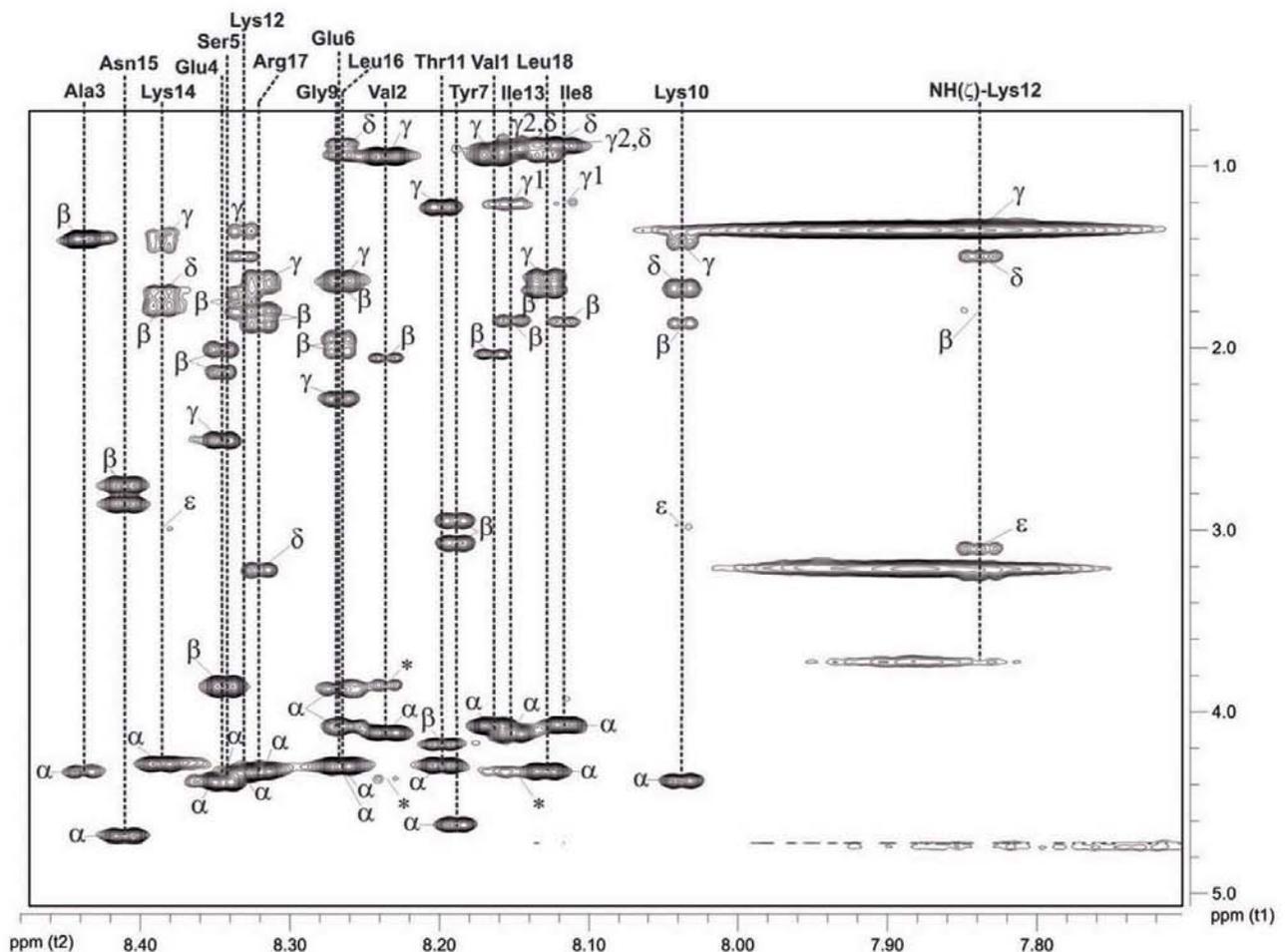


**Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-  
bindender Peptidfragmente aus dem *Xenopus*  
*laevis* double-stranded RNA-binding protein ZFa**







Entwicklung spezifischer  
Oligonukleotid-bindender  
Peptidfragmente aus dem *Xenopus*  
*laevis double-stranded*  
*RNA-binding protein ZFa*

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Universität Konstanz

Mathematisch Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Dominik Gauss

Dissertation der Universität Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2011

1. Referent: Dr. Heiko Möller

2. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jörg Hartig

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2011

Zugl.: Konstanz, Univ., Diss., 2011

978-3-86955-977-3

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2011

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-977-3

Well, a wiser fellow than myself once said, sometimes you eat the bear.  
And much obliged, sometimes the bear, well, he eats you.

The Stranger in *The Big Lebowski*



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Juni 2006 bis Dezember 2010 im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe für NMR-Spektroskopie an komplexen molekularen Systemen von Prof. Dr. Heiko Möller.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heiko Möller für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas und die intensive Betreuung bedanken. Neben der gewährten wissenschaftlichen Freiheit konnte ich immer auf seine volle Unterstützung zählen.

Herrn Prof. Dr. Valentin Wittmann danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und seine stets offene Tür bei Fragen und Belangen aller Art.

Der Arbeitsgruppe Möller möchte für die schöne Zeit in- und außerhalb des Labors danken. Im speziellen danke ich meinem Laborkollegen Andreas Prestel für die sehr angenehme gemeinsame Zeit im Labor sowie für seine Arbeiten auf dem Photolinker-Projekt, Zarko Kulic dafür, dass er mich in die Welt der Molekularbiologie eingeführt hat, David Witte für die Unterstützung am ITC und Ruslan Nedieltkov für viele spannende Diskussionen weit jenseits der üblichen Arbeitszeiten.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Wittmann danke ich für die stets gute Zusammenarbeit, die Mitbenutzung der Laborinfrastruktur und die vielen schönen und lustigen Stunden auch außerhalb des Labors. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Angelika Semmler, die mit mir gemeinsam gegen die Tücken der Peptidchemie gekämpft hat, sowie bei Henning Beckmann, Magnus Schmidt, Christian Risinger, Andrea Niederwieser, Frank Sicherl, Caroline Maierhofer, Daniel Specker und Mônica Boldt für die abwechslungsreiche gemeinsame Zeit bedanken.

Viele Experimente, bei denen RNA mit im Spiel war, wurden in den Laboren der Arbeitsgruppe Hartig durchgeführt. Für diese Möglichkeit, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und viele interessante Anregungen, möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Hartig bedanken. Bei der Laborarbeit konnte ich dabei immer auf die Hilfe von Astrid Joachimi zählen, auch dafür möchte ich mich bedanken. Ein ganz besonderer Dank gebührt Markus Wieland für seine vielfältige Unterstützung. Ohne die mir entgegengebrachte Geduld und Hilfsbereitschaft hätte ich viele Experimente nicht durchführen können.

Anke Friemel möchte ich für die Hilfe am NMR-Spektrometer und der Aufnahme diverser Spektren danken.

---

Meinen Mitarbeiterpraktikanten Thomas Lohmiller, Simon Böhm, Moritz Baier, Michael Krumm, Gyrel Herrmann, Stephan Hacker und Roman Sommer danke ich für ihren präparativen und kreativen Beitrag zu dieser Arbeit.

Für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und die vielen wertvollen Anregungen danke den Korrekturlesern Angelika Semmler, Anja Meißner, Kathrin Bracht, Angelika Gauß und David Witte.

Der Arbeitsgruppe Zumbusch, insbesondere Christian Jüngst, Martin Winterhalder und Georg Fischer danke ich für die gute Zusammenarbeit beim Projekt mit den NIR-Farbstoffen. Georg Fischer möchte ich überdies für die schöne und facettenreiche gemeinsame WG-Zeit danken.

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurden in den S1-Laboren der Arbeitsgruppe Stürmer durchgeführt. Für diese Möglichkeit sowie die stets unkomplizierte Hilfe bei Fragen und Problemen möchte ich mich bedanken. Den Arbeitsgruppen Kroneck und Deuerling danke ich für die Mitbenutzung ihrer Zentrifugen.

Dem Fachbereich Chemie danke ich für den meist unkomplizierter Zugang zu vielen Geräten und Chemikalien. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle der AG Marx in Person von Benjamin Bornemann und Anna-Lena Steck für ihre Unterstützung bei den ESI-MS-Messungen danken. Der AG Groth danke ich für die Mitbenutzung der HPLC-Anlage sowie speziell Thomas Huhn für die nützlichen Ratschläge bei der Einrichtung des Labors. Bei Thomas Exner und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Hilfe bei hartnäckigen Computerproblemen und die lustigen gemeinsamen Kegelabende bedanken.

Gar mancher frustrierende Labortag nahm dank vieler aktueller und ehemaliger Mitglieder der Fachschaft Chemie noch ein versöhnliches Ende. Hier sind viele Freundschaften entstanden die weit über die Mauern des L-Gebäudes hinaus gewachsen sind, wofür ich sehr dankbar bin.

Meinem Bruder Christian Bracht, Stefan Michelfelder, Ines Möller, Kathrin Bracht und Diana Klingler möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit in Konstanz und darüberhinaus, die vielen gemeinsamen Urlaube und schönen Erlebnisse, sowie ihren Rückhalt auch in schwierigen Zeiten danken.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern Walter und Angelika Gauß für die großzügige Finanzierung meines Studiums, das in mich gesetzte Vertrauen und ihre stets bedingungslose Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren . . . . .	7
1.1.1. Doppelsträngige RNA . . . . .	7
1.1.2. DNA/RNA-bindende Proteine . . . . .	8
1.1.3. Das <i>dsRNA-binding protein dsRBP-ZFa</i> aus <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	13
1.1.4. Das dsRNA-erkennende Protein Rnt1p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	19
1.2. Künstliche Bindungsmotive für Nukleinsäuredoppelstränge . . . . .	21
1.2.1. Niedermolekulare dsRNA-Liganden . . . . .	21
1.2.2. Peptidmimetika . . . . .	22
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>27</b>
3.1. Peptidsynthese . . . . .	27
3.2. Proteinexpression . . . . .	31
3.3. NMR-Spektroskopie . . . . .	33
3.3.1. Homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie . . . . .	35
3.3.2. Heteronukleare 2D-NMR-Spektroskopie . . . . .	37
3.3.3. Wasserunterdrückung . . . . .	39
3.3.4. Konformationsanalyse . . . . .	41
3.4. CD-Spektroskopie . . . . .	45
3.4.1. Anwendung . . . . .	46
3.5. Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie . . . . .	47
3.5.1. Theoretische Grundlagen . . . . .	47
3.5.2. Anwendung . . . . .	50
3.6. Isotherme Titrationskalorimetrie . . . . .	51
<b>4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa</b>	<b>55</b>
4.1. Verwendete Oligonukleotide . . . . .	55

4.2.	Das ZF1 und ZF2 enthaltende Proteinfragment dsRBP-ZFa 2-128 . . . . .	58
4.2.1.	Transformation und Optimierung der Expressionsbedingungen . . . . .	59
4.2.2.	Präparative Expression und Reinigung . . . . .	62
4.2.3.	Interaktionsstudien mit Oligonukleotiden . . . . .	68
4.3.	Von dsRBP-ZFa abgeleitete Peptide . . . . .	74
4.3.1.	Nachbildungen der zweiten Zinkfingerdomäne . . . . .	75
4.3.2.	Nachbildungen der ersten Zinkfingerdomäne . . . . .	105
<b>5.</b>	<b>Interaktion mit doppelsträngiger RNA - basierend auf der <math>\alpha</math>1-Helix von Rnt1p</b>	<b>111</b>
5.1.	Strukturelle Charakterisierung . . . . .	111
5.2.	Interaktionsstudien . . . . .	115
5.2.1.	NMR-Titration . . . . .	115
5.2.2.	HHR-Assay . . . . .	116
5.2.3.	SPR-Experimente . . . . .	116
5.3.	N-terminale PEG-Funktionalisierung . . . . .	119
5.4.	Photoschalter . . . . .	121
<b>6.</b>	<b>Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>127</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
7.1.	Substrukturen des dsRNA-erkennenden Proteins dsRBP-ZFa . . . . .	133
7.2.	Peptide ausgehend von der $\alpha$ 1-Helix des Proteins Rnt1p . . . . .	138
7.3.	Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff . . . . .	140
<b>8.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>143</b>
8.1.	Allgemeine Angaben . . . . .	143
8.1.1.	UV/Vis-Absorptionsspektroskopie . . . . .	143
8.1.2.	HPLC . . . . .	143
8.1.3.	Massenspektrometrie . . . . .	144
8.1.4.	CD-Spektroskopie . . . . .	144
8.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptidsynthese . . . . .	145
8.3.	Synthetisierte Peptide . . . . .	151
8.3.1.	dsRBP-ZFa-Peptide . . . . .	151
8.3.2.	Rnt1p-Peptide . . . . .	175
8.4.	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	184
8.4.1.	RNA-Transkription . . . . .	185
8.5.	Proteinexpression . . . . .	188
8.5.1.	Puffer und Medien . . . . .	188

8.5.2. Transformation und Expression . . . . .	189
8.5.3. Plasmidpräparation . . . . .	192
8.5.4. Reinigung . . . . .	192
8.6. NMR-Experimente . . . . .	193
8.6.1. Probenvorbereitung . . . . .	193
8.6.2. Spektrometer . . . . .	193
8.6.3. Spektren . . . . .	194
8.6.4. <i>Secondary chemical shifts</i> . . . . .	194
8.6.5. NMR-Titrationsen . . . . .	195
8.7. SPR-Experimente . . . . .	198
8.7.1. Verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	198
8.7.2. Immobilisierung . . . . .	200
8.7.3. Bindungsexperimente . . . . .	202
8.8. ITC-Experimente . . . . .	202
8.9. HHR-Experimente . . . . .	202
8.10. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> . . . . .	203
8.10.1. Radioaktive Markierung der DNA . . . . .	203
8.10.2. Gelelektrophorese . . . . .	203
8.11. NIR-label . . . . .	204
<b>A. Verwendete Chemikalien</b>	<b>207</b>
<b>B. NMR-Pulsprogramme</b>	<b>209</b>
<b>C. Module Peptidsynthesizer</b>	<b>247</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>255</b>



# Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
A	Adenosin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Act	Aktivierete Säurefunktion
Ala, A	Alanin
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
AMP	Ampicillin
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Aspartat
asRNA	<i>antisense</i> RNA
BMPH	N-( $\beta$ -Maleimidopropionsäure)-Hydrazid
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat
BP	Basenpaar
C	Cytidin
CAB	Carbenicillin
CAM	Chloramphenicol
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CHCA	$\alpha$ -Cyano-hydroxy-zimtsäure
COMU	1-[(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy-dimethylamino-morpholinomethylen)]-methanaminium hexafluorophosphat
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPP	<i>Cell Penetrating Peptides</i>
CSI	<i>Chemical Shift Index</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

CV	<i>Column Volume</i>
Cys, C	Cystein
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
dsRBM	<i>dsRNA-binding motif</i>
dsRBP-ZFa	<i>double-stranded RNA-binding protein ZFa</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
DYT	<i>double Yeast extract and Tryptone</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	1,2-Ethandithiol
eq	Äquivalente
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie
FAM	6-Carboxyfluorescein
FC	Flusszelle
FID	<i>Free Induction Decay</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanosin
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutamat
Gly, G	Glycin
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HCys	Homocystein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHR	Hammerhead-Ribozym
His, H	Histidin

---

HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMPT	Hexamethylenphosphorsäuretriamid
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTH	<i>Helix-turn-helix</i>
Ile, I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K	Kelvin
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
M	Molar (mol/l)
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MeCN	Acetonitril
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Met, M	Methionin
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	<i>tert</i> -Butyl-methyl-ether
n.d.	<i>not determined</i>
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NIR	Nahes Infrarot
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
NTA	Nitrotriessigsäure
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OPfp	Pentafluorphenylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PG	Schutzgruppe
Phe, F	Phenylalanin
ppm	<i>parts per million</i>
Presat	<i>presaturation</i>
Pro, P	Prolin
PS	Polystyrol
PyAOP	(7-Aza-Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
RAM	Rink Amid
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RP-HPLC	<i>Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
rt	Raumtemperatur
RU	<i>Response Unit</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser, S	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SOC	<i>super optimal brooth</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
T	Thymidin
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure

TG	TentaGel
Thr, T	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
Trp, W	Tryptophan
Trt	Trityl
TSP	3-(Trimethylsilyl)-propionat
Tyr, Y	Tyrosin
U	Uridin
UV/Vis	Ultraviolett und sichtbar
Val, V	Valin
WATERGATE	<i>water suppression by gradient taylorred excitation</i>
Xaa	beliebige Aminosäure
ZF1	erste Zinkfingerdomäne
ZF2	zweite Zinkfingerdomäne



# 1. Einleitung

## 1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind in viele biologische und biochemische Prozesse involviert. Als Bausteine der DNA (Desoxyribonukleinsäure) sind sie die Träger der genetischen Information eines Lebewesens. Diese wird mit Hilfe der RNA (Ribonukleinsäure) im Rahmen der Proteinbiosynthese weitergegeben.<sup>[1,2]</sup>

Erst in den letzten zwanzig Jahren ist zunehmend bekannt geworden, dass auch RNA eine sehr viel größere strukturelle und funktionelle Vielfalt hat als bisher angenommen. Wurde der RNA früher hauptsächlich die Rolle als Überträger von Erbinformationen in Form von mRNA (*messenger RNA*) und der Transport der einzelnen Aminosäurebausteine bei der Proteinbiosynthese in Form von tRNA (*transfer RNA*) zugeschrieben, so kennt man heute eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse, bei denen RNA in verschiedenster Form eine zentrale Rolle spielt. So ist sie beispielsweise in Form von snRNA (*small nuclear RNA*)<sup>[3]</sup>, asRNA (*antisense RNA*)<sup>[4]</sup>, microRNA<sup>[5]</sup>, siRNA (*small interfering RNA*)<sup>[6]</sup> oder *riboswitches*<sup>[7]</sup> unmittelbar an der Genregulation beteiligt. Desweiteren bestehen die katalytisch aktiven Bestandteile der Ribosomen aus rRNA (*ribosomal RNA*). Bei vielen Viren besteht das gesamte Genom aus RNA. In Anlehnung an „Ribonukleinsäure“ und „Enzym“ werden katalytisch aktive RNA-Moleküle zudem als Ribozyme bezeichnet.

Diese Vielfalt an Funktionen setzt ein hohes Maß an struktureller Diversität voraus. Dass bereits geringe Unterschiede in der Molekülstruktur großen Einfluss auf die Tertiärstruktur nehmen können, zeigt der Vergleich von doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit doppelsträngiger DNA (dsDNA).

### 1.1.1. Doppelsträngige RNA

Auf molekularer Ebene unterscheidet sich DNA von RNA lediglich durch eine fehlende Hydroxygruppe an 2'-Position des Riboseringes und den Ersatz der Nukleobase Thymin durch Uracil.

In der Sekundärstruktur liegt RNA im Allgemeinen als einzelner, helikal gewundener Strang vor, während DNA meist einen, ebenfalls helikal gewundenen, Doppelstrang mit antiparalleler Basenanordnung ausbildet. Jedoch kann auch die RNA eine doppelsträngige

## 1. Einleitung

---

Struktur ausbilden. Diese ist ein wichtiges Strukturmerkmal in vielen Organismen, da die Erkennung von dsRNA eine zentrale Rolle in vielen biologischen Prozessen spielt.<sup>[8]</sup> So ist sie beispielsweise bei der RNA-Interferenz<sup>[9]</sup>, dem mRNA-*editing*<sup>[10,11]</sup> oder der Interferon-kontrollierten Reaktion von Viren<sup>[12]</sup> von entscheidender Bedeutung.

Zwar bildet dsRNA wie dsDNA eine helikale Struktur aus. Der direkte Vergleich zeigt jedoch, dass die beiden Helices in ihrer Form nicht identisch sind. Die dsDNA liegt als sogenannte B-Helix vor, die sich durch eine breite und eher flache große Furche auszeichnet. Die kleine Furche hingegen ist eng und tief. Im Gegensatz dazu weist die A-Helix der dsRNA eine enge und sehr tiefe große Furche auf, während die kleine Furche sehr breit und flach ist (Tab. 1.1).<sup>[13]</sup>

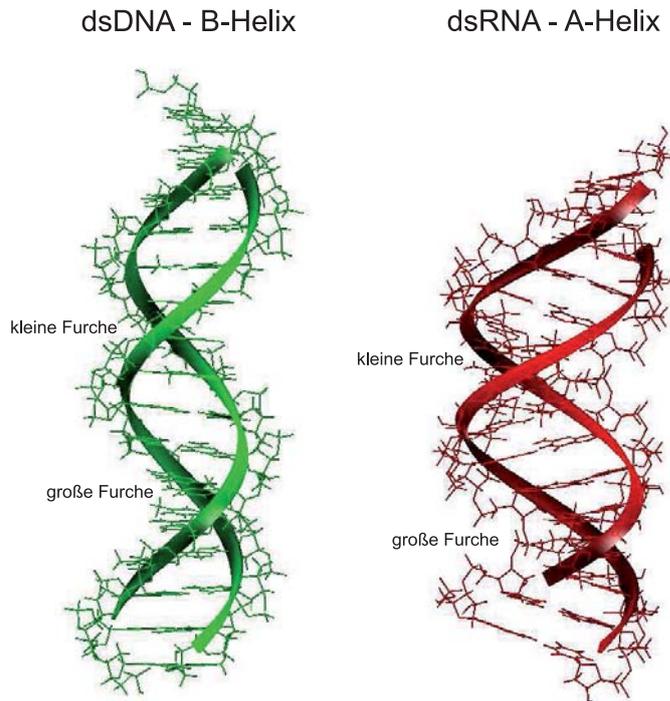
**Tabelle 1.1.:** Strukturelle Merkmale der dsDNA-B-Helix im Vergleich zur dsRNA-A-Helix.

	B-Helix (dsDNA)	A-Helix (dsRNA)
Richtung	rechtsgängig	rechtsgängig
Konformation der glycosidischen Bindung	anti	anti
Zuckerfaltung	C2'-endo	C3'-endo
Basenpaare pro Windung	10,4	11
Ganghöhe	3,32 nm	2,46 nm
Neigung der Basenpaare	1°	19°
große Furche	breit, eher flach	eng, sehr tief
kleine Furche	eng, tief	sehr breit, flach

Die große Furche der RNA-A-Form-Helix ist zum einen zu eng, zum anderen durch negativ geladene Phosphatreste blockiert, um Kontakte zwischen Proteinen und den Basen zu erlauben. Eine basenspezifische Erkennung durch Proteine, wie bei der dsDNA, ist hier daher nicht möglich. Da die chemische Umgebung in der kleinen Furche der A-Helix weitgehend unabhängig von der Basensequenz ist (es werden hauptsächlich 2'-Hydroxygruppen präsentiert), geht man davon aus, dass hier keine Sequenzspezifität vorliegt, sondern die Erkennung vielmehr strukturabhängig ist<sup>[15]</sup>. Zur Unterscheidung verschiedener RNA-Doppelstränge könnten zum Beispiel strukturelle Unregelmäßigkeiten wie Ausstülpungen, *loops*, Fehlpaarungen oder überhängende Einzelstrangenden dienen.<sup>[16-19]</sup> In Abb. 1.2 sind einige Beispiele für Sekundär- und Tertiärstrukturelemente von RNA gezeigt.

### 1.1.2. DNA/RNA-bindende Proteine

Die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA ist sehr gut untersucht. Die Unterscheidung verschiedener DNA-Stränge durch Proteine erfolgt meist anhand der Basensequenz.<sup>[21]</sup> Häufig vorkommende Struktur motive sind *Helix-loop-helix*-Strukturen, *Leucin-zipper* und

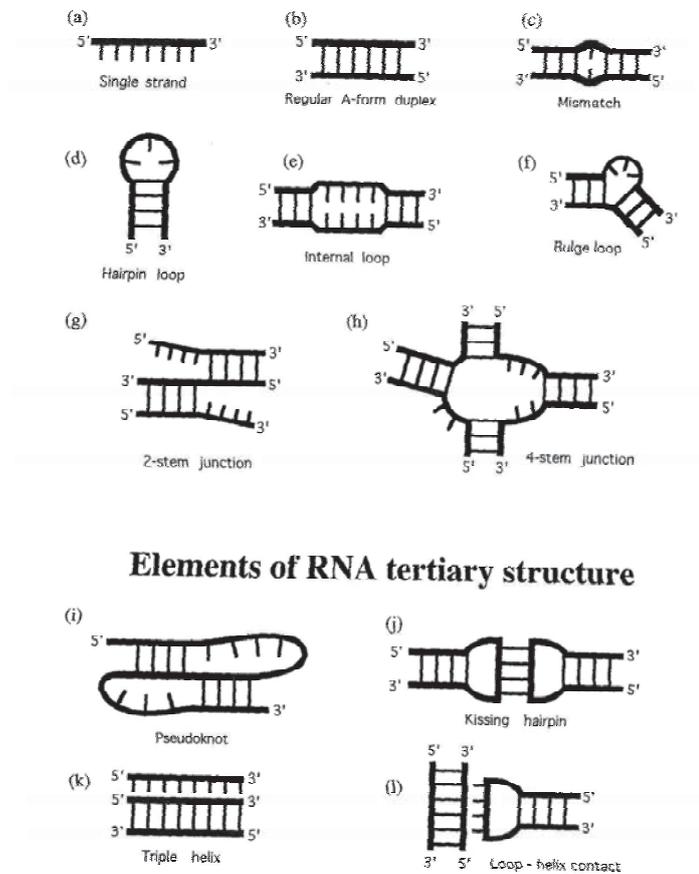


**Abbildung 1.1.:** Vergleich der Tertiärstruktur von dsDNA (grün) und dsRNA (rot). Zur Illustration wurden zwei Doppelstränge mit je 16 Basenpaaren einer sich wiederholenden ACGT-, bzw. ACGU-Sequenz mit dem Softwarepaket Sybyl<sup>[14]</sup> erzeugt.

Zinkfinger.<sup>[22]</sup> Aufgrund der inzwischen gewonnenen Erkenntnisse ist es mittlerweile sogar möglich, Moleküle (beispielsweise Peptide) zu synthetisieren, die selektiv bestimmte Nukleotidsequenzen erkennen.<sup>[23,24]</sup>

### Das Zinkfingermotiv

Zinkfinger sind neben *Helix-turn-helix*-Strukturen und *Leucin-zippern* ein häufig vorkommendes Strukturmotiv in Nucleinsäure-bindenden (dsDNA und ssRNA) Proteinen. Mehr als 4000 dieser Domänen sind in über 700 verschiedenen Proteinen bekannt<sup>[25]</sup> und es wird vermutet, dass bis zu ein Prozent der im menschlichen Genom kodierten Proteine ein Zinkfingermotiv enthalten. Sie bestehen in der Regel aus etwa 30 Aminosäuren, von denen vier koordinativ an ein einzelnes  $Zn^{2+}$ -Ion gebunden sind. Die beiden am häufigsten vorkommenden Substrukturen sind  $Cys_4$  und  $Cys_2His_2$ , was bedeutet, dass das Zinkion entweder über vier Cysteinreste oder über zwei Cystein- und zwei Histidinreste koordiniert ist. Im  $Cys_2His_2$ -Motiv sind die beiden Histidinreste in der Regel drei oder vier Aminosäuren voneinander entfernt. Daneben gibt es noch eine Reihe seltener vorkommender Zinkfingermotive.<sup>[1]</sup> Üblicherweise sind die einzelnen Zinkfingerdomänen sechs bis acht Aminosäuren von-



**Abbildung 1.2.:** Sekundär- (a-h) und Tertiärstrukturelemente (i-l) von RNA. Dicke Linien kennzeichnen das Nucleinsäurerückgrat, dünne Linien repräsentieren die Basen. Abbildung entnommen aus [20].

einander entfernt. Das Zinkion selbst tritt nicht mit der Nucleinsäure in Wechselwirkung, sondern stabilisiert durch die Koordination das kleine Strukturmotiv. Als erstes wurde das Zinkfingermotiv im Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) aus *Xenopus laevis* identifiziert (Abb. 1.3). [26]

Während das Zinkfinger-Motiv bei dsDNA-bindenden Proteinen schon seit längerem bekannt ist, wurde es bei dsRNA-bindenden Proteinen erstmals beim *dsRNA-binding protein* ZFa (dsRBP-ZFa) aus *Xenopus laevis*, einem afrikanischen Krallenfrosch, gefunden (s. 1.1.3). [27,28]



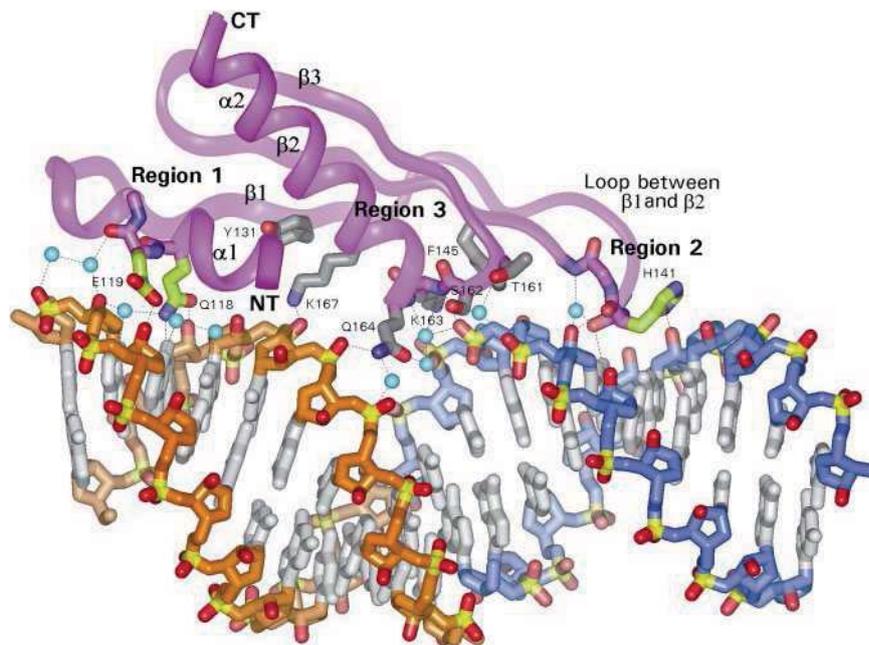
**Abbildung 1.3.:** NMR-Struktur der ersten drei Zinkfingerdomänen von TFIIIA (PDB-Code: 1TF3) im Komplex mit dsDNA.<sup>[26]</sup> Das Protein (cyan) windet sich um die Doppelhelix und bindet mit seinen drei Zinkfingerdomänen kooperativ an den DNA-Doppelstrang. Die koordinierten Zink-Ionen sind orange dargestellt.

### Das double-stranded RNA-binding motif (dsRBM)

Im Gegensatz zur dsDNA ist die Wechselwirkung von dsRNA mit Proteinen sehr viel weniger gut untersucht. Ein Motiv, das bei fast allen bisher bekannten dsRNA-bindenden Proteinen gefunden wurde, ist das *double-stranded RNA-binding motif* (dsRBM). Diese in der Regel etwa 70 Aminosäuren umfassende Sequenz bildet eine sehr charakteristische Tertiärstruktur aus, eine  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ -Faltung, bei der die beiden Helices auf einer Seite des dreisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes angeordnet sind. Die meisten potenziell dsRNA-bindenden Reste sind auf der Oberfläche exponiert. Proteine mit dsRBM binden an dsRNA, sowie in manchen Fällen auch an RNA-DNA-Hybride, wobei in der Regel keine Sequenzspezifität erkennbar ist. Neben seiner wichtigen Funktion bei der dsRNA-Erkennung ist das dsRBM auch an der Komplexbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.<sup>[29]</sup>

Das dsRBM wurde zunächst in Staufen, einem Protein, das für die mRNA-Lokalisierung in *Drosophila* verantwortlich ist, und PKR, einer dsRNA-aktivierten Proteinkinase in Nagern, entdeckt.<sup>[30-32]</sup> Bis 2005 waren bereits 388 eukaryotische, davon 72 humane, Proteine aus mindestens neun Proteinfamilien mit unterschiedlicher Funktion bekannt, die bis zu fünf dieser Bindungsmotive enthalten können.<sup>[33]</sup>

Bisher konnten neun hochaufgelöste Strukturen des dsRBM im Komplex mit dsRNA-Konstrukten aufgeklärt werden.<sup>[34–40]</sup> Obwohl die untersuchten Domänen aus verschiedenen Proteinen mit zum Teil geringer Sequenzhomologie stammen und die dsRNA-Bindungspartner sich teilweise stark in ihrer Sequenz unterscheiden, weisen die Strukturen eine sehr große Ähnlichkeit auf. Die Wechselwirkung findet dabei hauptsächlich zwischen 2'-Hydroxygruppen und Phosphat-Sauerstoffen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der dsRNA und der  $\alpha_1$ -Helix, dem  $\beta_3$ - $\alpha_2$ -loop und dem  $\beta_1$ - $\beta_2$ -loop des Proteins statt (Abb. 1.4). Sie ist daher auf RNA-Seite nicht sequenzspezifisch. Das Motiv lagert sich an einer Seite des dsRNA-Doppelstranges an und überbrückt zwei kleine Furchen sowie die dazwischenliegende große Furche. Aufgrund der unterschiedlichen Topologie der großen und kleinen Furchen (siehe 1.1.1) kann so dsRNA im Gegensatz zu dsDNA erkannt werden. Wie hingegen zwischen verschiedenen dsRNAs unterschieden werden kann, ist damit aber noch nicht geklärt.



**Abbildung 1.4.:** Wechselwirkung zwischen dem dsRBM von Xlrpba-2 mit doppelsträngiger RNA. Das Proteinrückgrat ist in violett dargestellt, die mit der RNA interagierenden Reste in grün bzw. grau. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte schwarze Linien gekennzeichnet. Abbildung entnommen aus<sup>[34]</sup>.

In deutlich geringerem Maße sind auch dsRNA-bindende Proteine ohne das charakteristische dsRBM bekannt. Protein-dsRNA-Komplexe sind beispielsweise vom Protein p19, das spezifisch dsRNA von 19 Basenpaaren (BP) Länge erkennt<sup>[41,42]</sup>, vom B2 Protein des

*flock house virus*<sup>[43,44]</sup>, vom *core*-Protein des *blue-tongue virus*<sup>[45]</sup> sowie von Proteinen, die mit doppelsträngigen rRNA-Regionen wechselwirken<sup>[46]</sup>, charakterisiert worden.

Ein ebenfalls spezifisch dsRNA-erkennendes Protein ist das *double-stranded RNA-binding protein ZFa* (dsRBP-ZFa) aus *Xenopus laevis*. Funktion und natürliches Substrat dieses Proteins sind noch nicht bekannt, auch konnte noch keine Komplexstruktur erhalten werden. Es deutet aber vieles darauf hin, dass es sich hier um ein neues dsRNA-Erkennungsmotiv handelt (s. 1.1.3).

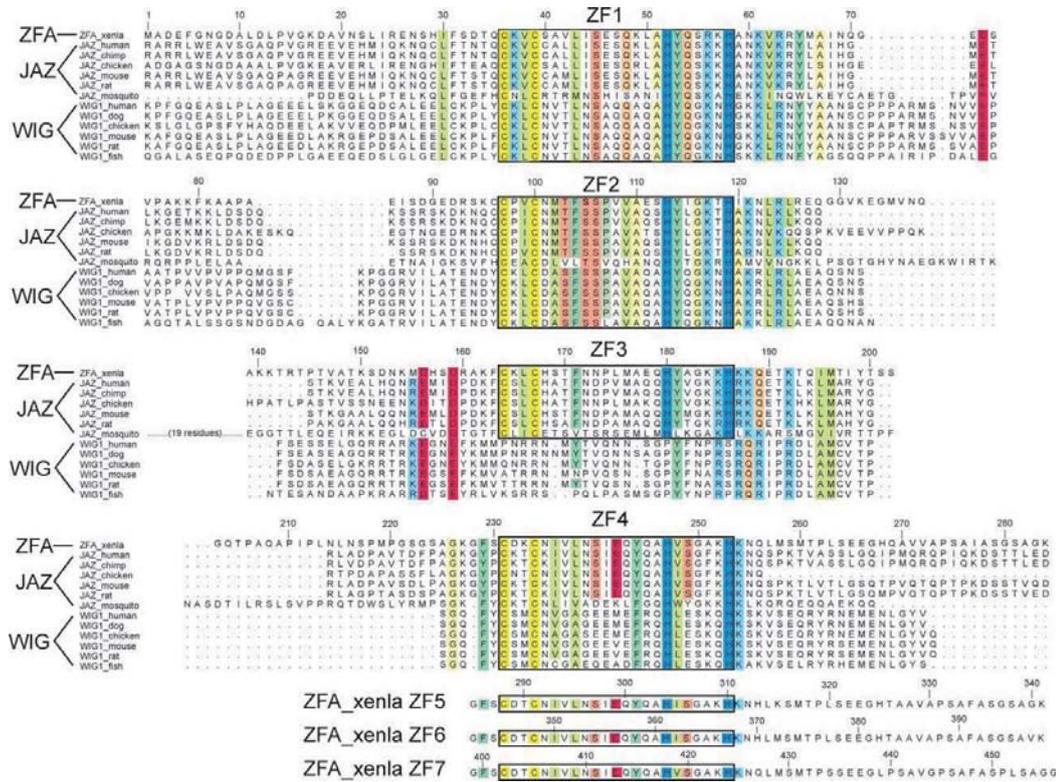
### 1.1.3. Das dsRNA-binding protein dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis*

Das *double-stranded RNA-binding protein* dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis* wurde erstmals beim Screening einer ovariellen *complementary* DNA (cDNA) Expressionsbibliothek, wie sie für die Suche nach DNA bindenden Proteinen verwendet wird, identifiziert.<sup>[28]</sup> Es besteht aus 524 Aminosäuren und hat einen sauren C- und einen basischen N-Terminus. Es enthält insgesamt 7 Zinkfinger motive des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs, von denen die C-terminalen vier von der Sequenz her nahezu identisch sind (91 - 100 % Sequenzhomologie), die N-terminalen drei aber weder untereinander noch zu den vier C-terminalen große Ähnlichkeit zeigen (Abb. 1.5).

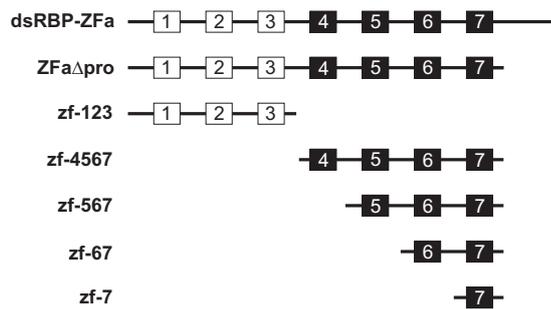
Die biologische Funktion von dsRBP-ZFa ist bislang noch völlig unklar. Die homologen Proteine JAZ, wig-1 und PAG608, die in Nagern und beim Menschen gefunden wurden und wie dsRBP-ZFa eine hohe Präferenz für dsRNA und RNA/DNA-Hybride gegenüber dsDNA zeigen (siehe nächster Abschnitt), spielen eine wichtige Rolle beim Prozess der Apoptose.<sup>[48-51]</sup> Sie werden durch den Tumorsuppressor p53 induziert und in bestimmten Tumoren, beispielsweise dem Plattenepithelzellkarzinom der Lunge, in erhöhten Konzentrationen gefunden. Künstlich hervorgerufene Überexpression dieser Proteine kann Apoptose auslösen und das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Die Bindung an dsRNA mit Hilfe intakter Zinkfingerdomänen ist für ihre Funktion essentiell.

*Electrophoretic mobility shift assays* zeigten eine starke Präferenz zur Bindung an A-Form-Helices. Für 36 Basenpaare umfassende dsRNA und RNA/DNA-Hybride wurden Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich erhalten. Eine Sequenzspezifität konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden. Um den Einfluss der einzelnen Zinkfingerdomänen näher zu untersuchen, synthetisierten Finerty *et al.* sieben verschiedene Proteinkonstrukte, die jeweils eine unterschiedliche Kombination der sieben Zinkfingerdomänen enthielten (Abb. 1.6).<sup>[47]</sup> Während die Konstrukte zf-67 und zf-7 auch bei hohen RNA-Konzentrationen (1 µM bzw. 10 µM) keine Bindung zeigten, wurden für die Konstrukte zf-123, zf-4567 und zf-567 Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich erhalten. Bindung an einzelsträngige

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.5.:** Vergleich der Aminosäuresequenz von dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis* mit den JAZ- und wig-Proteinen aus anderen Organismen. Die Sequenzen sind so übereinandergelegt, dass die Zinkfingerdomänen verglichen werden. Die N-terminalen Fortsetzungen der JAZ- und wig-Proteine sind nicht gezeigt, die Nummerierung entspricht der dsRBP-ZFa-Sequenz. Die Zink-koordinierenden Cysteine und Histidine sind gelb, bzw. blau hinterlegt. Konservierte Aminosäuren sind grün (hydrophob), blau-grün (aromatisch), hellblau (positiv geladen), rot (negativ geladen), rosa (hydrophil) und hellgelb (kurze Seitenkette) markiert. Abbildung entnommen aus<sup>[15]</sup>.

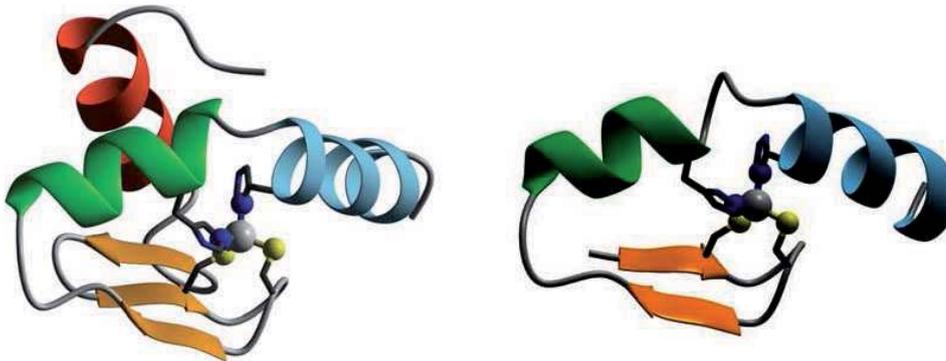


**Abbildung 1.6.:** Von Finerty *et al.* synthetisierte Proteinfragmente von dsRBP-ZFa.<sup>[47]</sup> Ganz oben dargestellt sind das komplette Protein (dsRBP-ZFa) und das Protein ohne C-terminalen Rest (ZFaΔpro). Darunter sind die Proteinfragmente dargestellt, denen verschiedene Zinkfingerdomänen fehlen. Die Zahl indiziert jeweils die Nummer der Zinkfingerdomäne.

Oligonukleotide sowie an dsDNA konnte nicht beobachtet werden. Während zf-123 eine ebenso hohe Affinität zu RNA/DNA-Hybriden zeigt, ist diese bei zf-4567 und zf-567 um ein bis zwei Größenordnungen kleiner.

Dass Konstrukte, die nur die ersten bzw. letzten drei Zinkfingerdomänen enthalten, eine genauso starke Affinität zu dsRNA zeigen wie das Wildtyp-Protein, war zunächst einmal erstaunlich. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass dsRBP-ZFa zwei verschiedene dsRNA-Substrate hat.<sup>[47]</sup> Da die N-terminalen Zinkfinger RNA/DNA-Hybride mit nahezu identischer Affinität wie dsRNA binden, ist es auch denkbar, dass das dazugehörige Substrat eine Mischform aus A- und B-Helix ist oder dass es sich um eine komplexere Topologie, wie beispielsweise bei der tRNA zu finden, handelt.

Die Struktur der beiden N-terminalen Zinkfingerdomänen wurde 2005 von Möller *et al.*<sup>[15]</sup> mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden aufgeklärt (Abb. 1.7). Obwohl sich strukturelle Ähnlichkeiten sowohl zu klassischen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingern als auch zum dsRBM und anderen Nucleinsäure bindenden Proteindomänen erkennen ließen, konnte nicht auf ein Bindungsmotiv für die dsRNA-Wechselwirkung geschlossen werden.



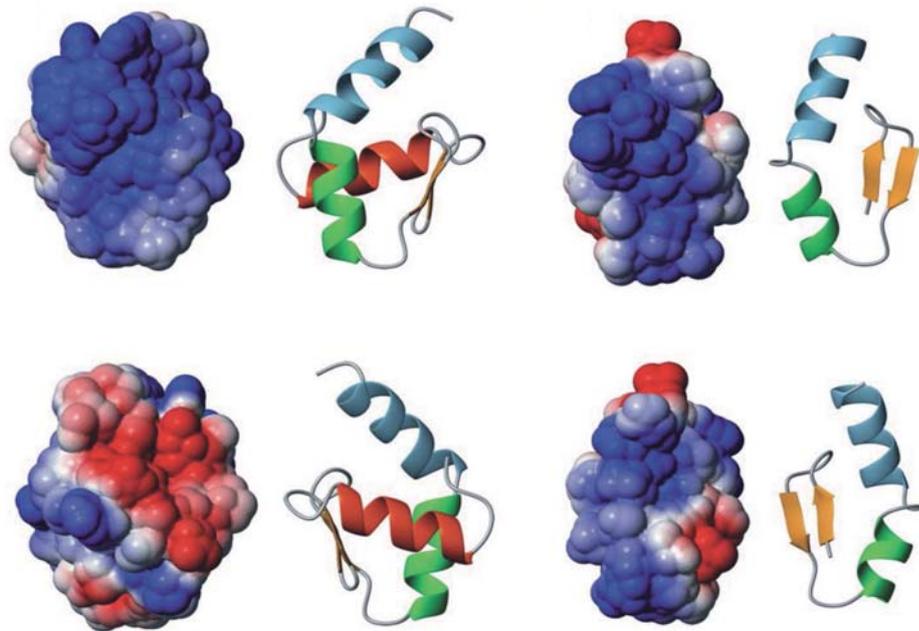
**Abbildung 1.7.:** Struktur der beiden N-terminalen Zinkfingerdomänen ZF1 und ZF2 aus dsRBP-ZFa. In grau dargestellt ist jeweils das Zinkion, das von den beiden Histidin- (blau) und Cystein-Resten (gelb) koordiniert wird. Grün und hellblau sind die beiden Helices, die das geknickte HTH-Motiv bilden. Abbildung entnommen aus<sup>[15]</sup>.

Beide Zinkfingerdomänen bilden eine  $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ -Faltung aus. Die beiden das Zinkion koordinierenden Cystein-Reste sind dabei in dem zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert, während die beiden  $\alpha$ -Helices ein charakteristisches *Helix-turn-helix*-Motiv (HTH-Motiv) ausbilden. Die das Zinkion koordinierenden Histidinreste befinden sich in jeweils einer der beiden Helices und stabilisieren durch die Metallkoordination den Knick zwischen diesen. Bei der ersten Zinkfingerdomäne (ZF1) schließen sich N-terminal ein weiteres  $\beta$ -Faltblatt sowie eine  $\alpha$ -Helix an, wobei letztere mit dem HTH-Motiv in Interaktion tritt.

## 1. Einleitung

---

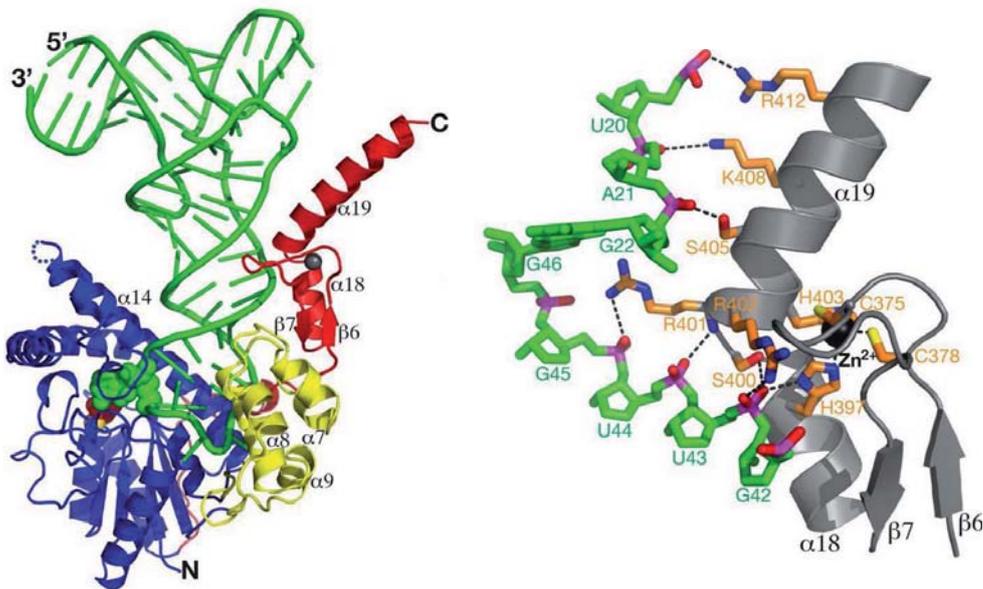
Auf der solvensexponierten Seite der HTH-Motive von ZF1 und ZF2 befinden sich mehrere Lysin- und Argininreste und bilden eine positiv geladene Oberfläche (Abb. 1.8). Diese könnte sehr gut mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der dsRNA wechselwirken.



**Abbildung 1.8.:** Elektrostatisches Oberflächenpotential von ZF1 (links) und ZF2 (rechts). Positiv geladene Bereiche sind blau, negative rot gefärbt. Die nach außen liegenden Bereiche des HTH-Motivs sind vornehmlich positiv geladen und damit für eine Wechselwirkung mit RNA prädestiniert. Abbildung entnommen aus<sup>[15]</sup>.

Somit lassen sich zwar strukturelle Ähnlichkeiten zu klassischen  $C_2H_2$ -Zinkfingern erkennen, in vielerlei Hinsicht verhalten sich die hier beschriebenen Zinkfinger allerdings untypisch. So sind die beiden Zinkfingerdomänen im Gegensatz zu sonst üblichen sechs bis acht Aminosäuren durch einen langen, 40 Aminosäuren umfassenden, unstrukturierten Linker verbunden, wodurch sie sich unabhängig voneinander bewegen können. Der Abstand zwischen den beiden Zink koordinierenden Histidinresten ist mit fünf Aminosäuren länger als die üblicherweise gefundenen drei bis vier. Desweiteren hat die Strukturaufklärung gezeigt, dass die Zinkkoordination an sich ungewöhnlich ist: das Zinkion wird jeweils über einen  $\delta$ - und einen  $\epsilon$ -Stickstoff der beteiligten Histidin-Seitenketten koordiniert. Es handelt sich hier also vermutlich um ein zum damaligen Zeitpunkt neues Erkennungsmotiv für doppelsträngige RNA.

Einen interessanten Hinweis auf ein mögliches Substrat von dsRBP-ZFa lieferte eine Veröffentlichung von Zhou *et al.* im Jahre 2008. Dimethylallyltransferase (DMATase) katalysiert den Transfer einer Dimethylallylgruppe eines Dimethylallyl-Pyrophosphates zum N6-Stickstoff von Adenin 37 bestimmter tRNAs. Zhou *et al.* haben Kristallstrukturen mehrerer Zwischenformen des DMATase-tRNA<sup>Cys</sup>-Komplexes veröffentlicht, die neue Hinweise auf den Reaktionsmechanismus lieferten.<sup>[52]</sup> Das Enzym erkennt das tRNA-Substrat durch indirektes Auslesen der Sequenz. Adenosin 37 klappt aus dem Anticodon-loop der tRNA in den Kanal der DMATase, wo die Funktionalisierung stattfindet (Abb. 1.9).



**Abbildung 1.9.:** Links: Struktur des DMATase-tRNA-Pyrophosphat-Komplexes. Die tRNA ist grün dargestellt, blau die DMATase *core domain*, gelb die DMATase *insertion domain*, rot der C-Terminus mit dem HTH-Motiv. Rechts: Interaktion des C-terminalen HTH-Motivs (grau) mit der tRNA (grün). Abbildung entnommen aus<sup>[52]</sup>.

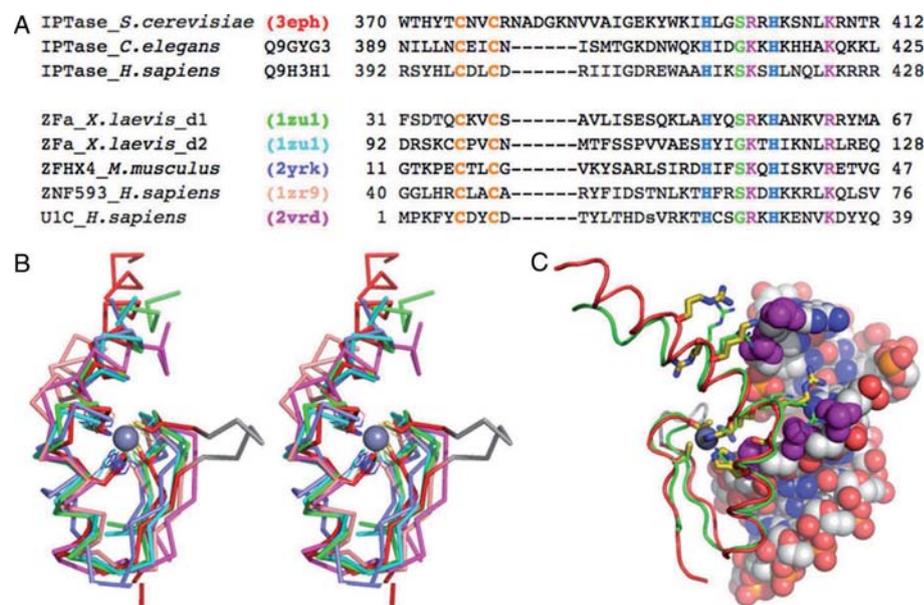
Der eigentlich interessante Teil für die vorliegende Arbeit ist aber nicht das in Abb. 1.9 blau dargestellte aktive Zentrum des Proteins, sondern das rote Zinkfinger-Motiv, bestehend aus den beiden antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern  $\beta_7$  und  $\beta_8$  sowie den sich C-terminal anschließenden  $\alpha$ -Helices  $\alpha_{18}$  und  $\alpha_{19}$ , die in der Veröffentlichung wie folgt beschrieben werden:

[...] *The overall structure of the zinc finger can be interpreted as an uninterrupted long helix that is forced to make a kink by coordination of His-397 and His-403 with a zinc ion. This results in a zinc finger whose shape is complementary to the structure of tRNA near the junction of anticodon stem and D loop[...].*

## 1. Einleitung

Die Wechselwirkung findet hauptsächlich zwischen basischen Resten des HTH-Motivs und negativ geladenen Phosphatresten der tRNA statt (Abb. 1.9). Bei einer Struktur-Homologie-Suche konnte kein verwandtes Protein gefunden werden, weshalb die Autoren diese Zinkfinger-Struktur als neues RNA-Erkennungsmotiv postulierten.

Andreeva *et al.* zeigten jedoch, dass besagtes HTH-Motiv eine sehr hohe Strukturhomologie zu anderen Oligonukleotid-bindenden Zinkfingerdomänen mit H-X<sub>5</sub>-H-Motiv zeigt.<sup>[53]</sup> In Abb. 1.10 sind Vergleiche mit Sequenzen und Strukturen anderer Oligonukleotid-bindender Proteine mit HTH-Motiv dargestellt. Neben den stark konservierten Cystein- (gelb) und Histidin-Resten (blau), die an das Zinkion koordinieren, haben alle dargestellten Proteine basische Aminosäuren an zwei identischen Positionen im Bereich des HTH-Motivs (violett). Desweiteren ist die Anzahl basischer Aminosäuren in diesem Bereich (zwischen sechs und zwölf in einem Sequenzabschnitt von 27 Resten) bei allen gezeigten Proteinen relativ groß. Insbesondere aus dem Strukturvergleich mit ZF1 aus dsRBP-ZFa geht hervor, dass tRNA als mögliches Substrat für dieses Protein in Frage kommt.



**Abbildung 1.10.:** A: Vergleich der Sequenz des N-terminalen HTH-Motivs aus der DMATase-tRNA-Struktur mit bekannten HTH-Zinkfingern. Die Zink-koordinierenden Cysteine und Histidine sind gelb, bzw. blau dargestellt. B: *stereoview* der überlagerten Strukturen der HTH-Zinkfingerstrukturen. Die Farben der Domänen entsprechen denen aus A. C: Strukturvergleich von ZF1 aus dsRBP-ZFa mit der DMATase-HTH-Domäne im Komplex mit tRNA. Abbildung entnommen aus<sup>[53]</sup>.

