Fmoc-Gly und Fmoc-Arg(Pbf) wurden von Haake [haa 00] mit Hilfe experimentell bestimmter Brechungsindexinkremente berechnet. Diese Rechnungen zeigen,

daß die Reaktionsverfolgung auch bei kleinen Aminosäuren wie Fmoc-Gly prinzipiell möglich ist.

Wie oben beschrieben, ist das Signal-Rausch-Verhältnis von RfS-Messungen mit DME als Lösungsmittel aufgrund des niedrigen Brechungsindex besser, als bei DMF oder THF. Da sich Fmoc-Aminosäuren in DME aufgrund dessen relativ unpolaren Charakters nur schlecht lösen, wurden die meisten Aminosäurekupplungen in DMF durchgeführt. Aminosäurekupplungen in DME werden am Ende dieses Abschnitts am Beispiel der 6-Aminohexansäure (ϵ -Aminocaprinsäure) behandelt.

In Abb. 3.8 ist die Kupplung von Fmoc-Gly an eine Diamino-PEG-Oberfläche gezeigt. Die Kupplung erfolgte in diesem Beispiel mit TBTU/HOBt-Aktivierung in 0,1 M Lösung, die Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin (20 % in DMF). Zunächst wurde über eine Zeitdauer von 10 min eine Basislinie unter DMF aufgenommen. Danach wurde die Reaktionslösung injiziert. Nach einem Sprung des Signals um ca. 0,5 nm nahm die optische Schichtdicke kontinuierlich zu und erreichte schließlich eine Sättigung. Nach 40 min Meßzeit wurde die Reaktionslösung durch reines DMF ersetzt, was einen negativen Sprung des Signals bewirkte. Im Vergleich zur Basislinie wurde ein Zuwachs der optischen Schichtdicke von 370 pm erhalten. Diese Effekte lassen sich durch die Anbindung der Aminosäure an die Oberfläche erklären. Der Sprung der optischen Schichtdicke wird dabei vermutlich durch die unterschiedlichen Brechungsindices von Kupplungslösung und reinem Lösungsmittel sowie durch eine sehr rasche Anbindung der Aminosäure verursacht. Der Anteil des Brechungsindex-Effekts läßt sich durch die Abnahme der Schichtdicke beim Wechsel zu reinem DMF nach der Kupplung abschätzen, da sich die optischen Eigenschaften der PEG-Schicht bei Kupplung der Aminosäure nur gering ändern. Nach Zugabe der Piperidin-Lösung wurde wiederum ein starker Sprung des Signals nach oben erhalten, auch hier verursacht durch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften von Lösungsmittel und Piperidin-Lösung, mit anschließender schnellen Abnahme der optischen Schichtdicke, die durch die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erklärt wird. Nach ca. 60 min wurde die Abspalt-Lösung wieder durch DMF ersetzt, wodurch wieder ein negativer Signalsprung erhalten wurde. Am Ende der Messung lag das Signal um knapp 50 pm höher als zu Beginn. Dies stellt keinen als signifikant zu bezeichnenden Schichtdickenzuwachs mehr dar, da der Wert innerhalb der durch Drift des Messsignals zu erwartenden Unsicherheit liegt (vgl. haa 00). Da nach der Fmoc-Abspaltung im Fall von Glycin aufgrund der Molekülgröße nur eine geringfügig veränderte Oberfläche vorliegt, ist allerdings auch kein meßbarer Zuwachs der optischen Schichtdicke zu erwarten. Der Signalverlauf zeigt dennoch, daß sowohl die Anbindung der Fmoc-geschützten Aminosäure als auch die Abspaltung der Schutzgruppe verfolgt werden konnte.

Alle durchgeführten Messungen der Anbindung von Fmoc-Aminosäuren weisen diesen Verlauf auf.

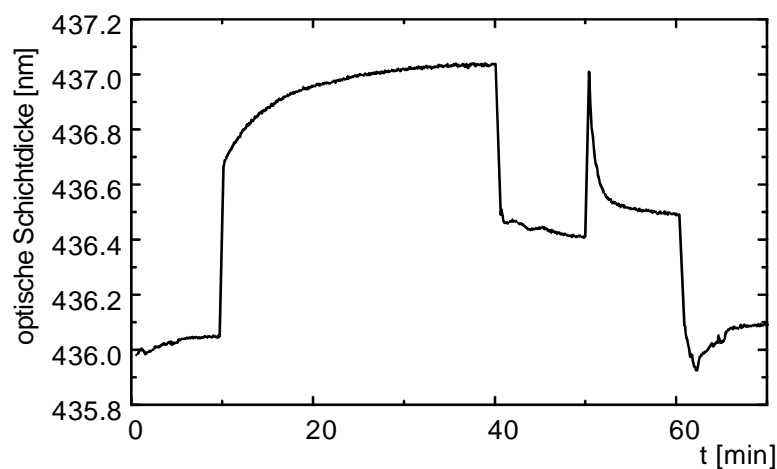


Abb. 3.8: Kupplung von Fmoc-Gly-OH mit TBTU/HOBt (jeweils 0,1 M in DMF) und DIEA (0,2 M in DMF) an eine Diamino-PEG-Oberfläche und anschließende Fmoc-Abspaltung mit Piperidin (20 % in DMF).

Auf demselben Sensor wurde im Anschluß an Gly auf die gleiche Weise Fmoc-Arg(Pbf)-OH gekuppelt (Abb. 3.9, durchgezogene Kurve). Aufgrund der größeren Molekülmasse der Aminosäure wurde mit 730 pm der erwartete höhere Schichtdickenzuwachs erhalten. Da nach Abspaltung von Fmoc immer noch ein relativ großes Molekül auf der Oberfläche verbleibt (die Seitenkettenschutzgruppe wird nicht abgespalten), ist der hohe resultierende Schichtdickenzuwachs von 390 pm verständlich.

Um nachzuweisen, daß die gemessenen Kurven tatsächlich der Anbindung von Aminosäuren entsprechen, und nicht etwa auf mögliche Quelleffekten des Dichtrings der Meßzelle oder der Oberflächenbeschichtung zurückzuführen sind, wurde dasselbe Experiment auf einer mit Acetylchlorid deaktivierten Diamino-PEG-Oberfläche durchgeführt. Die Meßkurve (Abb. 3.9, gestrichelt) zeigt die üblichen Signalsprünge, die durch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften von Reaktionslösung und Lösungsmittel verursacht werden. Während der Reaktionszeit ist jedoch außer diesem Sprung keine Zunahme der Schichtdicke zu erkennen, woraus geschlossen werden kann, daß die Aminosäure nicht an die Oberfläche bindet. Die leichte Abnahme des Signals ist auf eine Drift zurückzuführen. Während der Behandlung mit Piperidin ist ebenfalls eine leichte Signalabnahme zu sehen, die aber in diesem Fall für reine Drifteffekte zu groß ist. Nach Spülen mit Lösungsmittel ist die optische Schichtdicke im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleiche wie zu Beginn. Dies zeigt, daß Piperidin hier zu keiner Substanz-Abspaltung von der Oberfläche führt. Eine mögliche Erklärung wäre an dieser Stelle tatsächlich das Quellen der O-Ringdichtung der Meßzelle.

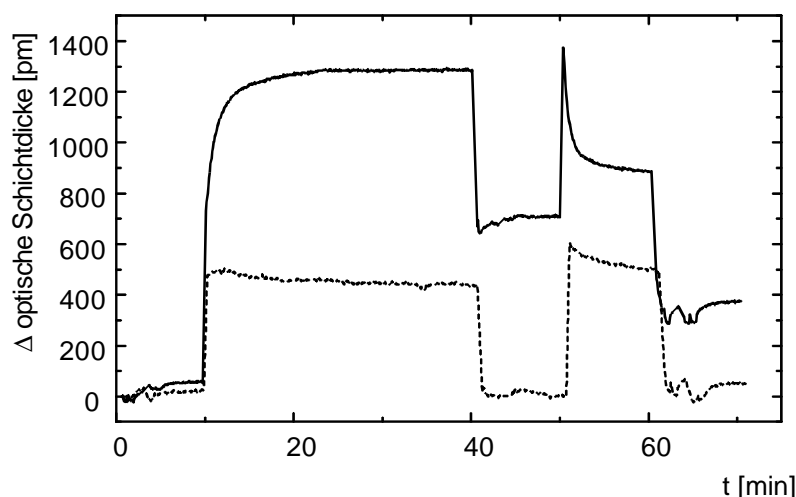


Abb. 3.9: Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH mit TBTU/HOBt (jeweils 0,1 M in DMF) und DIEA (0,2 M in DMF) an eine Diamino-PEG-Oberfläche (durchgezogen) bzw. an eine mit Acetylchlorid gepappte Diamino-PEG-Oberfläche (gestrichelt) und anschließende Fmoc-Abspaltung mit Piperidin (20 % in DMF).

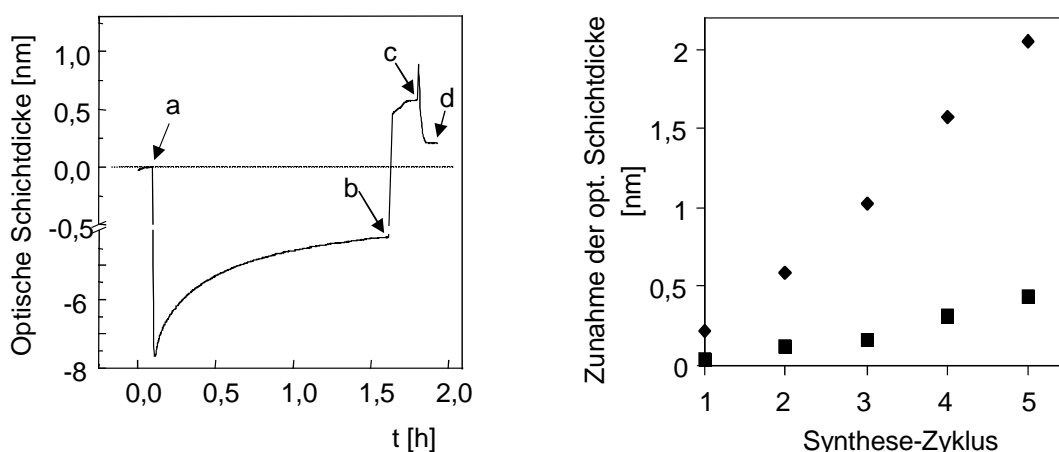


Abb. 3.10: links: Kupplung von Fmoc-Lys(Fmoc); a: Zugabe der Kupplungsreagenzien (1. Aminosäure/TBTU/HOBt, 2. DIEA), b: Waschen mit DMF, c: Zugabe von Piperidin (20 % in DMF), d: Waschen mit DMF. Rechts: Zunahme der optischen Schichtdicke pro Kupplungsschritt vor und nach der Fmoc-Abspaltung (gemessen bei c und d).

Wenn Verbindungen mit kleinerer Molekülgröße als Fmoc-Gly gekuppelt werden sollen, kann eine Erhöhung der Oberflächenbeladung nötig werden, um signifikante Änderungen der optischen Schichtdicke zu erhalten. Eine einfache Möglichkeit zur Steigerung der Oberflächenbeladung ist die Einführung von einer oder mehreren Lysin-Verzweigungen. Um festzustellen, wieviele Verzweigungen synthetisiert werden können, ohne daß die Kupplungsausbeute vermindert wird, wurde mehrmals hintereinander Fmoc-Lys(Fmoc) auf einer Diamino-Propan-Oberfläche gekuppelt und die Änderung der Schichtdicke mit RfS verfolgt. Nach Anbindung des ersten Lysin-Rests sollte bei jeder weiteren Kupplung eine Verdopplung

der Schichtdickenzunahme beobachtet werden. In Abb. 3.10 sind die Änderungen der Schichtdicke für 5 Kupplungen von Fmoc-Lys(Fmoc) vor und nach der Fmoc-Abspaltung und beispielhaft eine Bindungskurve gezeigt. Die Synthesestufen 2 und 3 zeigen die erwartete Verdopplung der Oberflächenbeladung. Bei den Stufen 4 und 5 ist die Kupplung vermutlich durch die zunehmende sterische Hinderung beeinträchtigt.

Bei Betrachtung der Form der Bindungskurve in Abb. 3.10 fällt, im Gegensatz zu den oben gezeigten Messungen, der negative Sprung der optischen Schichtdicke auf. Dieser ist ebenso auf eine Änderung des Brechungsindex beim Wechsel von reinem Lösungsmittel zur Reaktionslösung zurückzuführen. Zum RfS-Signal trägt das gesamte Schichtsystem von Transducer, Beschichtungen und der darüber stehenden Lösung bei. Der negative Wert wird in diesem Fall durch das veränderte Schichtsystem (es wurde eine Diaminopropan-Beschichtung verwendet) verursacht.

Am Beispiel der Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH an eine Diamino-PEG-Oberfläche wurde der Einfluß der Konzentration der Reaktionslösung untersucht. Hierzu wurde die Fmoc-Aminosäure unter DIC-Aktivierung in unterschiedlichen Konzentrationen mit den Aminogruppen des Transducers umgesetzt. Da die Diamino-PEG-Beladungsdichte der Transducer variieren kann, wurden alle Experimente auf demselben Transducer durchgeführt. Um zu gewährleisten, daß für die Aminosäure bei jeder Sequenzposition eine zumindest näherungsweise vergleichbare Oberflächenbeschaffenheit vorliegt, wurde vor jeder Arginin-Anbindung einmal Fmoc-Val gekuppelt. Die synthetisierte Sequenz ist demnach RVRVRV.

In Abb. 3.11 ist der Verlauf der optischen Schichtdicke für drei Konzentrationen der Reaktionslösung gezeigt. In Abhängigkeit von der Konzentration wurde ein unterschiedlich starker Zuwachs der optischen Schichtdicke erhalten. Da es sich bei der Anbindung einer Aminosäure unter den gegebenen Konzentrationen und den damit verbundenen hohen Überschüssen der Reaktanden in Lösung um eine irreversible Reaktion handelt, sollte bei vollständigem Umsatz immer die gleiche Schichtdicke erreicht werden, wenn auch nach unterschiedlicher Reaktionszeit. Demgegenüber zeigen alle drei Kurven schon nach ca. 25 min eine Sättigung, d. h. das Ende der Reaktion. Die gemessene Konzentrationsabhängigkeit kann somit nicht durch unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten erklärt werden. Vermutlich liegen auf der sterisch gehinderten Glasoberfläche unterschiedlich gut zugängliche Reaktionszentren vor, so daß die schwerer erreichbaren erst bei höheren Konzentrationen umgesetzt werden können. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen unterstützt, die bei der Peptidsequenzierung auf Glasplättchen gemacht wurden. Schlecht zugänglich reaktive Zentren werden z. B. bei der Oberflächenbeschichtung durch Epoxid-

öffnung mit Diamin-PEG erzeugt, da hierbei oberflächennahe sekundäre Aminogruppen und Hydroxygruppen entstehen. Diese sind durch das darüberliegende PEG abgeschirmt.

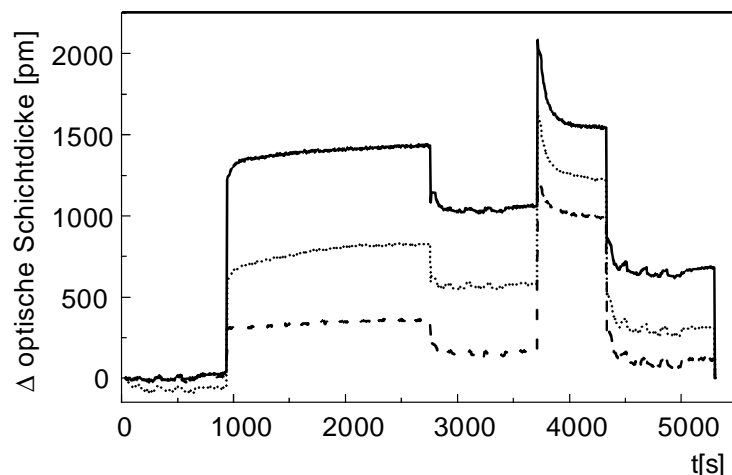


Abb. 3.11: Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH mit DIC in unterschiedlichen Konzentrationen an eine Diamino-PEG-Oberfläche: 0,1 M (durchgezogen), 0,05 M (gepunktet), 0,01 M (gestrichelt).

Um auszuschließen, daß die gemessenen Effekte durch eine schlechtere Zugänglichkeit der oberflächengebundenen Aminogruppen bei späteren Sequenzpositionen verursacht wird, wurde zuerst mit hoher, dann mit niedriger und zuletzt mit mittlerer Konzentration gekuppelt. Experimente mit einer anderen Abfolge der Konzentrationen führten zu analogen Ergebnissen für den Schichtdickenzuwachs.

Als Beispiel für die Knüpfung von Amidbindungen mit DME als Lösungsmittel wurde Fmoc-6-Aminohexansäure verwendet, da sie sich noch in relativ hohen Konzentration in DME löst. In Abb. 3.12 ist der Verlauf der optischen Schichtdicke bei Kupplung der Aminosäure mit DIC gezeigt. Deutliche Unterschiede zu Reaktionen in DMF zeigen sich in der Geschwindigkeit der Fmoc-Abspaltung. Während bei Verwendung von DMF die Abspaltung schon nach 3-5 min abgeschlossen war, wurde mit Piperidin in DME eine nahezu vollständige Abspaltung erst nach mehrfacher Behandlung mit der Abspatlösung erhalten. Vermutlich ist die Solvatisierung der oberflächengebundenen Fmoc-Aminosäure in DME schlechter als in DMF. Dadurch ist die Zugänglichkeit der Fmoc-Schutzgruppe geringer und die Abspaltung verläuft langsamer.

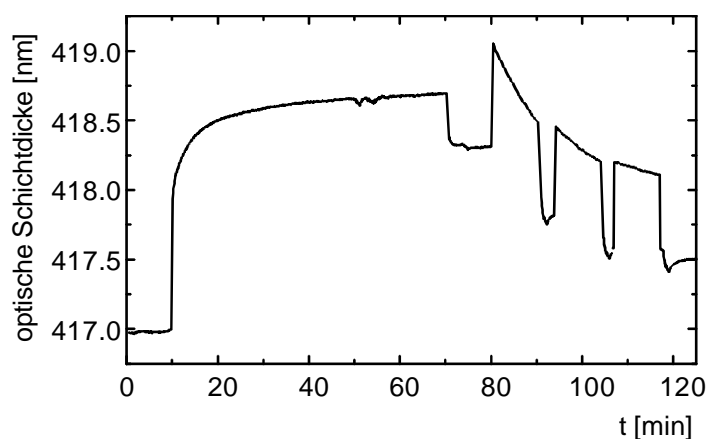


Abb. 3.12: Kupplung von Fmoc-Ahx-OH mit DIC (je 0,2 M in DME) an eine Diamino-PEG-Oberfläche und 3-fache Fmoc-Abspaltung mit Piperidin (20 % in DMF).

Wiederholungen der Kupplung von Fmoc-Ahx an Diamino-PEG-Oberflächen führten zu unterschiedlichen Bindungskurven (Abb. 3.13), wobei die Sprünge zu Beginn der Kupplung, der zeitliche Verlauf der Bindung und die erreichte Schichtdicke nach der Kupplung variierten. Für den letzten Aspekt wurde von Haake (haa 00) eine Abhängigkeit vom Alter der PEG-Schichten gefunden. Mit zunehmender Lagerungsdauer der Transducer wurde ein abnehmender Schichtdickenzuwachs bei der Bindung festgestellt. Zudem können die Transducer je nach Charge eine unterschiedliche Oberflächenbeladung aufweisen. Die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten (die aus den Anfangssteigungen bestimmten Ratenkonstanten variieren um den Faktor 2) konnten weder mit dem Alter der Transducer noch mit der Endschichtdicke korreliert werden. Obwohl diese Streuung höher ist als die gewöhnlich bei Affinitätsreaktionen unter Wasser bestimmten Werte, ist die Detektion der Aminosäureanbindung mit einer gewissen Reproduzierbarkeit möglich.

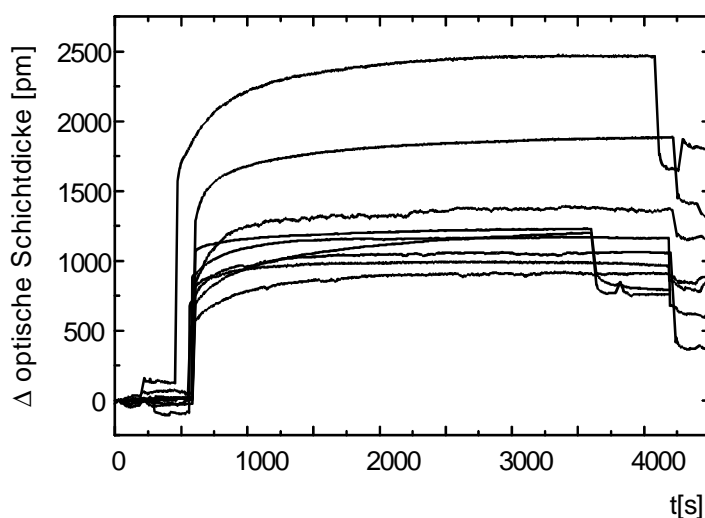


Abb. 3.13: 9 Beispiele der Verfolgung der Kupplung von Fmoc-Ahx-OH mit DIC (jeweils 0,2 M in DME) an eine Diamino-PEG-Oberfläche.

3.2.3.3. Monitoring der Synthese eines Hämagglutinin-Epitops mit anschließender Antikörper-Bindung

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Verfolgung der Kupplung von Aminosäuren wurden an einer längeren Peptidsynthese erprobt. Im Anschluß wurde ein Bindungsassay mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt.

Als Modellsystem wurde ein Epitop des Hämagglutinins (HA) des humanen Influenzavirus mit der Sequenz YPYDVPDYA gewählt. Gegen dieses Epitop ist ein hochaffiner monoklonaler Antikörper kommerziell erhältlich. Ziel der Untersuchung war die Möglichkeit der Online-Verfolgung einer Peptidsynthese mit direkt anschließendem Bioassay, wie er beim Screening von auf der Oberfläche synthetisierten Bibliotheken mit einem Targetprotein durchgeführt würde, zu zeigen. Zusätzlich steht mit diesem Test eine Methode zur Verfügung, den Syntheseerfolg direkt an der Oberfläche zu überprüfen, da nur bei einer ausreichenden Zahl an Bindungsstellen die Antikörperbindung nachweisbar ist.

Die Synthese erfolgte auf einer Diamino-PEG-Oberfläche mit TBTU/HOBt-Aktivierung in 0,1 M Lösung. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wurde in der üblichen Weise mit TFA durchgeführt, wobei die Bindung zum Transducer erhalten blieb, da auf die Einführung eines Linkers verzichtet wurde.

In Abb. 3.14 sind beispielhaft 3 Bindungskurven aus der Synthese des HA-Peptids gezeigt. Bei allen Kupplungen wurde eine Sättigung erreicht, wenn auch nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. Demgegenüber war die Fmoc-Abspaltung einheitlich nach ungefähr 3 min abgeschlossen.

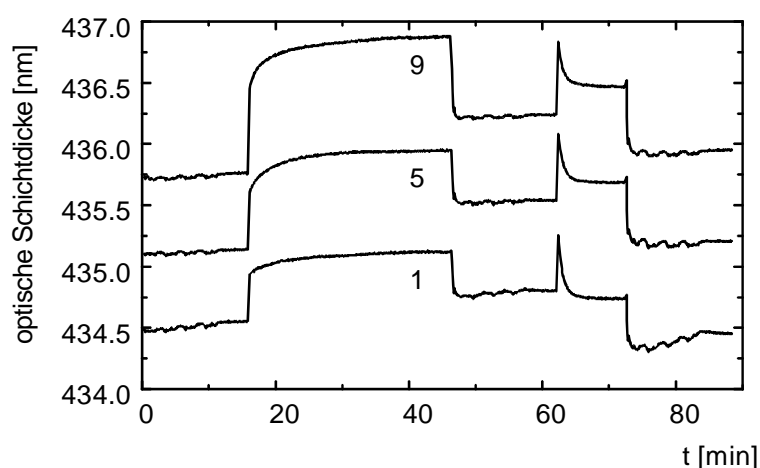


Abb. 3.14: Bindungskurven für die Synthese des HA-Peptids. Zur besseren Übersicht sind von 9 Aminosäure-Kupplungen nur die Positionen 1 (Ala), 5 (Val) und 9 (Tyr) gezeigt.

Abb. 3.15 zeigt die Schichtdickenänderungen einer Gesamt-Synthese nach Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren und nach Abspaltung der Fmoc-Gruppen in einer Übersicht. Die resultierenden Änderungen der optischen Schichtdicke nach Fmoc-Abspaltung sind häufig sehr gering und teilweise sogar negativ. Wie in Kapitel 3.2.3.2 am Beispiel von Glycin beschrieben wurde, sind solche geringen Effekte aufgrund von Signalunsicherheiten nicht signifikant. Dennoch ist über den Verlauf der Bindungskurve eine Bestimmung des Endpunkts der Reaktion möglich.

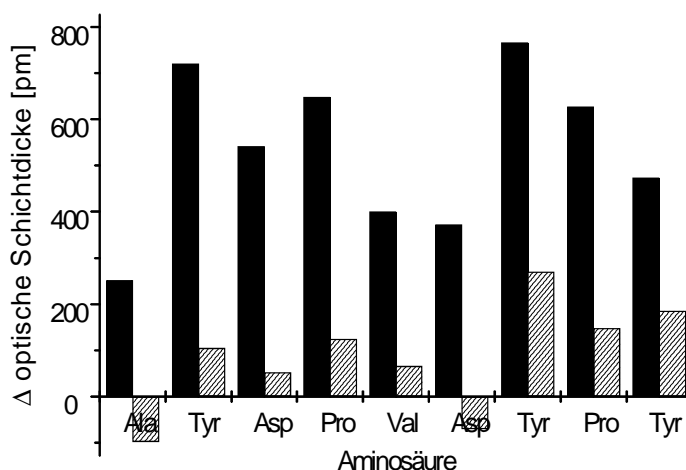


Abb. 3.15: Verfolgung der Synthese des HA-Peptids: Schichtdickenzunahmen bei der Kupplung, gemessen vor (ausgefüllt) und nach der Fmoc-Abspaltung (schraffiert).

Die mehrfache Wiederholung der Synthese lieferte prinzipiell die gleichen Ergebnisse. In Abb. 3.16 sind die Mittelwerte von 4 Synthesen gezeigt. Die ebenfalls eingezeichneten Standardabweichungen spiegeln nicht nur die Unsicherheiten im Meßsignal, sondern auch die unterschiedlichen Bindungskapazitäten der 4 Diamino-PEG Oberflächen wieder. Die relativen Standardabweichungen betragen 6 - 28 %.

Um diese geringen Schichtdickeneffekte besser quantifizieren zu können, wurden in einem weiteren Experiment die Zahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche durch Einführung von 3 Lysin-Verzweigungen auf ungefähr das achtfache gesteigert. In Abb. 3.17 ist die entsprechende Verdopplung des Schichtdickenzuwachses für die drei Kupplungen von Fmoc-Lys(Fmoc) zu erkennen. Interessanterweise resultiert für die Kupplung von Asp auch hier jeweils eine negative Schichtdickenänderung, was mit der bisherigen Erklärung der Meßsignale nicht zu deuten ist.

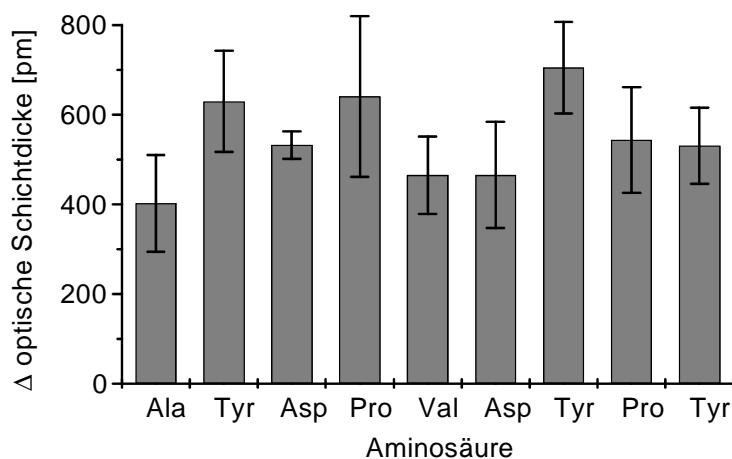


Abb. 3.16: Verfolgung der Synthese des HA-Peptids: Schichtdickenzunahmen bei der Kupplung, gemessen vor der Fmoc-Abspaltung. Fehlerbalken: Standardabweichungen für 4 Messungen.

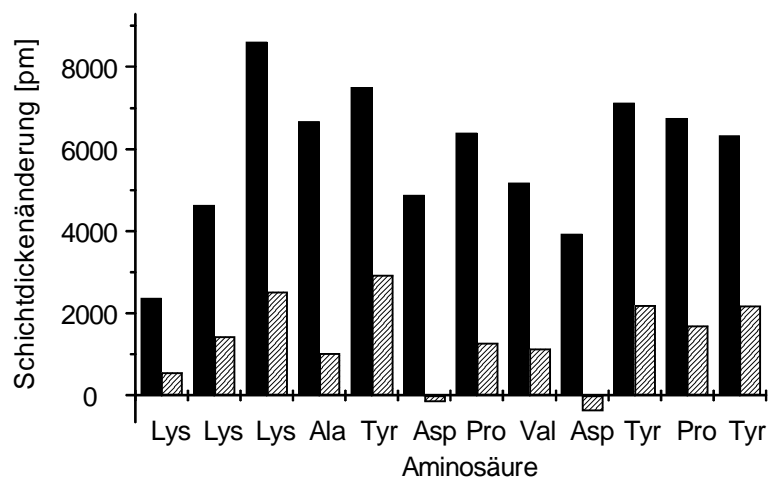


Abb. 3.17: Verfolgung der Synthese des HA-Epitops nach Einführung von 3 Lys-Verzweigungen mit Fmoc-Lys(Fmoc): Schichtdickenzunahmen bei der Kupplung, gemessen vor (ausgefüllt) und nach der Fmoc-Abspaltung (schraffiert).

Die Online-Verfolgung der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen ist in Abb. 3.18 gezeigt. Zu erkennen ist nach einer 5-minütigen Basislinie ein starker Abfall des Signals bei Zugabe von TFA, der, wie schon mehrfach besprochen, durch die stark unterschiedlichen optischen Eigenschaften von DMF und TFA verursacht wird. Danach nimmt die optische Schichtdicke weiter ab, durchläuft ein Minimum und steigt langsam wieder an. Nach Waschen mit DMF ist die resultierende Schichtdicke um ca. 1,3 nm niedriger als am Anfang der Entschützung. Das leicht ansteigende Signal nach Durchlaufen des Minimums kann durch ein Quellen der Dichtung der Meßzelle erklärt werden: Die gestrichelte Kurve in Abb. 3.18 zeigt den Kurvenverlauf bei Behandlung einer unmodifizierten SiO₂-Oberfläche mit TFA. Nach dem Brechungsindexsprung findet keine weitere Abnahme der Schichtdicke statt, da in

diesem Fall nichts von der Oberfläche abgespalten wird. Durch Aufnahme von TFA im Dichtering kommt es dagegen zu einem leichten Schichtdickenzuwachs. Durch Spülen mit DMF kann der Ausgangszustand wiederhergestellt werden. Das Signal bei der Schutzgruppenabspaltung setzt sich also aus diesem Quelleffekt und einer tatsächlichen Schichtdickenabnahme durch Abspaltung der Schutzgruppen zusammen.

Die Abnahme der optischen Schichtdicke um 1,3 nm ist allerdings größer als der Nettowuchs bei der Synthese des Peptids. Mit einem unmodifizierten Diamino-PEG-Transducer wurde nach Behandlung mit TFA eine Abnahme der Schichtdicke um ca. 1 nm erhalten. Der beobachteten Signalabnahme durch Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen ist demnach ein Signal überlagert, das von der PEG-Schicht verursacht wird. Diese Effekte konnten nicht sicher geklärt werden. Denkbar wäre, daß nicht kovalent gebundenes Polymer während der Umsetzung mit TFA desorbiert, oder daß das Diamino-PEG teilweise abgespalten wird.

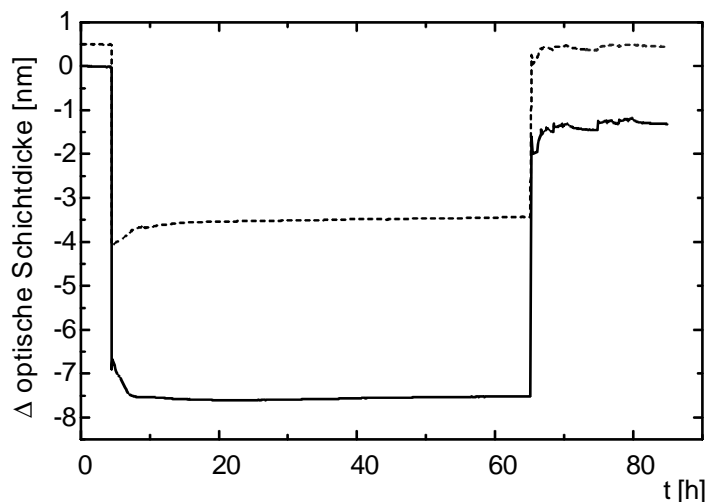


Abb. 3.18: Schichtdickenverlauf während der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA beim HA-Peptid auf einer Diamino-PEG-Oberfläche (durchgezogen) und während der TFA-Behandlung einer reinen SiO₂-Oberfläche (gestrichelt).

Die Bindung eines Antikörpers an die erhaltene Oberfläche sollte zum einen als Synthesebeweis dienen, zum anderen die prinzipielle Möglichkeit eines Bioassays auf diesen Oberflächen demonstrieren. In einem RIfS-Aufbau mit Standard-Fließ-Injektions-Anlage (FIA) wurde nach Spülen der Meßzelle mit Puffer zunächst die unspezifische Wechselwirkung mit Ovalbumin (OVA) und Rinderserumalbumin (BSA) überprüft. Dabei ergaben sich geringe Zunahmen der optischen Schichtdicke von ca. 50 pm für OVA und 180 pm für BSA, wobei nach längerem Spülen hiervon nur noch 100 pm übrig blieben. Anschließend wurden in zwei Experimenten unterschiedliche Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers injiziert. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml wurde ein Schichtdickenzuwachs von 550 pm, bei 2 µg/ml ein Zuwachs von 650 pm erhalten. Nach Regeneration mit Salzsäure und Acetonitril/-

Propionsäure wurde ungefähr der Ausgangswert der optischen Schichtdicke erhalten. Um zu überprüfen, ob die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche spezifisch ist, wurde ein Bindungshemmtest mit freiem HA-Peptid (vgl. Kapitel 2.1) durchgeführt: Nach Vorinkubation des Antikörpers (1 $\mu\text{g/ml}$) mit einer 100 μM Lösung des Peptids wurde nur noch eine geringe Zunahme der optischen Schichtdicke erhalten. Dies zeigt, daß sowohl das oberflächengebundene als auch das freie Peptid in dieselbe Bindungstasche des Antikörpers binden. Die Tatsache, daß die Bindung nicht vollständig unterdrückt wird, deutet auf eine relativ hohe Dissoziationsratenkonstante der Antikörper-Peptid-Bindung hin. Hierfür spricht auch die relativ starke Abnahme der Schichtdicke während des Spülens mit Puffer (Abb. 3.19, Bereich B). Ein Zerfall des Peptid-Antikörper-Komplexes in oberflächennahen Bereichen kann deshalb zur Bindung von Antikörpermolekülen an das oberflächengebundene Peptid führen.

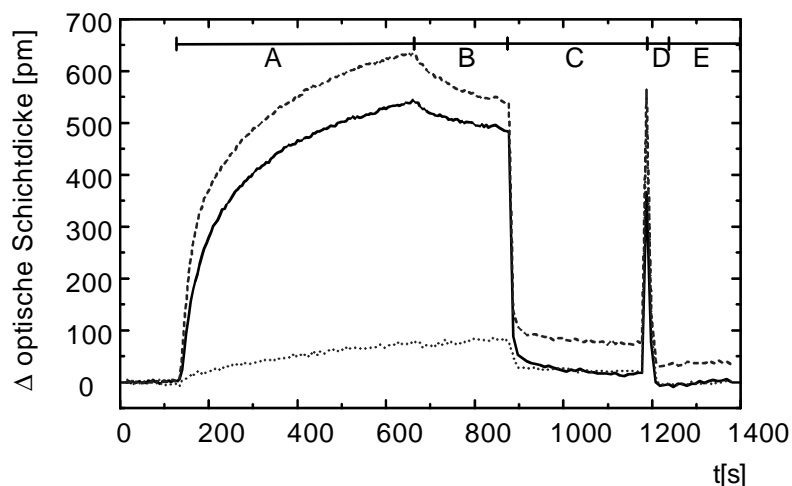


Abb. 3.19: Bindung eines monoklonalen Antikörpers an die Hämagglutininepitop-Oberfläche: 1 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper (durchgezogen); 2 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper (gestrichelt) und Inhibierung der Bindung von 1 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper durch eine 100 μM Lösung des HA-Peptids (gepunktet). Die bezeichneten Bereiche sind: Injektion des Antikörpers (A), Auswaschphase (B), Regeneration mit Salzsäure (C) und Acetonitril/Propionsäure (D), Spülphase (E).

Als Negativ-Kontrolle für den Bindungsassay wurde ein um die letzte Aminosäure (Tyrosin) verkürztes Peptid synthetisiert, an das der Antikörper nicht mehr binden sollte. Tatsächlich ergab sich bei der Injektion des Antikörpers zu dieser Oberfläche eine Schichtdickenzunahme von lediglich 50 pm.

3.2.4. Synthese von trisubstituierten 1,3,5-Triazinen

Am Beispiel von substituierten 1,3,5-Triazinen wurde die Synthese nichtpeptidischer organischer Moleküle auf Glasträgern untersucht. Triazin-Derivate sind Gegenstand vieler

biomedizinischer Forschungsfelder, so z. B. bei der Suche nach Chemotherapeutika [jar 93] oder als trifunktionelle Scaffolds für die Synthese von konformativ stabilisierten Proteinen aus synthetischen Peptiden [tah 98]. Daneben werden Triazine weltweit in großem Umfang als Herbizide eingesetzt und spielen daher eine wichtige Rolle im Bereich der Umweltanalytik. Aufgrund ihrer Toxizität und langen Haltbarkeit in der Umwelt wurden einige der Verbindungen in manchen Ländern inzwischen verboten. Gegen einige dieser Herbizide stehen polyklonale und monoklonale Antikörper zur Verfügung, so daß auch bei diesem Testsystem die Wechselwirkung zwischen auf der Oberfläche synthetisierter Verbindung und einem Antikörper untersucht werden konnte.

Als Folge der oben genannten Anwendungen besteht ein großes Interesse in der kombinatorischen Synthese von Triazinen. Methoden einer Bibliotheksynthese in Lösung wurden z.B. von Falorni [fal 98] et al. und Gustafson et al. [gus 98] vorgestellt. In dieser Arbeit wurde die von Stankova und Lebl [sta 96] publizierte Festphasensynthese auf die Glasoberflächen übertragen. Auf einer Diamino-PEG-Oberfläche wurde nach Anbindung einer Fmoc-Aminosäure und Fmoc-Abspaltung der Triazinring durch Substitution eines Chloratoms von Cyanurchlorid eingeführt. Durch Reaktion mit einem Amin wurde das 2. Chloratom ersetzt. In einzelnen Fällen wurde auch das verbleibende Chloratom durch Erhitzen in einer konzentrierten Lösung einesamins substituiert (Abb. 3.20).

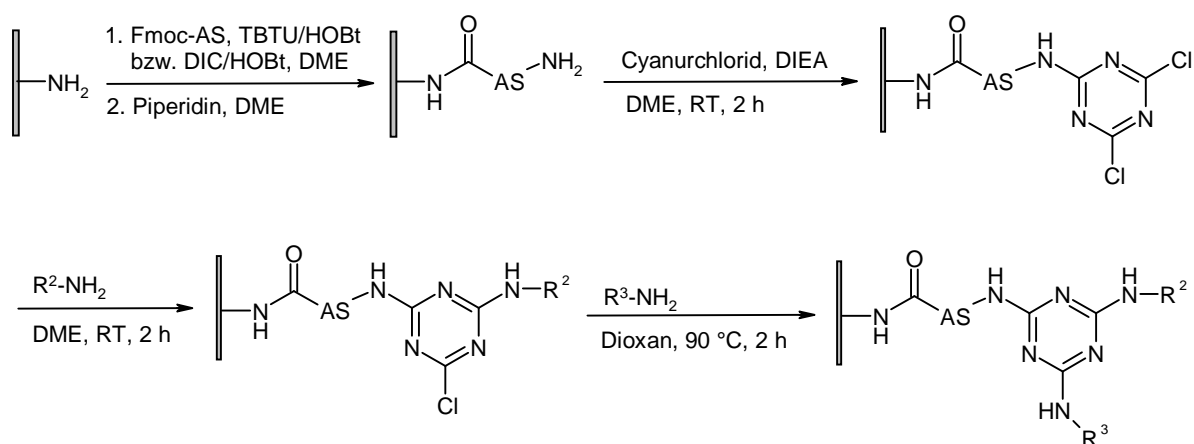


Abb. 3.20: Festphasensynthese von substituierten 1,3,5-Triazinen.

3.2.4.1. Synthese-Monitoring

Die Synthese-Verfolgung nichtpeptidischer organischer Moleküle wurde am Beispiel von zwei verschiedenen 1,3,5-Triazinen untersucht. Gegen Atrazinhexansäuramid [4-Chlor-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäuramid] (Abb. 3.21), ein Derivat des Herbizids Atrazin, waren Antikörper vorhanden, so daß wie bei der Synthese des

Hämagglutininepitops im Anschluß an die Reaktionsverfolgung ein Antikörper-Bindungsassay durchgeführt werden konnte.

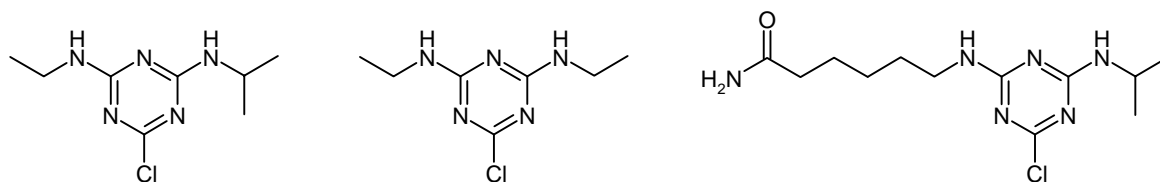


Abb. 3.21: Strukturen von Atrazin (links), Simazin und Atrazinhexansäureamid (rechts).

Die Synthese folgte dem in Abb. 3.20 gezeigten Schema. Zunächst erfolgte die Anbindung der Fmoc-6-Aminohexansäure mit DIC (0,2 M in DME). Nach Fmoc-Abspaltung und Anbindung von Cyanurchlorid wurde das 2. Chloratom durch Isopropylamin (0,1 M in DME) substituiert. Das verbleibende Chloratom am Triazinring wurde nicht substituiert. Die Syntheseverfolgung ist in Abb. 3.22 gezeigt. Die Bereiche A und B entsprechen den in Abschnitt 3.2.3.2 gezeigten Bindungskurven. Teil C zeigt die Anbindung von Cyanurchlorid mit einer resultierenden Schichtdickenzunahme von 440 pm. Selbst für die Umsetzung mit Isopropylamin, das eine relativ geringe Molekülmasse besitzt, wird ein signifikanter Zuwachs von 180 pm erhalten. Bei Wiederholungen dieses Experiments wurden ähnliche Bindungskurven erhalten, mit unterschiedlichen Steigerungen der optischen Schichtdicke (vgl. Kapitel 3.2.3.2).

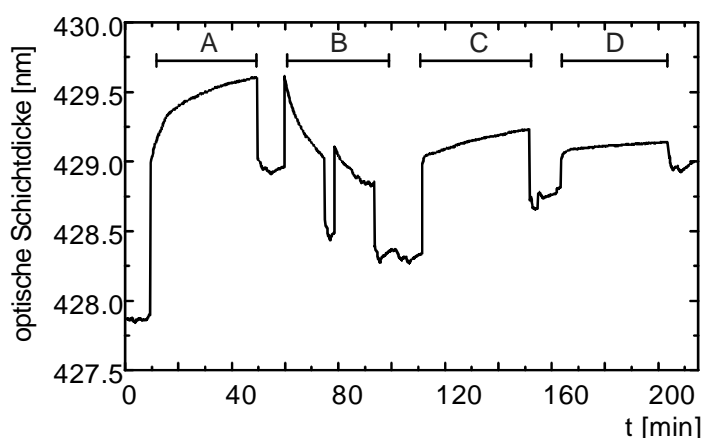


Abb. 3.22: Monitoring der Synthese von Atrazinhexansäureamid. A: Fmoc-Ahx/DIC (0,2 M in DME), B: 2 x Piperidin (20 % in DME), C: Cyanurchlorid (0,1 M in DME), D: Isopropylamin (0,2 M in DME). In den Zwischenbereichen wird mit reinem DME gespült.

Als Negativ-Kontrolle für den Bindungsassay wurde durch Austausch von Isopropylamin gegen Adamantylmethylamin ein sterisch anspruchsvolles Derivat synthetisiert (6-(1-Adamantylmethylamino)-4-chlor-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäureamid), an das der Antikör-

per nicht mehr binden sollte. Die Bindungskurve für dieses Derivat hatte ein vergleichbares Aussehen zu der in Abb. 3.22 gezeigten Kurve, wobei im letzten Schritt etwas höhere Zuwachsraten erhalten wurden.

Die Ergebnisse der Bindungstests mit einem monoklonalen Antikörper sind in Abb. 3.23 und Abb. 3.24 gezeigt. Überraschend war, daß auch an das sterisch gehinderte Adamantylmethylamin-Derivat eine deutliche Bindung des Antikörpers zu sehen war. Bei Injektion einer Antikörperlösung von 5 µg/ml war die mit diesem Derivat erreichte Gleichgewichtsbeladung ungefähr halb so hoch wie bei Atrazinhexansäureamid. Die Änderung der optischen Schichtdicke betrug ca. 0,75 nm für das gehinderte Adamantylmethylamin-Derivat bzw. 1,5 nm für Atrazinhexansäureamid. Offenbar bindet der Antikörper, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität, an beide Triazinderivate.

Die Spezifität der Bindung wurde auch hier durch einen Bindungshemmtest nachgewiesen. Dazu wurden beide Oberflächen mit dem monoklonalen Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml versetzt. Für die Oberfläche mit dem Adamantylmethylamin-Derivat ergab sich eine geringere Steigung, was auf eine langsamere Kinetik der Bindung deutet. Bei Vorinkubation der gleichen Antikörper-Konzentration mit 1 µg/ml Atrazincapronsäure konnte bei beiden Derivaten die Bindung des Antikörpers vollständig unterdrückt werden.

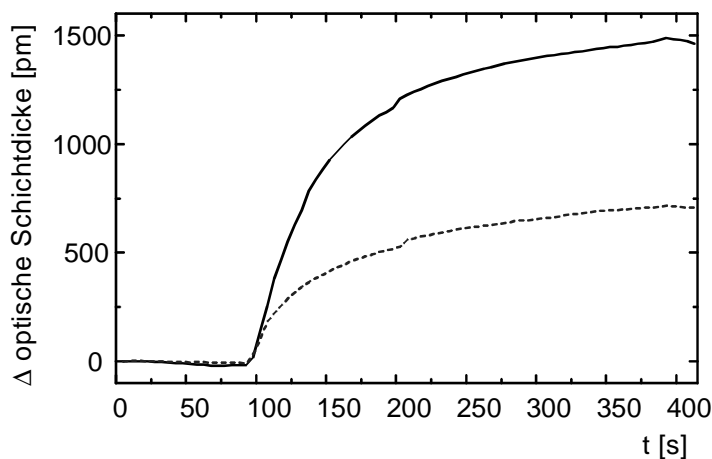


Abb. 3.23: Bestimmung der Gleichgewichtsbeladung mit 5 µg/ml monoklonalem Anti-Atrazin-Antikörper. Durchgezogen: Bindung an das Isopropylamin-Derivat, gestrichelt: Bindung an das Adamantylmethylamin-Derivat.

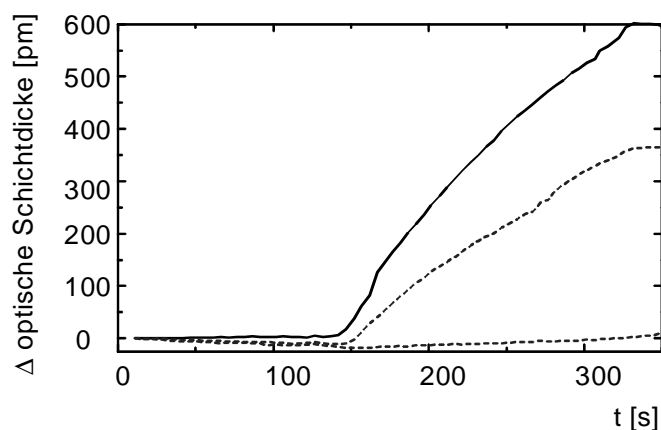


Abb. 3.24: Bindung eines monoklonalen Anti-Atrazin-Antikörpers ($1 \mu\text{g/ml}$) an das Isopropylamin-Derivat (durchgezogen) und an das Adamantylmethylamin-Derivat (gestrichelt, oben). Hemmung der Bindung mit 1000 ng/ml Atrazincapronsäure (gestrichelt, unten); Die Hemmung war bei beiden Oberflächen möglich, beispielhaft ist nur eine Kurve abgebildet.

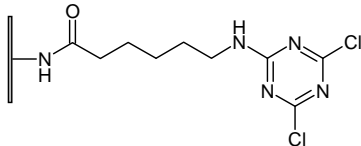
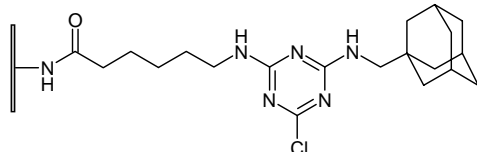
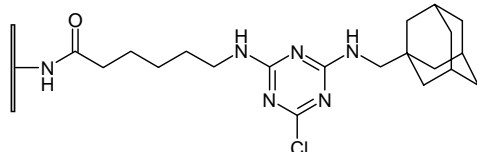
Obwohl der Antikörper noch eine relativ starke Bindung an das oberflächengebundene Adamantylmethylamin-Derivat zeigte, konnte bei Versuchen, die Bindung des Antikörpers mit diesem Molekül zu unterdrücken, keine Hemmung erreicht werden. Dies kann erklärt werden, wenn man bedenkt, daß das oberflächengebundene Triazin-Derivat nicht unbedingt die gleichen strukturellen Eigenschaften besitzt wie ein Molekül in Lösung. Auch könnte durch kooperative Wechselwirkungen des Antikörpers mit mehreren auf der Oberfläche gebundenen Molekülen eine Bindung möglich werden.

Andererseits muß an dieser Stelle kritisch angemerkt werden, daß mit der vorgestellten Methode zur Reaktionsverfolgung zwar das Ende eines Reaktionsschrittes, aber nicht zwingend ein vollständiger Umsatz detektiert wird. Ein Sättigungsverlauf der Meßkurve bedeutet, daß keine weiteren Reaktionszentren umgesetzt werden, es könnten aber noch freie, möglicherweise schwer zugängliche Bindungsplätze auf der Oberfläche vorhanden sein. Tatsächlich wurde auf einem Transducer, bei dem die Synthese nach Anbindung des Cyanurchlorids abgebrochen wurde, ein Schichtdickenzuwachs von ca. $3,5 \text{ nm}$ bei Bindung des monoklonalen Anti-Atrazin-Antikörpers erhalten. Auch an dieser Oberfläche war die Antikörperbindung durch Vorinkubation des Antikörpers mit Atrazinhexansäureamid zu hemmen.

Um auszuschließen, daß die Antikörperbindung an die Adamantylmethylamin-Triazin-Oberfläche durch Nebenprodukte der Synthese verursacht wird, wurde das Triazin-Derivat an 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz synthetisiert. Nach Aufreinigung wurde die Verbindung unter DIC-Aktivierung an den Transducer gebunden, so daß von einer einheitlichen Oberfläche ausgegangen werden kann. Da auch diese Oberfläche den Antikörper binden konnte, trifft im

gezeigten Beispiel die Erklärung der Antikörperbindung an Reaktionsbeiprodukte nicht zu. Dies konnte durch Synthese des Moleküls auf vergleichbaren Trägermaterialien mit anschließender Analytik der Reaktionsprodukte bestätigt werden (vgl. Abschnitt 3.2.4.3). Grundsätzlich ist allerdings die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse aufgrund von unerwünschten Nebenprodukten nicht auszuschließen. Die Ergebnisse der Antikörperbindungsassays sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

Tab. 3.2: Maximalbeladung und mögliche Bindungshemmung auf verschiedenen Triazin-Oberflächen. 1-3a: unter Reaktionsmonitoring synthetisiert, 3b: Kupplung des fertigen Adamantylmethylamin-Triazins.

| Pos. | Oberfläche | Maximalbelegung | Bindungshemmung |
|------|---|---|-----------------|
| 1 |  | 3-4 nm | Ja |
| 2 |  | 5-6 nm | Ja |
| 3 |  | a) 3-4 nm b) 2-3 nm (nach der Synthese angebunden) | Ja |

3.2.4.2. Synthese in Mikrotiterplatten und Screening

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, daß Antikörper zwischen unterschiedlichen auf der Oberfläche synthetisierten Molekülen unterscheiden können. Deshalb wurde versucht, am Beispiel der Triazine modellhaft ein Screening mit dem in Kapitel 2.1.2.2 gezeigten parallelisierten RfS-Aufbau durchzuführen. Die Synthese wurde ohne Online-Verfolgung durchgeführt, da die Empfindlichkeit des parallelisierten Meßgeräts noch nicht für die Detektion von sehr kleinen Schichtdickenänderungen, wie sie in diesem Fall auftreten, optimiert ist.

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde eine Bibliothek aus 36 Triazin-Derivaten synthetisiert. Dabei wurde jede Verbindung zweifach in benachbarten Wells dargestellt, um die Reproduzierbarkeit der Synthese und des anschließenden Assays überprüfen zu können. Die verbleibenden 24 Wells konnten als Kontrolle genutzt werden.

Die Anbindung der Aminosäuren an die mit Diamino-PEG modifizierte Oberfläche der Mikrotiterplatte erfolgte mit DIC/HOBt-Aktivierung (je 0,2 M in DMF), die Reaktion mit Cyanurchlorid und die anschließende Substitution eines Chloratoms durch Amine wurden in DCM durchgeführt (jeweils 0,1 M). Amine, die als Hydrochlorid vorlagen, wurden dabei durch Zugabe von 1 Äquivalent DIEA freigesetzt. Das 3. Chloratom wurde nicht substituiert, da die Verklebung der Mikrotiterplatte bei hohen Temperaturen durch das in relativ hoher Konzentration vorhandene Amin beschädigt wurde. Nach Abschluß eines Reaktionsschrittes wurde jedes Well einzeln leergesaugt, um Kreuzkontamination mit Reagenzien der Nachbarwells zu vermeiden, und anschließend im Lösungsmittelstrom mit DMF, MeOH und DCM gewaschen.

Der Aufbau der synthetisierten Bibliothek ist in Abb. 3.25 gezeigt. Durch unterschiedliche Substitutionsmuster sollten die Auswirkung von Änderungen der Reste R1 und R2 auf die Bindungsstärke des Antikörpers untersucht werden. Parent-Molekül des eingesetzten Antikörpers ist Atrazinhexansäure (vgl. Abb. 3.21). Nach Piehler (pie 97) bewirken bei Wechselwirkung in homogener Lösung Veränderungen auf der Seite der Säuregruppe (R1) einen größeren Verlust an Bindungsaffinität, als bei Substitution des Isopropylamins. Da in der vorliegenden Arbeit nicht die Wechselwirkung in Lösung untersucht wurde, sondern die Affinität des Antikörpers zu oberflächengebundenen Molekülen, sollten Variationen der Aminosäure, über die das Triazinsystem an die Oberfläche gebunden ist, demgegenüber einen eher geringen Effekt zeigen. Eine Veränderung der Aminosäure, die im wesentlichen als Spacer zur Oberfläche dient, stellt gegenüber der Anbindung an die Oberfläche eine eher geringe Einschränkung dar. Neben der schon verwendeten Amino-hexansäure wurde Glutaminsäure-tert.-butylester mit sterisch anspruchsvoller und Phenylalanin mit aromatischer Seitenkette eingesetzt. Auf Seite von R2 wurden aliphatische, aromatische und heteroaromatische Reste unterschiedlicher Größe und Polarität eingeführt.

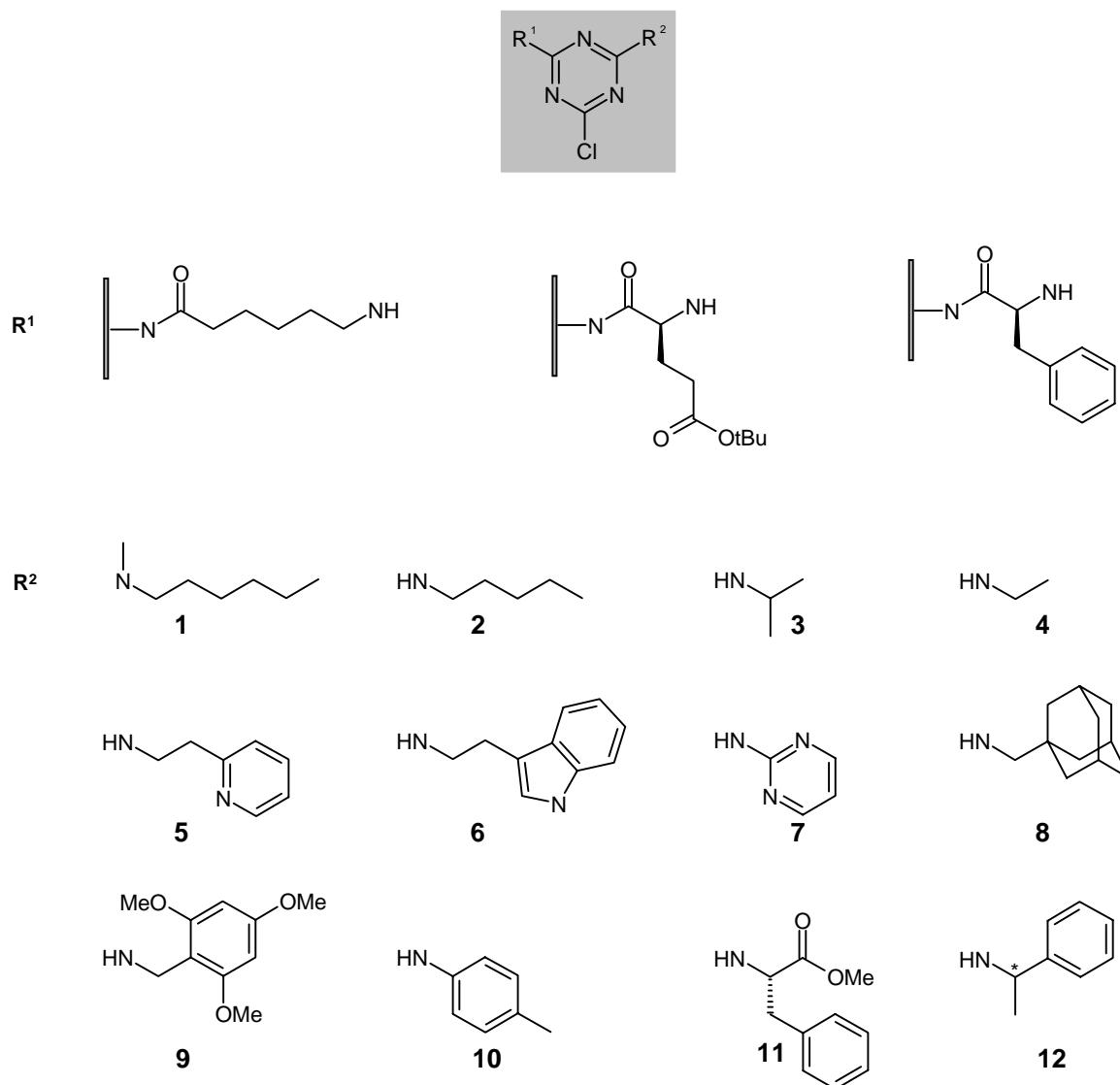


Abb. 3.25: Triazin-Bibliothek: R^1 bezeichnet 3 verschiedene oberflächengebundene Aminosäuren, R^2 bezeichnet 12 unterschiedliche Aminverbindungen.

Die Testung der Mikrotiterplatte erfolgte mit polyklonalen Anti-Simazin und Anti-Atrazin Antikörpern. Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse mit Anti-Simazin-Antikörpern beschrieben. Zunächst wurde zur Ermittlung unspezifischer Bindung eine Lösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Ovalbumin in die Platte pipettiert. Mit einem Schichtdickenzuwachs von ca. 200 pm wurde hierbei eine relativ hohe unspezifische Bindung festgestellt. Bei Wiederholung des Experiments nach Regeneration konnte kein nennenswerter Schichtdickenzuwachs mehr festgestellt werden, d. h. daß die unspezifischen Bindungsplätze mit Ovalbumin abgesättigt wurden. Die anschließende Bindung des Antikörpers wurde mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ während eines Zeitraums von 10 min gemessen. Anschließend wurde mit Puffer gespült und mit einer Pepsin-Lösung regeneriert. Bei Wiederholungen der Messung war kein merklicher Qualitätsverlust der Oberflächenbeschichtung zu beobachten.

Zur besseren Übersicht sind in Abb. 3.26 von den 72 Bindungskurven nur die Messungen für $R^2 = 9$ (obere Kurvenschar) und $R^2 = 10$ (untere Kurvenschar) mit jeweils allen 3 Aminosäuren als Spacer gezeigt. Immer zwei Kurven stammen also vom gleichen oberflächengebundenen Triazin-Derivat. Es zeigte sich, daß der Antikörper zwischen Verbindungen mit unterschiedlichen Resten R^2 diskriminieren kann, daß unerschiedliche Reste R^1 aber keinen nennenswerten Einfluß auf die Bindungsstärke haben.

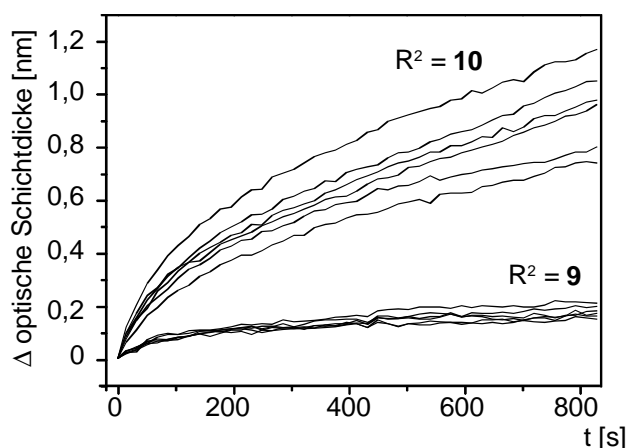


Abb. 3.26: Bindung eines polyklonalen Anti-Simazin-Antikörpers (20 $\mu\text{g/ml}$) bei sechs unterschiedlichen Triazin-Derivaten. Aufgezeigt sind jeweils 2 Messungen pro Probe. Zwischen den Aminosäuren (R^1) wurde nicht unterschieden.

Die Auswertung über die gesamte Mikrotiterplatte ist in einem Säulendiagramm gezeigt (Abb. 3.27). Als Maß für die Bindungsaffinität kann z. B. die Anfangssteigung der Bindungskurve oder der Schichtdickenzuwachs zu einem bestimmten Zeitpunkt herangezogen werden. Hier wurde die Gesamtänderung der optischen Schichtdicke ausgewertet. Die Variation der Aminosäure (R^1), über die das Triazinsystem an die Oberfläche gebunden ist, hat keinen großen Einfluß auf die Stärke der Antikörperbindung. Verbindungen, die sich nur in dieser Aminosäure unterscheiden, zeigen sehr ähnliche Bindungsaffinitäten. Unterschiede ergeben sich bei Veränderung der Aminkomponente (R^2), wobei sterisch hindernde Substituenten zu einer Verschlechterung der Bindung führen. Genauere Bindungsstudien sind aufgrund der derzeit noch vorhandenen Ungenauigkeit des neu entwickelten Meßgeräts nicht möglich. Deutlich ist aber, daß gleiche Verbindungen in unterschiedlichen Wells ähnliche Signale ergeben, die Messung innerhalb einer Platte also eine gewisse Reproduzierbarkeit zeigt. In den unbehandelten Wells wurde keine Bindung des Antikörpers an die Oberfläche gemessen.

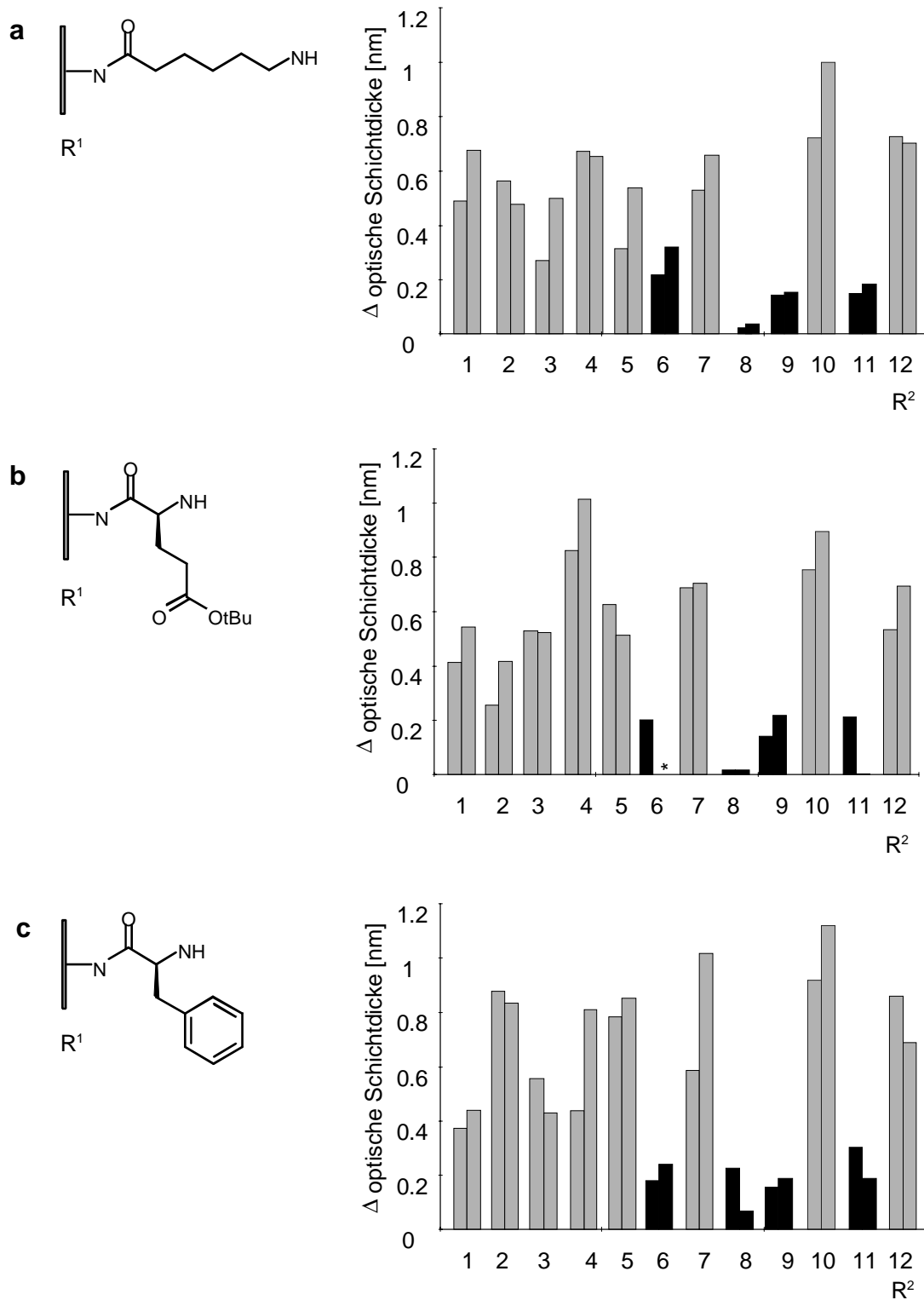


Abb. 3.27: Gesamtzuwachs der optischen Schichtdicke bei Inkubation der Mikrotiterplatte mit einem Anti-Simazin-Antikörper (20 μ g/ml) nach ca. 15 min Meßzeit. Antikörperbindende Derivate sind grau gekennzeichnet, schlecht bindende Derivate schwarz (Grenze bei 0,4 nm Schichtdickenzuwachs). R1 = Ahx (**a**), Glu(OtBu) (**b**), Phe (**c**). * Bei b-6 wurde aufgrund einer beschädigten Kavität nur ein Meßwert erhalten.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des vorigen Kapitels bei Synthesen in RIfS-Mikrotiterplatten zu überprüfen, wurde am Beispiel von drei Triazinderivaten mit einem

polyklonalen Anti-Atrazin-Antikörper sowohl der übliche Bindungstest als auch ein Bindungshemmtest durchgeführt. Neben den beiden schon verwendeten Verbindungen Atrazinhexansäureamid und dem entsprechenden Adamantylmethylamin-Derivat wurde ein Derivat mit einem L-Alaninmethylester-Substituenten untersucht (Abb. 3.28). Der Bindungshemmtest mit den beiden Antikörper-bindenden Molekülen (Abb. 3.29) beweist die Spezifität der Bindung.

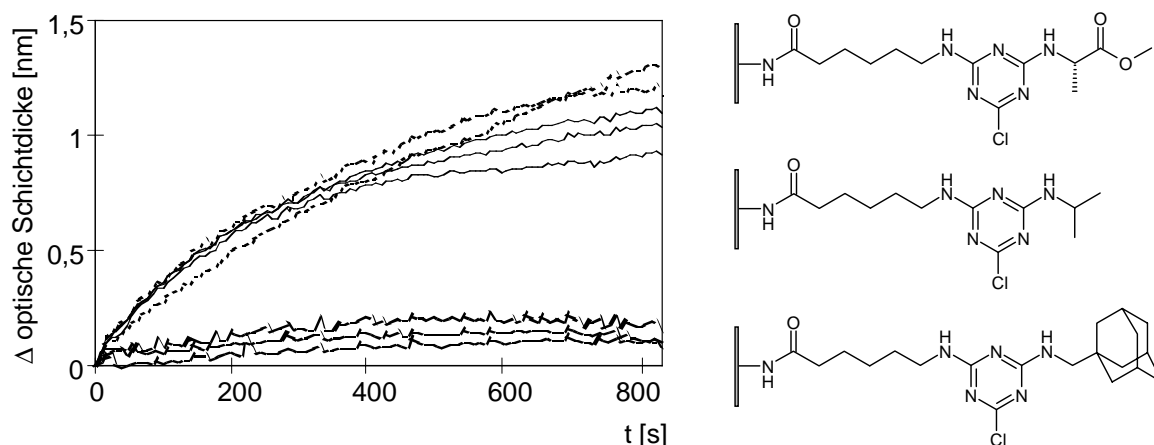


Abb. 3.28: Bindung eines polyklonalen Anti-Atrazin-Antikörpers (25 μ g/ml) (links) an drei unterschiedliche Triazin-Derivate (rechts). Unterschiedliche Substituenten am Triazin-Ring: L-Alaninmethylester (gepunktet), Isopropylamin (durchgezogen, oben), Adamantylmethylamin (durchgezogen, unten). Gezeigt sind jeweils mehrere Messungen in unterschiedlichen Kavitäten.

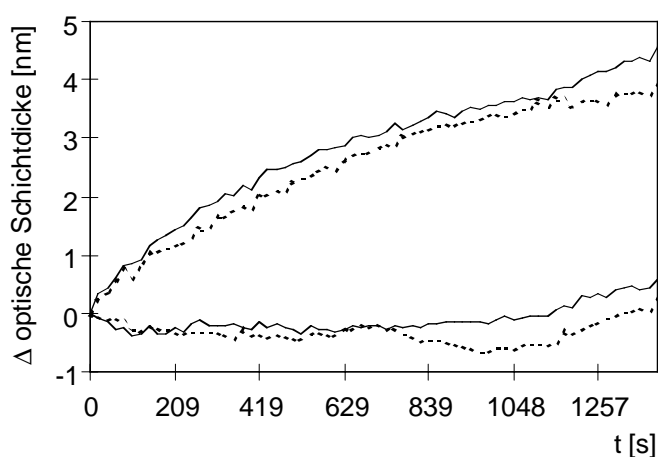


Abb. 3.29: Bindung eines polyklonalen Anti-Atrazin-Antikörpers (25 μ g/ml) an das Isopropylamin-Derivat (durchgezogen) und an das Alaninmethylester-Derivat (gestrichelt). Hemmung der Bindung mit 25 μ g/ml Atrazincapronsäure (untere Kurven).

Im Gegensatz zu den im vorigen Kapitel gezeigten Messungen (vgl. Abb. 3.23) wurde hier festgestellt, daß der Antikörper an das Adamantylmethylamin-Derivat praktisch nicht bindet.

Die Erklärung hierfür findet sich in der unterschiedlichen Meßtechnik. Während bei den früheren Experimenten mit einem Fluß-System gearbeitet wurde, finden die Assays in Mikrotiterplatten in ruhenden Lösungen statt. Bei diffusionskontrollierten Bindungskinetiken führt dies aufgrund der Ausbreitung der Diffusionsgrenzschicht zu einer raschen Verarmung der Antikörperkonzentration und damit zu einer langsameren Bindung. Mit einem Einkanal-Meßaufbau wurde die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche im Fluß und in ruhendem Zustand verglichen (Abb. 3.30). In einem Zeitraum von 800 s, entsprechend den Messungen mit dem parallelisierten Aufbau, wird bei Messung im Fluß schon ein Schichtdickenzuwachs von ungefähr 4 nm erhalten, in ruhender Lösung jedoch nur von 1 nm. Die erreichbaren Gleichgewichtsbeladungen sind aber in beiden Fällen gleich, wie in einem zusätzlichen Experiment gezeigt wurde.

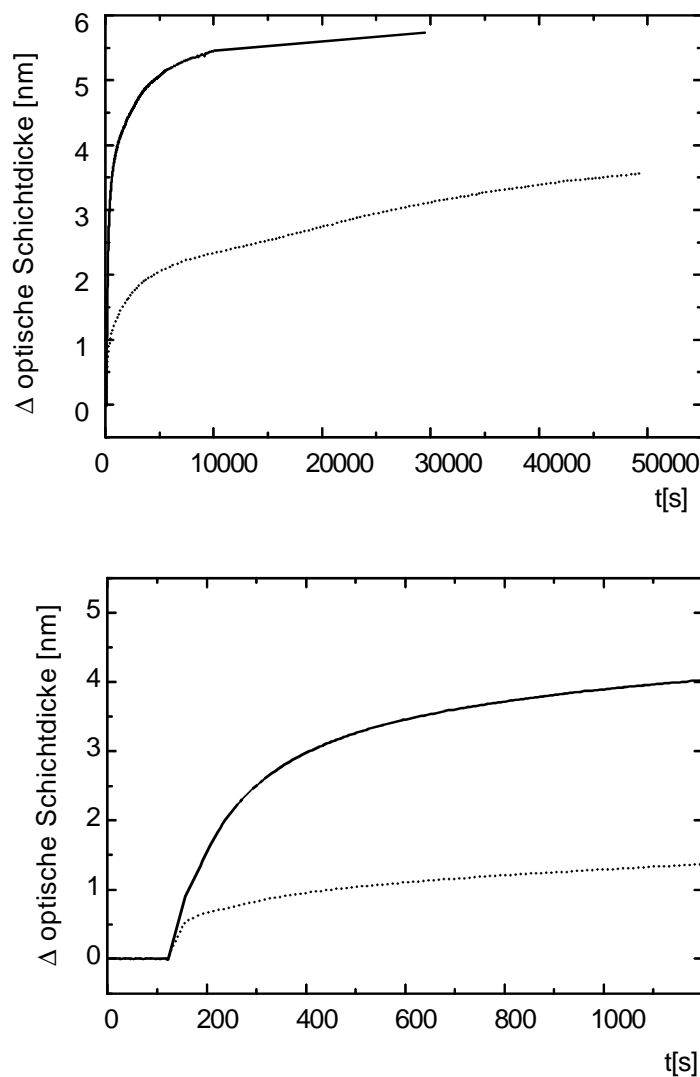


Abb. 3.30: Bindung eines Anti-Atrazin-Antikörpers ($50 \mu\text{g/ml}$) an das Adamantylmethylamin-Derivat, gemessen mit einem Einkanalaufbau. Durchgezogen: Messung im Fluß, gestrichelt: Messung in ruhendem Zustand. Die untere Grafik zeigt den Zeitausschnitt, der bei Messungen in Mikrotiterplatten verfolgt wurde.

3.2.4.3. Referenzsynthese und –analytik

Die Referenzsynthese wurde wie im Fall der Peptidsynthesen (vgl. Kapitel 3.2.3) zunächst auf CPG durchgeführt. Da die Produkte für eine Analytik mit HPLC und MS mit TFA vom Träger abgespalten werden sollten, wurde die Diamino-PEG-Oberfläche zunächst mit einem Rink-Amid-Linker modifiziert (vgl. Kapitel 3.2.2). Die Oberflächenbeladung des CPG's wurde durch Fmoc-Bestimmung zu ca. 0,04 mmol/g bestimmt. Dieser Wert liegt um einen Faktor von ungefähr 2,5 niedriger als bei vergleichbarem kommerziell erhältlichen Amino-modifiziertem CPG.

Die Synthese von Stankova [sta 96] wurde dahingehend abgewandelt, daß sie in der RfS-Meßzelle durchgeführt werden kann: Methylenchlorid wurde aufgrund seines niedrigen Siedepunkts durch DME ersetzt, die Anbindung von Cyanurchlorid wurde bei Raumtemperatur und nicht bei 0 °C durchgeführt. Da in der Meßzelle eine stufenweise Dosierung von Reagenzien nicht möglich ist, wurde die gesamte Menge der in diesem Schritt benötigten Base (DIEA) von Anfang an zugegeben. Nach Abspaltung der Syntheseprodukte mit TFA (20 % in DCM) wurden diese in tert.-BuOH/Wasser (4:1) aufgenommen und gefriergetrocknet. In Abb. 3.31 sind HPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum von Atrazinhexansäureamid gezeigt. Das Nebenprodukt bei 14,3 min konnte durch HPLC-MS-Kopplung als Peak mit der Masse $m/z = 283$ identifiziert werden. Die Isotopenaufspaltung des Peaks zeigt, daß in dieser Verbindung kein Chloratom mehr vorhanden ist. Offenbar wurde hier das letzte Chloratom durch eine Hydroxygruppe substituiert.

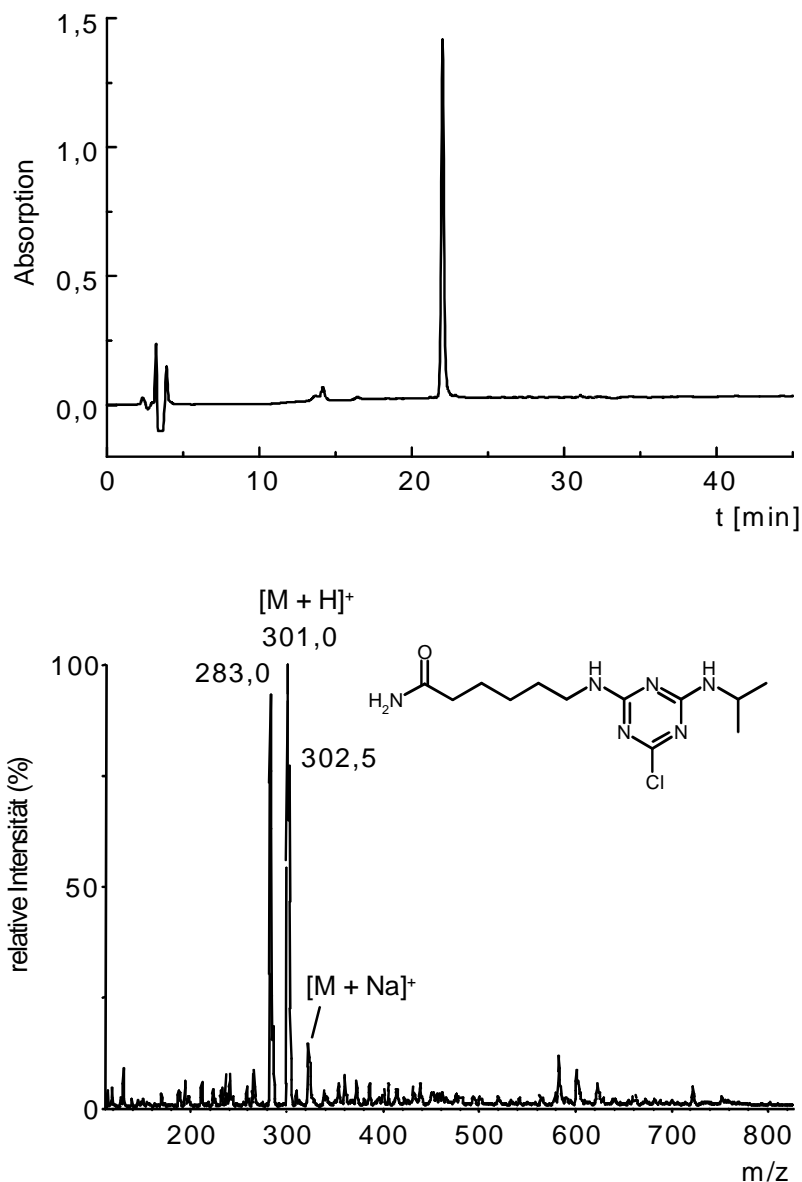


Abb. 3.31: HPLC (oben, $\lambda = 214\text{nm}$) und MS-Spektrum (unten) von 4-Chlor-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäureamid (Atrazinhexansäureamid).

Auch an dieser Stelle wurde nach einem besseren Vergleich zu planaren Glasoberflächen gesucht, als er durch CPG gegeben ist. Versuche, die in Mikrotiterplatten synthetisierten Verbindungen direkt zu charakterisieren schlugen fehl, da die Verklebung der Mikrotiterplatte nicht TFA-stabil war, wodurch eine saure Abspaltung nach Einführung des Rink-Linkers nicht möglich war. Ebenso führte eine photolytische Abspaltung in ACN nach Einführung eines Photolinkers nicht zum Erfolg, da während der Abspaltung soviel Zusatzstoffe bzw. Weichmacher aus der Polypropylen-Kavitätenplatte oder aus der Verklebung gelöst wurden, daß die erwarteten Verbindungen massenspektrometrisch nicht mehr nachzuweisen waren. Abhilfe könnte hier durch Vollglasplatten geschaffen werden, die üblicherweise für

chemische Zwecke verwendet werden. Allerdings wäre eine Glas-Mikrotiterplatte, welche den erforderlichen optischen Eigenschaften für RfS genügen würde, teuer.

Die in Kapitel 3.2.3.1 verwendeten Glasplättchen erwiesen sich ebenso als ungeeignetes Vergleichssystem, da die Plättchen zur Abspaltung der Reaktionsprodukte in verschließbaren Gefäßen mit TFA versetzt werden mußten. Diese Gefäße bieten eine relativ große Oberfläche an der die geringe Menge an Syntheseprodukt adsorbiert wurde. Zudem ist bei dieser Vorgehensweise der Eintrag an Verunreinigungen relativ hoch.

Die genannten Probleme konnten durch Verwendung handelsüblicher Glaskapillaren, ähnlich denen für die Probenauftragung bei der Dünnschichtchromatographie, umgangen werden. Kapillaren bieten den großen Vorteil, gleichzeitig als feste Phase und als Synthesereaktor zu dienen, wodurch eine Kontamination der Produkte nach der Abspaltung verhindert wird. Im folgenden soll die Vorgehensweise für eine Synthese in Kapillaren kurz erklärt werden, bevor auf die Ergebnisse der Triazin-Vergleichssynthesen eingegangen wird.

Die Synthese findet auf der Kapillarinnenoberfläche statt, die in Analogie zu den anderen bisher besprochenen Glasträgern silanisiert und mit einem Diaminoethylenglycol modifiziert wurde. Die Abspaltung der Syntheseprodukte erfolgte photolytisch. Eine nachträgliche Verunreinigung der Proben wird umgangen, da die Abspatlösung in der Kapillare verbleiben und direkt ohne Probenaufarbeitung analysiert werden kann. Über die kleine Oberfläche ($< 2 \text{ mm}^2$), die mit der Umgebung in Kontakt kommt, kann nur wenig Lösungsmittel verdampfen, so daß auch bei leichtflüchtigen Lösungsmitteln in offenen Kapillaren gearbeitet werden kann. Die Innenseite der Kapillaren ($d = 1 \text{ mm}$, $l = 8 \text{ cm}$) hat eine Oberfläche von $2,5 \text{ cm}^2$. Wird eine Oberflächenbeladung von $0,5 \text{ pmol/mm}^2$ angenommen, ergibt sich bei einem Volumen von ca. $60 \text{ } \mu\text{l}$ nach Abspaltung der Verbindungen von der Oberfläche eine Konzentration von ca. $2 \text{ } \mu\text{mol/L}$. Mit den vorhandenen HPLC-Systemen ist bei dieser geringen Konzentration eine reproduzierbare Analytik ohne weitere Aufkonzentrierung der Proben nicht möglich. Zur Synthesekontrolle wurde deshalb die ES-Massenpektrometrie herangezogen.

Die in Kapillaren synthetisierten Triazine dienten als Synthesekontrolle für die unter gleichen Bedingungen in der Mikrotiterplatte synthetisierten Verbindungen. Hierbei wurde von den im vorigen Kapitel eingesetzten Aminosäuren nur die Aminohexansäure verwendet. Es kann angenommen werden, daß Cyanurchlorid mit anderen Aminosäuren mit ähnlicher Ausbeute reagiert. Die verwendeten Amine R^2 sind:

- N-Hexylmethylamin, Pentylamin, 1-Phenylethylamin, Adamantylmethylamin, Isopropylamin, Trimethoxybenzylamin, Ethylamin x HCl und 2-(2-Aminoethyl)pyridin.