#### 1.1.4. Das dsRNA-erkennende Protein Rnt1p aus *Saccharomyces cerevisiae*

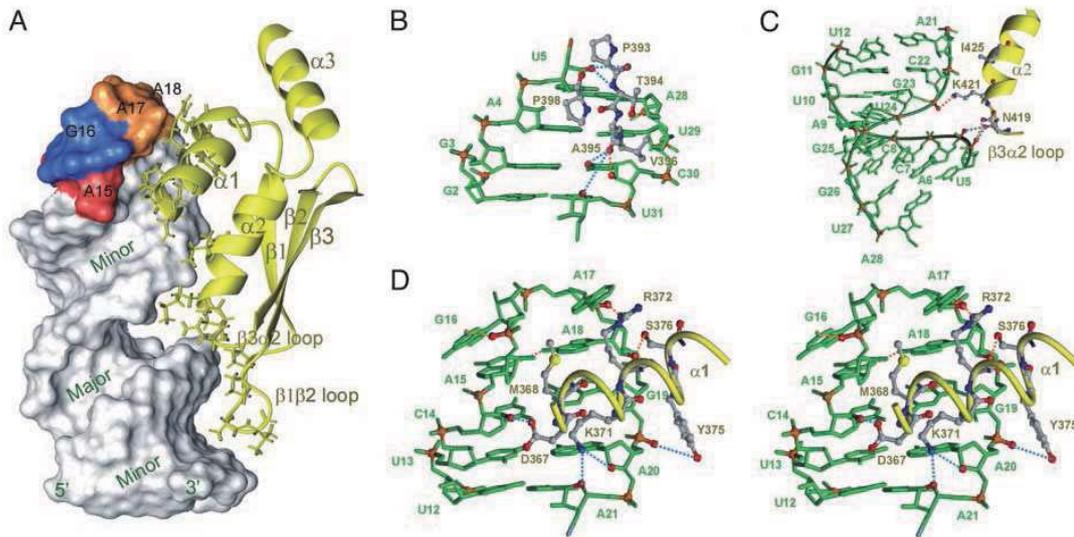
Das Protein Rnt1p gehört zur RNase III-Familie der dsRNA-Endonukleasen und spielt eine Schlüsselrolle bei der RNA-Prozessierung von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), indem es sehr spezifisch ausgewählte RNA-Moleküle spaltet.<sup>[54]</sup> Bekannte Substrate dieser Proteinklasse sind snRNAs<sup>[55]</sup> und snoRNAs (*small nucleolar RNA*), welche unter anderem in die Modifikation von rRNA-Vorläufern involviert sind, wie zum Beispiel bei der spezifischen 2'O-Methylierung<sup>[56-58]</sup> oder der Pseudouridylierung<sup>[59,60]</sup>. Auch sind Beispiele dieser Familie bekannt, die eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz spielen, z.B. die Proteine Dicer aus *Drosophila melanogaster*<sup>[9]</sup> und Drosha aus *Caenorhabditis elegans*<sup>[61]</sup>. Außerdem ist Rnt1p im Abbauprozess von pre-mRNA und mRNA involviert<sup>[62,63]</sup>.

Alle Substrate von Rnt1p sind dsRNA-*hairpins* mit einem AGNN-*tetraloop*<sup>[64]</sup>, wobei N für eine beliebige Nukleobase steht. Die *loop*-Region dient dabei ausschließlich der Erkennung des Substrates, die eigentliche Spaltung der dsRNA findet im Bereich des Doppelstranges statt, in 14 - 16 Basenpaaren Abstand vom *hairpin*.<sup>[54]</sup>

Wu *et al.* veröffentlichten 2004 eine NMR-Struktur des dsRBM von Rnt1p im Komplex mit dsRNA<sup>[36]</sup>. Dazu synthetisierten sie ein 88 Aminosäuren umfassendes Protein, entsprechend den Resten 366 - 453 von Rnt1p. Als Substrat verwendeten sie ein 32 Nukleotide umfassendes Derivat (14 Basenpaare + *tetraloop*) des 5'-*hairpins* des snR47 snoRNA-*precursors* von Hefe, da die Interaktion mit diesem biochemisch relativ gut verstanden<sup>[54]</sup> und die Struktur des AGAA-*tetraloops* bekannt ist<sup>[65]</sup>. Zusätzlich zur klassischen  $\alpha_1$ - $\beta_1$ - $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\alpha_2$ -Faltung hat das dsRBM von Rnt1p C-terminal eine weitere Helix ( $\alpha_3$ ), die mit ihrer hydrophoben Seite mit dem C-terminalen Teil der  $\alpha_1$ -Helix sowie dem  $\alpha_1$ - $\beta_1$ -*loop* wechselwirkt (Abb. 1.11, A, gelbe Struktur).

Das dsRBM von Rnt1p bindet das RNA-Substrat an einer Seite über fast dessen gesamte Länge, wobei die Wechselwirkung hauptsächlich über das Zucker-Phosphat-Rückgrat stattfindet. Das Motiv zeigt den bekannten Bindungsmodus (siehe 1.1.2). Das Protein bindet über drei aufeinanderfolgende kleine und große Furchen, wobei eine der kleinen Furchen an den *tetraloop* grenzt. Die  $\alpha_1$ -Helix liegt in der kleinen Furche des *tetraloops* und der zwei angrenzenden Basenpaare. Das N-terminale Ende der  $\alpha_2$ -Helix und der  $\beta_3$ - $\alpha_2$ -*loop* binden an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der großen Furche, während der  $\beta_1$ - $\beta_2$ -*loop* in der kleinen Furche 10 - 13 Basenpaare entfernt vom *tetraloop* liegt (Abb. 1.11).

Erstaunlicherweise sind keine basenspezifischen Kontakte zwischen Protein und den konservierten Basen des *loops* (A und G) zu beobachten. Es handelt sich hier also offensichtlich um eine strukturspezifische Erkennung der *tetraloop*-Konformation.



**Abbildung 1.11.:** Wechselwirkungen zwischen dem dsRBM von Rnt1p mit snR47h-RNA. A: Struktur des Komplexes zwischen Protein und RNA. Gezeigt ist die Oberfläche des RNA-Stranges mit den Basen A15 in rot, G16 in blau und A17, A18 in orange. Das Protein ist gelb dargestellt. B-D: Detaillierte Abbildung der Interaktion des Proteins mit der kleinen Furche (B), der großen Furche (C) und der kleinen Furche des *tetraloops* als *stereoview* (D). Nucleotide sind grün dargestellt, Phosphatreste und O2'-Gruppen von wechselwirkenden Riboseren rot. Direkte und von Wasser medierte Wasserstoffbrücken sind als orange bzw. blau gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die an der Wechselwirkung beteiligten Seitenketten des Proteins sind als *sticks* dargestellt, das Proteinrückgrat als gelbes Band. Abbildung entnommen aus<sup>[36]</sup>.

Chanfreau *et al.* haben den Einfluss von Mutationen im Substrat von Rnt1p sowohl auf Bindung an das Protein, als auch auf die dsRNA-Spaltung untersucht<sup>[54]</sup>. Enthielt die RNA statt des AGAA-*loops* einen ACAA-*loop*, fand keine Spaltung statt, im Falle von CGAA, GAAA und UUCG war sie nahezu aufgehoben. Wurden Basenpaare zwischen *tetraloop* und Spaltstelle entfernt, verschob sich letztere um die Anzahl der fehlenden Basenpaare. Die Spaltungsaktivität blieb in diesem Fall jedoch praktisch unverändert. Die Spaltstelle definiert sich also offenbar ausschließlich durch den Abstand zum *tetraloop*.

Um den Einfluss des AGNN-*tetraloops* auf die Bindung von Rnt1p an sein RNA-Substrat zu untersuchen, wurden SPR-Experimente in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ , welches für die Spaltungsreaktion notwendig ist, durchgeführt. Dazu wurde Rnt1p auf einer Dextranoberfläche immobilisiert und die Wechselwirkung mit sowohl Wildtyp-Substrat, als auch mit der GAAA-*tetraloop*-Mutante untersucht. Während die Assoziation von Rnt1p mit dem Wildtyp-Substrat etwa zehnmal schneller ablief als mit der Mutante ( $k_a(\text{AGAA}) = 6,48 \cdot 10^5 \frac{1}{M \cdot s}$ ,  $k_a(\text{GAAA}) = 7,32 \cdot 10^4 \frac{1}{M \cdot s}$ ), verlief die Dissoziation lediglich etwa zweimal so schnell ( $k_d(\text{AGAA}) = 1,06 \cdot 10^{-3} \frac{1}{s}$ ,  $k_d(\text{GAAA}) = 5,67 \cdot 10^{-4} \frac{1}{s}$ ). Daraus ergibt sich eine etwa fünfmal kleinere Dissoziationskonstante für das Wildtyp Substrat ( $K_d(\text{AGAA}) = 1,6 \text{ nM}$ ,

$K_d(\text{GAAA}) = 7,8 \text{ nM}$ ). Auch bei anderen RNA-Konzentrationen war die Dissoziationskonstante  $K_D$  bei der GAAA-Mutante stets höher als beim Wildtyp-Substrat.

Für die Erkennung der *stem-loop*-RNA durch die  $\alpha_1$ -Helix von Rnt1p ist also offensichtlich ein AGNN-*tetraloop* notwendig. Allerdings ist wohl nicht die Sequenz, sondern die Konformation des *loops* entscheidend, da die Wechselwirkung zwischen Protein und RNA nur über die beiden nicht konservierten Reste des *tetraloops*, in diesem Fall A17 und A18, stattfindet. Der Beitrag der  $\alpha_1$ -Helix von Rnt1p zur Bindung an *stem-loop*-RNA-Substrate ist relativ gering, der Großteil der Bindung geschieht über das restliche dsRBM. Allerdings ist diese Bindung alleine nicht produktiv, d.h. eine Spaltung der RNA findet nur bei Vorliegen des AGNN-*tetraloops* statt.

## 1.2. Künstliche Bindungsmotive für Nukleinsäuredoppelstränge

Um in die biochemischen Prozesse in einer Zelle eingreifen zu können, wurden sehr viele Ansätze entwickelt und auch schon erfolgreich angewendet. Neben kleinen Molekülen, die selektiv biologisch aktive Spezies imitieren, zerstören oder reversibel blockieren, werden bereits erfolgreich modifizierte Nukleinsäuren, beispielsweise beim *antisense*-Ansatz, eingesetzt. Auch der Einsatz von Peptiden spielt eine immer größere Rolle.<sup>[66]</sup>

Nukleinsäuren stellen aufgrund ihrer sehr großen Bedeutung in einer Vielzahl zellulärer Prozesse ein interessantes Ziel dar. Während der Mechanismus bei Unterscheidung verschiedener dsRNAs durch Proteine noch ziemlich unklar ist, ist dieser Vorgang für dsDNA mittlerweile sehr gut untersucht und verstanden. Auch erlaubt die Topologie der B-Helix der dsDNA im Gegensatz zur dsRNA direkte Kontakte zu den Basen, was eine sequenzspezifische Erkennung ermöglicht.<sup>[21]</sup> Es ist inzwischen möglich, gezielt sequenzspezifische Liganden für doppelsträngige DNA zu erhalten.<sup>[23,24,67]</sup>

### 1.2.1. Niedermolekulare dsRNA-Liganden

Ein in Medizin und Wissenschaft häufig verwendetes Prinzip zur Bindung an Nukleinsäuredoppelstränge ist die Interkalation. Dabei lagern sich planare, heteroaromatische polyzyklische Moleküle in der Doppelhelix zwischen benachbarten Basenpaaren ein. Anwendung finden Interkalatoren beispielsweise in der Molekularbiologie in Form von Ethidiumbromid zum Anfärben von Nukleinsäuren oder in der Medizin als Zytostatika, die die Replikation und Transkription der DNA unterbinden. Allerdings haben sie eine, wenn überhaupt, sehr geringe Selektivität für DNA oder RNA.<sup>[68]</sup>

Eine Möglichkeit, Interkalatoren selektiver zu machen, ist die Funktionalisierung bzw. Modifizierung mit Gruppen, die zwischen dsRNA und dsDNA oder bestimmten Sequenzen

unterscheiden können. Für dsDNA wurde das zum Beispiel anhand des natürlichen Antibiotikums Actinomycin D gezeigt. Dabei handelt es sich bei der interkalierenden Einheit um ein Phenoxazin-Derivat, an das zwei Zyklopeptide gebunden sind, welche in der kleinen Furche der dsDNA liegen und so eine Sequenzspezifität bewirken.<sup>[69,70]</sup>

Es sind auch einige Beispiele für funktionalisierte Interkalatoren beschrieben, die selektiv dsRNA erkennen. Eine Möglichkeit ist die Modifikation mit verschiedenen Nukleobasen, welche z.B. komplementär an Ausstülpungen oder andere einzelsträngige Bereiche binden können.<sup>[71]</sup> Auch die Modifikation mit Aminosäuren wie Argininseitenketten<sup>[72]</sup> oder Aminoglykosiden wie Neomycin<sup>[73]</sup> wurde beschrieben.

Ein weiterer Ansatz sind die sogenannten *threading* Interkalatoren. Diese winden sich durch den Doppelstrang und binden mit ihren Substituenten in beiden Furchen der Doppelhelix.<sup>[74-76]</sup> Die Substrate dieser Substanzklasse müssen eine relativ labile Basenpaarung aufweisen, wie es beispielsweise in der Nähe von Fehlpaarungen und Ausstülpungen der Fall ist. Beispiele für dsRNA-bindende *threading* Interkalatoren sind substituierte 2-Arylchinoline<sup>[77]</sup>, Amsacrin-4-carboxamid-Derivate<sup>[78]</sup>, Diphenylfuran-Derivate<sup>[79]</sup> oder Peptid-Acridin-Konjugate<sup>[16]</sup>.

Eine andere Klasse dsRNA-bindender Moleküle sind Aminoglykosid-Antibiotika.<sup>[80,81]</sup> Dabei handelt es sich um Oligosaccharide, die eine oder mehrere Aminogruppen tragen. Sie binden an die Aminoacyl-tRNA-kodierende Seite von prokaryotischer rRNA und unterbinden so den Translationsprozess.<sup>[82,83]</sup> Vicens *et al.* haben Kristallstrukturen der drei Aminoglykoside Paromomycin, Tobramycin und Geneticin jeweils im Komplex mit doppelsträngiger Modell-RNA, die die Minimalstruktur der rRNA-Bindungstasche enthält, veröffentlicht<sup>[84-86]</sup>, welche tiefere Einblicke in den Bindungsmechanismus geben<sup>[80]</sup>.

### 1.2.2. Peptidmimetika

Der Übergang zwischen der Verbindungsklasse der Peptide und der der Proteine ist fließend. Sie unterscheiden sich nur in der Länge ihrer Aminosäuresequenz. Aufgrund ihrer zum Teil sehr hohen Spezifität gegenüber Sekundär- und Tertiärstrukturmerkmalen ihrer Substrate sind Proteine prädestinierte Vorlagen zur Entwicklung selektiv wirkender, niedermolekularer Substanzen. Als Pharmazeutika selbst sind sie aber eher ungeeignet, da sie unter anderem

- ab einer Größe von etwa 60 Aminosäuren in der Regel gentechnisch hergestellt werden müssen, was einen relativ hohen Arbeits- und Kostenaufwand bei geringen Ausbeuten bedeutet,

- sowohl hinsichtlich ihrer Lagerstabilität, als auch ihres Löslichkeitsverhaltens oft sehr problematisch sind,
- unter Umständen eine geringe Membranpermeabilität, einhergehend mit einer geringen Bioverfügbarkeit aufweisen können,
- aufgrund proteolytischer Degradation eine geringe metabolische Stabilität haben.

Ein Ansatz diese Nachteile zu umgehen ist die Entwicklung von Peptidmimetika. Diese sind in der Literatur definiert als *Substanzen, die als Ligand oder Rezeptor den biologischen Effekt eines Peptids oder Proteins auf Rezeptor-Niveau imitieren oder blockieren können*<sup>[87]</sup> bzw. als *Substanz, die sowohl Sekundärstruktur als auch andere strukturelle Eigenschaften des Original Peptids/Proteins hat, was es ihr erlaubt, das Original Peptid/Protein an Rezeptoren oder Enzymen zu ersetzen*<sup>[88]</sup>. Es handelt sich hierbei also prinzipiell um die nicht-peptidische Nachbildungen biologisch aktiver Substrukturen von Proteinen.

Peptidmimetika gewinnen immer mehr an Bedeutung im biologisch-chemischen und pharmazeutischen Bereich. Dabei sind sie neben der Anwendung als Wirkstoffe auch in wissenschaftlicher Hinsicht interessant, beispielsweise bei der Aufklärung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Oft ist es nicht möglich, Komplexstrukturen von Proteinen zu kristallisieren oder NMR-spektroskopisch auszuwerten. Mit Hilfe kleinerer Konstrukte kann das mitunter gelingen. Dadurch können Hinweise auf Bindungs- oder Reaktionsmodi erhalten werden.

Als pharmakologische Wirkstoffe bieten Peptidmimetika gegenüber den physiologisch aktiven Proteinen interessante Vorteile, wie zum Beispiel die Verstärkung der Wirksamkeit, die Erhöhung der Selektivität zur Verminderung von Nebenwirkungen, die Schaffung oraler Bioverfügbarkeit oder die Verlängerung der Wirkungsdauer durch Reduktion des enzymatischen Abbaus im Organismus.<sup>[87-91]</sup> Bei der Entwicklung solcher Peptidmimetika werden in der Regel zunächst mit Hilfe computergestützter Methoden und Strukturinformationen aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie Leitstrukturen entwickelt. Da Peptidmimetika üblicherweise chemisch synthetisiert werden, ergibt sich eine enorme strukturelle Vielfalt. Neben dem Einbau unnatürlicher Aminosäurederivate bei der automatisierten Festphasenpeptidsynthese, von denen bereits viele kommerziell erhältlich sind, sind die verschiedensten Modifikationen denkbar (s.u.). Nach Evaluation der ersten synthetisierten Leitstrukturen können diese sukzessive sowohl hinsichtlich ihrer Bindungs-, als auch sonstiger Wirkstoffeigenschaften optimiert werden. Beispiele für bereits als Arzneimittel eingesetzte Peptidmimetika sind der ACE-Hemmer Captopril<sup>[92]</sup> oder der HIV-Proteaseinhibitor Saquinavir<sup>[93]</sup>.

Die Möglichkeiten zur Modifizierung der Peptidstruktur sind, wie schon gesagt, sehr vielfältig und können von leichten Veränderungen der Ausgangsstruktur bis hin zum reinen

Nichtpeptid reichen. Ein klassischer Ansatz ist die Modifikation der Seitenkette, angefangen beim Austausch von L- gegen D-Aminosäuren. Im Rahmen der synthetisch-chemischen Möglichkeiten sind der Phantasie hier nahezu keine Grenzen gesetzt. Ein Beispiel für eine simple Modifikation mit weitreichenden Auswirkungen ist die Methylierung von Tyrosin an der  $\beta$ , 2' und 6' Position, was zur Einschränkung der Rotation um die  $C^\beta$ - $C^\gamma$ -Bindung führt und damit zur Begünstigung bioaktiver Konformationen beitragen kann.<sup>[94]</sup> Auch das Peptidrückgrat selbst kann modifiziert werden. Dabei können entweder zusätzliche Gruppen zur Kettenverlängerung eingeführt werden, wie das z.B. bei  $\beta$ -Aminosäuren der Fall ist, oder die einzelnen Kettenglieder (NH, CH, CO) durch andere Funktionalitäten wie beispielsweise O, N, CS, S, BH, SO, SO<sub>2</sub> etc. ersetzt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Darstellung zyklischer Peptide, wobei die Überbrückung sowohl innerhalb eines Aminosäurerestes vorliegen als auch mehrere Aminosäuren umfassen kann. Hier wiederum ergeben sich drei weitere Möglichkeiten: die Zyklisierung kann von Rückgrat zu Rückgrat, vom Rückgrat zur Seitenkette oder von der Seitenkette zur Seitenkette (*side chain-to-side chain*) erfolgen. Zyklische Peptide sind auch in der Natur weit verbreitet. Sie wurden unter anderem in Pflanzen, Pilzen<sup>[95]</sup>, einfachen marinen Lebewesen, wie z.B. Schwämmen, sowie Bakterien gefunden<sup>[96,97]</sup>. Der Vorteil zyklischer Peptide liegt zum einen in der, verglichen zu ihren linearen Analoga, höheren metabolischen Stabilität, da sie für proteolytische Degradation weniger anfällig sind. Dadurch lässt sich im pharmazeutischen Einsatz eine längere Wirkungsdauer erzielen. Zum anderen sind sie durch die konformationelle Rigidität weniger flexibel, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität und Rezeptorselektivität führen kann. Außerdem wird eine erhöhte Membranpermeabilität diskutiert.<sup>[98]</sup> Um bioaktive Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter oder *turns* zu stabilisieren, können bestimmte Aminosäuresequenzen oder auch nicht proteinogene Gruppen in das Peptidmimetikum eingeführt werden. Beispiele dafür sind die  $\alpha$ -Helix-Induktoren vom Typ zyklischer Hydrazide<sup>[88]</sup> oder die kovalente Verknüpfung von Aminosäureresten zur Stabilisierung der helikalen Konformation<sup>[99]</sup>.

## 2. Zielsetzung

Die 2005 von Möller *et al.* veröffentlichte NMR-Struktur der ersten beiden Zinkfingerdomänen des *double-stranded RNA-binding proteins ZFa* lieferte erste Hinweise auf die strukturellen Anforderungen für die spezifische Erkennung von doppelsträngiger RNA. Es wird vermutet, dass dabei die *Helix-turn-helix*-Strukturen der beiden Zinkfingerdomänen ZF1 und ZF2 eine entscheidende Rolle spielen. Bislang sind weder die Funktion des Proteins noch das natürliche Substrat oder strukturelle Anforderungen an dieses bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, nähere Erkenntnisse über diese Wechselwirkung zu erhalten, sowie das HTH-Motiv im Peptidkontext nachzubilden. Dazu sollte zunächst ein Protein-konstrukt der ersten beiden Zinkfingerdomänen in Minimalmedium exprimiert werden, um für NMR-Experimente zugängliches  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein zu erhalten.

Um Hinweise auf mögliche Bindungspartner zu erhalten sollten verschiedene Oligonukleotidmotive auf ihre Wechselwirkung mit dem Protein untersucht werden. Dazu sollten verschiedene biophysikalische Methoden eingesetzt werden.

Ausgehend von den HTH-Motiven beider Zinkfingerdomänen sollten verschiedene Peptide hergestellt werden, die der Proteinstruktur möglichst nahe kommen sollten. Neben der Synthese linearer Peptide sollten auch zyklische Vertreter synthetisiert werden, um die Zinkkoordination der beiden Histidinreste zu imitieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine Zinkkoordination auch im Peptidkontext möglich ist.

Neben der für Peptide nach erfolgter Synthese üblichen Charakterisierung mittels HPLC und Massenspektrometrie sollten die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Resonanzen der Peptide mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Experimenten zugeordnet werden. Mit den bestimmten Kopplungskonstanten und dem Vergleich der chemischen Verschiebungen mit tabellierten Werten für *random-coil*-Strukturen könnten so Hinweise auf partiell vorliegende Sekundärstrukturmerkmale erhalten werden.

Zur Untersuchung der dsRNA-Affinität der synthetisierten Peptide sollte ein Fluoreszenzassay, der auf der Spaltung eines entsprechend modifizierten RNA-Substrates durch das Hammerhead-Ribozym beruht, angewendet und auf seine Tauglichkeit für diese Art Fragestellung evaluiert werden. Zusätzlich sollte die Affinität zu verschiedenen Oligonukleotiden mit Hilfe von NMR-Titrations und SPR-Spektroskopie untersucht werden.

## 2. Zielsetzung

---

Desweiteren sollten Derivate der Peptide synthetisiert werden, die eine Immobilisierung auf SPR-Sensorchips ermöglichen. Damit könnte es möglich sein, eine große Anzahl verschiedener Oligonukleotide als mögliche Peptidliganden zu testen.

Als ebenfalls interessantes Vorbild für die Entwicklung spezifischer dsRNA-bindender Peptide könnte die  $\alpha$ 1-Helix des Proteins Rnt1p dienen. Daher sollten ausgehend von deren Sequenz ebenfalls Peptide synthetisiert werden um die Wechselwirkung mit verschiedenen Oligonukleotidmotiven zu untersuchen. Wie bei den ZFa-Nachbildungen sollten auch hier Derivate zur Immobilisierung auf SPR-Sensorchips hergestellt werden.

Außerdem sollten mit den Rnt1p-Peptiden der Einfluss einer N-terminalen PEG-Funktionalisierung auf Reinigung und Analytik sowie die Einführung eines photoschaltbaren Azobenzollinkers untersucht werden. Mit letzterem könnte, durch Verbrückung über zwei Cystein-Seitenketten, eine helikale Konformation durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge stabilisiert bzw. gestört werden.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe Zumbusch, Universität Konstanz, sollte ein Pyrrolopyrrol-Cyanin-basierter NIR-Fluoreszenzfarbstoff kovalent an ein zellmembrandurchdringendes Peptid gekuppelt werden. Mit Hilfe des Peptidrestes sollte versucht werden, den Farbstoff in lebende HeLa-Zellen zu schleusen und dessen Verhalten dort fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

## 3. Methoden

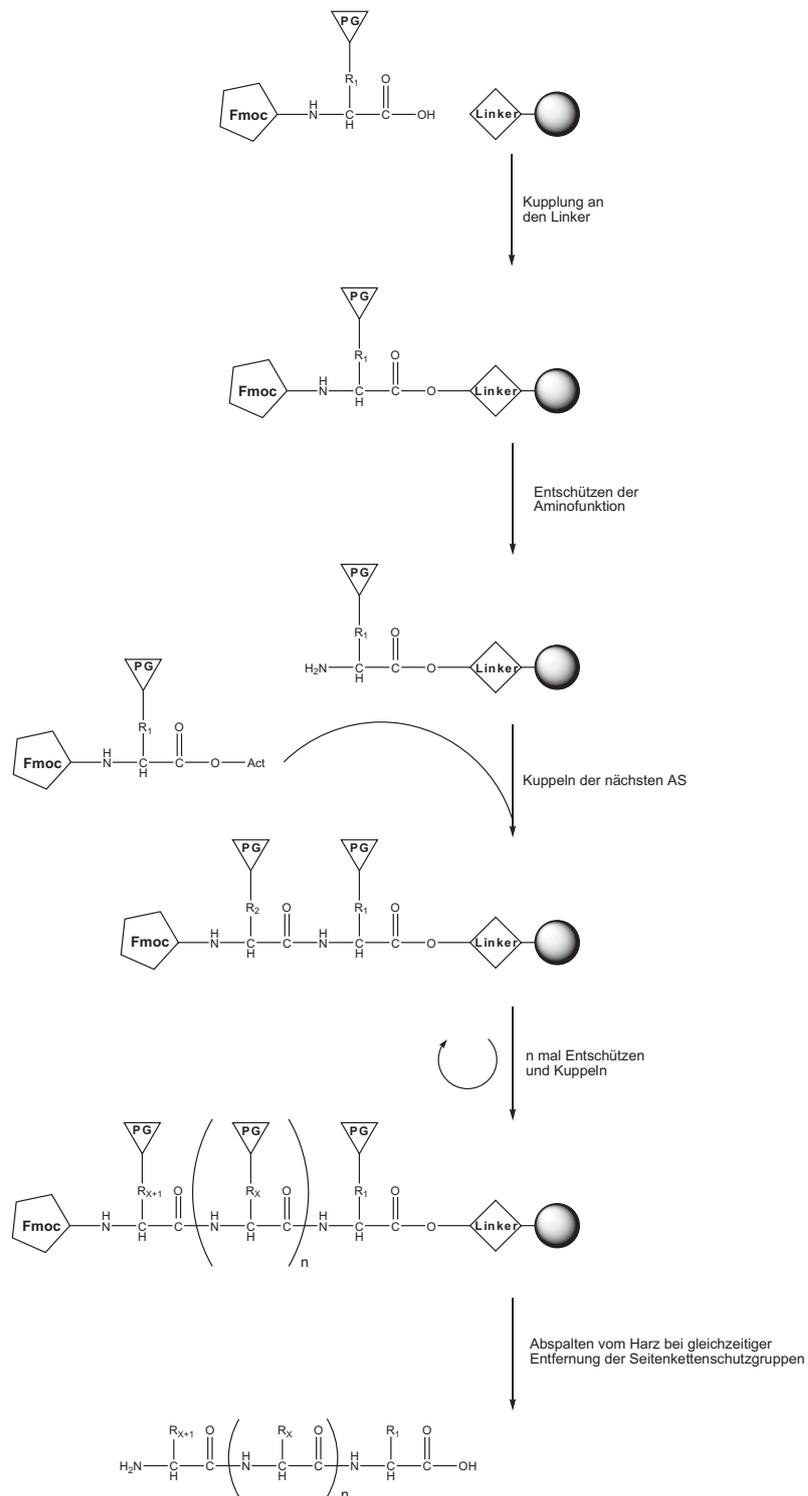
### 3.1. Peptidsynthese

Während zur Herstellung von Proteinen und großen Peptiden (> 60 Aminosäuren) üblicherweise auf gentechnische und enzymatische Methoden zurückgegriffen wird, nutzt man bei kürzeren Peptiden im Allgemeinen chemische Methoden, bei denen das Molekül der Reihe nach aus einzelnen Bausteinen aufgebaut wird. Ein Meilenstein war hierbei die Peptidsynthese an festen Trägern (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS), die erstmals 1963 von Merrifield beschrieben wurde.<sup>[100]</sup> Sie basiert auf einer kovalenten Verknüpfung der wachsenden Peptidkette an einen unlöslichen polymeren Träger und dem schrittweisen Aufbau des Peptides vom C- zum N-Terminus mittels aufeinanderfolgender Kupplungs- und Abspaltzyklen. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Überschüsse an Reagenzien und eventuelle Verunreinigungen durch Nebenprodukte durch einfache Wasch- und Filtrationsprozesse vom polymergebundenen Peptid abgetrennt werden können. Damit und aufgrund der sich immer wiederholenden Schritte ist die SPPS sehr gut für eine Automatisierung geeignet, was eine erhebliche Verringerung des Zeit- und Arbeitsaufwandes bedeutet. Nach Abschluss der Synthese kann das Peptid vom polymeren Träger abgespalten, gereinigt und charakterisiert werden.

Der eigentliche Aufbau des Peptides erfordert den Einsatz verschiedener Schutzgruppen. Dabei müssen der N-Terminus und die Seitenkettenfunktionalitäten orthogonal geschützt werden, d.h. die Schutzgruppen müssen sich unabhängig voneinander abspalten lassen. Eine sehr häufig verwendete Methode ist die Fmoc/tBu-Strategie.<sup>[101,102]</sup> Dabei wird eine Aminosäure mit Fmoc-geschütztem N-Terminus über ihre zuvor aktivierte C-terminale Carboxylgruppe an einen polymeren Träger gekuppelt. Durch Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe und Wiederholung des Kupplungsschrittes kann so sukzessive die gewünschte Peptidsequenz aufgebaut werden (Abb. 3.1). Um Peptide mit Deletionsstellen zu vermeiden, welche die abschließende Reinigung erheblich erschweren würden, werden verbleibende freie Aminogruppen nach jedem Kupplungsschritt mit Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) acetyliert.

Um bei der Kondensation eine Nebenreaktion mit den Seitenkettenfunktionalitäten der eingesetzten Aminosäuren zu verhindern, werden diese mit zur Fmoc-Entschützung or-

### 3. Methoden



**Abbildung 3.1.:** Fließschema der Fmoc-Peptidsynthese. PG steht allgemein für eine Seitenkettenschutzgruppe, Act für eine aktivierte Säurefunktion.

thogonalen Schutzgruppen vorübergehend blockiert. In der Regel werden hier säurelabile Gruppen, wie beispielsweise die *tert*-Butyl-Schutzgruppe verwendet. Diese haben den weiteren Vorteil, dass sie am Ende der Synthese gemeinsam mit dem Peptid von der festen Phase abgespalten werden können. Daneben gibt es eine große Anzahl weiterer geschützter Aminosäurederivate, die abhängig von der jeweiligen Synthesestrategie eingesetzt werden können.

Zur oben beschriebenen Aktivierung der Carboxylgruppe der zu kuppelnden Aminosäure stehen heute zahlreiche Reagenzien zur Verfügung. Üblicherweise wird die Säurefunktion in einen deutlich reaktiveren Aktivester überführt, der dann mit der freien Aminofunktion des festphasengebundenen Peptids reagiert. Eine ausführliche Diskussion über die verschiedenen Kupplungsreagenzien ist in den Reviews von Montalbetti<sup>[103]</sup> und Katritzky<sup>[104]</sup> sowie im Novabiochem-Katalog<sup>[105]</sup> gegeben. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Benzotriazol-derivate verwendet. Diese haben, im Vergleich zu den früher verwendeten Carbodiimidreagenzien, in polaren Lösungsmitteln wie DMF oder NMP deutlich bessere Kupplungseigenschaften.

Als erster Vertreter hielt das von Castro eingeführte (Benzotriazol-1-yl-oxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP)<sup>[106]</sup> Einzug in die Peptidsynthese. Aufgrund der Bildung des stark kanzerogenen HMPT (Hexamethylenphosphorsäuretriamid) wird es heute aber weitgehend durch Guanidinium- (Abb. 3.2) oder zu BOP analoge, weniger giftige Phosphoniumsalze<sup>[107]</sup> ersetzt (Abb. 3.3). Für die Kupplungsreagenzien HBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat), TBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat) und HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) vermutete man lange Zeit die Struktur von Uroniumsalzen (O-Form). NMR-Daten und Röntgenstrukturanalysen zeigten jedoch, dass diese Reagenzien tatsächlich als Guanidiniumsalze (N-Form) vorliegen.<sup>[108]</sup> Um die aktive Acyl-Guanidinium- oder -Phosphonium-Spezies für die Amidkupplung zu erhalten, muss die Säurefunktion der Aminosäure durch Zusatz eines tertiärenamins (Et<sub>3</sub>N oder DIPEA (Diisopropylethylamin)) deprotoniert werden.

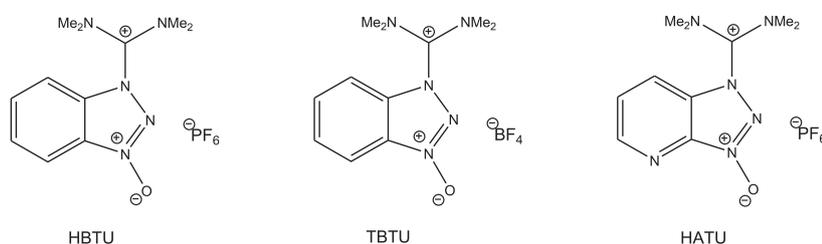
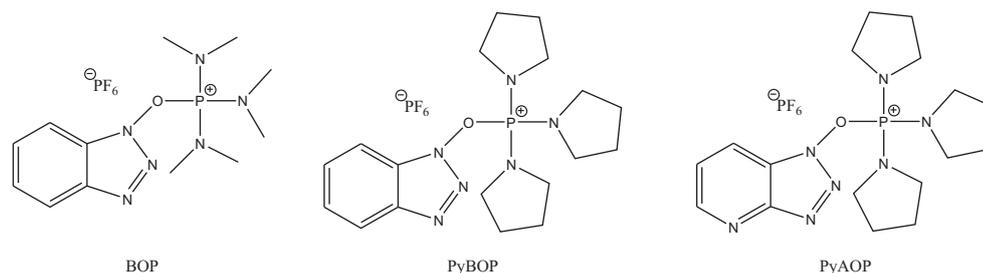


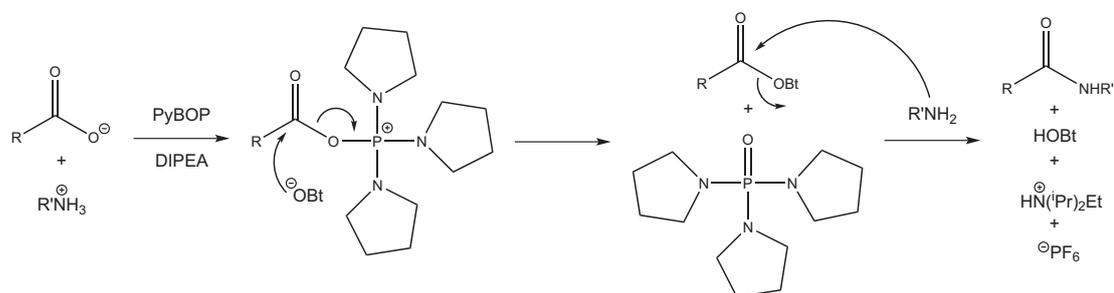
Abbildung 3.2.: Guanidinium Kupplungsreagenzien

### 3. Methoden

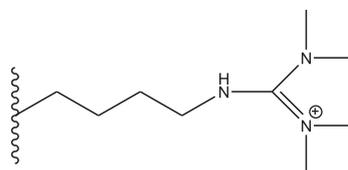


**Abbildung 3.3.:** Phosphonium Kupplungsreagenzien

Als Additive werden bei der Kupplung gerne *N*-Hydroxyverbindungen (z.B. HOBT (1-Hydroxybenzotriazol), HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol)) zugesetzt. Sie sollen der Senkung der Stereomutation dienen, indem die Bildung des intermediären Aktivesters beschleunigt wird.<sup>[109]</sup> Zusätzlich sollen sie eine Verminderung des nachteiligen Einflusses der tertiären Base bewirken.<sup>[110]</sup> Aufgrund der 2005 publizierten explosiven Eigenschaften von HOBT<sup>[111]</sup> und der daraus resultierenden Auflagen für den Transport ist dieses mittlerweile nicht mehr kommerziell erhältlich. Sowohl eigene Beobachtungen als auch Untersuchungen in der Literatur<sup>[107,112]</sup> deuten jedoch auf eine nahezu identische Kupplungseffizienz ohne den Zusatz von HOBT hin.



**Abbildung 3.4.:** Mechanismus der Aktivierung mit PyBOP. Zur Deprotonierung der Aminosäure ist die Zugabe einer tertiären Base erforderlich.



**Abbildung 3.5.:** Mögliches Nebenprodukt bei der Verwendung von Guanidiniumreagenzien.

Im Hinblick auf ihre Reaktivität sind die jeweils analogen Guanidinium- und Phosphoniumsalze nahezu äquivalent.<sup>[113]</sup> Ist eine freie Aminofunktion zugegen (bei ungeschützten

Seitenketten oder Zyklisierungen über ein Lactam), können Guanidiniumreagenzien jedoch eine Nebenreaktion in Form einer *N*-Guanidinium-Bildung eingehen (Abb. 3.5), was zu einer irreversiblen Blockierung der Aminofunktion führt.<sup>[114,115]</sup> Da die Kupplung bei gängigen Peptidsynthesen im Vergleich zur Bildung des Nebenproduktes sehr schnell verläuft, tritt das Problem in der Regel nur bei langsamen oder stark gehinderten Kupplungen (wie z.B. Zyklisierungen) auf. In solchen Fällen wird in der Regel auf Phosphoniumreagenzien zurückgegriffen. Bei automatisierten Synthesen wird hingegen trotz der möglichen Nebenreaktion meist HBTU oder TBTU verwendet, da deren Lösungen in DMF stabiler sind.<sup>[102]</sup>

Wesentlich reaktiver als die anderen Vertreter ihrer Gruppe sind die beiden 7-Aza-Derivate HATU und PyAOP. Durch den elektronenziehenden Effekt des zusätzlich eingeführten Ringstickstoffs in 7-Position wird zum einen eine Stabilisierung der Abgangsgruppe erreicht, zum anderen wird im Aktivester die Ausbildung eines Nachbargruppeneffektes ermöglicht (Abb. 3.6).<sup>[116]</sup> Dies erhöht gleichzeitig die Reaktivität und trägt zur Erhaltung der Konfiguration bei.<sup>[117]</sup>

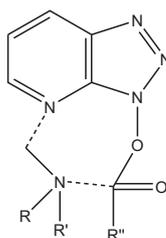


Abbildung 3.6.: Nachbargruppeneffekt bei der Verwendung von HOAt.

## 3.2. Proteinexpression

Ab einer Größe von etwa 60 Aminosäuren wird bei der Herstellung von Peptiden und Proteinen in der Regel auf molekularbiologische Methoden zurückgegriffen. Dazu werden Organismen wie beispielsweise Bakterien, Pilze oder Säugetierzellen gentechnisch so verändert, dass sie das gewünschte Protein in großen Mengen herstellen. Der am häufigsten verwendete und am besten untersuchte Organismus ist das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*)<sup>[118]</sup>. Es zeichnet sich vor allem durch seine Robustheit und kurze Generationszeiten aus.

Damit die Bakterien das gewünschte Protein exprimieren, müssen zunächst die genetischen Informationen dafür vorhanden sein. Dies erreicht man durch die sogenannte Transformation. Dabei werden zunächst die Bakterienzellen kompetent, d.h. die Zellmembran für fremde DNA durchlässig gemacht. Dies wird häufig mit einem Hitzeschock erreicht,

wobei die Zellen zunächst mit  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{RbCl}$  oder  $\text{MnCl}_2$  behandelt und dann für kurze Zeit auf  $42^\circ\text{C}$  erhitzt werden. Salz und Hitze bewirken eine Perforation der Membran, durch die dann die fremde DNA in die Zelle gelangen kann. Die eingeschleuste DNA enthält die genetische Information für das zu exprimierende Protein sowie einen oder mehrere Selektionsmarker. Dabei handelt es sich um Resistenzgene gegen bestimmte Antibiotika. Diese sind wichtig, da üblicherweise nur ein Bruchteil der eingesetzten Zellen die fremde DNA aufnimmt. Die transformierten Zellen können dann auf das entsprechende Antibiotikum enthaltenden Agar-Platten kultiviert werden, wobei sich nur diejenigen Zellen vermehren bzw. überleben, die die entsprechenden Resistenzen und somit auch die Information für das gewünschte Protein in ihrem Genom tragen.

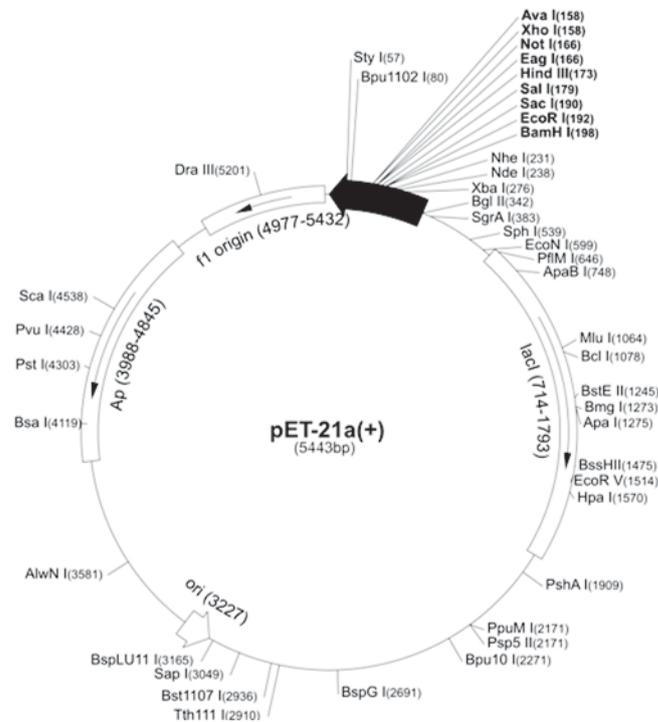
#### **Der pET-21-Vektor**

Das pET-System ist ein häufig verwendetes System zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*.<sup>[119]</sup> Es enthält mehrere Klonierungsstellen, an denen mit verschiedenen Restriktionsenzymen proteinkodierende DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Diese Klonierungsstellen, bzw. die eingefügten Gene des gewünschten Proteins, unterliegen der Expressionskontrolle des T7-Promotors, der durch die *E. coli* RNA-Polymerase nicht erkannt wird.<sup>[120]</sup> Daher muss man bei Verwendung dieses Vektors *E. coli*-Stämme verwenden, die das T7-RNA-Polymerase-Gen auf ihrer chromosomalen DNA tragen, wie zum Beispiel *E. coli* BL21 (DE3).

Die Expression von T7-Polymerase und gewünschtem Protein werden über ein lac-Operon reguliert. Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bewirkt eine allosterische Konformationsänderung des Lac-Repressors, was die Wechselwirkung mit dem lac-Operator inhibiert. Dadurch werden schließlich die Expression von T7-Polymerase und einkloniertem Protein induziert.

#### **Isolierung des gewünschten Proteins**

Zur Herstellung des gewünschten Proteins werden die transformierten Zellen auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht anwachsen gelassen. Einzelne Kolonien werden dann in zunächst wenigen Millilitern eines antibiotikahaltigen Wachstumsmediums kultiviert. Die Zellen werden in immer größere Mengen Nährlösung überführt, wobei stets UV/Vis-spektroskopisch die optische Dichte kontrolliert wird. Hat man die gewünschte Zelldichte erreicht, wird die Überexpression mit Hilfe von IPTG induziert. Nach einigen Stunden wird die Zellsuspension abzentrifugiert, die Zellen in geeignetem Puffer resuspendiert und darin aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile kann das ge-



**Abbildung 3.7.:** Vektorkarte des pET-21-Vektors. Im Bereich des schwarzen Pfeils sind die Klonierungsstellen für verschiedene Restriktionsenzyme enthalten.

wünschte Protein mittels chromatographischer Reinigung isoliert werden. Meist werden hier Ionenaustauscher-, Gelfiltrations-, und Affinitätsäulen verwendet.

Die eingesetzten Nährmedien enthalten alle für das Wachstum der Bakterien notwendigen Stoffe und unterscheiden sich zum Teil stark in ihrer Zusammensetzung, je nachdem welcher Bakterienstamm verwendet wird. Außerdem muss berücksichtigt werden, ob weitere Zusätze für die Stabilität des zu exprimierenden Proteins, beispielsweise bestimmte Ionen, notwendig sind. Benötigt man für NMR-Experimente markierte Proteine, wird die gesamte Anzucht in sogenanntem Minimalmedium durchgeführt, welches nur die für das Wachstum absolut benötigten Substanzen enthält. Zum Beispiel enthält M9-Medium als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoff-Quellen lediglich Glukose, Ammoniumchlorid und Wasser, welche je nach Bedarf unterschiedlich isotopenmarkiert eingesetzt werden können.

### 3.3. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist ein vielseitiges Werkzeug zur strukturellen Charakterisierung von Molekülen und deren Wechselwirkungen untereinander. Bis Ende der 80er Jahre wurden Proteinstrukturen fast ausschließlich durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Seit-

dem hat die NMR-Spektroskopie bei der Proteinstrukturaufklärung deutlich an Bedeutung hinzugewonnen. Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse werden zur Strukturaufklärung mit Kernresonanzmethoden meist gelöste Probenmoleküle verwendet. Dabei entfallen zeitaufwändige Kristallisationsexperimente. Zudem kann unter Bedingungen gemessen werden, die den physiologischen näher kommen. Ohnehin lassen sich viele Proteine, insbesondere Membranproteine, nicht oder nur sehr schwer kristallisieren. Ein weiterer Vorteil der NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit, Protein-Ligand-Wechselwirkungen und molekulare Dynamik untersuchen zu können. Welche der beiden Methoden die vorteilhaftere ist, hängt stets vom zu untersuchenden System ab.

Zur NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung von Proteinen müssen diese in der Regel isotoopenmarkiert vorliegen, da die NMR-aktiven Isotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  nur eine sehr geringe natürliche Häufigkeit haben. Dies erreicht man entweder durch Einsatz der entsprechend isotoopenmarkierten Aminosäurebausteine (SPPS) oder durch Expression in entsprechend markiertem Minimalmedium.

Anders als bei der Röntgenstrukturanalyse ist für NMR-spektroskopische Methoden die Proteingröße ein limitierender Faktor. Ab einer Größe von 30 kDa muss man üblicherweise auf die TROSY-Methodik zurückgreifen, für Proteine über 100 kDa steht darüberhinaus noch CRIPT bzw. CRINEPT zur Verfügung.<sup>[121–124]</sup>

Bei kleineren Proteinen und Peptiden (bis ca. 10 kDa) ist die Strukturbestimmung oft auch ohne Isotoopenmarkierung möglich. Hierzu nimmt man eine Serie unterschiedlicher zweidimensionaler Spektren auf und nutzt den jeweils charakteristischen Informationsgehalt (Tab. 3.1). So erfolgt beispielsweise die Zuordnung der Sequenz anhand von TOCSY- und NOESY-Spektren. Die Protonenresonanzen der Seitenketten können anhand von TOCSY- und COSY-Kreuzsignalen eindeutig zugeordnet werden. Kohlenstoff- und Stickstoffverschiebungen sind über entsprechende HSQC- und HMBC-Experimente zugänglich.

Über die Kopplungskonstanten lassen sich des Weiteren Informationen über Torsionswinkel erhalten. Atomabstände können zudem mit Hilfe der NOE-Aufbauarten abgeschätzt werden. Damit lassen sich mit computergestützten Verfahren dreidimensionale Strukturen berechnen. Ein dazu häufig verwendetes Verfahren ist das sog. *simulated annealing*, bei dem in mehreren Zyklen das Erwärmen und das Abkühlen eines Moleküls simuliert wird. In der Phase hoher Temperatur wird zunächst ein großer Bereich des Konformationsraums abgesucht. Beim anschließenden langsamen Abkühlen werden neben den vom verwendeten Kraftfeld abhängigen Parameter (z.B. Bindungslängen und -winkel, Ramachandran-Plot, Van-der-Waals-Radien) NMR-Strukturinformationen über Energieterme, sog. *constraints* berücksichtigt, welche bestimmte Konformationen bevorzugen. Während bei einfachen Energieminimierungen nur das lokale Optimum gefunden wird, besteht beim *simulated*

Tabelle 3.1.: Informationsgehalt ausgewählter NMR-Experimente.

Spektrum	steht für	Kreuzsignale zu
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>	geminal und vicinal gekoppelten Protonen, selten: <i>long-range</i> Kopplungen über mehr als drei Bindungen
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>	allen Resonanzen eines Spinsystems
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	direkt gebundenen Heterokernen
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	Heterokernen, die 2 oder 3 Bindungen entfernt sind
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>	Kernen, die sich in räumlicher Nähe befinden (max. 5 - 6 Å entfernt)
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>	Kernen, die sich in räumlicher Nähe befinden (max. 5 - 6 Å entfernt)

*annealing* die Chance, viele Strukturen im globalen Optimum zu erhalten. Die endgültige NMR-Struktur wird durch ein Ensemble der Strukturen repräsentiert, die nach dem simulierten Abkühlen die geringsten Verletzungen der NMR-Strukturinformationen aufweisen.

### 3.3.1. Homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie

Bei homonuklearen zweidimensionalen Spektren sind in der Regel in beiden Dimensionen die chemischen Verschiebungen von Protonen miteinander korreliert. Dabei können entweder skalare Kopplungen (über kovalente Bindungen) oder dipolare Wechselwirkungen (durch räumliche Nähe) ausgenutzt werden. Ersteres kann mittels COSY- und TOCSY-Spektren beobachtet werden, letzteres durch NOESY- bzw. ROESY-Spektren.

#### H,H-COSY

Beim COSY-Experiment<sup>[125]</sup> erhält man Kreuzsignale von Protonen, die zwei (geminale Kopplung) oder drei (vicinale Kopplung) Bindungen voneinander entfernt sind. In seltenen Fällen können auch Kopplungen über vier oder mehr Bindungen beobachtet werden. Die dabei zu Grunde liegende Pulssequenz ist  $90^\circ_x-t_1-90^\circ_x$ -FID (Abb. 3.8). Dabei bewirkt der zweite  $90^\circ$ -Puls einen Polarisationstransfer, der unter anderem von der Kopplungskonstante zweier Protonen abhängig ist. Durch Inkrementieren der  $t_1$ -Zeit erhält man aus einer Serie von eindimensionalen Spektren das 2D-Spektrum.

COSY-Spektren eines Peptides eignen sich besonders gut zur eindeutigen Zuordnungen von Protonenresonanzen der Aminosäure-Seitenketten. Ist aus anderen Experimenten beispielsweise die chemische Verschiebung des Amid-Protons einer Aminosäure bekannt, kann

man von diesem ausgehend die Kette Kreuzsignal für Kreuzsignal entlanggehen und damit die Seitenkettenprotonen eindeutig zuordnen. Außerdem lassen sich aus phasensensitiven COSY-Spektren Kopplungskonstanten bestimmen, aus denen Hinweise zu bevorzugten Sekundärstrukturmerkmalen erhalten werden können (3.3.4).

#### **H,H-TOCSY oder HOHAHA**

Wie bereits beim COSY-Experiment beschrieben, werden auch beim TOCSY-Experiment<sup>[126]</sup> skalare Kopplungen ausgenutzt. Der zweite  $90^\circ_x$ -Puls wird hier durch einen sogenannten *Spin-Lock* ersetzt. Dabei werden die Spins durch mehrere aufeinanderfolgende  $180^\circ_y$ -Pulse in der x,y-Ebene gehalten, analog zum homonuklearen Spin-Echo. Unter diesen Bedingungen starker Kopplung wird die Evolution der chemischen Verschiebungen verhindert, die Spin-Spin-Kopplung jedoch nicht beeinflusst. Durch Mischung der Spinzustände wird so die Magnetisierung eines Protons auf alle anderen im selben Spinsystem übertragen. Die Effektivität dieses Prozesses hängt von den jeweiligen Kopplungskonstanten, der Entfernung (Anzahl der Bindungen) zwischen den koppelnden Kernen und der Dauer der Spinlock-Bedingungen ab.<sup>[127,128]</sup> Letztere liegt bei Peptiden üblicherweise zwischen 50 und 150 ms.

Im TOCSY-Spektrum erhält man so für jedes Spinsystem mehrere zur Diagonalen symmetrische Spuren (jeweils eine ausgehend von jedem Proton). Daher ist diese Methode besonders gut zur Untersuchung von Peptiden und Oligosacchariden geeignet. Während man bei letzteren einzelne Spuren für jede Zucker-Einheit erhält, ergeben sich bei Peptiden charakteristische Muster für verschiedene Aminosäuren.

#### **H,H-NOESY und H,H-ROESY**

Als Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) wird der Effekt bezeichnet, durch den sich die Intensitäten von NMR-Signalen verändern, wenn die Besetzungsverhältnisse anderer Übergänge gegenüber dem Gleichgewichtszustand verändert werden. Die Stärke des Effekts beruht auf der dipolaren Relaxation und hängt dadurch vom räumlichen Abstand der betreffenden Kerne sowie der Rotationskorrelationszeit ab. Im Gegensatz zur skalaren Kopplung wirkt die dipolare Wechselwirkung nicht über Bindungselektronen, sondern durch den Raum („*through space*“). NOE-Experimente liefern daher Daten über Protonen, die sich zwar räumlich nahe kommen, aber nicht durch Elektronenpaare miteinander verbunden sein müssen.

Beim NOESY-Experiment<sup>[129]</sup> werden also Informationen über sich räumlich nahe stehende Protonen erhalten. Die Intensität der Kreuzsignale hängt vom räumlichen Abstand  $r$  der koppelnden Protonen ab und ist in erster Näherung proportional zu  $\frac{1}{r^6}$ . Die Effizienz des NOE-Transfers wird von der Kreuzrelaxationsrate  $\sigma$  bestimmt, welche mit den Doppel-

(W2) und Nullquantenübergängen (W0) über  $\sigma = W2 - W0$  verknüpft ist. Bei kleinen Molekülen überwiegt der W2-, bei größeren der W0-Anteil. Bei  $W2 = W0$  ergibt sich kein NOE-Signal. Dies ist, abhängig von der Messfrequenz, der Größe der Moleküle und der Viskosität der Lösung, bei Molekülen mit einem Molekulargewicht von 1 - 2 kDa der Fall. Hier kann auf das ROESY-Experiment zurückgegriffen werden (s.u.).

NOE-Kreuzsignale sind bis zu einem Abstand von etwa 5 Å beobachtbar. Insbesondere bei Proteinen können NOESY-Spektren wertvolle Strukturinformationen liefern, da Wechselwirkungen zwischen Protonen beobachtbar sind, die zwar in der Primärstruktur weit voneinander entfernt sind, sich aufgrund der Proteinfaltung aber in der Tertiärstruktur sehr nahe kommen. Die genauesten Abstandsinformationen erhält man durch Aufnahme von NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten. Durch Auftragung der erhaltenen Intensität gegen die Mischzeit erhält man die sog. NOE-Aufbaurrate. Sie ist am Anfang annähernd linear, sodass sich über die Steigung Abstandsinformationen gewinnen lassen. Ein Problem stellen jedoch die relativ geringen Intensitäten zu Beginn eines solchen NOE-Aufbaus dar.