Im Fall des Pentylamin-Derivats wurde auch das letzte Chloratom des Triazin-Rings durch Pentylamin bzw. N-Hexylmethylamin substituiert.

In den folgenden Abbildungen sind für diese Verbindungen beispielhaft 2 MS-Spektren gezeigt. Das in diesem Abschnitt oben beschriebene Nebenprodukt konnte bei keiner der in Kapillaren synthetisierten Verbindungen nachgewiesen werden.

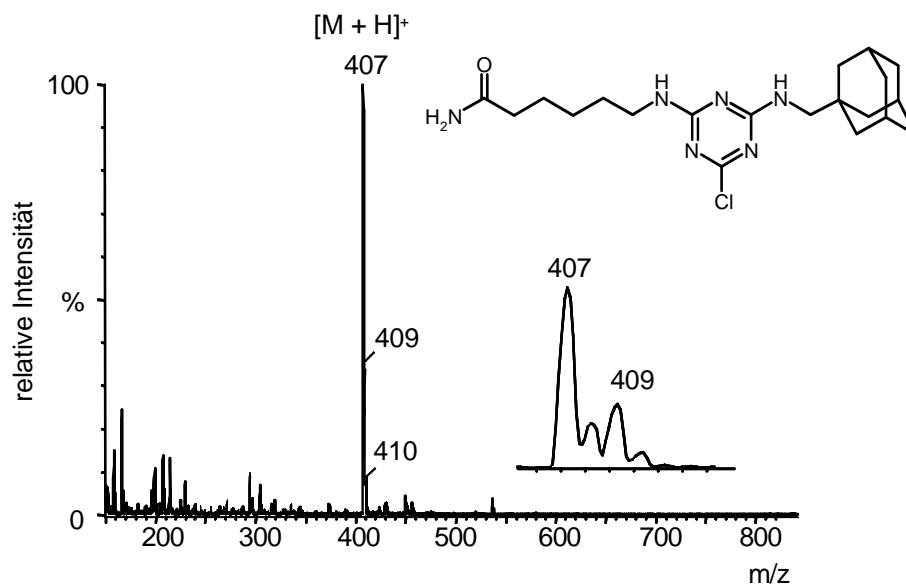


Abb. 3.32: ES-MS-Spektrum von 6-(Adamantylmethylamino)-4-chlor-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäureamid.

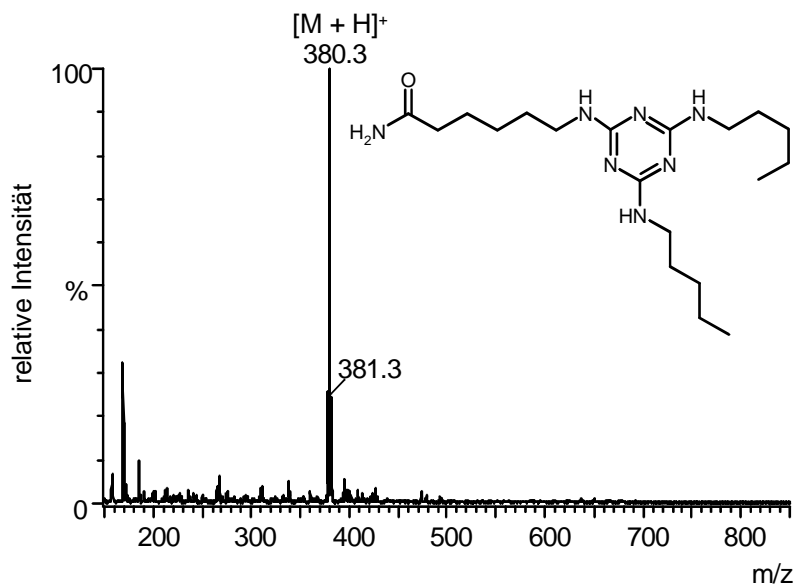


Abb. 3.33: ES-MS-Spektrum von 4,6-Bis(pentylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäureamid.

3.2.5. Festphasensynthese eines Thrombininhibitors

Thrombin ist ein proteolytisches Enzym, das aus Fibrinogen Fibrinmonomere freisetzt, die nach Aneinanderlagerung zu faserförmigem Fibrin und nach Quervernetzung zu Fibringerinnseln führen. Diese Abläufe stellen die letzten Schritte der Blutgerinnungskaskade dar, die durch Verletzungen ausgelöst wird und schließlich zum Wundverschluß führt. Besonders im medizinischen Bereich ist die Unterbindung der Blutgerinnung, z. B. bei operativen Eingriffen, wichtig. Prinzipiell kann hierfür an jedem Schritt der Gerinnungskaskade angesetzt werden, meist wird aber die Spaltung von Fibrinogen durch Inhibierung von Thrombin unterdrückt. Dies kann wie z. B. bei Heparin, einem Polysaccharid, durch Verstärkung natürlicher Inhibitoren geschehen oder durch niedermolekulare organische Moleküle, die direkt mit Thrombin Komplexe bilden. In Abb. 3.34 und Abb. 3.35 sind zwei niedermolekulare Thrombininhibitoren gezeigt.

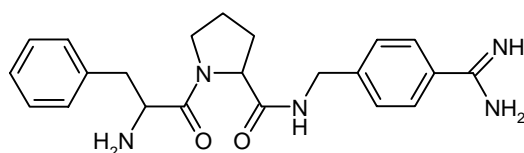


Abb. 3.34: Struktur eines Thrombininhibitors (freundlicherweise von der Knoll AG zur Verfügung gestellt).

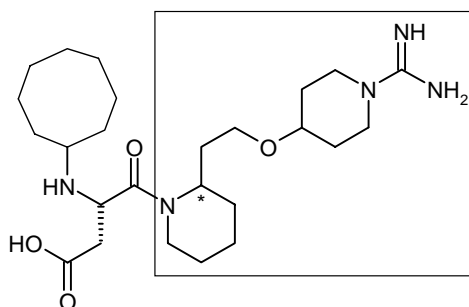


Abb. 3.35: Struktur des Thrombininhibitors N-(N-Cyclooctyl-S- α -aspartyl)-2R,S-[N-(2-amidino)-4-piperidyloxyethyl]-piperidin [bro 97]. Die Synthese des eingerahmten Molekülteils erfolgte in Lösung.*

Die Synthese des in Abb. 3.35 gezeigten Thrombininhibitors diente in dieser Arbeit als praxisnaher Test für das angestrebte Screening-Verfahren. Im einem ersten Schritt mußte die etablierte Lösungssynthese [bro 97] auf die feste Phase übertragen werden. Gleichzeitig sollte das aus dieser Synthese erhaltene Produkt für Vorversuche mit RfS verwendet werden.

* Das an der Guanidino-Gruppe zweifach Boc-geschützte Piperidin-Derivat wurde von Dr. D. Leipert zur Verfügung gestellt.

Wichtig waren hierbei die Fragen, ob mit diesem Produkt die Bindung von Thrombin an einen bekannten oberflächengebundenen Inhibitor gehemmt werden kann, und ob das Zielmolekül Thrombin auch dann bindet, wenn es selbst an der Transduceroberfläche immobilisiert ist. Da bei vielen bekannten Thrombininhibitoren die Guanidinogruppe eine wichtige Rolle für die Wirkung spielt, sollte das Molekül über die Carboxygruppe an die Oberfläche gebunden werden. Auch hier wurden wie in den vorigen Kapiteln Diamino-PEG-beschichtete Transducer verwendet, so daß die Synthese eines an den Aminogruppen geschützten Derivats erforderlich war, um es an die Transduceroberfläche binden zu können. Die Festphasensynthese des freien Inhibitors wurde auf Polystyrol-Wang-Harz ausgearbeitet (Abb. 3.36), ein Boc-geschütztes Derivat wurde im Anschluß mit dem gleichen Protokoll auf SASRIN-Harz synthetisiert. Das Inhibitor-molekül wurde aus Asparaginsäure, einem in Lösung vorsynthetisierten Piperidin-Baustein und Cyclooctanon aufgebaut. Nach Anbindung von Fmoc-Asp-OAll über die Carboxygruppe der Seitenkette wurde die Allylschutzgruppe mit 1,2 eq. Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium in $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}/\text{NMM}$ (37:2:1) abgespalten. Zur Anbindung des Boc-geschützten Piperidin-Derivats wurde zunächst versucht, die Carboxygruppe der Asparaginsäure als Pentafluorphenylester zu aktivieren. Hierzu wurde das Harz mit einem 3-fachen Überschuß von Pentafluorphenol und DIC mit katalytischen Mengen DMAP in DMF umgesetzt. Die Veresterung konnte nach Waschen des Harzes IR-spektroskopisch über die Absorptionen der Nitrogruppe (ca. 1520 bzw. 1350 cm^{-1}) überprüft werden. Die anschließende Umsetzung mit dem Piperidin-Derivat führte zu keinem befriedigenden Ergebnis. Deshalb wurden mehrere gebräuchliche Kupplungsreagenzien untersucht: Mit TBTU und DIC konnte keine ausreichende Umsetzung erreicht werden. Zufriedenstellende Reinheiten wurden nur mit PyBrop erhalten, das zur Knüpfung von Amidbindungen mit N-methylierten Aminosäuren bzw. sekundären Aminen besonders geeignet ist [cos 91]. Hierzu wurde das Piperidin-Derivat zusammen mit den Kupplungsreagenzien (PyBrop/DIEA, TBTU/HOBt/DIEA bzw. DIC/HOBt) in 3-fachem Überschuß in DMF gelöst zum Harz gegeben. In Tab. 3.3 sind HPLC-Reinheiten, die unter unterschiedlichen Kupplungsbedingungen erreicht wurden, angegeben. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte zu keiner Verbesserung der Reinheit.

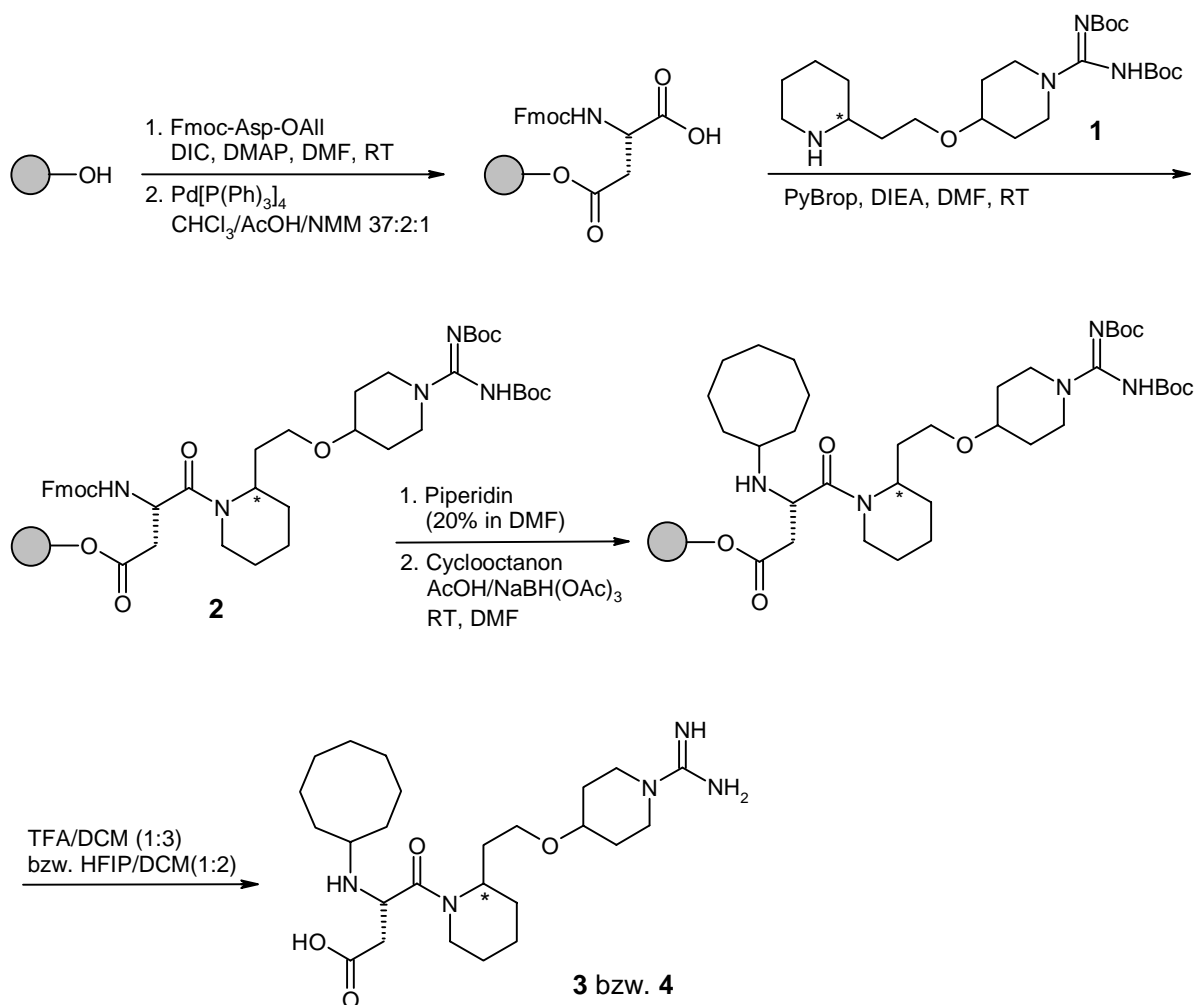


Abb. 3.36: Synthese des Thrombininhibitors **3** am PS-Wang-Harz und am SASRIN-Harz (Bei Abspaltung mit HFIP (30 % in DCM) wird das an der Guanidino-Gruppe zweifach Boc-geschützte Derivat erhalten (**4**)).

Tab. 3.3: Variation der Kupplungsbedingungen zur Anbindung des Piperidinderivats **1**. Die HPLC-Reinheiten wurden bei 214 nm bestimmt.

| Pos. | Reaktionsbedingungen | HPLC-Reinheit [%] |
|------|--|-------------------|
| 1 | als PFP-Ester voraktiviertes Harz, DMF, RT | 41 |
| 2 | PyBrop (3eq.), DIEA (6 eq.), DMF, RT | 82 |
| 3 | TBTU/HOBt (3eq.), DIEA (6 eq.), DMF, RT | - |
| 4 | DIC/HOBt (3eq.), DMF, RT | - |

Zur reduktiven Alkylierung des N-Terminus der Asparaginsäure wurde nach Fmoc-Abspaltung die freie Aminogruppe mit 5 eq. Cyclooctanon, 5 eq. Natriumtriacetoxyborhydrid in Anwesenheit von Essigsäure bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Abspaltung vom polymeren Träger wurde das Produkt in einer Reinheit von ca. 65 % (HPLC, $\lambda = 214$ nm) erhalten. Als Nebenprodukte traten das nicht alkylierte Edukt ($m/z = 370$), das durch Wieder-

holung der Reaktion entfernt werden konnte, und eine an der Aminogruppe acetylierte Verbindung auf ($m/z = 412$). Abb. 3.37 und Abb. 3.38 zeigen die MS-Spektren des nach saurer Abspaltung entschützten Zwischenprodukts **2** und des Endprodukts der Synthese, des Inhibitors **3**.

Die Synthese auf SASRIN-Harz erfolgte analog der Synthese auf Wang-Harz und lieferte das an der Guanidino-Gruppe geschützte Produkt **4** in vergleichbarer Reinheit.

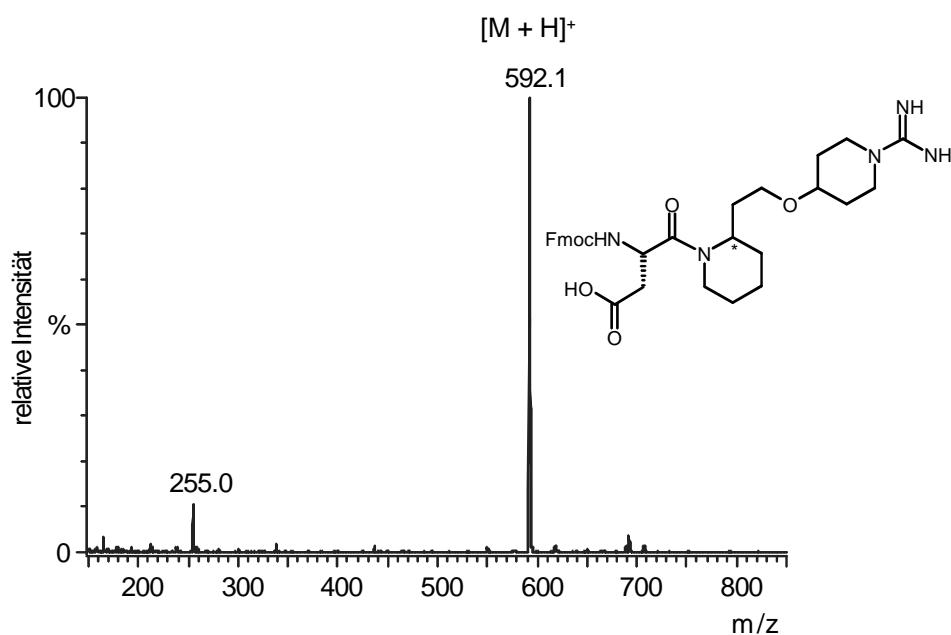


Abb. 3.37: ES-MS-Spektrum von **2** nach Abspaltung vom Harz mit TFA an der Guanidino-Gruppe entschützt ($m/z = 255$: Fragmentierung an der Amidbindung).

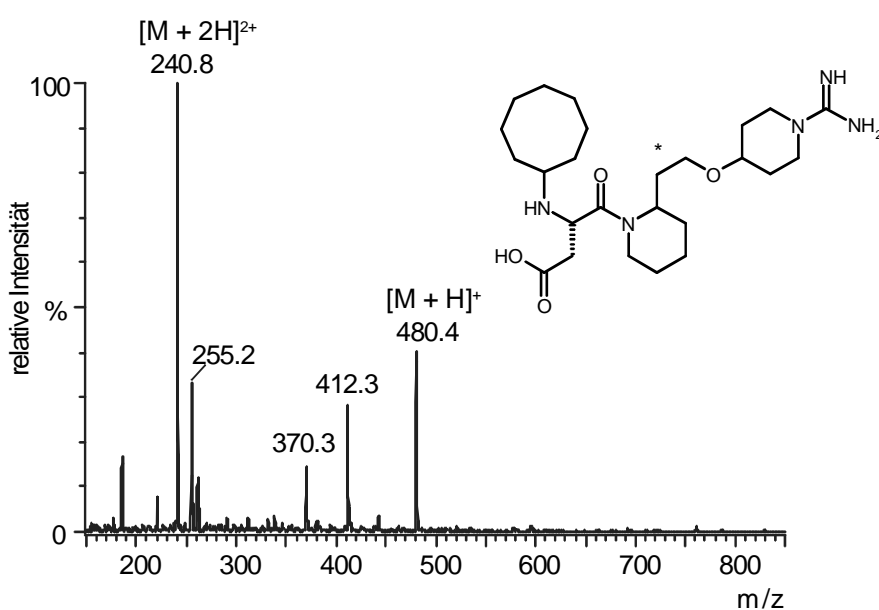


Abb. 3.38: ES-MS-Spektrum von **3**.

Sehr schlechte Reinheiten für die reduktive Alkylierung wurden bei Synthesen auf Trityl-Harz erhalten, weshalb für die Darstellung des Boc-geschützten Inhibitors auf SASRIN-Harz zurückgegriffen wurde. Die geringe Ausbeute bei Verwendung des Trityl-Harzes ist vermutlich auf eine große sterische Hinderung zwischen Cyclooctanon und dem Trityl-Anker zurückzuführen.

Die Wirksamkeit des freien Inhibitors **3** wurde mit RIfS durch Hemmung der Bindung von Thrombin überprüft. Hierzu wurde der in Abb. 3.34 gezeigte Thrombininhibitor über die Aminogruppe unter Knüpfung einer Peptid-Bindung kovalent an einen mit Bernsteinsäureanhydrid umfunktionalisierten Diamino-PEG-Transducer gebunden. Die Bindung von Thrombin an diese Oberfläche konnte durch Vorinkubation von Thrombin mit **3** inhibiert werden (Abb. 3.39).

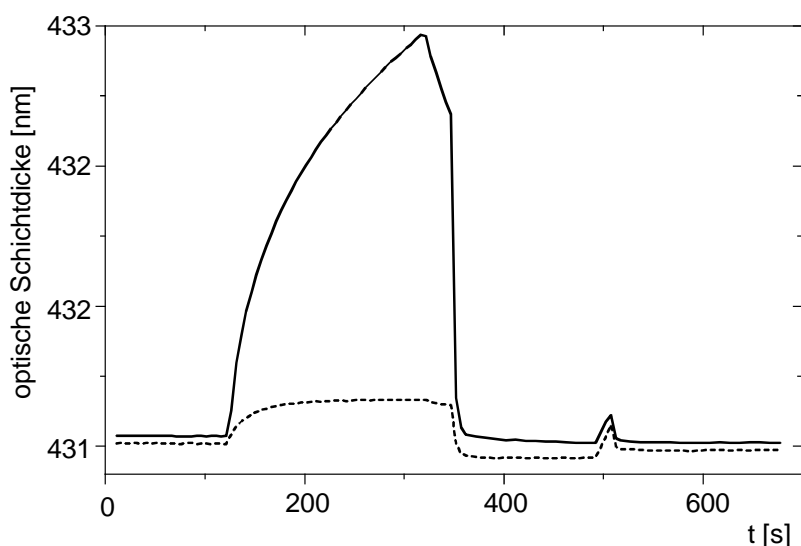


Abb. 3.39: Bindung von Thrombin (50 µg/ml) an den in Abb. 3.34 gezeigten Inhibitor (durchgezogen). Hemmung der Bindung mit 10 µg/ml des Inhibitors **3** (gestrichelt).

Die Synthese eines vollständig geschützten Derivats, das zur kovalenten Anbindung auf eine Diamino-PEG-Transduceroberfläche geeignet ist, war bisher erfolglos. Versuche, die durch die reduktive Alkylierung neu entstandene sekundäre Aminogruppe der Asparaginsäure mit Di-tert.-butyl-dicarbonat zu schützen, schlugen fehl, da vermutlich die sterische Hinderung an dieser Stelle zu groß ist. Eine Möglichkeit diese sekundäre Aminogruppe zu schützen, wäre die Einführung einer Fmoc-Schutzgruppe durch Umsetzung mit Fmoc-Chlorid, da der Raumanpruch bei Fmoc-Chlorid am reaktiven Zentrum geringer ist als bei Boc-Anhydrid.

3.2.6. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Reaktionen auf modifizierten Glasoberflächen durchgeführt. Gegenüber den konventionell für die Festphasensynthese verwendeten Trägermaterialien, wie Polystyrol oder PEG besitzt Glas zwar den Vorteil, daß auch bei hohen Temperaturen synthetisiert werden kann, jedoch, unabhängig vom verwendeten Linkersystem, den Nachteil geringer Basenstabilität. Zusätzlich bestehen Einschränkungen in der Anzahl der nutzbaren Lösungsmittel. Ebenso wie bei polymerharzgebundenen Festphasensynthesen sind in Abhängigkeit vom Solvationsvermögen und der Polarität nicht alle Lösungsmittel gleichermaßen geeignet, da bei schlechter Solvatisierung der oberflächengebundenen Reaktionszentren unzureichende Umsätze erhalten werden.

Eine weitere Einschränkung der Lösungsmittelpalette wird durch die Online-Verfolgung der Synthesen mit RfS gegeben. Organische Lösungsmittel sind für RfS-Messungen verwendbar, wenn sich ihr Brechungsindex von dem der SiO₂-Schicht deutlich unterscheidet. Als geeignet erwiesen sich z. B. DMF, DCM und DME.

Da sich an die Synthese ein Antikörper-Assay anschloß, wurden zur Abschirmung gegen unspezifische Bindung Diamino-PEG beschichtete Oberflächen verwendet. Obwohl diese Beschichtungen geringere Signale liefern als Aminodextranschichten, da nur eine Monolage an reaktiven Zentren zur Verfügung steht, erwiesen sie sich aufgrund der höheren chemischen Beständigkeit für die geforderten organisch chemischen Zwecke als besser geeignet.

Am Beispiel der etablierten Peptidchemie wurden die ersten Versuche zur Reaktionsverfolgung mit RfS unter Verwendung von Fmoc-Gly und Fmoc-Arg(Pbf) als Synthesebausteine durchgeführt. Mit beiden Aminosäuren konnte der komplette Syntheszyklus, d. h. die Anbindung der Aminosäure und die Abspaltung der Schutzgruppe verfolgt werden. Zur Kupplung der Aminosäuren wurden mehrere Kupplungsreagenzien in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Konzentration der Reagenzien einen größeren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit und auf die resultierende optische Schichtdicke, d. h. die resultierende Oberflächenbeladung hatte, als die Art der Kupplungsreagenzien. Diese Konzentrationsabhängigkeit deutet darauf hin, daß die Reaktionszentren auf der Oberfläche teilweise sehr schlecht zugänglich sind und erst bei hohen Konzentrationen umgesetzt werden. Deshalb wurden i. A. mindestens 0,1 M Lösungen eingesetzt.

Mit der Synthese eines Hämagglutinin-Epitops wurde die vollständige Reaktionsverfolgung für ein Nonapeptid mit Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und anschließendem Antikörperbindungsassay demonstriert. Durch die Bindung eines kommerziell erhältlichen hochaffinen Antikörpers gegen das HA-Epitop konnte der erfolgreiche Syntheseverlauf

bewiesen werden. Die Bindung konnte durch Zugabe des freien Peptids gehemmt werden. Als negativ-Kontrolle wurde ein um die N-terminale Aminosäure verkürztes Peptid synthetisiert, zu dem der Antikörper nur noch eine sehr schwache Bindung zeigte. Insgesamt belegen diese Resultate, daß auf der Oberfläche tatsächlich das gewünschte Peptid synthetisiert wurde.

Die Tauglichkeit der Methode zur Verfolgung der Synthese niedermolekularer organischer Moleküle wurde am Beispiel substituierter 1,3,5-Triazine gezeigt. Es zeigte sich, daß die Methode zur Verfolgung von Reaktionen, bei denen nur sehr geringe Änderungen der optischen Schichtdicke auftreten, an ihre Grenzen stößt. Auch hier wurde die erfolgreiche Synthese durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers bewiesen.

Auf eine Online-Verfolgung von Synthesen mit dem parallelisierten Screening-Gerät wurde an dieser Stelle verzichtet, da zum einen, bedingt durch die Meßtechnik, die Empfindlichkeit geringer ist als bei einem Einkanal-Aufbau, andererseits die Probenhandhabung des Pipettierroboters noch nicht auf organische Lösungsmittel ausgelegt ist. Zudem zeigten sich Probleme in der Stabilität der Verklebung der Mikrotiterplatte gegenüber manchen Lösungsmitteln und Reagenzien (z. B. TFA), so daß beim derzeitigen Stand der Mikrotiterplatten Einschränkungen bezüglich der Nutzbarkeit für organische Synthesen bestehen.

Die Triazin-Synthese wurde von den Transducern für den RfS-Einzelmeßplatz auf die Mikrotiterplatten des parallelisierten Geräts übertragen. In einer Mikrotiterplatte mit Diamino-PEG-Beschichtung wurde eine kleine Bibliothek aus 36 Triazinen synthetisiert und mit polyklonalen Antikörpern auf ihre Bindungsaktivität getestet. Hierbei konnte zwischen Triazinen, die eine hohe Affinität zu dem Antikörper zeigten und nichtbindenden Molekülen differenziert werden, eine genauere Unterscheidung war allerdings nicht möglich. Dies ist im Primärscreening ausreichend, da nur die aktivsten Verbindungen für nachfolgende Untersuchungen in einer getrennten Synthese dargestellt und aufgereinigt werden müssen.

Zusätzlich zu den Bindungsassays mit Antikörpern wurde der Syntheserfolg mit Referenzmethoden nachgewiesen. Da aufgrund der sehr geringen Stoffmengen auf den Transduceroberflächen eine Referenzanalytik schwierig ist, wurden sowohl peptidische Verbindungen als auch die Triazine auf vergleichbaren Oberflächen synthetisiert und mit konventionellen analytischen Methoden charakterisiert.

Peptide wurden durch Edman-Sequenzierung der oberflächengebundenen Syntheseprodukte nachgewiesen. Als Trägermaterialien wurden hierfür CPG und Deckgläschen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß die Syntheseprodukte bei Kupplung mit DIC bzw. TBTU keine nennenswerten Qualitätsunterschiede aufweisen. Allerdings schien die Kupplung mit DIC etwas langsamer abzulaufen, da die Produktreinheit bei kurzen Reaktionszeiten etwas geringer war als bei Kupplung mit TBTU.

Triazine wurden auf CPG und auf der Innenoberfläche von Schmelzpunktkapillaren synthetisiert. Um die Charakterisierung der Produkte mit HPLC und MS zu ermöglichen, wurde die Glasoberfläche mit einem säurelabilen bzw. einem photolabilen Linker modifiziert. Aufgrund der geringen Stoffmenge konnten die Verbindungen nach Abspaltung von den Kapillaren jedoch nur massenspektrometrisch charakterisiert werden.

Als drittes Modellsystem wurde schließlich die Festphasensynthese eines niedermolekularen Thrombininhibitors erarbeitet. Das an Polymerharzen synthetisierte Molekül zeigte im Bioassay gute Bindungseigenschaften zu Thrombin. Die Übertragung der Synthese auf Glasoberflächen und die Bibliothekssynthese in Mikrotiterplatten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4. Überwachung des Fermentationsprozesses von Glycopeptid-Antibiotika mit RfS

4.1. Einleitung

Biotechnologische Herstellungsverfahren haben in den letzten Jahrzehnten eine große Bedeutung erlangt. Der Markt für biotechnologische Produkte wird für das Jahr 2000 in den Bereichen Energie, Chemikalien, Pharmazeutika, Landwirtschaft, u.a. auf über 65 Milliarden Dollar geschätzt. Dabei sind fermentierte Nahrungsmittel nicht berücksichtigt, die allein mehrere hundert Milliarden DM ausmachen [leu 98]. Typische industrielle biotechnologische Prozesse sind die Herstellung von Proteinen und Peptiden, wie z.B. dem natürlichen Thrombininhibitor Hirudin, von Aminosäuren wie Lysin und Glutaminsäure, oder von Antibiotika wie z.B. Penicillinen oder Vancomycin.

Jeder Fermentationsprozeß muß laufend überwacht werden, um sicherzustellen, daß er in optimaler Weise verläuft. Dabei werden meist nur allgemeine Parameter wie pH-Wert, Temperatur oder Druck online verfolgt. Bisher erfolgte die Reaktionskontrolle offline, das bedeutet, daß zu verschiedenen Reaktionszeiten Proben gezogen werden, die dann aufgearbeitet und mit geeigneten Verfahren auf Produkt- bzw. Nebenproduktgehalt geprüft werden. Problematisch kann dabei die zeitliche Verzögerung zwischen Fermentationsprozeß und dem Analyseergebnis sein. Wünschenswert wäre deshalb eine direkte, kostengünstige Möglichkeit zur online-Kontrolle des Produktgehalts, um schnell auf Veränderungen im Fermentationsprozeß reagieren zu können.

Vor diesem Hintergrund sollte am Beispiel der Glycopeptid-Antibiotika Vancomycin und Balhimycin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gauglitz die prinzipielle Möglichkeit eines auf RfS basierenden Biosensors überprüft werden, der das markierungsfreie Online-Monitoring biotechnologischer Synthesen erlaubt.

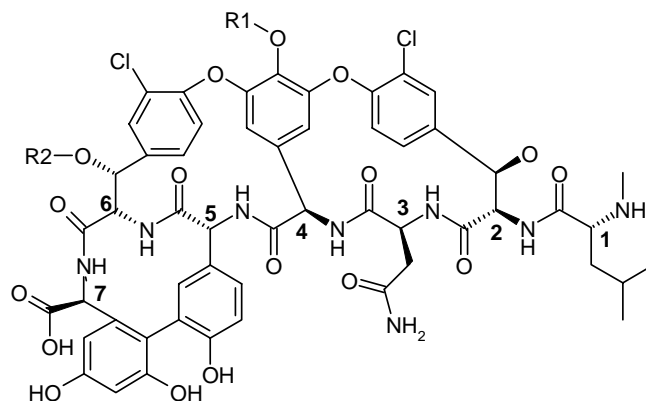
4.1.1. Glycopeptid-Antibiotika

Vancomycin wurde in den 50er Jahren bei einem Naturprodukt-Screening von Eli Lilly nach antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen entdeckt. Produziert wird das Antibiotikum von *Amycolatopsis orientalis*, einem Bakterienstamm, der ursprünglich aus indonesischen Bodenproben isoliert wurde. Vancomycin war der erste Vertreter einer neuen Klasse von Glycopeptid-Antibiotika, von welcher inzwischen mehr als 30 Antibiotika bekannt sind [nag 94]. Klinische Verwendung finden bisher allerdings nur das kürzlich zugelassene Teicoplanin und Vancomycin, das inzwischen den Status eines Notfallantibiotikums besitzt,

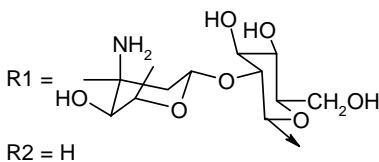
da viele Bakterien, insbesondere Methicillin-resistente Staphylokokken (MRS) [yao 94], Resistenzen gegen nahezu alle gebräuchlichen Antibiotika erworben haben.

4.1.1.1. Struktur und Wirkungsweise

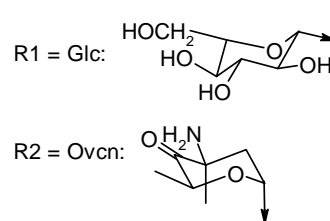
Glycopeptid-Antibiotika sind trizyklische Verbindungen. Gemeinsam ist den Verbindungen ein Heptapeptidrückgrat mit aromatischen Seitenketten, die über Phenylether- (AS 2, 4, 6) und Biphenyl-Bindungen (AS 5, 7) verknüpft sind. Dieses Grundgerüst kann an mehreren Stellen des Peptids glycosyliert sein und ist für alle Typen der Glycopeptid-Antibiotika charakteristisch. Man unterscheidet im wesentlichen drei Grundtypen durch die Art der Aminosäuren 1 und 3. Aliphatische Aminosäuren kennzeichnen den Vancomycin-Typ (Abb. 4.1), aromatische Aminosäuren den Actinoidin-Typ. Beim Ristocetin-Typ liegen aromatische, über eine Biphenylether-Brücke verknüpfte Aminosäuren vor. Zusätzliche Unterschiede ergeben sich in der Art der Glycosylierung, der Anzahl an Chloratomen und der Seitenkettenverbrückung.



Vancomycin



Balhimycin



Balhimycin V

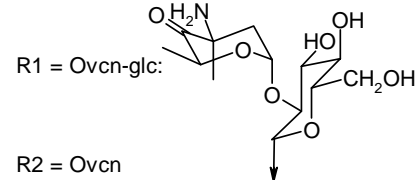


Abb. 4.1: Struktur von Vancomycin, Balhimycin und Balhimycin V [ver 96].

Ovcn: 4-Oxovancosaminyl-1, Glc: Glucosyl-1, Ovcn-glc: 4-Oxovancosaminyl-(1-2)-glucosyl-1.

Die Wirkungsweise der Glycopeptid-Antibiotika beruht auf der Unterbindung der Zellwandsynthese Gram-positiver Bakterien. Nieto und Perkins [nie 71] konnten zeigen, daß Vancomycin spezifisch an den Zellwandbiosynthese-Precursor, das UDP-N-Acetyl-Muramyl-

Pentapeptid bindet. Hierdurch wird die enzymatische Vernetzung der Muramylpentapeptide (AEKaa bei *Staphylococcus aureus*) und somit die Bildung des Mureins, der Stützsubstanz der Bakterienzellwände, verhindert. Die Glycopeptid-Antibiotika erkennen hierbei selektiv die C-terminalen Sequenzpositionen D-Ala-D-Ala des Pentapeptids. Die Aufklärung der Struktur des bimolekularen Komplexes von Vancomycin mit der Mucopeptidvorstufe Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala gelang durch NMR-Experimente [wil 62] und wurde später röntgenographisch bestätigt [sch 96b]. Die Bindung wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Methylgruppen des Alanins und den Kohlenwasserstoff-Abschnitten des Antibiotikums verursacht (Abb. 4.2). Das Pentapeptid Vancomycin-resistenter Bakterien endet C-terminal mit D-Lactat anstelle von D-Alanin. Durch den Verlust einer Wasserstoffbrücke ist die Vancomycin-Peptid-Bindung so stark geschwächt, daß die Zellwandbiosynthese der Bakterien praktisch ungehindert weiter läuft.

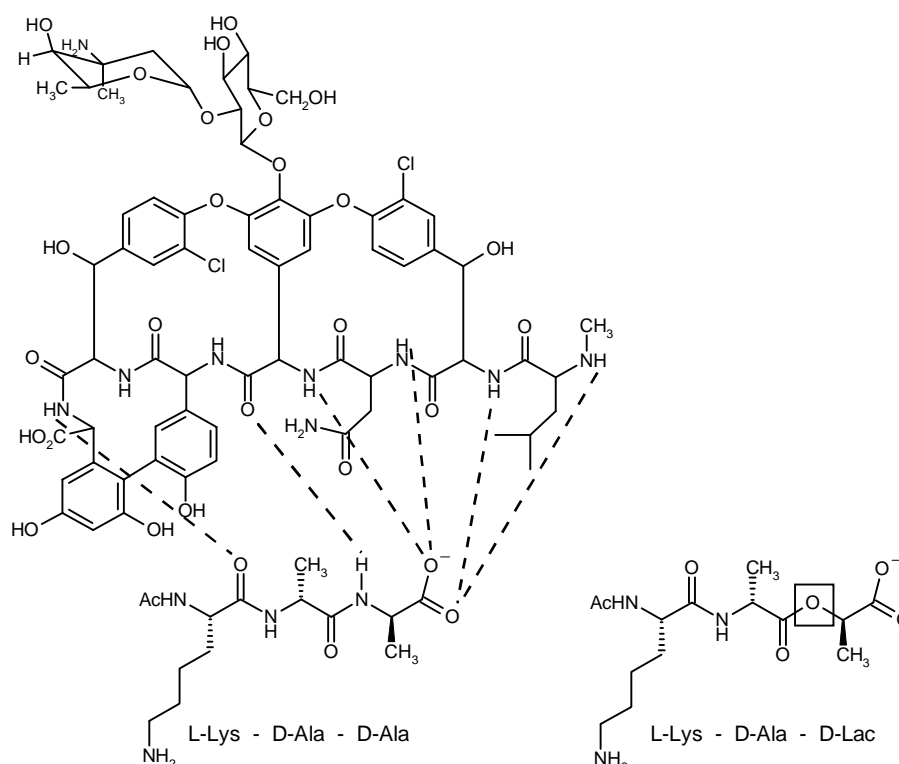


Abb. 4.2: Wechselwirkungen zwischen Vancomycin und der Mucopeptidvorstufe Kaa. Die gestrichelten Linien symbolisieren Wasserstoffbrückenbindungen. Bei Einbau von D-Lactat entfällt eine für die Bindung essentielle H-Brücke.

4.1.2. Aufgabenstellung

Die Möglichkeit der Überwachung der Produktkonzentration bei Fermentationen mit RIfS soll am Beispiel der Antibiotika Vancomycin und Balhimycin überprüft werden. Die Eigenschaft von Vancomycin, das Peptid D-Ala-D-Ala spezifisch und mit hoher Affinität zu binden, soll genutzt werden, um den Wirkstoffgehalt in der Kultur zu bestimmen. Dazu muß das D-Ala-D-Ala-Peptid auf dem Transducer kovalent aufgebracht werden. Da die Kulturbrühe aus dem Fermenterprozeß mit ihrem Gehalt an verschiedensten Proteinen, DNA-Partikeln und weiteren Komponenten eine sehr komplexe Matrix darstellt, müssen die Transducer so beschaffen sein, daß spezifisch die Konzentration des Antibiotikums bestimmt werden kann.

Die direkte Messung in Fermenterproben kann problematisch sein, wenn auch Fremdsubstanzen an den Transducer binden und somit das Ergebnis verfälschen. Gegebenenfalls sollen einfache Schritte zur Probenaufbereitung entwickelt werden. Zur Referenzierung der mit RIfS bestimmten Konzentrationen soll ein geeignetes Analytik-Verfahren erarbeitet werden.

4.2. Ergebnisse und Diskussion

4.2.1. Bestimmung der Vancomycin-Konzentration in Fermentationsproben mit RIfS*

Zur Bestimmung der Konzentration des Antibiotikums in den Fermenterproben wurde die reflektometrische Interferenzspektroskopie eingesetzt. Um die Wechselwirkungen zwischen z. B. Vancomycin und auf D-Ala-D-Ala endenden Peptiden zu studieren, wurde das Peptid kovalent an die Transduceroberfläche angebunden. Hierzu wurde N- α -acetyliertes L-Lys-D-Ala-D-Ala über die ϵ -Aminogruppe von Lysin auf der Oberfläche immobilisiert. Auf prinzipiell dem gleichen Weg wurden von Rao et al. [rao 99] die Konzentration von reinen Vancomycin-Lösungen mit Oberflächen-Plasmonenresonanz bestimmt.

Die grundlegenden Untersuchungen zur reflektometrischen Charakterisierung der beschichteten Transducer bezüglich der Abschirmung gegen unspezifische Wechselwirkungen, der Regenerierbarkeit und der Wechselwirkungskonstanten wurden vom Kooperationspartner durchgeführt und sind ausführlich bei Mehlmann [meh 99] beschrieben. An dieser Stelle soll nur eine kurze Zusammenfassung gegeben werden.

* Für die RIfS-Messungen in diesem Teil der Arbeit danke ich Herrn Dipl.-Chem. Martin Mehlmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Gauglitz vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen.

Zur Abschirmung der Transducer gegen unspezifische Wechselwirkungen können Aminodextran (AMD)- oder Diamino-PEG-Beschichtungen verwendet werden. Wegen der hydrogelartigen Struktur des Aminodextrans zeigten AMD-Transducer wie zu erwarten ein deutlich größeres Signal-Rausch-Verhältnis als Transducer, die mit PEG abgeschirmt waren. Auf PEG-modifizierten Transducern ist maximal die Anbindung einer Monolage möglich, so daß hier deutlich geringere Signale auftreten. PEG-modifizierte Transducer zeigten demgegenüber eine schneller ablaufende Kinetik und insgesamt eine etwas einfachere (da zeitlich kürzere) Regenerierung. Beide Transducerarten besitzen somit für eine Messung in einem Bioreaktor gewisse Vorteile. Die AMD-Transducer besitzen wegen der größeren Signalintensität eine geringere Nachweisgrenze, während bei den PEG-Transducern wegen der schnellen Gleichgewichtseinstellung eventuell eine kontinuierliche Messung ohne (bzw. mit deutlich kürzeren) Spül- und Regenerationsschritten möglich ist.

Die Spezifität der Bindung von Vancomycin wurde durch Hemmung der Bindung durch Zugabe von freiem Ligand (Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) gezeigt. Ein weiterer Beweis für die Spezifität der Bindung ist die Tatsache, daß ein Transducer, auf dem L-Ala-L-Ala-L-Ala immobilisiert wurde, keine Bindung von Vancomycin an die Oberfläche zeigte.

Um die Transducer auf unspezifische Wechselwirkungen zu testen, wurde nach Beschichtung der Glasoberfläche mit dem Liganden auf alle Oberflächen Ovalbumin als Modellprotein injiziert. Dabei zeigten alle verwendeten Transducer keine unspezifische Bindung.

Für die Messung des Verlaufs der Vancomycin-Produktion in einem Fermenter wurde ein Transducer zu verwendet, dessen SiO_2 -Schicht mit AMD abgeschirmt war. Dieser Transducer hat gegenüber Transducern, die mit Polyethylenglycol abgeschirmt wurden, den Vorteil eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses und eines größeren dynamischen Bereiches. Zudem kann aufgrund der langsameren Bindungskinetik anstelle der Gleichgewichtsbeladung die Anfangssteigung als konzentrationsabhängige Größe verwendet werden. Dadurch können Schwankungen durch z.B. unvollständige Regeneration und damit verbundener geringerer Maximalbelegung vermieden werden. Zur Anbindung von Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala wurde die Aminodextran-Oberfläche mit Glutarsäureanhydrid umfunktionalisiert. Nach Aktivierung der erhaltenen Carboxy-Gruppe als Succinimidylester wurde das Peptid über die ϵ -Aminogruppe von Lysin angebunden.

Zur Quantifizierung wurde mit reinem Vancomycin eine Kalibriergerade aufgenommen. Für Konzentrationen unter $10 \mu\text{g/ml}$ besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Anfangssteigung der Bindungskurve (Abb. 4.3).

Zur Verfolgung der Produktbildung im Fermenter wurden in regelmäßigen Abständen* Proben gezogen. Die Fermentation wurde nach der in Abschnitt 6.1.11 beschriebenen Methode durchgeführt. Der einzige Aufbereitungsschritt der Proben vor der Messung bestand im Abzentrifugieren größerer Inhaltsstoffe wie Zellen oder Zellfragmente. Ein solcher Aufbereitungsschritt ist nötig, um ein Verstopfen der Schläuche und der Flußzelle der FIA-Anlage und der Flußzelle zu vermeiden. Die Kulturfiltrate wurden bis zur Messung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

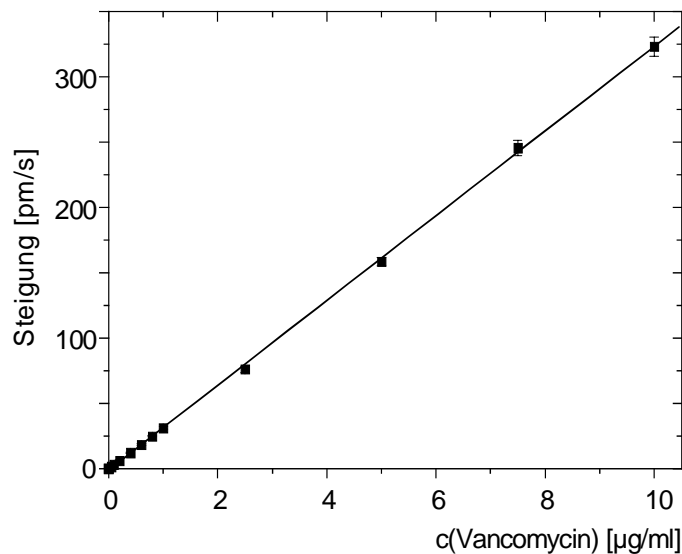


Abb. 4.3: Kalibriergerade für einen mit Ac-Lys-D-Ala-D-Ala modifizierten AMD-Transducer. Ausgewertet wurden die Anfangssteigungen der Bindungskurven.

In Vorversuchen wurden Vancomycinkonzentrationen von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ in den Fermenterproben bestimmt. Da der lineare Bereich der Kalibrierung bei unter $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ lag, wurden alle Proben im Verhältnis 1:99 mit PBS-Puffer verdünnt. Bereits bei der dritten Probe nach $t = 48\text{ h}$ ist die Anfangssteigung der Bindungskurve so steil (das heißt, es wurde schon soviel Vancomycin produziert), daß die Konzentration außerhalb des dynamischen Bereichs liegt und somit eine Konzentrationsbestimmung nur mit verdünnten Proben möglich ist.

Durch die hohe Verdünnung war eine quantitative Bestimmung der Vancomycinkonzentration in den ersten beiden Proben allerdings nicht mehr möglich, da ein zu geringes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wurde. Bei Versuchen, diese Kulturfiltrate direkt zu messen, wurde eine starke unspezifische Bindung an die Oberfläche festgestellt. Schon die erste Probe, die direkt nach dem Animpfen der Nährlösung mit dem Bakterienstamm (zum Zeitpunkt $t = 0\text{ h}$)

* Im folgenden ist mit der Numerierung der Proben bzw. der Messungen die zeitliche Abfolge der Probennahme gemeint.

gezogen wurde, zeigte einen deutlichen Schichtdickenzuwachs bei Inkubation mit Vancomycin. Verantwortlich kann hierfür neben unspezifischer Bindung die Änderung des Brechungsindex beim Wechsel von PBS-Puffer zum Kulturfiltrat sein. Auch bei einer geringeren Verdünnung (1:9) war die unspezifische Bindung noch so hoch, daß bei dem geringen Signal-Rausch-Verhältnis keine Quantifizierung möglich war. In Abb. 4.4 sind beispielhaft sechs Einzelmessungen gezeigt.

Um die Spezifität der Vancomycinbindung zu beweisen und gleichzeitig den Anteil an unspezifischer Bindung zu bestimmen, wurde die Bindung durch Zusatz von 3 mg/ml Ac-K(Ac)aa zu den unverdünnten Fermenterproben inhibiert. Hierbei wurde ein Schichtdickenzuwachs von ca. 0,5 nm erhalten. Ungefähr die gleiche Schichtdicke wurde für mehrere Kulturfiltrate bei Studien mit einem Tri-L-Ala-modifizierten Transducer, an den Vancomycin nicht bindet, erhalten. Da auch Proben mit hoher Vancomycinkonzentration keinen höheren Zuwachs der optischen Schichtdicke ergaben, zeigt dies, daß die unspezifische Bindung während des gesamten Fermentationsprozesses ungefähr gleich bleibt. Durch Verdünnung der Proben konnten unspezifische Signale unter die Nachweisgrenze gedrückt werden.

Als weiteres Kontrollexperiment zur Überprüfung, ob die Bindung des Vancomycins an die Oberfläche spezifisch ist, diente der Fermentationsprozeß eines modifizierten Bakterienstammes, der kein Vancomycin produziert. Bei diesem Nullmutanten (*A. pseudonocardiae*) kann davon ausgegangen werden, daß in erster Näherung die restliche Zusammensetzung der Fermenterbrühe die gleiche ist, wie bei einem *A. orientalis* Stamm. Nach Verdünnung der Proben konnte keine Bindung an den Transducer detektiert werden. Dies zeigt, daß zumindest in einer verdünnten Fermenterprobe die Bindung des Vancomycins an den Transducer spezifisch ist.

Abb. 4.5 zeigt die über eine Dreifachmessung bestimmten Konzentrationen von Vancomycin und ihre Standardabweichung und die mit den Fermentationsproben eines Nullmutanten erhaltenen Werte.

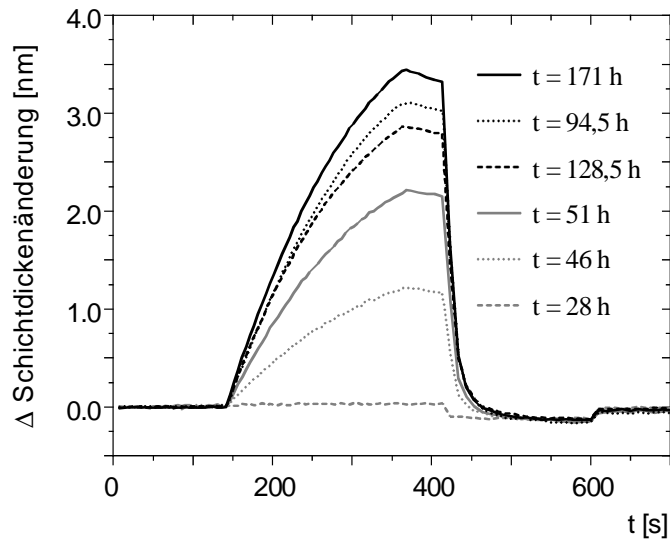


Abb. 4.4: Bindungskurven bei Inkubation des Transducers mit Fermenter-Proben (1:99 mit PBS verdünnt). Die Oberfläche wurde mit 0,1 N HCl regeneriert. Unspezifische Wechselwirkungen spielen keine Rolle, wie die Meßkurve bei $t = 28$ h zeigt.

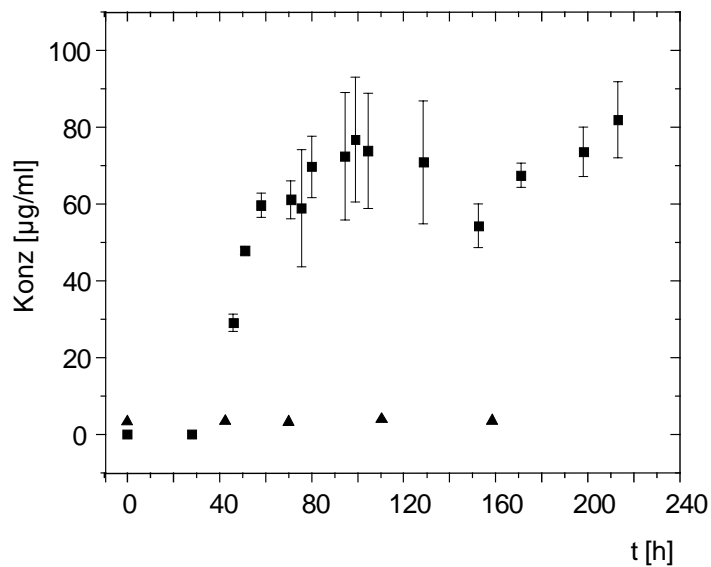


Abb. 4.5: Verfolgung der Vancomycinproduktion in einem Biofermenter bei Einsatz verschiedener Bakterienstämme. ▲ nicht-produzierender Nullmutant, ■ *Amycolatopsis Orientalis*. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 Messungen.

4.2.2. Quantifizierung mit HPLC-MS-MS-Analytik

Die Kulturbrühe aus dem Fermenterprozeß stellt mit ihrem Gehalt an verschiedensten Proteinen, DNA-Partikeln und weiteren Komponenten eine sehr komplexe Matrix dar. Die besondere Stärke von Biosensoren liegt darin, aus komplexen Systemen selektiv und sensitiv Zielsubstanzen in kurzen Zeitintervallen zu erfassen. Dennoch kann nicht immer ausgeschlossen werden, daß außer der gewünschten Substanz noch andere Verbindungen sensorisch erfaßt werden und somit ein verfälschtes Ergebnis erhalten wird. Aus diesem Grund wurde versucht, die reflektometrisch bestimmten Konzentrationen mit einer anderen Methode zu referenzieren.

Um den Vancomycin-Gehalt einer Fermenter-Probe mit konventionellen Analysemethoden bestimmen zu können, muß zunächst eine Probenaufreinigung erfolgen, d. h. das Antibiotikum muß von den restlichen Inhaltsstoffen des Kulturfiltrats abgetrennt werden. Besonders geeignet zur Trennung und anschließenden Quantifizierung sind Kopplungsmethoden wie HPLC-MS- oder HPLC-UV-Kopplung, da aufwendige präparative Aufarbeitungsschritte meist nicht nötig sind.

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit sind Quantifizierungen mit LC-MS oft wesentlich genauer als mit anderen gängigen Detektionsmethoden wie UV- oder elektrochemische Detektion. Zudem ist das Massenspektrometer ein äußerst selektiver Detektor, so daß auch chromatographisch nicht vollständig getrennte Verbindungen quantifiziert werden können.

Für die in dieser Arbeit gewünschte Quantifizierung bietet sich ein Tandem-MS-Experiment an, da damit bei bekannten Molekülen anhand der charakteristischen Fragmentierungen gezielt bestimmte Moleküle gescannt werden können. Es wurden Neutralverlust-Scans im „Multi Reaction Monitoring (MRM)“-Mode durchgeführt. Hierbei stehen beide Quadrupole des Spektrometers auf einem oder mehreren festen Werten, d. h. der erste Analysator wird auf das m/z -Verhältnis des gesuchten Molekülions, der zweite Analysator auf das m/z -Verhältnis des Fragmentions eingestellt. Die Größe des Meßsignals wird durch die Anzahl der Elternionen festgelegt, die unter Kollisionsbedingungen ein bestimmtes Tochterion bilden. Es werden also keine Massenspektren im eigentlichen Sinne erhalten, sondern Intensitäten. Bei Kopplung mit HPLC entspricht dies der Aufnahme eines Chromatogramms mit massensensitiver Detektion.

Am Beispiel des Balhimycin-produzierenden Bakterienstammes *A. mediterranei* wurde versucht, die mit RfS erhaltenen Daten zu referenzieren. Die Fermentation wurde analog der im letzten Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. In einem Zeitraum von ca.

250 h wurden 15 Proben gezogen. Diese wurden für die reflektometrische Konzentrationsbestimmung und anschließend zur Quantifizierung mit HPLC-MS benutzt.

Das Produktspektrum von *A. mediterranei* wurde in ersten HPLC-MS-Analysen bestimmt, indem über den Massenbereich von 500 bis 2000 amu gescannt wurde. Außer Balhimycin ($M + H^+ = 1448$) konnten das Mono-Hydrat von Balhimycin V ($M + H^+ = 1606$), einer dreifach glycosylierten Verbindung, und Desvancosaminvancomycin ($M + H^+ = 1305$) nachgewiesen werden. Andere in der Literatur beschriebene Biosyntheseprodukte [ver 96] wurden nicht detektiert. In weiteren Experimenten wurden die hauptsächlich auftretenden Fragmentationen (Tab. 4.1) dieser Verbindungen bestimmt. Anhand dieser Fragmentierungen wurde die Konzentration der zu verschiedenen Zeiten gezogenen Fermenterproben mittels der oben beschriebenen Neutralverlustscans bestimmt.

Tab. 4.1: Fragmentierung der Balhimycin-Biosyntheseprodukte. Es sind die Massen der monoisotopischen Verbindungen angegeben.

| Substanz | M+H ⁺ | Fragmentierung | | | Intensität |
|------------------------|------------------|------------------|---------------------------|-------|------------|
| | | M+H ⁺ | | | |
| Balhimycin | 1448 | 1305 | - Ovcn | | + |
| | | 1143 | - Ovcn | - Glc | - |
| Balhimycin V | 1606 | 1448 | - Ovcn x H ₂ O | | - |
| | | 1305 | - Ovcn-glc | | - |
| Devancosaminvancomycin | 1305 | 1143 | | - Glc | 0 |

+ = hohe Ionenintensität, 0 = mittlere Ionenintensität, - = geringe Ionenintensität.

Ovcn: Oxovancosaminyl-, Glc: Glucosyl, Ovcn-glc: Oxovancosaminyl(1-2)-glucosyl (vgl. Abb. 4.1).

Zur Quantifizierung wurde über alle in Tab. 4.1 aufgeführten Fragmentierungen summiert. Abb. 4.6 zeigt beispielhaft das UV-Chromatogramm und den TIC der Probe 10 bei $t = 100$ h. Der zweite große Peak der UV-Spur deckt sich zeitlich – unter Berücksichtigung der Verzögerung zwischen UV- und MS-Detektion - mit dem TIC der MRM-Messung. Allein über die UV-Spur wäre eine Konzentrationsbestimmung schwierig, da keine vollständig getrennten Peaks vorliegen. Es ist jedoch anzumerken, daß diesem scheinbaren Produktpeak noch andere nicht im MS detektierte Verbindungen überlagert sein können.

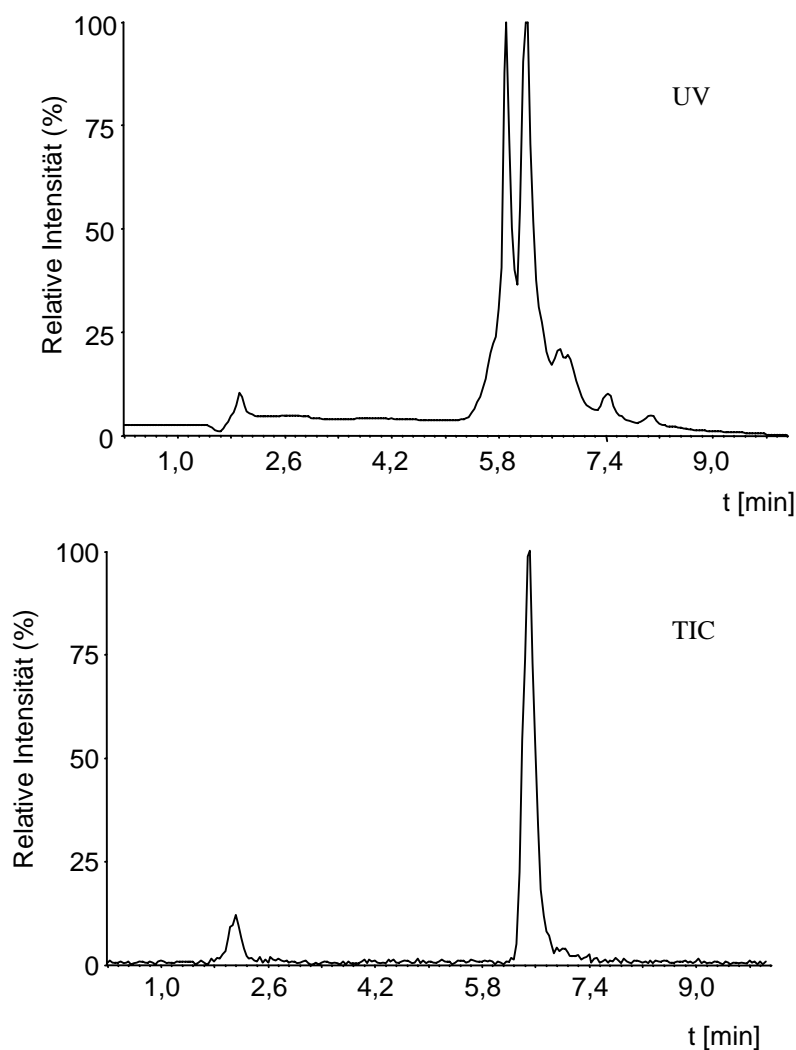


Abb. 4.6: UV-Chromatogramm (oben) und TIC aller detektierten Massen der Fermenterprobe (vgl. Tab. 4.1) bei $t = 100$ h. Die Verschiebung der Einspritzpeaks zeigt die Zeitdifferenz zwischen UV-Detektion ($\bullet = 214$ nm) und MS. Zur Auswertung wird über den TIC integriert.

Alle 15 Proben wurden mittels eines automatischen Probengebers nacheinander in chronologischer Reihenfolge, d. h. in ansteigender Konzentration gemessen. Zur Mittelwertbildung wurde dies dreimal wiederholt. Jede Meßreihe wurde auf eine eigene Kalibriergerade bezogen, die unmittelbar vorher aufgenommen wurde (Abb. 4.7), um Schwankungen der Gerätecharakteristik auszugleichen. Die Kalibriermessungen erfolgten mit Lösungen von reinem Balhimycin unter demselben Gradienten wie die Messung der Fermenterproben. Zusätzlich wurde eine Kalibriermessung mit Balhimycin, das mit dem Kulturfiltrat des Nullmutanten verdünnt war, gemessen, um Effekte unterschiedlicher Protonierungsausbeute durch nicht vollständig abgetrennte Puffersalze auszuschließen. Beide Messungen lieferten dasselbe Ergebnis. Eine Kalibriergerade ist in Abb. 4.7 gezeigt, Abb. 4.8 vergleicht die sensorisch bestimmten Konzentrationen mit den Ergebnissen der HPLC-MS-Messungen.

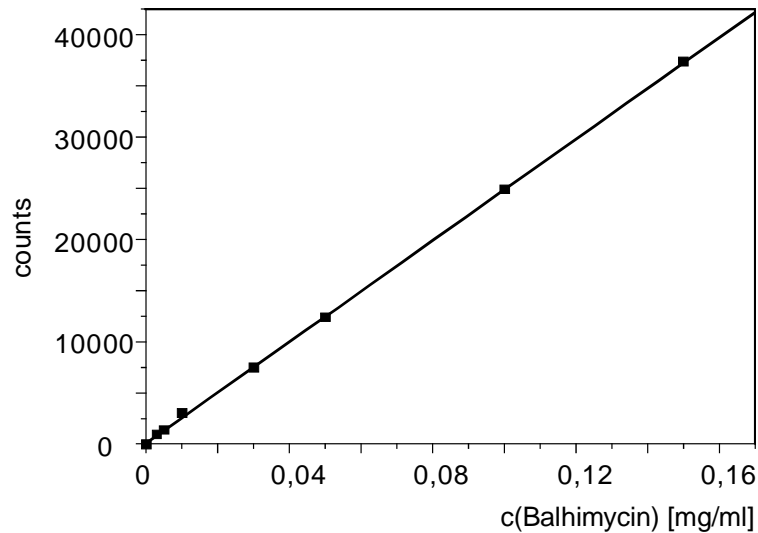


Abb. 4.7: Kalibriergerade für reines Balhimycin in Wasser. Die Intensität wurde durch Integration über den TIC bestimmt.

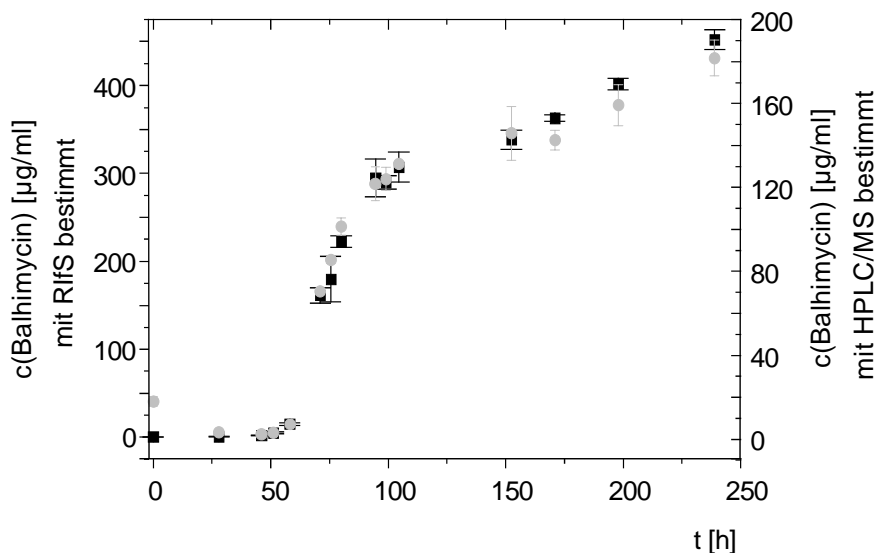


Abb. 4.8: Verfolgung der Balhimycinproduktion eines Fermenters. Vergleich der Sensor-Daten (schwarz) und der HPLC-MS-Daten (grau). Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung von 3 Messungen.

Es zeigte sich, daß mit beiden Meßverfahren prinzipiell der gleiche Verlauf der Produktbildung gemessen wird. Allerdings liegen die mit RfS bestimmten Werte um etwa 50% über den mit HPLC-MS bestimmten Werten (Abb. 4.8). Hierfür können verschiedene Faktoren verantwortlich sein. Zum einen ist es möglich, daß massenspektrometrisch nicht alle Produkte erfaßt wurden, die die Grundstruktur des Antibiotikums besitzen und somit an die Tripeptidsequenz binden können. Andererseits könnten auch Beiprodukte, die eine andere Struktur aufweisen, spezifisch an die Sensoroberfläche binden und somit ein zu hohes Signal ergeben. Weitere Fehlerquellen könnten in der massenspektrometrischen Kalibrierung mit

reinem Balhimycin liegen: durch unterschiedliche Protonierungswahrscheinlichkeiten der Nebenprodukte der Biosynthese und des reinen Balhimycins wäre ein verfälschtes Ergebnis denkbar. Da beide Meßverfahren den gleichen Konzentrationsverlauf ergaben, kann trotz der genannten Einschränkungen eine sinnvolle Überwachung der Antibiotikasythese durchgeführt werden, sofern nicht absolute Konzentrationen, sondern Konzentrationsänderungen gemessen werden sollen.

4.2.3. Zusammenfassende Diskussion

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Möglichkeit der Verfolgung einer Biosynthese mit RIfS am Beispiel der Fermentation bei Glycopeptidantibiotika zu zeigen. In vorangegangenen Arbeiten [meh 99] wurde gezeigt, daß die Konzentration von Vancomycin mit Transducern, die mit dem Tripeptid Ac-Lys-D-Ala-D-Ala beschichtet sind, sicher bestimmt werden kann.

Die mit reinen Vancomycin-Lösungen gewonnenen Erfahrungen wurden dann auf die Messung der Vancomycinkonzentration in Fermenterproben übertragen. Diese Proben wurden zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen, und nicht weiter aufgereinigt. Es stellte sich heraus, daß damit eine deutliche unspezifische Bindung auf den verwendeten Transducern zu beobachten war. Durch Verdünnung der Proben konnte dieses Problem vermieden werden, wobei bei sehr verdünnten Proben die Konzentration unter die Bestimmungsgrenze fallen kann. Da schon bei der dritten Probe nach Animpfen des Fermenters die Vancomycinkonzentration jedoch so hoch war, daß die RIfS-Signale außerhalb des linearen Kalibrierbereichs lagen, war eine Verdünnung erforderlich, und damit konnten die aufgrund unspezifischer Bindung auftretenden Probleme vernachlässigt werden.

Am Beispiel der Verfolgung der Biosynthese von Balhimycin wurde versucht, die mit RIfS erhaltenen Ergebnisse durch HPLC-MS-Messungen zu referenzieren. Hierbei wurden mit beiden Methoden die gleichen relativen Konzentrationen gemessen, absolut wurden allerdings unterschiedliche Mengen des Antibiotikums bestimmt. Möglicherweise wurde mit RIfS und HPLC-MS nicht dasselbe Produktspektrum gemessen, wodurch die unterschiedlichen Konzentrationen zu erklären wären.

Es wurde gezeigt, daß die Verfolgung der Biosynthese von Antibiotika mit RIfS möglich ist. Ebenso sollte die vorgestellte Methode auf andere Produkte übertragbar sein. Für ein Online-Monitoring wird der Zentrifugationsschritt aufgrund der einfacheren Automatisierung durch eine Filtration ersetzt werden müssen. Durch geeignete Wahl der Filter können makromolekulare Substanzen abgetrennt werden, wodurch die gemessene unspezifische Bindung möglicherweise verringert werden kann.

5. Untersuchungen von Cyclopeptid-Ligand-Wechselwirkungen und Charakterisierung beschichteter Oberflächen

5.1. Einleitung

Ringförmige Peptide stellen aufgrund ihrer biologischen Wirkungen und des häufigen natürlichen Vorkommens seit langem ein vielfach bearbeitetes Forschungsfeld dar [ovc 75]. Die Bandbreite der biologischen Wirkungen ist groß, so werden Cyclopeptide z. B. als Antibiotica, Ionentransportsysteme, Antimycotica oder Cancerostatica eingesetzt, um nur wenige Anwendungen zu nennen. Die teilweise hohe Rezeptorselektivität und die Stabilität gegen enzymatischen Abbau lassen sich durch die eingeschränkte Flexibilität und damit verbundene Konformationsfixierung biologisch wichtiger Kettenabschnitte erklären.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet cyclischer Peptide ist die Verwendung als Rezeptor für die Molekulare Erkennung niedermolekularer Analyte [deb 74, miy 93, tor 95]. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das macrocyclische Antibiotikum Vancomycin (vgl. Kapitel 4), das sich u. a. als chirale stationäre Phase in der HPLC [arm 94a, sve 98] und als chirales Additiv in der Kapillarelektrophorese als sehr potenter Selektor mit breitem Anwendungsbereich erwiesen hat [arm 94b, chu 96]. Jung et al. [jun 96b] setzten Peptidsubbibliotheken bestehend aus 18^3 individuellen Cyclopeptiden in der Kapillarelektrophorese als chirale Selektoren ein. Drei dieser Subbibliotheken zeigten eine unterschiedliche Selektivität gegenüber racemischen α -Aminosäuren. Chiari et al. [chi 98] konnten aus diesen Bibliotheken durch Dekonvolution zwei einzelne Selektoren ermitteln. Ein umfassender neuerer Überblick über den Einsatz makrocyclischer Peptide als molekulare Rezeptoren ist in zusammenfassender Literatur gegeben [jun 99].

Alle bisher erwähnten Beispiele befassen sich mit Wechselwirkungen in homogener Lösung. In jüngerer Zeit wurden oberflächengebundene cyclische Peptide für die chemische und biochemische Sensorik verwendet. Erste Beispiele hierfür waren Gramacidin [cor 97] und Valinomycin [rag 98] als Transporter von Kaliumionen durch eine Lipid-Doppelschicht, die kovalent auf einer Goldelektrode angebunden war.

In Kooperationsprojekten unserer Arbeitsgruppe wurden Cyclopeptide auf verschiedenen Sensoroberflächen immobilisiert und als molekulare Rezeptoren eingesetzt. Durch Schwingquarzuntersuchungen [wei 99] und durch Reflektometrische Interferenzspektroskopie [lei 98a, lei 99] konnte mit Cyclopeptid-Monoschichten die molekulare Erkennung kleiner Analytmoleküle in der Gas- und Flüssigphase nachgewiesen werden. So wurde bei Messungen in

wässriger Lösung z. B. eine starke Wechselwirkung zwischen Arginin und einigen Cyclopeptiden festgestellt.

Diese vielseitigen Anwendungen erklären das große Interesse an neuen synthetischen zyklischen Peptiden. Viele Cyclopeptide sind *homodet*, d.h. sie enthalten nur Peptidbindungen (Lactame), andere sind *heterodet* und weisen neben Peptidbindungen zusätzlich Ester- (Lactone), Disulfid-, Sulfid- oder Thioesterverbindungen auf. Je nach gewünschtem Produkt stehen unterschiedliche Synthesestrategien zur Verfügung. Ein guter Überblick über die in den letzten 20 Jahren beschriebenen Cyclopeptidsynthesen wird in [fei 96] gegeben.

Für die Synthese der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *homodeten* „Kopf-zu-Schwanz“-cyclisierten Peptiden bietet sich die polymergebundene Synthese der linearen Sequenz an, mit anschließender Zyklisierung am polymeren Träger oder einer Zyklisierung in Lösung, nach Abspaltung seitenkettengeschützter Peptide.

Der Vorteil der Zyklisierung am Harz ist die Möglichkeit, durch hohe Überschüsse die Zyklisierungsreaktion zu begünstigen, und die überschüssigen Reagenzien und unerwünschte Nebenprodukte durch Waschschrte zu entfernen. Durch die Nutzung des orthogonalen Schutzgruppenprinzips (Fmoc/tBu/Allyl) lassen sich solche Zyklisierungen realisieren [sch 85]. Dabei ist es auch möglich, Seitenketten-zu-Kopf-Zyklisierungen und Peptidverzweigungen durchzuführen [kat 94]. Der Gefahr der Cyclodimerisierung wird meist durch niedrige Harzbeladungen ($< 0,3$ mmol/g) begegnet. Dies wird als „Pseudoverdünnung“ bezeichnet, ein kinetisches Phänomen, welches das bevorzugte Abflauen von intramolekularen Reaktionen im Gegensatz zu intermolekularen Reaktionen beschreibt [maz 79].

Der Vorteil einer Zyklisierung in Lösung liegt in der größeren Freiheit bei der Auswahl der eingesetzten Aminosäuren, da nicht zwingend trifunktionelle Aminosäuren benötigt werden. Ein Zurückdrängen der Cyclooligomerisierung und Cyclodimerisierung als unerwünschte Nebenreaktionen wird durch Arbeiten in verdünnter Lösung (10^{-4} - 10^{-3} M) erreicht. Um das hohe Racemisierungsrisiko bei Zyklisierungen über chirale Aminosäurebausteine, das insbesondere bei sehr langen Kupplungszeiten auftritt, zu mindern, eignen sich nach Ehrlich et al. [ehr 93] Reagenzien auf der Basis von 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol.

5.1.1. Aufgabenstellung

Die Verwendung von Cyclopeptiden als aktive Zentren in Sensoren bedingt ihre Anbindung an Polymere oder Oberflächen. In vorangegangenen Arbeiten wurden Cyclopeptide auf Gold- bzw. auf Glasoberflächen immobilisiert und auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber verschiedenen Analyten getestet.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand nicht die Suche nach neuen Cyclopeptid-Ligand-Paaren, sondern die Untersuchung der Art der Wechselwirkung und die Charakterisierung der Oberflächenbeschichtungen mittels FT-ATR-IR- und Fluoreszenzspektroskopie.

In einer reziproken Vorgehensweise sollten anstelle der Cyclopeptide die betreffenden Liganden auf Silizium-ATR-Kristallen immobilisiert werden, um, ausgehend von der von Leipert et al. [lei 99] beobachteten Wechselwirkungen verschiedener Cyclopeptide mit Arginin, mit Hilfe der ATR-IR-Spektroskopie Aussagen über die an der Bindung beteiligten Molekülfragmente oberflächengebundener Liganden und gelöster Cyclopeptide zu erhalten. Zur Charakterisierung der Oberflächenbeschichtungen wird ebenfalls die IR-Spektroskopie herangezogen.

Durch die kovalente Anbindung von Cyclopeptiden an Oberflächen verändern sich sowohl Konformation als auch konformative Beweglichkeit der Peptide. Da diese Parameter erheblichen Einfluß auf die Bindung der Analyte haben, ist es wichtig, die konformative Beweglichkeit oberflächenfixierter Cyclopeptide im Vergleich zu gelösten Cyclopeptiden zu untersuchen. Hierfür sollten fluoreszenzmarkierte Cyclopeptide zur Beschichtung von SiO₂-Oberflächen eingesetzt und mit Hilfe von UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert werden.

5.2. Ergebnisse und Diskussion

5.2.1. Synthese von Cyclopeptiden

Die Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptide sind in Abb. 5.1 gezeigt. In vorangegangenen Arbeiten zur Untersuchung von Wirt-Gast-Beziehungen mit RIfS [lei 99] wurde gezeigt, daß die Peptide **1-3** wesentlich stärkere Wechselwirkungen zu Arginin aufweisen, als zu anderen natürlichen Aminosäuren. Die drei Lysin-Reste dienten dabei zur Anbindung auf die Transducer-Oberflächen. Die gleichen Peptide wurden hier zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Cyclopeptid und Gast mittels der ATR-IR-Spektroskopie eingesetzt. Ergänzt wurde dieser Testsatz durch die Peptide **4-7**, wobei unter Beibehaltung der drei Lysin-Reste im wesentlichen Nitrophenylalanin durch polare und unpolare aliphatische Aminosäuren ausgetauscht wurde.

Die Cyclopeptide **1-7** wurden durch Zyklisierung seitenkettengeschützter Peptide in verdünnter Lösung (0.001 M in DMF) hergestellt. Zur Synthese der linearen Peptide wurde ein automatischer Peptidsynthesizer verwendet. Die Abspaltung der vollständig seitenkettengeschützten Peptide vom 2-Chlortritylchlorid-Harz erfolgte mit Hexafluorisopropylalkohol, die Kopf-Schwanz-(„head to tail“)-Zyklisierung wurde mit TBTU/HOBt-Aktivierung durch-

geführt. Nach Beendigung der Zyklisierung wurden die überschüssigen Reagenzien durch saure und basische Extraktionsschritte entfernt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen mit TFA in Anwesenheit von Scavengern abgespalten. Die Cyclopeptide wurden in Diethylether gefällt und aus tert.-Butanol / Wasser gefriergetrocknet.

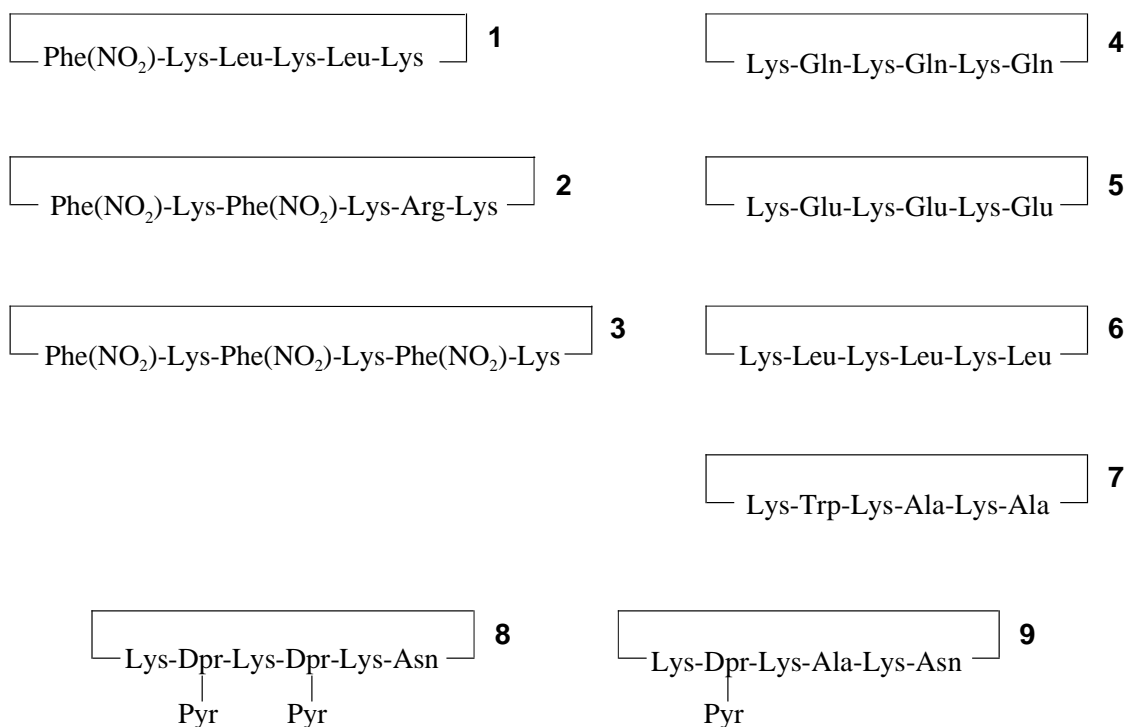


Abb. 5.1: Strukturen der verwendeten Cyclopeptide: Die Verbindungen **1-7** wurden für die IR-Spektroskopie verwendet, die Pyren-modifizierten Cyclopeptide **8*** und **9** für die Fluoreszenz-Spektroskopie (Dpr: Diaminpropansäure, Pyr: 1-Pyren-carbonsäure).

Die Verbindungen **8** und **9** dienen zur Charakterisierung kovalent auf Kieselgel gebundener Cyclopeptide mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie. Als Fluoreszenzmarker diente 1-Pyren-carbonsäure, die möglichst dicht am Peptid-Rückgrat über die Seitenkette von Diaminpropansäure angebunden wurde. Die drei Lysinreste dienen zur Anbindung des Peptids an das Kieselgel. Zur Synthese dieser Peptide wurde eine harzgebundene Zyklisierung durchgeführt: Fmoc-Asp(OAll) wurde über die Seitenkette in geringer Beladung, um Cyclodimerisierungen zu vermeiden am Rink-Amid-Harz angebunden. Nach Aufbau der linearen Peptidkette an fester Phase wurde durch palladiumkatalysierte Allylabsplaltung die • -Carboxy-Gruppe der Asparaginsäure freigesetzt. Die „head to tail“-Zyklisierung wurde anschließend am Harz durchgeführt. Nach Abspaltung der Dde-Schutzgruppe wurde 1-Pyren-carbonsäure angebunden und mit TFA/H₂O/TIS vom Harz abgespalten. Abb. 5.2 zeigt das Syntheschema von **9**.

* Das Cyclopeptid **8** wurde freundlicherweise von Dr. Dietmar Leipert zur Verfügung gestellt.

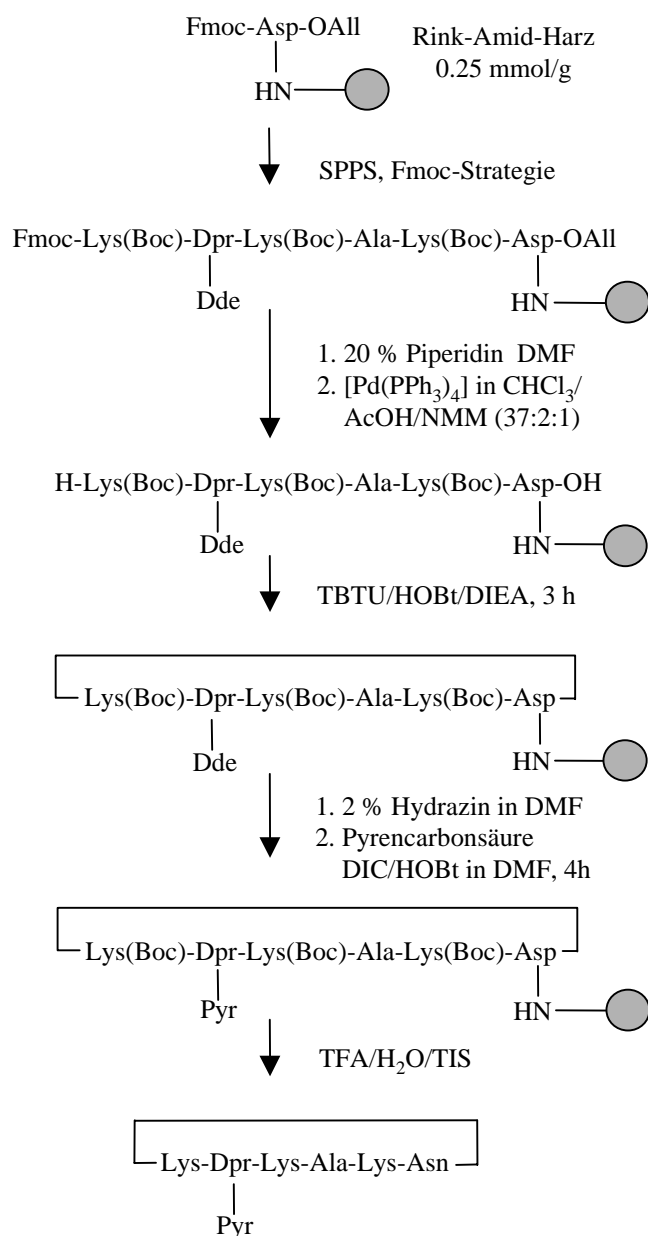


Abb. 5.2: Syntheschema von cyclo[Lys-Dpr(Pyr)-Lys-Ala-Lys-Asn] (**9**).

Alle Cyclopeptide wurden routinemäßig mittels ES-Massenspektrometrie und HPLC analysiert. Da für die analytischen Fragestellungen dieser Arbeit eine hohe Reinheit erforderlich war, wurden alle Cyclopeptide durch präparative HPLC aufgereinigt.

In Abb. 5.3 ist beispielhaft die HPLC- und MS- Analytik von Cyclopeptid **6** gezeigt. Abb. 5.4 zeigt das FT-ICR-MS-Spektrum von **9**.