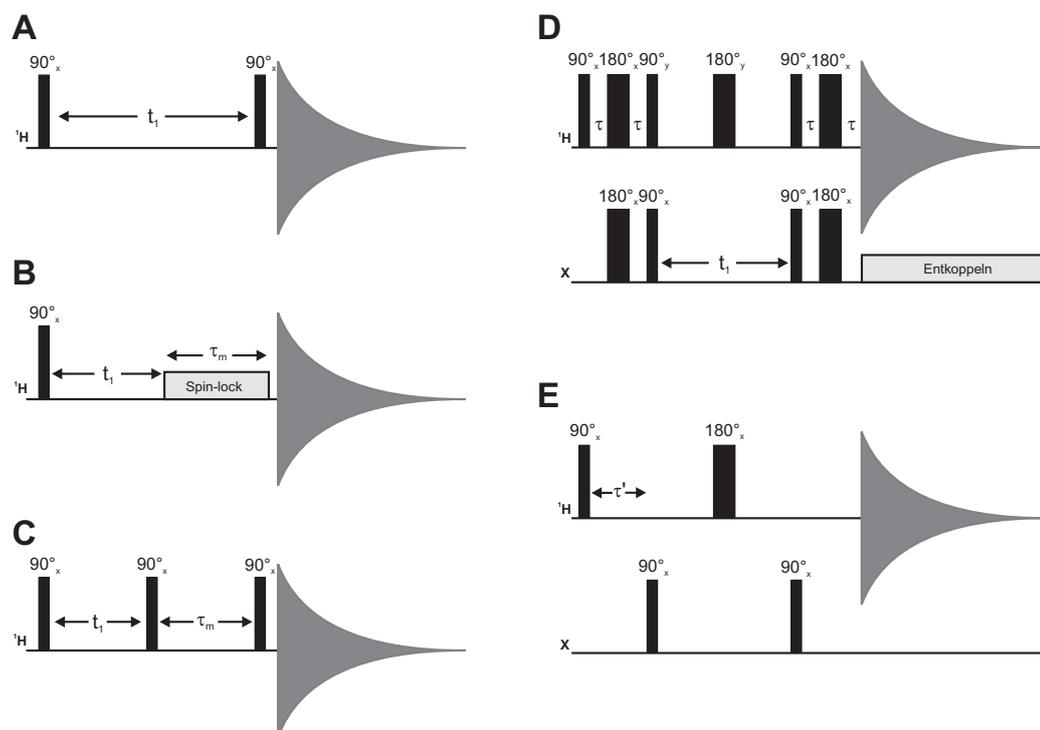
Wie das NOESY-Experiment beruht auch das ROESY (*Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*)-Experiment auf dipolarer Relaxation. Die Relaxationsprozesse finden allerdings unter Spinlock-Bedingungen statt. Daher kann es in ROESY-Spektren zu TOCSY-Artefakten kommen. Während der NOE wie oben beschrieben einen Nulldurchgang hat, der ein Verschwinden von Signalen bei bestimmten Korrelationszeiten (bzw. Flexibilität) bewirken kann, ist der ROE stets positiv (d.h. es ergeben sich stets Kreuzsignale mit umgekehrten Vorzeichen zur Diagonale). Die maximale Verstärkung ist allerdings schwächer als beim NOESY-Experiment.

### 3.3.2. Heteronukleare 2D-NMR-Spektroskopie

Bei heteronuklearen Experimenten werden Resonanzfrequenzen verschiedener Kerne miteinander korreliert. Am gängigsten sind Korrelationen von Protonen mit  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -Kernen, mit der entsprechenden Hardware sind aber viele weitere Korrelationen möglich. Da die klassischen heteronuklearen 2D-Verfahren, wie z.B. das C,H-COSY, sehr lange Messzeiten beanspruchen, wird heutzutage standardmäßig auf sogenannte inverse Verfahren zurückgegriffen.

#### HSQC

Das HSQC-Experiment ist ein inverses Verfahren. Dabei wird zunächst die Polarisation der  $^1\text{H}$ -Kerne auf den direkt gekoppelten  $^{13}\text{C}$ -Kern übertragen. Nach der Entwicklung der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebung wird zurücktransferiert und auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal detektiert.



**Abbildung 3.8.:** Schematische Darstellung der Pulssequenzen der beschriebenen Experimente. Auf der linken Seite sind die homonuklearen Experimente dargestellt. A: einfachste Pulssequenz für ein COSY-Experiment; B: Pulssequenz für das TOCSY-Experiment; C: NOESY-Experiment.  $t_1$  ist die inkrementierte Entwicklungszeit,  $\tau_m$  die jeweilige Mischzeit. Die Pulssequenz für das ROESY-Experiment ist im Prinzip mit der des TOCSY (B) identisch, sie unterscheiden sich jedoch in der Länge der Mischzeit und der Frequenz des Spin-locks. Auf der rechten Seite dargestellt sind die Pulssequenzen der beschriebenen heteronuklearen Experimente HSQC (D) und HMBC (E). Die Zeitintervalle  $\tau$  werden so gewählt, dass die jeweils gewünschten Kopplungen selektiert werden können.

Durch das größere gyromagnetische Verhältnis der Protonen resultiert sowohl durch die Anregung als auch bei der Detektion ein erheblicher Empfindlichkeitsgewinn. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wird üblicherweise während der Aufnahme des FID breitbandentkoppelt. Dadurch wird verhindert, dass die Signale aufgrund der  $J_{CH}$ -Kopplungen eine Duplett-Feinstruktur aufweisen.

Bei der Strukturaufklärung von Proteinen ist das H,N-HSQC<sup>[130]</sup> in der Regel das erste Experiment. Man erhält Signale für direkt an ein Stickstoffatom gebundene Protonen. Die Anzahl der Signale sollte also in etwa der Anzahl an Aminosäureresten entsprechen, wobei Proline, im Gegensatz zu Stickstoff-enthaltenden Seitenketten, keine Signale liefern. Anhand der Dispersion der chemischen Verschiebungen lässt sich relativ schnell beurteilen, ob ein Protein gefaltet vorliegt oder nicht. Analog dazu erhält man beim H,C-HSQC Signale für  $^1J$ -gekoppelte Protonen und Kohlenstoffatome. Vor allem bei kleineren Molekülen eignet

sich diese Experiment sehr gut zur Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen. Durch sogenannte Multiplizitätseditierung wird in einer speziellen Variante des HSQC bewirkt, dass Kreuzsignale von  $\text{CH}_2$ -Gruppen umgekehrtes Vorzeichen zu denen von  $\text{CH}$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen haben, was wertvolle Informationen für die Zuordnung von Seitenkettenprotonen von Peptiden oder Proteinen liefern kann.

## HMBC

Beim HMBC-Experiment<sup>[131]</sup> werden Korrelationspeaks für Protonen und  $^{13}\text{C}$ -Kerne erhalten, die zwei oder drei Bindungen voneinander entfernt sind. Damit lassen sich auch  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen von Carbonylgruppen und quaternären Kohlenstoffen ermitteln, die aus dem HSQC nicht zugänglich sind. Da  $^1\text{J}$ -Kopplungen erheblich größer als  $^{2,3}\text{J}$ -Kopplungen sind, lassen sich diese mit Hilfe eines sogenannten *low-pass*-Filters unterdrücken. Wie das HSQC ist auch das HMBC ein inverses Verfahren.

### 3.3.3. Wasserunterdrückung

Um NMR-Spektren von Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren in möglichst physiologischer Umgebung aufzunehmen, kommt man nicht umhin, Wasser oder wässrige Puffer als Lösungsmittel zu verwenden. Um die Signale der austauschenden Amin- und vor allem Amidprotonen nicht zu verlieren, kann man in der Regel auch nicht auf  $\text{D}_2\text{O}$  zurückgreifen.  $\text{H}_2\text{O}$  hat eine Protonenkonzentration von 110 M, wohingegen die Konzentration der gelösten Probe üblicherweise im millimolaren Bereich liegt. Selbst bei der Verwendung von  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem Deuterierungsgrad von 99,9 % Deuterium liegt die Protonenkonzentration immernoch bei etwa 100 mM. Durch diesen enormen Überschuss ergeben sich verschiedene Komplikationen, wie zum Beispiel eine Übersteuerung des Empfängers, Artefakte im Spektrum, Verzerrungen der Basislinie oder das sogenannte *radiation damping*. Dabei wechselwirkt der durch sehr starke Signale in der Empfängerspule induzierte Strom mit der transversalen Magnetisierung der Spins, was eine Verkürzung der Relaxationszeiten und damit Linienverbreiterung zur Folge hat. Auch sind in der Nähe des Wassersignals gelegene Peaks unter Umständen nicht mehr sichtbar.<sup>[132,133]</sup> Es gibt mittlerweile unzählige Möglichkeiten, das Wassersignal zu unterdrücken. In der Regel wird dies während bzw. vor der Messung erreicht, wobei auch Methoden beschrieben wurden, bei denen die Unterdrückung des Wassersignals nach der Aufnahme der Spektren geschieht<sup>[133,134]</sup>.

#### Presaturation (Presat)

Eine relativ einfache und unkomplizierte Möglichkeit der Wasserunterdrückung ist die selektive Sättigung des Wassersignals vor Anregung und Aufnahme des Spektrums.<sup>[135]</sup> Dabei

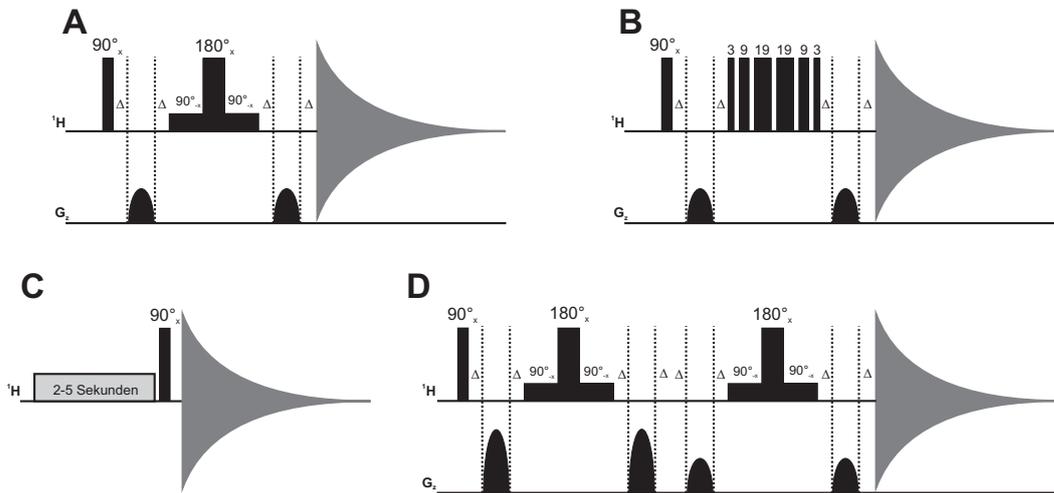
wird mit einem kontinuierlichen, schwachen Radiofrequenzfeld auf die Frequenz des Wassers eingestrahlt. Die Dauer der Einstrahlung liegt üblicherweise im Bereich von 2 - 5 Sekunden, wobei eine längere Pulsdauer zwar eine bessere Signalunterdrückung bringt, die Aufnahmezeit sich dadurch jedoch verlängert. Da für die Presat-Methode keine komplizierten Pulsfolgen nötig sind, lässt sie sich relativ einfach in bestehende Pulsprogramme integrieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass Signale, die nicht in der Nähe der Wasserfrequenz sind, von dem Sättigungspuls unberührt bleiben. Allerdings können Resonanzen in der Nähe des Wasser-signals zum Teil deutlich abgeschwächt werden. Ebenso kann es durch Sättigungstransfer zu einer Abschwächung von Signalen austauschbarer Protonen kommen.<sup>[136,137]</sup>

#### **Gepulste Feldgradienten**

Die heutzutage wahrscheinlich am häufigsten verwendete Methode zur Wasserunterdrückung ist die **WATERGATE**-Sequenz (*water suppression by gradient-tailored excitation*).<sup>[126,138,139]</sup> Dabei wird mit Hilfe von gepulsten Feldgradienten die Magnetisierung des Wassers vor der Aufnahme des FID zerstört. Schematisch kann man die Sequenz als  $G_1$ -S- $G_1$  beschreiben, wobei  $G_1$  zwei identische Gradientenpulse sind, die eine  $180^\circ$ -Spin-Echo-Sequenz S umschließen, die alle Magnetisierungen mit Ausnahme der des Wasser refokussiert. Die durch den Anregungspuls aufgebaute transversale Magnetisierung wird durch den ersten Gradienten dispergiert und durch den zweiten wieder refokussiert, sofern sie zuvor durch einen  $180^\circ_{-x}$ -Puls invertiert wurde. Bettet man diesen  $180^\circ_{-x}$ -Puls zwischen zwei auf das Wasser-signal selektive  $90^\circ_{-x}$ -Pulse, hat das Wasser keine Nettomagnetisierung, während alle anderen Spins das Spin-Echo durchlaufen und so durch den zweiten Gradienten wieder refokussiert werden können (Abb. 3.9). Oft werden für S Binomialsequenzen verwendet, wie zum Beispiel die 3-9-19-Sequenz<sup>[140]</sup>. Dadurch erhält man für die Wasserunterdrückung optimierte Anregungsprofile. Auch sind diese Sequenzen weniger empfindlich für Phasen- und Pulsinhomogenitäten. Ein Nachteil ist, dass Signale in der Nähe der Wasserfrequenz mitunter stärker abgeschwächt werden, da nicht mehr komplett selektiv auf diese eingestrahlt wird.

Eine Weiterentwicklung der WATERGATE-Methode ist das **Excitation Sculpting**<sup>[141]</sup>, welches eine sogenannte *double pulsed field gradient spin-echo* (DPFGSE)-Methode ist, während es sich beim WATERGATE um eine *single pulsed field gradient spin-echo* (SPFGSE)-Methode handelt. Im Prinzip ist es also eine Doppel-Echo-Version der WATERGATE-Sequenz, die man schematisch mit  $G_1$ -S- $G_1$ - $G_2$ -S- $G_2$  beschreiben kann. Die Vorteile dabei sind eine bessere Unterdrückung des Lösungsmittelsignals, eine größere Toleranz gegenüber schlecht kalibrierten Pulsen, Gradientenstärken und Feldinhomogenitäten und eine weniger verformte Basislinie.<sup>[133]</sup> Außerdem können mehrere Lösungsmittel gleichzeitig unterdrückt

werden.<sup>[142]</sup> Allerdings ist das Unterdrückungsprofil breiter und die Sequenz zur Wasserunterdrückung dauert doppelt so lange. Vor allem bei Probenköpfen mit hohem Q-Faktor kann zudem *radiation damping* auftreten. Dem kann entgegengewirkt werden, indem man die beiden Methoden *Excitation Sculpting* und *Presaturation* kombiniert.



**Abbildung 3.9.:** Pulssequenzen der beschriebenen Wasserunterdrückungsmethoden. In C ist die einfachste Möglichkeit, die sogenannte *Presaturation* gezeigt. Oben abgebildet sind zwei Beispiele für die WATERGATE-Methode. Bei A wird selektiv auf das Wassersignal eingestrahlt. B zeigt die Anwendung einer Binomialsequenz. D stellt im Prinzip eine Verdopplung von A dar, das *Excitation Sculpting*.

### 3.3.4. Konformationsanalyse

Wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben, ist die NMR-Spektroskopie ein wertvolles Werkzeug zur Strukturaufklärung von Proteinen. Durch Bestimmung möglichst vieler *constraints*, wie zum Beispiel Diederwinkeln oder Abständen zwischen Protonen, lässt sich so mit Hilfe computergestützter Verfahren ein dreidimensionales Bild von Proteinen erhalten, insbesondere, wenn große Teile davon geordnete Strukturmerkmale wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter aufweisen. Bei kleineren Proteinen ( $< 30$  Aminosäuren) und Peptiden ist dies häufig nicht mehr möglich, da hier in der Regel verschiedene Konformationen vorliegen, die schnell ineinander übergehen. Deshalb erhält man hier eher Hinweise auf bevorzugte Sekundärstrukturmerkmale.<sup>[143]</sup>

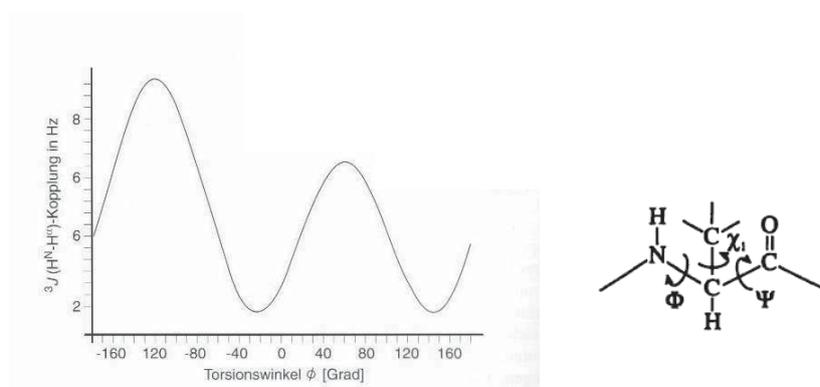
### Kopplungskonstanten

Mit Hilfe von Kopplungskonstanten kann man über die Karplus-Gleichung<sup>[144,145]</sup> Aussagen über Diederwinkel, wie z.B.  $\Phi$  oder  $\chi_1$  machen (Abb. 3.10), die eine grobe Abschät-

zung der Sekundärstruktur erlauben und wichtige Parameter zur Strukturaufklärung liefern. Es besteht zwar kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Kopplungskonstante und Bindungswinkel, jedoch können damit bestimmte Konformationen ausgeschlossen werden. Beispielsweise liegen die  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten in helikalen Bereichen üblicherweise bei  $\leq 4$  Hz, während bei  $\beta$ -Faltblättern meist Werte  $\geq 8$  Hz beobachtet werden.

$$\text{Karplus-Gleichung: } {}^3J = A + B\cos\Phi + C\cos^2\Phi \quad (3.1)$$

A, B und C sind empirische Parameter, die je nach koppelnden Kernen und chemischer Umgebung angepasst werden können. Dabei ist zu beachten, dass sich für bestimmte Werte der Kopplungskonstanten mehrere mögliche Winkel ergeben können.



**Abbildung 3.10.:** links: Zusammenhang zwischen Kopplungskonstante und  $\Phi$ -Winkel (Karplus-Beziehung). In dieser Darstellung ist der Torsionswinkel zwischen  $CO_i$  und  $CO_{i-1}$  eines Peptids gegen die Kopplungskonstante  ${}^3J(H^N-H^\alpha)$  aufgetragen.<sup>[146]</sup> Rechts: Polypeptidsegment mit den *backbone*-Torsionswinkeln  $\Phi$ ,  $\Psi$  und dem ersten Seitenkettentorsionswinkel  $\chi_1$ .<sup>[143]</sup>

#### Sekundärstrukturabhängige chemische Verschiebungen

Sowohl  ${}^1H$ - als auch  ${}^{13}C$ -chemische Verschiebungen in Peptiden und Proteinen sind von der jeweils vorliegenden Sekundärstruktur abhängig.<sup>[147,148]</sup> Auswirkungen auf die chemische Verschiebung haben z.B. Helix-Dipol-Effekte, Flexibilität, die Rückgrat-Diederwinkel und Wasserstoffbrücken.<sup>[147]</sup> So sind beispielsweise  $H^\alpha$ -Verschiebungen in helikalen Bereichen im Vergleich zu *random coil*-Strukturen zu höherem Feld verschoben, in  $\beta$ -Faltblättern hingegen in einer ähnlichen Größenordnung tieffeldverschoben. Ein Zusammenhang zwischen chemischer Verschiebung und vorliegender Sekundärstruktur ist in Tab. 3.2 gezeigt.

Genau dieser Zusammenhang wird bei der *Chemical Shift Index*-Methode (CSI) ausgenutzt. Dabei werden die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren mit den Werten für *random coil*-Werte verglichen und der Sequenz entlang im Sinne einer Digital-

**Tabelle 3.2.:** Durchschnittliche Differenz der chemischen Verschiebung verschiedener Kerne abhängig von der vorliegenden Sekundärstruktur im Vergleich zu *random coil*-Werten (in ppm).<sup>[149]</sup>

Kern	Helix	$\beta$ -Faltblatt
H $^{\alpha}$	-0,38	0,38
NH	-0,19	0,29
C $^{\alpha}$	2,6	-1,4
CO	1,7	-1,4
N	-1,7	1,2

funktion aufgetragen. Je nach Größe der Differenz und dem Vorzeichen werden den Aminosäuren die Werte -1, 0 und 1 zugewiesen. Anhäufungen von Werten in die eine oder andere Richtung (ohne Unterbrechung) weisen auf definierte Sekundärstrukturen hin. Exemplarisch für H $^{\alpha}$ -, C $^{\alpha}$ - und CO-Verschiebungen geht man dabei folgendermaßen vor:<sup>[149,150]</sup>

1. Zunächst werden mit Hilfe mehrdimensionaler Spektren die chemischen Verschiebungen der einzelnen Reste zugeordnet.
2. Die Werte werden mit den Werten für *random coil*-Verschiebungen aus Tab. 3.3<sup>[149]</sup> verglichen. Liegt die Differenz im positiven Bereich über der angegebenen Toleranzschwelle, erhält der Rest eine 1, liegt sie im negativen Bereich darunter, eine -1. Ist die chemische Verschiebung innerhalb des Toleranzbereiches, wird der Wert 0 zugeordnet. Diese Werte werden nun entlang der Sequenz aufgetragen, was den jeweiligen CSI ergibt.
3. Nun werden Gruppierungen von Resten mit demselben Vorzeichen Sekundärstrukturen zugeordnet:
  - a) Bei Protonen gilt, dass Gruppierungen von mindestens vier aufeinanderfolgenden Resten mit dem Wert -1 als Helix definiert werden, wenn sie nicht durch einen Rest mit dem Wert 1 unterbrochen sind. Folgen drei Reste mit dem Wert 1 aufeinander, die nicht durch einen Rest mit dem Wert -1 unterbrochen sind, handelt es sich um ein  $\beta$ -Faltblatt. Die restlichen Regionen werden als *coil* definiert.
  - b) Bei den  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen gilt dasselbe mit umgekehrtem Vorzeichen, also viermal 1 entspricht einer helikalen Region, dreimal -1 einem  $\beta$ -Faltblatt.
4. Längere strukturierte Bereiche erfordern einen mindestens 70 %igen Anteil des gleichen Vorzeichens. Endpunkte von Helices oder  $\beta$ -Faltblättern werden durch einen

### 3. Methoden

Rest mit umgekehrtem Vorzeichen oder zwei aufeinanderfolgenden Resten mit dem Wert 0 definiert.

**Tabelle 3.3.:** *Random coil*-Werte und Toleranzgrenzen für die Zuordnung der jeweils vorliegenden Sekundärstruktur.<sup>[149]</sup>

Aminosäure	H <sup>α</sup> -Bereich	C <sup>α</sup> -Bereich	CO-Bereich
Ala	4,35 ± 0,10	52,2 (+0,8; -0,5)	177,6 ± 0,5
Cys	4,65 ± 0,10	56,8 (+0,8; -0,5)	174,1 ± 0,5
Asp	4,76 ± 0,10	53,9 (+0,8; -0,5)	176,8 ± 0,5
Glu	4,29 ± 0,10	56,5 (+0,8; -0,5)	176,6 ± 0,5
Phe	4,66 ± 0,10	57,9 (+0,8; -0,5)	175,5 ± 0,5
Gly	3,97 ± 0,10	45,0 (+0,8; -0,5)	173,6 ± 0,5
His	4,63 ± 0,10	55,5 (+0,8; -0,5)	174,9 ± 0,5
Ile	3,95 ± 0,10	61,2 (+0,8; -0,5)	176,5 ± 0,5
Lys	4,36 ± 0,10	56,5 (+0,8; -0,5)	176,5 ± 0,5
Leu	4,17 ± 0,10	55,0 (+0,8; -0,5)	176,9 ± 0,5
Met	4,52 ± 0,10	55,2 (+0,8; -0,5)	177,0 ± 0,5
Asn	4,75 ± 0,10	52,7 (+0,8; -0,5)	175,6 ± 0,5
Pro	4,44 ± 0,10	63,0 (+0,8; -0,5)	176,0 ± 0,5
Gln	4,37 ± 0,10	56,0 (+0,8; -0,5)	175,6 ± 0,5
Arg	4,38 ± 0,10	56,0 (+0,8; -0,5)	176,6 ± 0,5
Ser	4,50 ± 0,10	58,1 (+0,8; -0,5)	174,7 ± 0,5
Thr	4,35 ± 0,10	62,0 (+0,8; -0,5)	175,5 ± 0,5
Val	3,95 ± 0,10	62,2 (+0,8; -0,5)	176,0 ± 0,5
Trp	4,70 ± 0,10	57,6 (+0,8; -0,5)	175,6 ± 0,5
Tyr	4,60 ± 0,10	58,0 (+0,8; -0,5)	175,9 ± 0,5

Das hier beschriebene Verfahren ist vor allem bei größeren, definiert gefalteten Proteinen praktikabel. Bei Peptiden hingegen liegen meist verschiedene Konformationen vor, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Daher kann man in solchen Fällen durch Auftragen der Differenz der chemischen Verschiebungen im Vergleich zu den *random coil*-Werten gegen die Sequenz eher Tendenzen hin zu einer definierten Sekundärstruktur erhalten.

Da die chemische Verschiebung einzelner Aminosäurereste zu einem gewissen Teil auch von der chemischen Umgebung, d.h. den benachbarten Aminosäuren abhängt<sup>[151]</sup>, erscheint es sinnvoll, diesen Einfluss zu quantifizieren und zu berücksichtigen. Um Korrekturwerte für die Sequenzabhängigkeit der chemischen Verschiebung in *random coil*-Strukturen zu erhalten, synthetisierten Schwarzinger *et al.* 20 Pentapeptide des Typs GGXGG, wobei X jeweils eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren ist. Durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der Glycin-Reste 1,2,4 und 5 im Vergleich zum Modellpeptid GGGGG konnten so Korrekturfaktoren für die 19 restlichen Aminosäuren erhalten werden. Wie zu erwarten

wurde beobachtet, dass der Einfluss auf die direkt benachbarten Reste 2 und 4 deutlich stärker ist als auf die weiter entfernten. Mit dieser Methode wurden Korrekturfaktoren für NH, H $\alpha$ , C $\alpha$ , CO und N erhalten.<sup>[152]</sup>

### 3.4. CD-Spektroskopie

Chirale Moleküle haben die Eigenschaft, die Ebene des linear polarisierten Lichts zu drehen. Dies ist eine Folge davon, dass sie die beiden Anteile von zirkular polarisiertem Licht unterschiedlich stark absorbieren. Dies wird bei der CD-Spektroskopie ausgenutzt. Die häufigste Anwendung ist die Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen und Oligonukleotiden.

Während der Feldvektor von linear polarisiertem Licht in einer Ebene oszilliert, kann dieser bei zirkular polarisiertem Licht als um diese Fläche rotierend angesehen werden, mit gleichen Anteilen in beide Richtungen. Die Absorption von unpolarisiertem Licht ist durch das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 3.2) definiert:

$$\text{Lambert-Beersches Gesetz: } A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (3.2)$$

Dabei ist  $A_\lambda$  die wellenlängenabhängige Absorption,  $\varepsilon_\lambda$  der wellenlängenabhängige molare dekadische Extinktionskoeffizient [ $\frac{l}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ ],  $c$  die Konzentration [ $\frac{\text{mol}}{l}$ ] und  $d$  die Schichtdicke [cm].

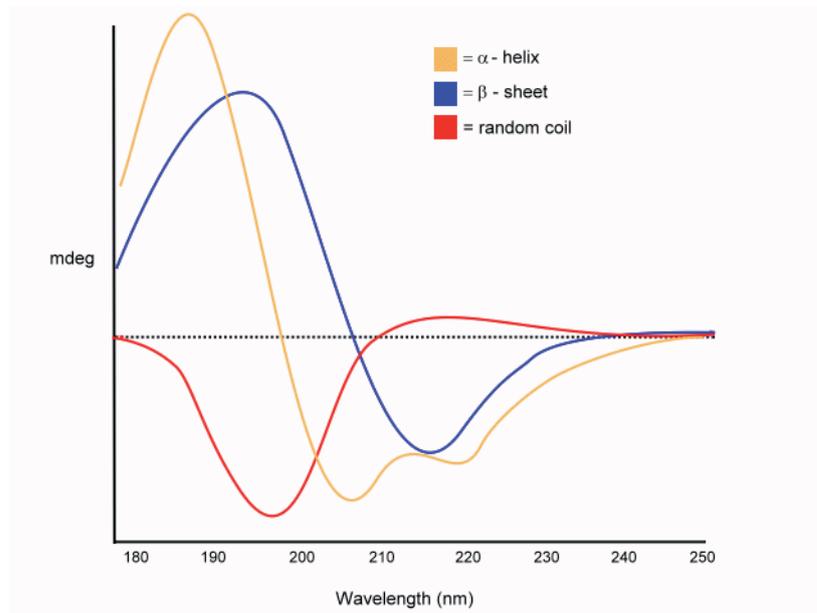
Bei zirkular polarisiertem Licht kann man molare Extinktionskoeffizienten für beide Drehrichtungen definieren. Die Differenz wird als molarer Zirkulardichroismus  $\Delta\varepsilon$  bezeichnet:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{links} - \varepsilon_{rechts} = \frac{(A_{links} - A_{rechts})}{c \cdot d} \quad (3.3)$$

Sowohl in der Literatur als auch bei vielen Geräten wird als Einheit häufig die molare Elliptizität  $[\Theta]$  angegeben. Diese steht in linearem Zusammenhang mit  $\Delta\varepsilon$  und ist definiert als:

$$[\Theta] = \frac{100 \cdot \Theta}{c \cdot d} = 3298 \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{mit} \quad \Theta = 32,98 \cdot \Delta A \quad (3.4)$$

Da die Absorption, und damit auch der Zirkulardichroismus, wellenlängenabhängig ist, wird bei CD-Messungen über einen gewissen Spektralbereich gemessen, welcher je nach zu untersuchender Spezies variiert. Zur Erzeugung des zirkular polarisierten Lichtes wird monochromatisches Licht zunächst linear polarisiert. Danach wird es mit Hilfe eines Modulators in die beiden Drehrichtungen aufgespalten. Der Detektor (z.B. ein Photomultiplier) ist für die Detektion der beiden Drehrichtungen mit derselben Frequenz moduliert wie der



**Abbildung 3.11.:** Typische CD-Spektren für die jeweiligen Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen (entnommen aus [www.proteinchemist.com](http://www.proteinchemist.com)).

Modulator, so dass die Absorption für die jeweilige Drehrichtung separat registriert werden kann.

#### 3.4.1. Anwendung

Wie oben bereits erwähnt, wird die CD-Spektroskopie sehr häufig zur Sekundärstrukturbestimmung von Biomolekülen eingesetzt. So kann bei Oligonukleotiden neben der Identifikation des vorliegenden Helix-Typs (A, B oder Z) auch der Übergang zwischen ihnen verfolgt werden. Durch temperaturabhängige Messungen kann außerdem die Aufschmelztemperatur von Doppelsträngen bestimmt werden.

Bei Peptiden und Proteinen kann man die vorliegende Sekundärstruktur bzw. deren Anteile bestimmen. Als Chromophor dient hier die Amidbindung zwischen den einzelnen Aminosäureresten, deren Zirkulardichroismus stark davon abhängt, ob sie sich innerhalb einer  $\alpha$ -Helix, eines  $\beta$ -Faltblattes oder einer *random coil*-Struktur befindet. Die charakteristischen Übergänge sind der  $n\pi^*$ -Übergang bei etwa 220 nm und der  $\pi\pi^*$ -Übergang bei etwa 190 nm. Der spektrale Bereich bei der Untersuchung von Peptiden und Proteinen liegt dementsprechend üblicherweise zwischen 160 und 260 nm.

In Abb. 3.11 sind typische CD-Spektren für die verschiedenen Sekundärstrukturen in Proteinen dargestellt.  $\alpha$ -Helices zeigen zwei negative Banden bei 222 nm und 208 nm sowie eine starke positive Bande bei 190 nm. CD-Spektren von  $\beta$ -Faltblättern sind in der Regel

simpler und weniger intensiv mit zwei relativ schwachen negativen Absorptionsbanden bei 217 nm und 180 nm sowie einer positiven bei 195 nm, wobei hier eine größere Variabilität als bei  $\alpha$ -Helices beobachtet wird.<sup>[153]</sup> Ungefaltete Peptide zeichnen sich durch eine intensive negative Bande um 200 nm aus. Außerdem können schwache Banden bei höheren Wellenlängen auftreten, die sowohl negativ als auch positiv sein können.

Durch Titrationsexperimente und Verfolgen der Änderungen im CD-Spektrum können Interaktionen zwischen Bindungspartnern beobachtet werden.

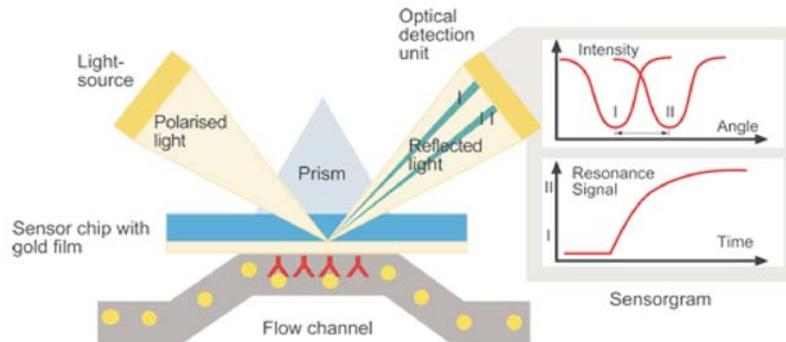
## 3.5. Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

### 3.5.1. Theoretische Grundlagen

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) ist eine sehr sensitive Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Das Phänomen wurde erstmals 1902 von R.M. Wood beschrieben<sup>[154]</sup>, eine Beschreibung der physikalischen Grundlagen wurde 1959 von T. Turbadar veröffentlicht<sup>[155]</sup>. Weite Verbreitung und kommerzielle Anwendung in der Biochemie fand sie allerdings erst innerhalb der letzten 20 Jahre.

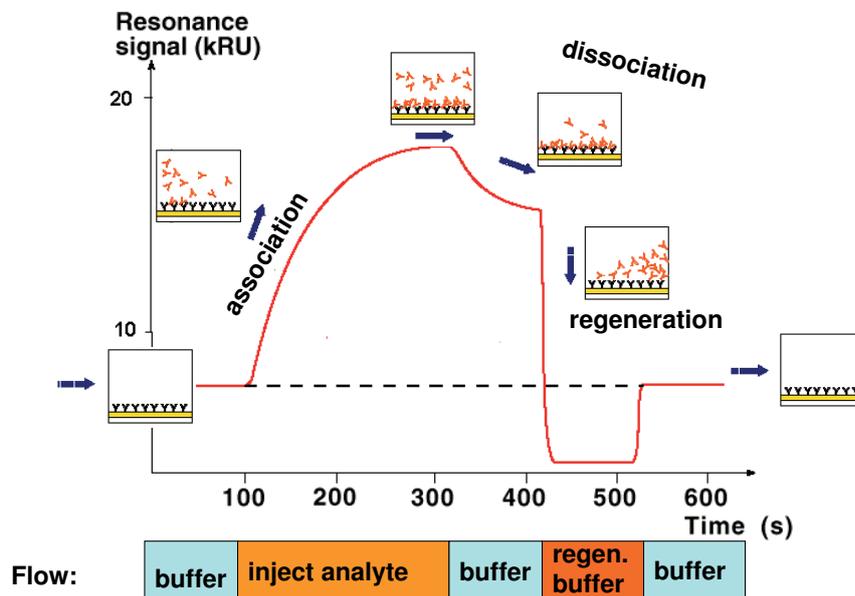
Das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz tritt auf, wenn totalreflektierendes Licht an der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex auf eine elektrisch leitende Schicht, z.B. Gold, trifft. Jenseits der reflektierenden Schicht entsteht in diesem Fall ein elektrisches Feld (evaneszierendes Feld), welches mit den freien Elektronenwolken in der Goldschicht wechselwirkt. Die dadurch entstehenden elektrischen Wellen (*electron charge density waves*), sogenannte Plasmonen, können nun von dem eingestrahlt linear polarisierten Licht angeregt werden und die Intensität des reflektierten Lichts verringern. Bei Resonanz ist dieser Effekt am stärksten. Der Resonanzwinkel, bei dem die größte Intensitätsverringerng auftritt, ist abhängig vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene.

Heutige Sensorchips tragen üblicherweise eine funktionalisierte Dextranschicht auf der Goldoberfläche, auf der einer der beiden Bindungspartner (Rezeptor) immobilisiert werden kann. Der zweite Bindungspartner (Ligand) wird in Lösung über die Oberfläche geleitet. Im Falle einer Wechselwirkung ändert sich die Konzentration des Liganden in der Nähe der Goldschicht, was zu einer Änderung des Brechungsindex führt. Diese Änderung ist in guter Näherung proportional zur Masse des gebundenen Liganden.<sup>[157]</sup> Der zeitliche Verlauf der Interaktion wird in einem Sensorgram dargestellt, in dem auf der y-Achse sogenannte *Response Units* (RU) aufgetragen werden, wobei 1 RU einer Massendifferenz von 1 pg/mm<sup>2</sup> entspricht. In Abb. 3.13 ist exemplarisch ein solches Sensorgram gezeigt. In der Assozia-



**Abbildung 3.12.:** Schematische Abbildung des SPR-Messprinzips (links) und typische Darstellung der erhaltenen Daten (rechts).<sup>[156]</sup>

tionsphase binden immer mehr Ligand-Moleküle an den immobilisierten Bindungspartner, das Signal nimmt zu. Hat sich das Gleichgewicht der Belegung eingestellt, erreicht die Kurve eine Sättigung. Wird nun statt der Ligandlösung nur noch Puffer über die Oberfläche gespült, löst sich der Ligand und der Brechungsindex verringert sich, was an einer Abnahme des Signals zu beobachten ist. Um die vollständige Dissoziation zu beschleunigen wird die Oberfläche meist mit einer Regenerationslösung behandelt.



**Abbildung 3.13.:** Typischer Verlauf einer SPR-Messung. Aus RU-Werten im Sättigungsbereich bei mehreren Ligandkonzentrationen lassen sich über *steady state affinity*  $K_D$ -Werte ermitteln. Die kinetische Auswertung erfolgt anhand des Kurvenverlaufs in der Assoziations- und Dissoziationsphase. Abbildung entnommen aus<sup>[158]</sup>.

Unter Annahme einer 1:1 Wechselwirkung zwischen immobilisiertem Rezeptor R und mobilem Ligand L ergibt sich ein Gleichgewicht



Für die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes gilt:

$$\frac{dRU}{dt} = k_a[R][L] - k_d[RL] \quad (3.6)$$

mit einer Bildungsgeschwindigkeit

$$RU(t) = RU_{eq} \cdot [1 - e^{-k_{obs} \cdot t}] \text{ mit } k_{obs} = k_a \cdot L_0 + k_d \quad (3.7)$$

wobei  $RU_{eq}$  der Signalausschlag im Gleichgewichtszustand,  $L_0$  die Konzentration des Liganden und  $k_{obs}$  die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Assoziation sind. Diese ergibt sich als Anfangssteigung aus der Auftragung von  $\frac{dRU}{dt}$  gegen  $RU(t)$ .

Im Pufferstrom und unter der Annahme, dass *rebinding*-Effekte vernachlässigbar sind, gilt analog für die Dissoziation des Komplexes

$$-\frac{dRU}{dt} = k_d \cdot [RL] \quad (3.8)$$

mit einer Dissoziationsgeschwindigkeit

$$RU(t) = RU_{eq} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (3.9)$$

$k_d$  lässt sich mit Hilfe von Gleichung 3.9 in der Dissoziationsphase ermitteln. Damit, und unter Zuhilfenahme von Gleichung 3.7, lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_D$  ausgehend von Gleichung 3.5 mit

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \text{ mit } k_a = \frac{k_{obs} - k_d}{L_0} \quad (3.10)$$

bestimmen.

Im Falle sehr schneller Bindungsreaktionen ähnelt das Sensorgram einer Kastenform und lässt sich nicht mehr kinetisch auswerten. Hier lässt sich die Dissoziationskonstante über Verdünnungsreihen bestimmen. Durch Auftragen der Gleichgewichtsbelegung gegen die Ligandkonzentration lässt sich mit Hilfe der sogenannten *steady state affinity* über

$$RU_{eq} = \frac{L_0 \cdot R_{max}}{K_D + L_0} \quad (3.11)$$

die Dissoziationskonstante bestimmen.

Um  $K_D$ -Werte mit hoher Genauigkeit zu bestimmen, sollte zum einen eine Sättigung der aufgetragenen Kurve erreicht werden, zum anderen die höchste verwendete Konzentration  $L_0$  des Liganden mindestens doppelt so hoch wie die ausgegebene Dissoziationskonstante sein.

#### 3.5.2. Anwendung

Die Vorzüge der SPR-Spektroskopie sind vielfältig. So lassen sich biomolekulare Wechselwirkungen verschiedenster Art praktisch in Echtzeit verfolgen. Auch der Substanzbedarf, im Speziellen der des immobilisierten Bindungspartners, ist im Vergleich zu anderen Methoden äußerst gering. Abhängig von der Natur der Substanzen und den verwendeten Bedingungen lassen sich mit einem einmal immobilisierten Molekül sehr viele Bindungstests durchführen. Je nach Herangehensweise und möglicher Variation der Bedingungen lassen sich neben den in 3.5.1 beschriebenen kinetischen Konstanten zudem thermodynamische Konstanten wie  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  und  $\Delta C_p^0$  bestimmen.

Zu bedenken ist auf der anderen Seite, dass sich bei weitem nicht alle biomolekularen Systeme für SPR-spektroskopische Untersuchungen eignen. Auch wenn auf ein komplexes Label, wie beispielsweise bei Fluoreszenzmessungen oder der EPR-Spektroskopie nötig, verzichtet werden kann, muss dennoch bei einem der beiden Bindungspartner eine funktionelle Gruppe zur Immobilisierung auf den Chip vorhanden sein. Diese sollte nach Möglichkeit nicht an der zu beobachtenden Interaktion beteiligt sein. Auch muss man sich stets bewusst sein, dass ein Bindungspartner auf einer komplexen Oberfläche immobilisiert ist, was mitunter erhebliche Abweichungen von den Bedingungen in Lösung nach sich zieht. Ob sich ein zu untersuchendes System für SPR-Messungen eignet, muss daher von Fall zu Fall untersucht werden.

#### Immobilisierungsstrategien

Die auf die Goldoberfläche aufgetragene Dextran-Matrix kann eine Vielzahl funktioneller Gruppen tragen, an die Rezeptormoleküle gebunden werden können. Neben der Art der funktionellen Gruppen kann auch die Länge, die Dichte und der Grad der Funktionalisierung der Matrix variieren. Die wahrscheinlich am häufigsten verwendeten Sensorchips weisen Carboxymethyldextran-Funktionalitäten auf. Mit geeigneten Kupplungs- bzw. Aktivierungsreagenzien lassen sich hierauf selektiv Moleküle mit  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$  und  $-COOH$ -Gruppen kovalent immobilisieren. Bei biomolekularen Fragestellungen ebenfalls häufig verwendete Oberflächen sind Streptavidin- und NTA-funktionalisierte Matrices, wel-

che zur Bindung biotinylierter Rezeptoren bzw. His-tag-modifizierter Proteine geeignet sind. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer Immobilisierungsmöglichkeiten wie beispielsweise Antikörper, einzelsträngige Oligonukleotide oder *lipid monolayers*.

### 3.6. Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wird die Wärmeänderung bei der Mischung/Reaktion zweier Komponenten gemessen. Die meisten chemischen Reaktionen, also auch die Bildung von Komplexen zwischen Proteinen, Oligonukleotiden oder niedermolekularen Verbindungen, gehen mit einer Änderung der Enthalpie  $\Delta H$  einher. Dabei kann Wärme an die Umgebung abgegeben (exotherme Reaktion) oder von ihr aufgenommen (endotherme Reaktion) werden.

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  eines 1:1-Komplexes (Gleichung 3.5) ist direkt mit der freien Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  verknüpft, welche sich wiederum aus der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , der Reaktionsentropie  $\Delta S$  und der Temperatur zusammensetzt:

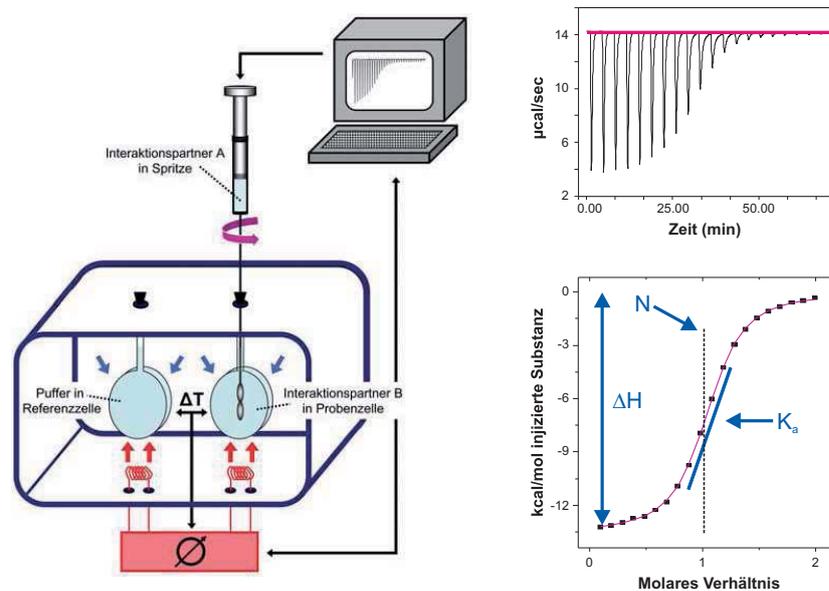
$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.12)$$

Neben diesen thermodynamischen Werten lässt sich außerdem noch die Stöchiometrie einer Reaktion und, wenn bei verschiedenen Temperaturen gemessen wird, die Änderung der Wärmekapazität der Reaktion bestimmen.<sup>[159]</sup>

Der schematische Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters ist in Abb. 3.14 gezeigt. In einem thermisch von der Umgebung abgeschirmten Gefäß befinden sich zwei unabhängig voneinander beheizbare Zellen. Diese werden mit einem mess- und kontrollierbaren Heizstrom auf konstanter Temperatur gehalten. Eine der Zellen (die Referenzzelle) wird mit Puffer befüllt, in der anderen (Probenzelle) wird einer der beiden Bindungspartner vorgelegt. Mit Hilfe einer Mikroliterspritze wird der zweite Bindungspartner (idealerweise bis zu einem dreifachen Überschuss) intervallweise in die Probenzelle titriert. Die durch die Komplexbildung verursachte Temperaturänderung in der Probenzelle wird mit einer Erhöhung (endotherme Reaktion) oder Erniedrigung (exotherme Reaktion) der Heizleistung ausgeglichen. Eine exemplarische Auftragung der Heizleistung, abzüglich der der Referenzzelle, gegen die Zeit ist in Abb. 3.14 rechts oben gezeigt.

Die freigesetzte Wärmemenge wird durch Integration der einzelnen Spikes erhalten und gegen das molare Verhältnis der Reaktanden aufgetragen. Im Idealfall erhält man eine sigmoide Kurve, anhand deren Verlauf man direkt folgende Konstanten ablesen kann (Abb. 3.14 rechts unten):

- $\Delta H$  ist die Differenz der  $y$ -Werte zu Beginn und am Ende der Messung



**Abbildung 3.14.:** Links: schematische Darstellung eines isothermen Titrationskalorimeters.<sup>[160]</sup> Auf der rechten Seite ist eine exemplarische Messung dargestellt. Aus den erhaltenen Messdaten (oben) lassen sich durch Integration und Auftragung gegen das molare Verhältnis der Reaktanden direkt die eingezeichneten thermodynamischen Konstanten bestimmen (unten).

- der x-Wert in der Mitte der sigmoiden Kurve gibt die Stöchiometrie der Reaktion wieder
- aus der Steigung im linearen Teil der sigmoiden Funktion lässt sich die Gleichgewichtskonstante  $K$  bestimmen

Mit Hilfe von Gleichung 3.12 lassen sich so die restlichen thermodynamischen Konstanten der Reaktion bestimmen. Eventuell entstehende Reaktionswärmen, die auf Wechselwirkungen mit dem Puffer, Solvatationseffekte, Konformationsänderungen oder ähnliches zurückzuführen sind, lassen sich durch entsprechende Referenzmessungen identifizieren bzw. korrigieren.

Durch die stete technische Weiterentwicklung und Miniaturisierung der Kalorimeter können mittlerweile Messungen mit sehr kleinen Substanzmengen durchgeführt werden. Trotzdem liegen diese, zumindest im Falle eines der beiden Bindungspartner, noch immer um Größenordnungen über den bei der SPR-Spektroskopie verwendeten Mengen. Auch lassen sich bei der ITC lediglich thermodynamische Größen bestimmen, über die Kinetik einer Reaktion können keine Aussagen getroffen werden.

Die Vorteile der ITC liegen darin, dass die Messungen ausschließlich in Lösung vorgenommen werden. So kann zum einen auf eine zur Immobilisierung oder Detektion notwendige,

nicht natürliche Funktionalität in einem der beiden Bindungspartner verzichtet werden, zum anderen lassen sich Artefakte, die durch Oberflächenreaktionen entstehen, ausschließen.



## 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, wurde 2005 von Möller *et al.*<sup>[15]</sup> die NMR-Struktur eines Konstruktes der ersten beiden Zinkfingerdomänen von dsRBP-ZFa (Aminosäuren 2-128, Protein **1**) veröffentlicht. Die mutmaßlich für die dsRNA-Erkennung verantwortlichen Zinkfingerdomänen sind durch einen langen, unstrukturierten Bereich separiert. Das legt unter anderem die Vermutung nahe, dass für die Erkennung von dsRNA nicht zwingend beide Domänen kooperativ verantwortlich sein müssen.

Mit Hilfe des aus den beiden ersten Zinkfingerdomänen bestehenden Konstruktes **1** wurden Bindungsexperimente mit diversen Oligonukleotidmotiven durchgeführt. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung, sowie um die Möglichkeit zu haben, NMR-Bindungsstudien durchführen zu können, wurde das Protein <sup>15</sup>N-markiert exprimiert.

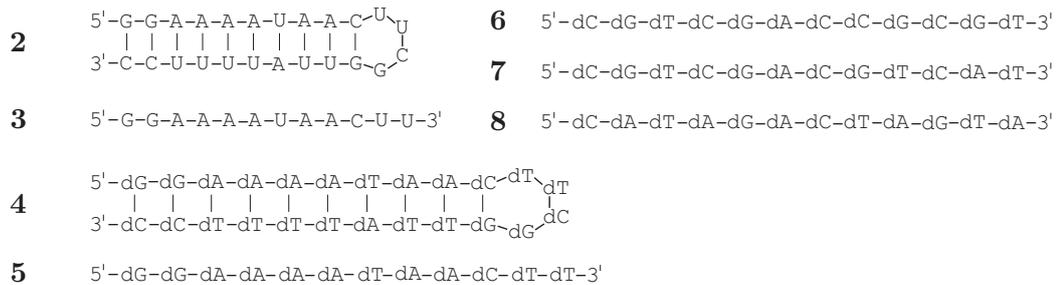
Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung peptidischer Substrukturen der beiden Zinkfingerdomänen ZF1 und ZF2. Basierend auf den Sequenzen der *Helix-turn-helix*-Motive wurden verschiedene Peptide synthetisiert und wenn möglich strukturell charakterisiert. Generell wurde die native Aminosäuresequenz weitestgehend beibehalten. Variationen wurden lediglich N-terminal eingeführt, um die Peptide für SPR-Interaktionsstudien immobilisieren zu können. Außerdem wurden zyklische Peptide synthetisiert, um die Zinkkoordination zu imitieren, sowie entsprechende lineare Peptide mit Modifikationen an den Positionen der beiden koordinierenden Histidine, um den Einfluss der Zyklisierung und der Zinkkoordination zu untersuchen.

### 4.1. Verwendete Oligonukleotide

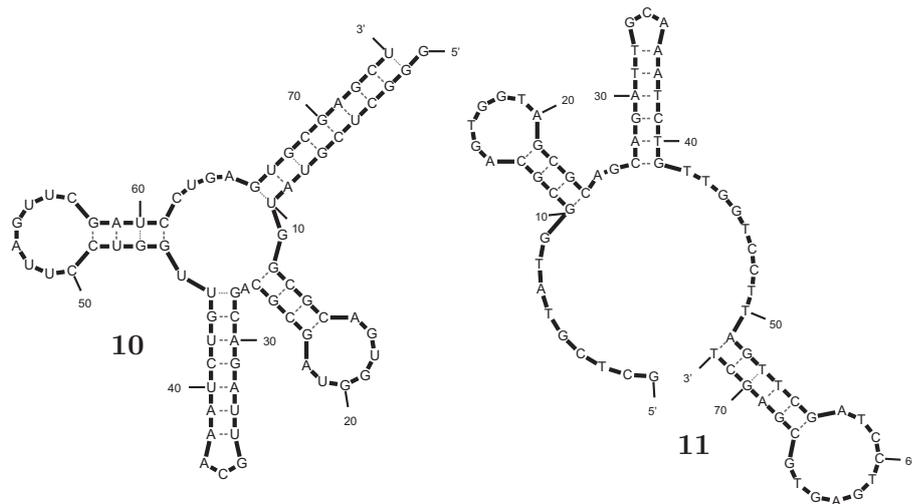
Eine mögliche Wechselwirkung von Protein- bzw. den Peptiden mit unterschiedlichen Oligonukleotidmotiven wurde anhand verschiedener RNAs und DNAs untersucht, wobei diese einzel- und doppelsträngig und in verschiedenen Längen vorlagen. In Abb. 4.1 sind sieben verschiedene Sequenzen dargestellt. Links zu sehen (**2**, **3**, **4**, **5**) sind vier zusammengehö-

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

rende Sequenzen, je ein 24 Basen umfassender DNA- und RNA-*stem-loop* mit korrespondierender Sequenz sowie jeweils ein entsprechender Einzelstrang, bestehend aus den jeweils ersten 12 Basen. Die doppelsträngige RNA leitet sich von einer für Bindungsstudien bereits verwendeten dsRNA<sup>[28,161]</sup> ab. Bei den drei Sequenzen auf der rechten Seite (**6**, **7**, **8**) handelt es sich um DNA-Einzelstränge, die zufällig ausgewählt wurden und in keinem Kontext zu den anderen stehen.

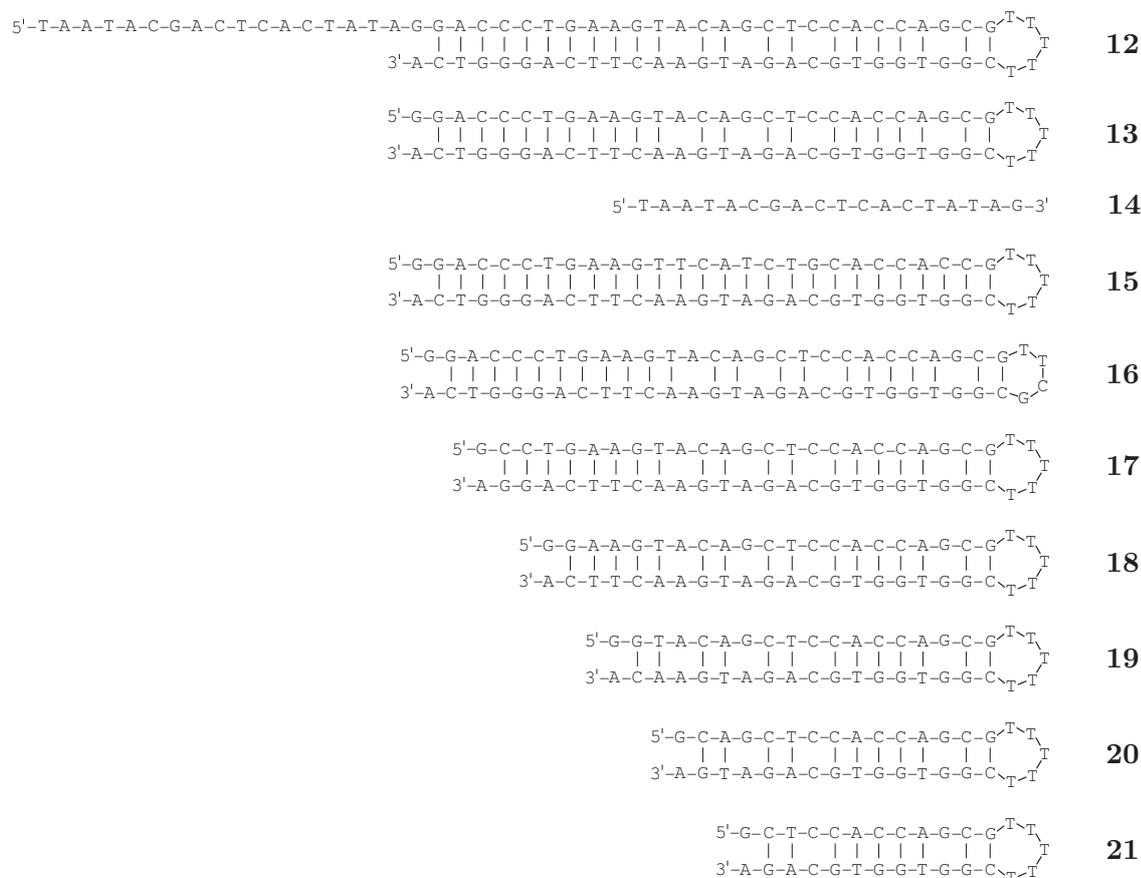


**Abbildung 4.1.:** Sequenzen einiger Oligonukleotide, mit denen die Wechselwirkungen abhängig vom Strukturtyp untersucht wurde. Zur besseren Unterscheidung zwischen RNA und DNA sind Desoxynukleotide mit einem d gekennzeichnet.