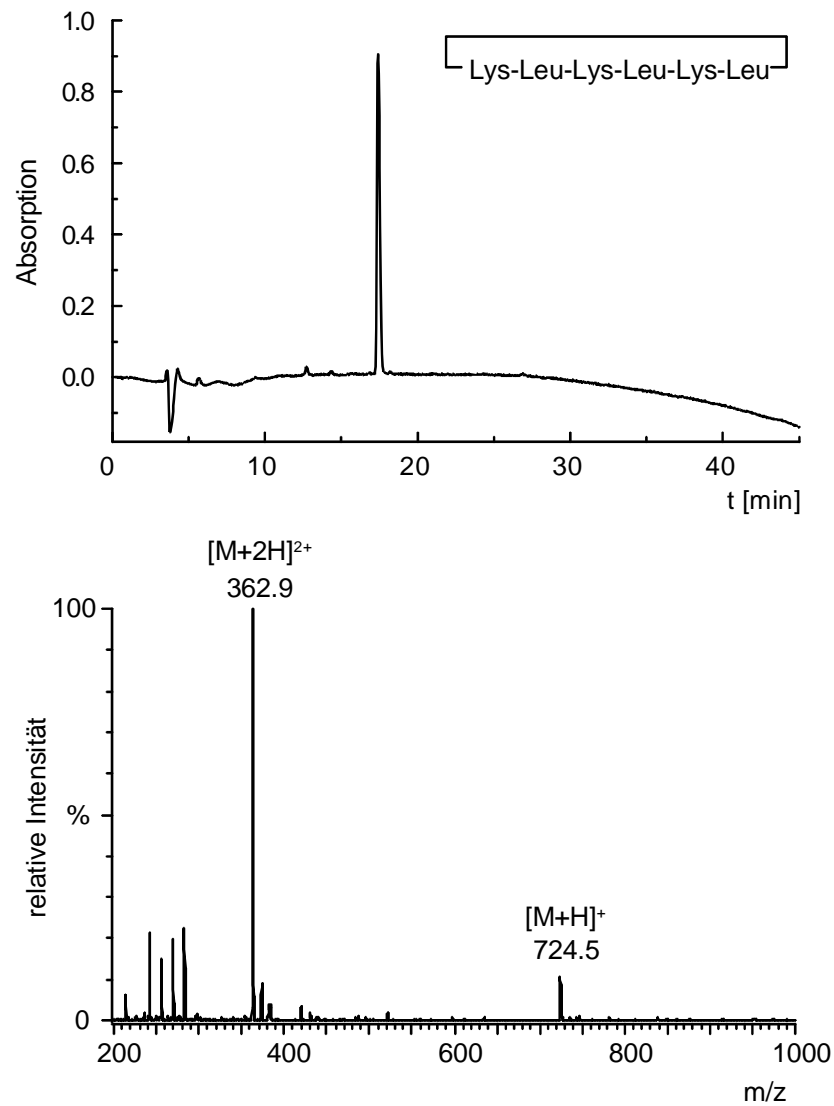


Abb. 5.3: HPLC-Chromatogramm (Reinheit bei $\lambda = 214$ nm: 94 %) und ES-MS-Spektrum von c[KLKLLK] (**6**) nach präparativer HPLC.

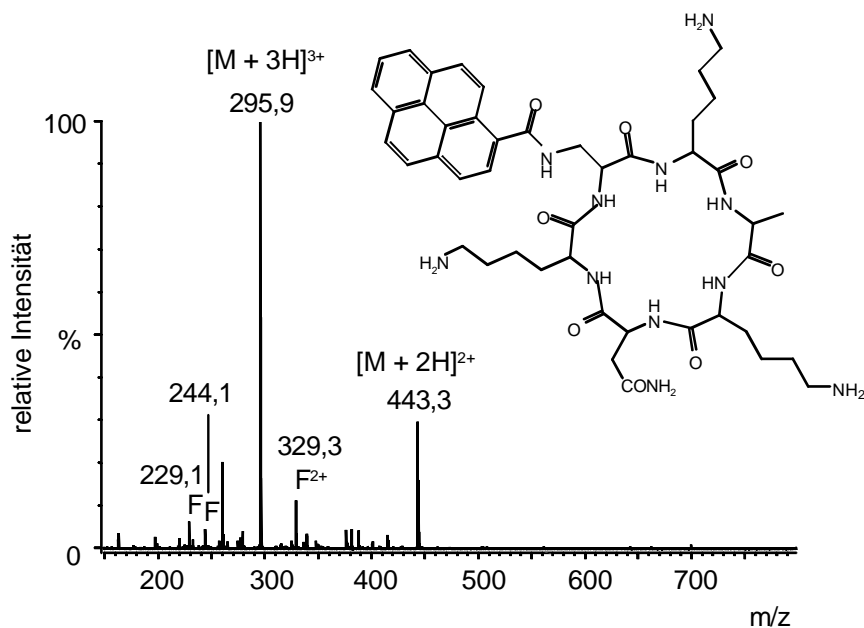


Abb. 5.4: FT-ICR-MS-Spektrum von cyclo[Lys-Dpr(Pyr)-Lys-Ala-Lys-Asn] (9). F: Fragmentierungen des Pyrencarbonsäureamids.

5.2.2. IR-spektroskopische Untersuchungen*

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen eines freien Analyten mit einer stationären Phase kann die IR-Spektroskopie herangezogen werden. Durch intermolekulare Wechselwirkungen können Frequenzverschiebungen der Banden der beteiligten Gruppen bzw. zusätzliche Banden auftreten. Banden von Valenzschwingungen werden meist zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, da durch Wechselwirkung mit anderen Gruppen die Bindungsstärke der betroffenen Bindung geschwächt wird. Zusätzlich können kinematische Kopplungen auftreten, durch die eine Bande zu höheren Wellenzahlen verschoben wird [sch 71]. Erschwerend kommt hier hinzu, daß keine völlig wechselwirkungsfreien Gruppen untersucht werden, sondern komplexe Moleküle, deren funktionelle Gruppen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen eingehen können. Es ist deshalb sehr schwer zu entscheiden, aufgrund welcher Effekte die beobachteten Bandenverschiebungen hervorgerufen werden.

Zusätzlich ändern sich Form und Intensität der Banden. Die Lebensdauer des angeregten Zustands eines Moleküls wird bei Bildung von Assoziaten verkürzt, da neue Wege der Energieabgabe eröffnet werden. Das Auftreten von intermolekularen Wechselwirkungen führt

* Für die Aufnahme der IR-Spektren danke ich Frau Dipl.-Ing. (FH) Frauke Palmer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V. Hoffmann vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen.

daher i. A. zu einer Vergrößerung der Halbwertsbreite einer Bande. Durch Polarisierung von Banden wird eine Intensitätssteigerung hervorgerufen.

Über die genannten Effekte gewinnt man Aufschluß über die Umgebung des Analyten und über die Molekülgruppen, die Wechselwirkungen mit einem immobilisierten Bindungspartner eingehen.

Die Cyclopeptide **1-7** wurden mittels FT-ATR-IR-Spektroskopie bezüglich ihrer Bindungsstabilität und der Art der Wechselwirkung gegenüber unterschiedlichen Liganden untersucht. Als Liganden dienten ein Konjugat aus Arginin und einem hydrophilen Ethylenglycol-Spacer (Atg) sowie zwei Tripeptide, die mit Aminohexansäure als Spacer versehen waren. Um festzustellen, ob es sich hierbei um spezifische Wechselwirkungen handelt, wurde zusätzlich die Bindung der Peptide an die Siliziumhydroxid-Oberfläche eines unmodifizierten Si-Kristalls untersucht.

Zur Ermittlung der charakteristischen Schwingungen der reinen Cyclopeptide wurden IR-Spektren auf ZnSe-Kristallen aufgenommen. Da keine Wechselwirkung zwischen den Cyclopeptiden und ZnSe auftritt, zeigen diese Spektren die Bandenlage der unbeeinflussten Cyclopeptide in Lösung.

Da die Signalintensitäten erwartungsgemäß sehr gering waren, mußte der ATR-Kristall zur Untersuchung der Cyclopeptid-Ligand-Wechselwirkung beidseitig (auf beiden Meßflächen) mit einem der Bindungspartner vollständig beschichtet werden. Auf diese Weise steht eine genügend große beschichtete Oberfläche für die Messung zur Verfügung.

Um die Zahl der beschichteten ATR-Kristalle gering zu halten, wurden nach dem aus der Chromatographie bekannten „Prinzip der reziproken Erkennung“ [pir 80, wel 94] nicht die Cyclopeptide, sondern die entsprechenden Bindungspartner auf der Kristall-Oberfläche immobilisiert. Das Reziproke Erkennungsprinzip wurde für Enantiomerentrennungen in der Chromatographie beschrieben: trennt man die Enantiomere des Selektanden A an einer chiralen Phase mit dem Selektor B, so können prinzipiell auch die Enantiomere von B an einer Phase mit einem der Enantiomere von A getrennt werden. Da bei der Untersuchung der Cyclopeptide nur die Wechselwirkung zu einem immobilisierten Bindungspartner, aber keine Trennungen beobachtet werden sollen, liegt somit ein vereinfachter Fall dieses Prinzips vor.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß auf diese Weise zusätzliche funktionelle Gruppen für die Wechselwirkungen mit den Liganden vorhanden sind. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Cyclopeptiden sind dies die Seitenketten von Lysin, die bei umgekehrtem Vorgehen durch kovalente Bindung zumindest teilweise auf der Oberfläche fixiert wären und somit für Wechselwirkungen mit gelösten Bindungspartnern sehr wahrscheinlich nicht zur Verfügung stünden.

5.2.2.1. Beschichtung des ATR-Kristalls

Wenn synthetische Verbindungen zur Modifizierung von Oberflächen eingesetzt werden, können sie entweder direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden (vgl. Kapitel 3) oder zuerst in makroskopischen Mengen dargestellt und anschließend mit verschiedenen Methoden auf die Oberfläche gebunden werden. Im zweiten Fall kann nach der Synthese eine Analytik mit üblichen Methoden durchgeführt werden. Aussagen über die funktionellen Gruppen, die an den intermolekularen Wechselwirkungen beteiligt sind, können nur bei genauer Kenntnis der oberflächengebundenen Moleküle getroffen werden. Bei einer Synthese der Liganden auf der Kristalloberfläche kann das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte nicht ausgeschlossen werden. Da keine zerstörungsfreie Methode zur genauen Charakterisierung der oberflächengebundenen Verbindungen zur Verfügung steht, wurden die Schichten hier im Gegensatz zu Kapitel 3 nicht durch Synthese auf der Oberfläche, sondern durch Anbindung fertig gereinigter und charakterisierter Moleküle hergestellt.

Das Arginin-Spacer-Konjugat sollte eine freie Carboxygruppe auf der Seite des Arginins und eine freie Aminogruppe zur Anbindung auf eine GOPTS-Oberfläche besitzen. Im ersten Schritt der Synthese wurde 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz mit 2 eq. Diaminopropan in DCM belegt. Atg wurde in 2-fachem Überschuß mit DIC-Aktivierung über Nacht angebunden. Nach Fmoc-Abspaltung wurde die freie Aminogruppe mit 5 eq. Bernsteinsäureanhydrid und DIEA in DMF umfunktionalisiert, wodurch eine freie Carboxygruppe erhalten wurde. Diese wurde als Pentafluorphenylester aktiviert und anschließend mit H-Arg(Pmc)-OH umgesetzt. Das MS-Spektrum der Verbindung ist in Abb. 5.5 gezeigt. Als Verunreinigung trat hauptsächlich das Hydrolyseprodukt des Pentafluorphenylesters auf. Die Reinheit wurde mittels HPLC bei 214 nm zu 82 % bestimmt.

Zur Anbindung auf einen Epoxy-aktivierten Si-ATR-Kristall (vgl. Kapitel 2) wurde dieser mit einer Lösung des Arginin-Derivats und DIEA (je 0,3 M in DMF) während 36 h umgesetzt. Durch die lange Reaktionszeit sollte eine möglichst hohe Oberflächenbeladung erreicht werden. Die Abspaltung der Pmc-Gruppe erfolgte mit TFA (50 % in DCM) [ram 87].

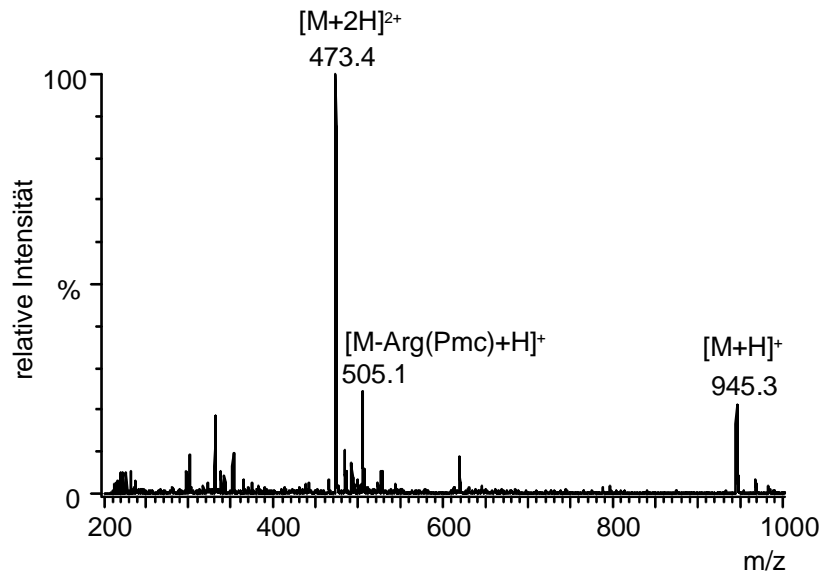


Abb. 5.5: ES-MS-Spektrum des Pmc-geschützten Arginin-Spacer-Konjugats.

Die beiden Tripeptide wurden nach Standard-Methoden der Peptidchemie am Trityl-Harz aufgebaut und mit HFIP vollgeschützt abgespalten. Zur C-terminalen Anbindung wurde die Carboxygruppe der Aminohexansäure mit TBTU/HOBt (je 0,5 M in DMF) aktiviert und während 36 h an einen Aminopropyl-modifizierten Si-Kristall gekuppelt.

Um eine möglichst hohe Oberflächenbeladung zu erhalten, sollten die Konzentration der Reaktionslösung sehr hoch und die Reaktionszeit sehr lang sein. Da in der Regel keine großen Substanzmengen zur Verfügung standen, wurde der Kristall beidseitig mit jeweils 20 μ l der Reaktionslösung benetzt und zwischen zwei Objektträger gelegt, so daß letztlich nur wenig der Verbindung eingesetzt werden mußte.

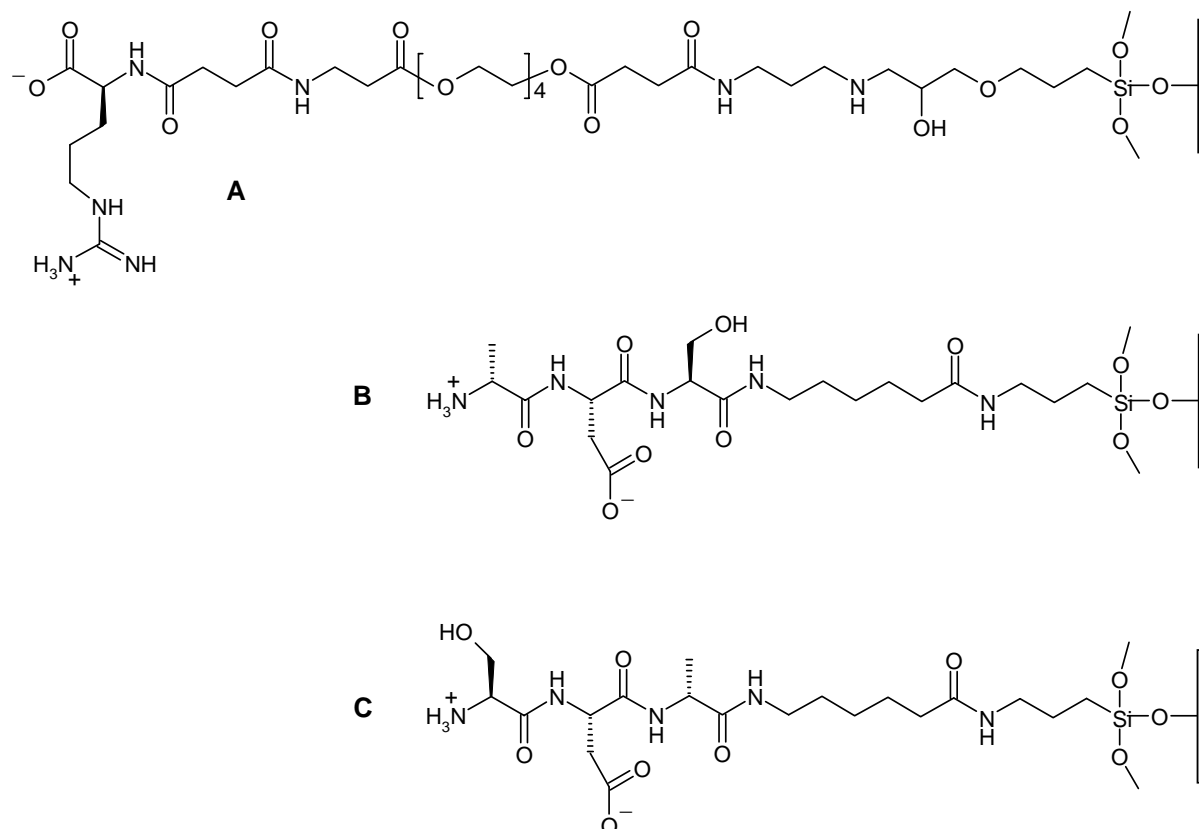


Abb. 5.6: Oberflächenbeschichtungen auf Silizium-ATR-IR-Kristallen: **A**: Arginin wurde über Bernsteinsäureanhydrid, die Ethylenglycol-Aminosäure Atg und Diaminopropan auf Epoxy-silanisiertes Silizium angebunden. **B** und **C**: Die Tripeptide Ser-Asp-D-Ala und D-Ala-Asp-Ser wurden mit Aminohexansäure als Spacer C-terminal an eine Aminopropyloberfläche gebunden.

Durch die ATR-IR-Spektren der Beschichtung konnten qualitative Aussagen über den Erfolg der Anbindung getroffen werden. Die IR-Spektren der Beschichtung zeigten entsprechende Schwingungen der funktionellen Gruppen der angebundenen Moleküle. Bei Beschichtung **A** (Abb. 5.7) sind dies die Schwingungen der Amid- und Esterbindungen, sowie der Carboxy- und der Guanidino-Gruppe. Auch die C-O-Valenzschwingung der Carboxygruppe des nicht mit Arginin umgesetzten Spacermoleküls konnte im Spektrum zugeordnet werden.

Bei den Beschichtungen **C** (Abb. 5.8) und **D** (Abb. 5.9) waren Schwingungen der Amidbindungen, der Ammoniumgruppe des N-Terminus der Peptide und der Carboxy-Gruppe zu erkennen.

Obwohl versucht wurde, die Schichten im Vakuum zu trocknen und in wasserfreiem Zustand zu vermessen, war dennoch so viel Wasser auf der Oberfläche adsorbiert, daß die Spektren der Beschichtung von der Absorption von Wasser überlagert waren. Zusätzlich sind bei ca. 1725, 1620 und 1580 cm⁻¹ drei Absorptionsbanden vorhanden die als Hintergrunds-

Absorptionen des Spektrometers identifiziert wurden und bei Einkanalspektren nicht zu vermeiden sind.

Zur Interpretation der Spektren wurden die Banden modellhaft als Lorentz-Banden angepaßt. Da die homogene Linienverbreiterung bei Spektren in Lösung (auch hier bei oberflächengebundenen Molekülen) einen größeren Anteil an der Bandenverbreiterung als die inhomogene Linienverbreiterung hat, kann dies als gute Näherung angesehen werden. Eine physikalisch korrekte Anpassung mit Voigt-Banden lieferte nur bei genauer Vorgabe des Gauss-Anteils sinnvolle Ergebnisse. Zur Berechnung wurde die ungefähre Lage der Bande und eine mittlere Halbwertsbreite, die sich aus der Anzahl der erwarteten Schwingungen und der Breite der Gesamtbande ergibt, vorgegeben. In einem iterativen Verfahren wurde die Differenz der Summenkurve der vorgegebenen Banden zum experimentellen Spektrum minimiert.

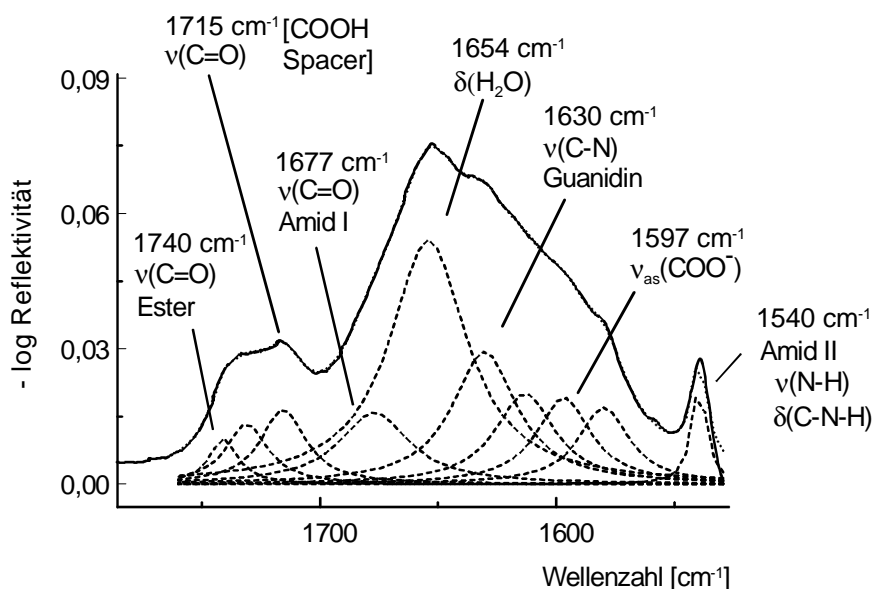


Abb. 5.7: IR-Einkanal-Spektrum der Arginin-Beschichtung auf Silizium (A) (—). Anpassung der Banden als Lorentz-Funktionen (-----) und die daraus erhaltene Summenkurve (-----). Die nicht bezeichneten Banden bei 1725, 1615 und 1580 cm^{-1} stammen nicht von der Oberfläche, sondern aus dem Hintergrund des Spektrometers.

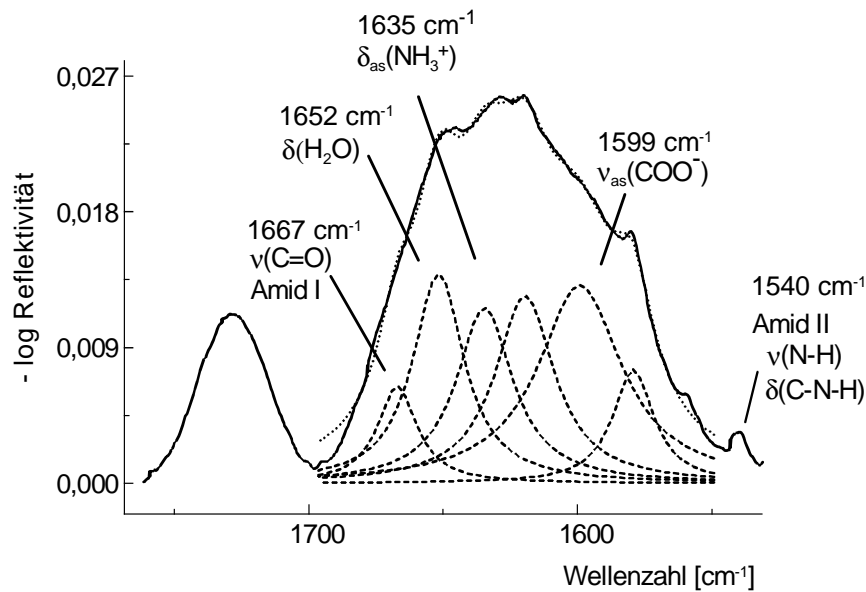


Abb. 5.8: IR-Einkanal-Spektrum der Oberflächenbeschichtung **B** (—). Anpassung der Banden als Lorentz-Funktionen (-----) und die daraus erhaltene Summenkurve (.....). Die nicht bezeichneten Banden bei 1725, 1620 und 1579 cm^{-1} sind Hintergrundbanden des Spektrometers.

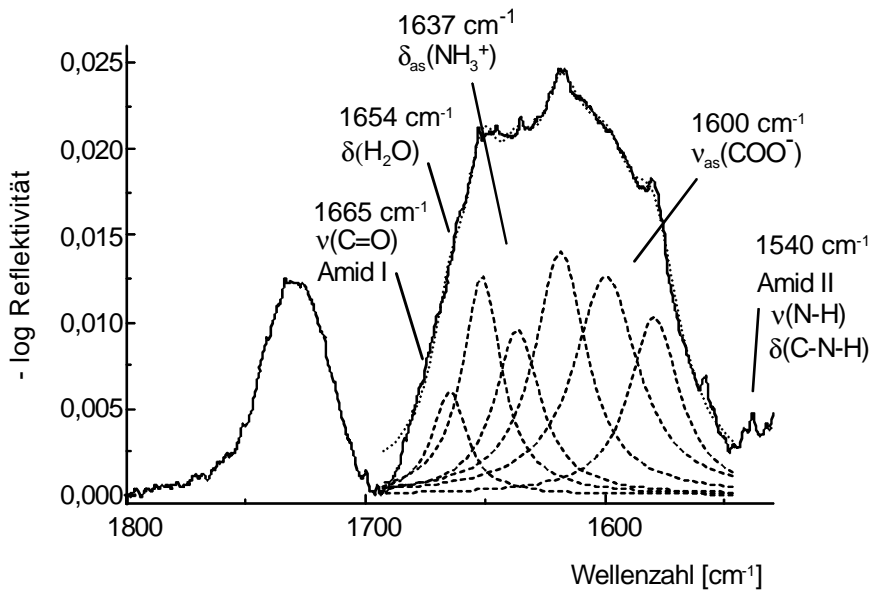


Abb. 5.9: IR-Einkanal-Spektrum der Oberflächenbeschichtung **C** (—). Anpassung der Banden als Lorentz Funktionen (-----) und die daraus erhaltene Summenkurve (.....). Die nicht bezeichneten Banden bei 1725, 1619 und 1580 cm^{-1} sind Hintergrundbanden des Spektrometers.

Alle drei Beschichtungen waren in makroskopischem Maßstab homogen: Durch Einkopplung des Lichtstrahls an unterschiedlichen Stellen des Kristalls können unterschiedliche Orte auf der Oberfläche vermessen werden. Da für jede Oberfläche hierbei immer Spektren gleicher Intensität erhalten wurden, kann von einer gleichmäßigen Beschichtung ausgegangen werden.

Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob die angebotenen Moleküle statistisch über die Fläche verteilt oder in Clustern vorliegen, da hierfür eine orts aufgelöste Messung nötig wäre. Eine absolute Bestimmung der Oberflächenbeladung ist nicht möglich, jedoch können die Beschichtungen über die Intensität der Spektren verglichen werden. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß sich die funktionellen Gruppen in Anzahl und Umgebung unterscheiden, wodurch eine gewisse Einschränkung der Vergleichbarkeit gegeben ist. Zusätzlich fällt die Intensität einer Absorption exponentiell mit dem Abstand der betrachteten Gruppe von der Oberfläche. Wird von einer gestreckten Anbindung der Moleküle ausgegangen, was eine grobe Vereinfachung darstellt, so sollte bei Beschichtung **A** die Intensität einer Bande bei gleicher Oberflächenbeladung niedriger sein als bei **B** und **C**. Als Marker für die Intensität kann die asymmetrische Streckschwingung der Carboxylate herangezogen werden, da diese Gruppe in allen Molekülen nur einmal vorkommt. Aufgrund der höheren Intensität dieser Bande bei **A** ist demnach die Belegungsdichte von **A** höher als bei **B** und **C**.

Ein einfacherer Vergleich ist zwischen **B** und **C** möglich, da sich die angebotenen Moleküle nur in der Sequenzabfolge unterscheiden. Hierbei scheint **C** aufgrund der geringfügig niedrigeren Intensität des Spektrums eine etwas kleinere Belegungsdichte aufzuweisen.

5.2.2.2. IR-Spektren der Cyclopeptide

Alle Spektren wurden mit einem FTIR-Spektrometer aufgenommen. Um Einflüsse des Spektrometers und Absorptionen des Lösungsmittels (Wasser) zu eliminieren, wurde immer gegen das reine Lösungsmittel referenziert. Hierzu wurde unmittelbar vor der Messung mit dem jeweiligen Kristall ein Spektrum von Wasser aufgenommen, das anschließend vom eigentlichen Spektrum subtrahiert wurde.

Die ermittelten Lagen der Banden können aufgrund des starken Rauschens der Spektren und der damit verbundenen ungenauen Anpassung um einige Wellenzahlen vom tatsächlichen Wert abweichen.

IR-Spektren von Cyclopeptiden sind aufgrund der Molekülgröße und damit aufgrund der vielen, häufig sehr ähnlichen, absorbierenden Gruppen schwer zu interpretieren. Häufig können übereinanderliegende Banden nicht genügend aufgelöst bzw. nicht eindeutig zugeordnet werden. Im folgenden wird nur der Bereich von 1700 cm^{-1} bis 1400 cm^{-1} besprochen. Am Beispiel von Cyclopeptid **2** soll das Aussehen der IR-Spektren, die auf den unterschiedlichen Oberflächen gemessen wurden, erläutert werden. Die stärksten erwarteten Banden sind in Tab. 5.1 zusammengestellt.

Tab. 5.1: Erwartete IR-Absorptionen von Cyclopeptid **2** im Bereich von 1700 cm^{-1} bis 1400 cm^{-1} .

| Gruppe | Schwingung | Bandenlage [cm^{-1}] |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| Amid | $\nu(\text{C}=\text{O})$, Amid I | 1700-1620 |
| Amid | $\nu(\text{C}-\text{N})$ und $\delta(\text{C}-\text{N}-\text{H})$, Amid II | 1550-1510 |
| Seitenkette von Lys | $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3)^+$ | 1665-1585 |
| Seitenkette von Lys | $\delta_{\text{sy}}(\text{NH}_3)^+$ | 1530-1490 |
| Seitenkette von Phe(NO_2) | $\nu(\text{C}-\text{C})$, Phenyl-Gerüst | ca. 1600 |
| Seitenkette von Phe(NO_2) | $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ | 1530-1500 |
| Seitenkette von Arg | ν, δ der Guanidino-Gruppe* | 1620-1650 |

* von Amid I und $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3)^+$ überlagert und meist nicht aufgelöst.

Anhand der Überlappung der Absorptionsbereiche (vgl. Tab. 5.1) werden die Schwierigkeiten bei der Interpretation der Spektren deutlich. Anzahl und Lage der Amid-Banden hängen von der Konformation des Peptids ab. Für die Amid-Schwingungen sind z. B. bei Vorliegen zweier β -turns mindestens zwei Banden zu erwarten. Sind β - und γ -turns im Peptid enthalten, erwartet man drei Absorptionsbanden. Die Amid I-Schwingungen der an den β - bzw. γ -turns beteiligten Amidbindungen liegen bei Wellenzahlen unterhalb, die der freien Amid-Gruppen oberhalb 1650 cm^{-1} . Die genaue Lage dieser Banden ist abhängig vom Lösungsmittel (H_2O), vom Winkel der Wasserstoffbrücken zwischen den an den turns beteiligten Amid-Gruppen und von den Bindungslängen der Wasserstoffbrücken [man 93, vas 98]. Erschwerend kommt hinzu, daß bei Adsorption der Peptide auf die unterschiedlichen Oberflächen sich die Konformation ändern kann, so daß die Amid-Banden zusätzlich verschoben werden, aber durch die Möglichkeit neuer Wasserstoffbrücken auch weitere Banden entstehen können. Eine genaue Bandenzuordnung ist ohne Kenntnis der Konformation der Cyclopeptide deshalb ohne den Vergleich von mehreren verschiedenen Cyclopeptid-Spektren nicht möglich. Die im folgenden getroffenen Zuordnungen für Amid-, Guanidino- und Ammonium-Schwingungen können deshalb Anteile der jeweils anderen Gruppen enthalten.

Das Lösungsspektrum von **2** ist in Abb. 5.10 gezeigt. Da alle verwendeten Cyclopeptide nach Synthese und Aufreinigung als Trifluoracetate vorliegen, sind die Spektren von der Absorption der asymmetrischen Streckerschwingung des Carboxylats der Trifluoressigsäure überlagert. Von den Amid-Schwingungen des Peptid-Rückgrats ist nur die Amid I-Schwingung zu erkennen. Die Amid II-Bande ist wie die symmetrische Deformationsschwingung NH_3^+ -Gruppe entweder sehr schwach ausgeprägt, oder wird von der relativ

starken Absorption der Nitrogruppe überlagert. Im mittleren Bereich des Spektrums finden sich die Gerüst-Valenzschwingungen der Phenylringe und die asymmetrische Deformationsschwingung der NH_3^+ -Gruppe der Lysinseitenketten. Die Absorptionsbanden der Guanidino-Gruppe der Argininseitenkette sind von geringerer Intensität und werden von den Banden der Amid- und der Ammoniumgruppen überlagert. Dies ist aufgrund der geringen Anzahl (1 Guanidinogruppe zu 6 Amidbindungen und 3 Ammoniumgruppen) verständlich.

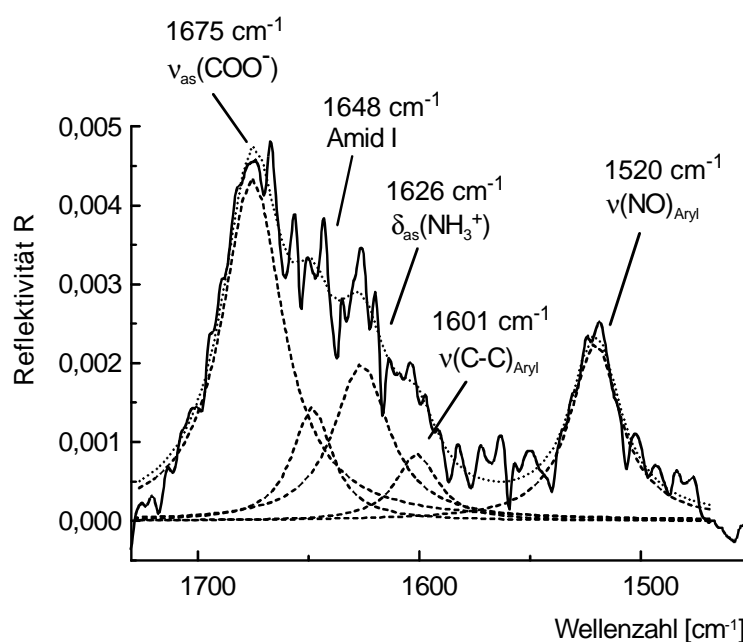


Abb. 5.10: ATR-IR-Spektrum von Cyclopeptid **2** (gelöst in Wasser) gemessen mit einem ZnSe-Kristall (—). Anpassung der Banden (angegebene Wellenzahlen) als Lorentz-Funktionen (-----) und die daraus erhaltene Summenkurve (-----).

Zur Messung der nicht kovalent an die beschichteten Oberflächen gebundenen Cyclopeptide wurden diese in Konzentrationen von 3-4 mg/ml in Wasser gelöst und in der Meßzelle auf der Kristalloberfläche adsorbiert. Alle Spektren wurden über 1024 Scans summiert. Aufgrund der geringen Oberflächendichte der Peptide ist nur ein sehr geringes Signal zu erwarten, das von der Absorption nicht gebundener Moleküle in der Lösung weit übertroffen wird. Um die Banden der gebundenen Peptide dennoch beurteilen zu können, wurde die Peptidlösung nach einer kurzen Adsorptionszeit durch Spülen mit einem Meßzellenvolumen Wasser (5 ml) entfernt. Zurück bleiben nur die auf der Oberfläche gebundenen Peptide, sofern sie während des Spülens nicht ausgewaschen werden. Somit konnten Peptide, die nur sehr schwache Bindungen zur Oberfläche eingehen, nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, daß TFA, die auf keiner der untersuchten Oberflächen eine Bindung zeigte, ebenso ausgewaschen wurde. Gleichzeitig kann über die Leichtigkeit, mit der die

Cyclopeptide ausgespült werden, die Stärke der Wechselwirkung mit der Oberfläche abgeschätzt werden.

Um die Oberfläche nach der Messung von den adsorbierten Cyclopeptiden zu befreien, wurde mit 1 M NaCl und Wasser gespült. Bei einigen Peptiden wurden zur vollständigen Entfernung Spülzeiten von mehreren Stunden benötigt.

Wie bereits erwähnt war eine quantitative Bestimmung der Oberflächenbeladung der beschichteten Kristalle nicht möglich. Da somit nicht von gleich großer Oberflächenbeladung der drei beschichteten Silizium-Kristalle ausgegangen werden kann, ist der Vergleich der Wechselwirkungsstärken zwischen Cyclopeptid und Oberfläche durch Vergleich der Intensität der Spektren nicht möglich. Deshalb werden im folgenden nur die Lagen und die Intensitätsverhältnisse der auftretenden Banden betrachtet, um die unterschiedlichen Wechselwirkungen zu verdeutlichen.

Abb. 5.11 zeigt das Spektrum von **2** nach Adsorption auf der SiOH-Oberfläche eines unbeschichteten Si-Kristalls im Bereich von 1850 cm^{-1} bis 1450 cm^{-1} . Der obere Energiebereich zeigt das Rauschen der Basislinie. Bei kleineren Wellenzahlen als 1450 cm^{-1} konnte aufgrund der Absorption des Kristalls nicht gemessen werden. Gegenüber dem Lösungsspektrum des Peptids werden einige Veränderungen deutlich:

- Die große Bande der TFA ist fast vollständig verschwunden. Da reine Trifluoressigsäure auf der SiOH-Oberfläche keine Bindung zeigte, ist anzunehmen, daß die noch vorhandene Absorption auf eine schwache Bindung der TFA gegenüber der nun vorliegenden Peptidoberfläche zurückzuführen ist.
- Die Absorption der asymmetrischen Deformation der NH_3^+ -Gruppe ist in zwei Banden aufgespalten. Die neu hinzugekommene, zu höherer Energie verschobene Bande bei 1633 cm^{-1} wird durch Wasserstoffbrückenbindung der Ammonium-Gruppen der Lysinreste mit den Silanolgruppen des Kristalls hervorgerufen. Die ebenso an dieser Stelle erwarteten Absorptionsbanden der Guanidino-Gruppe sind diesem Signal überlagert und können nicht von der Schwingung der NH_3^+ -Gruppe getrennt werden.
- Zusätzlich tritt die symmetrische Deformationsschwingung der NH_3^+ -Gruppen auf. Diese Tatsache und die gegenüber der üblicherweise beobachteten, zu höherer Energie verschobenen Lage der Bande zeigen ebenfalls die Bindung der Aminogruppen zur Oberfläche. Die große Halbwertsbreite der Bande wird vermutlich durch Überlagerung mit einer Amid II-Schwingung hervorgerufen, die ebenfalls in diesem Bereich zu erwarten ist und nicht aufgelöst wurde.

- Die leichte Verschiebung der Nitrobande von 1520 cm^{-1} zu 1516 cm^{-1} und die im Verhältnis zu den übrigen Banden geringere Intensität läßt vermuten, daß auch die Nitrogruppe geringfügig an der Bindung des Peptids zur Oberfläche beteiligt ist.

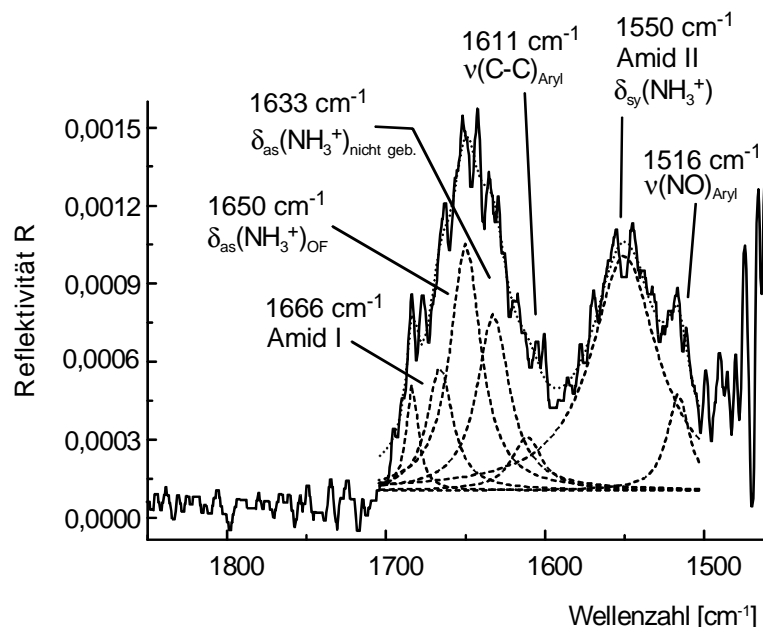


Abb. 5.11: ATR-IR-Spektrum von Cyclopeptid **2**, gebunden auf der SiOH-Oberfläche eines Si-Kristalls (—). Anpassung der Banden (angegebene Wellenzahlen) als Lorentz-Funktionen (-----) und die daraus erhaltene Summenkurve (.....).

Bei den beschichteten Oberflächen A-C war eine Bandenanalyse schwierig, da meist ein sehr geringes Signal-Rausch-Verhältnis vorlag. Zusätzlich wird die Spektreninterpretation durch die vorhandene Doppelinformation, d.h. durch die Überlagerung der Spektren des Peptids und der Oberflächenbeschichtung erschwert. Zwar wurde durch die Referenzierung eine Kompensation der Absorption des Wassers erreicht, die vollständige Kompensation des Spektrums der Beschichtung ist allerdings nur möglich, wenn die Peptide keine starken Wechselwirkungen mit der Beschichtung eingehen. Finden intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Cyclopeptiden und der Oberflächenbeschichtung statt, führt dies zu einer Verschiebung der Banden der beteiligten Gruppen der Peptide und der Oberfläche. Nach Subtraktion des wechselwirkungsfreien Oberflächenspektrums treten somit scheinbar negative bzw. zusätzliche Banden auf. Solche negativen Merkmale können demnach zur Charakterisierung der an der Wechselwirkung beteiligten funktionellen Gruppen der Oberflächenbeschichtung herangezogen werden.

Im IR-Spektrum von Cyclopeptid **2** auf Beschichtung A (Abb. 5.12) sind die beiden Hauptbereiche der Absorption des Peptids trotz des Rauschens noch deutlich zu erkennen, eine Bandenzuordnung ist allerdings nicht möglich. Direkte Aussagen über die an der

Wechselwirkungen mit der Oberfläche beteiligten Gruppen des Peptids können deshalb nicht gemacht werden. Eine Ausnahme stellt die N–O-Valenzschwingung der Nitro-Gruppe dar, die aufgrund der unveränderten Bandenlage bei ca. 1520 cm^{-1} offenbar keine Bindungen an die Oberfläche eingeht.