**Abbildung 4.2.:** Mittels mfold<sup>[162]</sup> berechnete Struktur der Cystein-tRNA **10** (links) sowie der korrespondierenden DNA **11** (rechts). Komplementäre Basenpaarungen sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet, Paarungen zwischen G und U, bzw. T, mit etwas dünneren.

Aufgrund der von Zhou *et al.* publizierten Komplexstrukturen von DMATase mit tRNA<sup>[52]</sup> und der von Andreeva *et al.* gefundenen Strukturhomologie zwischen den Zinkfingerregionen von DMATase und dsRBP-ZFa<sup>[53]</sup> (s. 1.1.3) wurde tRNA als mögliches Substrat von dsRBP-ZFa vermutet. Um diese These zu überprüfen, wurden Bindungsexperimente mit tRNA durchgeführt. Dazu wurde zum einen eine kommerziell erhältliche tRNA-Mischung

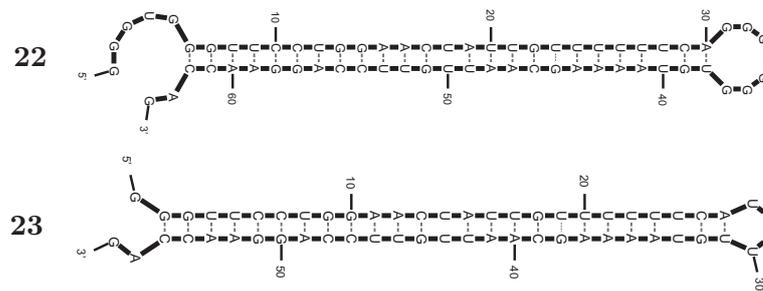


**Abbildung 4.3.:** Sequenzen der eingesetzten DNA-Motive. Oligonukleotid **14** entspricht dem Einzelstrangüberhang von Verbindung **12**. Sämtliche *hairpin*-Motive mit fünf Basen haben einen TTTTT-*pentaloop*, der *tetraloop* bei Verbindung **16** besteht aus der Sequenz TTCCG.

aus *S. cerevisiae* (**9**, Sigma-Aldrich) verwendet. Zum anderen wurde Cystein-kodierende tRNA (tRNA<sup>Cys</sup>) aus *S. cerevisiae* (**10**) selbst transkribiert. Um die Spezifität bezüglich der tRNA<sup>Cys</sup> zu verifizieren, wurde ebenfalls die sequenzanaloge DNA **11** eingesetzt (Abb. 4.2).

Bei Voruntersuchungen mit peptidischen Nachbildungen der zweiten Zinkfingerdomäne wurde eine sehr starke Wechselwirkung mit einem dsDNA *hairpin*-Konstrukt mit *pentaloop* und Einzelstrangüberhang (**12**) beobachtet. Ausgehend davon wurden verschiedene dsDNA-Konstrukte eingesetzt, die sich in der Beschaffenheit des Einzelstrangüberhanges, der *loop*-Region, der Anzahl an Fehlpaarungen und der Länge des Doppelstranges unterschieden (Abb. 4.3).

Um den Einfluss des Einzelstrangüberhanges zu untersuchen, wurde dieser bei Verbindung **13** weggelassen, wohingegen Verbindung **14** ausschließlich diesen darstellt. Verbindung **12** enthält in der doppelsträngigen Region vier Fehlpaarungen. Um deren Einfluss



**Abbildung 4.4.:** Von mfold<sup>[162]</sup> berechnete Struktur der beiden dsRNA-Motive **22** (oben) und **23** (unten). Komplementäre Basenpaarungen sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet, Paarungen zwischen G und U mit etwas dünneren.

zu untersuchen, wurden bei Konstrukt **15** vier Basen so verändert, dass im doppelsträngigen Bereich keine Fehlpaarung mehr vorlag. Die verwendeten RNA-*hairpin*-Konstrukte wiesen allesamt einen *tetraloop* auf, wohingegen die hier beschriebenen DNA-Konstrukte einen TTTTT-*pentaloop* haben. Daher wurde bei Konstrukt **16** dieser durch einen TTCG-*tetraloop* ersetzt. Die Basenfolge des *loops* ergab sich in Analogie zu den bereits verwendeten *hairpin*-Konstrukten **2** und **4**. Dabei wurde auch die restliche Sequenz berücksichtigt, da ausgeschlossen werden sollte, dass es eine vorteilhaftere Möglichkeit der Basenpaarung als die bei den anderen Konstrukten vorliegende gibt. Schließlich sollte noch der Einfluss der Länge des Doppelstranges auf die Interaktion mit den Peptiden untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Konstrukte verwendet, bei denen der doppelsträngige Bereich um drei (**17**), sechs (**18**), neun (**19**), zwölf (**20**) und fünfzehn (**21**) Basenpaare verkürzt wurde (Abb. 4.3).

Zudem wurden mit den beiden bereits für andere Experimente immobilisierten dsRNA-Konstrukten **22** und **23** (Abb. 4.4) erste SPR-Experimente mit verschiedenen Peptiden ausgehend von der zweiten Zinkfingerdomäne durchgeführt.

## 4.2. Das ZF1 und ZF2 enthaltende Proteinfragment dsRBP-ZFa 2-128

Transformation, Expression und Reinigung des Proteinkonstruktes erfolgte größtenteils analog zur Herstellung des Konstruktes für die Bestimmung der NMR-Struktur.<sup>[15,163]</sup> Eine grobe strukturelle Charakterisierung erfolgte mit NMR- und CD-spektroskopischen Methoden. Interaktionsstudien mit verschiedenen Oligonukleotidmotiven wurden mit Hilfe von SPR-Spektroskopie und ITC durchgeführt.

### 4.2.1. Transformation und Optimierung der Expressionsbedingungen

Das Plasmid (pET-21a-Vektor mit der inklonierten Sequenz für die Reste 2-128) wurde von Prof. Peter E. Wright, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA, fixiert auf einem Filterpapier zur Verfügung gestellt. Daraus wurde es mit Hilfe von Tris-Puffer extrahiert.

Zur Transformation wurden *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta-Zellen (erhalten von der Arbeitsgruppe Boos, Universität Konstanz) zunächst in DYT-Medium und anschließend in SOC-Medium kultiviert. Als Selektionsmarker diente jeweils Chloramphenicol, da dieser Bakterienstamm eine entsprechende Resistenz trägt. Die Zellen wurden durch kurzes Erhitzen auf 42 °C und anschließendes Abkühlen auf 0 °C kompetent gemacht und mit dem Plasmid inkubiert. Zur ausschließlichen Selektion der transformierten Zellen wurden einige µl auf DYT-Agar-Platten kultiviert, welche neben Chloramphenicol auch Carbenicillin enthielten, gegen welches eine Resistenz auf dem inklonierten Plasmid vorhanden war.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Transformation wurde eine Plasmidpräparation mit anschließender Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden einige Milliliter LB-Medium mit Ampicillin mit einzelnen Kolonien der nach der Transformation kultivierten Zellen angeimpft. Die Plasmidpräparation wurde nach einem entsprechenden Protokoll von Qiagen<sup>[164]</sup> durchgeführt. Es wurden ca. 50 µl Lösung mit einer DNA-Konzentration von 250 µg/ml erhalten. Diese wurde mit Wasser 1:2 verdünnt und von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert.

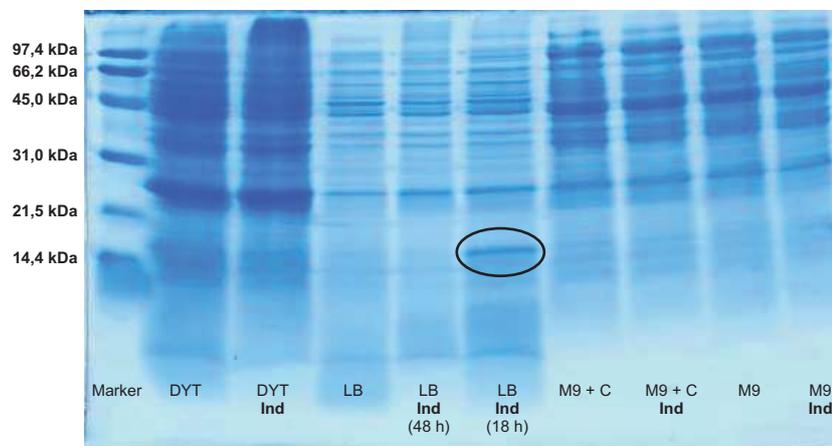
Da die DNA-Sequenz des Plasmids nicht bekannt ist, wurde die erhaltene Sequenz in die korrespondierende Aminosäuresequenz umgeschrieben<sup>[165]</sup> und mit ExpASy auf Sequenzhomologie zu dem gewünschten Proteinfoagument untersucht<sup>[166]</sup>. In Abb. 4.5 sind unten die möglicherweise entstehenden Proteine, getrennt durch einen Punkt, gezeigt. Der markierte Teil entspricht zu 100% der gewünschten Proteinsequenz. Die Transformation verlief somit erfolgreich.

Zur Evaluation verschiedener Wachstumsmedien wurden die in Tab. 4.1 gezeigten Medien mit einzelnen Kolonien angeimpft und die Absorption bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) zeitabhängig beobachtet. Nach entsprechendem Wachstum wurden  $ZnSO_4$  und zur Induktion der Überexpression IPTG zugegeben. Abb. 4.6 zeigt, dass eine signifikante Bande im Bereich der Masse des Proteins (14-15 kDa) nur bei Wachstum und Überexpression in LB-Medium zu erkennen ist. Ebenfalls ist zu sehen, dass eine zu lange Überexpression ein Verschwinden der Bande zur Folge hat. Die intensive Bande nach Induktion in LB-Medium deutet aber ebenfalls darauf hin, dass die Transformation erfolgreich war.



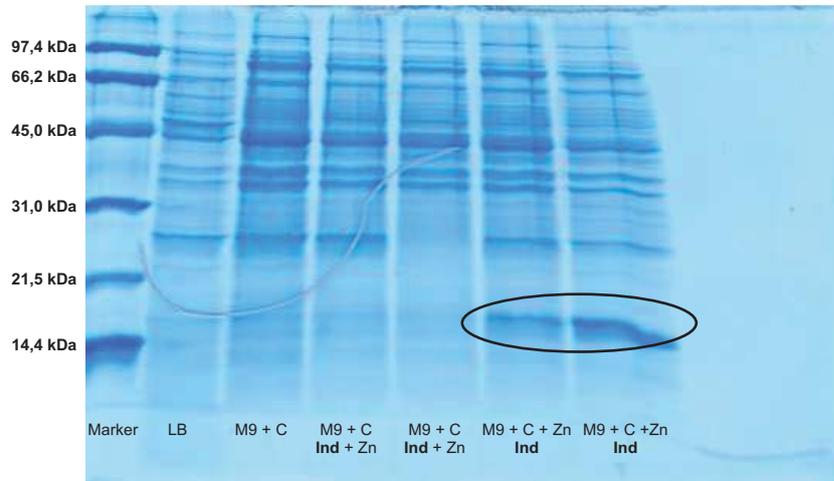
**Tabelle 4.1.:** OD<sub>600</sub>-Werte verschiedener Medien nach Animpfen mit Kolonien der transformierten Zellen. In der letzten Zeile sind die Werte nach der Induktion mit IPTG aufgeführt, in Klammern die Zeit nach IPTG-Zugabe.

t	DYT	LB	M9 + Celtone	M9
1 h	0,01	0,03	0	0
4 h	0,01	0,26	0,02	0
6 h	0,02	0,62	0,02	0
24 h	0,96	-	0,16	0,02
48 h	-	-	0,95	0,80
nach Ind. (h)	0,89 (24 h)	0,40 (18 h)	0,93 (20 h)	0,86 (20 h)



**Abbildung 4.6.:** Vergleich der Überexpression von dsRBP-ZFa 2-128 in verschiedenen Wachstumsmedien. Eine scharfe Bande im erwarteten Bereich zwischen 14 und 15 kDa ist nur bei Expression in LB-Medium mit Chloramphenicol zu erkennen. Diese ist bei zu langer IPTG-induzierter Überexpression nicht mehr zu sehen.

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.7.:** Vergleich der Überexpression von dsRBP-ZFa 2-128 in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zinkzugabe. Ist Zink schon während des Wachstums zugegen, erhält man nach Induktion mit IPTG eine intensive Bande im Bereich der gewünschten Masse (die beiden rechten Spuren). Gibt man das Zink erst zusammen mit dem IPTG zu, ist keine prominente Bande in diesem Bereich zu beobachten. Als Antibiotikum wurde Ampicillin zugesetzt.

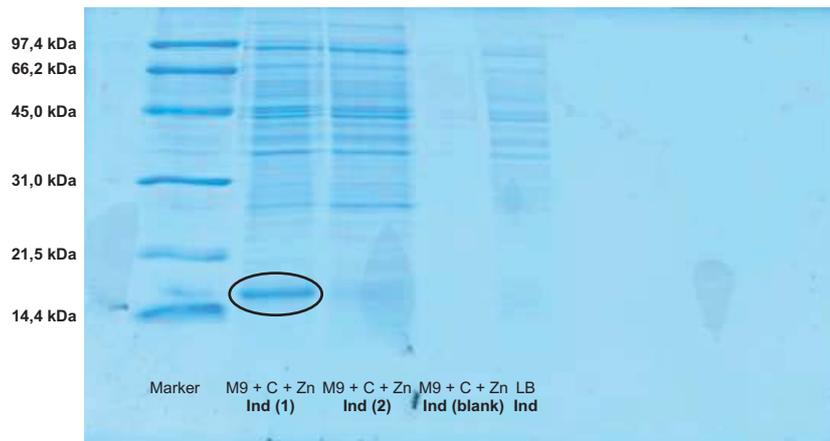
lonien gewachsen. Im Fall von Carbenicillin und Chloramphenicol musste in der Regel zwei Tage gewartet werden. Um das optimierte Expressionssystem (M9-Medium mit Cel-tone und Zink, Ampicillin als Antibiotikum) zu testen, wurden entsprechende Vorkulturen angezogen, das Wachstum UV/Vis-spektroskopisch verfolgt (Tab. 4.2) und die Überexpression mittels SDS-PAGE verifiziert (Abb. 4.8). Als Negativkontrolle wurde eine Probe M9-Medium identisch wie die anderen behandelt, jedoch nicht mit Zellen angeimpft (M9 + C + Zn (blank)).

**Tabelle 4.2.:** OD<sub>600</sub>-Werte verschiedener Medien nach Animpfen mit Kolonien der transformierten Zellen. In der letzten Zeile sind die Werte 48 h nach der Induktion mit IPTG aufgeführt.

t	M9 + C + Zn (1)	M9 + C + Zn (2)	M9 + C + Zn (blank)	LB
2 h	0,01	0,01	0,02	0,03
4 h	0,03	0,02	0,00	0,05
6 h	0,01	0,00	0,00	0,04
24 h	0,73	0,94	0,02	0,34
48 h nach Ind.	0,87	0,84	0,15	0,81

#### 4.2.2. Präparative Expression und Reinigung

Zur präparativen Expression wurde M9-Medium mit <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, <sup>15</sup>N-markiertem Cel-tone, ZnSO<sub>4</sub> und Ampicillin als Selektionsmarker verwendet (siehe Abschnitt 8.5.2, S. 189). Das



**Abbildung 4.8.:** Wachstum und Überexpression in M9-Medium mit Celstone und Zink. Bei M9 + C + Zn (blank) wurden alle Schritte analog zu den anderen Kulturen durchgeführt, jedoch nicht angeimpft. Bei der rechten Spur wurde LB-Medium ohne Zink verwendet. Es zeigt sich, dass die Bakterien zwar anwachsen (Tab. 4.2), das gewünschte Protein jedoch nicht exprimiert wird.

Wachstum der Zellen wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt und die Menge des Nährmediums sukzessive vergrößert. Nach Erreichen einer ausreichenden optischen Dichte wurde mit IPTG die Überexpression von Protein 1 induziert. Die Absorption wurde in kurzen Intervallen überprüft, nach Erreichen einer Plateauphase wurden die Zellen geerntet. Die jeweiligen Absorptionswerte sind in Tab. 4.3 aufgelistet.

Zur Isolierung des Proteins wurden die Zellen in Lyse-Puffer suspendiert, mit Hilfe einer *French Press* aufgeschlossen und anschließend bei etwa 100.000 g in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Da das Protein keine die Reinigung vereinfachende Modifikation wie z.B. einen *His-tag* enthält, konnte nicht auf affinitätschromatographische Reinigungsmethoden zurückgegriffen werden. Es wurde daher zunächst eine Vorreinigung mit Hilfe von Ionentauschersäulen durchgeführt. Dazu wurden ein Anionen- und zwei Kationentauscher hintereinander geschaltet. Nach Elution des Durchflusses wurde der Anionentauscher, an dem negativ geladene Zellbestandteile wie z.B. Oligonukleotide gebunden sein sollten, aus dem System entfernt, und die am Kationentauscher gebundenen, positiv geladenen Zellbestandteile, eluiert. In Abb. 4.10 ist ein SDS-Gel der beiden Hauptfraktionen der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 4.9) nach Aufkonzentrieren sowie deren entsprechende Filtrate dargestellt. Sowohl der Durchfluss als auch die kleineren Peaks zeigten keine Bande im Bereich der gewünschten Masse (nicht gezeigt). Es ist eindeutig zu erkennen, dass sich der hauptsächliche Anteil des Proteins in den Fraktionen 35 - 44 befand. Das Konzentrat der gepoolten Fraktionen der beiden Hauptpeaks wurde per Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

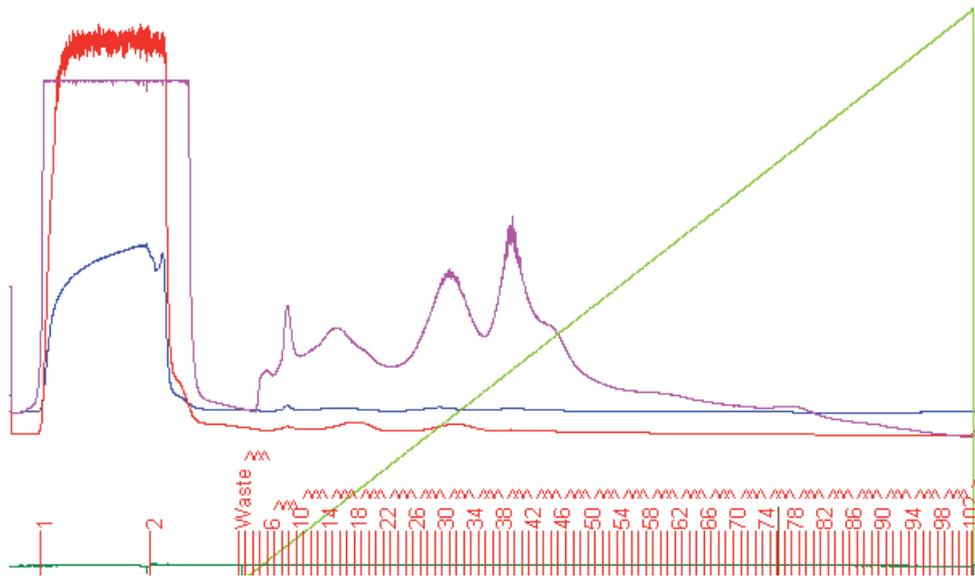
**Tabelle 4.3.:** OD<sub>600</sub>-Werte bei der präparativen Expression von dsRBP-ZFa 2-128. „M9 (blank)“ steht für nicht angeimpftes Medium und diente als Negativkontrolle. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 wachsen gelassen und dann entweder in der nächstgrößeren Menge Medium verdünnt, oder mit IPTG versetzt um die Überexpression zu induzieren.

t	M9 (1)	M9 (2)	M9 (3)	M9 (blank)
nach Animpfen von je 100 ml Medium				
18 h	0,07	0,05	0,05	0,01
22 h	0,06	0,06	0,04	0,03
26 h	0,06	0,14	0,05	0,04
40 h	0,61	0,80	0,07	0,00
nach Animpfen von je 500 ml Medium				
2,5 h	0,44	0,35	-	-
3,5 h	0,57	0,51	-	-
4,5 h	0,71	0,65	-	-
Induktion der Überexpression mit IPTG				
1,5 h	0,76	0,78	-	-
3 h	0,84	0,85	-	-
4 h	0,84	0,78	-	-

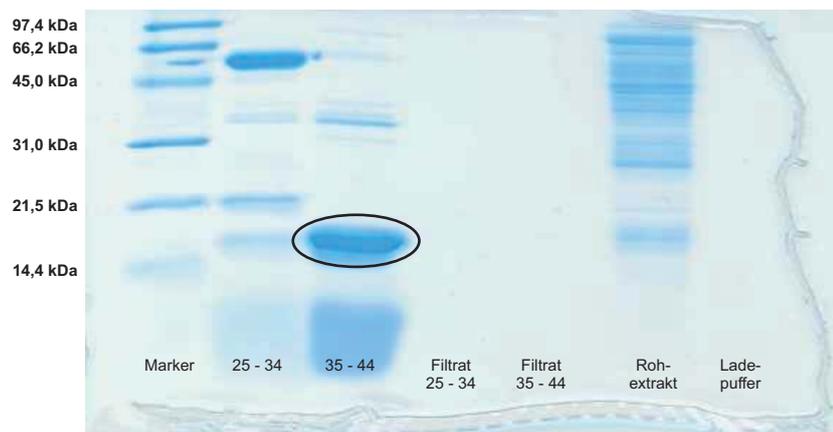
Dazu wurde das Konzentrat auf eine äquilibrierte Superdex 75-Säule aufgetragen und isokratisch aufgereinigt. Dabei konnte sowohl das Protein als auch das Hauptnebenprodukt separat isoliert werden. Letzteres hatte eine Masse von ca. 60 kDa und wurde nicht weiter charakterisiert.

Zur Charakterisierung des Proteins und zur Verifizierung, dass es im gefalteten Zustand vorlag, wurden <sup>15</sup>N-HSQC-NMR- und CD-Spektren aufgenommen. Das NMR-Spektrum zeigte eine deutliche Dispersion der Signale, was sehr stark auf ein gefaltetes Protein hindeutet. Ein Vergleich mit einem Spektrum von Heiko Möller, welches zur Strukturaufklärung verwendet wurde<sup>[15]</sup>, zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung (Abb. 4.13). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das gewünschte Protein in gefaltetem Zustand erhalten wurde.

Das erhaltene CD-Spektrum (Abb. 4.12) untermauert diese Vermutung. Während *random-coil*-Strukturen in der Regel Minima bei Wellenlängen unterhalb von 200 nm aufweisen, sind diese bei gefalteten Proteinen zwischen 205 und 225 nm zu finden (vgl. Abb. 3.11, S. 46). Dies ist im gezeigten Spektrum der Fall. Desweiteren zeigen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter im Gegensatz zu *random-coil*-Strukturen positive Werte bei kurzen Wellenlängen, was beim CD-Spektrum von **1** ebenfalls beobachtet wird.

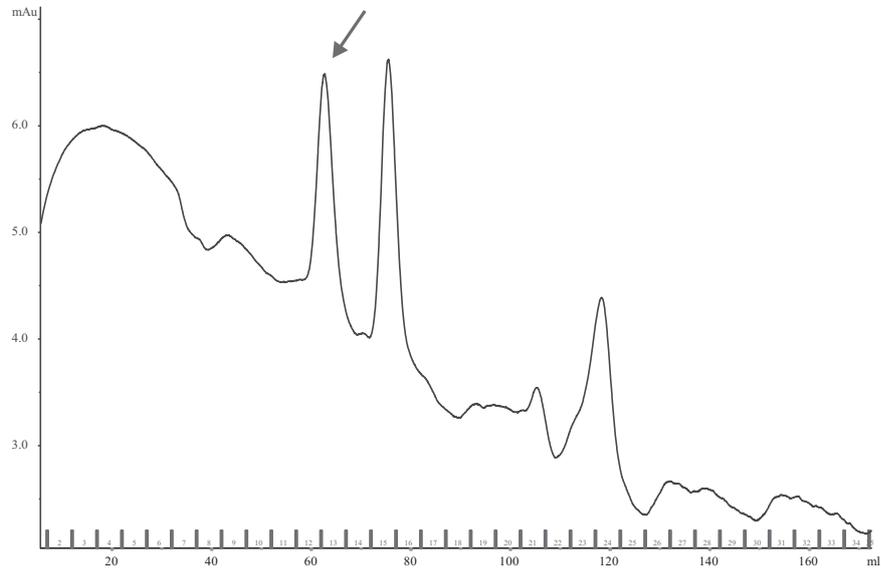


**Abbildung 4.9.:** Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie. In den Fraktionen 1 und 2 ist der Durchfluss enthalten, also alles, was weder an die Anionen-, noch an die Kationentauschersäule bindet. Grün dargestellt ist der NaCl-Gradient von 0 - 100 %.

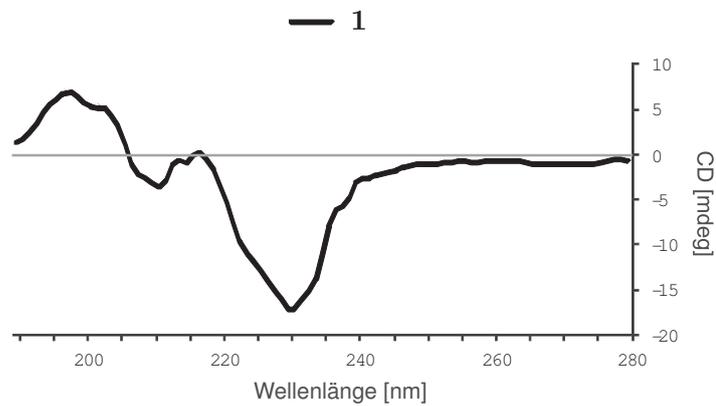


**Abbildung 4.10.:** Die beiden intensivsten Peaks der Ionenaustauschchromatographie nach Aufkonzentrieren. Ebenfalls aufgetragen wurden das Filtrat und der Ladepuffer, wo jeweils keine Banden im Bereich der gesuchten Masse gefunden wurden.

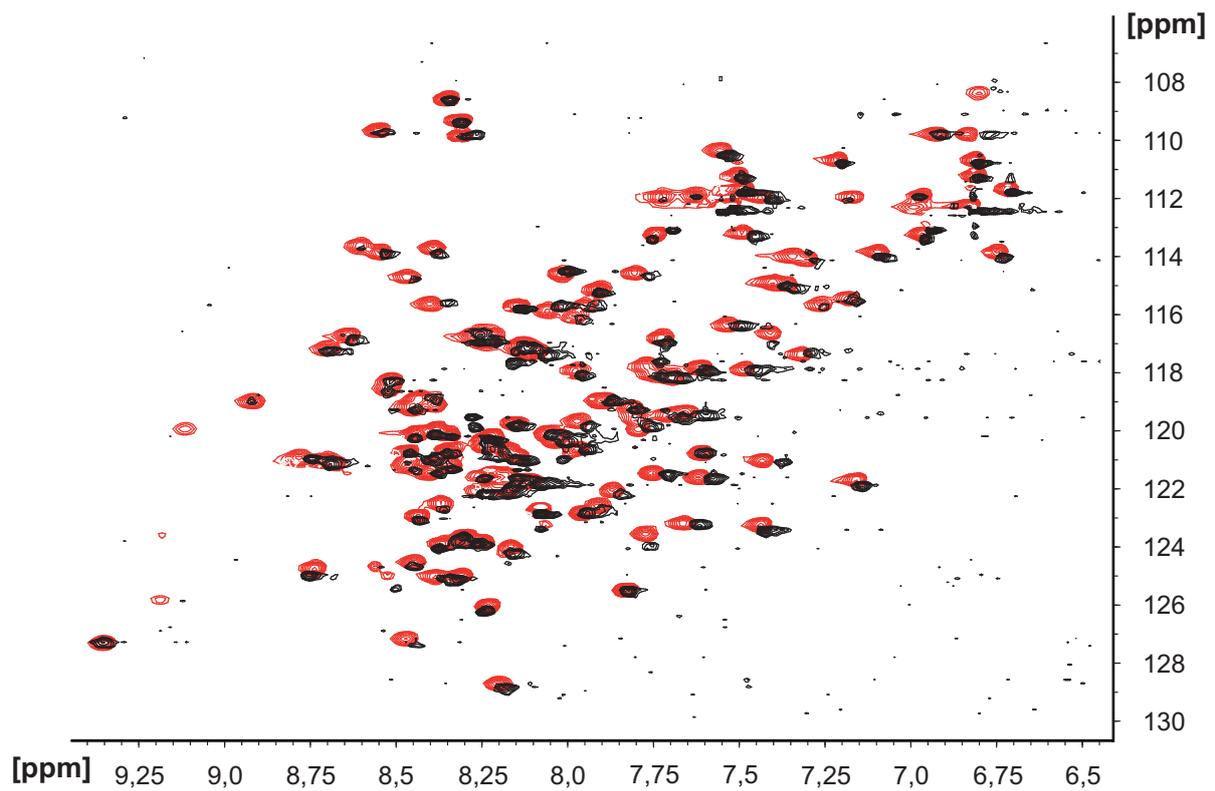
#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.11.:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie der nach der Ionenaustauschchromatographie aufkonzentrierten Fraktionen 35 - 44. Der rote Pfeil markiert den Peak des Proteins dsRBP-ZFa 2-128. Die sehr schwachen Absorptionswerte sind durch eine falsche Einstellung der UV-Lampe am Gerät bedingt.



**Abbildung 4.12.:** CD-Spektrum des exprimierten Proteinkonstruktes **1**, gemessen in HBS-Puffer, pH = 7,0. Die Minima bei relativ langen Wellenlängen deuten auf eine vorliegende Sekundärstruktur hin, bei ungeordneten Strukturen sind diese typischerweise bei Wellenlängen unterhalb von 200 nm zu finden. Auch die positiven Werte bei kurzen Wellenlängen sind charakteristisch für  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter.



**Abbildung 4.13.:** Vergleich des 600 MHz  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von dsRBP-ZFa 2-128 bei 293 K (bestimmt mit MeOH) in Tris-NMR-Puffer pH = 6,8 (schwarz) mit einem  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums der Probe, die für die Strukturberechnung verwendet wurde (rot)<sup>[15]</sup>. Die beiden Spektren sind nahezu identisch. Die geringen Abweichungen können durch Unterschiede in der Pufferzusammensetzung, dem pH-Wert oder der Temperatur hervorgerufen werden.

### 4.2.3. Interaktionsstudien mit Oligonukleotiden

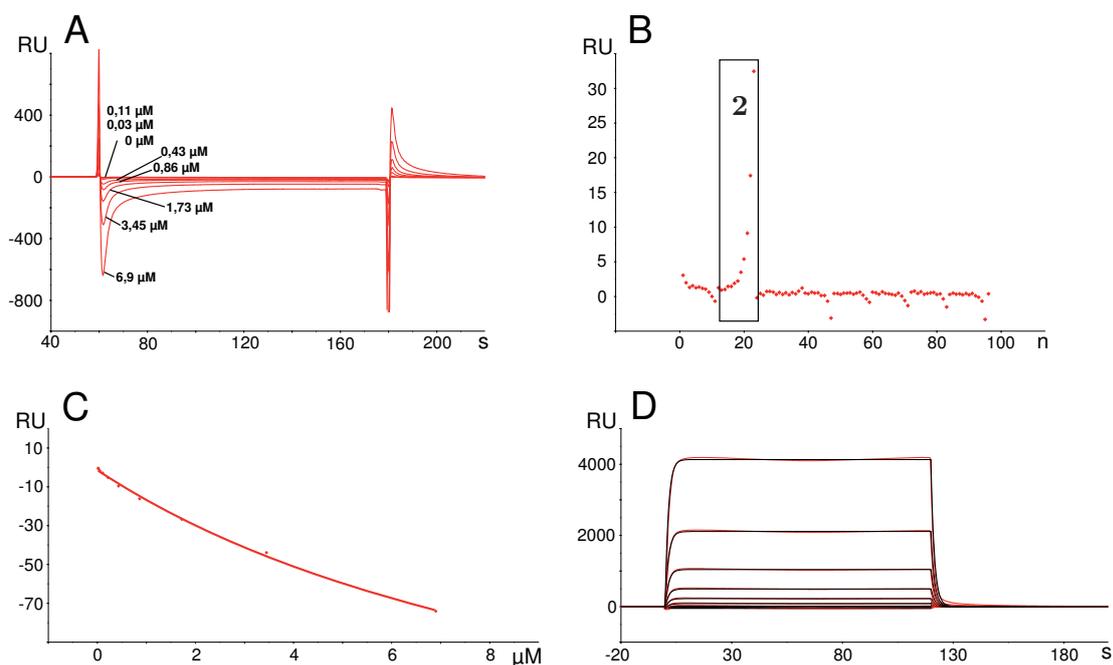
#### SPR-Experimente

Nachdem das Protein also erfolgreich präpariert werden konnte, sollten als nächstes die geplanten Interaktionsstudien mit Oligonukleotiden folgen, um die Wechselwirkung der Zinkfinger mit DNA/RNA zu untersuchen. Hierzu wurde das Protein **1** über eine Amidkupplung auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Die Carboxylgruppen des Chips wurden dazu vorher mit EDC/NHS aktiviert. Nach Immobilisieren und anschließendem Waschen mit Ethanolamin ergab sich eine Nettobelegung von etwa 3000 *Response Units* (RU). Als Referenzzelle wurde Flusszelle (FC) 1 unmodifiziert verwendet.

**Tabelle 4.4.:** Bei SPR-Experimenten mit immobilisiertem Protein **1** untersuchte Oligonukleotidmotive (siehe Abbildungen Abb. 4.1 S. 56, Abb. 4.2 S. 56 und Abb. 4.3 S. 57). Im Falle von Verbindung **2** wurde zunächst keine Wechselwirkung beobachtet. Ein genaueres Studium der einzelnen Sensorgramme zeigte ein für keine Interaktion untypisches Verhalten.

Verbindung	max. Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Bindung
<b>2</b>	6,9	(-)
<b>6</b>	100	-
<b>9</b>	100	-
<b>10</b>	0,4	-
<b>11</b>	100	-
<b>13</b>	100	-
<b>14</b>	100	-
<b>20</b>	100	-

Als mögliche Bindungspartner wurden die in Tab. 4.4 aufgeführten Oligonukleotidmotive bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Bei Auftragung von Konzentration gegen RU-Wert (*steady-state-affinity*) ergab sich bei allen Verbindungen eine Gerade, was auf keine bzw. auf eine unspezifische Wechselwirkung hindeutet. Auch zeigten fast alle Sensorgramme eine für unspezifische Oberflächenbindung typische Rechteckform, die aus einer extrem schnellen Kinetik resultiert. Eine Ausnahme bildeten die Sensorgramme mit der doppelsträngigen RNA **2**. In Abb. 4.14 sind verschiedene Darstellungen der experimentellen Ergebnisse gezeigt. Bei Betrachtung der Sensorgramme der belegten Flusszelle abzüglich der Referenzzelle (A) kann man zwar einen für Wechselwirkung typischen Kurvenverlauf erkennen, allerdings ist zu Beginn der Injektion jeweils ein sehr starker Signalabfall zu beobachten. Daher kann durch Auftragung der *steady-state-affinity* kein vernünftiger  $K_D$ -Wert bestimmt werden (C). In Teilbild B sind die RU-Werte der Referenzzelle für die in Tab.

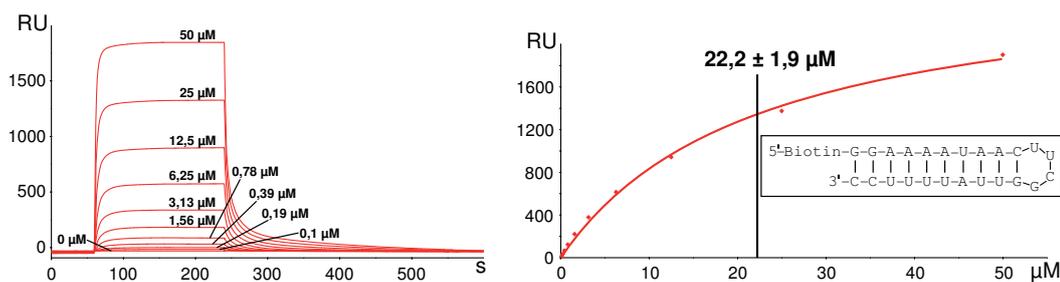


**Abbildung 4.14.:** Verschiedene Darstellungen der Wechselwirkung von immobilisiertem Protein **1** mit der dsRNA **2**. A: Sensorgramme der belegten Flusszelle abzüglich der Referenzzelle. Die jeweils verwendete RNA-Konzentration ist den Kurven zugeordnet. B: Bindung der untersuchten Oligonukleotide aus Tab. 4.4 an die Referenzzelle. Eingehrahmt sind die Zyklen mit der dsRNA **2** mit steigender Konzentration von links nach rechts. C: Auftragung von dsRNA-Konzentration gegen RU der Differenz von belegter Flusszelle abzüglich der Referenzzelle (*steady-state-affinity*). D: „*kinetic fit*“ der belegten Flusszelle (ohne Abzug der Referenzzelle) nach einem 1:1 Bindungsmodell.

4.4 aufgeführten Oligonukleotide bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt. Einzig für die doppelsträngige RNA **2** (eingehrahmt) sind Ausschläge bei steigenden Konzentrationen zu sehen, was die atypische Form der Sensorgramme in Teilbild A erklärt. In Abb. 4.14 D ist ein *kinetic fit* nach einem 1:1 Bindungsmodell (schwarz) mit den Sensorgrammen der belegten Flusszelle (rot) gezeigt. Die sehr gute Übereinstimmung von Sensorgrammen und *fit* deutet ebenfalls auf eine Wechselwirkung hin. Allerdings ist zu beachten, dass hier die Werte der unbelegten Referenzzelle, was dem Anteil an unspezifischer Bindung entspricht, nicht subtrahiert wurden. Die Dextranmatrix des CM5-Chips ist negativ geladen, was eine starke Wechselwirkung mit der ebenfalls negativ geladenen RNA unwahrscheinlich erscheinen lässt. Quantitative Aussagen über eine Wechselwirkung können dennoch nicht gemacht werden.

Aufgrund der Indizien für eine Wechselwirkung zwischen Protein **1** und dsRNA **2** und der mutmaßlichen Interaktion der RNA mit der unbelegten Referenzzelle wurde in einem weiteren Experiment RNA **2** in biotinylierter Form (**24**, s. Abb. 4.15) auf einem Streptavidin-modifizierten Sensorchip immobilisiert. In Abb. 4.15 sind die erhaltenen Sensorgramme der

belegten Flusszelle abzüglich der Referenzzelle (links), sowie die Auftragung der *steady-state-affinity* dargestellt. Letztere ergab einen  $K_D$ -Wert von  $22,2 \mu\text{M}$ . Die Sensorgramme zeigten einen Kurvenverlauf mit einer gut zu erkennenden Assoziations- und Dissoziationsphase. Auch sind die erhaltenen RU-Werte relativ hoch. Der ermittelte  $K_D$ -Wert ist deutlich größer als der für ähnliche dsRNA-Motive mit Hilfe von *electrophoretic mobility shift assays* von Finerty et al. veröffentlichte<sup>[28]</sup>. Ein möglicher Grund für die Abweichungen könnten beispielsweise Multivalenzeffekte sein.

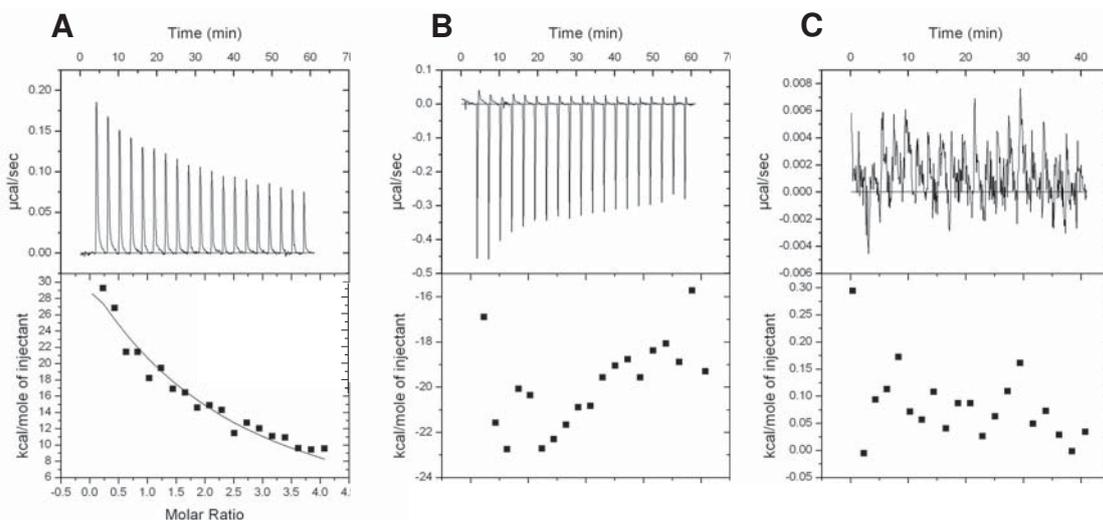


**Abbildung 4.15.:** SPR-Experimente mit über Biotin/Streptavidin immobilisierter RNA **24** und Protein **1**. Links dargestellt sind die Sensorgramme bei verschiedenen Proteinkonzentrationen, rechts die Auftragung der *steady-state-affinity*. Die dsRNA-Belegung betrug  $\sim 1000$  RU. Als Laufpuffer diente HBS-RNA, die Flussrate betrug  $5 \mu\text{l}/\text{min}$ . Zur Regenerierung wurde nach jedem Zyklus dreimal  $60$  s  $1$  M NaCl-Lösung injiziert.

### ITC-Experimente

Als alternative Methode zu den SPR-Experimenten wurden ITC-Experimente mit den beiden RNA-Motiven **9**, der kommerziellen tRNA-Mischung, und **2**, dem oben beschriebenen *hairpin*-Motiv, durchgeführt. In Abb. 4.16 sind die Titrationsexperimente mit vorgelegtem Protein **1** und der tRNA-Mischung **9** dargestellt. Links abgebildet ist die eigentliche Titration von RNA in Protein, beide gelöst in HBS-Puffer. Der eingezeichnete Kurvenverlauf resultiert aus einer Näherung nach einem *one-site-binding-model*. Um Artefakte, wie zum Beispiel Solvatationseffekte, bei der RNA-Zugabe auszuschließen, wurde bei der in der mittleren Abbildung dargestellten Messreihe RNA in die nur Puffer enthaltende Messzelle titriert. Als weitere Negativkontrolle wurde Puffer aus der Spritze in die Puffer enthaltende Messzelle titriert (rechts in Abb. 4.16). Hierbei wurde keine Wärmeentwicklung beobachtet.

Die Titration der tRNA-Mischung **9** zum in der Messzelle vorgelegten Protein ergab eine abfallende Kurve, die jedoch nicht den für ITC-Experimente typischen sigmoiden Verlauf zeigte. Dennoch ließen sich anhand der erhaltenen Daten einige Informationen über die Wechselwirkung erhalten. Zunächst einmal ließ sich aufgrund des positiven Vorzeichens der Reaktionswärmen sagen, dass es sich um eine endotherme Reaktion handelt. Die in Abb. 4.16 B zeigte Zugabe der tRNA in Puffer ergab Heizraten mit negativem Vorzeichen,



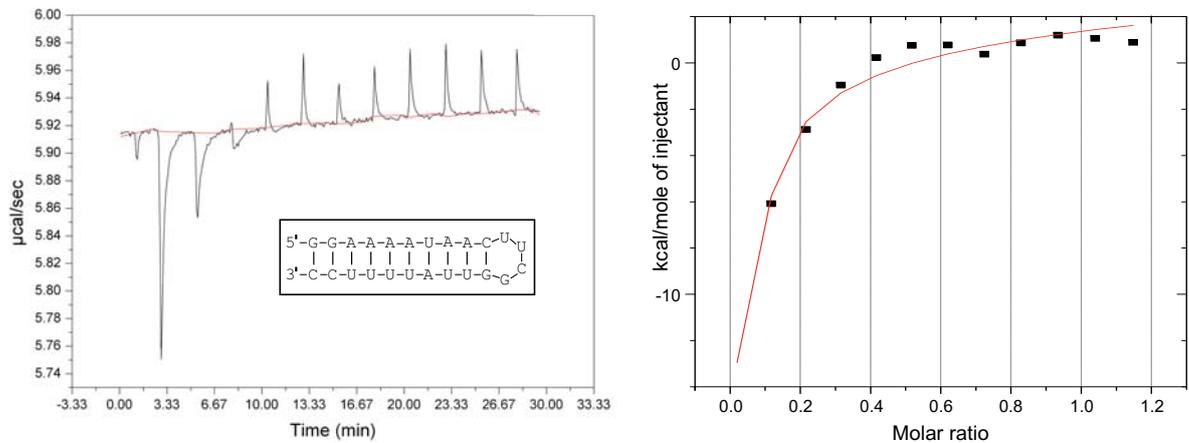
**Abbildung 4.16.:** ITC-Titrationsexperimente mit Protein **1** und der tRNA-Mischung **9**. Die Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt. Beide Komponenten waren in dem bereits bei den SPR-Experimenten verwendeten HBS-RNA-Puffer gelöst. A: Titration mit vorgelegtem Protein **1** und zugegebener tRNA **9**. Es ist eine deutliche Änderung der Wärmeentwicklung bei fortschreitender Titration zu beobachten. B: Titration von **9** in die mit HBS-Puffer befüllte Messzelle. Es sind zwar Ausschläge zu erkennen, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen zum in A gezeigten Experiment, was dagegen spricht, dass es sich bei der dort beobachteten Wechselwirkung um ein Artefakt handelt. C: Titration von Puffer in Puffer. Es ist keine Wärmeentwicklung zu beobachten.

die sich in einem relativ konstanten Bereich bewegen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem in Abb. 4.16 A beobachteten Kurvenverlauf tatsächlich um eine Wechselwirkung zwischen Protein und RNA handelt.

Aus der Näherung nach dem *one-site-binding-model* ergibt sich eine Stöchiometrie von  $0,922 \pm 0,273$ , die ausgegebene Dissoziationskonstante liegt bei 435  $\mu\text{M}$ . Da es sich bei der eingesetzten RNA um eine Mischung verschiedener tRNAs handelte und trotz mehrfacher Nachfrage beim Hersteller keine weiteren Informationen dazu erhältlich waren, sind die bestimmten thermodynamischen Konstanten jedoch eher fragwürdig und werden hier nicht weiter diskutiert. Es ist jedoch zweifelsohne eine Interaktion zwischen Protein **1** und zumindest einer oder mehrerer Komponenten aus **9** zu beobachten.

In einem weiteren Titrationsexperiment wurde zu der in der Messzelle vorgelegter Proteinlösung die dsRNA **2** schrittweise hinzugegeben. Die entstehenden Reaktionswärme sowie die Auftragung der Integrale gegen das molare Verhältnis sind in Abb. 4.17 dargestellt. Auch hier ergab sich ein für ITC-Experimente untypischer Kurvenverlauf. Die eingezeichnete rote Linie resultiert aus einer Näherung anhand eines *two sequential binding sites*-Modells und passt relativ gut zu den erhaltenen Werten. Mit allen anderen zur Verfügung stehenden

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.17.:** ITC-Titrationsexperiment mit Protein **1** und der doppelsträngigen RNA **2**. Links gezeigt ist die Heizleistung bei sukzessiver RNA-Zugabe. Rechts dargestellt ist die Integration der links erhaltenen Peaks, aufgetragen gegen das molare Verhältnis. Die rot eingezeichnete Linie ist eine Näherung nach einem *two sequential binding sites*-Modell.

Modellen war keine Näherung möglich. Das *two sequential binding sites*-Bindungsmodell basiert auf der Annahme von zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen  $K_D$ -Werten. Diese betragen bei der gezeigten Näherung  $K_{D1} = 57,5 \pm 5,3 \mu\text{M}$  und  $K_{D2} = 2,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . Aufgrund der relativ niedrigen absoluten Heizleistung und dem untypischen Kurvenverlauf sind diese Werte mit Vorsicht zu genießen. Von der Größenordnung her stimmen sie aber mit den bei den SPR-Experimenten erhaltenen  $K_D$ -Werten relativ gut überein.

Nach einem steilen Ansteigen mündet die Kurve bei einem molaren Verhältnis von 0,4 - 0,5 in einer Sättigung. Dies könnte so gedeutet werden, dass zwei Proteinmoleküle an ein Molekül RNA binden. Aufgrund der zwei mutmaßlich dsRNA-bindenden Zinkfingerdomänen im eingesetzten Proteinkonstrukt würde das bedeuten, dass vier Zinkfingerdomänen an einen RNA-Doppelstrang binden. Ebenfalls denkbar wäre, dass nur eine der beiden Domänen mit zwei Bindungsstellen an die RNA bindet.

Desweiteren wurde das Protein in vierfach verdünnter Konzentration eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Ziel war es zum einen, den steilen Kurvenverlauf am Anfang der Titration näher zu untersuchen, zum anderen sollte das Verhalten bei größerem RNA-Überschuss beobachtet werden. Der Nachteil einer solchen Verdünnung sind die noch geringeren entstehenden Reaktionswärmen. Der Kurvenverlauf entsprach ziemlich genau dem gezeigten und brachte somit keine weiteren Erkenntnisse.

Die Ergebnisse aus den ITC-Experimenten zeigten eindeutig eine Wechselwirkung zwischen Protein **1** und beiden untersuchten RNAs, der kommerziellen tRNA-Mischung **9** aus

*S. cerevisiae* und der doppelsträngigen RNA **2**. Aufgrund der komplexen und weitgehend unbekanntem Zusammensetzung der tRNA **9** konnten jedoch keine genaueren Aussagen über die Interaktion mit dieser gemacht werden.

Im Fall der dsRNA **2** konnte ausschließlich eine Näherung nach einem *two sequential binding sites*-Modell den Kurvenverlauf beschreiben. Die Kurve mündete nach steilem Anstieg bei einem molaren Verhältnis von Protein:dsRNA von ca. 2:1 in einer Sättigung. Dies würde bedeuten, dass an ein dsRNA-Molekül zwei Moleküle Protein **1** binden. Weitere ITC-Experimente, beispielsweise eine Titration von Protein in in der Messzelle vorgelegte RNA, könnten weitere Aufschlüsse über das Bindungsverhalten geben.

### 4.3. Von dsRBP-ZFa abgeleitete Peptide

Die zugrundeliegende Idee der Entwicklung von peptidischen Nachbildungen des *double-stranded RNA-binding protein ZFa* ist die isolierte Darstellung des dsRNA-Erkennungsmotivs. Da vermutlich beide Zinkfingerdomänen dsRNA-Affinität haben, wurden von beiden Peptide synthetisiert, die dem Bereich des jeweiligen *Helix-turn-helix*-Motivs (HTH-Motiv) entsprechen. Im Protein wird die geknickte Geometrie durch Zinkkoordination der beiden Histidin-Reste stabilisiert, von denen jeweils einer in einer der beiden Helices lokalisiert ist (Abb. 1.7). Eine Möglichkeit, die Zinkkoordination zu imitieren, ist eine kovalente Zyklisierung über zwei Seitenkettenfunktionalitäten. Dabei sollte der räumliche Anspruch dieser Zyklisierung möglichst der der Koordination im Protein entsprechen.

In einer früheren Arbeit<sup>[167]</sup> wurden verschiedene Möglichkeiten einer *side chain-to-side chain* Zyklisierung mit Hilfe von *molecular modelling* und Moleküldynamik Simulationen evaluiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein zyklisches Peptid synthetisiert, welches das HTH-Motiv der zweiten Zinkfingerdomäne imitieren sollte. Die beiden das Zink koordinierenden Histidine wurden dabei durch ein Lysin und ein Glutamat substituiert, über deren Seitenketten durch Knüpfen einer Laktambindung zyklisiert wurde (**25**).

Generell sollte die zweite Zinkfingerdomäne als Vorlage für ein Peptid geeigneter sein, da sie:

- insgesamt einfacher aufgebaut ist. Im Gegensatz zur ersten Zinkfingerdomäne fehlt ihr die N-terminale  $\alpha$ -Helix, die in der ersten Domäne senkrecht gegen die N-terminale Helix des HTH-Motivs gepackt vorliegt, sowie das erweiterte  $\beta$ -Faltblatt, welches wie die N-terminale Helix ebenfalls hydrophobe Interaktionen mit Helix  $\alpha 2$  ausbildet,
- aufgrund weniger hydrophober Seitenketten leichter wasserlöslich sein dürfte,
- im Gegensatz zur ersten Zinkfingerdomäne keine schwefelhaltigen Aminosäuren im in Frage kommenden Sequenzabschnitt enthält, was sowohl für die Synthese als auch für die weitere Handhabung vorteilhaft ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide ausgehend von der Sequenz von beiden Zinkfingerdomänen synthetisiert, unter anderem auch mit N-terminalen Modifikationen zur späteren Immobilisierung für Bindungsexperimente. Neben dem oben beschriebenen zyklischen Vertreter wurden hauptsächlich lineare Sequenzen hergestellt. Abgesehen von der deutlich unkomplizierteren Synthese haben Voruntersuchungen Hinweise darauf geliefert, dass diese besser als Mimetika geeignet sein könnten (s.u.). Zwar ist bei diesen der Knick zwischen den Helices nicht fixiert, was einer exakten Nachbildung der aktiven Proteindomäne entgegenwirken könnte. Allerdings sind die offenkettigen Peptide deutlich flexibler, was bei der Komplexbildung mit Oligonukleotiden wiederum von Vorteil sein könnte<sup>[168,169]</sup>.

Sämtliche Peptide wurden an fester Phase unter Zuhilfenahme der Fmoc/tBu-Strategie synthetisiert. Die Kupplungen wurden teilweise von Hand in Spritzen mit eingesetzter PE-Fritte, teilweise am Peptidsynthesizer durchgeführt. Nach Abspalten vom polymeren Träger wurden die Peptide mittels RP-HPLC gereinigt. Die Charakterisierung erfolgte in der Regel mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. Die genauen Reaktions- und Reinigungsbedingungen sowie die durchgeführte Analytik sind in Abschnitt 8.3 für jedes Peptid detailliert beschrieben.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben. In Abschnitt 4.3.1 ist anhand von Peptid **31** das Vorgehen für die Resonanzzuordnung exemplarisch dargestellt. Für alle weiteren Peptide wurde analog dazu verfahren, die Zuordnung von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen sowie die ermittelten Kopplungskonstanten sind ebenfalls in 8.3 aufgeführt.

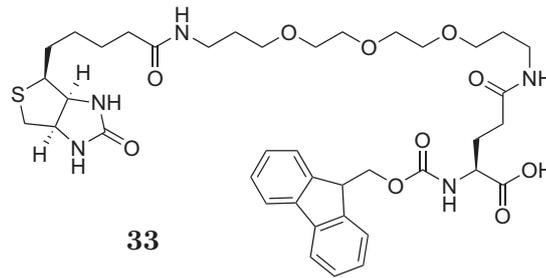
#### 4.3.1. Nachbildungen der zweiten Zinkfingerdomäne

Ausgehend von der zweiten Zinkfingerdomäne wurden sowohl zyklische, als auch lineare Peptide synthetisiert. Das oben beschriebene Zylopeptid **25** entspricht dem Sequenzausschnitt V108 - L125, wobei die Histidinreste 113 und 119 durch ein Lysin, bzw. ein Glutamat ersetzt wurden, über die eine amidische Seitenkettenzyklisierung ausgebildet wurde. Ebenfalls zyklisch, aber ohne den sich an die Zyklisierung anschließenden N-terminalen Teil, ist Peptid **26** (Abb. 4.19). Als Nebenprodukte wurden zwei lineare Spezies erhalten, Peptid **27**, bei dem die Aminofunktion des Lysins acetyliert ist, und Peptid **28**, welches die gleiche Sequenz wie Peptid **27** ohne das Glutamat an der Stelle von Histidin 113 hat.

Zur eventuellen Stabilisierung der helikalen Konformation wurde bei Peptid **29** ein längerer Proteinausschnitt gewählt (S106 - Q128), die beiden Histidinreste wurden jedoch auch in diesem Fall substituiert. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde desweiteren ein Peptid mit der nativen Sequenz S106 - Q128 synthetisiert (**30**). Als Negativkontrollen bei Bindungsexperimenten wurden außerdem die beiden jeweils inversen Sequenzen **31** und **32** hergestellt.