Indirekte Aussagen über die Wechselwirkung ergeben sich aus den negativen Banden, die hauptsächlich im Absorptionsbereich der Guanidino-Gruppe des oberflächengebundenen Arginins und, wenn auch sehr schwach, im Bereich der deprotonierten Carboxy-Gruppe des Arginins auftreten. Die geringen Intensitäten der Absorptionsbanden des Cyclopeptids deuten darauf hin, daß Amid-Gruppen der Beschichtung für die Wechselwirkung beansprucht werden und damit zu einer Verminderung der Signalintensität führen. Im Bereich der Absorption der Ester-Bindungen des Glycol-Spacers tritt kein negatives Merkmal auf. Dies bedeutet, daß das Spacermolekül, bis auf die gemeinsame Amidbindung mit Arginin, nicht an der Wechselwirkung mit dem Cyclopeptid beteiligt ist. Allerdings scheint auch die Carboxy-Gruppe des Nebenprodukts der Beschichtung, das nicht mit Arginin umgesetzt wurde, an der Wechselwirkung beteiligt zu sein, da auch bei ca. 1700 cm^{-1} eine geringe negative Bande angedeutet ist. Insgesamt kann festgehalten werden, daß die Wechselwirkungen hauptsächlich über die Carboxy- und die Guanidino-Gruppe des oberflächengebundenen Arginins stattfinden.

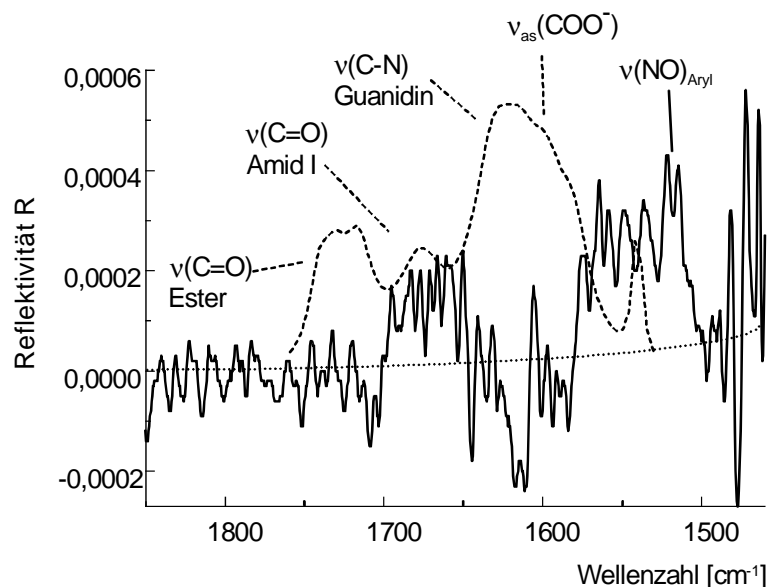


Abb. 5.12: ATR-IR-Spektrum von Cyclopeptid **2**, gebunden auf der Oberflächenbeschichtung **A** (—). Das Spektrum der Oberflächenbeschichtung ist durch die Summe der Lorentz-Kurven (willkürliche Intensität) ohne die Anpassung der Wasser-Absorption symbolisiert (-----). Die gepunktete Kurve (.....) deutet die Basislinie an.

Auf der Oberflächenbeschichtung **B** zeigte Cyclopeptid **2** ein intensiveres IR-Spektrum als bei Beschichtung **A**, jedoch war auch hier keine genaue Zuordnung der Banden möglich (Abb. 5.13). Aufgrund der unveränderten Lage der Bande der Nitro-Gruppe kann auch in diesem Fall angenommen werden, daß keine Bindung des Peptids an die Oberfläche über die Seitenkette des Nitrophenylalanins vorliegt. Negative Merkmale treten nur in geringem Maße auf.

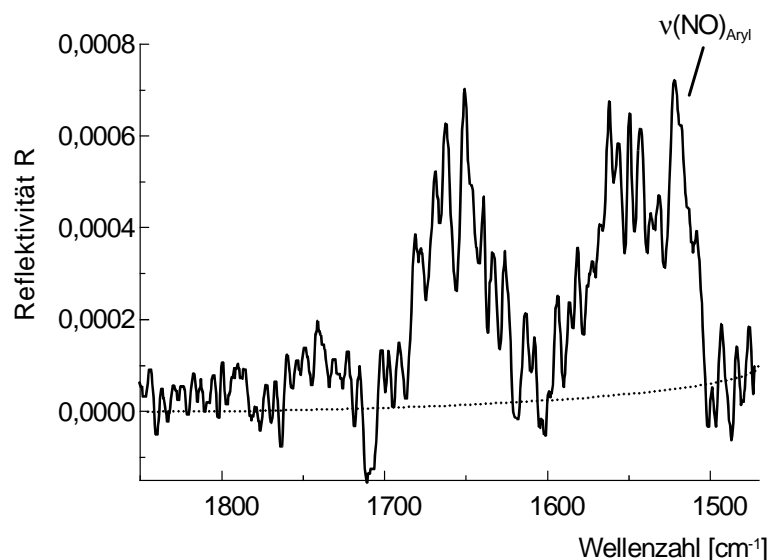


Abb. 5.13: ATR-IR-Spektrum von Cyclopeptid **2**, gebunden auf der Oberflächenbeschichtung **B** (—). Die gepunktete Kurve (.....) symbolisiert die Basislinie.

Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Beschichtungen **A** und **B** war bei **C** ein rein positives Peptid-Spektrum zu messen (Abb. 5.14). Das Spektrum besitzt starke Ähnlichkeit mit dem Spektrum des auf der SiOH-Oberfläche adsorbierten Peptids betreffend der Lage der meisten Banden und der Aufspaltung der Absorptionsbande der asymmetrischen Deformationsschwingung der Ammoniumgruppen in der Lysinseitenkette. Da auf dieser Oberfläche über das N-terminal gebundene Serin eine Hydroxy-Gruppe präsentiert wird, liegen in diesem Fall der Bindung des Cyclopeptids an den reinen Si-Kristall ähnliche Verhältnisse vor. Auswirkungen dieser Wechselwirkung auf die Schwingungsfrequenz der Hydroxygruppe des oberflächengebundenen Tripeptids können mit dem gegebenen Meßaufbau nicht detektiert werden, da die Absorption außerhalb des zugänglichen Meßbereichs liegt. Unverändert bleibt auch hier die Lage der Nitro-Bande. Im Gegensatz zu den Ammonium-Gruppen bindet die Nitro-Gruppe also nicht an die Tripeptid-Oberfläche. Das insgesamt intensitätsstarke Spektrum zeigt, daß neben der Wechselwirkungen der Lysinreste viele schwache Bindungen vorliegen müssen, die zu keiner Verschiebung der Absorptionsbanden des Peptids, durch kooperative Effekte aber zu einer relativ starken intermolekularen Bindung des Cyclopeptids

an die Oberfläche führen. Die relativ große Halbwertsbreite der Amid I-Schwingung deutet darauf hin, daß u. a. die Amid-Bindungen des Peptid-Rückgrats an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind.

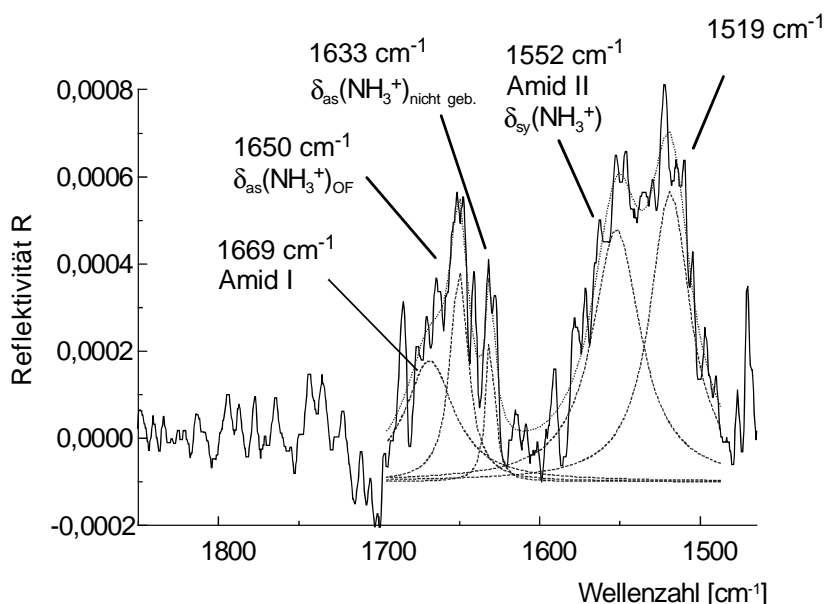


Abb. 5.14: ATR-IR-Spektrum von Cyclopeptid **2**, gebunden auf der Oberflächenbeschichtung **C** (—). Anpassung der Banden (angegebene Wellenzahlen) als Lorentz-Funktionen (-----) und die daraus erhaltenen Summenkurve (-----).

Eine Abschätzung der Bindungsstabilität auf verschiedenen Oberflächen ergibt sich aus der Intensität des Peptid-Spektrums und dem Ausmaß, in dem charakteristische Veränderungen im Spektrum auftreten. Dies soll am Beispiel der Arginin-Beschichtung (**A**) verdeutlicht werden. Abb. 5.15 zeigt die Auswertung der Größe der negativen Bande im Bereich der Carboxylat-Schwingung des oberflächengebundenen Arginins bei einer Wechselwirkung mit Cyclopeptiden. Zur Berechnung wurde die Bande an der Basislinie gespiegelt, als Lorentz-Funktion angepaßt und anschließend integriert. Bei den Cyclopeptiden **5** und **6** war kein negatives Merkmal zu erkennen. Ebenso war das Positiv-Spektrum der Peptide äußerst schwach ausgeprägt, so daß insgesamt davon ausgegangen werden kann, daß beide Peptide nur sehr schwach an die Oberfläche banden. Dagegen war bei **2** trotz des fehlenden negativen Merkmals eine deutliche Wechselwirkung mit der Oberfläche zu messen (vgl. Abb. 5.12).

Eine qualitative Übersicht über die Bindungsstabilität für alle untersuchten Oberflächen gibt Tab. 5.2. Für die SiOH-Oberfläche wurde hierfür die Stärke der asymmetrischen Deformationsschwingung der Peptid-Ammoniumgruppen, die mit der Oberfläche wechselwirkten, betrachtet. Bei der Arginin-Oberfläche (**A**) wurde die Ausbildung negativer Merkmale für die Carboxylat- und die Guanidino-Schwingung ausgewertet. Für die beiden Peptid-Oberflächen **B** und **C** wurde sowohl das Auftreten der Deformationsschwingung der NH_3^+ -Gruppen als

auch die durch Verschiebung der Carboxylat-Schwingung der Oberfläche entstandene negative Bande einbezogen.

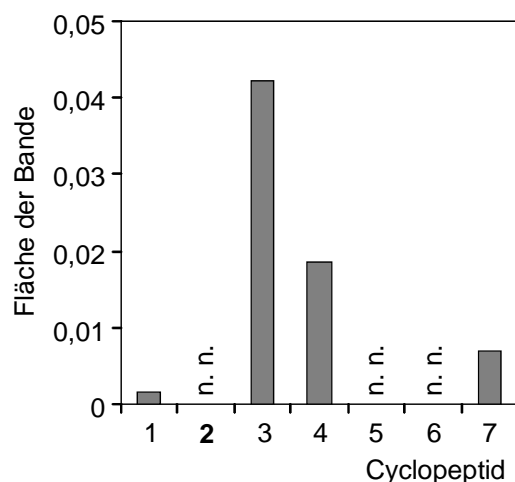


Abb. 5.15: Auswertung der negativen Bande bei 1600 cm^{-1} für Beschichtung A. Das Größe dieser Bande beschreibt die Stärke der Wechselwirkung mit der Carboxy-Gruppe des Arginins. Bei **2** war trotz des Fehlens dieser Bande eine Bindung an die Oberfläche nachweisbar. n. n.: nicht nachweisbar.

Tab. 5.2: Qualitativer Vergleich der Bindungsstabilität der Cyclopeptide mit den verschiedenen Oberflächen. *: schwache Bindung bis nicht bindend, **: mittelstarke Bindung, ***: starke Bindung. Aufgrund unterschiedlicher Oberflächenbeladungen sind die Beschichtungen A-C nicht vergleichbar.

| Cyclopeptid | Oberfläche | | | |
|-------------|------------|-----|-----|-----|
| | SiOH | A | B | C |
| 1 | * | ** | ** | * |
| 2 | ** | ** | ** | *** |
| 3 | ** | *** | *** | *** |
| 4 | *** | ** | *** | ** |
| 5 | *** | * | ** | * |
| 6 | * | * | * | * |
| 7 | ** | ** | * | * |

Eine molekulardynamische Berechnung der Bindungsenergien der Cyclopeptide an die reine SiOH- und an die Arginin-Oberfläche ergab einen ähnlichen Verlauf der Bindungsenergien (Abb. 5.16). Zur Simulation und Modellierung der Wechselwirkungsmechanismen wurden semiempirische Kraftfeldmethoden angewandt. Die berechneten Energien stellen die Gleichgewichtsenergien bei 0 K in der Gasphase dar.*

* Die Rechnungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Christiane Stingel zur Verfügung gestellt.

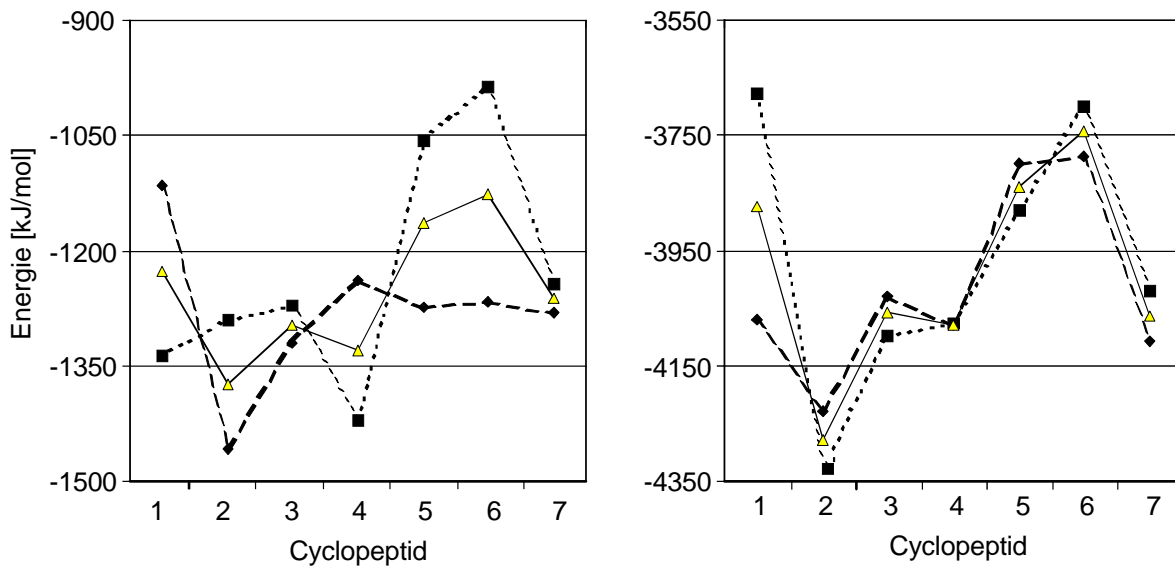


Abb. 5.16: Berechnung der Wechselwirkungsenergien bei 0 K der Cyclopeptide mit einer SiOH-Oberfläche, auf der Wasser adsorbiert ist (links), und der Arginin-Oberfläche (rechts). Für Arg wurde ein zwitterionischer Zustand angenommen. Angegeben sind die Mittelwerte (durchgezogen) aus den beiden Randfällen der Lage des Cyclopeptids auf der Oberfläche: Backbone oben (gepunktet) bzw. unten, zur Oberfläche gerichtet (gestrichelt). Bei Cyclopeptid **5** wurde von protonierten Carboxy-Gruppen ausgegangen.

Für die SiOH-Oberfläche wurde angenommen, daß auf die Oberfläche adsorbiertes Wasser vorliegt. Dieses wurde bei Anbindung der Cyclopeptide nicht verdrängt. Die gute Wasserkompensation der IR-Spektren liefert hierfür eine experimentelle Bestätigung: In keinem der Spektren wurde eine negative Absorption im Bereich der Wasserbande gemessen, die bei einer Verdrängung des Wassers auftreten müßte, da die Spektren gegen die beschichtete Oberfläche unter Wasser referenziert wurden. Die relativen Verhältnisse der Bindungsenergien stimmen mit Ausnahme von Peptid **5** mit den Experimentellen Abschätzungen überein. Im Gegensatz zum Ergebnis der Rechnung zeigte es im Experiment eine sehr starke Bindung zur Oberfläche. Dieses Peptid wurde für die Berechnung nicht als inneres Salz eingesetzt, sondern mit protonierten Säuregruppen. Bei einer Rechnung, die das Peptid als zwitterionische Verbindung berücksichtigte, wurde ebenfalls eine sehr geringe Bindungsenergie berechnet.

Bei der Arginin-Beschichtung wurden unter Voraussetzung eines als Zwitterion vorliegenden Arginins gute Übereinstimmungen zwischen den experimentellen Ergebnissen und der Rechnung erhalten, sofern nur die relativen Unterschiede der Bindungsstärken verglichen werden. Deutliche Unterschiede ergeben sich in der absoluten Bindungsstärke. Während nach den Berechnungen auf der Arginin-modifizierten Oberfläche alle Peptide sehr stark binden sollten, konnte für **6** im Experiment praktisch keine Bindung nachgewiesen werden: das

Peptid wurde schon beim Wechsel des Lösungsmittels vollständig ausgewaschen. Für die Rechnung wurde kein Wasser einbezogen. Da das Peptid **6** stark amphiphile Eigenschaften aufweist, könnten die Cyclopeptide in einer micellenartigen Struktur im Wasser gelöst sein. Die Oberfläche bildet aufgrund der vielen Ladungen eine sehr hydrophile Struktur. Eine Bindung des Peptids an die Oberfläche unter Aufbrechen möglicher Aggregate könnte somit einen Energieverlust bedeuten und damit die experimentell festgestellte geringe Bindungsstärke erklären.

Die relativ hohen berechneten Wechselwirkungsenergien der Cyclopeptide mit der Arginin-Schicht zeigen, daß eine große Zahl an Wechselwirkungsmechanismen offen stehen sollte. Auch die geringe Differenz der Energien, die für die Randfälle der Anbindung – Seitenketten zur Lösung, bzw. zur Oberfläche gerichtet – erhalten wurde, deutet auf vielfältige Wechselwirkungsmöglichkeiten hin. Andererseits muß beachtet werden, daß Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser geschwächt oder unterdrückt werden, und bei einer Rechnung ohne Wasser möglicherweise zu stark gewichtet werden. Tatsächlich schien diese Oberfläche aber die stärksten Wechselwirkungen auszubilden, wobei hier, aufgrund der nicht bekannten Oberflächenbeladung aus den Spektren keine genauen Daten zu erhalten sind.

Betrachtet man die in Abb. 5.16 dargestellten mittleren Bindungsenergien, so wird ersichtlich, daß im Falle der Arginin-Beschichtung prinzipiell der gleiche Verlauf für die einzelnen Peptide erhalten wurde wie auf der SiOH-Oberfläche. Zusammen mit den insgesamt sehr geringen Unterschieden der Wechselwirkungsenergien zeigt dies, daß keines der Peptide spezifisch an die Arginin-Oberfläche bindet.

5.2.3. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Cyclohexapeptiden*

Die konformative Beweglichkeit von Cyclohexapeptiden kann mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Man macht sich hierbei die Excimerbildung eines an die Cyclopeptide gebundenen Fluorophors zu Nutze. Es wurden die Pyren-modifizierten Cyclopeptide **8** und **9** eingesetzt (Abb. 5.1). Durch Vergleich der Excimerfluoreszenz der beiden Peptide kann zwischen intra- und intermolekularen Aggregaten unterschieden werden. In vorangegangenen Untersuchungen der Excimerfluoreszenz von **8** [lei 98b] wurde gezeigt, daß sowohl bei gelöstem als auch bei einem auf einer planaren Glasoberfläche angebindenem Peptid eine relativ hohe konformative Beweglichkeit vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzspektren der Peptide **8** und **9** in verschiedenen Lösungsmitteln

* Für die Messung der Fluoreszenzspektren danke ich Herrn Dr. Hans-Joachim Egelhaaf vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen (Fluoreszenzabklingkurven im ps-Bereich wurden am Center for Fluorescence Spectroscopy, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, USA aufgenommen).

verglichen. Durch Anbindung beider Peptide in unterschiedlichen Konzentrationen auf Kieselgel konnte die Beweglichkeit der oberflächengebundenen Peptide und die Beschichtung charakterisiert werden. Kieselgel besitzt eine sehr viel größere Oberfläche als planare Glasträger, so daß auch die Untersuchung niedrig belegter Oberflächen möglich war.

5.2.3.1. Konformative Beweglichkeit von Cyclopeptiden in Lösung

Zur Messung der Spektren wurden die Cyclopeptide in einer Konzentration von ca. 10^{-6} mol/l in sauerstofffreien Lösungsmitteln gelöst.

Die konformative Beweglichkeit gelöster Cyclopeptide wurde anhand des zweifach Pyren-modifizierten Peptids **8** untersucht. Prinzipiell können hierbei intra- und intermolekulare Excimere gebildet werden. Durch die hohe Verdünnung sollte das Auftreten von Pyren-Dimeren zwischen zwei Peptidmolekülen vermieden werden.

In den Fluoreszenzspektren von **8** in DMF, EtOH, und Wasser (Abb. 5.17) sind sowohl die Spektren des Monomers als auch des Excimers des Pyrencarbonsäureamids vorhanden, deren Maxima bei $\lambda \approx 400$ nm bzw. $\lambda \approx 500$ nm liegen. Die konformative Beweglichkeit von **8** in Lösung reicht also aus, um signifikante Anteile an Excimer zu bilden. Das Fluoreszenzspektrum ist stark lösungsmittelabhängig. Beim Wechsel des Lösungsmittels von EtOH zu Wasser wird das Intensitätsverhältnis von 0-0- zu 0-1-Peak der Bande der Monomerfluoreszenz stark reduziert, wodurch sich das Maximum langwellig von $\lambda = 385$ nm zu $\lambda = 405$ nm verschiebt. Gleichzeitig erhöht sich das Intensitätsverhältnis der Maxima von Excimer- und Monomerfluoreszenz von $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}} = 0,2$ bei DMF auf $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}} = 0,6$ bei Ethanol und $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}} \approx 5,0$ bei Wasser. Beide Effekte sind auf die geringere Löslichkeit von Pyren in polaren Lösungsmitteln zurückzuführen. Durch die schlechte Solvation des Pyrens in Wasser existieren bereits im Grundzustand Pyren-Dimere, die nach elektronischer Anregung sehr effektiv Excimere bilden. Die Fluoreszenzanregungsspektren (Abb. 5.18) zeigen, daß es sich bei den Excimeren in DMF um dynamische Excimere handelt, d. h. daß sich die Dimere erst nach der Anregung ausbilden, während die in wäßriger Lösung beobachteten Excimere vorwiegend aus Grundzustandsdimeren gebildet werden: Bei DMF sind die Spektren, die im Emissionsmaximum des Excimers bzw. des Monomers detektiert werden, nahezu identisch, während sie sich bei Wasser deutlich unterscheiden. Dies bedeutet, daß in DMF ein dynamisches Gleichgewicht zwischen angeregtem Monomer und Excimer, in Wasser jedoch ein eher statischer Zustand vorliegt. Dieser Befund wird durch gemessene Fluoreszenzabklingkurven bestätigt [ege 00].

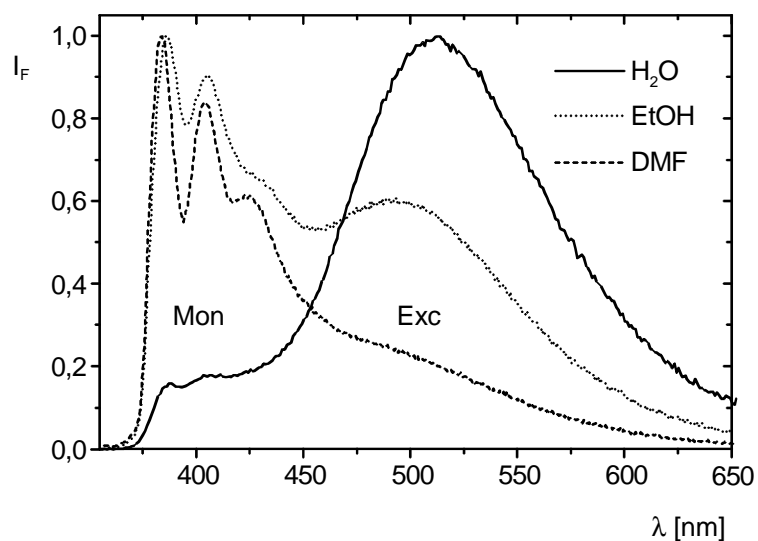


Abb. 5.17: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von **8** (Anregung bei 340 nm), gelöst in Wasser, EtOH und DMF.

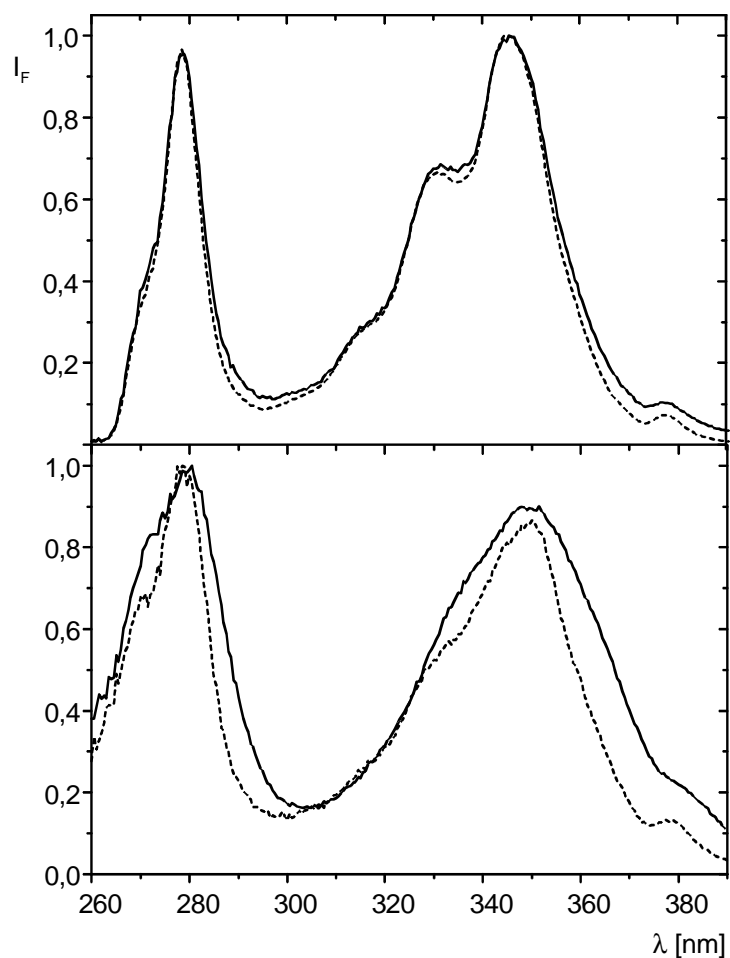


Abb. 5.18: Fluoreszenzanregungsspektren von **8**, gelöst in DMF (oben) und Wasser (unten). Detektion im Emissionsmaximum des Monomers (vgl. Abb. 5.17) bei 400 nm (gestrichelt) und im Emissionsmaximum des Excimers bei 505 nm (durchgezogen).

Auch durch temperaturabhängige Messungen konnte gezeigt werden, daß in Wasser überwiegend statische Excimere beobachtet werden. Bei Erwärmung von 0 °C auf 60 °C nahm das Verhältnis der Intensität der Excimer- zur Monomerfluoreszenz in Wasser ab, während es in DMF steigend war (Abb. 5.19). Durch die höhere Beweglichkeit der Peptide bei höherer Temperatur werden die Grundzustandsdimere bei Wasser teilweise getrennt und die Excimerfluoreszenz nimmt damit ab. In DMF liegen umgekehrte Verhältnisse vor. Durch Temperaturerhöhung steigt die Beweglichkeit der Peptide, wodurch sich Pyren-Dimere leichter ausbilden können.

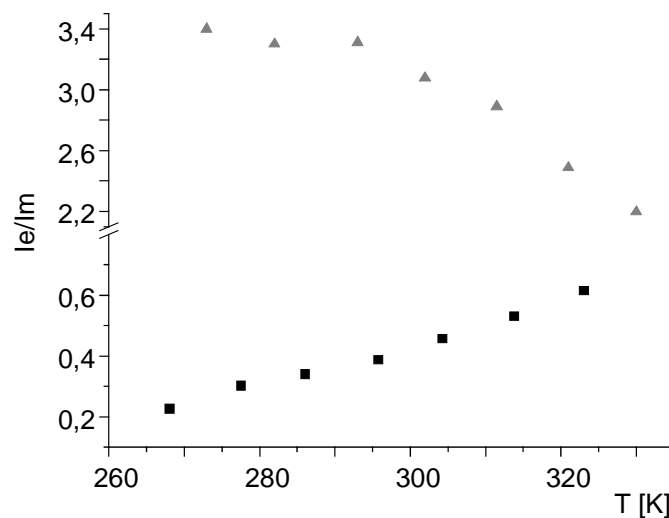


Abb. 5.19: Abhängigkeit des Excimer zu Monomer Verhältnisses von der Temperatur. Messung einer Suspension von **8** in Wasser (graue Dreiecke) und in DMF (schwarz), die Intensitäten wurden bei $\lambda = 505$ nm für das Excimer und bei $\lambda = 400$ nm für das Monomer bestimmt.

Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren der Peptide **8** und **9** zeigt, daß die Excimere bei **8** überwiegend aus intramolekularen Fluoren-Dimeren bestehen. Bei **9** (Abb. 5.20) wird erwartungsgemäß keine Excimerfluoreszenz beobachtet, da nur intermolekulare Excimere gebildet werden können. Nur wenn DMF als Lösungsmittel verwendet wird, ist eine sehr schwache Excimerbande zu erkennen. Eine denkbare Erklärung ist, daß sich Peptid **9** in DMF etwas schlechter löst als in den anderen Lösungsmitteln und damit zum Teil aggregierte Cyclopeptide vorliegen.

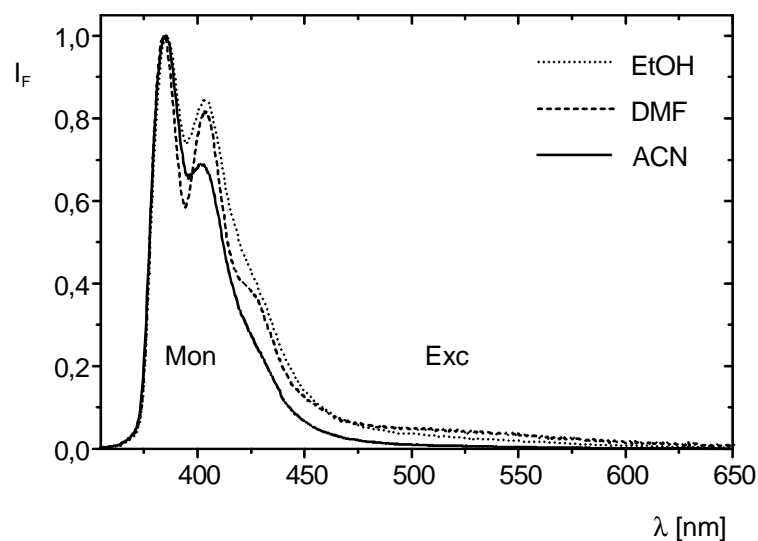


Abb. 5.20: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von **9** (Anregung bei 340 nm), gelöst in EtOH, ACN und DMF.

5.2.3.2. Anbindung der Cyclopeptide auf Kieselgel

Zur Aktivierung der Oberfläche wurde das Kieselgel (Nucleosil 300) zunächst mit Aminopropyltriethoxysilan unter Zusatz von Pyridin in Toluol umgesetzt. Die Grundlagen der Silanisierung von Glasoberflächen wurden in Kapitel 2 beschrieben. Da keine Maximalbelegung des Kieselgels erforderlich war, wurde das Aminosilan bezüglich der reaktiven Hydroxygruppen des Kieselgels im Unterschuß zugegeben. Der Umsatz der Reaktion wurde gaschromatographisch mit Zusatz von Decan als Standard verfolgt. Nach 6 h war kein Silan mehr in der Reaktionslösung nachweisbar. Die Beladung der Oberfläche mit Silan wurde nach Anbindung von Fmoc-6-Aminohexansäure durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe und UV-metrische Bestimmung des erhaltenen N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidinadduktes [mei 79, cla 98] zu 0,14 mmol/g bzw. $1,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ bestimmt. Die Elementaranalyse lieferte Werte in der gleichen Größenordnung.

Die eingesetzten Cyclopeptide **8** und **9** besitzen jeweils drei freie Aminogruppen, durch die eine Bindung zur Oberfläche erreicht werden kann. Zunächst wurde das Aminopropylkieselgel mit Chlorameisensäure-p-nitrophenylester zu einem Aktivcarbammat umgesetzt. Durch anschließende Substitution des Nitrophenols wurde das Cyclopeptid über eine Harnstoffgruppierung an die Oberfläche gebunden (Abb. 5.21). Über die IR-Absorption der Valenzschwingungen der Nitro-Gruppe ($1/\lambda \approx 1520 \text{ cm}^{-1}$, 1350 cm^{-1}) konnte die Umsetzung bei beiden Reaktionsschritten verfolgt werden. Nicht umgesetzte Carbamate wurden mit Isopropylamin gecappt. Die Cyclopeptide wurden im Unterschuß bezüglich der reaktiven

Zentren auf der Oberfläche eingesetzt, da aufgrund der hohen Intensität der Fluoreszenz keine hohe Bedeckung erforderlich war.

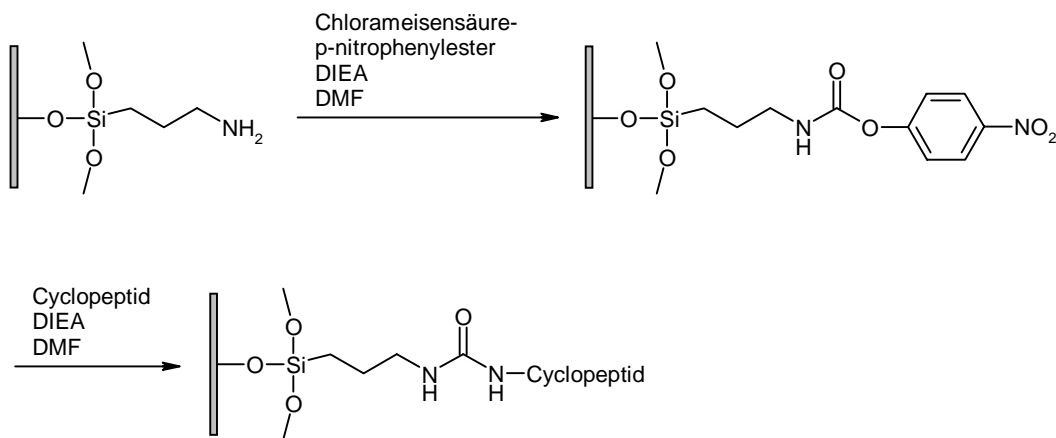


Abb. 5.21: Kovalente Anbindung von Lysin-haltigen Cyclopeptiden an Aminopropyl-modifiziertes Kieselgel.

Um bei der Untersuchung der konformativen Beweglichkeit zwischen inter- und intramolekularer Excimerbildung unterscheiden zu können, wurden beide Cyclopeptide mit verschiedenen Bedeckungsgraden angebunden (Tab. 5.3). Zur Bestimmung der erhaltenen Oberflächenbeladungen wurden Proben des Kieselgels in 10 ml 2 N NaOH/EtOH (3:1, v/v) 60 h hydrolysiert. Über UV-spektroskopische Bestimmung des Absorptionsmaximums von Pyren bei 344 nm ($\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet sich die Oberflächenbeladung von Pyren x_{Pyren} [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$] aus der Extinktion E nach

$$x_{\text{Pyren}} = \frac{100000 \cdot E}{\epsilon \cdot (\text{Einwaage Kieselgel [mg]})}$$

bei Verwendung von 1 cm-Küvetten. Im Fall des zweifach Pyren-modifizierten Peptids müssen diese Werte halbiert werden.

Die theoretischen Beladungen stellen die Maximalbelegung bei vollständigem Umsatz des Cyclopeptids dar (vgl. 6.2.3.2). Als Erklärung für die verglichen mit der theoretischen Beladung eher geringen Ausbeuten der Peptid-Anbindung können mehrere Faktoren dienen. Möglich ist eine schlechte Zugänglichkeit der Oberfläche, so daß trotz langer Reaktionszeiten kein vollständiger Umsatz erreicht wird. Dies kann durch Lösungsmittelleffekte verstärkt bzw. verursacht werden: Durch unzureichende Solvatisierung der oberflächengebundenen Reaktionszentren können diese auf dem Kieselgel adsorbiert vorliegen und stehen dem Reaktionspartner somit nicht zur Verfügung. Ebenso kann es mit prinzipiell gleichen Folgen zur Adsorption der Cyclopeptide auf der Oberfläche kommen.

Tab. 5.3: Ergebnisse der Bestimmung der Oberflächenbeladung von Cyclopeptidschichten auf Kieselgel (Nucleosil 100 Si, 5 Å; OF: 100 m²/g).

| Pos. | Cyclopeptid | Einwaage [mg] | E | x_{cyclo} [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$] | Theor. Beladung [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$] |
|------|-------------|---------------|-------|---|--|
| 1 | 8 | 0,86 | 0,093 | 0,1 | 0,39 |
| 2 | 8 | 2,05 | 0,032 | 0,015 | 0,041 |
| 3 | 8 | 5,09 | 0,022 | 0,004 | 0,008 |
| 4 | 9 | 1,03 | 0,079 | 0,14 | 0,49 |
| 5 | 9 | 2,79 | 0,020 | 0,013 | 0,049 |
| 6 | 9 | 6,16 | 0,010 | 0,003 | 0,010 |

Ziel der folgenden Untersuchungen war die Bestimmung der konformativen Beweglichkeit der angebondenen Cyclopeptide. Da die erreichten Oberflächenbeladungen hierfür ausreichend waren, wurde nicht versucht, z. B. durch Verwendung anderer Lösungsmittel, die Effizienz der Anbindung zu verbessern.

5.2.3.3. Untersuchung von Cyclopeptidschichten auf Kieselgel

Durch die Immobilisierung von Cyclopeptiden auf Oberflächen wird die Beweglichkeit der Moleküle eingeschränkt. Dies wird am Beispiel von **8** im folgenden beschrieben. Peptid **9** diente wiederum zur Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularen Pyren-Dimeren. Letztere können bei geringer Oberflächenkonzentration der Peptide nur bei einer Art Clusterung oder Inselbildung der Peptide auftreten.

Zur Messung wurden die beschichteten Kieselgelproben in verschiedenen Lösungsmitteln suspendiert und während der Messung gerührt.

In Abb. 5.22 sind die Fluoreszenzspektren von Cyclopeptid **9**, das kovalent an Kieselgel gebunden ist, in Wasser und in EtOH für die in Tab. 5.3 gegebenen Oberflächenbeladungen gezeigt. Bei der höchsten Konzentration (0,14 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) ist sowohl in Wasser als auch in Ethanol eine starke Excimerfluoreszenz vorhanden. Bei Annahme eines Flächenbedarfs der Moleküle von 1 nm² in grober Näherung, wäre die Oberfläche zu 10 % mit Cyclopeptiden bedeckt. Bei diesem Bedeckungsgrad kann aufgrund der starken Excimerfluoreszenz eine Inselbildung nicht ausgeschlossen werden. Schon bei der 10-fach geringeren Oberflächenbeladung ist aber praktisch keine Excimerfluoreszenz mehr nachweisbar. Dies bedeutet, daß bei geringen Oberflächenkonzentrationen keine Peptid-Cluster vorliegen und somit von isolierten Molekülen ausgegangen werden kann.

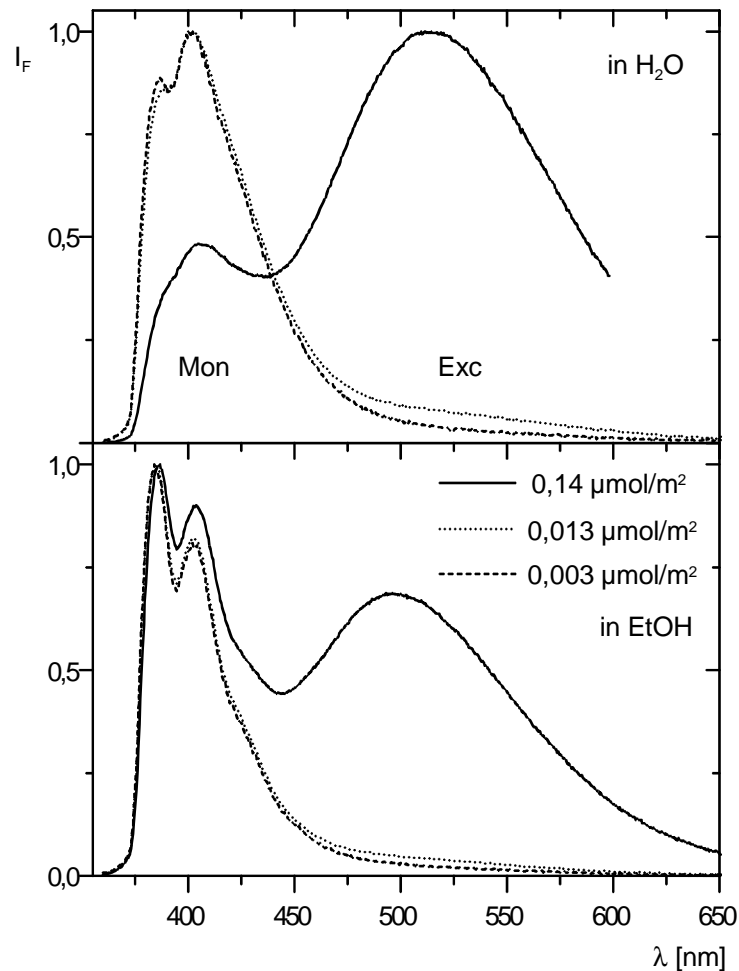


Abb. 5.22: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von **9** (Anregung bei 340 nm), angebunden auf Kieselgel in drei unterschiedlichen Oberflächenbeladungen. Messung in Wasser (oben) und EtOH (unten).

Die Fluoreszenzspektren von kovalent an Kieselgel gebundenem Peptid **8** sind für unterschiedliche Bedeckungsgrade und Lösungsmittel in Abb. 5.23 gezeigt. Wie schon bei homogenen Lösungen des Peptids gezeigt wurde, ist der Anteil der Excimerfluoreszenz in Wasser am größten. In Acetonitril und EtOH wird ungefähr das gleiche Intensitätsverhältnis von Excimer- zu Monomer-Fluoreszenz beobachtet. Diese Unterschiede sind auch hier auf die unterschiedliche Löslichkeit von Pyren in den verschiedenen Lösungsmitteln zurückzuführen. Erwartungsgemäß nimmt das Excimer zu Monomer Verhältnis beim Wechsel von hohen zu niedrigen Bedeckungsgraden ab. Hohe Oberflächenbeladungen ermöglichen neben intramolekularer auch intermolekulare Excimerbildung. Bei niedrigen Bedeckungsgraden ist die Excimerfluoreszenz wie bei **9** durch den Wegfall intermolekularer Dimere deutlich geringer. Da auch beim Wechsel von $0,015 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ zu $0,004 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ noch eine Abnahme der Pyren-Dimere zu beobachten war, wurde die geringste Konzentration zur Bestimmung der konformativen Beweglichkeit des Peptids benutzt, da das Auftreten intermolekularer Excimere sicher ausgeschlossen werden sollte.