Die Immobilisierung von Peptiden auf SPR-Sensorchips erfordert in der Regel das Einführen von zu den Seitenketten orthogonalen Funktionalitäten. Zwar ist auch eine Immobilisierung über beispielsweise Carboxyl- oder Amidgruppen möglich. Dabei besteht jedoch die Gefahr einer Maskierung der mutmaßlich interagierenden Region. Daher wurden von den im letzten Abschnitt beschriebenen Peptiden jeweils Analoga mit einem N-terminalen, in der Seitenkette mit Biotin funktionalisierten Glutamatrest (Abb. 4.18) synthetisiert (Pepti-

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.18.:** Zur Einführung des Biotinylrestes verwendetes Glutaminsäurederivat Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH.

de **34**, **35**, **36** und **37**). Aufgrund anhaltender Probleme mit den Streptavidin-modifizierten Sensorchips wurden ebenfalls Analoga mit einem N-terminalen Cysteinrest hergestellt (Peptide **38**, **39**, **40** und **41**), um eine alternative Immobilisierungsmethode zu untersuchen.

		<u>Beschreibung</u>
	90            100            110            120            128	
	<b>SDGEDRSKCCPVCNMTFSSPVAESHYIGKTHIKNLRLEQ</b>	<b>dsRBP-ZFa 1-128</b>
<b>25</b>	VVAESEYIGKTKIKNLRL	V108 - L125, zyklisch, H113 & H119 subst.
<b>26</b>	EYIGKTKIKNLRL	E113 - L125, zyklisch, H113 & H119 subst.
<b>27</b>	VVAESEYIGKTKIKNLRL	V108 - L125, H113 & H119 subst., K119 acetyliert
<b>28</b>	VVAES YIGKTKIKNLRL	V108 - L125, del. H113 & H119 subst., K119 acetyliert
<b>29</b>	SPVVAESEYIGKTKIKNLRLEQ	S106 - Q128, H113 & H119 subst.
<b>30</b>	SPVVAESHYIGKTHIKNLRLEQ	S106 - Q128
<b>31</b>	QERLRLNKIKTKGIYESEAVVPS	Q128 - S106, H113 & H119 subst.
<b>32</b>	QERLRLNKIHTKGIYHSEAVVPS	Q128 - S106
<b>34</b>	Biotin-SPVVAESHYIGKTHIKNLRLEQ	S106 - Q128 mit N-term. Biotin-tag
<b>35</b>	Biotin-QERLRLNKIHTKGIYHSEAVVPS	Q128 - S106 mit N-term. Biotin-tag
<b>36</b>	Biotin-SPVVAESEYIGKTKIKNLRLEQ	S106 - L125, H113 & H119 subst., mit N-term. Biotin-tag
<b>37</b>	Biotin-QERLRLNKIKTKGIYESEAVVPS	Q128 - S106, H113 & H119 subst., mit N-term. Biotin-tag
<b>38</b>	C-SPVVAESHYIGKTHIKNLRLEQ	S106 - Q128 mit N-term. Cystein
<b>39</b>	C-QERLRLNKIHTKGIYHSEAVVPS	Q128 - S106 mit N-term. Cystein
<b>40</b>	C-SPVVAESEYIGKTKIKNLRLEQ	S106 - Q128, H113 & H119 subst., mit N-term. Cystein
<b>41</b>	C-QERLRLNKIKTKGIYESEAVVPS	Q128 - S106, H113 & H119 subst., mit N-term. Cystein

**Abbildung 4.19.:** Synthetisierte Peptide ausgehend von der zweiten Zinkfingerdomäne, verglichen mit der ursprünglichen Proteinsequenz. Schwarz dargestellt sind Aminosäurereste, die mit der Proteinsequenz identisch sind, rot solche, die nicht mit der Sequenz übereinstimmen.

Sämtliche von der zweiten Zinkfingerdomäne abgeleiteten Peptide sind in Abb. 4.19, verglichen mit der ursprünglichen Proteinsequenz, dargestellt. Rot eingefärbte Aminosäurebausteine markieren eine Abweichung von der nativen Proteinsequenz.

Fast alle Peptide wurden wie oben beschrieben nach Standardmethoden hergestellt. Einen Sonderfall stellen die *side chain-to-side chain* zyklisierten Peptide **25** und **26** dar. Hier wur-

de die Peptidkette zunächst bis zur zweiten zu zyklisierenden Aminosäure an fester Phase synthetisiert, wobei die Seitenketten der zu zyklisierenden Aminosäuren mit Schutzgruppen orthogonal (O-Allyl / N-Aloc) zu den restlichen (säurelabilen) Schutzgruppen geschützt wurden. Nach selektivem Entschützen der Allylschutzgruppen mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und HNBMe<sub>2</sub> wurde unter Zuhilfenahme von PyAOP und HOAt die Amidbindung geknüpft, bevor die Synthese konventionell fortgesetzt wurde.

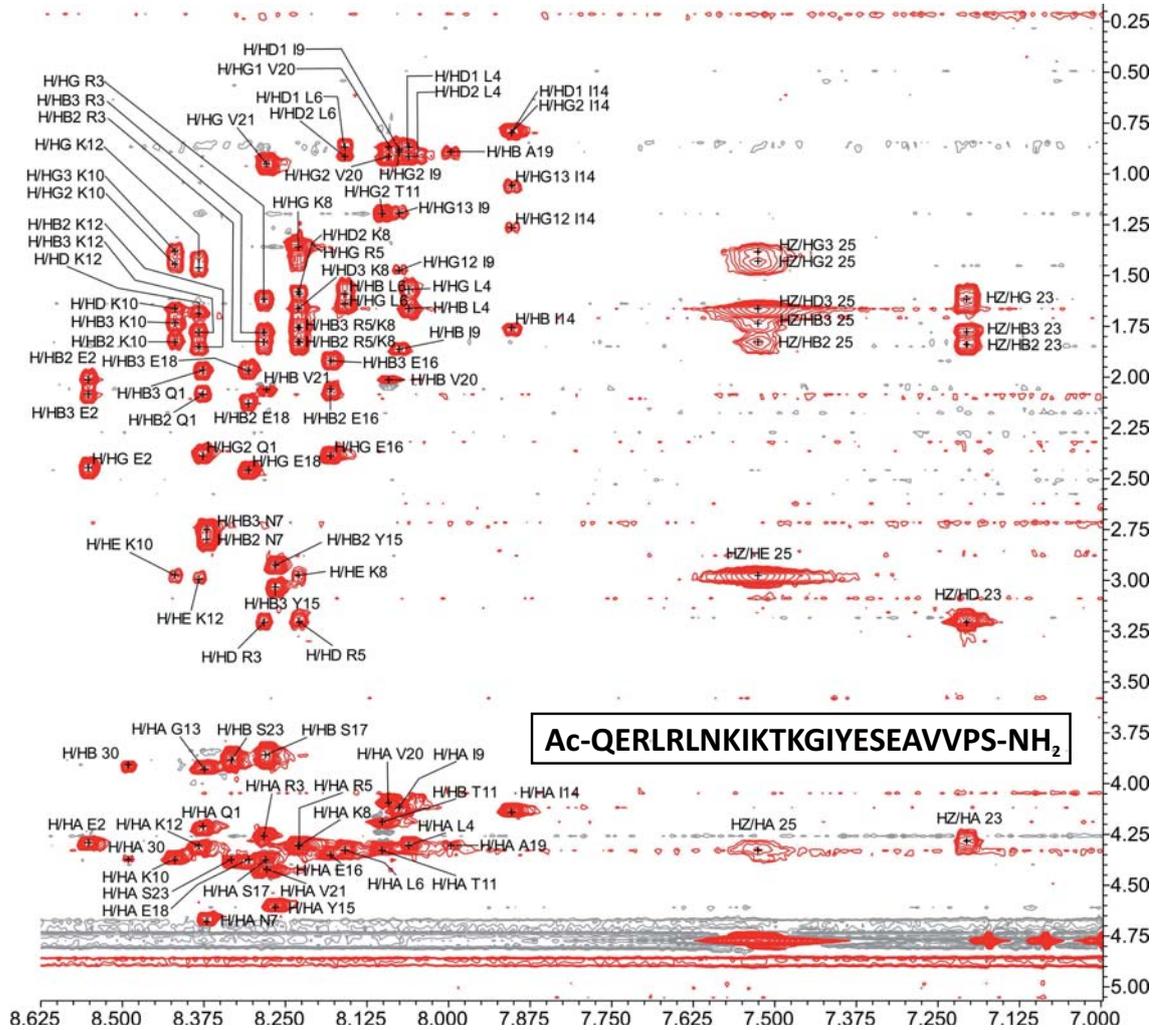
Bei den Peptiden mit Biotinrest wurden teilweise in nicht unerheblichem Maße Nebenprodukte mit einer Massendifferenz von +16 gefunden. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Oxidation des Biotins zum Biotinsulfoxid handelt. Zum einen wurde das Auftreten dieser Massendifferenz nur bei den biotinylierten Peptiden beobachtet, was den Schluss nahelegt, dass die Modifikation hier zu suchen ist. Zum anderen handelt es sich bei einer Massenzunahme von 16 häufig um einen zusätzlichen Sauerstoff. Auch ist die Oxidation von Biotin, wenn auch in anderem Kontext, ein durchaus bekanntes Phänomen.<sup>[170,171]</sup>

### Charakterisierung der Peptide

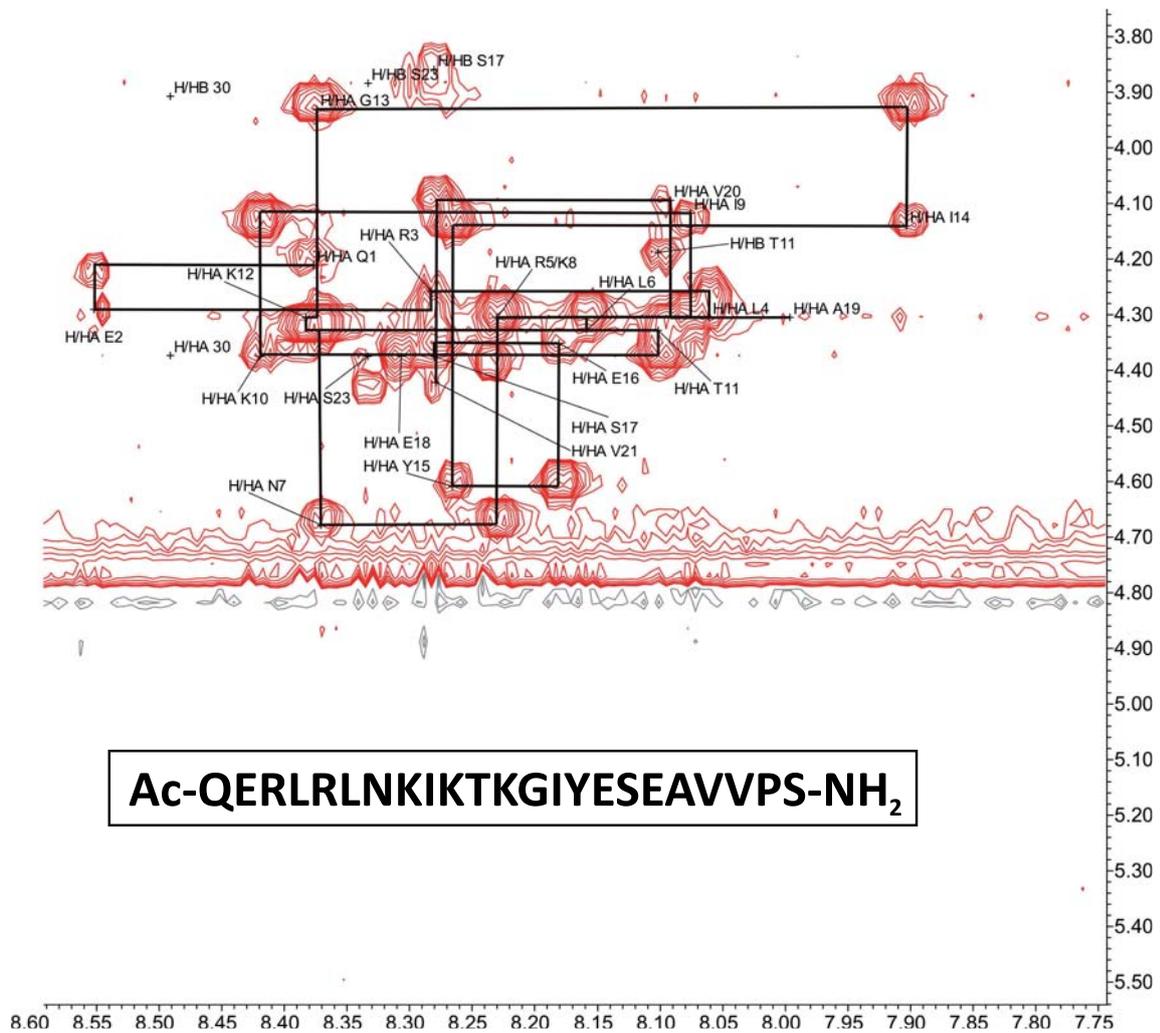
Die Charakterisierung der Peptide erfolgte in der Regel mit MALDI-MS und zweidimensionalen NMR-Experimenten. Zur Zuordnung der Protonenresonanzen wurden TOCSY, COSY und NOESY-Spektren aufgenommen, die Zuordnung der <sup>13</sup>C-Resonanzen erfolgte mit Hilfe von HSQC-Experimenten. Zunächst wurden mit Hilfe des TOCSY-Spektrums die charakteristischen Amidspuren identifiziert. Davon ausgehend konnten im NOESY-Spektrum einander benachbarte Aminosäuren identifiziert werden und den Spuren so ihre Position in der Sequenz zugeordnet werden. Zur genauen Zuordnung der Seitenkettenprotonen wurden COSY-Spektren verwendet. Durch dieses Zusammenspiel konnten die meisten Protonenresonanzen der synthetisierten Peptide eindeutig bestimmt werden. Exemplarisch ist in Abb. 4.20 das vollständig zugeordnete TOCSY-Spektrum von Peptid **31** dargestellt. Das dazugehörige NOESY-Spektrum ist in Abb. 4.21 gezeigt. Markiert sind die H<sup>N</sup>-H<sup>α</sup>-Kreuzsignale der jeweiligen Aminosäure. Diese sind mit Linien über die H<sup>N</sup>-H<sup>α-1</sup>-Kreuzsignale mit ihren jeweils in der Sequenz benachbarten Aminosäureresten verbunden.

Mit Hilfe der zugeordneten <sup>1</sup>H-Verschiebungen konnten nun anhand des HSQC-Spektrums viele der <sup>13</sup>C-Verschiebungen der synthetisierten Peptide zugeordnet werden. Gerade bei größeren Peptiden ist dies aufgrund der Signalüberlagerung in der Regel nicht für alle Resonanzen eindeutig möglich gewesen. Dies wäre unter Umständen mit Hilfe von HMBC-Spektren möglich gewesen. Aufgrund der deutlich geringeren Empfindlichkeit im Vergleich zum HSQC wurde aber in den meisten Fällen darauf verzichtet, da die Zuordnung der Protonenresonanzen zur eindeutigen Charakterisierung der Peptide ausreichte. Das vollständig zugeordnete HSQC-Spektrum von Peptid **31** ist in Abb. 4.22 dargestellt.

4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.20.:** Amid-Bereich von Peptid **31** eines 600 MHz TOCSY-Spektrums bei 300 K und pH = 3. <sup>[172]</sup> Das nicht zugeordnete Spinsystem Nr. 30 (ca. 8,5 ppm) könnte von einem isomeren Serinrest oder einer Verunreinigung stammen. Bei 7,525 ppm (Spinsystem 25) und 7,2 ppm (Spinsystem 23) sind die Spuren ausgehend von den Amid- bzw. Guanidinprotonen der Seitenketten von Lysin und Arginin zu sehen.



**Abbildung 4.21.:** Sequenzbestimmung von Peptid **31** anhand des Amid-Bereiches eines 600 MHz NOESY-Spektrums bei 300 K und pH = 3.<sup>[172]</sup> Die  $H^N$ - $H^{\alpha-1}$ -Kreuzsignale sind durch vertikale und horizontale Linien mit den Signalen der entsprechenden Aminosäuren verbunden. Die Sequenzfolge konnte bis auf den C-terminalen Teil Val21-Ser23 und das nicht eindeutig zu erkennende Kreuzsignal von Ala19 zu Glu18 komplett ermittelt werden.

4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

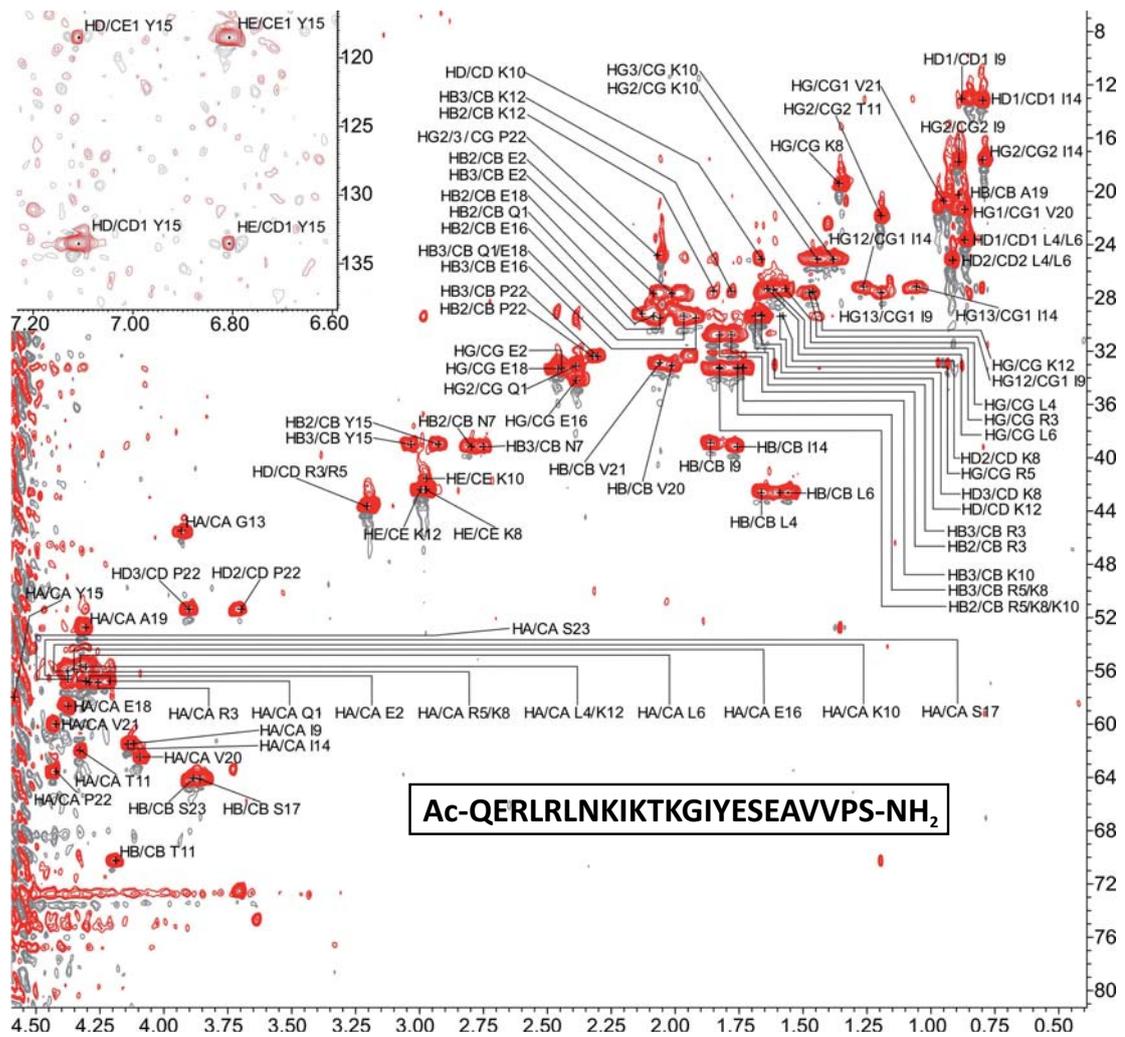


Abbildung 4.22.: 600 MHz HSQC-Spektrum von Peptid **31** bei 300 K und pH = 3.<sup>[172]</sup> Links oben ist der Bereich der aromatischen CH-Kreuzsignale von Tyr15 gezeigt.

Neben der zweifelsfreien Charakterisierung der synthetisierten Peptide bietet die Zuordnung der NMR-Spektren eine weitere mögliche Anwendung: die strukturelle Charakterisierung. Hinweise über eventuell vorliegende Sekundärstrukturen erhält man dabei aus Kopplungskonstanten sowie aus dem Vergleich der bestimmten chemischen Verschiebungen mit tabellierten, für bestimmte Sekundärstrukturmerkmale typischen Werten (siehe Kapitel 3.3.4).

In Abb. 4.23 sind die chemischen Verschiebungen einiger Peptide mit den tabellierten und bzgl. der Sequenz korrigierten Werten für *random-coil*-Strukturen<sup>[151,152]</sup> verglichen. Negative Werte für  $H^N$  und  $H^\alpha$  in den Balkendiagrammen deuten auf eine Tendenz zu  $\alpha$ -helikalen Strukturen hin, positive eher auf eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur.

Insgesamt ist die Mehrzahl der Balken für alle gezeigten Peptide im negativen Bereich. Allerdings sind die Bereiche negativer Werte bei den meisten untersuchten Peptiden entweder von positiven Werten unterbrochen oder die Abweichung ist so gering, dass eher von einer Tendenz hin zu  $\alpha$ -helikalen Strukturen ausgegangen werden kann. Besonders ausgeprägt ist dies bei Peptid **29**, dem N-terminalen Teil von Peptid **30** und, mit Abstrichen, dem C-terminalen Teil von Peptid **31** zu erkennen. Peptide dieser Größe sind in der Regel so flexibel dass, im Gegensatz zu gefalteten Proteinen, meist nur Tendenzen hin zu geordneten Sekundärstrukturen beobachtet werden können (vgl. Abschnitt 3.3.4, S. 42).

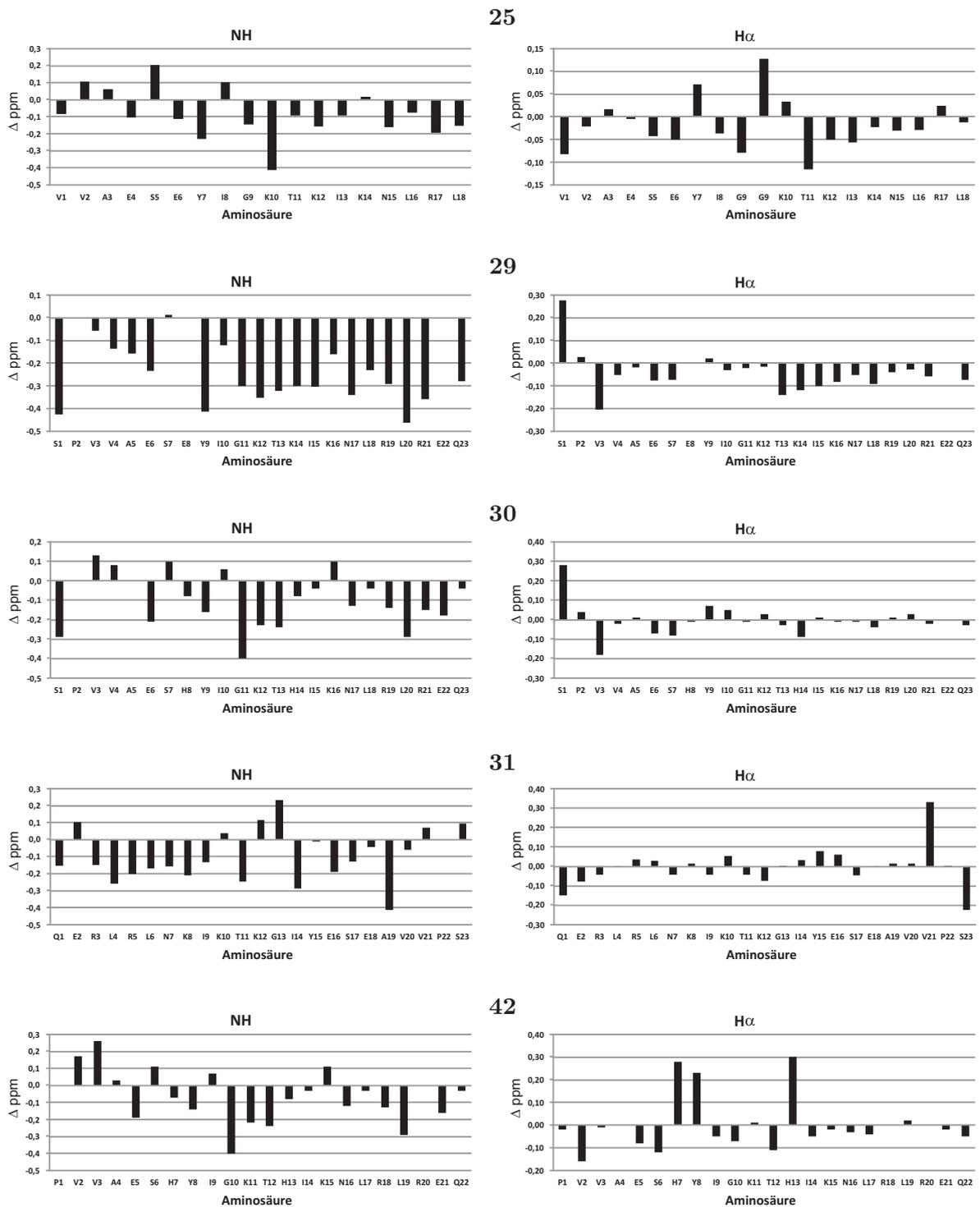
Die bestimmten  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten hingegen liegen allesamt im Bereich von 6 - 8 Hz. Daraus lassen sich keine Hinweise auf eine geordnete Sekundärstruktur ableiten.

Die in Abb. 4.24 abgebildeten CD-Spektren lassen ebenfalls keine Tendenzen hin zu geordneten Sekundärstrukturen erkennen. Dabei ist anzumerken, dass die Spektren in 10 mm-Küvetten aufgenommen wurden. Idealerweise verwendet man für Peptide und Proteine Küvetten mit kürzerem Strahlengang. Auch hätten sich unter Umständen die Pufferbedingungen noch optimieren lassen. Da der eventuelle Mehrwert optimierter CD-Spektren für diese Arbeit aber relativ gering gewesen wäre, wurde hierauf verzichtet.

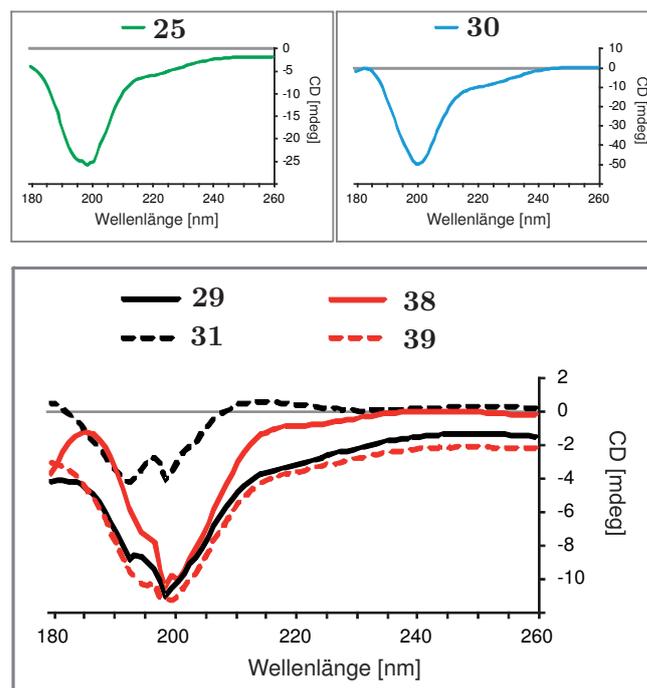
Wie bereits in Kapitel 3.3.4 beschrieben, liegen Peptide in Lösung meist in mehreren Konformationen vor. Daher kann mit den hier diskutierten Methoden allenfalls eine Tendenz hin zu einer bestimmten Sekundärstruktur beobachtet werden. Hinzu kommt, dass die NMR-Spektren bei  $\text{pH} = 3$  aufgenommen wurden, was der Ausbildung einer helikalen Konformation nicht förderlich ist.

Anhand der strukturellen Charakterisierung lässt sich bei einigen Peptiden zumindest eine Präferenz für das teilweise Vorliegen helikaler Strukturen ableiten. Besonders ausgeprägt ist dies beim Vergleich der chemischen Verschiebungen mit den tabellierten *random-coil*-Werten bei Peptid **29** zu beobachten.

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.23.:** Auftragung der  $H^N$ - und  $H^\alpha$ -chemischen Verschiebungen einiger ZF2-Mimetika gegen die tabellierten Werte für *random-coil*-Strukturen<sup>[151,152]</sup>. Negative Werte deuten auf eine  $\alpha$ -helikale Konformation hin.



**Abbildung 4.24.:** CD-Spektren der ZF2-Mimetika **25** und **30** (oben), sowie **29** und **38** und deren inverser Sequenzen **31** und **39**. Keines der Spektren deutet auf das Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Struktur hin. Die Messungen wurden in 10 mM Phosphatpuffer bei pH = 7,0 durchgeführt. Die Konzentration der Peptide betrug 10  $\mu$ M.

### Zink-Koordination

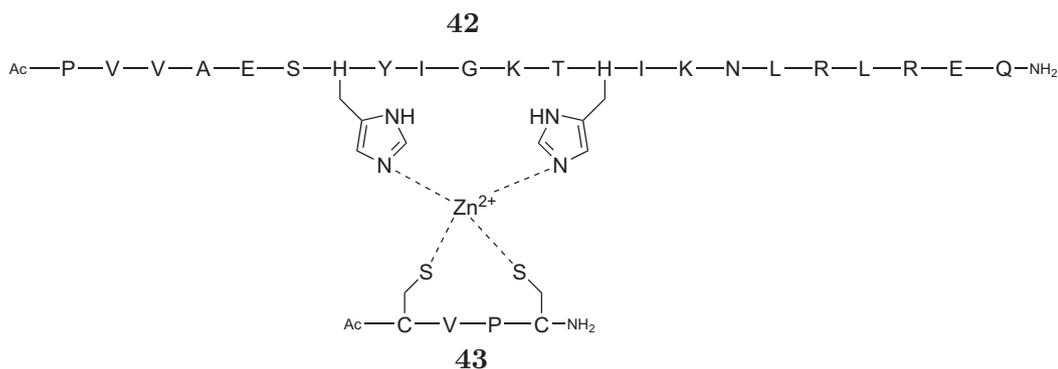
Im Proteinkontext ist der Knick zwischen den beiden Helices des HTH-Motives von ZF1 und ZF2 mutmaßlich durch die Koordination der beiden jeweils in einer der Helices lokalisierten Histidin-Reste induziert. Zudem binden die Thiolgruppen zweier weiterer Cysteinreste, die in den an das HTH-Motiv anschließenden  $\beta$ -Faltblättern lokalisiert sind, an das jeweilige Zinkion, woraus sich eine insgesamt tetraedrische Koordination des  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions ergibt. Alternativ zur kovalenten Seitenkettencyklisierung, wie bei Peptid **25**, sollte daher versucht werden, die Zinkkoordination über zwei Histidinreste im Peptidkontext zu realisieren.

Dazu wurde als HTH-Mimetikum ein N-terminal um eine Aminosäure verkürztes Derivat von Peptid **30** verwendet (Peptid **42**). Zur Nachbildung der Cysteinkoordination wurde das Tetrapeptid **43** synthetisiert, bei dem die zwei Cysteinreste (Cys<sub>97</sub> und Cys<sub>100</sub>) analog zur Proteinsequenz durch ein Valin und ein Prolin separiert sind. Die Sequenzen der beiden Peptide sind in Abb. 4.25 dargestellt.

Die Koordination der Peptide an  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sollte mit Hilfe von NMR-Titrations durch Beobachtung einer eventuellen Verschiebung von Signallagen untersucht werden. Eine Resonanzverschiebung kann dabei sowohl durch die eigentliche Koordination als auch durch

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

---



**Abbildung 4.25.:** Mögliche Zinkkoordination der beiden Peptide **42** und **43** ähnlich der im Proteinkontext beobachteten Komplexierung.

strukturelle Veränderungen entstehen. Für die Koordination der Peptide an das Zinkion ergeben sich folgende Möglichkeiten:

- keines der beiden Peptide geht eine Zinkkoordination ein,
- eines der beiden Peptide koordiniert zweifach im Sinne eines  $H_4-Zn^{2+}$ - oder  $C_4-Zn^{2+}$ -Komplexes,
- es entsteht, wie im Protein, eine  $C_2H_2-Zn$ -Koordination mit jeweils einem der beiden Peptide, wobei sich hier aufgrund der Chiralität am Zinkion weitere Variationen ergeben,
- bei Zinkzugabe entsteht zunächst ein Komplex zwischen einem der Peptide und dem Zinkion. Durch Zugabe des zweiten Peptides entsteht eine andere Komplexzusammensetzung. Auch in diesem Fall ergeben sich aufgrund der Chiralität am Zinkion mehrere Möglichkeiten.

Es wurden zwei NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde jeweils eines der beiden Peptide vorgelegt und zunächst eine  $Zn^{2+}$ -Ionen enthaltende Lösung bis zu äquimolarer Konzentration schrittweise hinzutitriert. Danach wurde das andere Peptid in äquimolarer Konzentration hinzugegeben.

Eine Schwierigkeit bei der NMR-spektroskopischen Analyse der Zinkkoordination ist der pH-Wert. Die Resonanzzuordnung von Peptiden wird in der Regel in saurer Lösung durchgeführt. Durch die so erreichte Protonierung der Amid-Stickstoffatome lassen sich die einzelnen Reste mit Hilfe von zweidimensionalen Experimenten eindeutig zuordnen. Die Versuche zur Zinkkoordination konnten jedoch nicht im Sauren durchgeführt werden, da für die Koordination der Histidine an das  $Zn^{2+}$  pH-Werte im neutralen Bereich am geeignetsten

sind. Der optimale pH-Wert ist stark von den den Histidinen benachbarten Aminosäuren abhängig, ein Wert von pH = 6,5 sollte aber unabhängig davon eine Koordination ermöglichen.<sup>[173]</sup>

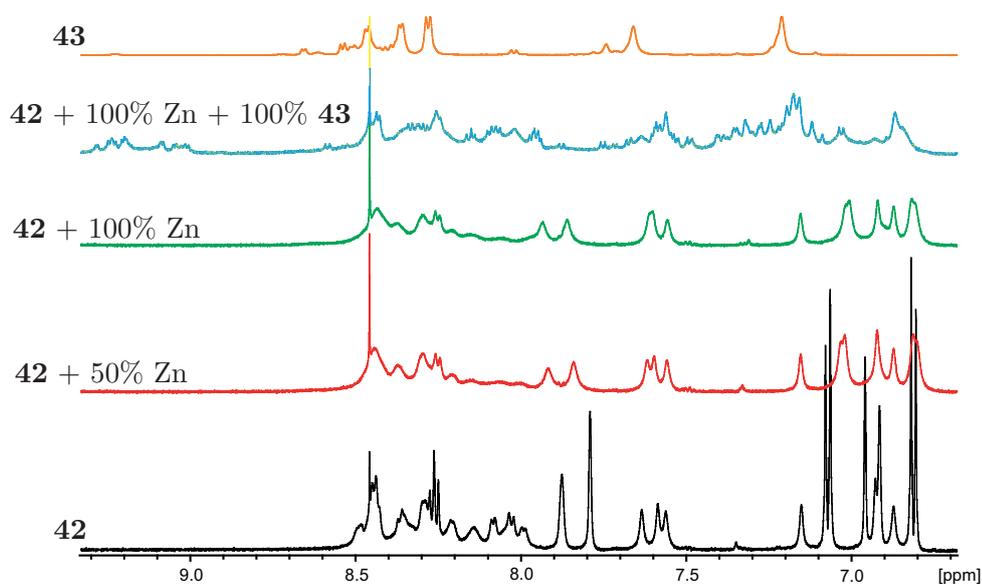
Da sich der pH-Wert bei Zugabe einer  $\text{Zn}^{2+}$ -Lösung verändern kann, wurde zunächst versucht, die Titration in gepufferter Lösung durchzuführen. Allerdings bildete sich bei Zugabe einer wässrigen  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung sowohl in Phosphat- als auch in Tris-gepufferter Lösung ein weißer Niederschlag. Dies könnte im Falle des Phosphatpuffers auf die Entstehung von wasserunlöslichem  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$  zurückzuführen sein. Die Titrationsexperimente wurden daher in wässriger Lösung durchgeführt, wobei der pH-Wert nach jedem Titrationschritt kontrolliert bzw. mit HCl/NaOH neu eingestellt wurde (Abb. 4.26).

Um zu verhindern, dass das Tetrapeptid **43** inter- oder intramolekulare Disulfidbindungen bildet, wurde in ersten Versuchen 1,4-Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Dieses bildete aber ebenfalls einen weißen Niederschlag bei Zugabe von wässriger  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung, weshalb bei den Titrationsexperimenten darauf verzichtet wurde.

Auch bei Vorlegen von Tetrapeptid **43** in wässriger Lösung wurde die Entstehung eines Niederschlages beobachtet. Dieser löste sich jedoch in Gegenwart von Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP).

Bei der in Abb. 4.26 gezeigten Titration wurde zunächst das die beiden Histidinreste enthaltende Peptid **42** in wässriger Lösung bei pH = 6,5 vorgelegt (schwarzes Spektrum). Danach wurde bis zu einem äquimolaren Verhältnis Peptid :  $\text{Zn}^{2+}$  in mehreren Schritten 0,1 M  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung hinzutitriert (grünes Spektrum). Bereits bei 50 %iger Zinkkonzentration (rotes Spektrum) war eine deutliche Signalverbreiterung sowie die Verschiebung einzelner Resonanzen zu beobachten. Nach Zugabe von Tetrapeptid **43** (blaues Spektrum) wurden die Signale deutlich schärfer, auch waren einige neue zu erkennen, die nicht im Spektrum des reinen Peptids **43** (gelbes Spektrum) zu finden sind, z.B. die Signale bei ca. 9,3 ppm, die in keinem der beiden Spektren der isolierten Peptide zu finden sind. Eine weitere Zugabe von  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung bis zu einem 1,5-fachen Überschuss brachte keine weitere Veränderung im NMR-Spektrum (nicht gezeigt).

In Abb. 4.27 ist das NMR-Titrationsexperiment gezeigt, bei dem  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung zu Peptid **43** hinzutitriert wurde. Wie oben bereits erwähnt, wurde bei der wässrigen Lösung von Peptid **43** die Entstehung eines weißen Niederschlages beobachtet. Dieser löste sich nach Zugabe von TCEP (rotes Spektrum), die Signale des Peptids wurden deutlich intensiver. Im Gegensatz zu Peptid **42** ist hier keine signifikante Veränderung des NMR-Spektrums bei sukzessiver Zinkzugabe zu beobachten. Nach Zugabe von  $\text{ZnSO}_4$  bis zu äquimolarer Konzentration wurde Peptid **42** in identischer Menge zugegeben. In Abb. 4.28 sind die beiden Spektren nach jeweils beendeter Titration miteinander verglichen. Das Spektrum, bei

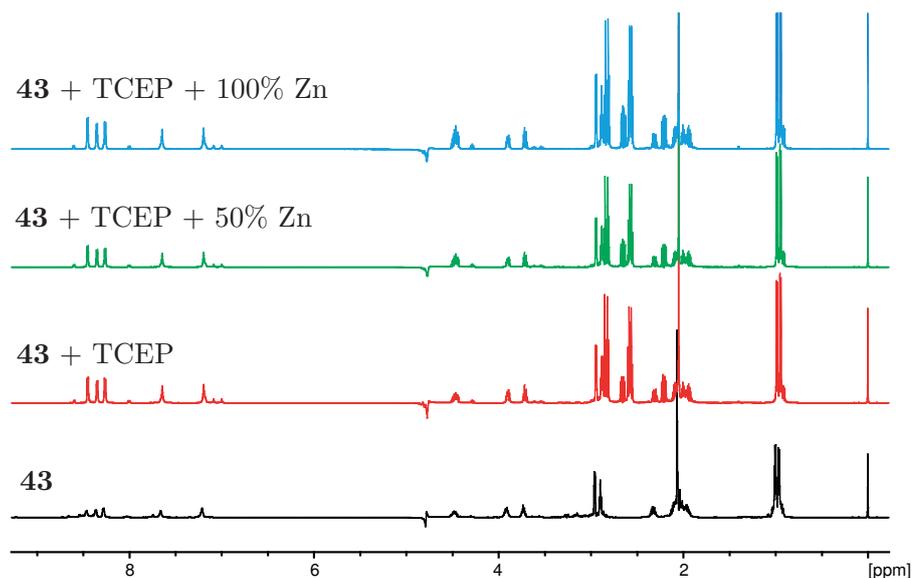


**Abbildung 4.26.:** NMR-Titrationsexperiment bei 300 K und pH = 6,5, bei dem zunächst das längere, die beiden Histidinreste enthaltende Peptid **42** vorgelegt und mit ZnSO<sub>4</sub>-Lösung versetzt wurde. Mit steigender Zinkkonzentration ist eine deutliche Verbreiterung der Signale zu beobachten. Nach Zugabe von Tetrapeptid **43** werden diese wieder schärfer. Auch ist das Auftreten von neuen Signalen zu beobachten.

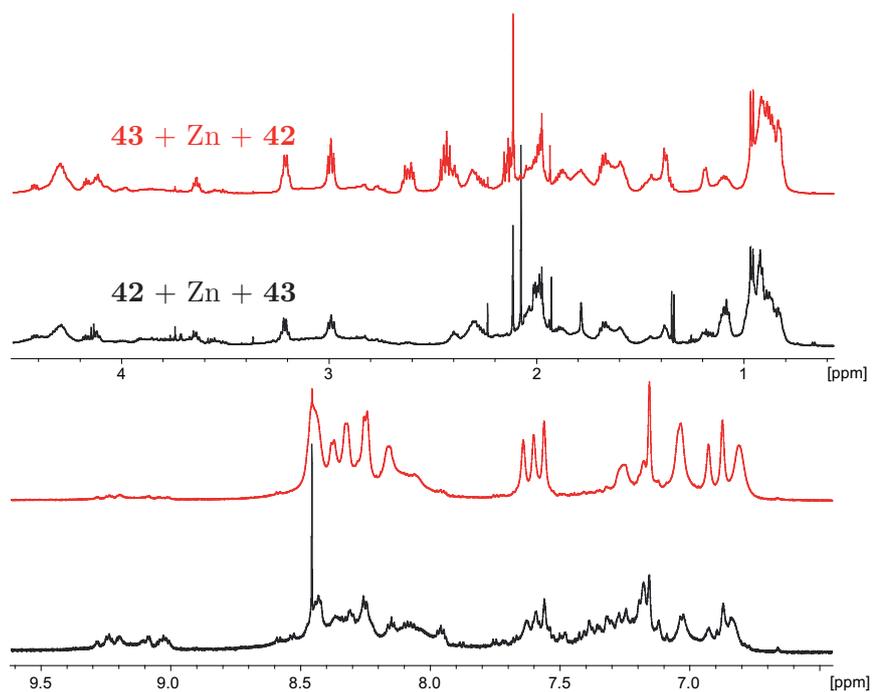
dem das lange Peptid vorgelegt wurde (schwarzes Spektrum) hat die deutlich schärferen Signale. Auch sind die im Laufe der Titration jenseits von neun ppm neu auftretenden Signale intensiver. Das die Unterschiede in den beiden Spektren alleine auf die Anwesenheit von TCEP zurückzuführen sind ist eher unwahrscheinlich, kann aber aufgrund fehlender Vergleichsexperimente nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Faktoren für Unterschiede in den beiden Spektren könnten nicht ganz identischer Konzentrationsverhältnisse sein, da die Peptide für die jeweiligen Titrationsexperimente separat eingewogen wurden. Auch eine unterschiedliche Koordination an das Zinkion oder eine mögliche Konkurrenz verschiedener Komplexformen abhängig von der Menge der sich jeweils in Lösung befindlichen Peptide könnte für Abweichungen hinsichtlich Signalschärfe oder Intensität verantwortlich sein.

Es war daher schwierig, in diesem Fall anhand der NMR-Titrationen definitive Aussagen über die Zinkkoordination der beiden Peptide zu machen. Die Linienverbreiterung der Signale von Peptid **42** in den Spektren in Abb. 4.26 nach Zugabe von ZnSO<sub>4</sub>-Lösung deuten auf eine Koordination der Histidinreste hin. Nach Zugabe von Tetrapeptid **43** wurden die Signale wieder schärfer. Die Ursache hierfür könnte sein, dass sich die beiden Cysteinreste ebenfalls an das Zinkion anlagern und so, analog zum Protein, ein Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-



**Abbildung 4.27.:** NMR-Titration des Tetrapeptids **43** mit  $\text{ZnSO}_4$  bei 300 K und  $\text{pH} = 6,5$ . In wässriger Lösung des Peptids wurde das Entstehen eines weißen Niederschlages beobachtet, welcher sich nach Zugabe von TCEP wieder auflöste (rotes Spektrum). Zugabe von Zink bis hin zu einer äquimolaren Konzentration bewirkte keine sichtbare Änderung im NMR-Spektrum.



**Abbildung 4.28.:** Vergleich der Spektren der beiden Titrationsreihen nach beendeter Zugabe von Zinksulfat und dem jeweils anderen Peptid. Bei der Aufnahme des roten Spektrums war zusätzlich TCEP zugegen (Signal bei 2,6 ppm). Das schwarze Spektrum, bei dem zunächst das lange Peptid vorgelegt wurde, zeigt die deutlich schärferen Signale.

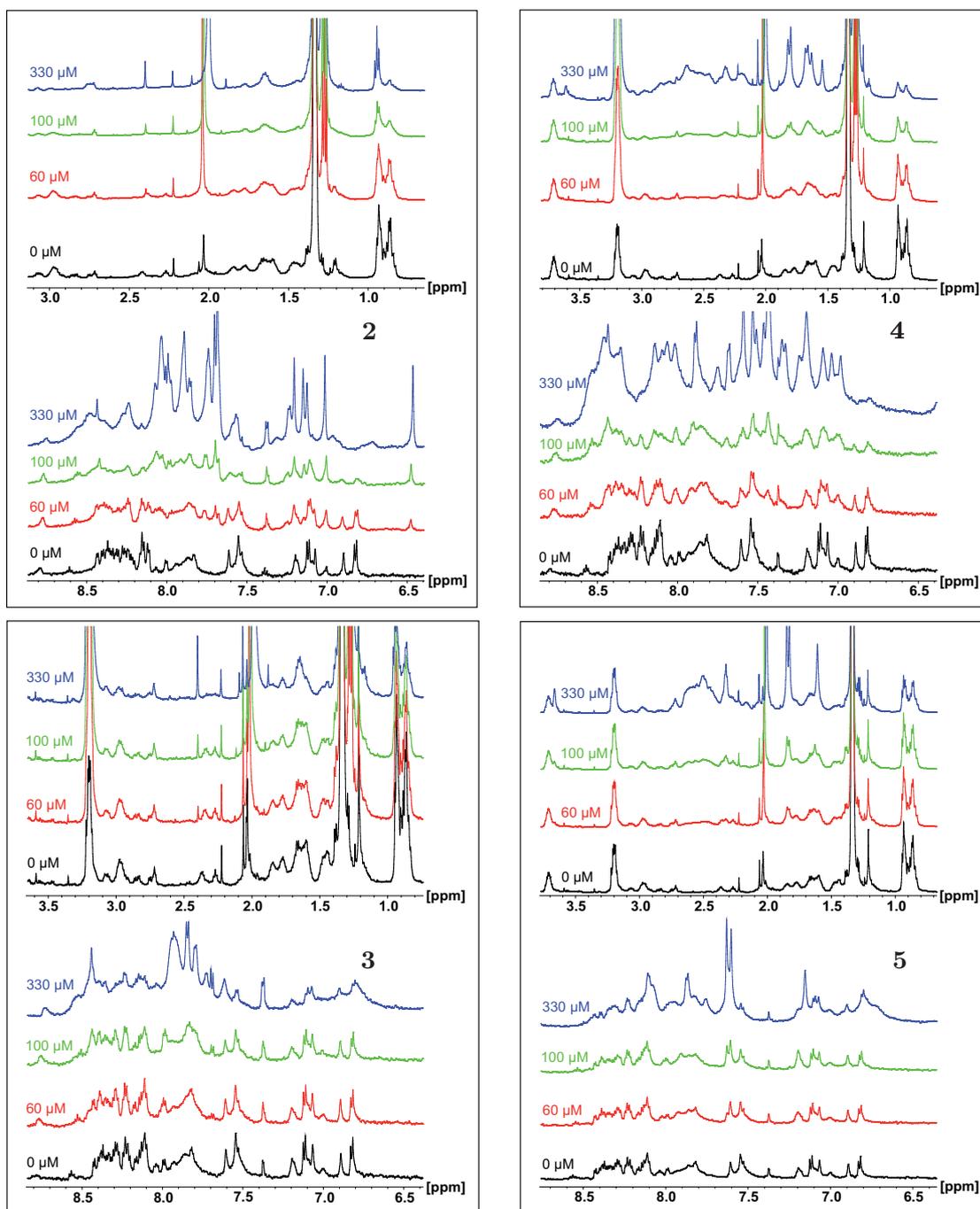
Zinkkomplex entsteht. Das Entstehen weiterer und schärferer Signale kann mit einer langsameren Austauschgeschwindigkeit des Zinkions im Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Komplex, verglichen mit dem His<sub>2</sub>-Komplex, bzw. einer größeren Stabilität dessen erklärt werden. Auch der Vergleich der oberen drei Spektren in Abb. 4.26 deutet auf die gewünschte Komplexbildung hin. Zum einen sind die Signale von Tetrapeptid **43** (gelbes Spektrum) in Gegenwart von Zn<sup>2+</sup>-Ionen und Peptid **42** (blaues Spektrum) nicht deckungsgleich. Zum anderen treten die Signale in der Gegend von 9,3 ppm ausschließlich in Gegenwart aller drei Komponenten auf, also weder bei Titration von Peptid **42**, noch bei der von Peptid **43** mit ZnSO<sub>4</sub>-Lösung.

Dass sich das Spektrum des Tetrapeptids bei Zinkzugabe nicht verändert, kann mehrere Ursachen haben. Denkbar ist zum Beispiel, dass sich kein Cys<sub>2</sub>-Zn<sup>2+</sup>- oder Cys<sub>4</sub>-Zn<sup>2+</sup>-Komplex zwischen Peptid und Zn<sup>2+</sup>-Ion ausbildet bzw. ein solcher aufgrund einer niedrigen Bindungskonstante nicht im NMR-Spektrum zu sehen ist. Dagegen scheint ein Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Zn<sup>2+</sup>-Komplex in Gegenwart eines zusätzlichen His<sub>2</sub>-Liganden wesentlich stabiler zu sein. Eine weitere Möglichkeit wäre ein störender Einfluss des bei der zweiten Titration zugegebenen TCEPs. Gegen einen solchen Einfluss spricht die relativ große Ähnlichkeit der beiden nach beendeter Titration aufgenommen Spektren (Abb. 4.28) im Vergleich zu den Spektren der reinen Peptide. Allerdings sind die bei der ersten Titration neu entstandenen Signale im Bereich von 9,3 ppm in den Spektren der zweiten Titration nur sehr schwach zu sehen. Ein Vergleich mit den chemischen Verschiebungen im Spektrum des Proteinkonstruktes **1**<sup>[15]</sup> brachte keine eindeutige Erklärung für die neu auftretenden Signale. Zwar sind dort vier Amidprotonen mit einer chemischen Verschiebung von mehr als neun ppm zu finden, allerdings gehören diese zu Aminosäureresten der ersten Zinkfingerdomäne (K37, E46 und R56) bzw. befinden sich auf der N-terminalen Seite von dieser (H29). Es kann also durchaus zu solchen chemischen Verschiebungen im gefalteten Zinkfingerkontext kommen. Da bei den hier beschriebenen Titrationen ein von der zweiten Zinkfingerdomäne abgeleitetes Konstrukt eingesetzt wurde sind direkte Rückschlüsse aber nicht möglich.

Die hier gezeigten Experimente deuten also darauf hin, dass es möglich ist, Peptide mit zwei Histidinresten in passendem Abstand voneinander mit Hilfe von Zinkionen in Gegenwart eines Cys<sub>2</sub>-Liganden mit einer eventuell einhergehenden strukturellen Änderung zu komplexieren. Für genauere Aussagen hinsichtlich des Komplexierungsverhalten und dessen Einfluss auf die Struktur der Peptide wären aber weitere Experimente notwendig.

#### **NMR-Titrationen mit verschiedenen Oligonukleotiden**

Mit dem Zylopeptid **25** wurden NMR-Titrationen mit den vier verschiedenen Oligonukleotidmotiven **2** - **5** aus Abb. 4.1, S. 56 (links) durchgeführt (Abb. 4.29). Die Peptidkon-



**Abbildung 4.29.:** Titrationsreihe des Zyklopeptids **25** mit den vier Oligonukleotidmotiven **2**, **3**, **4** und **5**. Im Gegensatz zu den einzelsträngigen Vertretern (unten) ist bei den doppelsträngigen Oligonukleotiden eine Linienverbreiterung bei verschiedenen Resonanzen deutlich zu erkennen (oben). Die Spektren wurden in acetatpufferter Lösung (pH = 4,5) bei 300 K aufgenommen. Die Peptidkonzentration lag bei etwa 150  $\mu\text{M}$ . Zur Prozessierung wurde eine Exponentialfunktion (Linienbreite 2 Hz) verwendet.

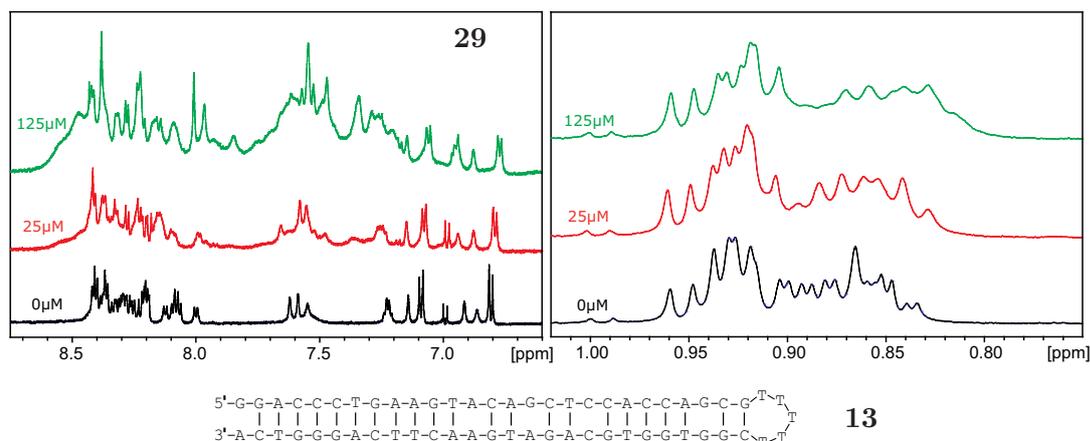
zentration betrug jeweils ungefähr 150  $\mu\text{M}$ . Es wurde bis zu einer zweifachen Oligonukleotidkonzentration titriert.

Vergleicht man die einzelnen Titrationsreihen miteinander, so fällt auf, dass sowohl bei der dsRNA **2** als auch bei der dsDNA **4** eine relativ starke Linienverbreiterung zu beobachten ist, die bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen einsetzt. Im Gegensatz zur dsDNA scheint diese bei der dsRNA spezifischer zu sein. Betrachtet man zum Beispiel den Bereich der aliphatischen Protonen, verbreitern sich die weniger tieffeldverschobenen Signale sehr stark, während sich die restlichen in diesem Bereich nur sehr wenig ändern. Die betroffenen Signale sind den Leucin- und Isoleucinseitenketten zuzuordnen. Auch die Signale der aromatischen Tyrosinprotonen (Dubletts bei 6,82 und 7,12 ppm) zeigen eine starke Linienverbreiterung sowie eine Verschiebung der Signallagen bereits bei relativ niedrigen RNA-Konzentrationen. Bei der dsDNA hingegen ist eine Verbreiterung aller Signale der aliphatischen Protonen zu beobachten. Bei den beiden einzelsträngigen Liganden hingegen ist nahezu keine Veränderung im Peptidspektrum zu erkennen.

Es scheint also eine Wechselwirkung zwischen Zyklopeptid und doppelsträngigen Nukleotidmotiven stattzufinden. Die Bindung an dsRNA könnte dabei angesichts der Unterschiede spezifischer sein als die Bindung an dsDNA. Mit einzelsträngigen Vertretern scheint keine Interaktion stattzufinden.