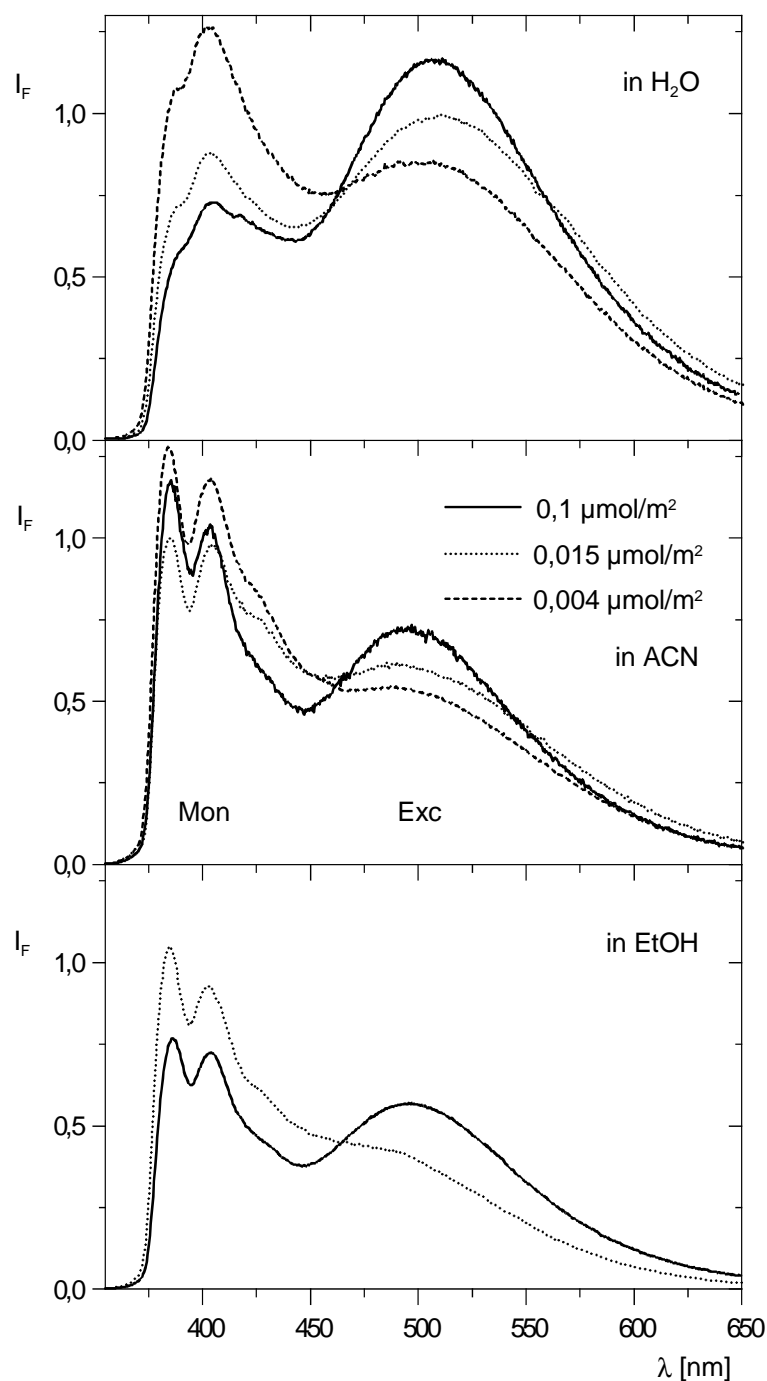


Abb. 5.23: Flächennormierte Fluoreszenzspektren von **8** (Anregung bei 340 nm), angebunden auf Kieselgel in unterschiedlichen Oberflächenbeladungen. Messung in Wasser (oben), ACN (Mitte) und EtOH (unten).

Abb. 5.24 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzspektren von **8** in homogener Lösung mit den Spektren des immobilisierten Peptids ($c = 4 \text{ nmol/m}^2$) in Acetonitril und Wasser. Durch die Anbindung des Peptids auf Kieselgel nimmt das Ausmaß der intramolekularen Excimerbildung in beiden Lösungsmitteln deutlich ab. Die konformative Beweglichkeit der Cyclopeptide und damit die Beweglichkeit der Pyren-Label wird demnach als Folge der Anbindung deutlich eingeschränkt. Diese Einschränkung muß nicht notwendigerweise durch

die kovalente Fixierung des Peptids auf der Oberfläche verursacht werden, sondern kann auch durch Adsorption der Pyren-Label oder des Peptidrückgrats an der Kieselgeloberfläche herrühren.

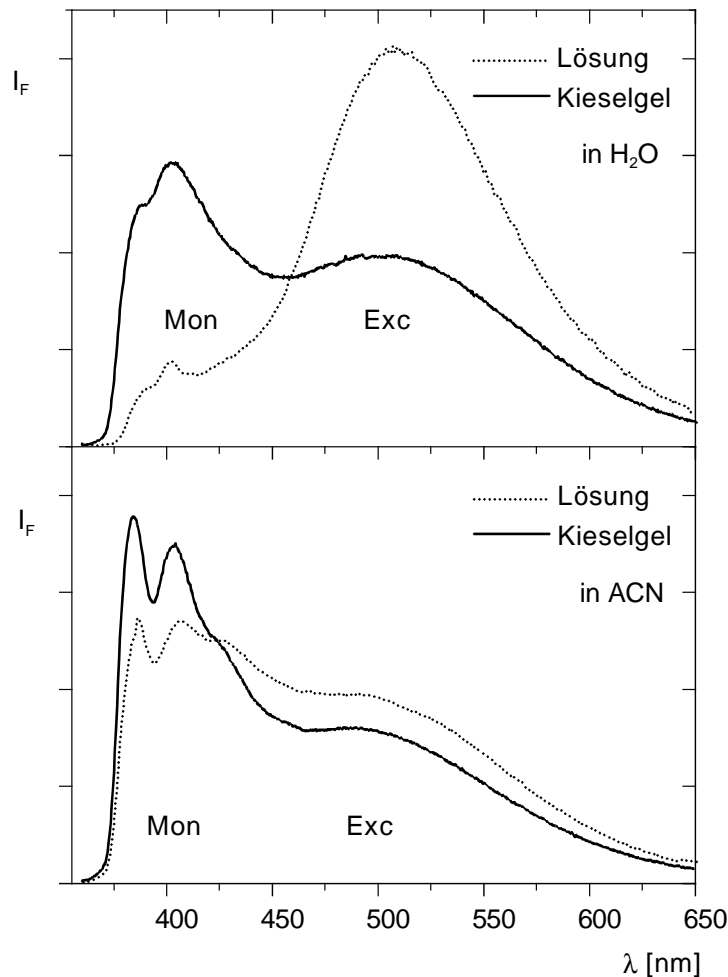


Abb. 5.24: Vergleich der flächennormierten Fluoreszenzspektren von **8** (Anregung bei 340 nm), angebunden auf Kieselgel ($c = 4 \text{ nmol/m}^2$) und in homogener Lösung. Messung in Wasser (oben) und ACN (unten).

Durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzanisotropie konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Die Ergebnisse der Anpassung der Anisotropie-Abklingkurven (Abb. 5.25) nach Gleichung (12) für **8**, gelöst in Wasser und gebunden an Kieselgel, sind in Tab. 5.4 wiedergegeben. Die Abklingkurve des gelösten, d. h. freien Peptids konnte durch eine einfache Exponentialfunktion angepaßt werden, für das oberflächengebundene Peptid war eine biexponentielle Anpassung nötig. Im Gegensatz zum gelösten Cyclopeptid sind offenbar beim oberflächengebundenen Peptid zwei unterschiedliche Komponenten vorhanden.

Insgesamt zeigen die im Vergleich zur homogenen Lösung verlängerten Rotationskorrelationszeiten und die geringeren Kegelöffnungswinkel (berechnet nach Gleichung (13)) für die "wobble in cone"- Bewegung, daß nicht nur die Translations- sondern auch die

Rotationsbeweglichkeit der Pyren-Monomere durch die Oberflächenfixierung des Cyclopeptids erheblich eingeschränkt ist. Diese Einschränkung ist in Wasser stärker als in Acetonitril.

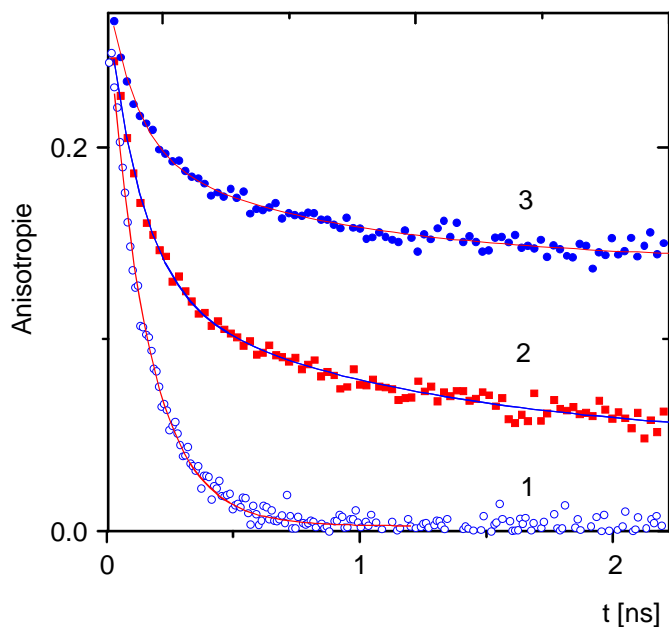


Abb. 5.25: Abklingkurven der Fluoreszenzanisotropie von **8**, gelöst in Wasser (1) und kovalent angebunden an Kieselgel (Oberflächenkonzentration $c = 4 \text{ nmol/m}^2$), das in ACN (2) bzw. in Wasser (3) suspendiert wurde. Zusätzlich eingezeichnet ist jeweils die exponentielle Anpassung der Meßsignale nach Gleichung (12).

Tab. 5.4: Rotationskorrelationszeiten τ_i , Restanisotropien r_∞/r_0 und Kegelöffnungswinkel Θ für die "wobble in cone"-Bewegung der Pyren-Label von Verbindung **8** in Lösung sowie kovalent gebunden an Kieselgel (suspendiert in ACN und Wasser). Index i: i-te Komponente der Fluoreszenzabklingkurve, A: Amplitude.

| | $\tau_1/\text{ns}(A_1)$ | $\tau_2/\text{ns}(A_2)$ | r_∞/r_0 | $\Theta/^\circ$ |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|-----------------|
| Lösung (Wasser) | 0.31 | - | 0 | 90 |
| auf Kieselgel in ACN | 0.27 (0.50) | 2.15 (0.32) | 0.18 | 57 |
| auf Kieselgel in Wasser | 0.23 (0.27) | 1.67 (0.21) | 0.52 | 37 |

5.2.4. Diskussion

Die ATR-IR-Spektroskopie wurde zur Charakterisierung der drei Oberflächenbeschichtungen herangezogen. Über die charakteristischen Absorptionsbanden der angebotenen Moleküle wurde der Erfolg der Anbindung bestätigt. Eine quantitative Bestimmung der Oberflächenbeladung ist nicht möglich. Ebenso konnten aufgrund der geringen lateralen Auflösung keine Angaben zur Homogenität der Beschichtungen gemacht werden.

Die Wechselwirkungen zwischen oberflächengebundenen Liganden und den Cyclopeptiden, die als gelöste Bindungspartner eingesetzt wurden, konnten durch Veränderungen der auftretenden Banden bestimmt werden. Über die Doppelinformation der Spektren, d. h. die Überlagerung der Absorptionsbanden der Cyclopeptide und der Oberflächenbeschichtung, konnten für beide Bindungspartner die wechselwirkenden Gruppen ermittelt werden. Es zeigte sich, daß die Cyclopeptide hauptsächlich über die Aminogruppen der Lysinseitenketten und über Amid-Bindungen des Peptidrückgrats mit der Oberfläche wechselwirken. Auch auf der Seite der oberflächengebundenen Aminosäuren bzw. Peptide waren Amid-Bindungen des Backbones und polare Gruppen der Seitenketten beteiligt.

Über die genannten Wechselwirkungen konnte die Stabilität der Bindung der Cyclopeptide mit den Oberflächen abgeschätzt werden. Molekulardynamische Rechnungen lieferten vergleichbare Ergebnisse, zumindest wenn die relativen Unterschiede der Wechselwirkungsenergien betrachtet werden. Insgesamt zeigen aber auch die Rechnungen durch die geringen Unterschiede in der Bindungsstärke und durch den ähnlichen Verlauf der Wechselwirkungsenergien für unterschiedliche Oberflächen, daß keines der Peptide selektiv an die beschichteten Kristalle bindet. Diese Aussage steht nicht notwendigerweise im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [lei 98a], da durch die reziproke Anbindungsweise an die Oberfläche nicht das exakt gleiche System untersucht wurde. Die beschriebenen Wechselwirkungen – mit Ausnahme der durch die nicht gebundenen Lysinseitenketten verursachten – werden aber unabhängig davon, ob Peptid oder Ligand auf die Oberfläche gebunden sind, die gleichen sein.

Im letzten Teil dieses Kapitels wurde die konformative Beweglichkeit oberflächengebundener Pyren-modifizierter Cyclohexapeptide mit der Beweglichkeit in Lösung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie verglichen. Über die Fähigkeit der Pyren-Label Excimere zu bilden, konnten Informationen über die Beweglichkeit der Peptide erhalten werden. Die in Lösung vorhandene hohe konformative Beweglichkeit war nach Anbindung auf einer Kieselgeloberfläche deutlich eingeschränkt. Für die Anwendung der Cyclopeptide als Erkennungsstrukturen in der Sensorik kann dies von Vorteil sein. Durch die

Wechselwirkungen zwischen Cyclopeptiden und Analyten tritt ein mehr oder weniger starker Entropieverlust auf, der der Ausbildung intermolekularer Bindungen entgegenwirkt. Durch die Einschränkung der internen Freiheitsgrade der Erkennungsstruktur, hier also durch Einschränkung der Beweglichkeit der Cyclopeptide, kann der Entropieverlust minimiert werden.

Zusätzlich konnte die Homogenität der Oberflächenbeschichtung charakterisiert werden. Die Cyclopeptide wurden über bis zu drei Lysinseitenketten in unterschiedlichen Konzentrationen auf modifiziertem Kieselgel angebunden. Durch eine Verdünnungsreihe mit einfach Pyren-gelabelten Cyclopeptid konnte gezeigt werden, daß bei Oberflächenkonzentrationen von $c < 0.01 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ keine signifikante Inselbildung vorliegt.

6. Experimenteller Teil

6.1. Material und Methoden

6.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Lösungsmittel wurden von den Fluka (Neu-Ulm), und Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel ACN, DCM, Dioxan, DMF, und THF wurden von Fluka (Neu-ULM) bezogen. Für die HPLC wurde Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv Gradient Grade der Firma Merck (Darmstadt) sowie Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol (Merck, Darmstadt) verwendet. Entionisiertes Wasser wurde über eine Filtrationsanlage (Millipore, Eschborn) gereinigt.

Funktionalisierte Polystyrol-Harze stammen von NovaBiochem (Heidelberg) und Rapp Polymere (Tübingen).

Aminosäurederivate wurden von NovaBiochem (Heidelberg), Orpegen (Heidelberg) und Alexis (Läufelfingen, Schweiz) bezogen.

Sonstige nicht näher aufgeführte Chemikalien wurden von Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Kieselgel (Nucleosil 300 Si, 5 μm Korngröße) wurde von Grom (Herrenberg), CPG (Porendurchmesser 50 nm) wurde von Proligo (Hamburg) bezogen.

Monoklonale anti-HA-Antikörper wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen, monoklonale und polyklonale anti-Atrazin- bzw. polyklonale anti-Simazin-Antikörper stammen von Dr. Ram Abuknesha, Kings College London.

6.1.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennungen zu analytischen Zwecken wurden an einer System-Gold-Anlage (Beckman, San Ramon, USA), bestehend aus einem Autosampler 507, einer programmierbaren Pumpeneinheit 126 und einem Diodenarraydetektor 168 durchgeführt.

Analytische Trennungen wurden mit Nucleosil 300 C₁₈ Säulen (5 μm Korngröße, 250 \times 2 mm, Grom, Herrenberg) bei einem Fluß von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Als mobile Phase dienten Wasser/0.12 % (v/v) TFA (Laufmittel A) und Acetonitril/0.08 % (v/v) TFA (Laufmittel B) in linearen Gradientensystemen wie in Tab 4-1 beschrieben. Die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen bei $\lambda = 214 \text{ nm}$ bestimmt, die jedoch aufgrund unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten keine absoluten Gehaltsangaben ermöglichen.

Tab. 6.1 Lineare Gradientensysteme für die analytische RP-HPLC

| Name | Gradientensystem |
|------------|-------------------------------|
| Gradient 1 | 10 % B nach 100 % B in 45 min |
| Gradient 2 | 0 % B nach 70 % B in 45 min |
| Gradient 3 | 50 % B nach 100 % B in 45 min |

Für präparative Trennungen wurde ein Waters 600 Multisolvant Delivery System (Waters, Eschborn) mit einem Lambda-Max Modell 481 LC Detektor, einem Data Module 740 und einer Nucleosil 300 C₁₈ Säule (5 µm Korngröße, 250 x 20 mm, Grom, Herrenberg) bei einer Flußrate von 10 ml/min mit demselben Laufmittelsystem verwendet. Der Gradient wurde dem jeweiligen Trennproblem angepaßt.

6.1.3. ES-Massenspektrometrie

Druckluftunterstützte Elektrospray-Massenspektrometrie wurde an einem API III TAGA 6000E Triple-Quadrupol Massenspektrometer mit Ionenspray-Ionisationsquelle (Sciex, Thornhill, Ontario, Kanada) durchgeführt. Die Proben wurden in tert.-Butylalkohol/H₂O (4:1) oder über eine Infusionspumpe (Harvard Apparatus, Southnatic, Massachusetts, USA) bei einem Fluß von 5-20 µl/min injiziert. Für größere Probenzahlen wurde eine HPLC-Spritzenpumpe (140 A, Applied Biosystems, Weiterstadt) angeschlossen und ein kontinuierlicher Fluß (100 µl/min) eines isokratischen Wasser/ACN (1:1)-Gemisches (mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure) eingestellt. In Abständen von 5 min wurden über einen automatischen Probeninjektor (Model 231, Dilutor 401, Gilson, Villiers le Bel) jeweils 5 µl der Probe (Konzentration 1 mmol/ml) in den Laufmittelstrom injiziert. Die Orifice Spannungen des Massenspektrometers betragen + 70 V bzw. -70 V).

Für HPLC-MS-Messungen wurde die oben genannte HPLC-Anlage, die mit einer Gromsil C 18-Säule (5 µm Korngröße, 100 x 2 mm, Grom, Herrenberg) verbunden war, eingesetzt. Die UV-Absorption wurde mittels eines Linear Uvis 204 (Reno, Nevada / USA) ermittelt.

Weitere ES-MS-Analysen wurden an einem Quattro II Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (Micromass, Altincham, UK) durchgeführt.

Hochaufgelöste FT-ICR-MS-Messungen wurden an einem Bruker Daltronic ApexTM II 4.7 mit Ionenspray-Ionisationsquelle (Bruker Daltronic, Bremen) durchgeführt.

6.1.3.1. HPLC-MS-MS-Analyse von Fermentationsproben

Zentrifugierte Kulturfiltrate wurden mit der in Abschnitt 6.1.3 genannten HPLC-Anlage bei einer Flußrate von 200 µl/min chromatographiert. Tab. 6.2 zeigt den verwendeten Gradienten.

Das Einspritzvolumen betrug 20 μl . Vor der massenspektrometrischen Detektion wurde die Flußrate auf 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert.

Zur Quantifizierung wurden Neutralverlustscans im „Multi-Reaction-Monitoring“-Mode durchgeführt. Integriert wurde über den TIC der gemessenen Ionen.

Tab. 6.2: Gradient für die HPLC-MS-Analytik von Fermentationsproben. Zur Equilibrierung wurde 3 min mit 100% H_2O gespült.

| t [min] | 0 | 10 | 13 | 15 | 17 |
|------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| % H_2O | 100 | 60 | 0 | 0 | 100 |
| % ACN | 0 | 40 | 100 | 100 | 0 |

6.1.4. UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden an Lambda 2 und Lambda 9 UV/VIS-Spektrometern (Perkin-Elmer, Überlingen) mit Quarzküvetten Suprasil 1,0 bzw. 0,1 durchgeführt.

6.1.5. Fluoreszenzspektroskopie

Stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren im Nanosekunden-Bereich wurden an einem SPEX-Fluorolog 112 gemessen.

6.1.6. FT-ATR-IR-Spektroskopie

FT-ATR-IR-Spektren von harzgebundenen und abgespaltenen Substanzen wurden an einem Bruker IFS48 Spektrometer aufgenommen, das mit einer Split pea-Einheit von Harrick versehen war. Dazu wurden einige Harzbeads oder geringe Substanzmengen auf den Si-Meßkristall der Split pea-Einheit gepreßt.

FT-ATR-IR-Spektren von beschichteten Silizium-Oberflächen und von Cyclopeptiden wurden mit einem Bruker IFS66c Spektrometer aufgenommen. Die Hochvakuumkammer des Spektrometers war mit einer Flüssigkeits-Durchfluß-Meßzelle ausgestattet. Der ATR-Kristall ist in Abb. 6.1 gezeigt. Über die häufige Reflexion des IR-Lichtstrahls innerhalb des Kristalls steht eine große Oberfläche zur Verfügung, so daß auch Spektren von gering beladenen Oberflächen aufgenommen werden können.

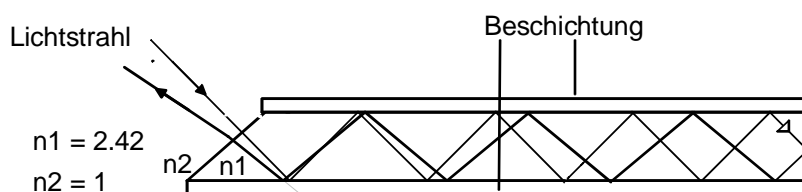


Abb. 6.1: Schema des ATR-Kristalls.

6.1.7. Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) wurde als Methode zur Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen gebundenen niedermolekularen Liganden einerseits und gelösten Antikörpern andererseits verwendet. Wesentliche Aspekte dieser Methode in Hinblick auf Detektion von Bindungsereignissen an Oberflächen sind von Brecht et al. [bre 93] eingehend diskutiert worden. Der schematische Aufbau der Meßapparatur, die für Antikörperbindungs-Assays verwendet wurde, ist in Abb. 6.2 gezeigt. Mit Hilfe der dort verwirklichten Fließinjektionsanalyse lassen sich flüssige Proben mit relativ geringem Aufwand reproduzierbar und schnell vermessen. Die Probenvolumina werden dabei kontrolliert in einen kontinuierlichen Trägerstrom injiziert und mit diesem zu einem Durchflußdetektor (Flußzelle) transportiert.

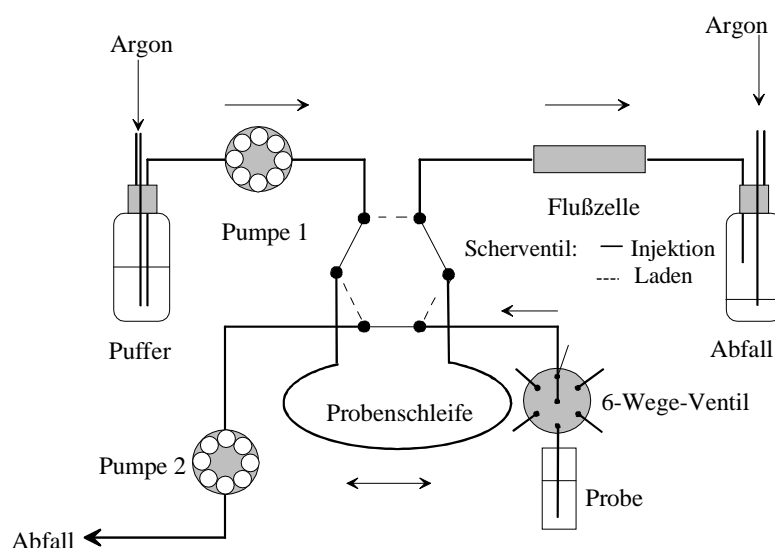


Abb. 6.2: Schema der Fließinjektionsanalyse-Apparatur.

Der Aufbau des Einzelmeßplatzes, mit dem die Untersuchungen Online-Reaktionsverfolgung durchgeführt wurden, und der Aufbau des parallelisierten Geräts (Biospec-Modul, Carl Zeiss, Jena) ist in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

6.1.8. Arbeitshilfe zur Synthese in Kapillaren

Um die Handhabung der mitunter leicht zerbrechlichen Kapillaren zu vereinfachen, wurde der in Abb. 6.3 gezeigte Kapillarhalter konstruiert. In dieser Anordnung werden bis zu 15 Kapillaren in einem Aluminiumrahmen fixiert. Die Zuleitung der Reagenzien und die Absaugung am Ende eines Syntheseschritts erfolgt über Teflonschläuche, die während der gesamten mehrstufigen Synthese auf die Kapillare aufgeschmolzen bleiben. Die Dosierung

der vorgelösten Reagenzien ist in einfacher Weise durch „Andocken“ mit einer Eppendorfpipette möglich.

Als Unterlage des Rahmens dient ein Aluminiumblock, der gleichzeitig als Heizblock verwendet werden kann. Zur gleichmäßigen Thermostatisierung der Kapillaren und als Lichtschutz bei Verwendung photolabiler Linker wird ein Deckel aus Aluminium verwendet.

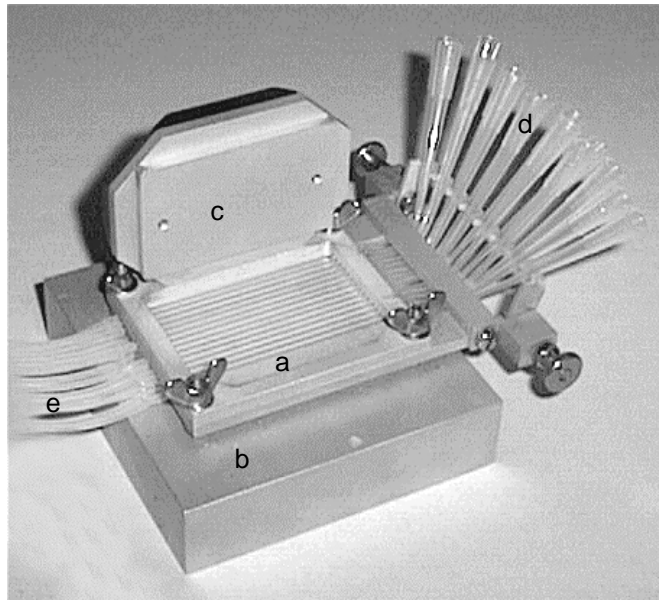


Abb. 6.3: Aufbau des Kapillarreaktorsystems^{*}: Rahmen zur Kapillar-Fixierung (a), Heizblock (b), Abdeckung (c), Reagenzienzuleitung (d), Leitungen zur Absaugung (e).

Es wurden beidseitig offene Schmelzpunktkapillaren (1 mm Innendurchmesser, 8 cm Länge) als Trägermaterial für Synthesen verwendet.

6.1.9. Puffer- und Nährlösungen

- PBS: 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 und 1,26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ werden in bidest. H_2O (1 l) gelöst. Der pH-Wert von 7,4 wird mit 0,1 N HCl eingestellt.
- Nährlösungen für die Fermentation: Die Fermentationsmedien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wohlleben, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.
Vorkultur: 1,5 g Glucose; 1,5 g Sojamehl; 0,5 g Cornsteep flüssig; 0,2 g CaCO_3 ; 0,5 g NaCl; 1 l H_2O . Hauptkultur: 20,0 g Glycerin (99 %); 5,0 g Glucose; 10 g Sojapepton; 3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g CaCO_3 ; 1 l H_2O . Beide Lösungen hatten einen pH-Wert von 7.

^{*} Für die Anfertigung des Kapillarhalters danke ich Herrn Eberhard Braun, Mechanik-Werkstatt, Chemisches Institut, Universität Tübingen.

6.1.10. Bakterienstämme

Amycolatopsis orientalis (zur Produktion von Vancomycin) und *Amycolatopsis mediterranei* (zur Produktion von Balhimycin) und *Amycolatopsis pseudonorcardiaciae* (Nullmutant, produziert nur Teile des Peptidrückgrats) wurden von der Arbeitsgruppe Wohlleben, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

6.1.11. Fermentationsprozeß

Die Fermentation wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen, der mit einem luftdurchlässigen Gummistopfen verschlossen wurde, durchgeführt. Zur Züchtung der Vorkultur wurden die Bakterien auf eine Agarplatte gestrichen und bei 27 °C zwei Tage gelagert. Aus dem entstandenen Bakterienrasen wurde ein ca. 1 cm² großes Stück herausgeschnitten und in 200 ml Vorkulturlösung suspendiert. Die Vorkultur wurde 2 Tage bei 27 °C geschüttelt und anschließend mikroskopisch auf Kontamination durch fremde Mikroorganismen untersucht. Zur Fermentierung wurden 200 ml der Hauptkultur-Nährlösung mit 10 ml der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 27 °C mehrere Tage geschüttelt.

In regelmäßigen Abständen wurden jeweils 5 ml Lösung aus dem Fermenter entnommen und zur Abtrennung fester Bestandteile 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Zentrifugate wurden bei -18 °C gelagert.

6.1.12. Kaiser-Test

Zur Prüfung der vollständigen Kupplung von Fmoc-Aminosäuren bei der Peptidsynthese wurde der Ninhydrintest für primäre Aminofunktionen eingesetzt [kai 70]. Das Syntheseharz wurde mit einigen Tropfen eines Gemisches aus KCN/Wasser/Pyridin (33 mg/50 ml/98 ml), Ninhydrin/n-Butanol (500 mg/10 ml) und Phenol/n-Butanol (80 g/20 ml) ca. 5 min bei 110 °C erhitzt. Bei braunem Harz und gelber Lösung beträgt die Kupplungsausbeute 100 %, bei (hell -) blauem Harz und blaugrüner bis hellblauer Lösung ca. 95 % und bei dunkelblauem Harz und blauer bis dunkelblauer Lösung maximal 85 %, wobei die Färbung auch von der am Harz aufgebauten Verbindung und der N-terminalen Aminosäure abhängt.

6.1.13. Automatische Peptidsequenzierung

Automatische Sequenzierung von Peptiden, die auf planaren Glasträgern synthetisiert wurden, erfolgte mittels Edman-Abbau mit einem „pulsed liquid phase“ Proteinsequencer Model 477 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) unter Verknüpfung mit dem PTH-Analyser Model

120 A. Die Bestimmung der abgebauten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgte über RP-HPLC (PTH-C₁₈, 220 × 2.1 mm).

6.1.14. Automatisierte Synthese von Peptiden

Die automatisierte Synthese von Peptiden wurde an einem Peptidsynthesizer (SMPS 350, Zinsser Analytic, Frankfurt; Software Syro von MultiSynTech, Bochum) durchgeführt. Als Syntheseflächen wurden Einwegspritzen mit Filterfritten eingesetzt, die in zwei Syntheseblöcken mit Vakuum- und Absaugvorrichtungen angeordnet werden, so daß parallel bis zu 2 × 48 verschiedene Peptide synthetisiert werden können.

6.1.15. Bestimmung der Beladung von Polymerharzen, Kieselgel und CPG

Zur Bestimmung der Belegung von Harzen [cla 98], Kieselgel und CPG mit Fmoc-Aminosäuren wird trockenes Trägermaterial (ca. 10-20 mg) in einem 10 ml Meßkolben mit DMF (500 µl) und Piperidin (500 µl) versetzt. Nach 1 h wurde mit DMF auf 10 ml aufgefüllt. Zur Hintergrund-Korrektur wird der gleiche Ansatz ohne Harz durchgeführt. Im UV-Spektrum dieser Lösung liegen zwischen 250 nm und 320 nm drei Maxima des N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidinadduktes mit den Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{267} = 17500 \text{ cm}^2/\text{mol}$, $\epsilon_{289} = 5800 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und $\epsilon_{301} = 7800 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Die Harzbelegung x [mmol/g] ergibt sich nach der Formel

$$x = 100\,000 \times E / (\epsilon \times \text{Einwaage Harz (mg)})$$

bei Verwendung von 1mm-Küvetten als Mittelwert der drei Maxima.

6.2. Modifizierung von SiO₂-Oberflächen

6.2.1. Beschichtung von CPG, Glasplättchen und Kapillaren

In dieser Arbeit wurde CPG mit Diaminopropan und (O,O'-Bis-(2-aminopropyl)-polyethylenglykol 500) (Jeffamine ED 600) beschichtet. Die Glasplättchen wurden mit Diaminopropan modifiziert und die Kapillaren wurden mit Jeffamine ED 600 beschichtet. Die Arbeitsschritte werden im folgenden gemeinsam beschrieben.

6.2.1.1. Silanisierung

Reinigung und Aktivierung der Oberfläche:

Alle Trägermaterialien werden 3 h mit soviel NaOH (1 M) behandelt, daß sie vollständig bedeckt sind. Anschließend wird mit bidest. Wasser gewaschen. Danach werden die

Glasträger ½ h in H₂SO₄/H₂O₂ (3:2, v/v) eingelegt und wieder mit bidest. Wasser gewaschen. CPG und Kapillaren wurden am Vakuum, die Glasplättchen im Stickstoffstrom getrocknet.

Umsetzung mit GOPTS:

CPG wird 3 h mit einer GOPTS-Lösung (50 % in Toluol) geschüttelt. Anschließend wird abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das CPG wird ohne Trocknung weiterverarbeitet.

Kapillaren und Glasplättchen werden 3 h mit GOPTS gefüllt bzw. bedeckt. Nach Waschen mit Aceton (H₂O-Gehalt < 0,1 %) wird kurz am Vakuum bzw. im Stickstoffstrom getrocknet. Um eine Hydrolyse der Epoxygruppen zu vermeiden werden die Oberflächen rasch weiterverarbeitet.

6.2.1.2. Umsetzung mit Jeffamine ED 600 bzw. Diaminopropan

Zur Beschichtung mit Diaminopropan wird das GOPTS-modifizierte CPG 2 h mit reinem Diaminopropan bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit THF, MeOH, DCM und Ether gewaschen und am Vakuum getrocknet. Entsprechend wird zur Beschichtung von Glasplättchen vorgegangen. Die Trocknung erfolgt im Stickstoffstrom.

Für die Beschichtung mit Jeffamine ED 600 wird das CPG mit einer Lösung des Amins (50 % in Toluol) 15 h auf 80 °C erhitzt. Danach wird mit Toluol, MeOH, DCM und Ether gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Zur Beschichtung von Kapillaren mit Jeffamine ED 600 werden diese mit dem Diamin gefüllt und 15 h auf 80 °C erhitzt. Anschließend wird mit Toluol, MeOH, DCM und Ether gewaschen und am Vakuum getrocknet

6.2.1.3. Anbindung des Rink-Amid-Linkers an CPG

Aminomodifiziertes CPG wird mit einer Lösung von p-[(R,S)- α -[1-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure (0.2 M in DMF), HOBt (0.2 M in DMF) und DIC (0.2 M in DMF) 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Waschen mit DMF (3 x), MeOH (3 x) und DCM (3 x) wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin (20 % in DMF, 2 x 10 min) abgespalten. Anschließend wird mit DMF (mindestens 10 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen und am Vakuum getrocknet.

6.2.1.4. Anbindung eines photolabilen Linkers an Kapillaren

Aminomodifizierte Kapillaren werden mit einer Lösung von 4-[4(1-(Fmoc-amino)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy]-buttersäure (0.2 M in DMF), HOBt (0.2 M in DMF) und DIC (0.2 M in DMF) befüllt und 16 h bei Raumtemperatur im Dunklen gelagert. Nach Waschen mit DMF (3 x), MeOH (3 x) und DCM (3 x) wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin

(20 % in DMF, 2 x 10 min) abgespalten. Anschließend wird mit DMF (mindestens 10 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen und am Vakuum getrocknet.

6.2.2. Modifizierung von Silizium-Kristallen

6.2.2.1. Silanisierung

Reinigung und Aktivierung der Oberfläche:

Der Kristall wird zunächst in salzsaurer H₂O₂-Lösung [H₂O₂ (30 %) / konz. HCl / Wasser (1:1:6, v/v/v)] für 10 min auf 80 °C erhitzt. Nach Waschen mit bidest. Wasser wird der Kristall weitere 10 min bei 80 °C in H₂O₂ (30 %) / NH₃ (25 %) / Wasser (1:1:5, v/v/v) geheizt. Anschließend wird erneut mit bidest. Wasser gewaschen. Zuletzt wird der Kristall mit H₂SO₄/H₂O₂ (3:2, v/v) 12 h behandelt, mit bidest. Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Umsetzung mit GOPTS:

Zur Silanisierung wird der Kristall 3 h in GOPTS bei Raumtemperatur eingelegt. Anschließend wird die Oberfläche mit Aceton abgespült, im Stickstoffstrom getrocknet und rasch weiterverarbeitet, um eine Hydrolyse der Epoxy-Gruppen zu vermeiden.

Umsetzung mit Aminopropyltriethoxysilan:

Der aktivierte Si-Kristall wird 6 h mit Aminopropyltriethoxysilan (50 % in Toluol) bei Raumtemperatur behandelt, danach mit Toluol und Aceton gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.2.2.2. Beschichtung mit Peptiden

Um möglichst wenig der Peptide zu verbrauchen, werden die aktivierten Si-Kristalle auf beiden Seiten mit jeweils 20 µl der Reaktionslösungen betropft. Zur gleichmäßigen Verteilung der Reaktionslösung und zur Verminderung des Abdampfens des Lösungsmittels werden die Kristalle während der Reaktionszeit sandwichartig zwischen zwei Objektträgern gelagert. Zur Schutzgruppenabspaltung werden die Kristalle in die Abspalllösung eingelegt.

Zur Kupplung des Arginin-Spacer-Konjugats (vgl. Abschnitt 6.3.8) wird eine Lösung des Arginin-Derivats und DIEA (je 0,3 M in DMF) auf einen GOPTS-modifizierten Kristall getropft und 36 h bei Raumtemperatur gelassen. Durch die lange Reaktionszeit soll eine möglichst hohe Oberflächenbeladung erreicht werden. Der Kristall wird anschließend mit DMF, MeOH und DCM gewaschen. Die Pmc-Gruppe wird während 1 h mit TFA (50 % in DCM) abgespalten. Nach Waschen mit DCM wird der Kristall im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Beschichtung von Aminopropyl-aktivierten Si-Kristallen mit den geschützten Peptiden D-Ala-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ahx und Ser(tBu)-Asp(OtBu)-D-Ala-Ahx werden die Kristalle jeweils mit einer Lösung des Peptids (18,5 mg, 0,025 mmol), sowie TBTU (8 mg, 0,025 mmol), HOBt (3,8 mg, 0,025 mmol) und DIEA (8,6 μ l, 0,05 mmol) in DMF (50 μ l) behandelt. Nach einer Reaktionszeit von 36 h wird mehrmals mit DMF gewaschen. Anschließend wird die Fmoc-Gruppe mit Piperidin (20 % in DMF) bei einer Reaktionszeit von 45 min abgespalten. Zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen werden die Kristalle mit TFA/Wasser/TIS (500 μ l) (95:2.5:2.5) 3 h behandelt. Nach Abspülen der Abspatlösung mit DCM werden die Kristalle im Stickstoffstrom getrocknet.

6.2.3. Beschichtung von Kieselgel mit Cyclopeptiden

6.2.3.1. Silanisierung

Reinigung und Aktivierung der Oberfläche:

2 g Kieselgel (Nucleosil 300 Si, 5 Å, Oberfläche 100 m²/g) werden in Salzsäure (0,05 M, 10 ml) 75 min geschüttelt: Anschließend wird abfiltriert und mit Wasser und Aceton gewaschen. Restliches Wasser wird durch eine azeotrope Destillation mit Toluol entfernt. Das aktivierte Kieselgel wird unter Stickstoff gelagert.

Umsetzung mit Aminopropyltriethoxysilan:

2 g aktiviertes Kieselgel (Dichte an Silanolgruppen ca. 0,5 mmol/g) werden in Toluol (8 ml) mit Aminopropyltriethoxysilan (124 μ l; 0,7 mmol) und Pyridin (113 μ l; 1,4 mmol) 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird abfiltriert, mit Toluol (4 x 8 ml) und DCM (4 x 8 ml) gewaschen und am Vakuum getrocknet.

6.2.3.2. Cyclopeptid-Anbindung

Zur Berechnung der Cyclopeptid-Stoffmengen wird von vollständig trifluoracetylierten Lysinseitenketten ausgegangen.

Aminopropyl-modifiziertes Kieselgel (500 mg) (Beladung: 0,14 mmol/g) wird mit einer Lösung von 10 eq. Chlorameisensäure-p-nitrophenylester (141 mg; 0,7 mmol) und 15 eq. DIEA (179,5 μ l; 1,0 mmol) in DCM (2,5 ml) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Kieselgel abfiltriert, mehrmals mit DCM gewaschen und am Vakuum getrocknet. Jeweils 50 mg des Kieselgels werden anschließend mit unterschiedlichen Mengen (vgl. Tab. 6.3) der Cyclopeptide **8** und **9** (vgl. Abb. 5.2.1) und DIEA (5 μ l, 0,03 mmol) in DMF (250 μ l) 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Absättigung nicht umgesetzter p-

Nitrophenylester wird anschließend Isopropylamin (1 M in DMF; 100 μ l) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das belegte Kieselgel wird abfiltriert, mit DMF, MeOH, und DCM gewaschen und am Vakuum getrocknet.

Tab. 6.3: Ansatzgrößen für die Cyclopeptide **8** und **9** in je 3 unterschiedlichen Oberflächenbeladungen.

| Cyclopeptid | Einwaage Kieselgel | Einwaage Cyclopeptid | Theor. Belegung [mmol/g] |
|-------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| 8 | 50 mg | 2,9 mg | 0,39 |
| 8 | 50 mg | 0,3 mg | 0,041 |
| 8 | 42 mg | 50 μ g | 0,008 |
| 9 | 50 mg | 3,0 mg | 0,49 |
| 9 | 50 mg | 0,3 mg | 0,049 |
| 9 | 50 mg | 60 μ g | 0,010 |

6.3. Festphasensynthesen

6.3.1. Belegung von 2-Chlortritylchlorid-Harz mit Aminosäuren

2-Chlortritylchlorid-Harz [bar 91] wird mit trockenem DCM (3 \times) gewaschen und, bezogen auf die Stoffmenge an aktiven Gruppen auf dem Harz, mit 3 eq. Fmoc-Aminosäure, 6 eq. DIEA und soviel DCM versetzt, daß sich der Ansatz gut schütteln läßt. Nach 2 h Kupplungsdauer wird abfiltriert, dreimal mit DCM gewaschen und nicht umgesetzte reaktive Gruppen durch Schütteln mit 10 eq. Methanol und 10 eq. DIEA in DCM abgesättigt. Nach Abfiltrieren wird jeweils dreimal mit DCM, MeOH und Et₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.3.2. Automatisierte parallele Peptidsynthese

Zur Synthese von Peptiden mit C-terminaler Carboxygruppe (Peptidsäuren) wurde 2-Chlortritylchlorid-Harz verwendet, das mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure beladen war (Beladung 0.5-1.0 mmol/g). Das Peptid kann damit wahlweise vollgeschützt abgespalten werden. C-terminale Peptidamide wurden auf Rink-Amid AM-PS-Harz synthetisiert, das die Kupplung der ersten Aminosäure im ersten Standardzyklus erlaubt.

Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren an das Harz erfolgt in 10-fachem Überschuß mit DIC/HOBt-Aktivierung. Die Zugabe des DIC erfolgt dabei in drei Portionen, um durch diese mehrfachen Dispense-Schritte eine optimale Durchmischung des polymeren Trägers zu erreichen. Die Syntheseyklen sind Tab. 6.4 zu entnehmen.

Nach der ersten Kupplungsphase (50 min) wird DCM (75 % in DMF) zugesetzt, um so durch eine veränderte „Lösungsmittelumgebung“ eine Konformationsänderung des Peptidharzes in Lösung zu erzielen, wodurch vorher sterisch nicht zugängliche Kupplungsstellen der aktivierten Aminosäure teilweise zugänglich gemacht werden und damit die Kupplungsausbeute erhöht wird. Die gesamten Kupplungszeiten betragen 70 min. Zur Fmoc-Abspaltung wird Piperidin (20 % in DMF) zum gequollenen Harz pipettiert. Das Waschen der Peptidpolymere erfolgt durch wiederholte Zugabe von DMF. Zwischen DMF-Zugabe und Absaugen ist eine einminütige Absetzzeit programmiert. Das Quellen des Harzes findet nur im ersten Kupplungszyklus statt.

Tab. 6.4: Standard-Synthesesyklus für Peptide am Multiplen Synthesautomaten. Die angegebenen Mengen entsprechen 10 eq. bezogen auf 20 mg Harz (0.015 mol).

| Operation | Reagenz | Volumen [μ l] | Zeit [min] |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------|--------------|
| Quellen | DMF | 500 | 10 |
| Deblockierung | 20 % Piperidin/DMF | je 400 | 15 + 10 |
| Waschen | DMF | 600 | 6 \times 1 |
| Kupplung | 0.5 M Fmoc-Aminosäure/ HOBt in DMF | 350 | 50 |
| | 1.0 M DIC/DMF | 250 | |
| Kupplungszusatz | DCM in DMF (3:1) | 100 | 20 |
| Waschen | DMF | 600 | 6 \times 1 |

6.3.3. Abspaltung und Aufarbeitung

Alle Angaben beziehen sich auf eine Ansatzgröße von 20 mg vorbelegten Harzes (0,015 mmol).

Bei Peptiden, die vollständig entschützt werden sollen, erfolgt die Abspaltung mit TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5 v/v) (1 ml). Nach 3 h wird die Abspatlösung abfiltriert und zur Fällung der Peptide mit eiskaltem Diethylether (6 ml) versetzt. Die Fällung wird während 3 h bei -20 °C vervollständigt. Nach Zentrifugation der verschlossenen Gefäße werden die Überstände dekantiert, die Peptidrückstände erneut mit Diethylether versetzt und mittels Vortexer dispergiert. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Die ausgefällten Peptide werden in tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

Wenn keine Schutzgruppen zu entfernen sind, wird 1 h mit TFA (25 % in DCM, 1,0 ml) abgespalten. Anschließend wird zur Trockne eingeeengt und aus tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) lyophilisiert.

Vollgeschützte Peptide werden vom 2-Chlortritylchlorid-Harz durch Zugabe von Hexafluorisopropylalkohol (30 % in DCM; 1,0 ml) abgespalten. Nach 1 h wird die Abspaltung abfiltriert, am Vakuum zur Trockne eingengt und in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

6.3.4. Zyklisierung der seitenkettengeschützten Peptide in Lösung

Für die Kopf-Schwanz-Zyklisierung wird eine 1 mM Lösung des seitenkettengeschützten Peptids in DMF hergestellt, auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit einer Lösung von 3 eq. TBTU, 3 eq. HOBt und 6 eq. DIEA in DMF versetzt. Es wird 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in DCM (ca. 1 ml / μmol Peptid) gelöst und jeweils dreimal mit der gleichen Menge NaHCO_3 (5 %), Wasser, KHSO_4 (5 %) und Wasser gewaschen. Das DCM wird am Vakuum entfernt und der Rückstand aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) lyophilisiert.

6.3.5. Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Die nach der in Abschnitt 6.3.4 beschriebenen Aufarbeitung erhaltenen geschützten Peptide werden zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA/Wasser/TIS (500 μl) (95:2.5:2.5) 3 h behandelt. Anschließend wird die Abspaltung zur Fällung der Peptide mit eiskaltem Diethylether (6 ml) versetzt. Nach 3 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden die Cyclopeptide abzentrifugiert, die Etherrückstände dekantiert, die Niederschläge mit eiskaltem Diethylether (5 ml) versetzt und im Ultraschallbad behandelt. Diese Waschschrte werden noch zweimal wiederholt. Die ausgefällten Peptide werden in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

6.3.6. Manuelle Synthese der Tri- und Tetrapeptide für die Anbindung auf Oberflächen

Als polymerer Träger wird mit der ersten Aminosäure vorbelegtes 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz verwendet (vgl. Abschnitt 6.3.1). Die Synthese wird gemäß den Standardverfahren der manuellen Peptidsynthese durchgeführt [ath 89]. N-Acetylierungen werden durch Umsetzung der entschützten Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid und DIEA (jeweils 10 % v/v in DMF) für 2 h bei Raumtemperatur erhalten.

Die Abspaltung seitenkettengeschützter Peptide vom polymeren Träger erfolgt mit HFIP (30 % in DCM). Vollständig entschützte Peptide werden mit TFA (50% in DCM) abgespalten. In beiden Fällen wird das Lösungsmittel am Vakuum entfernt, und das Peptid anschließend aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) lyophilisiert.

6.3.7. Synthese von cyclo[Lys-Dpr(Pyr)-Lys-Ala-Lys-Asn]

Fmoc-geschütztes Rink-Amid AM-PS-Harz (250 mg; Beladung 0,61 mmol/g; 0,15 mmol) wird 2 x 30 min mit Piperidin (20 % in DMF) entschützt und anschließend mit DMF (mindestens 10 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen. Das entschützte Harz wird mit einer Lösung von Fmoc-Asp-OAll (0,4 eq.; 23,8 mg; 0,06 mmol) und HOBt (0,4 eq.; 9,2 mg; 0,06 mmol) in DMF (2 ml) versetzt. Anschließend wird DIC (0,4 eq.; 9,3 µl; 0,06 mmol) zugegeben. Nach 5 h Kupplungsdauer wird abfiltriert und mit DMF (3 x) und DCM (3 x) gewaschen. Zum Absättigen nicht umgesetzter reaktiver Gruppen wird eine Lösung von Essigsäureanhydrid (10 % in DMF) und DIEA (5 % in DMF) (1,5 ml/100 mg Harz) zugegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert, das Harz mit DMF (6 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen und am Vakuum getrocknet. Entsprechend der in Abschnitt 6.3.2 beschriebenen Methode wird das lineare Peptid am Peptidsynthesizer aufgebaut. Zur katalytischen Abspaltung der Allylesterschutzgruppe wird dem Harz unter Inertgasatmosphäre eine Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium (76 mg, 0,07 mmol) in CHCl₃/HOAc/NMM (1,5 ml, 37:2:1 (v/v/v)) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz mit CHCl₃/HOAc/NMM (37:2:1 (v/v/v)) (5 x), DIEA (20 ml, 0,5 % in DMF), DMF (5 x), MeOH (5 x), DCM (5 x) und Et₂O gewaschen. Zur anschließenden Kopf-Schwanz-Zyklisierung wird das Harz mit einer Lösung von TBTU (57,8 mg, 0,18 mmol), HOBt (27,5 mg, 0,18 mmol) und DIEA (61,5 µl, 0,36 mmol) in DMF (1,5 ml) versetzt und 3 h geschüttelt. Der vollständige Umsatz wird mittels Kaisertest überprüft. Gegebenenfalls wird der Reaktionsschritt wiederholt. Die Abspaltung der Dde-Gruppe erfolgt mit Hydrazin (2 % in DMF, 2 x 15 min, je 2 ml). Nach Waschen mit DMF (3 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und DMF (3 x) wird das Harz mit einer Lösung von 1-Pyren-carbonsäure (44,3 mg, 0,18 mmol), und HOBt (27,5 mg, 0,18 mmol) in DMF (1,5 ml) versetzt. Nach Zugabe von DIC (27,8 µl, 0,18 mmol) wird 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit DMF (3 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgt mit TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5 v/v/v). Nach 1 h wird die Abspalllösung abfiltriert und nach der in 6.3.3 beschriebenen Methode in Ether gefällt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC gereinigt. ES-FT-ICR-MS: [M+2H]²⁺ = 443,3; HPLC-Reinheit = 75 % (RP18, ACN/H₂O, λ = 214 nm).

6.3.8. Synthese des Arginin-Polyethylenglycol-Konjugats

2-Chlor-Tritylchlorid-Harz (25 mg, Beladung 1,3 mmol/g, 0,0325 mmol) wird mit trockenem DCM (3x) gewaschen. Das gequollene Harz wird mit Diaminopropan (6 μ l, 2 eq., 0,07 mmol) in DCM (400 μ l) 2 h geschüttelt. Zur Absättigung nicht umgesetzter reaktiver Gruppen wird Methanol (100 μ l) zugegeben und für weitere 30 min geschüttelt. Anschließend wird das Harz mehrmals mit DCM und DMF gewaschen. Danach wird mit α -(N-Fmoc- β -aminopropionyl)- ω -(carboxymethylcarbamoyl)-tetra(oxyethylen) (Fmoc-Atg-OH) (2 eq., 38 mg, 0,065 mmol), HOBt (2 eq., 9,9 mg, 0,065 mmol) und DIC (2 eq., 10 μ l, 0,065 mmol) in DMF (400 μ l) während 15 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Harz wird mehrmals mit DMF, MeOH und DCM gewaschen. Nach Fmoc-Abspaltung nach Standardmethoden wird die freie Aminogruppe durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid (5 eq., 16,3 mg, 0,163 mmol) und DIEA (5 eq., 28 μ l, 0,163 mmol) in DCM (400 μ l) während 15 h umfunktionalisiert. Das Harz wird mehrmals mit DMF, MeOH und DCM gewaschen. Zur Aktivierung der harzgebundenen freien Carboxy-Gruppe wird das Harz mit Pentafluorphenol (10 eq., 60 mg, 0,33 mmol) und DIC (10 eq., 50,2 μ l, 0,33 mmol) in DMF (500 μ l) und einer katalytischen Menge Dimethylaminopyridin 15 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mehrmals mit DMF, MeOH, und DCM gewaschen. Die Anbindung von Arginin erfolgt durch Schütteln des Harzes mit H-Arg(Pmc)-OH (5 eq., 71,7 mg, 0,163 mmol) und DIEA (5 eq., 28 μ l, 0,163 mmol) in DMF (500 μ l) für 20 h bei Raumtemperatur. Die Abspaltung vom polymeren Träger und die Aufarbeitung erfolgen nach der in Abschnitt 6.3.3 beschriebenen Methode für geschützte Peptide.

ES-MS: $[M+H]^+ = 945,3$; HPLC-Reinheit = 82 % (RP18, ACN/H₂O, $\lambda = 214$ nm).

6.3.9. Synthese von Peptiden auf CPG, Glasplättchen und RfS-Transducern

Die Peptidsynthese auf glasartigen Trägermaterialien erfolgt nach den beschriebenen Standardmethoden. Zur Synthese auf CPG kann der automatische Peptidsynthesizer verwendet werden. Synthesen auf Glasplättchen und Transducer-Chips werden manuell durchgeführt. Die Konzentrationen der Reaktionslösungen können von 0,1 bis 0,3 mol/l variieren, Reaktionszeiten betragen mindestens 1 h. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wird ebenfalls nach den beschriebenen Standard-Methoden durchgeführt.

6.3.10. Synthese substituierter 1,3,5-Triazine

6.3.10.1. Polymerharzgebundene Synthesen

Synthese von 4-Chlor-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäure bzw. von 6-(Adamantylmethylamino)-4-chlor-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)hexansäure am 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz (Beladung 1,8 mmol/g):

Mit Fmoc-Aminohexansäure vorbelegtes und entschütztes 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz (20 mg; Beladung 1,0 mmol/g; 0,02 mmol) (vgl. Abschnitt 6.3.1) wird auf 0 °C gekühlt und mit einer Lösung von Cyanurchlorid (18,3 mg; 0,1 mmol) in DCM (400 µl) versetzt. Anschließend wird über einen Zeitraum von 15 min portionsweise DIEA (17,1 µl; 0,1 mmol) in DCM (100 µl) zugegeben. Das Harz wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt (Reaktionskontrolle mittels Kaisertest) und dann mit DCM (5 x) gewaschen. Zur Substitution des 2. Chloratoms wird das Harz mit einer Lösung von Isopropylamin (8,6 µl; 0,1 mmol) oder Adamantylmethylamin (16,5 mg; 0,1 mmol) in DMF (500 µl) versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit DMF (5 x), MeOH (3 x) und DCM (2 x) gewaschen. Die Abspaltung vom Polymeren Träger erfolgt bei Raumtemperatur mit TFA (20 % in DCM, 1 ml). Nach 30 min wird die Lösung abfiltriert, das Harz mit DCM (500 µl) gewaschen und die vereinigten organischen Filtrate werden am Vakuum zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) (2ml) gefriergetrocknet und anschließend mit ES-MS und HPLC analysiert. Isopropylamino-Derivat: ES-MS: $[M+H]^+ = 302$. Adamantylmethylamino-Derivat: ES-MS: $[M+H]^+ = 408$.

Die Synthese der entsprechenden Säureamide erfolgt an Rinkamid-AM-PS-Harz (Beladung 0,61 mmol/g):

Fmoc-geschütztes Rink-Amid AM-PS-Harz (33 mg; Beladung 0,61 mmol/g; 0,02 mmol) wird 2 x 30 min mit Piperidin (20 % in DMF) entschützt und anschließend mit DMF (mindestens 10 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen. Das entschützte Harz wird mit einer Lösung von Fmoc-Aminohexansäure (3 eq.; 21,1 mg; 0,06 mmol) und HOBt (3 eq.; 9,2 mg; 0,06 mmol) in DMF (500 µl) versetzt. Anschließend wird DIC (3 eq.; 9,3 µl; 0,06 mmol) zugegeben. Nach 5 h Kupplungsdauer wird abfiltriert und mit DMF (3 x) und DCM (3 x) gewaschen. Zum Absättigen nicht umgesetzter reaktiver Gruppen wird eine Lösung von Essigsäureanhydrid (10 % in DMF) und DIEA (5 % in DMF) (1,5 ml /100 mg Harz) zugegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF (6 x), MeOH (3 x) und DCM (3 x) gewaschen. Die weiteren Reaktionsschritte entsprechen der für Trityl-Chlorid-Harz beschriebenen Vorgehensweise.

Isopropylamino-Derivat: ES-MS: $[M+H]^+ = 301$. Adamantylmethylamino-Derivat: ES-MS: $[M+H]^+ = 407$.

6.3.10.2. Synthese einer Triazin-Bibliothek in einer RfS-Mikrotiterplatte

Die Wells einer Diamino-PEG-beschichteten Mikrotiterplatte werden mit 100 μ l einer Lösung von HOBt (0,2 M in DMF), DIC (0,2 M in DMF) und einer der folgenden Aminosäuren (0,2 M in DMF) versetzt: Fmoc- ϵ -Aminohexansäure, Fmoc-Phenylalanin, Fmoc-Glutaminsäure-tert.-butylester. Die befüllte Mikrotiterplatte wird abgedeckt und 16 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden die Wells mit DMF im Durchfluß gewaschen. Zur Fmoc-Abspaltung wird jedes Well mit 200 μ l Piperidin (20 % in DMF) versetzt. Nach 20 min wird die Lösung abgesaugt und mit DMF, MeOH und DCM im Durchfluß gewaschen. Anschließend werden alle Wells mit 200 μ l einer Lösung von Cyanurchlorid (0,1 M in DCM) und DIEA (0,1 M in DMF) versetzt, zugedeckt und 2 h stehen gelassen. Nach 1 h werden die Wells mit weiteren 100 μ l DCM versetzt, um verdampftes DCM zu ersetzen. Nach Ende der Reaktion wird abgesaugt und mit DCM gründlich im Durchfluß gewaschen. Zur Substitution des 2. Chloratoms werden die Wells mit einem der folgenden Amine (je 0,2 M in DMF) versetzt: N-Hexylmethylamin, Pentylamin, 1-Phenylethylamin, Adamantylmethylamin, Isopropylamin, Trimethoxybenzylamin, Ethylamin x HCl und 2-(2-Aminoethyl)pyridin, Tryptamin, p-Anisidin, 2-Aminopyrimidin und Phenylalaninmethylester. Nach 2,5 h wird die Reaktionslösung abgesaugt, und die Mikrotiterplatte mit DMF, MeOH und DCM im Durchfluß gewaschen.

6.3.10.3. Synthese auf modifizierten SiO₂-Oberflächen

Triazinsynthesen erfolgen an unterschiedlichen Trägermaterialien: CPG mit Rink-Amid-Linker (Abschnitt 6.2.1.3), Kapillaren mit einem Photolinker (Abschnitt 6.2.1.4) und RfS-Transducer für die Online-Verfolgung. Prinzipiell wird nach dem in Abschnitt 6.3.10.2 beschriebenen Protokoll verfahren.

Die Abspaltung der Produkte von CPG erfolgt mit TFA (20% in DCM) nach der für Polymerharze beschriebenen Methode. Die Syntheseprodukte werden mit ES-MS und HPLC charakterisiert.

Zur Abspaltung von den mit dem Fmoc-Aminomethyl-Photolinker modifizierten Kapillaren wurden diese mit ACN befüllt und an beiden Enden dicht verschlossen. Anschließend wurde mit einer Quecksilberdampflampe 1 h belichtet. Die Abspalllösung wurde ohne weitere Aufarbeitung massenspektrometrisch vermessen.

6.3.11. Synthese von N-(N-Cyclooctyl-S- α -aspartyl)-2R,S-[N-(2-amidino)-4-

piperidyloxyethyl]-piperidin am PS-Wang-Harz und am SASRIN-Harz

Die Synthese wird bis auf die Abspaltung vom polymeren Träger auf beiden Harzen nach demselben Protokoll durchgeführt.

PS-Wang-Harz (26,6 mg; Beladung 1,13 mmol/g; 0,03 mmol) bzw. SASRIN-Harz (29,4 mg; Beladung 1,02 mmol/g; 0,03 mmol) wird in einer Lösung aus Fmoc-Asp-OAll (35,6 mg; 3 eq.; 0,09 mmol) und katalytischen Mengen DMAP (0,5-1 mg) in DMF (0,5 ml) suspendiert. Anschließend wird DIC (13,9 μ l; 3 eq.; 0,09 mmol) zugegeben und 5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird mit DMF, DCM, MeOH, Et₂O (je 3 x) gewaschen. Nach dem Waschen werden die noch freien Aminogruppen des Harzes mit Acetanhydrid gecapped (10 % Acetanhydrid, 5 % Piperidin in DMF, 2 \times 15 min) und das Harz anschließend erneut mit DMF, DCM, MeOH, Et₂O (je 3 x) gewaschen. Zur katalytischen Abspaltung der Allylester-schutzgruppe wird dem Harz unter Inertgasatmosphäre eine Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium (32,5 mg; 1 eq.; 0,03 mmol) in CHCl₃/HOAc/NMM (1,5 ml, 37:2:1 (v/v/v)) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit CHCl₃/HOAc/NMM (37:2:1 (v/v/v)) (5 x), DIEA (20 ml, 0,5 % in DMF), DMF (5 x), MeOH (5 x), DCM (5 x) und Et₂O (3 x) gewaschen. Danach wird das Harz mit einer Lösung von PyBroP (38 mg; 3 eq.; 0,09 mmol), DIEA (30,8 μ l, 6 eq.; 0,18 mmol) und 2-{2-[N-(N,N'-di-tert.-butoxycarbonylamidino)-4-piperidyloxy]ethyl}-piperidin (41,2 mg 3 eq.; 0,09 mmol) in DMF (0,5 ml) versetzt. Der Ansatz wird 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit DMF, DCM, MeOH, Et₂O (je 5 x) gewaschen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird 2 x 30 min mit Piperidin (20 % in DMF) geschüttelt und anschließend mit DMF (mindestens 10 x), MeOH (3 x), DCM (3 x) und Et₂O (3 x) gewaschen. Zur reduktiven Alkylierung wird das Harz in THF (0,5 ml) suspendiert und mit Cyclooctanon (18,9 mg; 5 eq.; 0,15 mmol), Natriumtriacetoxyborhydrid (32 mg; 5 eq.; 0,15 mmol) und konz. Essigsäure (5 μ l) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit THF, DMF, DCM, MeOH, Et₂O (je 5 x) gewaschen.

Die Abspaltung vom PS-Wang-Harz erfolgt bei Raumtemperatur mit 25 % TFA/DCM (1 ml). Nach 1 h wird die Lösung abfiltriert, das Harz mit DCM (300 μ l) versetzt, abfiltriert und die vereinigten organischen Filtrate werden am Vakuum zur Trockne eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) (2 ml) gefriergetrocknet und anschließend mit ES-MS und HPLC analysiert. HPLC-Reinheit \sim 65 % (RP-18, ACN/H₂O, λ = 214 nm); ES-MS: [M+H]⁺ = 480,4.

Die Abspaltung vom SASRIN-Harz erfolgt bei Raumtemperatur mit Hexafluorisopropylalkohol (30 % in DCM; 1,0 ml). Nach 3 h wird die Abspatlösung abfiltriert, am Vakuum zur Trockne eingeeengt und in tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. HPLC-Reinheit ~ 65 % (RP-18, ACN/H₂O, 214 nm); ES-MS: [M+H]⁺ = 680,5.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Siliziumoxid- und Glasoberflächen funktionalisiert, charakterisiert und für unterschiedliche analytische Anwendungen eingesetzt. Zur Aktivierung der Oberflächen wurden die Methoden der klassischen Silanchemie benutzt, mit denen nach Silanisierung mit mono-, di- oder trifunktionellen Silanen eine reaktive Gruppe zur anschließenden Umsetzung mit dem gewünschten Molekül auf der Oberfläche bereitgestellt wird.

Die Modifizierung von Oberflächen mit synthetischen Verbindungen erfolgt meist durch Anbindung einer im Vorfeld synthetisierten, charakterisierten und aufgereinigten Verbindung. In vielen Fällen ist der Anspruch an die chemische Reinheit der Oberflächenbeschichtung nicht so hoch, als daß dieser aufwendige Weg beschritten werden müsste. Im 3. Kapitel dieser Arbeit wurden daher die Zielverbindungen vor dem Hintergrund eines Screenings der oberflächengebundenen Verbindungen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie direkt auf der Oberfläche synthetisiert. Zusätzlich wurde der Synthesefortschritt dieser Festphasenreaktionen mit RIFS online verfolgt.

Die RIFS-Transducer wurden mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan silanisiert und anschließend mit Diamino-PEG umgesetzt, wodurch eine oberflächengebundene Aminogruppe für weitere Syntheseschritte erhalten wurde. Da die optischen Eigenschaften des Lösungsmittels, in dem die Festphasenreaktion stattfindet, einen großen Einfluß auf das RIFS-Signal haben, wurden zunächst Lösungsmittel gesucht, die sowohl für die Synthese als auch für die Meßtechnik geeignet sind. Dies sind Lösungsmittel, deren Brechungsindex sich von dem der SiO_2 -Schicht des Transducers deutlich unterscheidet, wie z. B. Dimethylformamid oder Dimethoxyethan.

Peptidsynthesen wurden in DMF durchgeführt. Eine Reaktionsverfolgung war für den kompletten Syntheseyklus mit Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe und der Seitenkettenschutzgruppen möglich. Für Aminosäuren mit geringer Molmasse, wie Fmoc-Glycin konnte jedoch nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe kein signifikanter Schichtdickenzuwachs gemessen werden. Am Beispiel einer Nonapeptidsequenz des Hämagglutinins wurde im Anschluß an die Synthese ein Bindungsassay mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt. Die Spezifität der Bindung des Antikörpers an die Peptidoberfläche wurde durch Inhibierung mit dem freien Nonapeptid bewiesen. Dies und die Tatsache, daß der Antikörper an eine Oberfläche mit einem um eine Aminosäure verkürzten Peptid nur eine sehr schwache Bindung zeigte, beweisen die erfolgreiche Synthese des Nonapeptids.

Die Synthese-Verfolgung nichtpeptidischer organischer Verbindungen wurde am Beispiel substituierter Triazine gezeigt. Auch hier wurde der Syntheseerfolg durch anschließende Bindung polyklonaler Antikörper nachgewiesen.

Eine Bibliothek aus unterschiedlich substituierten 1,3,5-Triazinen wurde auf dem Transducer einer RIfS-Mikrotiterplatte synthetisiert. Die prinzipielle Möglichkeit eines Screenings oberflächengebunder Substanzen mit RIfS wurde durch Testung dieser Bibliothek gegen polyklonale Antikörper gezeigt. Auf ein Synthese-Monitoring wurde aufgrund der derzeit noch geringeren Empfindlichkeit des parallelisierten Meßgeräts verzichtet.

Als zukünftiges Testsystem der vorgestellten Screening-Methode wurde die Lösungssynthese eines niedermolekularen Thrombininhibitors auf die feste Phase übertragen.

Zusätzlich zu den Bindungsassays mit Antikörpern wurde der Syntheseerfolg mit Referenzmethoden nachgewiesen. Da aufgrund der sehr geringen Stoffmengen auf den Transduceroberflächen eine Referenzanalytik schwierig ist, wurden sowohl peptidische Verbindungen als auch die Triazine auf vergleichbaren Oberflächen, wie *controlled pore glass*, Deckgläschen oder der Innenoberfläche von Schmelzpunktskapillaren, synthetisiert und mit konventionellen analytischen Methoden charakterisiert. Peptide wurden durch Edman-Sequenzierung der oberflächengebundenen Syntheseprodukte nachgewiesen, die Triazine nach Spaltung eines zuvor eingeführten säurelabilen bzw. photolabilen Linkers mit HPLC- und MS-Analytik.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Biosynthese der Glycopeptid-Antibiotika Vancomycin und Balhimycin mit RIfS verfolgt. Hierbei wurde die hohe Spezifität der Bindung der Antibiotika an Peptide genutzt, die C-terminal auf D-Ala-D-Ala enden, indem diese kovalent an die Transducer gebunden wurden. In Arbeiten der Projektpartner wurde gezeigt, daß mit solchen Transducern die Konzentration reiner Vancomycin-Lösungen quantitativ bestimmt werden kann. Um die Produktion des Fermentationsprozesses zu kontrollieren, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben aus dem Fermenter gezogen. Diese Proben wurden zentrifugiert, um Zellen und Zellfragmente abzutrennen und anschließend ohne weitere Aufreinigung mit RIfS vermessen zu können. Die mit RIfS erhaltenen Daten wurden durch HPLC-MS-Messungen referenziert. Mit beiden Methoden wurde der gleiche Verlauf der Produktbildung bestimmt. Eine Online-Verfolgung der Vancomycinproduktion sollte damit in zukünftigen Arbeiten mit Hilfe eines Bypasses verwirklicht werden können.

Beim letzten Teil dieser Arbeit stand die spektroskopische Charakterisierung von Oberflächenbeschichtungen im Vordergrund. Zur Untersuchung peptidisch beschichteter Oberflächen wurden die FT-ATR-IR-Spektroskopie und die Fluoreszenzspektroskopie verwendet.

Da hierfür eine hohe Reinheit der Verbindungen erforderlich war, wurden diese an Polymerharzen synthetisiert und erst nach einer Aufreinigung mit präparativer HPLC an die Oberfläche gebunden.

Über das Auftreten charakteristischer IR-Absorptionen wurde die erfolgreiche Beschichtung von Si-ATR-IR-Kristallen mit einem Konjugat aus Arginin und einem Polyethylenglycol-spacer und zwei Tripeptiden bewiesen. Die Wechselwirkungen zwischen diesen oberflächen-gebundenen Liganden und Cyclopeptiden, die als gelöste Bindungspartner eingesetzt wurden, konnten durch Veränderungen der Absorptionsbanden beider Bindungspartner bestimmt werden. Im wesentlichen waren an den intermolekularen Wechselwirkungen sowohl Amid-Bindungen als auch die geladenen Gruppen der Peptide und der Oberfläche beteiligt. Eine Abschätzung der Stabilität der Wechselwirkungen zwischen den Cyclopeptiden und den beschichteten Oberflächen konnte daraus erhalten werden. Molekulardynamiksimulationen lieferten zu den experimentell bestimmten Bindungsstabilitäten vergleichbare Resultate.

Die konformative Beweglichkeit oberflächengebundener Pyren-modifizierter Cyclohexapeptide wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Tendenz der Pyren-Label Excimere zu bilden, diente dabei als Maß für die Beweglichkeit der Peptide. Zusammen mit Ergebnissen aus zeitaufgelösten Messungen der Fluoreszenzanisotropie konnte gezeigt werden, daß sich die Beweglichkeit der Cyclopeptide bei Anbindung auf Kieselgel stark erniedrigt.

Durch die Stärke der Excimer-Fluoreszenz eines einfach Pyren-modifizierten Cyclopeptids, das in unterschiedlichen Bedeckungsgraden auf Kieselgel angebunden wurde, konnte gezeigt werden, daß bei geringen Oberflächenkonzentrationen isolierte Moleküle vorliegen, bei höheren Konzentrationen eine Inselbildung allerdings nicht ausgeschlossen werden kann.

8. Literatur

- [ada 83] S. P. Adams, K. S. Kauka, E. J. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 661-663.
- [alb 89] F. Albericio, M. Pons, E. Pedroso, E. Giralt, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 360-366.
- [arm 94a] D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J. R. Chen, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473-1475.
- [arm 94b] D. W. Armstrong, K. Rundlett, J. R. Chen, *Chirality* **1994**, *6*, 496-497.
- [ath 86] E. Atherton, L. Cameron, M. Meldal, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1986**, 1763-1765.
- [ath 89] E. Atherton, R. C. Sheppard (Hrsg.) in *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL press, Oxford, **1989**.
- [bal 96] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2435-2488.
- [bar 91] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 513-520.
- [bay 70] E. Bayer, G. Jung, I. Halasz, I. Sebastian, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *51*, 4503-4505.
- [bir 70] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, John Wiley, New York **1970**.
- [bla 98] G. Blankenstein, U.D. Larsen, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 427-438.
- [bre 93] A. Brecht, G. Gauglitz, J. Polster, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 387-392.
- [bre 98] A. Brecht, M. Rothmund, A. Schütz, U. Schobel, *BioTec* **1998**, *3*, 26-28.
- [bro 97] A. D. Brown, J. C. Danilewicz, P. V. Fish (Pfizer Limited), Patent WO 97/16444, **1997**.
- [bus 92] B. Buszewski, *Chromatographia* **1992**, *34*, 573-580.
- [bus 98] B. Buszewski, M. Jezierska, M. Welniak, D. Berek, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 267-280.
- [cam 87] L. Cameron, M. Meldal, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1987**, 270-272.
- [chi 98] M. Chiari, V. Desperati, E. Manera, R. Longhi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4967-4973.
- [chu 96] Y.-H. Chu, Y. M. Dunajewskiy, D. P. Kirby, P. Vouros, B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7827-7831.
- [cla 98] Persönliche Mitteilung, Nils Clausen.
- [cor 97] B. A. Cornell, V. Braach-Maksyvtis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, *387*, 580-583.

- [cos 91] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1967-1970.
- [deb 74] C. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7566-7568.
- [dic 94] F. L. Dickert, O. Schuster, *Chemie in unserer Zeit* **1994**, 28, 147-152.
- [ege 00] H.-J. Egelhaaf, persönliche Mitteilung.
- [egn 95] B. J. Egner, G. D. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2652-2653.
- [ehr 93] A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L. A. Carpino, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 4781-4787.
- [eic 89] J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1989**, 54, 1746-1752.
- [fal 98] M. Falorni, G. Giacomelli, L. Mameli, A. Porcheddu, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7607-7610.
- [fei 96] S. Feiertag, Dissertation, Universität Tübingen, **1996**.
- [fer 91] N. V. McFerran, B. Walker, C. D. McGurk, F. C. Scott, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 382-387.
- [fis 99] M. Fischer, CD. Tran, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2255-2261.
- [fox 91] J. E. Fox, R. Newton, C. H. Stroud, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 62-65.
- [fra 88] R. Frank, *Tetrahedron* **1988**, 44, 6031-6040.
- [fra 96] R. Frank, H. Overwin, *Methods. Mol. Biol.* **1996**, 66, 149-169.
- [frü 96] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 19-46.
- [gan 98] A. Ganesan, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2989-2992.
- [gau 93] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm, *Sens. Act. B* **1993**, 11, 21-27.
- [gui 90] G. G. Guibault, A. Suleiman, *Am. Biotech. Lab.* **1990**, 8, 28-32.
- [gus 98] G. R. Gustafson, C. M. Baldino, M-M. E. O'Donnell, A. Sheldon, R. T. Tarsa, C. J. Verni, D. L. Coffen, *Tetrahedron* **1998**, 54, 4051-4065.
- [haa 00] H.-M. Haake, Dissertation, Tübingen, **2000**.
- [haa 98] W. J. Haap, T. Walk, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3503-3505.
- [har 92] J. M. Harris (ed.), *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Plenum Press, New York, **1992**.
- [her 92] G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, San Diego, **1992**.
- [her 96] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1996**, 52, 4527-4554.
- [her 97] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1997**, 53, 5643-5678.

- [jak 92] P. Jakob, Y. J. Chabal, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 2897-2909.
- [jar 93] M. Jarman, H. M. Coley, I. R. Judson, T. J. Thornton, D. E. V. Wilman, G. Abel C. J. Ruddy, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4195-4200.
- [jun 96a] G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [jun 96b] G. Jung, H. Hofstetter, S. Feiertag, D. Stoll, O. Hofstetter, K.-H. Wiesmüller, V. Schurig, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2261-2263.
- [jun 99] G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [kai 70] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. J. Carg, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 35-38.
- [kat 94] S. A. Kates, N. A. Solé, F. Albericio, G. Barany, in: *Peptides: Design, Synthesis and Biological Activity* Chapter 4, Birkhäuser, Boston, **1994**.
- [kes 91] C. R. Kessel, S. Granick, *Langmuir* **1991**, *7*, 532-538.
- [kin 84] J. N. Kinkel, K. K. Unger, *J. Chromatogr.* **1984**, *316*, 193-200.
- [kno 98] W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 569-638.
- [kös 83] H. Köster, A. Stumpe, A. Wolter, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 747-750.
- [lam 91] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [lei 98a] D. Leipert, D. Nopper, M. Bauser, G. Gauglitz, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3503-3505.
- [lei 98b] D. Leipert, Dissertation, Universität Tübingen, **1998**.
- [lei 99] D. Leipert, F. Rathgeb, M. Herold, J. Mack, G. Gauglitz, G. Jung, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 213-221.
- [leu 98] A. Leuchtenberger, *Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie*, B. G. Teubner, Stuttgart, **1998**.
- [lie 83] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sens. Act.* **1983**, *4*, 299-304.
- [löf 90] S. Löfas, B. Johnsson, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1990**, *21*, 1526-1528.
- [luo 98] Y. Luo, X. Ouyang, R. W. Armstrong, M. M. Murphy, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8719-8722.
- [man 93] H. H. Mantsch, A. Perczel, M. Hollósi, G. D. Fasman, *Biopolymers* **1993**, *33*, 201-207.
- [maz 79] S. Mazur, P. Jayalekshmy, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, *101*, 677-682.
- [meh 99] M. Mehlmann, Diplomarbeit, Universität Tübingen **1999**.

- [mei 79] J. Meienhofer, M. Wakin, E. P. Heimer, T. S. Lambros, R. C. Makofske, C.-D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-37.
- [mel 92] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [miy 93] H. Miyake, Y. Kojima, T. Yamashita, A. Ohsuka, *Makromol. Chem.* **1993**, *194*, 1925-1933.
- [nag 94] R. Nagarajan (Hrsg.), *Glycopeptide Antibiotics*, R. Marcel Dekker inc., New-York, **1994**.
- [naw 91] J. Nawrocki, *Chromatographia* **1991**, *31*, 193-205.
- [naw 97] J. Nawrocki, *J. Chromatogr.* **1997**, *779*, 29-71.
- [nef 97] A. Nefzi, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 449-472.
- [nie 71] M. Nieto, H. R. Perkins, *J. Biochem.* **1971**, *123*, 773-787.
- [ovc 75] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177-2209.
- [par 74] W. Parr, K. Grohmann, K. Hagele, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 655-666.
- [pie 00] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, submitted for publication.
- [pie 97] J. Piehler, *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, Dissertation, Shaker-Verlag, Aachen, **1997**.
- [pir 80] W. H. Pirkle, D. W. House, J. M. Finn, *J. Chromatogr.* **1980**, *192*, 143-158.
- [piv 96] D. E. Pivonka, K. Russell, T. Gero, *Appl. Spectr.* **1996**, *50*, 1471-1487.
- [plu 90] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, Plenum Press, New York, **1990**.
- [pur 96] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 3034-3036.
- [rad 99] J. Rademann, M. Groetli, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5459-5466.
- [rag 98] B. Raguse, V. Braach-Maksvytis, B. A. Cornell, L. G. King, P. D. J. Osman, R. J. Pace, L. Wieczorek, *Langmuir* **1998**, *14*, 648-659.
- [ram 87] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [rao 99] J. Rao, L. Yan, B. Xu, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2629-2630.
- [rei 99] U. Reineke, R. Sabat, R. Misselwitz, H. Welfe, HD. Volk, J. Schneider-Mergener, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 271-275.
- [rot 97] M. Rothmund, A. Schütz, A. Brecht, G. Gauglitz, G. Berthel, D. Gräfe, *Fres. J. Anal. Chem.* **1997**, *359*, 15-22.

- [sal 97] H. Salimi-Moosavi, T. Tang, D. J. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8716-8717.
- [sch 71] L. Schäfer, S. J. Cyvin, J. Brunvoll, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 6177-6179.
- [sch 85] P. W. Schiller, T. M.-D. Nguyen, J. Miller, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *25*, 171-174.
- [sch 96] P. Schuch, A.P. Minton, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 458-460.
- [sch 96b] M. Schäfer, T. R. Schneider, G. M. Sheldrick, *Structure* **1996**, *4*, 1509-1515.
- [sha 94] D. J. O'Shannessy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, *5*, 65-71.
- [sil 91] P. Silberzan, L. Léger, D. Ausseré, J. J. Benattar, *Langmuir* **1991**, *7*, 1647-1651.
- [spi 97] U. E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, VCH-Wiley, Weinheim, **1997**.
- [sta 96] M. Stankova, M. Lebl, *Mol. Div.* **1996**, *2*, 75-80.
- [ste 92] S. Stevanovic, Dissertation, Tübingen, **1992**.
- [ste 99] M. J. Stevens, *Langmuir* **1999**, *15*, 2773-2778.
- [suc 98] I. Sucholeiki, M.R. Pavia, C.T. Kresge, S.B. McCullen, A. Malek, S. Schramm, *Mol. Div.* **1998**, *3*, 161-171.
- [sup 84] Z. Suprinowicz, R. Lodkowski, A. L. Dawidowicz, B. Buszewski, *J. Chromatogr.* **1987**, *395*, 145-151.
- [sve 98] L. A. Svensson, K.-E. Karlsson, A. Karlsson, J. Vessman, *Cirality* **1998**, *10*, 273-280.
- [tah 98] D. C. Tahmasebbi, T. Sasaki, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 728-731.
- [teg 97] W. Tegge, R. Frank, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 355-362.
- [thi 87] P. A. Thiel, T. E. Madey, *Surf. Sci. Rep.* **1987**, *7*, 211.
- [tho 96] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [til 88] N. Tillman, A. Ulman, J. S. Schildkraut, T. L. Penner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6136-6144.
- [tor 95] M. Torneiro, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5887-5888.
- [tsu 99] V. V. Tsukruk, I. Luzinov, D. Julthongpiput, *Langmuir* **1999**, *15*, 3029-3032.
- [ung 76] K. K. Unger, N. Becker, P. Roumeliotis, *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 115-127.
- [van 74] J. M. Vanderkooi, J. B. Callis, *Biochem.* **1974**, *13*, 4000-4006.
- [weh 96] T. Wehler, J. Westman, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4471-4474.
- [wei 99] T. Weiß, D. Leipert, M. Kaspar, G. Jung, W. Göpel, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 331-335.
- [wel 94] C. J. Welch, *J. Chromatogr.* **1994**, *666*, 3-26.

- [wil 84] D. H. Williams, *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 364-369.
- [win 93] F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 587-614.
- [vas 98] E. Vass, M. Kurz, R. K. Konat, M. Hollósi, *Spectrochimica Acta A* **1998**, *54*, 773-786.
- [vér 96] L. Vértesy, H.-W. Fehlhaber, H. Kogler, M. Limbert, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 115-118.
- [yan 96] B. Yan, Q. Sun, J. R. Wareing, C. F. Jewell, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8765-8770.
- [yan 99] B. Yan, H-U. Gremlich, *J. Chromatogr. B* **1999**, *725*, 91-102.
- [yao 94] R. C. Yao, L. W. Crandall in *Glycopeptide Antibiotics* (Hrsg: R. Nagajaran), R. Marcel Dekker inc., New-York, **1994**, S. 1-21.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, H. Mayer, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, D. Krug, N. Kuhn, H. Liebich, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, A. Rieker, E. Schweda, V. Schurig, F. F. Seelig, H. U. Siehl, B. Speiser, Ha. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, H.-D. Wiemhöfer, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

Lebenslauf

Rolf Tünnemann

| | |
|----------------------------|--|
| 02. Februar 1969 | geboren in Stuttgart |
| 1975-1979 | Grundschule in Gerlingen |
| 1979-1988 | Gymnasium in Gerlingen |
| Mai 1988 | Abitur |
| November 1988 – Juni 1990 | Zivildienst |
| Oktober 1990 – Januar 1997 | Chemie-Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| Oktober 1992 | Vordiplom |
| Mai 1996 | mündliche Diplomprüfung |
| Juli 1996 – Januar 1997 | Diplomarbeit mit dem Titel „Cyclopeptid-modifizierte Kapillaren und deren Einsatz in der Kapillarelektrophorese“ unter Anleitung Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen. |
| März 1997 – April 2000 | Anfertigung der Doktorarbeit „Synthese und spektroskopische Untersuchung Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen und deren Anwendung in der Sensorik“ unter Anleitung Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen. |