Bei (später beschriebenen) SPR-Experimenten wurde eine starke Interaktion des Peptidmimetikums **29** der zweiten Zinkfingerdomäne mit der doppelsträngigen DNA **13** beobachtet. NMR-Titrationsexperimente könnten nähere Informationen über diese Wechselwirkung liefern. Dazu wurden das Peptid **29** sowie, als Negativkontrolle, dessen inverse Sequenz **31**, in acetatgepuffertem Lösung vorgelegt und schrittweise mit dsDNA **13** versetzt. Die ursprünglichen Spektren sowie zwei Titrationspunkte sind in Abb. 4.30 gezeigt. Bereits bei geringer DNA-Zugabe (rotes Spektrum) ist in beiden Spektren eine Veränderung in Form von Linienverbreiterung zu beobachten, die sich bei weiterer Zugabe weiter verstärkt (grünes Spektrum). Bei Fortsetzen der Oligonukleotidzugabe wurden keine weiteren signifikanten Änderungen beobachtet.

Die beobachtete Linienverbreiterung deutet zunächst auf eine Wechselwirkung zwischen Peptid und DNA hin. Da diese aber sowohl bei Peptid **29** als auch bei dessen inverser Sequenz **31** zu beobachten ist, muss in diesem Fall von einer unspezifischen und nicht von der 3D-Struktur des Peptidliganden abhängigen, evtl. ladungsvermittelten Wechselwirkung ausgegangen werden.



**Abbildung 4.30.:** NMR-Titrationsexperimente der beiden Peptide **29** und dessen inverser Sequenz **31** mit der doppelsträngigen DNA **13**. Bei beiden Titrationsreihen ist eine Linienverbreiterung einzelner Signale zu erkennen. Dies könnte auf eine unspezifische, ladungsvermittelte Wechselwirkung hindeuten. Die Spektren wurden in acetatgepufferter Lösung (pH = 4,5) bei 300 K aufgenommen. Die Peptidkonzentration betrug 150  $\mu$ M.

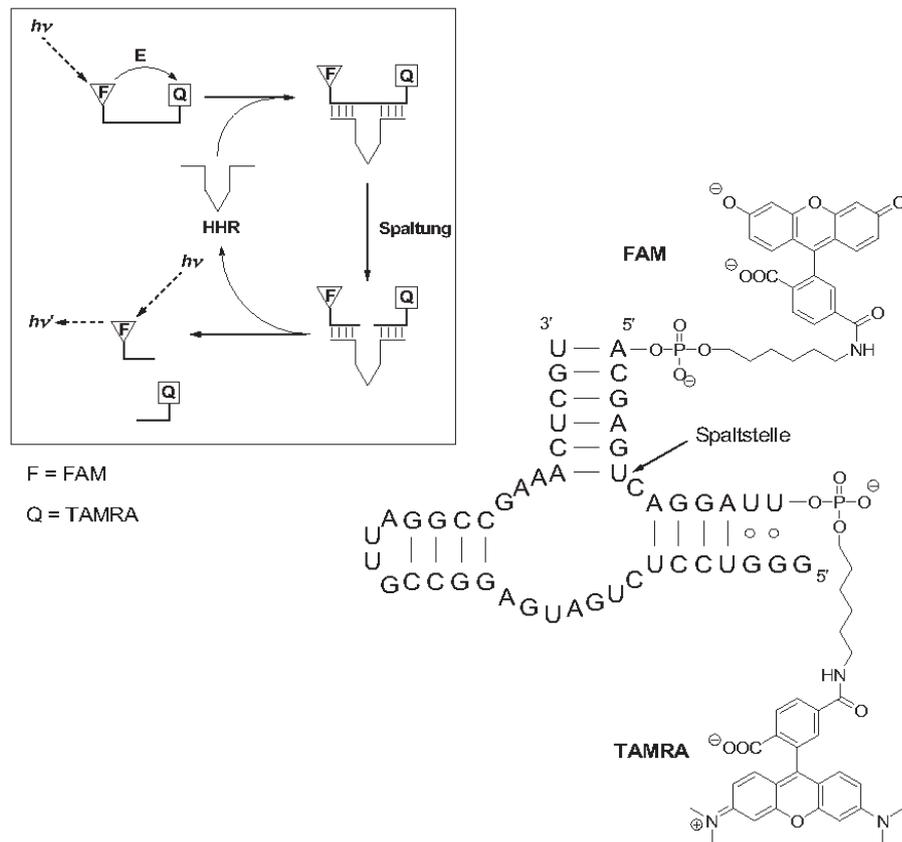
### HHR-Assays

Ribozyme finden in zunehmendem Maße Anwendung in der Biotechnologie. Das dabei am häufigsten verwendete Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym (HHR). Dabei handelt es sich um eine kleine, katalytisch aktive RNA, die sich selbst und andere RNA-Moleküle intermolekular spalten kann.<sup>[174]</sup> Diese Eigenschaft kann man sich in Testsystemen zunutze machen, indem man als Substrate Fluoreszenzresonanzenergie-Transfer-(FRET)-Oligonukleotide verwendet.

Bei dem hier verwendeten System wurde als Substrat ein mit den Chromophoren 6-Carboxyfluoreszein (FAM) am 5'-Ende und 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) am 3'-Ende markierter RNA-Strang verwendet.<sup>[175]</sup> Durch die räumliche Nähe der beiden Chromophore tritt Fluoreszenzlöschung ein. Wird das Substrat vom Ribozym gespalten, ist ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Da für die Spaltungsreaktion  $Mg^{2+}$ -Ionen essentiell

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

sind, kann die Reaktion zu einem definierten Zeitpunkt gestartet und in Echtzeit verfolgt werden. In Abb. 4.31 ist der Ribozym-Substrat-Komplex (rechts) und der Reaktionsmechanismus (links) schematisch dargestellt.<sup>[176]</sup>

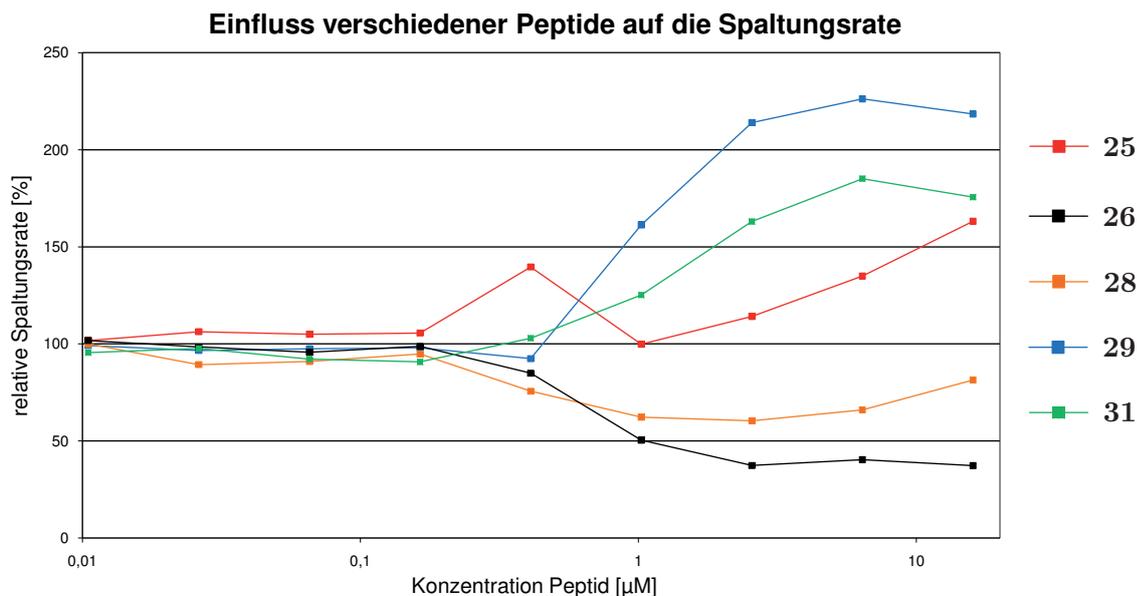


**Abbildung 4.31.:** Mechanismus (links) und Ribozym-Substrat-Komplex (rechts) der HHR-Testreaktion.<sup>[176,177]</sup>

Führt man die Reaktion in Gegenwart von Substanzen durch, die an das Ribozym und/oder den Ribozym-Substratkomplex binden, kann die Spaltung inhibiert werden, was durch eine Abnahme des Fluoreszenzanstieges detektierbar ist. Da sowohl im HHR alleine, als auch im Komplex mit dem Substrat doppelsträngige Bereiche vorliegen, könnte dieses Testsystem zur Identifizierung von dsRNA erkennenden Peptiden geeignet sein.

Zur Evaluierung der Testreaktion wurden zunächst einige Peptide bei verschiedenen Konzentrationen untersucht (Abb. 4.32). Die stärkste Inhibition der Spaltungsreaktion zeigte das kurze zyklische Peptid **26**. Auch bei Peptid **28** war ein inhibierender Effekt zu beobachten. So gut wie keinen Effekt auf die Spaltungsreaktion hatte das Zyklopeptid **25**, mit dem die oben beschriebenen NMR-Titrations durchgeführt wurden, wohingegen dessen

lineares Analogon **29** sowie die korrespondierende inverse Sequenz **31** eine Beschleunigung der Spaltungsreaktion bewirkten. Im Falle von Verbindung **29** erreichte die relative Spaltungsrate sogar einen mehr als doppelt so hohen Wert. Der Grund für diesen Effekt konnte nicht geklärt werden. Es deutet aber in jedem Fall auf eine Interaktion zwischen Peptid und dem Ribozym, dem Substrat oder dem Komplex aus beiden hin, wobei die Art der Wechselwirkung jedoch unklar bleibt.

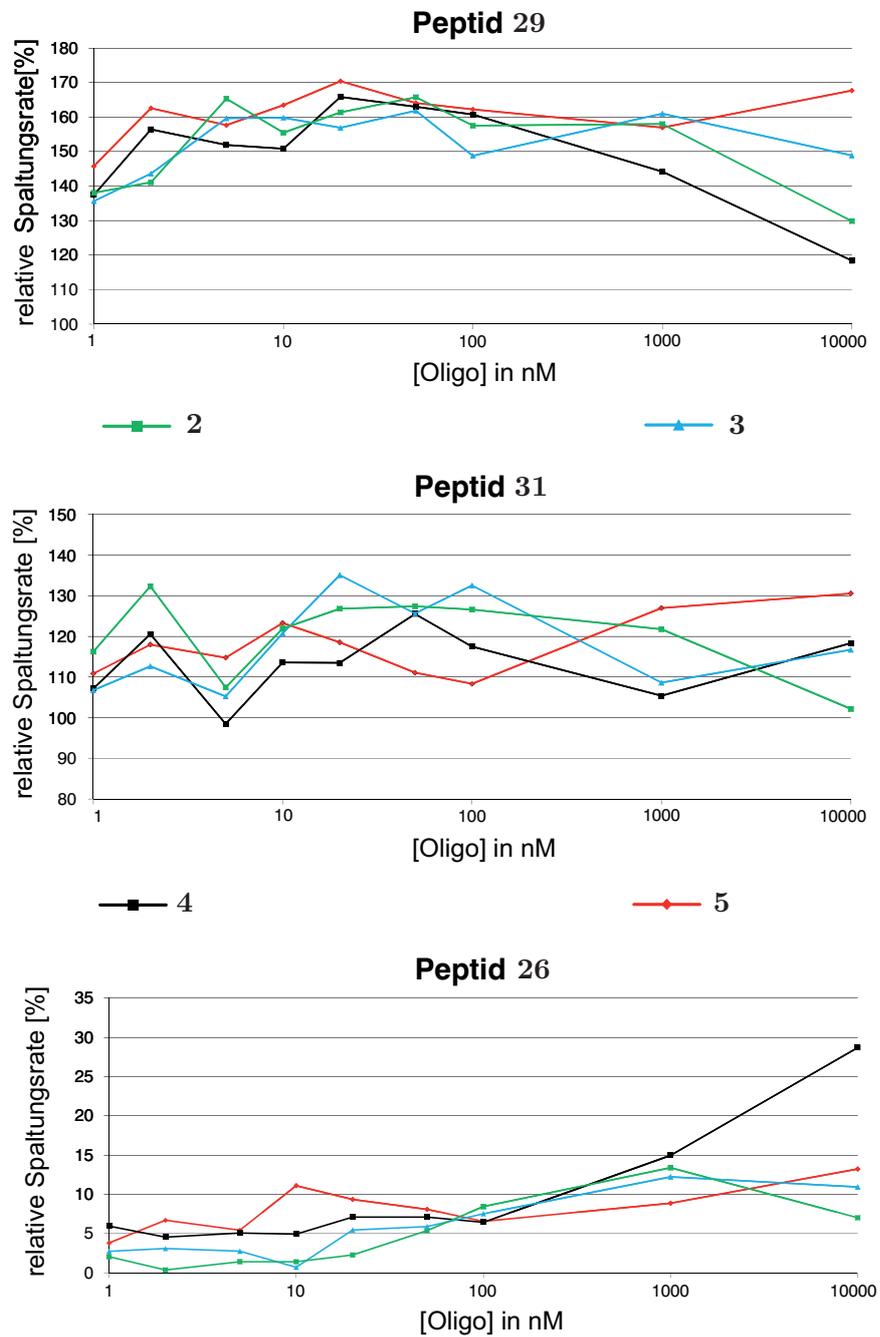


**Abbildung 4.32.:** HHR-Spaltungsreaktion in Gegenwart verschiedener Peptide. Aufgetragen ist die Konzentration gegen die relative Spaltungsrate. Das kurze zyklische Peptid **26** zeigt eine deutliche Inhibition der HHR-Reaktion, während das lineare ZF2-Mimetikum **29**, sowie dessen inverse Sequenz **31** einen beschleunigenden Effekt haben.

Mit den beiden beschleunigenden (**29** und **31**) und dem am stärksten inhibierenden (**26**) Peptiden wurden Kompetitionsstudien mit den vier bei den oben beschriebenen NMR-Titrations verwendeten Oligonukleotidmotiven **2**, **3**, **4** und **5** durchgeführt. Die Konzentration der Peptide betrug 2 µM, für die Oligonukleotide wurden Konzentrationsreihen von 0,1 nM bis 10 µM hergestellt.

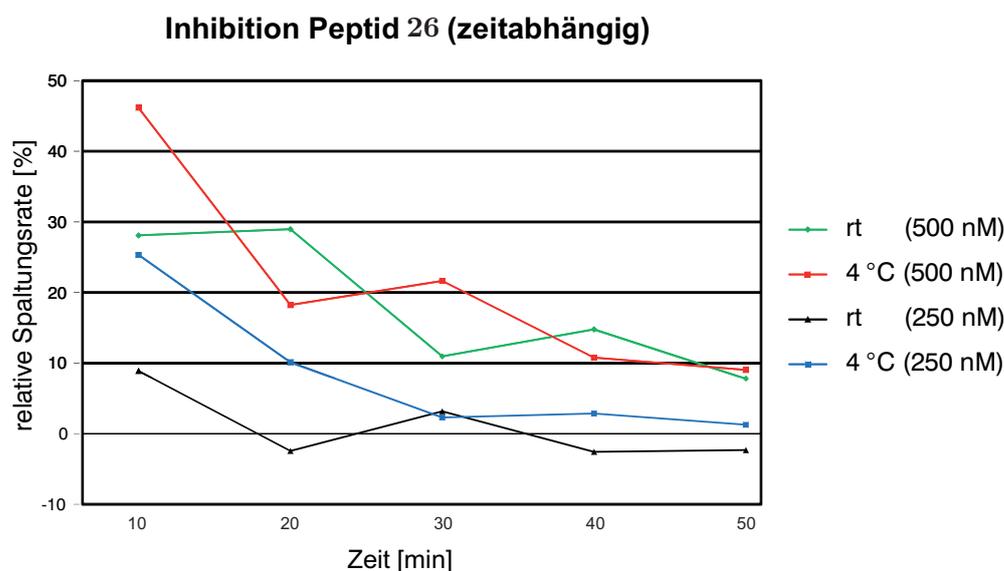
Bei Bindung eines Oligonukleotids an die Peptide sollte sich eine Veränderung bei der relativen Spaltungsrate der HHR-Reaktion beobachten lassen. In Abb. 4.33 sind drei Diagramme, jeweils eines für das entsprechende Peptid, mit den vier Oligonukleotiden dargestellt. Signifikante Veränderungen waren kaum zu beobachten. Bei dem kurzen zyklischen Peptid **26** stieg die relative Spaltungsrate bei sehr hohen Konzentrationen der doppelsträngigen DNA **4** etwas an, während die beiden doppelsträngigen Motive **2** und **4** die Beschleunigung der Spaltungsreaktion durch das lineare ZF2-Mimetikum **29** bei hohen Konzentrationen etwas verminderten.

4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.33.:** Wettbewerbsstudien mit den vier verschiedenen Oligonukleotidmotiven 2 (grün), 3 (blau), 4 (schwarz) und 5 (rot). Getestet wurde der Einfluss auf die Inhibition bzw. Beschleunigung der HHR-Spaltungsreaktion in Gegenwart verschiedener Konkurrentkonzentrationen.

Während die Werte der relativen Spaltungsrate bei den Experimenten von Peptid **26** in Gegenwart von Kompetitoren bei nahezu 0 liegen, beträgt der Grad der Abschwächung ohne Kompetitoren nur etwa 40 %. Durch die Notwendigkeit der Herstellung einer zusätzlichen Verdünnungsreihe bei den Experimenten mit Kompetitor ergibt sich eine deutliche längere Verweilzeit von Peptid und Ribozym in Lösung.



**Abbildung 4.34.:** Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit auf die relative Spaltungsrate der HHR-Reaktion in Gegenwart von Peptid **26**. Ebenfalls variiert wurden Substratkonzentration und Inkubationstemperatur.

Um den Einfluss der Inkubationszeit zu untersuchen, wurden zeitabhängige Inhibitionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich der Einfluss der Temperatur (4 °C und Raumtemperatur) und der Substratkonzentration (250 nM und 500 nM) untersucht.

In Abb. 4.34 sind die entsprechenden Kurven gezeigt. Aufgetragen wurde jeweils die relative Spaltungsrate gegen die Zeit, incl. den oben beschriebenen Variationen in Temperatur und Substratkonzentration. Es ist zu erkennen, dass die Temperatur bei der Inkubation eine eher untergeordnete Rolle spielt, während eine niedrigere Substratkonzentration offensichtlich eine geringere relative Spaltungsrate bewirkt. Allen Kurven gemein ist ein deutlicher Abfall bei zunehmender Inkubationszeit, was die vorangegangenen Beobachtungen bestätigt. Möglich wäre eine Präzipitation von HHR oder Substrat mit dem Peptid, worauf auch weiterführende Experimente mit radioaktiv markiertem Ribozym hindeuteten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibitionsexperimente mit dem Hammerhead-Ribozym durchaus vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben. Allerdings müssten für eine geeignete Anwendung des Systems im beschriebenen Kontext Bedingungen ohne Präzipitation gefunden werden.

### SPR-Experimente

Erste Bindungsexperimente wurden mit den immobilisierten RNA-Motiven **22** und **23** (S. 58) durchgeführt. Dabei konnte keinerlei Wechselwirkung mit den fünf in Tab. 4.5 aufgeführten eingesetzten HTH-Mimetika der zweiten Zinkfingerdomäne nachgewiesen werden.

**Tabelle 4.5.:** Erste SPR-Bindungsexperimente mit immobilisierten RNA-Konstrukten und verschiedenen Mimetika der zweiten Zinkfingerdomäne.

Peptid	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Bindung an RNA <b>22</b>	Bindung an RNA <b>23</b>
<b>25</b>	10	-	-
<b>26</b>	10	-	-
<b>28</b>	10	-	-
<b>29</b>	10	-	-
<b>31</b>	10	-	-

Da die Proteindomäne im Gegensatz zu den Oligonukleotidsubstraten bekannt ist, wurde bei weiteren Experimenten zunächst versucht, die Peptide zu immobilisieren. Dadurch können unter Einsatz weniger Sensorchips verschiedenste, unmodifizierte Oligonukleotide auf ihre Wechselwirkung mit den Peptiden hin untersucht werden.

Dazu wurden zunächst die oben beschriebenen biotinylierten Peptide (Abb. 4.19) synthetisiert und auf Streptavidin-modifizierte SA-Sensorchips immobilisiert. Erste Vortests mit jeweils 10  $\mu\text{M}$  Lösungen der Oligonukleotide **2** bis **8** ergaben nur sehr schwache Signale. Mit dem DNA-*hairpin*-Motiv **12**, das am 5'-Ende einen 18 Basen umfassenden Einzelstrangüberhang enthält, wurde hingegen eine sehr starke Wechselwirkung beobachtet. Eine Titrationsreihe mit Konzentrationen von 2 nM bis 10  $\mu\text{M}$  ist in Abb. 4.35 gezeigt. Der  $K_D$ -Wert wurde durch Auftragen der *steady-state-affinity* bestimmt und sieht mit einem Wert von 18 nM zunächst einmal sehr vielversprechend aus. Dabei ist allerdings zu beachten, dass für die Auftragung nur die Kurven bis zu einer Konzentration von 62,5 nM herangezogen wurden (rot dargestellte Sensorgramme). Bei den Sensorgrammen mit höheren Konzentrationen (blaue Sensorgramme) wurde keine Sättigung erreicht. Nach anfänglich typischem Verlauf stellte sich im Bereich der erwarteten Sättigung ein linearer Anstieg mit relativ großer Steigung ein, der eine seriöse Auswertung unmöglich macht. Desweiteren wurde ein Ansteigen der Basislinie nach jedem Zyklus beobachtet. Bei Auftragen der *steady-state-affinity* werden zwar nur die Differenzen bei den einzelnen Sensorgrammen berücksichtigt. Da die Unregelmäßigkeit der Basislinie aber in der Größenordnung dieser Differenzen liegt, können auch daraus Fehler bei der Bestimmung des  $K_D$ -Wertes resultieren. Das Ansteigen der Basislinie könnte beispielsweise durch unzureichende Regenerationsbedingungen oder einen *carry-over*-Effekt hervorgerufen werden.



#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

selwirkung mit den beiden immobilisierten Peptiden untersucht. Die erhaltenen RU-Werte sind in Tab. 4.6 aufgelistet. Da der Ausschlag von der gebundenen Masse und nicht von der Anzahl der gebundenen Moleküle abhängt, wurden die RU-Werte in den letzten beiden Spalten auf die Masse von **14** normiert.

**Tabelle 4.6.:** Absolute und relative, auf das Molekulargewicht normierte, RU-Werte verschiedener Oligonukleotide bei einfacher 1  $\mu$ M Injektion. Das N-terminal Biotin-modifizierte Peptid **36** der zweiten Zinkfinger-Domäne und dessen inverse Sequenz, ebenfalls N-terminal Biotin-modifiziert (**37**) wurden mit einer Belegung von ca. 600 RU auf einem Streptavidin-funktionalisierten Sensorchip immobilisiert. Die in den beiden rechten Spalten angegebenen Werte wurden auf die Masse von **14** (5467 Da) normiert.

Oligo	MW [Da]	RU <b>36</b>	RU <b>37</b>	rel. RU <b>36</b>	rel. RU <b>37</b>
<b>2</b>	7603	0	0	0	0
<b>3</b>	3827	0	0	0	0
<b>4</b>	7342	4,4	0	3,3	0
<b>5</b>	3678	0	0	0	0
<b>6</b>	3622	0	0	0	0
<b>7</b>	3521	0	0	0	0
<b>8</b>	3654	0	0	0	0
<b>12</b>	23402	146,2	53,8	34,2	12,6
<b>13</b>	18203	139,3	37	41,8	11,1
<b>14</b>	5467	0	0	0	0
<b>15</b>	18169	251,8	94,8	75,8	28,5
<b>16</b>	17909	109,8	25,2	33,5	7,7
<b>17</b>	16349	154,2	39,1	51,6	13,1
<b>18</b>	14494	96,5	17,7	36,4	6,7
<b>19</b>	12641	32,5	3	14,1	1,3
<b>20</b>	10779	23,3	2,5	11,8	1,3
<b>21</b>	8901	13,1	0	8,0	0
<b>44</b>	15088	67,9	15	24,6	5,4
<b>55</b>	10368	25	0	13,2	0

Ausschläge wurden für die doppelsträngigen DNA-Derivate von **12** erhalten, wobei die Intensität bei abnehmender Doppelstranglänge geringer wird. Auch scheint die Beschaffenheit des *loops* nicht entscheidend für die Bindung zu sein. Ebenfalls eine positive Antwort lieferten die dsDNA **4** und die in Kapitel 5 beschriebene dsRNA **55**, sowie das zu dessen Herstellung verwendete DNA-Templat **44**.

Mit den unterschiedlich langen dsDNAs wurden Verdünnungsreihen durchgeführt, um das Bindungsverhalten in Abhängigkeit von der Länge des doppelsträngigen Bereiches genauer zu untersuchen. Anhand der bestimmten  $K_D$ -Werte konnte zum einen die in Tab. 4.6 gezeigte Tendenz bestätigt werden, dass eine gewisse Länge des doppelsträngigen Bereiches (etwa 20 BP) für eine Wechselwirkung notwendig ist. Zum anderen ergaben sich bei

**Tabelle 4.7.:** Bestimmte  $K_D$ -Werte aus den Verdünnungsreihen mit verschiedenen dsDNA-Motiven. In Klammern gesetzte Werte sind größer als die halbe eingesetzte Maximalkonzentration. Die sehr hohen Werte weisen auf keine Wechselwirkung hin. Sie wurden jedoch zur Unterscheidung von Verdünnungsreihen ohne Ausschläge im Sensorgramm explizit aufgeführt (vgl. Tab. 4.6). Die hier beobachteten Effekte konnten in einem zweiten Experiment nicht reproduziert werden.

Oligo	Typ	Basen/BP	max. Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ 40 [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ 41 [ $\mu\text{M}$ ]
<b>12</b>	ssDNA/dsDNA	76/26	1	(1,1 $\pm$ 0,14)	(150800)
<b>13</b>	dsDNA	59/26	1	(2,3 $\pm$ 0,52)	(134000)
<b>14</b>	ssDNA	18/0	1	-	-
<b>17</b>	dsDNA	53/23	1	0,34 $\pm$ 0,04	(87000)
<b>18</b>	dsDNA	47/20	1	0,42 $\pm$ 0,20	-
<b>19</b>	dsDNA	41/17	1	(144000)	-
<b>20</b>	dsDNA	35/14	1	-	-
<b>21</b>	dsDNA	29/11	1	-	-

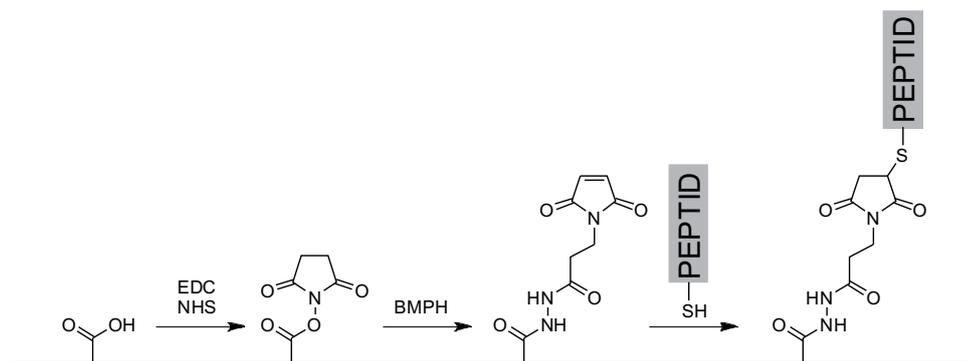
Auftragung der *steady-state-affinity* für die inverse Sequenz **37** keinerlei Anzeichen für eine bindende Wechselwirkung mit einem der Oligonukleotide. Die bestimmten  $K_D$ -Werte für beide Peptide sind in Tabelle Tab. 4.7 dargestellt. Die maximale Oligonukleotidkonzentration betrug 1  $\mu\text{M}$ , weshalb  $K_D$ -Werte  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  in Klammern geführt werden. Bei einem weiteren Experiment konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden.

Die Experimente mit Biotin-funktionalisierten Peptiden, immobilisiert auf Streptavidin-funktionalisierten Sensorchips, brachten interessante Ergebnisse. Die Unregelmäßigkeiten der Basislinie, die teilweise auf unter hundert Zyklen beschränkte Verwertbarkeit der Sensorchips, die mutmaßlichen Pufferprobleme (Ansteigen der Basislinie unter Pufferfluss, keine Bindung mehr beobachtbar nach einigen Stunden unter Pufferfluss, u.ä.) und die Tatsache, dass die Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten deuten aber darauf hin, dass es sich noch nicht um den optimalen Ansatz handelt. Daher wurde versucht, die Peptide über kovalente Verknüpfung auf einem Sensorchip zu immobilisieren.

Der einfachste und wohl am häufigsten verwendete Ansatz für eine kovalente Immobilisierung auf Sensorchips ist die Bindung von Aminogruppen (z.B. Lysinseitenketten oder N-terminale  $\text{NH}_2$ -Gruppe) des Liganden an die zuvor, z.B. mit EDC/NHS, aktivierten Carboxylfunktionalitäten auf dem Sensorchip. Da die Lysinreste der zu untersuchenden Peptide im mutmaßlich für die Interaktion verantwortlichen Bereich lokalisiert sind, wurde eine andere Strategie verwendet. Dabei wurden die zu immobilisierenden Peptide N-terminal mit einem Cysteinrest modifiziert, über den selektiv eine kovalente Immobilisierung auf dem Sensorchip ermöglicht werden sollte.

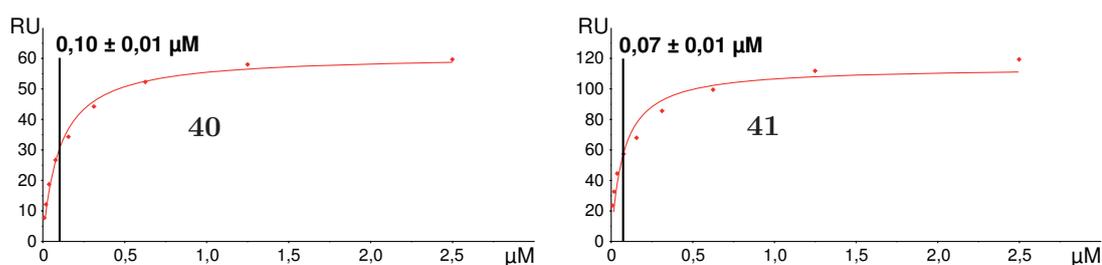
Dazu werden die Carboxylgruppen zunächst mit EDC/NHS in einen aktivierten NHS-Ester überführt. Daran wird N-( $\beta$ -Maleimidopropionsäure)-Hydrazid (BMPH) mit der Hydrazidgruppe gebunden, sodass die Oberfläche Maleimid-funktionalisiert ist. Damit kann dann die Thiolgruppe des Cysteins selektiv in einer Michael-Addition reagieren (Abb. 4.37).

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.37.:** Schema der Immobilisierung von Thiol-modifizierten Peptiden unter Zuhilfenahme von BMPH.

Die Cystein-modifizierte Nachbildung der zweiten Zinkfingerdomäne **40**, sowie dessen inverse Sequenz **41**, wurden mit Hilfe von BMPH über ihre N-terminalen Cysteinreste auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. In Tab. 4.8 sind die injizierten Oligonukleotide inklusive der maximal verwendeten Konzentration und der mit Hilfe der *steady-state-affinity* bestimmten  $K_D$ -Werte aufgeführt. Eine besonders starke Wechselwirkung wurde dabei mit der transkribierten tRNA **10** beobachtet. Hier ergaben sich  $K_D$ -Werte von  $0,1 \mu\text{M}$  für Peptid **40** und  $0,07 \mu\text{M}$  für die inverse Sequenz **41** (Abb. 4.38). Für die korrespondierende DNA ergaben sich um etwa eine Größenordnung höhere Bindungskonstanten, ebenfalls für beide Peptide. Im selben Rahmen bewegten sich die erhaltenen  $K_D$ -Werte für die kommerziell erhältliche tRNA-Mischung **9**.



**Abbildung 4.38.:** Auftragung der *steady-state-affinity* der Peptide **40** und **41** mit der transkribierten Cystein-kodierenden tRNA **10**. Sowohl die absoluten RU-Werte als auch der Verlauf der Kurven in einen gesättigten Bereich deuten auf vertrauenswürdige Ergebnisse hin.

Wechselwirkung mit DNA wurde lediglich für das lange dsDNA-Konstrukt **13** beobachtet, mit  $K_D$ -Werten von  $1,7 \mu\text{M}$  für Peptid **40** und  $1,4 \mu\text{M}$  für Peptid **41**. Mit dem verkürzten doppelsträngigen Fragment **21** wurde hingegen keine Interaktion beobachtet. Dies steht auf der einen Seite in Einklang mit den in Tab. 4.7 aufgeführten Ergebnissen,

**Tabelle 4.8.:** SPR-Experimente mit den immobilisierten Thiol-modifizierten Peptiden **40** und **41**. Die angegebenen  $K_D$ -Werte wurden mit Hilfe der Auftragung der *steady-state-affinity* bestimmt. Bei Verbindungen **3**, **4**, **14** und **21** war die gemessene RU-Differenz auch bei hohen Konzentrationen  $\leq 10$ , weshalb hier kein aussagekräftiger Wert erhalten wurde. Als Puffer wurde HBS-N verwendet, die Flussrate betrug 10 $\mu$ l/min.

Oligo	Typ	Basen/BP	max. Konz. [ $\mu$ M]	$K_D$ <b>40</b> [ $\mu$ M]	$K_D$ <b>41</b> [ $\mu$ M]
<b>3</b>	ssRNA	12/0	10	-	-
<b>4</b>	dsDNA	24/10	10	-	-
<b>9</b>	tRNA/dsRNA	nicht bekannt	10	$1,21 \pm 0,16$	$0,92 \pm 0,19$
<b>10</b>	tRNA/dsRNA	72/24	5	$0,10 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
<b>11</b>	DNA/dsDNA	72/16	10	$2,00 \pm 0,46$	$1,05 \pm 0,24$
<b>13</b>	dsDNA	59/26	10	$1,67 \pm 0,38$	$1,36 \pm 0,40$
<b>14</b>	ssDNA	18/0	10	-	-
<b>21</b>	dsDNA	29/11	10	-	-

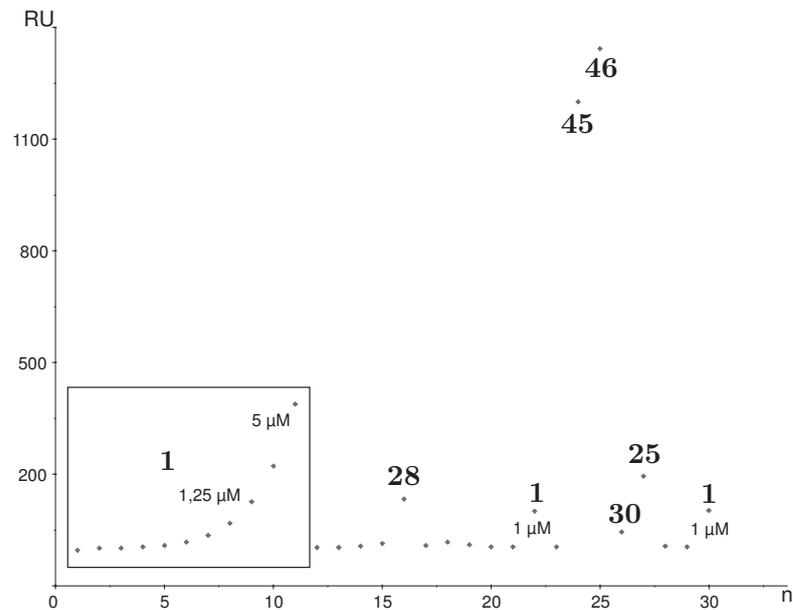
die eine doppelstränglängenabhängige Wechselwirkung der ZF2-Mimetika mit dsDNA nahelegen. Im Gegensatz dazu wurden bei den hier beschriebenen Ergebnissen aber für die inverse Peptidsequenz ähnliche Bindungskonstanten erhalten.

Keine Wechselwirkung beobachtet wurde mit dem einzelsträngigen DNA-Fragment **14**, sowie der dsDNA **4** und der ssRNA **3**.

Mit der in Abschnitt 4.2.3 immobilisierten biotinylierten dsRNA **24** wurden verschiedene Peptide als Liganden untersucht. Eine Auflistung der verwendeten Verbindungen ist in Tab. 4.9 gezeigt. Zunächst wurden Vortests mit einzelnen Injektionen mit 10  $\mu$ M Peptidkonzentration durchgeführt. Um Stabilität und Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurde alle zehn Zyklen ein 1  $\mu$ M Aliquot von Protein **1** injiziert. Dabei blieb der Ausschlag während der 30 durchgeführten Zyklen konstant (Abb. 4.39). Desweiteren wurden für die meisten der in Tab. 4.9 aufgeführten Peptide Verdünnungsreihen bis zu einer Maximalkonzentration von 50  $\mu$ M durchgeführt.

Bei den Vortests mit 10  $\mu$ M Peptidkonzentration wurde für die Peptide **25** und **28** ein signifikanter Ausschlag erhalten. In Abb. 4.40 sind die Sensorgramme und die Auftragung der *steady-state-affinity* der beiden Peptide gezeigt (A und B bzw. E und F). Letztere ergab jeweils eine Gerade, weshalb keine Bindungskonstanten bestimmt werden konnten. Gründe dafür können entweder eine unspezifische Wechselwirkung mit der immobilisierten RNA oder eine Bindungskonstante weit oberhalb der maximal eingesetzten Konzentration sein.

Keine Ausschläge bei den Vortests, aber ein bindungstypischer Verlauf der Sensorgramme wurde bei den beiden Peptiden **29** (Abb. 4.40 C und D) und **26** (Abb. 4.40 G und H) beobachtet. Während Peptid **29** bei der Auftragung der *steady-state-affinity* ein ähnliches



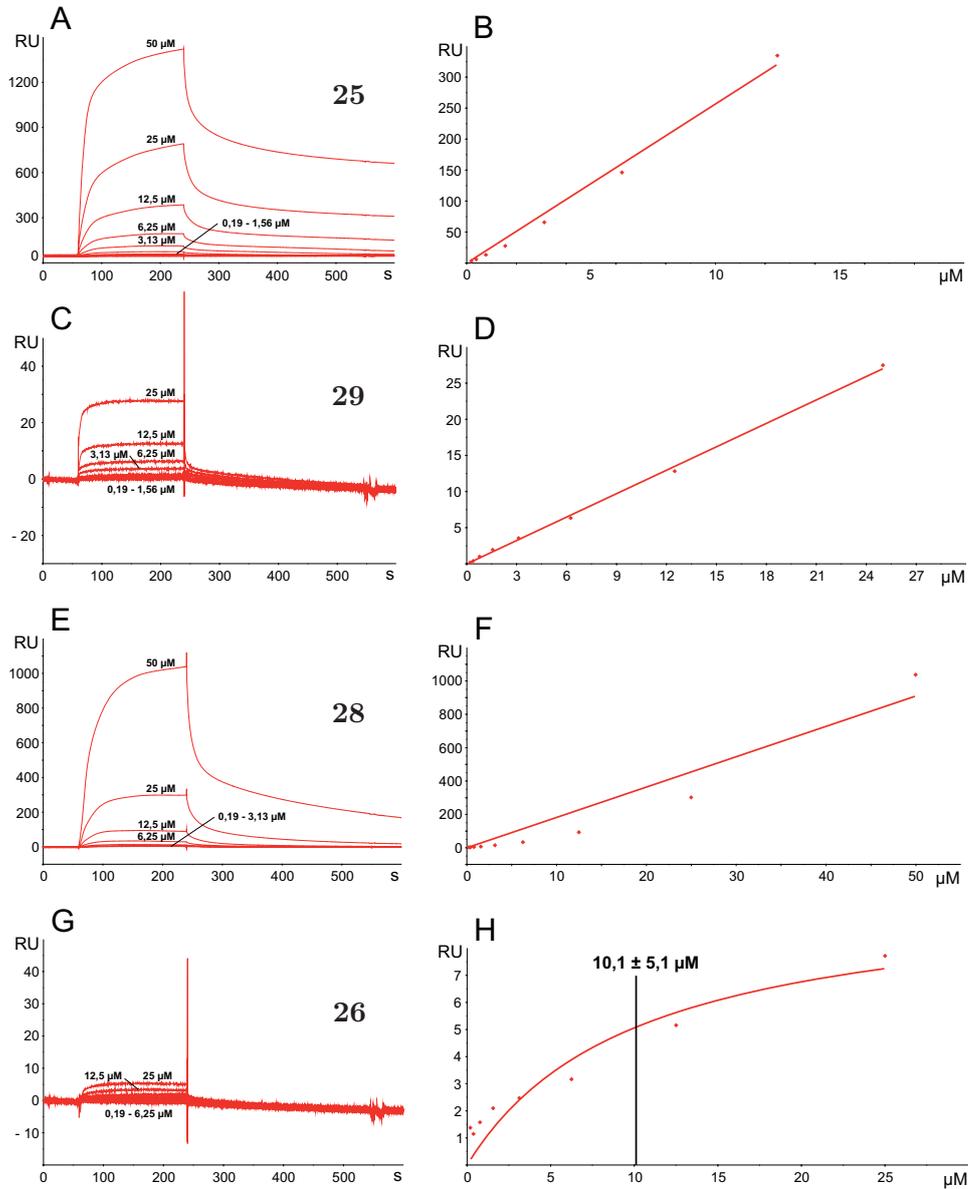
**Abbildung 4.39.:** SPR-Experimente mit immobilisierter dsRNA **2** und verschiedenen Peptiden als Liganden. Eingezeichnet ist die Verdünnungsreihe mit Protein **1**. Markiert sind nur die Signale von Peptiden, die einen signifikanten Ausschlag zeigten. Zur Kontrolle wurde alle zehn Zyklen ein  $1 \mu\text{M}$  Aliquot Protein **1** injiziert. Peptide **45** und **46** werden in Kapitel 4.3.2 diskutiert. Die dsRNA-Belegung betrug  $1300 \text{ RU}$ , als Laufpuffer diente HBS-RNA. Die Flussgeschwindigkeit betrug  $10 \mu\text{l}/\text{min}$ . Zur Regeneration wurde nach jedem Zyklus  $60 \text{ s } 1 \text{ M NaCl}$ -Lösung injiziert.

Verhalten wie die beiden Peptide **25** und **28** zeigte, wurde für Peptid **26** eine Kurve erhalten, die ein beginnendes Sättigungsverhalten andeutet. Aufgrund der sehr geringen absoluten RU-Werte und der nicht erreichten Sättigung der Kurve ist der bestimmte  $K_D$ -Wert von  $10 \mu\text{M}$  aber nicht als sehr vertrauenswürdig anzusehen.

### Electrophoretic mobility shift assay

*Electrophoretic mobility shift assays* sind eine beliebte Methode zum Nachweis von Oligonukleotid-bindenden Proteinen. Dabei wird ein Bindungspartner mit verschiedenen Konzentrationen des anderen auf einem Polyacrylamid-Gel inkubiert. Durch Anlegen von Spannung wandern die Komponenten abhängig von Ladung, Konformation und Größe unterschiedlich schnell im elektrischen Feld. Detektiert wird in der Regel mit Hilfe von radioaktiver Markierung des Oligonukleotids.

Bei den oben beschriebenen SPR-Experimenten mit verschiedenen dsDNA-Konstrukten zeigten die Biotin- bzw. Cystein-funktionalisierten Derivate von Peptid **29** (**36** bzw. **40**) eine relativ starke Interaktion, die mit abnehmender Doppelstranglänge immer schwächer wurde. Die inversen Derivate von Peptid **31** (**37** bzw. **41**) hingegen zeigten keine bzw. nur sehr schwache Bindung an die getesteten Oligonukleotide (s. Tab. 4.6 und Tab. 4.7).



**Abbildung 4.40.:** Sensorgramme und Auftragung der *steady-state-affinity* einiger Peptide mit immobilisierter dsRNA 2, die bei den Vortests bzw. näherem Betrachten der Sensorgramme der Verdünnungsreihen Anzeichen auf Wechselwirkung zeigten. A, B: Peptid 25. Trotz relativ großer absoluter Ausschläge lieferte die Auftragung der *steady-state-affinity* eine Gerade, die keine Bestimmung der Dissoziationskonstante zulässt. C, D: Peptid 29. Die absoluten RU-Werte sind zwar relativ gering, der Kurvenverlauf deutet aber auf eine bindende Wechselwirkung hin. Die Auftragung der *steady-state-affinity* lieferte ebenfalls eine Gerade. E, F: Peptid 28. Hier ergibt sich ein zu Peptid 25 analoges Bild. G, H: Peptid 26. Die Auftragung der *steady-state-affinity* ergibt eine Kurve mit beginnender Sättigung, aus der sich ein  $K_D$ -Wert von 10 µM bestimmen lässt. Die absoluten Ausschläge sind aber so gering, dass dieser Wert nicht als vertrauenswürdig angesehen werden kann. Als Laufpuffer diente bei allen Experimenten HBS-RNA. Die Flussgeschwindigkeit betrug 10 µl, zur Regeneration wurde dreimal 60 s 1 M NaCl-Lösung injiziert.

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

**Tabelle 4.9.:** Peptide, die als Liganden mit der immobilisierten dsRNA **2** untersucht wurden. Der bestimmte  $K_D$ -Wert für Peptid **26** ist aufgrund der sehr geringen Signalausschläge nicht vertrauenswürdig und daher in Klammern gesetzt. Die Diskussion zu den Mimetika der ersten Zinkfingerdomäne (Peptide **45** und **46**) ist in Abschnitt 4.3.2 zu finden. Die Peptide **51** und **52** gehören zum in Kapitel 5 beschriebenen Projekt.

Peptid	ZF-Domäne	RU 10 $\mu\text{M}$	Verd. Reihe	max. Konzentration	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>1</b>	1 & 2	387 (5 $\mu\text{M}$ )	✓	50 $\mu\text{M}$	22,2 $\pm$ 1,9 $\mu\text{M}$
<b>25</b>	2	194	✓	50 $\mu\text{M}$	(10,1 $\pm$ 5,1 $\mu\text{M}$ )
<b>26</b>	2	-	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>28</b>	2	132	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>29</b>	2	-	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>30</b>	2	44	-	-	-
<b>31</b>	2	-	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>38</b>	2	-	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>39</b>	2	-	✓	50 $\mu\text{M}$	-
<b>45</b>	1	1198	✓	50 $\mu\text{M}$	4,41 $\pm$ 0,30 $\mu\text{M}$
<b>46</b>	1	1340	✓	50 $\mu\text{M}$	3,58 $\pm$ 0,15 $\mu\text{M}$
<b>51</b>	-	-	-	-	-
<b>52</b>	-	-	-	-	-

Um diese Wechselwirkung weiter zu untersuchen, wurde ein *Electrophoretic mobility shift assay* mit der doppelsträngigen DNA **17** und den beiden Peptiden **29** und dessen inverser Sequenz **31** durchgeführt. Dazu wurde zunächst das DNA-Fragment mit Hilfe von  $\gamma$ -ATP (an der  $\gamma$ -Phosphat-Position mit  $^{32}\text{P}$  markiertes ATP) und T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert. Diese wurde dann mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Peptide auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die Verdünnungsreihe der Peptide wurde durch sukzessive 1:1-Verdünnung erstellt und umfasste Konzentrationen zwischen 0,01  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Nach beendeter Auftrennung im elektrischen Feld wurde das Gel mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgelesen. Die Banden der radioaktiv markierten DNA waren deutlich zu erkennen. Allerdings zeigten alle Banden ein identisches Laufverhalten, unabhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration. Es konnte also mit dieser Methode keine Wechselwirkung zwischen der dsDNA **17** und Peptid **29** bzw. dessen inverser Sequenz **31** nachgewiesen werden. Unter Umständen ist die Bindung zwischen Peptid und DNA zu schwach um sie mit dieser Methode mit den eingesetzten Konzentrationen zu beobachten. Auch werden mit dieser Methode in der Regel größere Proteine untersucht, die Versuchsbedingungen (wie beispielsweise der verwendete Puffer oder der Vernetzungsgrad des Gels) könnten für die eingesetzten Peptide nicht optimal gewesen sein.

### 4.3.2. Nachbildungen der ersten Zinkfingerdomäne

Da die erste Zinkfingerdomäne, wie oben beschrieben, in einigen Punkten als die schlechtere Vorlage für eine peptidische Nachbildung angesehen wurde, wurden ausgehend von dieser Substruktur weniger Peptide als von ZF2 synthetisiert. Neben einem linearen, 23 Aminosäuren umfassenden Fragment, bestehend aus den Resten Ser45 - Ala67 (**45**), sowie dessen inverser Sequenz **46**, wurden zur Immobilisierung auf SPR-Sensorchips von beiden Peptiden jeweils Varianten mit N-terminaler Biotin-Funktionalisierung (**47** und **48**), sowie zusätzlichem Cystein-Rest am N-Terminus (**49** und **50**) hergestellt (Abb. 4.41).

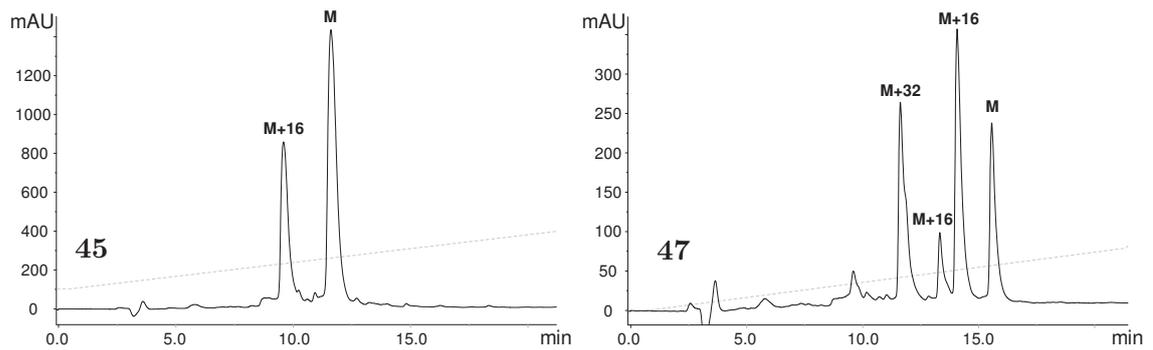
	40	50	60	70	Beschreibung
	QCKVCSAVLISESQKLAHYQSRKHANKVRRYMAINQGED				dsRBP-ZFa
<b>45</b>		SESQKLAHYQSRKHANKVRRYMA		S45 - A67	
<b>46</b>		AMYRRVKNAHKRSQYHALKQSES		A67 - S45	
<b>47</b>	Biotin-	SESQKLAHYQSRKHANKVRRYMA		S45 - A67 mit N-term. Biotin-Tag	
<b>48</b>	Biotin-	AMYRRVKNAHKRSQYHALKQSES		A67 - S45 mit N-term. Biotin-Tag	
<b>49</b>	C-	SESQKLAHYQSRKHANKVRRYMA		S45 - A67 mit N-term. Cystein	
<b>50</b>	C-	AMYRRVKNAHKRSQYHALKQSES		A67 - S45 mit N-term. Cystein	

**Abbildung 4.41.:** Synthetisierte Peptide ausgehend von der Sequenz der ersten Zinkfingerdomäne, verglichen mit der ursprünglichen Proteinsequenz. Schwarz dargestellt sind Aminosäurereste, die mit der Proteinsequenz identisch sind, rot solche, die nicht mit der Sequenz übereinstimmen.

Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide erfolgte wie im einleitenden Abschnitt 4.3 beschrieben. Im Gegensatz zu den Peptiden abgeleitet von der zweiten Zinkfingerdomäne ist bei denen der ersten ein Methionin in der Sequenz enthalten. Dieses kann zu Oxidation zum Methioninsulfoxid neigen, was zu einer Massenzunahme von +16 führt. Entsprechende Nebenprodukte wurden auch tatsächlich gefunden. Bei den biotinylierten Peptiden wurden im HPLC-Chromatogramm insgesamt vier prominente Peaks gefunden, neben der Verbindung mit der gewünschten Masse zwei mit  $m/z +16$  und einer mit  $m/z +32$  (Abb. 4.42). Hierbei handelte es sich vermutlich um eine parallele Oxidation von Methionin und Biotin (vgl. 4.3.1).

Eine Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin unter Zuhilfenahme von  $\text{NH}_4\text{I}$  und Dimethylsulfid ist in der Literatur beschrieben.<sup>[178]</sup> Aufgrund der chemisch ähnlichen Umgebung des Schwefels könnte eine analoge Reduktion auch beim Biotin funktionieren. Da für die SPR-Experimente jedoch nur sehr geringe Substanzmengen vonnöten waren und sich die Nebenprodukte einfach abtrennen ließen, wurde hier auf weitere Versuche verzichtet. Die aufgereinigten Peptide waren in lyophilisiertem Zustand bei  $-20\text{ °C}$  über Monate stabil.

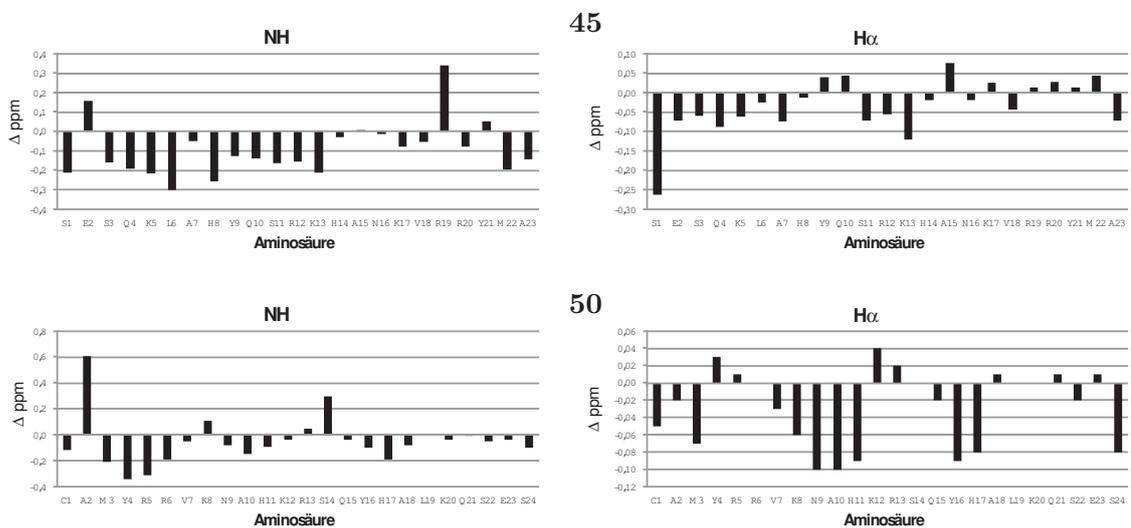
#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



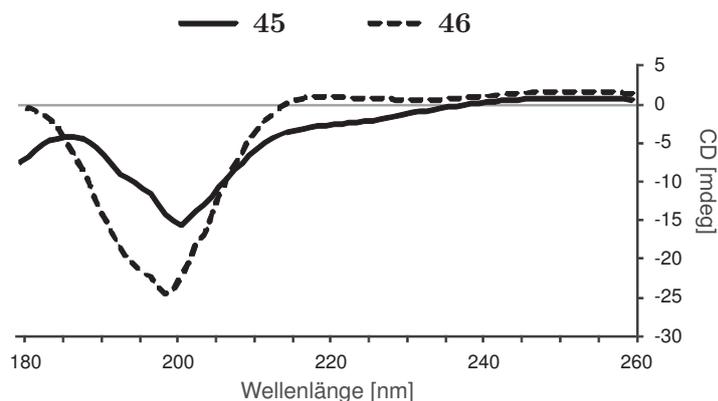
**Abbildung 4.42.:** RP-HPLC-Chromatogramme von Peptid **45** (links) und **47** (rechts). Der mit M gekennzeichnete Peak entspricht der Masse des gewünschten Produktes, bei den anderen ist die Differenz dazu angegeben. Der Gradient betrug 10 - 30 % B in 20 min.

#### Charakterisierung der Peptide

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Peptide erfolgte wie für die der zweiten Zinkfingerdomäne beschrieben. In Abb. 4.44 sind die chemischen Verschiebungen der Peptide **45** und dessen inverser, N-terminal Cystein-modifizierter Sequenz **50**, verglichen mit den für *random-coil*-Strukturen typischen Verschiebungen gezeigt. Vor allem im N-terminalen Bereich zeigte sich hier bei Peptid **45** eine Tendenz hin zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur. Auch sind bei diesem Peptid einige Kopplungskonstanten deutlich kleiner als 7 Hz, was ebenfalls typisch für  $\alpha$ -Helices ist.



**Abbildung 4.43.:** Auftragung der  $H^N$ - und  $H^\alpha$ -chemischen Verschiebungen der ZF1-Mimetika **45** und **50** gegen die tabellierten Werte für *random-coil*-Strukturen<sup>[151,152]</sup>. Negative Werte deuten auf eine  $\alpha$ -helikale Konformation hin. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde für die beiden Peptide nicht die selbe Skalierung der y-Achse verwendet.



**Abbildung 4.44.:** CD-Spektren der Verbindungen **45** und **46**. Beide Spektren liefern keine eindeutigen Hinweise für das Vorliegen  $\alpha$ -helikaler Strukturen. Die Messungen wurden in 10 mM Phosphatpuffer bei  $\text{pH} = 7,0$  durchgeführt. Die Konzentration der Peptide betrug  $10 \mu\text{M}$ .

Das CD-Spektrum von Peptid **45** (Abb. 4.44) zeigte ebenfalls eine ganz leichte Verschiebung des Minimums hin zu längeren Wellenlängen, was auf teilweise helikale Strukturen hindeuten würde. Diese ist jedoch nicht als signifikant zu bewerten. Hinsichtlich der verwendeten Küvetten und Pufferbedingungen gilt hier das bereits bei den ZF2-Mimetika beschriebene.

Peptid **45** scheint aber zumindest partiell in einer helikalen Konformation vorzuliegen.

### SPR-Experimente

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von **45** und **46** mit verschiedenen Oligonukleotidmotiven wurden die beiden biotinylierten Analoga **47** und **48** auf einem SA-Sensorchip immobilisiert. Bei der Bestimmung der Bindungsaffinitäten diente eine unbehandelte Flusszelle als Referenz.

Die untersuchten Oligonukleotidmotive sind mitsamt der bestimmten  $K_D$ -Werte für beide Peptide in Tab. 4.10 dargestellt. Die Differenz der RU-Werte lag bei den bindenden Oligonukleotiden auch bei Konzentrationen von 250 nM noch im zweistelligen Bereich, was für ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis spricht und relativ zuverlässig auf eine tatsächliche Wechselwirkung schließen lässt.

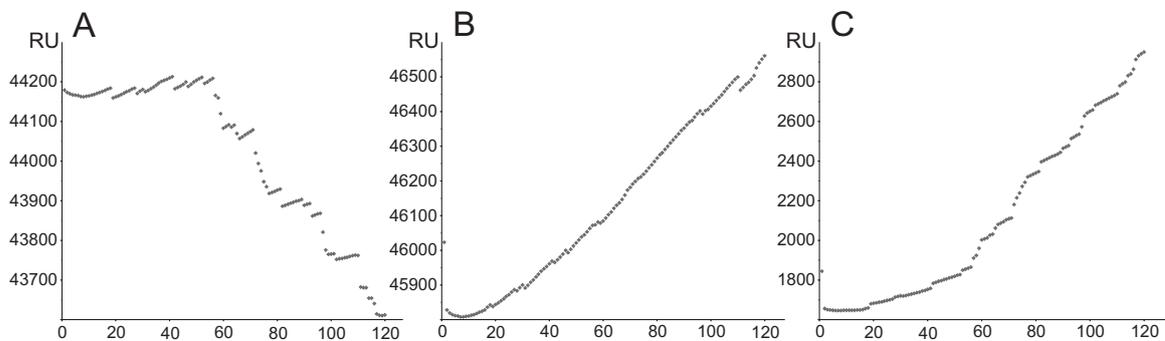
Bei Betrachtung der Basislinie über ein längeres Zeitintervall fällt auf, dass diese in nicht unerheblichem Maße ansteigt. Dies ist sowohl für die Flusszelle mit immobilisiertem Peptid **47**, als auch für die Zelle mit der inversen Sequenz **48** der Fall. Der RU-Wert der Basislinie der Referenzzelle nimmt zwar mit der Zeit etwas ab, dennoch erhält man für die Differenz von belegter Zelle abzüglich Referenzzelle über 100 Zyklen eine Veränderung von mehreren hundert RU. Das Verhalten der Basislinie von Referenzzelle, belegter Zelle und der Differenz

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa

**Tabelle 4.10.:** SPR-Experimente mit den immobilisierten Biotin-modifizierten HTH-Mimetika **47** und **48**. Die angegebenen  $K_D$ -Werte wurden mit Hilfe von *steady-state-affinity* bestimmt. Werte in Klammern indizieren einen unsicheren Wert, da in diesen Fällen die maximale Ligand-Konzentration kleiner als das doppelte des bestimmten  $K_D$ -wertes war. Als Puffer wurde PBS (mit Azid) verwendet, die Flussrate betrug 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Belegung lag bei beiden Peptiden bei etwa 1000 RU.

Oligo	Typ	Basen/BP	max. Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ <b>47</b> [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ <b>48</b> [ $\mu\text{M}$ ]
<b>2</b>	dsRNA	24/10	1	-	-
<b>4</b>	dsDNA	24/10	1	-	-
<b>12</b>	ssDNA/dsDNA	76/26	1	$0,23 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,04$
<b>13</b>	dsDNA	59/26	1	$0,18 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,02$
<b>14</b>	ssDNA	18/0	1	-	-
<b>15</b>	dsDNA	59/26	1	$0,30 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,05$
<b>16</b>	dsDNA	58/26	1	$(0,97 \pm 0,13)$	$(0,51 \pm 0,08)$
<b>17</b>	dsDNA	53/23	1	$0,16 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$
<b>18</b>	dsDNA	47/20	1	$0,31 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,06$
<b>19</b>	dsDNA	41/17	1	$(0,59 \pm 0,16)$	$0,25 \pm 0,06$
<b>20</b>	dsDNA	35/14	1	$(1,26 \pm 0,26)$	$(0,55 \pm 0,13)$
<b>21</b>	dsDNA	29/11	1	$(0,90 \pm 0,19)$	$(0,59 \pm 0,08)$

der beiden ist in Abb. 4.45 für Peptid **47** gezeigt. Für Peptid **48** wurde ein identisches Bild erhalten.



**Abbildung 4.45.:** Graphische Darstellung der Entwicklung der Basislinie in Abhängigkeit der Anzahl der Zyklen. A: Referenzzelle. B: Mit Peptid **47** belegte Flusszelle. C: Differenz von belegter Zelle und Referenzzelle (B-A).

Eine Wiederholung des in Tab. 4.10 dargestellten Experiments 5 Tage später ergab deutlich weniger intensive Kurven. Für einige Oligonukleotide konnten zwar noch  $K_D$ -Werte bestimmt werden, die Differenz der RU-Werte lag aber selbst bei mikromolaren Oligonukleotidkonzentrationen stets unter einem Wert von 10 und damit deutlich unter den zuvor beobachteten.

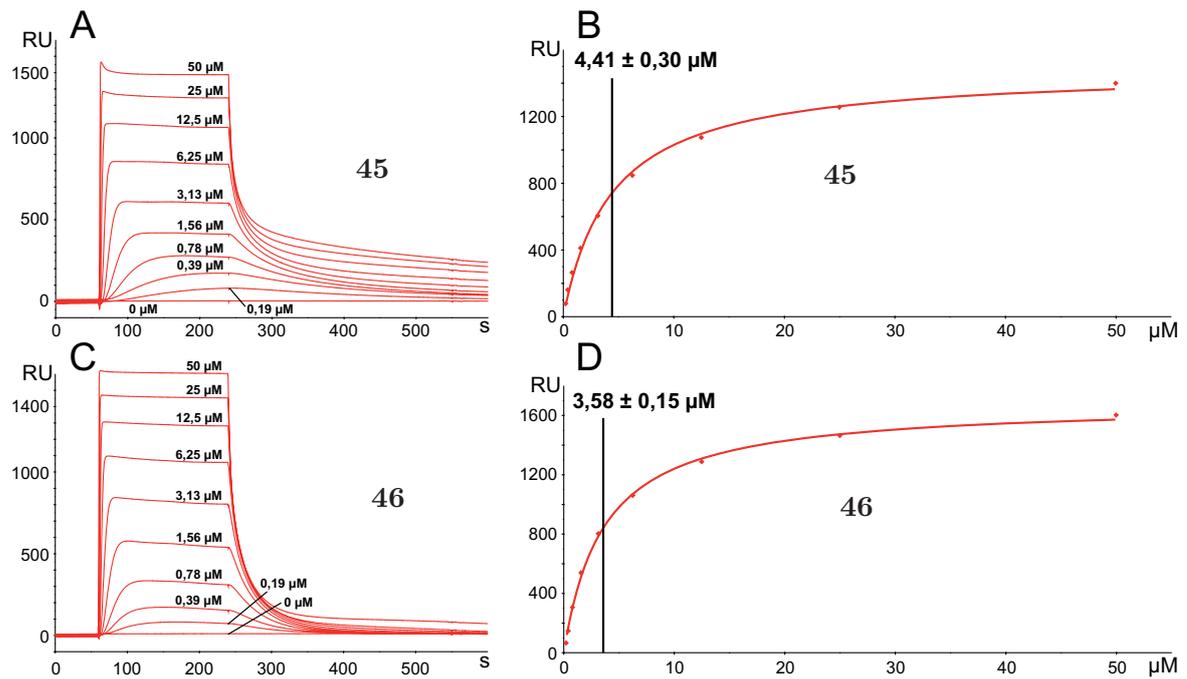
Zur Regeneration wurde nach jedem Zyklus 50 mM NaOH / 1M NaCl injiziert. Bei Vor-  
tests wurde jeweils das ursprüngliche Niveau der Basislinie erhalten, was auch die ersten 20  
Zyklen aus Abb. 4.45 bestätigen. Denkbare Ursachen für das beobachtete Verhalten wären  
ein Aggregieren der Peptide auf der Chipoberfläche oder ein negativer Effekt des PBS-  
Puffers. Bei den Peptiden wurde in Lösung keine übermäßige Tendenz zur Aggregation  
beobachtet. Auch ist die Belegung auf dem Sensorchip deutlich niedriger als beispielsweise  
bei der Synthese auf der Harzkugel. Allerdings ist eine Wechselwirkung mit der Dextran-  
schicht oder den darauf gebundenen Streptavidinresten denkbar. Ebenfalls möglich aber  
eher unwahrscheinlich wäre, dass die Peptide unter den Bedingungen auf dem Sensorchip  
nicht stabil sind.

Zur Untersuchung der Stabilität der Basislinie unter Pufferbedingungen wurden alle vier  
Flusszellen eines auf drei Flusszellen belegten Sensorchips über Nacht unter konstantem  
PBS-Puffer-Fluss beobachtet. Auch hier zeigte sich ein Abfall bei der Referenzzelle und ein  
deutlicher Anstieg bei den belegten Flusszellen. Bei der Referenzzelle gelang eine Regene-  
ration auf den ursprünglichen Wert, bei den belegten Flusszellen konnte der ursprüngliche  
Wert hingegen auch unter verschiedensten Regenerationsbedingungen nicht mehr erreicht  
werden (nicht gezeigt).

Die erhaltenen  $K_D$ -Werte können auf jeden Fall als glaubwürdig angesehen werden. Den-  
noch scheint das System als Ganzes, vor allem hinsichtlich der möglichen Anzahl durch-  
führbarer Zyklen, nicht den Idealbedingungen zu entsprechen.

Mit der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen immobilisierten dsRNA **2** wurden bei einfachen  
Injektionen sehr starke Ausschläge für die beiden Peptide **45** und **46** beobachtet (Abb.  
4.39). Daher wurden für diese beiden Peptide weitere Experimente durchgeführt. In Abb.  
4.46 sind die Sensorgramme der Verdünnungsreihen sowie die korrespondierende Auftra-  
gung der *steady-state-affinity* dargestellt. Für beide Peptide wurden  $K_D$ -Werte im Bereich  
von 4  $\mu\text{M}$  erhalten. Bei den Experimenten mit immobilisierten Peptiden wurden mit diesem  
RNA-Konstrukt keine Bindungskurven erhalten. Zwar wurden dort die Oligonukleotide nur  
bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt (vgl. Tab. 4.10), bei einer Dissoziationskon-  
stante ähnlicher Größenordnung hätten aber auch dort signifikante Ausschläge sichtbar sein  
müssen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten könnten Multivalenzef-  
fekte sein. In diesem Fall müsste das Peptid das Potenzial haben, mehrere Moleküle dsRNA  
gleichzeitig binden zu können. Dies stünde allerdings im Widerspruch zu den mit dem Pro-  
teinkonstrukt erhaltenen ITC-Ergebnissen in Abschnitt 4.2.3, S. 70, die auf eine Bindung  
von zwei Molekülen Protein pro Molekül dsRNA hindeuteten. Der bei analog zu den hier  
beschriebenen SPR-Experimenten mit immobilisierter dsRNA **2** erhaltene  $K_D$ -Wert für das  
Proteinkonstrukt liegt mit einem Wert von 22  $\mu\text{M}$  in einer ähnlichen Größenordnung.

#### 4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa



**Abbildung 4.46.:** Erhaltene Sensorgramme und Auftragung der *steady-state-affinity* der Peptide **45** und **46** mit immobilisierter dsRNA **2**. Als Laufpuffer diente HBS-RNA, die Flussrate betrug  $5 \mu\text{l}/\text{min}$ . Regeneriert wurde nach jedem Zyklus mit drei 60 s-Injektionen 1 M NaCl-Lösung.

Dies deutet darauf hin, dass für die Wechselwirkung der HTH-Mimetika mit Oligonukleotiden nicht eine spezifische 3D-Struktur Voraussetzung ist, da die 3D-Strukturen der Peptide **45** und dessen inverser Sequenz **46** als sehr verschieden anzunehmen sind. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass **45** und **46** andere Gemeinsamkeiten aufweisen, die schließlich zu ähnlichen dsRNA-Affinitäten führen. So ist zu erwarten, dass allein die Anzahl basischer Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Nukleinsäurebindung hat. Darüber hinaus werden beide Peptide ihre Arginin- und Lysin-Seitenketten in ähnlichen Abständen zueinander präsentieren. Die genaue Orientierung dieser Seitenketten ist für die dsRNA-Affinität offenbar von untergeordneter Bedeutung. In Anbetracht der ausgeprägten Flexibilität der Peptidstrukturen, auf die u.a. die sekundären chemischen Verschiebungen hinweisen, können die positiv geladenen Gruppen in beiden Peptiden eine Vielzahl an relativen Positionen einnehmen.

In weiteren Experimenten könnten diese Faktoren im Detail untersucht werden. Dabei sollte zum einen die Anzahl und die Sequenzposition der basischen Reste variiert werden und zum anderen die 3D-Struktur des präsentierenden Peptids oder Peptidmimetikums rigidisiert werden.

## 5. Interaktion mit doppelsträngiger RNA - basierend auf der $\alpha$ 1-Helix von Rnt1p

Im Rahmen der Zulassungsarbeit von Andrea Gerster<sup>[179]</sup> wurde ein 15 Aminosäuren umfassendes Peptid mit der Sequenz der  $\alpha$ 1-Helix von Rnt1p (SLDMNAKRQLYSLIG) synthetisiert (**51**). Ebenso erfolgte eine NMR-spektroskopische Resonanzzuordnung bei pH 2,5 sowie eine erste strukturelle Charakterisierung mit Hilfe von Kopplungskonstanten. Eine NMR-Titration mit einer dsRNA-*hairpin*-Struktur deutete auf eine schwache Wechselwirkung zwischen Peptid und RNA hin. Die an der Interaktion beteiligten Regionen des Peptids konnten jedoch nicht identifiziert werden. Hierbei ist zu bemerken, dass das RNA-Konstrukt nicht dem natürlichen Substrat entsprach. Zum einen war die Länge des Doppelstranges signifikant kürzer, zum anderen war der an der Protein-RNA-Wechselwirkung unmittelbar beteiligte AGNN-Tetraloop nicht vorhanden, bzw. hatte eine andere Sequenz.

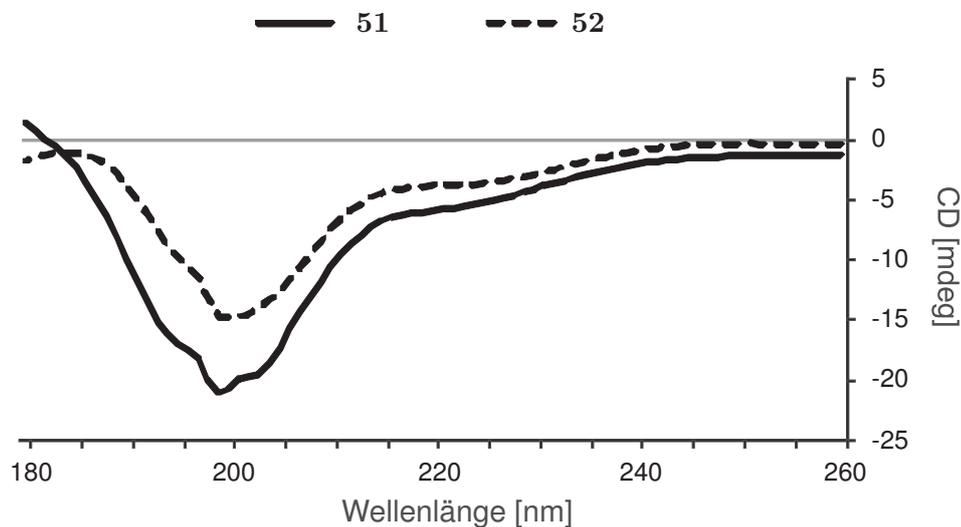
### 5.1. Strukturelle Charakterisierung

Das in Abb. 5.1 gezeigte CD-Spektrum sieht zunächst nach dem Vorliegen einer *random-coil*-Struktur aus. Allerdings kann man neben dem Minimum bei  $\sim 198$  nm auch eine Schulter bei  $\sim 205$  nm erkennen, was auf ein partielles Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Struktur hindeutet.

Die  $H^N$ - $H^\alpha$ Kopplungskonstanten (Tab. 5.1) lieferten in diesem Fall keinen unmittelbaren Hinweis auf das Vorliegen helikaler Strukturen. Wie in 3.3.4 bereits beschrieben, muss das aber einer zumindest teilweise vorliegenden helikalen Struktur nicht widersprechen.

Um anhand der chemischen Verschiebungen Hinweise auf Sekundärstrukturmerkmale zu erhalten, wurden diese mit den korrigierten Werten für *random coil*-chemische Verschiebungen verglichen (siehe 3.3.4). Da bei kurzen Peptiden mehrere Konformationen im Gleichgewicht vorliegen können, wurde nicht der eigentliche *Chemical Shift Index* erstellt, sondern die Abweichungen für die einzelnen Aminosäuren aufgetragen. Dadurch könnten evtl. Tendenzen hin zu geordneten Sekundärstrukturen zu erkennen sein.

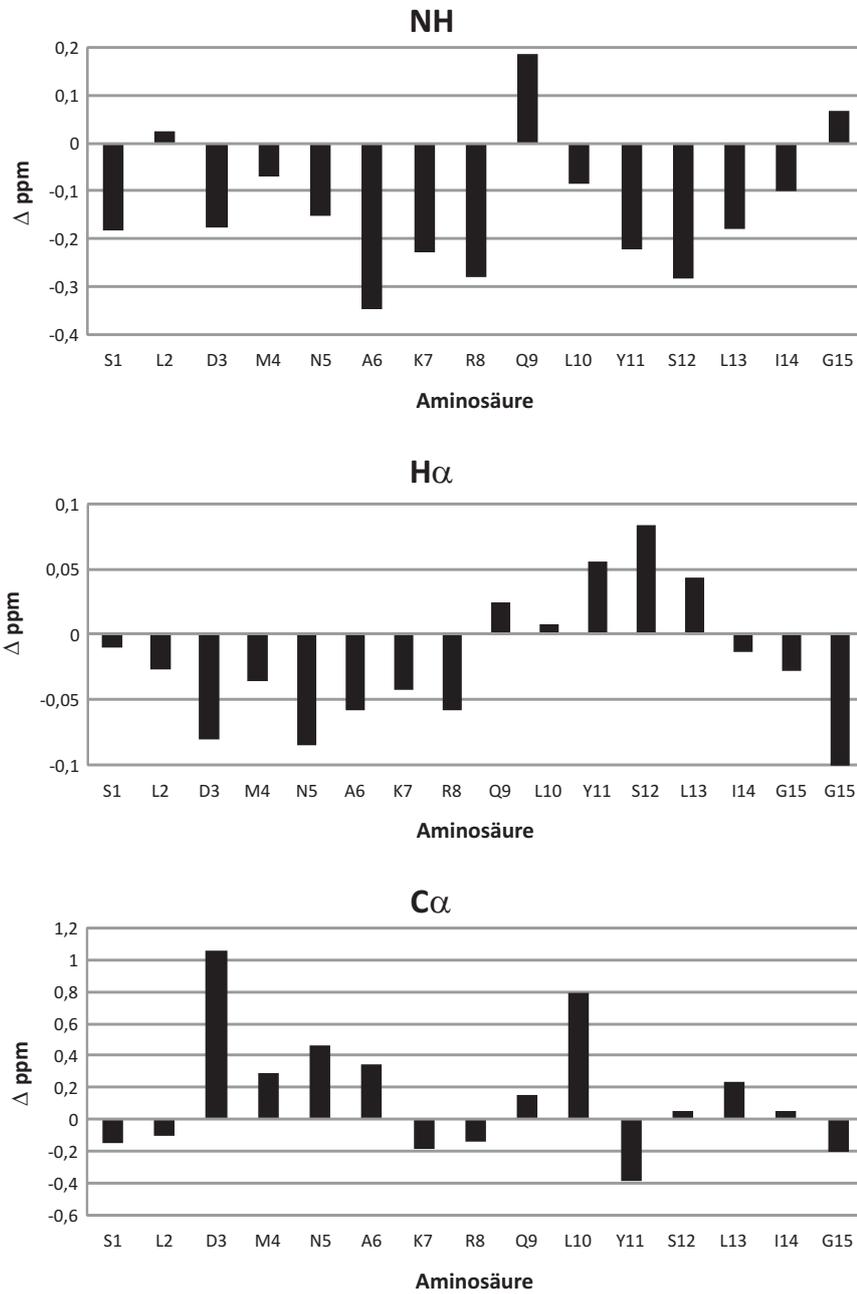
In Abb. 5.2 und Abb. 5.3 sind die Differenzen der chemischen Verschiebungen von Peptid **51** und dessen inverser Sequenz **52**, jeweils verglichen mit den korrigierten *random coil*-



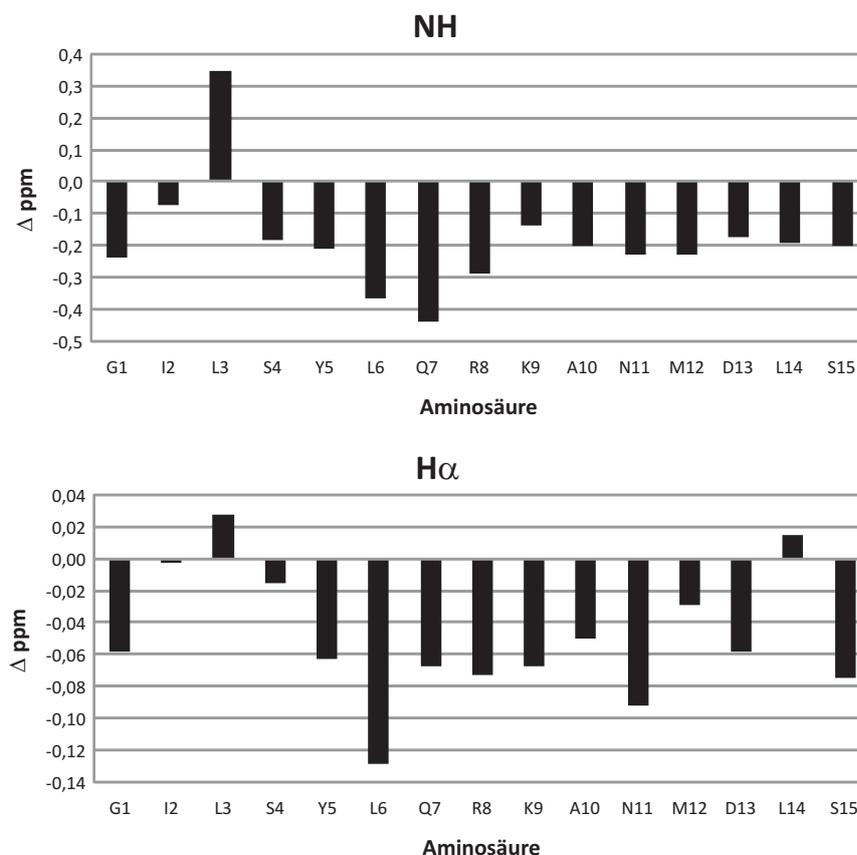
**Abbildung 5.1.:** CD-Spektren der beiden Peptide **51** und **52**. Die angedeutete Bande bei  $\sim 205$  nm könnte auf ein partielles Vorliegen einer  $\alpha$ -helikalen Struktur hindeuten.

**Tabelle 5.1.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten in Hz von Peptid **51**. Die bestimmten Werte deuten nicht unmittelbar auf das Vorliegen einer helikalen Struktur hin.

AS	$\delta(H^N)$ [ppm]	$J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	AS	$\delta(H^N)$ [ppm]	$J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]
Ser1	8,278	6,6	Gln9	8,325	6,6
Leu2	8,354	6,6	Leu10	8,184	6,6
Asp3	8,433	7,2	Tyr11	8,079	7,2
Met4	8,351	6,6	Ser12	8,088	7,2
Asn5	8,328	7,2	Leu13	8,202	7,2
Ala6	8,053	5,6	Ile14	8,041	6,9
Lys7	8,161	6,9	Gly15	8,418	7,2
Arg8	8,141	6,6			



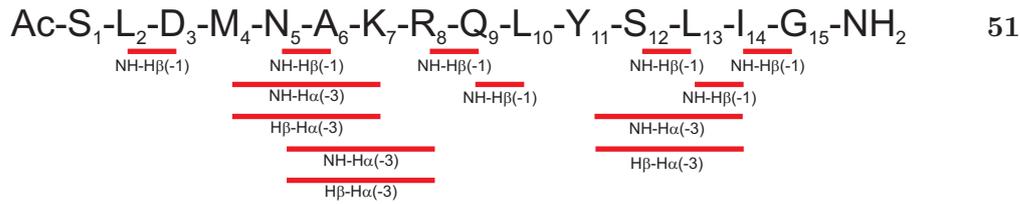
**Abbildung 5.2.:** Auftragung der Differenzen der NH, H $\alpha$  und C $\alpha$  chemischen Verschiebungen von Peptid 51 im Vergleich zu den korrigierten *random coil*-Werten. Besonders der N-terminale Bereich zeigt Tendenzen hin zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur.



**Abbildung 5.3.:** Auftragung der Differenzen der NH und H $\alpha$  chemischen Verschiebungen von Peptid **52** im Vergleich zu den korrigierten *random coil*-Werten. Nahezu das gesamte Peptid zeigt anhand dieser Auftragung eine Tendenz hin zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur.

Werten aufgetragen. Bei den Protonenverschiebungen deuten negative Werte auf  $\alpha$ -helikale Strukturen, positive Werte auf  $\beta$ -sheets hin. Bei beiden Peptiden liegen die Verschiebungen tendenziell in Richtung helikaler Strukturen. Auffällig ist, dass die strukturellen Tendenzen von Peptid **51** sehr gut mit den NOE-Daten übereinstimmen. Bei der inversen Sequenz **52** wurden nahezu keine NOE-Kreuzsignale zu nicht benachbarten Resten erhalten.

Ein intensiveres Studium der NOESY-Spektren zeigte das Auftreten diverser helixtypischer NOE-Signale. In Abb. 5.4 sind die für  $\alpha$ -Helices typischen NOEs schematisch dargestellt. Es fällt auf, dass sich in bestimmten Bereichen NOEs häufen, die typischerweise bei helikalen Konformationen zu finden sind. Dies ist ein weiterer Hinweis für das Vorliegen einer teilweise helikalen Struktur.



**Abbildung 5.4.:** Sequenz von **51** mit schematischer Darstellung der für helikale Konformationen typischen NOE-Kreuzsignale.

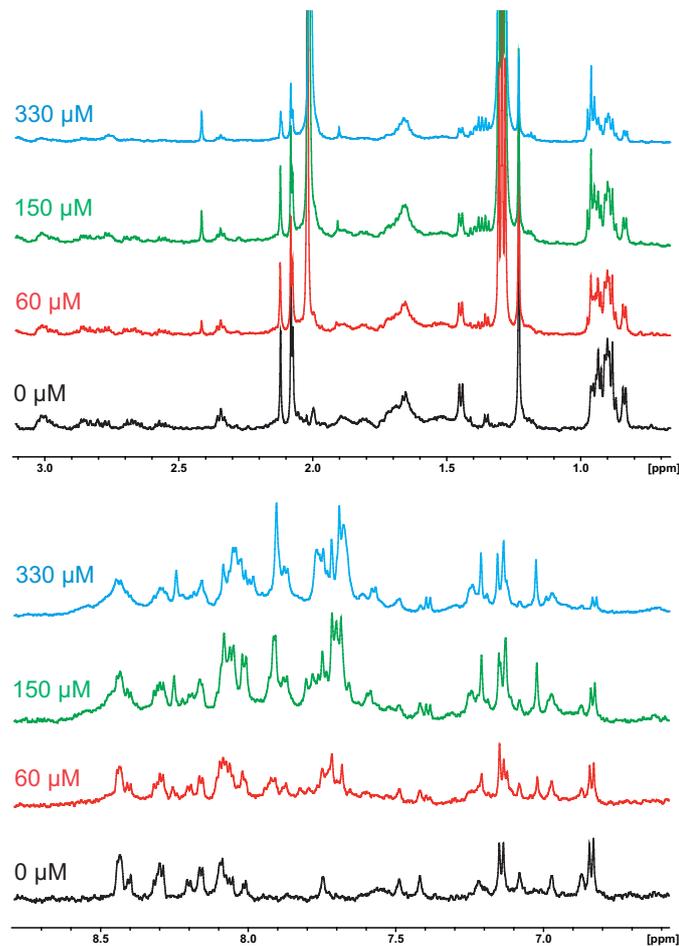
## 5.2. Interaktionsstudien

Mit Hilfe verschiedener Bindungstests wurde untersucht, ob das Peptidfragment der  $\alpha 1$ -Helix von Rnt1p Wechselwirkungen mit Oligonukleotiden eingeht. Dabei kamen diverse Oligonukleotidmotive, sowohl RNA als auch DNA, zum Einsatz.

### 5.2.1. NMR-Titration

In Abb. 5.5 sind zwei Bereiche der von Andrea Gerster durchgeführten NMR-Titration von Peptid **51** mit der 24 Basenpaar-*stem-loop*-RNA **2** gezeigt. Zu dem vorgelegten Peptid wurde RNA bis zur zweifachen Konzentration hinzutitriert. Insgesamt ist aus der Titrationsreihe keine signifikante Veränderung des Peptidspektrums ersichtlich. Ab etwa äquimolarer RNA-Konzentration lässt sich eine leichte Linienverbreiterung einzelner Signale beobachten. Eine Verschiebung von Signallagen findet so gut wie nicht statt. Neu auftauchende Signale können der RNA zugeordnet werden, da sie allesamt mit steigender RNA-Konzentration intensiver werden. Wobei es sich dabei theoretisch auch um Signale handeln könnte, die auf einen langsamen Austausch zurückzuführen sind.

Zwei Faktoren könnten für die schwache bis nicht beobachtbare Wechselwirkung verantwortlich sein: zum einen handelt es sich bei der verwendeten RNA zwar um einen *hairpin* mit vergleichbarer Länge und *loop*-Größe wie beim natürlichen Substrat des Proteins. Die  $\alpha 1$ -Helix geht aber im Proteinkontext eine Wechselwirkung mit dem AGAA-Tetraloop der RNA ein. Bei der verwendeten RNA hat dieser die Sequenz UUCG. Außerdem hat das Protein als Ganzes keine allzu hohe Bindungskonstante, der  $K_D$ -Wert liegt im mikromolaren Bereich. Da hier nur ein Teil der interagierenden Domäne zugegen ist, kann von einer deutlich schwächeren Bindung ausgegangen werden. Bindungsstudien mit einem der Komplexstruktur vergleichbaren RNA-Konstrukt wurden mit Hilfe von SPR-Experimenten durchgeführt (s.u.).



**Abbildung 5.5.:** Zwei verschiedene Ausschnitte der Titration von **51** mit dem 24 BP RNA *stem-loop 2*. Eine signifikante Änderung der Signallagen ist nicht zu beobachten. Die Spektren wurden bei 300 K in Acetat-Puffer (pH = 4,5) an einem 600 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Peptidkonzentration betrug 150  $\mu$ M.

### 5.2.2. HHR-Assay

Mit dem 15 AS-Peptid wurde ein Inhibitionsassay mit einem *Hammerhead*-Ribozym, wie in 4.3.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurden allerdings keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten. Die Änderung der absoluten Fluoreszenzwerte war im Vergleich zu früheren Experimenten deutlich kleiner, weshalb die relativen Werte wenig aussagekräftig sind.

### 5.2.3. SPR-Experimente

Zur Immobilisierung auf einem Streptavidin-funktionalisierten Biacore Chip wurde das oben beschriebene 15 Aminosäuren umfassende Peptid erneut nach Standard Fmoc-SPPS-Protokollen synthetisiert. Zusätzlich wurde N-terminal ein in der Seitenkette mit Biotin

modifizierter Glutamatrest eingefügt. Als Negativkontrolle wurde ein Peptid mit inverser Sequenz synthetisiert, welches ebenfalls N-terminal mit dem Biotintag modifiziert wurde.



**53**

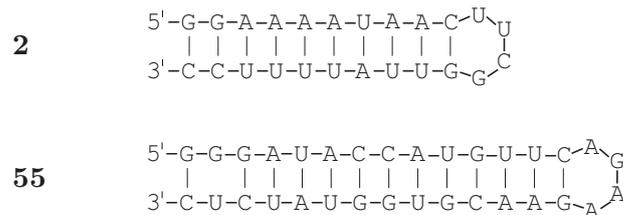


**54**

**Abbildung 5.6.:** Die zur SPR-Immobilisierung synthetisierten Peptide **53** und **54**. Zur Einführung des Biotinrestes wurde N-terminal ein entsprechend seitenkettenfunktionalisiertes Glutaminsäurederivat angeknüpft.

Wie bereits in 1.1.4 beschrieben, bindet die  $\alpha$ 1-Helix an einen RNA-Doppelstrang mit AGAA-Loop. Um eine eventuelle dsRNA-Affinität des synthetisierten Peptides zu untersuchen, wurde ein 32 Basen umfassender RNA-Doppelstrang mit AGAA-Loop hergestellt (**55**, Abb. 5.7).

Dazu wurde zunächst das für die RNA-Transkription benötigte doppelsträngige DNA-Templat mit Hilfe der PCR generiert und amplifiziert. Als Templat wurde die der RNA entsprechende DNA-Sequenz sowie deren *reverse complement*, jeweils mit einem T7-Promoter am 5'-Ende eingesetzt. Um die optimale *annealing* Temperatur zu bestimmen, wurde eine Reihe von PCRs bei verschiedenen Temperaturen zwischen 52 °C und 72 °C durchgeführt. Nach 25 Zyklen zeigte das Agarose-Gel starke Signale im Bereich des PCR-Produktes bei 54 °C und 58 °C. Als *annealing* Temperatur wurde daher bei der folgenden präparativen PCR 56 °C verwendet. Dabei wurden insgesamt 0,365 nmol RNA erhalten.



**Abbildung 5.7.:** Sequenzen der doppelsträngigen RNAs, die bei der NMR-Titration eingesetzt wurde (oben) bzw. für die SPR-Experimente transkribiert wurde (unten).

Für die SPR-Experimente wurden die beiden Peptide **53** und **54** auf jeweils einer Flusszelle eines Streptavidin-funktionalisierten Sensorchips immobilisiert (s. S. 68). Die Belegung betrug 550 RU für Peptid **53** und 850 RU für Peptid **54**. Als Puffer wurde  $\text{NaN}_3$  enthaltender PBS-Puffer verwendet, die Flussrate betrug 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

## 5. Interaktion mit doppelsträngiger RNA - basierend auf der $\alpha$ 1-Helix von Rnt1p

**Tabelle 5.2.:** Auflistung der verschiedenen Oligonukleotide, mit denen Biacore-Experimente mit den immobilisierten Peptiden **53** und **54** durchgeführt wurden. Zur besseren Übersicht sind Länge, Anzahl der Basen und -paare, Nukleotidsequenz des *loops* und maximal verwendete Konzentration angegeben. Mit keinem der 19 eingesetzten Oligonukleotide konnte eine Wechselwirkung mit einem der beiden Peptide nachgewiesen werden.

Oligo	Typ	Anzahl Basen	Anzahl Basenpaare	<i>loop</i>	Konzentration	Bindung
<b>2</b>	dsRNA	24	10	UUCG	1 $\mu$ M	-
<b>3</b>	ssRNA	12	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>4</b>	dsDNA	24	10	TTCG	1 $\mu$ M	-
<b>5</b>	ssDNA	12	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>6</b>	ssDNA	12	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>7</b>	ssDNA	12	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>8</b>	ssDNA	12	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>12</b>	dsDNA	76	26	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>13</b>	dsDNA	59	26	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>14</b>	ssDNA	18	-	-	1 $\mu$ M	-
<b>15</b>	dsDNA	59	26	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>16</b>	dsDNA	58	26	TTCG	1 $\mu$ M	-
<b>17</b>	dsDNA	53	23	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>18</b>	dsDNA	47	20	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>19</b>	dsDNA	41	17	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>20</b>	dsDNA	35	14	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>21</b>	dsDNA	29	11	TTTTT	1 $\mu$ M	-
<b>55</b>	dsRNA	32	14	AGAA	1 $\mu$ M	-
<b>44</b>	dsDNA	49	12	AGAA	1 $\mu$ M	-

Mit keiner der 19 getesteten Oligonukleotide aus Tab. 5.2 wurde eine Interaktion beobachtet, weder mit der Nachbildung der  $\alpha$ 1-Helix **53**, noch mit dessen inverser Sequenz **54**. Da, wie schon beschrieben, die Dissoziationskonstante des kompletten Proteins mit der doppelsträngigen RNA **55** nur im mikromolaren Bereich liegt, ist anzunehmen, dass das Peptid weniger stark bindet. Eine höhere RNA-Konzentration konnte aufgrund der schlechten Ausbeuten bei der Transkription nicht eingesetzt werden.

In Versuchsreihen zur Untersuchung der ZFa-Peptide wurde biotinylierte dsRNA **2** auf einem SA-Chip immobilisiert. Auch hier zeigten sowohl Peptid **51** als auch Peptid **52**

keinerlei Bindung. Allerdings sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei der dsRNA **2** nicht um das passende Rnt1p-Substrat handelt.

### 5.3. N-terminale PEG-Funktionalisierung

Die Anwendung von Peptiden und Proteinen als Pharmazeutika hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Typische Probleme bei der Verwendung dieser Biopharmazeutika sind jedoch kurze Halbwertszeit, Immunogenität, proteolytischer Abbau und schlechte Löslichkeit. Neben einer Variation der Aminosäuresequenz, Konjugation an beispielsweise Serumproteine oder Einbau in sog. *drug delivery vehicles* ist eine Funktionalisierung mit Polyethylenglykol (PEG) eine Möglichkeit, die beschriebenen Probleme zu umgehen.<sup>[66]</sup> Die Vorteile einer PEGylierung von Peptiden können unter anderem folgende sein:

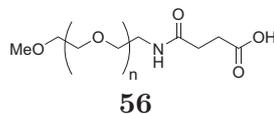
- Verbesserung der Wasserlöslichkeit
- Abschirmung von antigenen und immunogenen Epitopen
- Schutz vor Erkennung und Abbau durch proteolytische Enzyme
- Änderung der Biodistribution durch drastische Erhöhung der Molekülgröße

Mittlerweile ist eine Vielzahl von PEGylierungsreagenzien kommerziell erhältlich. Dabei stehen neben verschieden großer Anzahl von Wiederholeinheiten auch Derivate mit unterschiedlichsten Endgruppen zur Verfügung. Zum einen eröffnet dies eine Vielzahl von Kupplungsmöglichkeiten, zum anderen können beispielsweise über Fluoreszenzlabel detektierbare Reste eingefügt werden. Verschiedene Schutzgruppen ermöglichen außerdem eine Mehrfachfunktionalisierung des Polyethylenglykolderivates.

Um die Praktikabilität einer PEG-Funktionalisierung zu untersuchen, wurde Peptid **51** an fester Phase mit einem kommerziellen PEG-Linker versehen (Abb. 5.8). Untersucht wurde neben der Wasserlöslichkeit auch die Kompatibilität des Linkers bei der Festphasensynthese und das Verhalten des Konjugats bei RP-HPLC-Reinigung und NMR-spektroskopischer Charakterisierung. Da anstatt der Länge der PEG-Kette vom Hersteller nur eine ungefähre molare Masse angegeben war, wurde die Anzahl der Wiederholeinheiten mittels MALDI-TOF-MS untersucht.

Die Kupplung des Linkers an das Peptid erfolgte analog zu den Bedingungen, wie sie in Abschnitt 5.2.3 für die Biotinfunktionalisierung beschrieben wurden. Statt der funktionalisierten Aminosäure wurden hier jedoch zwei Äquivalente des PEG-Linkers **56**, bezogen auf die Anfangsmenge Harz, mit HBTU und DIPEA in NMP zugegeben und zweimal über

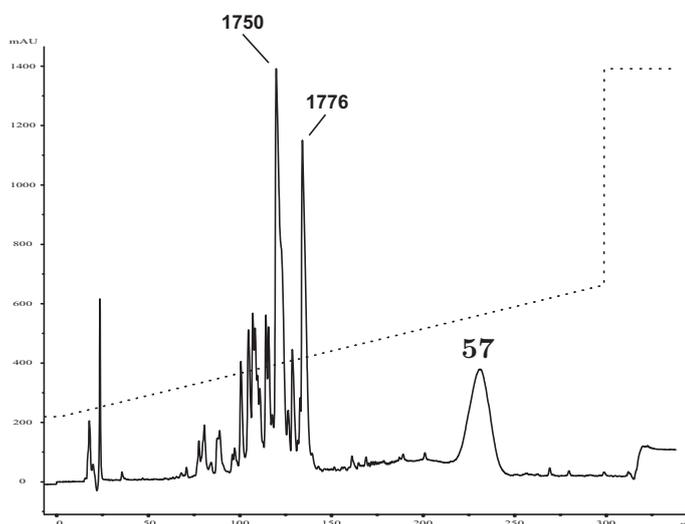
Nacht gekuppelt. Nach Abspalten von der festen Phase wurde das Konjugat RP-HPLC-chromatographisch gereinigt.



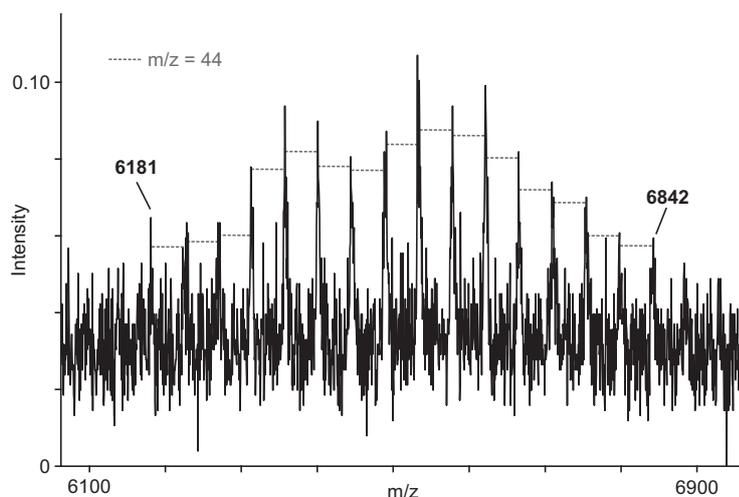
**Abbildung 5.8.:** Für die PEGylierung von **51** verwendeter Linker **56**. Für n ist vom Hersteller keine eindeutige Zahl angegeben. Das Molekulargewicht ist mit etwa 5000 Da ausgewiesen.

Das in Abb. 5.9 dargestellte Chromatogramm zeigt eine sehr gute Separierung des PEGylierten Peptids **57** von den restlichen peptidischen Verbindungen. Die Breite des Peaks kommt durch die Polydispersität des PEG-Linkers zustande. Die Verteilung dieser wurde mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf 98 - 113 bestimmt (Abb. 5.10). Bei der Aufnahme von ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurde wie erwartet ein intensiver Peak bei 3,7 ppm beobachtet, der dem Polyethylenglykol zuzuordnen ist. Es wurden weder Signale des Peptids überdeckt, noch waren negative Auswirkungen auf die Qualität der Spektren auszumachen.

Die Funktionalisierung von Peptiden mit dem PEG-Linker **56** kann also als einfache und praktikable Methode zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit, besseren Separation bei säulenchromatographischen Reinigungen und Variation der pharmakologischen Eigenschaften angesehen werden.



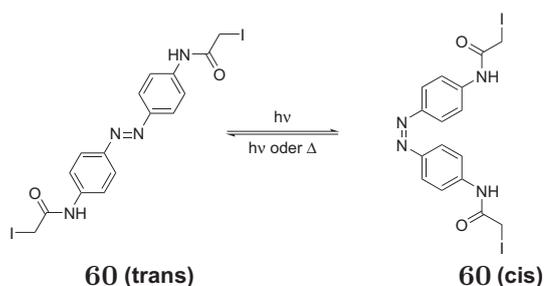
**Abbildung 5.9.:** Chromatogramm der präparativen Reinigung des PEG-funktionalisierten Peptids **57**. Die beiden anderen markierten Peaks entsprechen dem nichtfunktionalisierten Peptid ( $m/z = 1750$ ) und einem nicht identifizierten Nebenprodukt ( $m/z = 1776$ ).



**Abbildung 5.10.:** Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Massenspektrum von **57**. Die rot gestrichelten Linien entsprechen jeweils der Masse einer PEG-Einheit.

## 5.4. Photoschalter

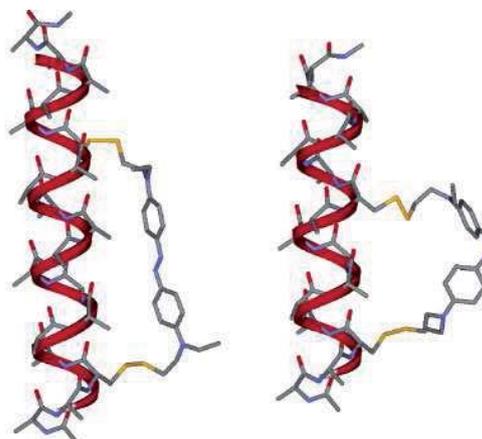
Durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlängen können Azobenzol-Chromophore eine reversible cis-trans-Isomerisierung eingehen.<sup>[180]</sup> Integriert man eine solche schaltbare Modifikation in ein Biomolekül, lässt sich dessen Struktur reversibel verändern. Da die Struktur von Biomolekülen meistens direkt mit deren Aktivität zusammenhängt, lässt sich diese im Idealfall durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge an- und ausschalten.



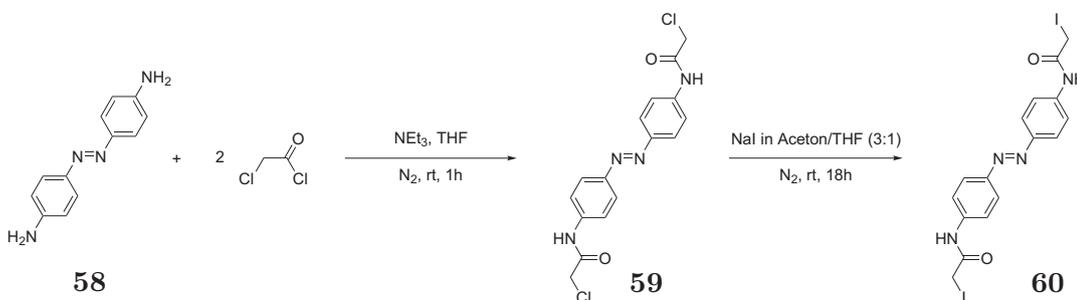
**Abbildung 5.11.:** cis-trans-Isomerisierung des verwendeten Azobenzol-Linkers 4,4'-Bis(Iodacetamid)-azobenzol **60**. Durch Bestrahlung bei  $\sim 360$  nm liegt das Molekül hauptsächlich in cis-Konformation vor. Durch Bestrahlung bei  $\sim 450$  nm relaxiert das Molekül schnell in die thermodynamisch stabilere trans-Konformation. Im Dunkeln liegt die Halbwertszeit des angeregten Zustandes zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden, abhängig von der Temperatur<sup>[181]</sup>.

Bei synthetischen Peptiden lassen sich unnatürliche Modifikationen relativ einfach einführen, meist über Seitenkettenfunktionalitäten in Kombination mit geeigneten Schutzgruppenstrategien. Ein in der Literatur häufig beschriebenes Beispiel ist die *side chain-to-side*

*chain* Zyklisierung mit einem  $\alpha$ -Iodacetamid-funktionalisierten Azobenzollinker über zwei Cysteinreste. Abhängig von der Länge des Linkers und dem Abstand der beiden Cysteine lässt sich dadurch beispielsweise eine helikale Konformation photosensitiv stabilisieren oder stören<sup>[181–187]</sup>.



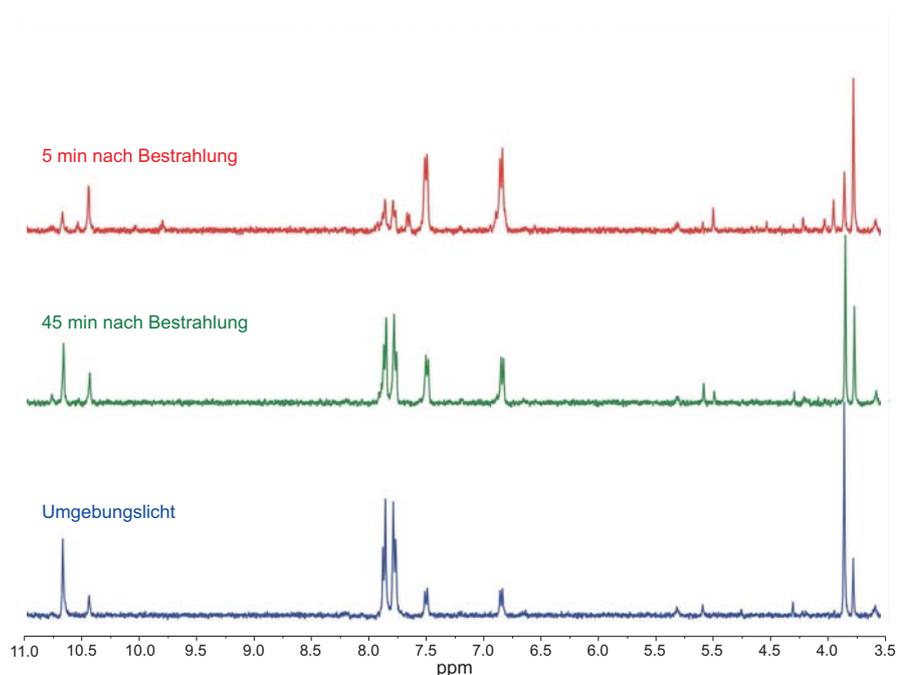
**Abbildung 5.12.:** Beispiel einer Azobenzollinker induzierten Stabilisierung einer  $\alpha$ -Helix. Links ist die Verbrückung über zwei Cysteine an den Positionen  $i$  und  $i+11$  gezeigt. Die helikale Konformation wird durch das *trans*-Isomer des Linkers stabilisiert, die *cis*-Konformation wirkt destabilisierend. Rechts ist eine Verbrückung über zwei Cysteine an den Positionen  $i$  und  $i+7$  zu sehen, hier ist die *cis*-Konformation helixstabilisierend. Einen ähnlichen Effekt ergäbe eine Verbrückung über  $i$  und  $i+4$  (hier nicht dargestellt). Abbildung entnommen aus<sup>[185]</sup>.



**Abbildung 5.13.:** Darstellung von 4,4'-Bis(iodacetamid)-azobenzol ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4,4'-Diaminoazobenzol.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Andreas Prestel<sup>[188]</sup> wurde ein 15 Aminosäuren umfassendes Peptid synthetisiert, das bis auf zwei Reste der Sequenz der  $\alpha$ 1-Helix von Rnt1p entspricht (**61**). Die beiden zur Verbrückung mit dem Diazobenzollinker benötigten Cysteinsubstitutionen wurden dabei so ausgewählt, dass zum einen die an der Interaktion mit der dsRNA beteiligten Aminosäuren nicht durch Cysteine ersetzt wurden, zum anderen sich der Linker vollständig auf der nichtbindenden Seite des Peptids befindet (Abb. 5.15).

Als photoschaltbarer Linker wurde 4,4'-Bis(iodacetamid)-azobenzol (**60**) in einer zweistufigen Synthese nach einer Vorschrift von Kumita *et al.*<sup>[181]</sup>, ausgehend von 4,4'-Diaminoazobenzol (**58**), synthetisiert (Abb. 5.13). Der nach zweimaligem Umkristallisieren aus THF/Wasser in guter Reinheit erhaltene Linker wurde zur Untersuchung des Isomerisierungsverhaltens in DMSO-d<sub>6</sub> gelöst. Zunächst wurde ein Protonenspektrum bei Umgebungslicht aufgenommen. Hier sollte hauptsächlich die thermodynamisch stabilere trans-Konformation vorliegen. Um die cis-Konformation zu erhalten wurde fünf Minuten bei 366 nm bestrahlt. Es wurde sowohl direkt nach dem Bestrahlen (aus messtechnischen Gründen nach 5 min), als auch 45 min danach ein Protonenspektrum gemessen, um das Isomerisierungsverhalten zu beobachten. Wie in Abb. 5.14 und Tab. 5.3 zu sehen ist, liegt bereits bei Umgebungslicht die cis-Konformation zu etwa 20% vor. Fünf Minuten nach dem Bestrahlen liegt diese zu dreivierteln vor, wohingegen nach 45 min nur noch etwa 35% NMR-spektroskopisch nachweisbar sind. Der Literaturwert für die Halbwertszeit der thermischen Isomerisierung bei 25 °C liegt bei 12 min<sup>[187]</sup>, was größenordnungsmäßig mit den beobachteten Werten übereinstimmt.



**Abbildung 5.14.:** 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Photolinkers **60** in DMSO-d<sub>6</sub> bei 300 K nach Bestrahlung bei 366 nm. Rot: 5 min nach der Bestrahlung. Grün: 45 min nach der Bestrahlung. Blau: bei Umgebungslicht.

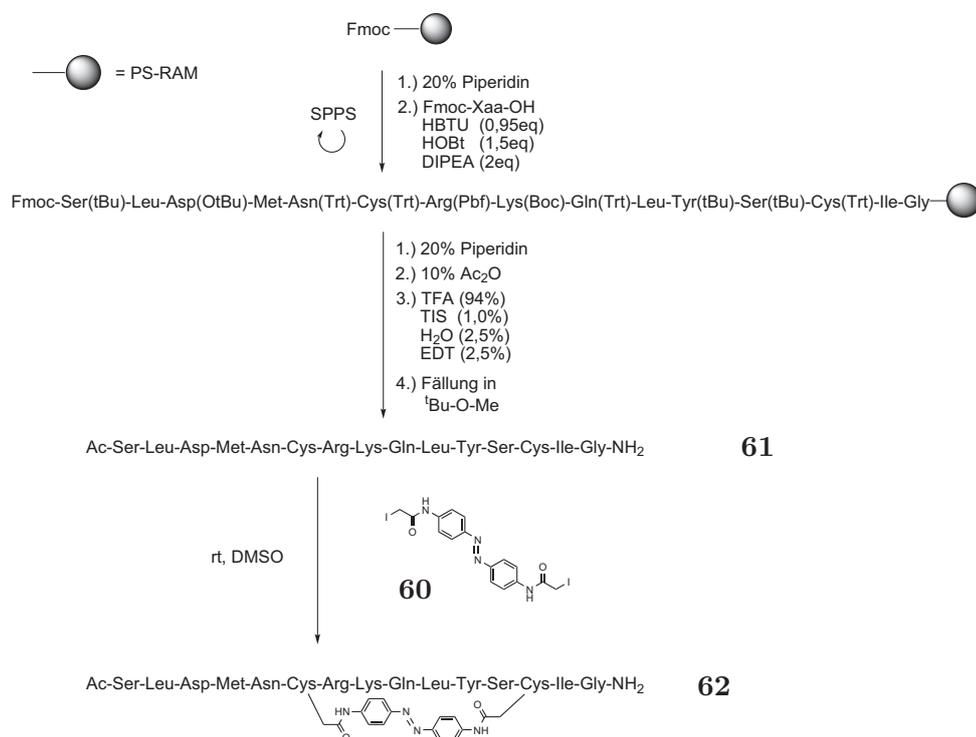
Die Umsetzung des vollständig entschützten, vom Harz abgespaltenen und per RP-HPLC gereinigten Peptides **61** mit dem Photolinker **60** wurde in einem Gemisch aus DMSO und

## 5. Interaktion mit doppelsträngiger RNA - basierend auf der $\alpha$ 1-Helix von Rnt1p

**Tabelle 5.3.:** Prozentualer Anteil der cis-Konformation vor und nach Bestrahlung bei 366 nm. Verglichen wurden jeweils die Integrale der Signale der jeweiligen Konformation. Zur besseren Integrierbarkeit wurde beim Prozessieren eine Exponentialfunktion mit einer Linienbreite von 2 Hz verwendet.

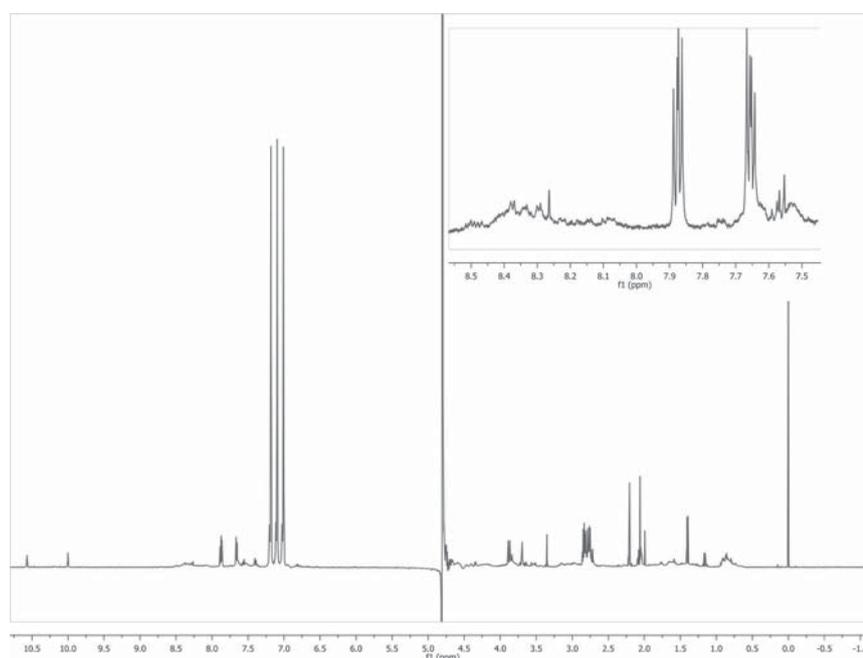
	Amid-H	Aromaten-H	Methylen-H	Durchschnitt
5 min nach Bestrahlung	76,6	74,3	70,1	73,7
45 min nach Bestrahlung	35,8	37,0	35,7	36,2
bei Umgebungslicht	20,6	19,0	20,5	20,0

wässrigem TrisCl-Puffer (2:1) durchgeführt.<sup>[181]</sup> Nach ca. einer Stunde Reaktionszeit wurde überschüssiger Linker durch Zugabe von Wasser ausgefällt. Die erhaltene Lösung wurde lyophilisiert und direkt mittels RP-HPLC gereinigt. Im MALDI-TOF-Massenspektrum des Rohproduktes wurden neben Signalen des gewünschten Produktes auch Signale eines Nebenproduktes mit  $\Delta m/z = -48$  gefunden. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Eliminierung von Thiomethanol aus Methionin handelt.<sup>[189]</sup> Im RP-HPLC-Chromatogramm waren sehr viele Peaks zu sehen. Die meisten zeigten Absorption bei 366 nm, was darauf hindeutet, dass zumindest Derivate des Photolinkers zugegen sein müssten. Reines Produkt konnte nur in Spuren erhalten werden und stand daher nicht für eine detaillierte NMR-Charakterisierung zur Verfügung.



**Abbildung 5.15.:** Syntheschema der Darstellung des mit dem Photolinker zyklisierten Peptids **62**.

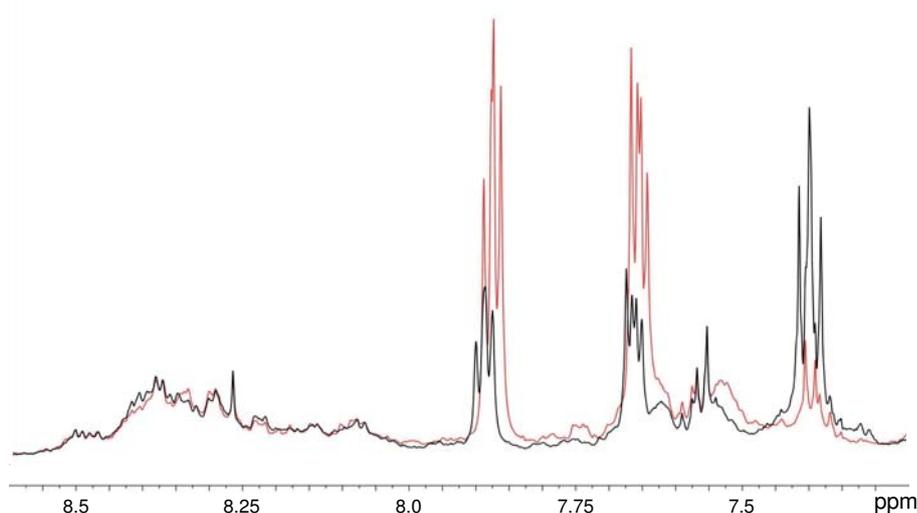
Durch Variation der Reaktionsbedingungen (1.) reines DMSO, 2.) beide Komponenten fünffach verdünnt, oder 3.) beide Komponenten doppelt konzentriert) konnte keine merkliche Verbesserung der Ausbeuten erzielt werden, wobei zu erwähnen ist, dass in reinem DMSO kein Produkt nachgewiesen werden konnte. Die Aufreinigung der anderen Ansätze gestaltete sich ebenfalls schwierig. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass das zyklisierte Peptid in DMSO und/oder saurer wässriger Lösung nicht stabil ist. Daher wurde versucht, die Verweilzeit in beiden Lösungen möglichst kurz zu halten. Um genug Substanz zur NMR-spektroskopischen Untersuchung zu erhalten, wurden alle HPLC-Fractionen des Produktes mit den Mischfraktionen vereinigt, die Nebenprodukte im Bereich des verlinkten Peptids enthielten und Absorption bei 366 nm zeigten.



**Abbildung 5.16.:** 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des zyklisierten Peptids in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5) bei 300 K und  $\text{pH}=3$ . Oben rechts gezeigt ist eine Vergrößerung des Bereichs der Amid- und Aromatenprotonen.

In Abb. 5.16 ist das Protonenspektrum des zyklisierten Peptides gezeigt. Neben den intensiven Signalen des Photolinkers sind Signale bei für Peptide typischen Resonanzen zu erkennen. Als weiteren Hinweis für eine erfolgreiche Zyklisierung kann man deuten, dass die aromatischen Signale des Photolinkers nicht mehr in zwei Dupletts, sondern in zweimal zwei Dupletts aufgespalten sind. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Benzolringe nicht mehr äquivalent sind, wie es in einem zyklisierten Peptid auch der Fall sein sollte. Zur Aufnahme auswertbarer zweidimensionaler NMR-Spektren war die Probe nicht konzentriert genug. Eine genauere strukturelle Charakterisierung des zyklisierten Peptides konnte daher nicht erfolgen. Um das Verhalten bei Bestrahlung zu untersuchen wurde die Probe 20 min

lang bei 366 nm bestrahlt. Danach wurde so zeitnah wie möglich (etwa 10 min) ein Protonenspektrum aufgenommen (Abb. 5.17). Im Bereich der Amidprotonen ist eine leichte Verschiebung der Signallagen zu beobachten. Die nur geringe Änderung der chemischen Verschiebungen deutet aber nicht auf eine drastische Änderung der Sekundärstruktur des Peptides hin.



**Abbildung 5.17.:** Ausschnitt des Amid- und Aromatenbereiches eines 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5) bei 300 K und  $\text{pH}=3$ . Rot: vor der Bestrahlung. Schwarz: 10 min nach 20 minütiger Bestrahlung bei 366 nm. Der Transfer der Probe zum NMR-Spektrometer erfolgte unter Lichtausschluss.

Nach Bestrahlung und Aufnahme der Spektren des zyklisierten Peptids wurde stets das Entstehen eines weißen Niederschlages beobachtet. Eine plausible Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Es ist jedoch bekannt, dass nach Überführen in die cis-Konformation mit einem Azobenzolderivat zyklisierte Peptide zur Präzipitation neigen können.<sup>[190]</sup>

## 6. Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff

Pyrrrolopyrrol Cyanin Farbstoffe (PPCys) stellen eine sehr interessante Klasse neuer naher Infrarot (NIR)-Fluoreszenzfarbstoffe dar.<sup>[191,192]</sup> Sie zeichnen sich durch schmale und intensive NIR-Absorptionsbanden aus. Durch Komplexierung mit BF<sub>2</sub> oder BPh<sub>2</sub> erhält man Verbindungen, die eine starke Fluoreszenz im NIR-Bereich zeigen, im sichtbaren Wellenlängenbereich aber kaum absorbieren. Durch Variation der heterozyklischen Ringsubstituenten lässt sich der Absorptionsbereich zwischen 684 und 864 nm einstellen, wobei stets hohe Fluoreszenzquantenausbeuten erhalten werden.<sup>[192]</sup>

In modernen biologischen Anwendungen ist die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile ein weitverbreitetes Instrument.<sup>[193,194]</sup> Mit stark fluoreszierenden und chemisch- sowie photostabilen Chromophoren lassen sich zum Beispiel biologisch interessante Verbindungen funktionalisieren und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Echtzeit verfolgen.<sup>[195]</sup> Die Möglichkeit, dabei im NIR-Bereich arbeiten zu können, hat im wesentlichen drei Vorteile:<sup>[196-198]</sup>

- durch schwache Absorption und stark reduzierte Streuung im Gewebe werden hohe Eindringtiefen ermöglicht
- aufgrund des sehr niedrigen Eigenfluoreszenzhintergrundes wird eine hohe Empfindlichkeit erreicht
- im Vergleich zur Emission im sichtbaren Bereich entstehen weniger Lichtschäden

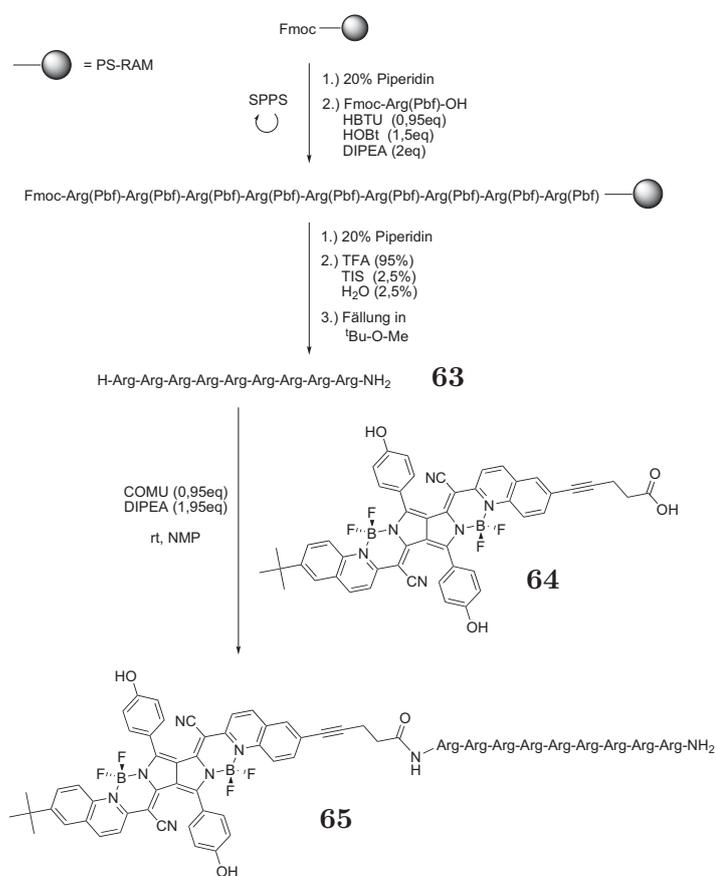
In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Zumbusch wurde ein Peptid mit einem von Georg Fischer synthetisierten neuen asymmetrischen NIR-Fluoreszenzfarbstoff **64** verknüpft und mittels *live cell microscopy* auf seine Anwendungsmöglichkeiten in biologischen Systemen hin untersucht.<sup>[199]</sup>

Mit Hilfe zellmembrandurchdringender Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs) können Partikel unterschiedlicher Größe in Zellen eingeschleust werden.<sup>[200]</sup> CPPs sind Peptide mit einer Länge von maximal 30 Aminosäuren und haben die Eigenschaft, Zellmembranen auf einem scheinbar energieunabhängigen Weg durchdringen zu können.<sup>[201,202]</sup> Der Transportmechanismus ist bislang aber noch nicht aufgeklärt. CPPs enthalten in der Regel

## 6. Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff

viele basische Aminosäuren. Durch die polykationische Struktur können sie mit der negativ geladenen Zellmembran wechselwirken. Als einfache CPP-Sequenzen wurden Polyarginine, speziell Nonaarginin, beschrieben<sup>[203]</sup>. Neben der Membrangängigkeit zeigen diese eine sehr gute Wasserlöslichkeit. Ein Arg<sub>9</sub>-PPCy-Konjugat sollte daher ebenfalls wasserlöslich sein.

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass sich Verbindung **64** in NMP unter Zuhilfenahme von COMU (1-[(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenoxy-dimethylamino-morpholino-methylen)]-methanaminium hexafluorophosphat) und DIPEA an die Seitenkettenaminofunktion eines Lysinrestes kuppeln lässt. Daher wurde davon ausgegangen, dass dies ebenfalls mit dem freien N-Terminus möglich sein sollte.



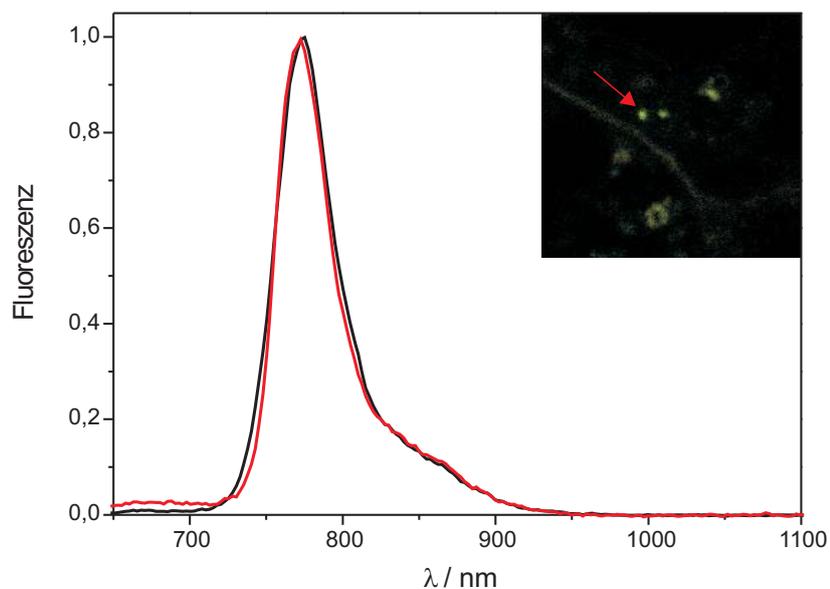
**Abbildung 6.1.:** Syntheschema der Funktionalisierung des membrangängigen Polyarginins mit **64**.

Das Nonaarginin wurde nach Standard Fmoc-Methoden an fester Phase synthetisiert. Nach Abspalten vom polymeren Träger wurde Farbstoff **64** in Lösung mit COMU und DIPEA in NMP über Nacht bei Raumtemperatur an das Peptid gekuppelt<sup>[204]</sup>. Ein Syntheschema ist in Abb. 6.1 gezeigt. Nach Aufkonzentrieren und Entsalzen mit einer Sephadex PD10-Säule wurde das Farbstoffkonjugat mittels RP-HPLC gereinigt.

---

Die *live-cell-imaging*-Versuche<sup>[203]</sup> wurden von Christian Jüngst, Arbeitsgruppe Zumbusch, durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen auf Mikroskopierschalen angezogen und 30 Minuten mit **65** in Puffer inkubiert. Die überstehende Lösung wurde entfernt und die Zellen mehrmals mit Puffer gewaschen, bevor sie unter dem Mikroskop untersucht wurden.

Um sicher zu sein, dass der Farbstoff auch in den Zellen intakt ist, wurden die Fluoreszenzspektren in reinem Puffer und in einem Vesikel in einer HeLa-Zelle verglichen. In Abb. 6.2 sind die beiden Spektren in normierter Form übereinandergelegt. Beide sind nahezu deckungsgleich, was darauf hindeutet, dass der Farbstoff auch im Vesikel in der gleichen Form wie in Lösung vorliegt. Sowohl Bandenform als auch Lage des Fluoreszenzmaximums (774 nm) sind, verglichen mit Messungen in Chloroform, kaum verändert.

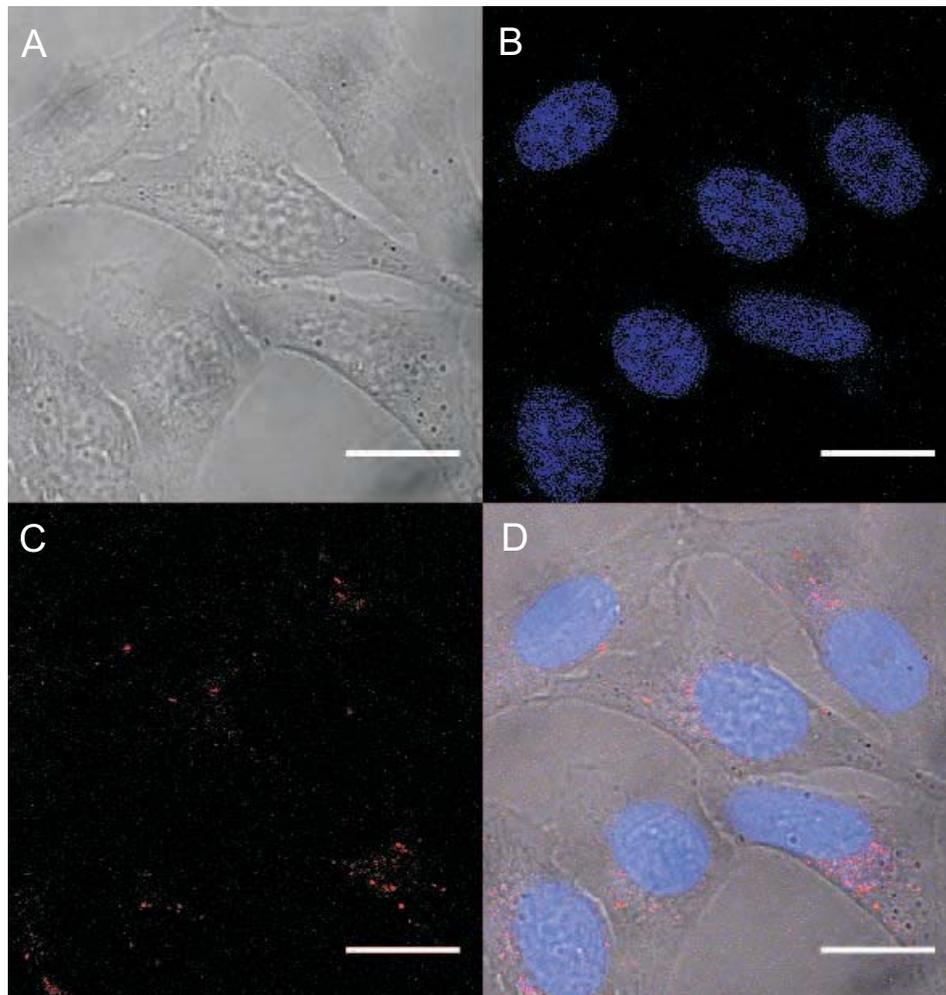


**Abbildung 6.2.:** Normierte Fluoreszenzspektren von **65** in Puffer (schwarze Linie) und in den im Bild mit Pfeil markierten endozytotischen Vesikeln (rote Linie).

In Abb. 6.3 sind Bilder der HeLa-Zellen gezeigt. Zur Lokalisierung des Zellkerns wurde dieser vor der Inkubation mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) angefärbt. Die blau fluoreszierenden Hoechst-Farbstoffe sind zellpermeable, DNA-bindende Fluorophore, die häufig zum Markieren von Zellkernen verwendet werden. Nach der Inkubation der Zellen mit **65** wurden über mehrere Stunden Transmissions- und Fluoreszenzbilder aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde dabei auf zwei Kanälen detektiert, einem blauen für den Hoechst

## 6. Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff

Farbstoff und einem roten für das Peptid-Farbstoff-Konjugat. Durch Überlagerung der Bilder kann man erkennen, dass die Peptid-Farbstoff-Konjugate in endozytotischen Vesikeln in die Zellen eingedrungen sind. Die Vesikel bewegen sich in die Nähe des Zellkerns, dringen aber nicht in diesen ein. Noch mehrere Stunden nach der Inkubation wurden intensive Fluoreszenzsignale erhalten. Auch wurde kein schädlicher Einfluss auf die Zellen beobachtet. Der verwendete Farbstoff scheint also als NIR-Fluoreszenzlabel für *in vivo* Anwendungen geeignet zu sein.



**Abbildung 6.3.:** Bilder von lebenden HeLa-Zellen nach Markierung mit **65**, fünf Stunden nach der Inkubation. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 20  $\mu\text{m}$ . A: Durchlicht-Mikroskop Bild. B: mit Hoechst-Farbstoff angefärbte Zellkerne. C: NIR-Fluoreszenzaufnahme der mit **65** inkubierten Zellen. D: Überlagerung von B und C. Die Farbstoff-Peptid-Konjugate sind in der Nähe, aber außerhalb der Zellkerne lokalisiert.

---

## Kupplung an fester Phase

Desweiteren wurde untersucht, ob sich **64** auch an fester Phase kuppeln lässt. Dazu wurden einige Milligramm TentaGel S-Harz mit **64**, HBTU und DIPEA in einer Mischung aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und NMP über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen wurden einzelne Harzkugeln von Martin Winterhalder, Arbeitsgruppe Zumbusch, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigten die Kugeln auf der Oberfläche starke Fluoreszenz. Allerdings brachte eine Negativkontrolle (selbe Bedingungen, ohne Kupplungsreagenz) die gleichen Ergebnisse, was den Schluss nahe legt, dass es sich um eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Harzkugeln und Farbstoff handelt. Darüber hinaus ist der Borkomplex des Farbstoffes gegenüber den TFA-Abspaltbedingungen nicht stabil. Eine nachträgliche Komplexierung würde wiederum die Vorteile der Festphasensynthese zunichte machen. Dieses Teilprojekt wurde daher nicht weiter verfolgt.



## 7. Zusammenfassung

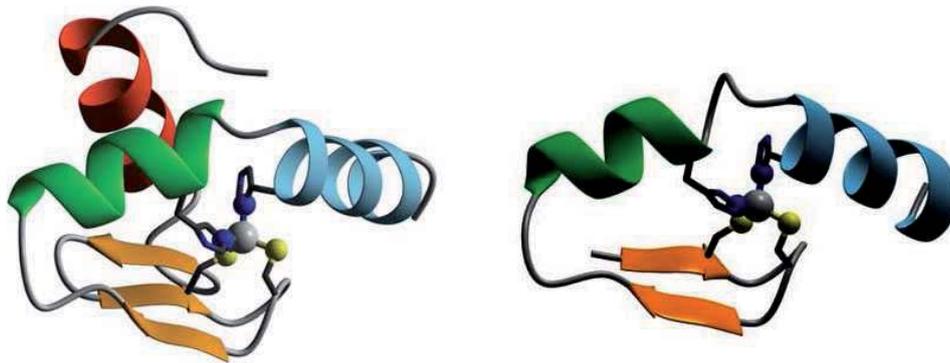
### 7.1. Substrukturen des dsRNA-erkennenden Proteins dsRBP-ZFa

Aufgrund ihrer Rolle bei der Entstehung von Krebs, der Verteidigung gegen Viren, der Prozessierung zellulärer RNA oder der posttranskriptionalen Genregulation hat das Interesse an doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Obwohl die Struktur einiger weniger dsRNA-bindender Proteine mittlerweile aufgeklärt ist, ist der Mechanismus der Interaktion bislang weitestgehend unbekannt.

Das *double-stranded RNA-binding protein ZFa* (dsRBP-ZFa) wurde beim Screening einer ovariären cDNA Expressionsbibliothek identifiziert. Es besteht aus 524 Aminosäuren und enthält insgesamt sieben Zinkfinger motive des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs. Während die C-terminalen vier Zinkfinger eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen, zeigen die drei N-terminalen Zinkfingerdomänen weder untereinander noch zu den vier C-terminalen große Ähnlichkeit. Die biologische Funktion von dsRBP-ZFa ist bislang noch völlig unklar. Homologe Proteine, die in Nagern und beim Menschen gefunden wurden, spielen eine wichtige Rolle beim Prozess der Apoptose und werden durch den Tumorsuppressor p53 induziert. Künstlich hervorgerufene Überexpression dieser Proteine kann Apoptose auslösen und das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Die Bindung an dsRNA mit Hilfe intakter Zinkfingerdomänen ist für ihre Funktion essentiell.

Die NMR-Struktur eines 127 Aminosäuren umfassenden Konstruktes, welches die ersten beiden Zinkfingerdomänen (ZF1 und ZF2) von dsRBP-ZFa enthält, wurde 2005 von Möller *et al.* gelöst<sup>[15]</sup>. Beide Zinkfingerdomänen bilden ein charakteristisches *Helix-turn-helix*-Motiv (HTH-Motiv), welches durch die Koordination von zwei sich jeweils in einer der Helices befindenden Histidinresten an ein Zinkion stabilisiert wird (Abb. 7.1). Die Zinkfinger motive sind in mehrerlei Hinsicht ungewöhnlich und höchstwahrscheinlich für die selektive dsRNA-Erkennung verantwortlich. Es könnte sich hier also um ein neues Erkennungsmotiv handeln.

In dieser Arbeit wurde ausgehend von dem Proteinkonstrukt sowie verschiedener peptidischer Substrukturen die Wechselwirkung sowohl mit doppelsträngiger RNA, als auch mit anderen Oligonukleotidmotiven, untersucht.



**Abbildung 7.1.:** Struktur der beiden N-terminalen Zinkfingerdomänen ZF1 und ZF2 aus dsRBP-ZFa. In grau dargestellt ist jeweils das Zinkion, das von den beiden Histidinen (blau) und Cysteinen (gelb) koordiniert wird. Grün und hellblau sind die beiden Helices, die das geknickte HTH-Motiv bilden.

Um tiefere Einblicke in die dsRNA-Erkennung zu erhalten, wurde das oben beschriebene 127 Aminosäuren umfassende Proteinkonstrukt in *E. coli* exprimiert. Zur späteren NMR-spektroskopischen Charakterisierung wurde die Expression in  $^{15}\text{N}$ -markiertem Minimalmedium durchgeführt und optimiert. Sowohl das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum als auch das CD-Spektrum zeigten, dass die Expression erfolgreich war und gefaltetes Protein erhalten wurde.

Bei SPR-Experimenten mit immobilisiertem Protein und verschiedenen Oligonukleotidmotiven wurde zunächst keine Wechselwirkung beobachtet. Dennoch gab es mehrere Indizien für eine Wechselwirkung zwischen dem Proteinkonstrukt (1) und einem 24 Basen umfassenden dsRNA-*hairpin* (2, Abb. 7.2). Ein biotinyliertes Derivat dieser dsRNA konnte erfolgreich auf einem Sensorchip immobilisiert und auf Interaktion mit dem Protein untersucht werden. Dabei ergab sich ein  $K_D$ -Wert von  $22,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$ , was einer eher schwachen Wechselwirkung entspricht. Mit Hilfe von *Electrophoretic mobility shift assays* wurden sowohl mit dem kompletten Protein, als auch mit Konstrukten, die nur drei oder vier Zinkfingerdomänen enthielten, Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich veröffentlicht.<sup>[47]</sup>

Auch die durchgeführten ITC-Experimente deuteten auf eine Wechselwirkung zwischen Protein und RNA hin. Dabei wurden Hinweise auf eine Interaktion des Proteins sowohl mit dem RNA-*hairpin* als auch mit einer kommerziell erhältlichen tRNA-Mischung erhalten. Aufgrund der untypischen Kurvenform konnten in diesem Fall jedoch weder verlässliche Bindungs- noch thermodynamische Konstanten bestimmt werden.

Ausgehend von Sequenz und Struktur der Zinkfingerdomänen wurden verschiedene Peptide entwickelt, die das *Helix-turn-helix*-Motiv nachbilden sollten. Dem lagen im Wesentlichen

zwei Ziele zu Grunde: Zum einen könnten dadurch neue Erkenntnisse über den Bindungsmodus gewonnen werden. Zum anderen wäre es für zukünftige Arbeiten interessant, das minimale Erkennungsmotiv zu kennen. Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren ließe sich dieses unter Umständen sogar noch optimieren, sowohl bezüglich Bindungsstärke und Selektivität gegenüber dem Substrat, als auch hinsichtlich anderer Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit oder Polarität. Damit könnte selektiv in biologische Vorgänge eingegriffen werden.

In dieser Arbeit wurden diverse Peptide synthetisiert, die eine der beiden Zinkfingerdomänen imitieren sollten. Dabei wurden hauptsächlich lineare, aber auch zyklische Peptide hergestellt. Variationen zur ursprünglichen Proteinsequenz wurden entweder N-terminal (in der Regel zu Immobilisierungszwecken) oder im Bereich der Zink-koordinierenden Histidinreste eingeführt.

Zur eindeutigen Identifizierung, der strukturellen Charakterisierung und als Basis für zukünftige Titrationsexperimente wurden von den meisten Peptiden 2D-NMR-Spektren aufgenommen und die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen zugeordnet. Durch Bestimmung der  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten und dem Vergleich der chemischen Verschiebungen mit tabellierten Werten für *random-coil*-Strukturen wurden Hinweise auf eventuell vorliegende Sekundärstrukturmerkmale gesucht. Dazu wurden teilweise auch CD-Spektren aufgenommen. Sowohl bei einer Nachbildung der ersten Zinkfingerdomäne (Peptid **45**), als auch bei einigen Peptiden die auf der Sequenz der zweiten Zinkfingerdomäne basieren (Peptide **29**, **30**, **31**), konnten Hinweise auf das Vorliegen partiell helikaler Strukturen gefunden werden.

Die synthetisierten Peptide dienen nicht nur dem Ziel, die Struktur des HTH-Motives zu imitieren, sondern können darüberhinaus selbst spezifische Affinität zu Oligonukleotiden aufweisen. Die Wechselwirkung zwischen den HTH-Mimetika und verschiedenen Oligonukleotidmotiven wurde mit Hilfe von NMR-Titrations, SPR-basierten Interaktionsstudien und eines Hammerhead-Ribozym (HHR)-basierten Fluoreszenzassays untersucht. Da das HHR und das bei diesen Versuchen eingesetzte Substrat aus RNA bestanden und teilweise in doppelsträngiger Form vorlagen, wurde dieser Ansatz zur Identifizierung dsRNA-bindender Peptide herangezogen. Bei NMR- und SPR-basierten Experimenten lassen sich beliebige Oligonukleotidmotive einsetzen.

Mit dem zyklischen Peptid **25**, welches die zweite Zinkfingerdomäne inklusive Zinkkoordination imitieren sollte, wurden NMR-Titrations mit je einem Vertreter der vier verschiedenen Oligonukleotidmotive dsRNA, dsDNA, ssRNA und ssDNA, allesamt abgeleitet von der in Abb. 7.2 abgebildeten dsRNA **2**, durchgeführt. Sowohl mit dsRNA als auch mit dsDNA zeigten sich im NMR-Spektrum Veränderungen, die auf eine Interaktion hindeuten.

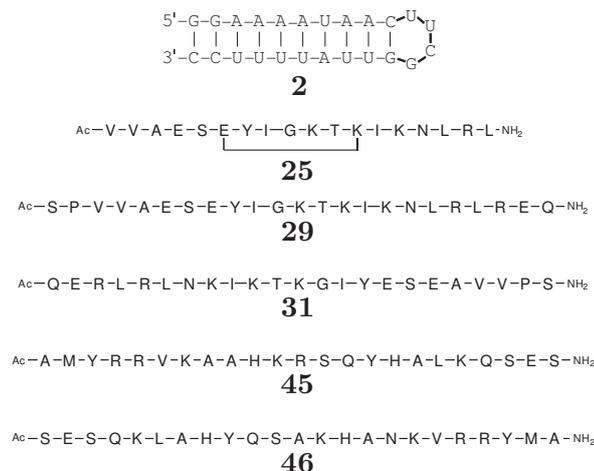


Abbildung 7.2.: Sequenzen der diskutierten Peptide sowie der dsRNA **2**.

Allerdings schien dies bei der dsDNA weniger selektiv zu sein. Dies könnte auf eine unspezifischere Wechselwirkung als bei der dsRNA hindeuten. Mit den beiden einzelsträngigen Vertretern wurden keine signifikanten Veränderungen im Protonenspektrum beobachtet.

Bei dem HHR-basierten Fluoreszenzassay bewirkte Peptid **25** weder eine Inhibition noch eine Beschleunigung der Spaltungsreaktion, wie es für andere Peptide beobachtet wurde. Allerdings zeigte ein ebenfalls zyklisches Derivat dieses Peptides, bei dem der N-terminale Teil nach der Zyklisierung nicht vorhanden war, eine deutliche Inhibition der Spaltungsreaktion.

SPR-Experimente mit immobilisierter RNA **2** zeigten zunächst deutliche Ausschläge selbst bei Injektion geringer Konzentrationen von Peptid **25**. Es ergab sich aber, möglicherweise durch Überlagerung unspezifischer Wechselwirkungen, bei Auftragung der *steady-state-affinity* kein Kurvenverlauf, der die Bestimmung von Bindungskonstanten möglich gemacht hätte.

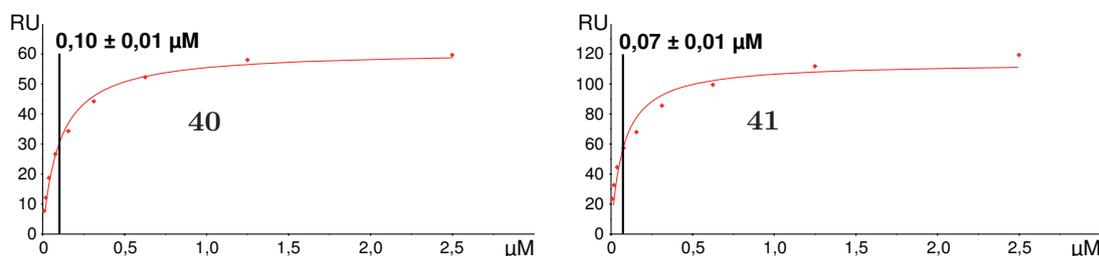
Die lineare Nachbildung der zweiten Zinkfingerdomäne **29** sowie dessen inverse Sequenz **31** bewirkten eine Beschleunigung der HHR-Spaltungsrate um bis zu 200%. Eine genaue Erklärung hierfür wurde bislang nicht gefunden, es deutet aber auf eine irgendwie geartete Wechselwirkung mit dem HHR und/oder dem Substrat hin.

Ein N-terminal biotinyliertes Derivat von **29** zeigte bei SPR-Experimenten eine sehr starke Wechselwirkung mit einem 26 Basenpaare enthaltenden dsDNA-*hairpin*-Motiv mit Einzelstrangüberhang. Weitere Untersuchungen mit über N-terminal Cystein-modifizierten und kovalent immobilisierten Peptiden zeigten, dass weder der Einzelstrangüberhang noch die Beschaffenheit der *loop*-Region einen Einfluss auf die Bindung haben. Bei sukzessivem Verkürzen des Doppelstranges bis auf 20 Basenpaare wurden  $K_D$ -Werte im mikromola-

ren Bereich erhalten. Kürzere dsDNA-Konstrukte zeigten keine Wechselwirkung mit dem Peptid. Mit dem ebenfalls über ein Thiol kovalent immobilisierten Peptid **31**, der inversen Sequenz von Peptid **29**, wurde ein ähnliches Bindungsverhalten gegenüber den verschiedenen Oligonukleotidmotiven beobachtet.

NMR-Titrationsexperimente, bei denen jeweils eines der beiden Peptide vorgelegt und sukzessive mit dsDNA titriert wurde, brachten keine weiteren Erkenntnisse. Bei beiden Peptiden konnte mit zunehmender DNA-Konzentration eine Verbreiterung der Protonenresonanzen beobachtet werden. Dies könnte durch eine unspezifische, ladungsvermittelte Wechselwirkung zustande kommen, die eine eventuelle spezifische Wechselwirkung überlagert.

Bei weiteren SPR-Experimenten wurden für beide Peptide relativ ähnliche  $K_D$ -Werte mit unterschiedlichen Oligonukleotiden erhalten. In einer von Andreeva *et al.* veröffentlichten Komplexstruktur ist die Wechselwirkung der Zinkfingerregion des Proteins DMATase, welche eine sehr starke strukturelle Ähnlichkeit mit ZF1 und ZF2 aus dsRBP-ZFa hat, mit tRNA beschrieben.<sup>[53]</sup> Daher wurde auch tRNA als möglicher Bindungspartner der HTH-Mimetika untersucht. Mit einer selbst transkribierten, Cystein-kodierenden tRNA, konnten  $K_D$ -Werte um 100 nM bestimmt werden (Abb. 7.3). Mit der korrespondierenden DNA, einer kommerziell erhältlichen tRNA-Mischung sowie der oben beschriebenen 26 Basenpaar-dsDNA lagen diese im Bereich zwischen 1-2  $\mu$ M.



**Abbildung 7.3.:** Auftragung der *steady-state-affinity* der von ZF2 abgeleiteten Peptide **40** und **41** mit der transkribierten Cystein kodierenden tRNA **10**. Die beiden Peptide entsprechen den Sequenzen der Peptide **29** und **31**, tragen aber zur Immobilisierung N-terminal einen zusätzlichen Cystein-Rest.

Das Peptidfragment **45** der ersten Zinkfingerdomäne, sowie dessen inverse Sequenz **46**, zeigten bei allen durchgeführten SPR-Experimenten ein sehr ähnliches Verhalten. So wurde für beide Peptide, mit Hilfe eines Biotin-Restes auf der Chipoberfläche immobilisiert, eine Wechselwirkung mit verschiedenen dsDNA-Konstrukten beobachtet. Die  $K_D$ -Werte lagen dabei größtenteils im submikromolaren Bereich.

Mit der immobilisierten dsRNA **2** wurden ebenfalls aussagekräftige Bindungskurven erhalten (Abb. 7.4). Die mit Hilfe der *steady-state-affinity* bestimmten  $K_D$ -Werte lagen bei beiden Peptiden im Bereich von 4  $\mu$ M.

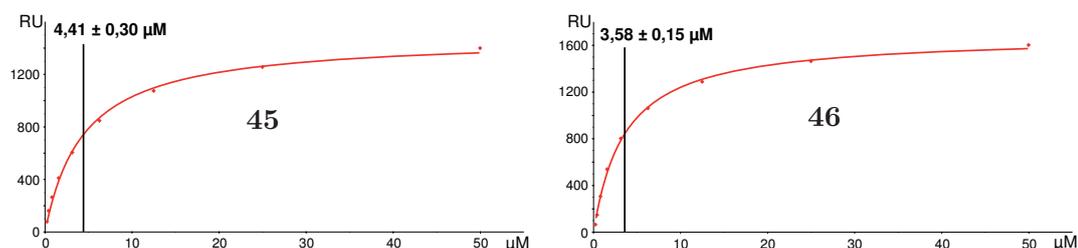


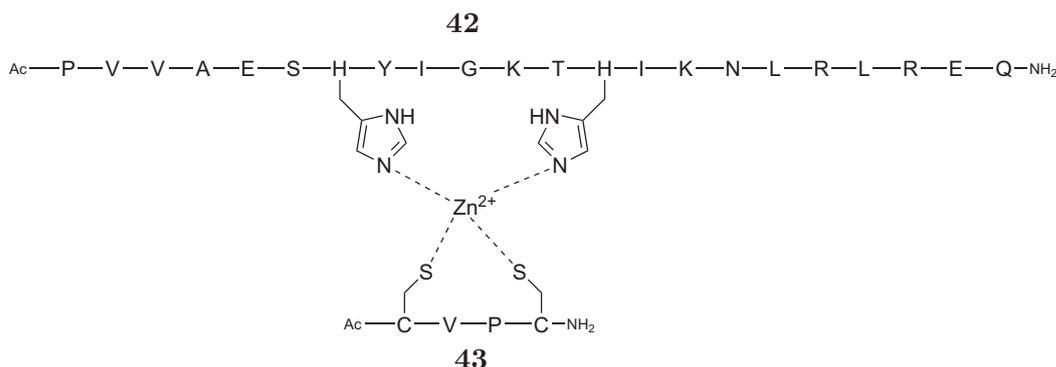
Abbildung 7.4.: Auftragung der *steady-state-affinity* der Peptide **45** und **46** mit immobilisierter dsRNA **2**.

Es konnten also eindeutig Wechselwirkungen von peptidischen Nachbildungen beider HTH-Motive mit verschiedenen doppelsträngigen Oligonukleotidmotiven nachgewiesen werden. Allerdings wurden diese auch für die jeweils inversen Sequenzen in der gleichen Größenordnung beobachtet. Es ist nicht geklärt ob der Grund dafür eine ebenfalls ausgebildete Sekundärstruktur der inversen Sequenzen ist, oder ob die Wechselwirkung ausschließlich ladungsvermittelt ist. Letzteres könnte mit randomisierten Sequenzen, die aus den gleichen Aminosäuren wie die beobachteten Peptide bestehen, ausgeschlossen, bzw. bestätigt werden.

Desweiteren wurden Voruntersuchungen mit einem Peptidfragment der zweiten Zinkfingerdomäne (Peptid **42**) zur Zinkkoordination in Lösung durchgeführt. Um wie im Proteinkontext eine  $\text{Cys}_2\text{His}_2$ -Koordination zu erhalten, wurde das Tetrapeptid **43** synthetisiert (Abb. 7.5). Durch Titration von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen zu einer Lösung von Peptid **42** beobachtete man Verbreiterung und teilweise Verschiebung der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Nach Zugabe des Tetrapeptids wurden diese deutlich schärfer und es entstanden neue Signale bei relativ tiefem Feld, die nicht in den Spektren der isolierten Peptide zu finden waren. Das gibt Grund zu der Annahme, dass eine Zinkkoordination im Peptidkontext durchaus möglich ist.

## 7.2. Peptide ausgehend von der $\alpha 1$ -Helix des Proteins Rnt1p

Das Protein Rnt1p gehört zur RNase III-Familie der dsRNA-Endonukleasen und spielt eine Schlüsselrolle bei der RNA-Prozessierung von *S. cerevisiae*. Die Substrate dieses Proteins sind allesamt dsRNA-*hairpins* mit einem AGNN-*tetraloop*<sup>[64]</sup>, für dessen Erkennung die  $\alpha 1$ -Helix des an die RNA bindenden *double-stranded RNA-binding motifs* (dsRBM) verantwortlich ist.



**Abbildung 7.5.:** Mögliche Zinkkoordination der beiden Peptide **42** und **43** ähnlich der im Proteinkontext beobachteten.

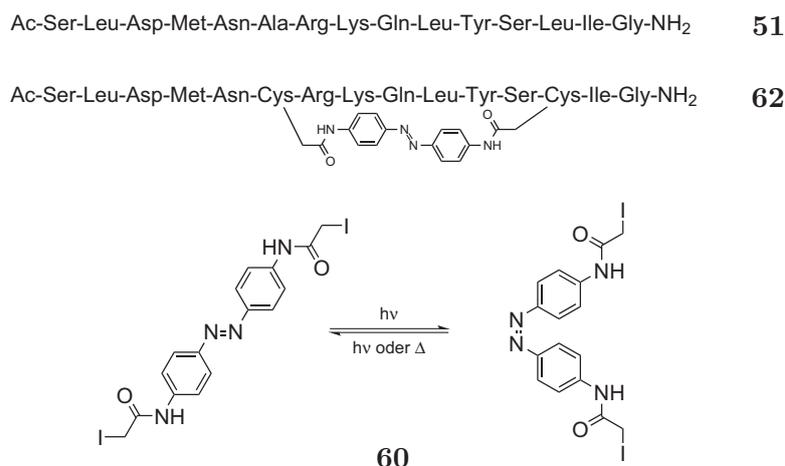
Ein 15 Aminosäuren umfassendes Peptid mit der Sequenz der  $\alpha$ 1-Helix wurde synthetisiert und strukturell charakterisiert. Sowohl das erhaltene CD-Spektrum, als auch das Auftreten einiger helixtypischer NOE-Signale und ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Werten für *random coil*-Strukturen weisen auf das Vorliegen einer helikalen Struktur hin.

Interaktionsstudien mit diversen Oligonukleotidmotiven brachten keine positiven Ergebnisse, weder mit NMR- noch mit SPR-Experimenten. Unter anderem wurde auch ein 32 Nukleotide umfassendes dsRNA-*hairpin*-Konstrukt mit AGAA-*tetraloop* transkribiert, welches nachweislich an das komplette dsRBM von Rnt1p bindet<sup>[36]</sup>. Allerdings ist diese Bindung mit einem  $K_D$ -Wert im mikromolaren Bereich relativ schwach. Der Anteil von Helix  $\alpha$ 1 an der Wechselwirkung dürfte demnach um Größenordnungen schwächer sein. Experimente mit höheren Konzentrationen als den hier maximal verwendeten von 1  $\mu$ M könnten unter Umständen zum Erfolg führen.

Die Aktivität von Biomolekülen hängt in der Regel unmittelbar mit ihrer räumlichen Struktur zusammen. Es ist daher sehr interessant, diese durch Veränderung der Umgebungsvariablen beeinflussen zu können.

Durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlängen können Azobenzole eine reversible cis-trans-Isomerisierung eingehen. Durch den Einbau solcher Chromophore in Peptide, entweder in das Rückgrat oder als Seitenkettenzyklisierung, lässt sich die Struktur durch Bestrahlung reversibel schalten.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Andreas Prestel wurde Peptid **62**, ein mit einem Azobenzollinker Seitenketten-zyklisiertes Derivat von Peptid **51**, hergestellt (Abb. 7.6). Dazu wurde zunächst 4,4'-Bis(iodacetamid)azobenzol synthetisiert und die cis-trans-Isomerisierung



**Abbildung 7.6.:** Sequenzen der beiden Peptide **51** und **62** sowie Darstellung der photoinduzierten cis-trans-Isomerisierung des 4,4'-Bis(iodoacetamid)azobenzol-Photolinkers **60**.

ung NMR-spektroskopisch verfolgt (Abb. 7.7). Der Linker wurde dann im Rahmen einer *side chain-to-side chain*-Zyklisierung in das Peptid integriert. Nach Bestrahlung bei 366 nm wurden Veränderungen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum beobachtet. Aufgrund der schlechten Reaktionsausbeuten konnte aber keine detailliertere strukturelle Charakterisierung erfolgen.

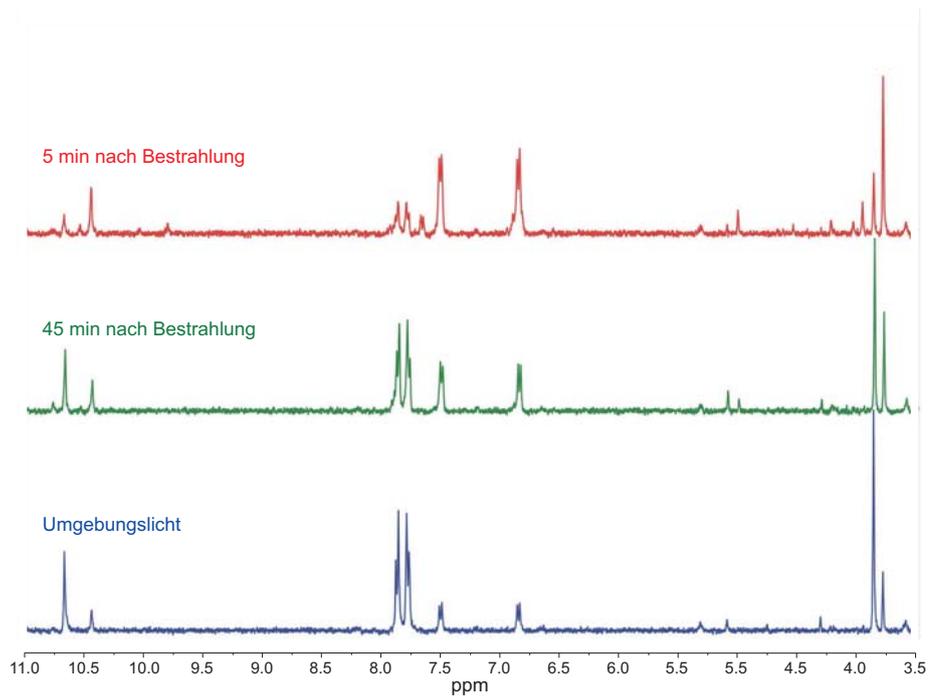
Mit größeren Mengen an zyklisiertem Peptid sollte dies aber durchaus möglich sein. Ließe sich tatsächlich ein Einfluss auf die helikale Konformation des Peptides feststellen, könnte so, im Falle einer nachweisbaren Erkennung von dsRNA, ein reversibel photoschaltbares, RNA-erkennendes Peptid hergestellt werden.

### 7.3. Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Pyrrolopyrrol-Cyanine (PPCy)s stellen eine sehr interessante Farbstoffklasse für zellbiologische Anwendungen dar. Durch Komplexierung mit BF<sub>2</sub> oder BPh<sub>2</sub> erhält man Fluoreszenzfarbstoffe mit schmalen und intensiven Absorptionsbanden im nahen Infrarot (NIR)-Bereich. Der Absorptionsbereich lässt sich dabei durch Variation der heterozyklischen Ringsubstituenten in einem Bereich zwischen 684 und 864 nm einstellen. Für biologische Anwendungen ergeben sich damit Fluorophore mit hoher Empfindlichkeit. Zudem wird eine hohe Eindringtiefe ermöglicht und dabei gleichzeitig ein anderer Wellenlängenbereich als der von bisher erhältlichen Farbstoffe verwendet

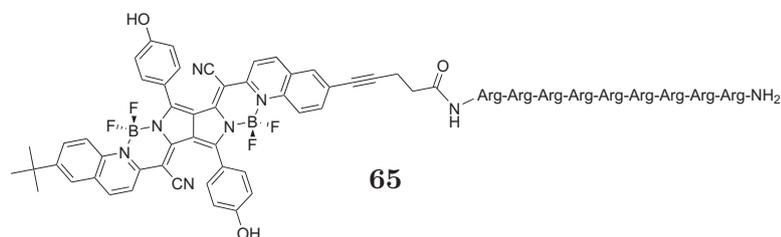
Um einen solchen Farbstoff in eine lebende Zelle zu schleusen und damit dessen Verhalten und Stabilität zu untersuchen, wurde dieser kovalent an ein zuvor synthetisiertes zellmembrandurchdringendes Peptid gekuppelt. Das in Abb. 7.8 gezeigte Konjugat wurde

### 7.3. Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff



**Abbildung 7.7.:** 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Photolinkers **60** in DMSO- $d_6$  bei 300 K nach Bestrahlung bei 366 nm. Rot: 5 min nach der Bestrahlung. Grün: 45 min nach der Bestrahlung. Blau: bei Umgebungslicht.

zu HeLa-Zellen gegeben und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die Peptid-Farbstoff-Konjugate in endozytotischen Vesikeln in die Zelle gelangen und sich in die Nähe des Zellkerns bewegen, jedoch nicht in diesen eindringen. Noch mehrere Stunden nach der Inkubation wurden intensive Fluoreszenzsignale erhalten. Das Spektrum des Farbstoff-Konjugates innerhalb der Vesikel ist dabei identisch mit dem in Lösung. Auch wurde kein schädlicher Einfluss auf die Zellen beobachtet.



**Abbildung 7.8.:** Konjugat aus einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff und einem zellmembrandurchdringenden Nonaarginin.



## 8. Experimenteller Teil

### 8.1. Allgemeine Angaben

#### 8.1.1. UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren zur Bestimmung der Fmoc-Konzentration wurden entweder mit einem Cary 50 Einstrahlphotometer (Varian) oder mit einem Philips Pu8740 Einstrahlphotometer in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas *Suprasil* aufgenommen.

#### 8.1.2. HPLC

Analytische und präparative RP-HPLC erfolgte an den folgenden Geräten:

- Shimadzu LC-20A *Prominence* HPLC-System mit zwei seriellen Tandemkolbenpumpen LC-20AT, automatischem Probengeber SIL-20A, Säulenofen CTO-20AC, Photodiodenarraydetektor SPD-M20A, Datenbus CBM-20A und LC-Solution Software
- Merck Hitachi HPLC-System mit automatischem Probengeber AS-4000, Pumpe D6200, Interface D-6000 und UV-Detektor L-4000
- Aekta *Purifier* Chromatographie System mit Tandemkolbenpumpen P-900, UV-Detektor UV-900 und automatischem Fraktionssammler Frac 920. Als Kontrollsoftware wurde Unicorn 3.11 verwendet

Als Trennsäulen wurden verwendet:

- Knauer Nucleosil 100-5 C18, 250 · 4 mm, CV = 4,155 ml (analytische Trennung)
- Knauer Eurosphere 100-5 C18, 250 · 4 mm, CV = 4,155 ml (analytische Trennung)
- Knauer Eurosphere 100-10 C18, 250 · 16 mm, CV = 19,635 ml (präparative Trennung)
- Merck LiChrosphere 100-5 C18, 250 · 4 mm, CV = 4,155 ml (analytische Trennung)
- Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, 250 · 4 mm, CV = 4,155 ml (analytische Trennung)

- Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100-5 C18, 250 · 10 mm, CV = 19,635 ml (präparative Trennung)

Wenn nicht anders beschrieben wurden als Eluenten verwendet:

- Eluent A: 95% H<sub>2</sub>O, 5% MeCN, 0,1% TFA
- Eluent A': 0,1% TFA in H<sub>2</sub>O
- Eluent B: 95% MeCN, 5% H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA
- Eluent B': 0,1% TFA in MeCN

### 8.1.3. Massenspektrometrie

**MALDI-TOF-Massenspektren** wurden an einem Bruker Biflex III Spektrometer aufgenommen. Als Ionisationsquelle diente ein gepulster Stickstofflaser (337nm). Als Matrix diente eine Lösung von ~15 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-hydroxy-zimtsäure (CHCA) in 50 % MeCN und 50 % H<sub>2</sub>O, versetzt mit 0,1 % TFA oder eine Lösung von ~15 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 50 % MeCN und 50 % H<sub>2</sub>O, versetzt mit 0,1 % TFA. Zum Kalibrieren wurde eine Referenzlösung aus mehreren Peptiden hergestellt (Tab. 8.1).

**Tabelle 8.1.:** Referenzsubstanzen für MALDI-TOF-MS Messungen

Peptid	m/z ([M+H] <sup>+</sup> )
Bradykinin Fragment 1-7	756,4
Angiotensin II	1046,45
Angiotensin I	1296,69
Neurotensin	1672,92
Bovine Insuline Chain B (ox)	3494,64
Bovine Insuline	5734,61

**ESI-MS-Spektren** wurden an einem Bruker Esquire 3000+ Spektrometer (Peptide im *positive mode*, Oligonukleotide im *negative mode*) aufgenommen. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 3  $\mu$ l/min injiziert.

### 8.1.4. CD-Spektroskopie

Die abgebildeten CD-Spektren wurden an einem JASCO J-815 Zirkulardichrometer gemessen. Die Messungen wurden bei 25 °C in 10 mm-Küvetten durchgeführt. Der spektrale

Bereich lag zwischen 180 und 260 nm. Es wurden jeweils zehn Spektren gemessen und adiert, wobei die Basislinienkorrektur mit einer zuvor gemessenen, nur den jeweiligen Puffer enthaltenden Probe, durchgeführt wurde.

Die CD-Spektren von Protein **1** wurden in HBS-RNA-Puffer (20 mM HEPES, 55 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 µM ZnSO<sub>4</sub> und 10 mM DTT, pH = 7,0, siehe auch 8.7) aufgenommen. Die Peptide wurden in 10 mM Phosphatpuffer, pH = 7,0 vermessen.

Zur Aufnahme und Prozessierung der Daten wurde die Software *Spectra Manager, Version 2.08.01* (Jasco Corporation) verwendet. Die Spektren wurden nach einem Savitzky-Golay-Algorithmus geglättet.

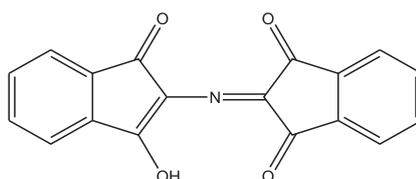
## 8.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptidsynthese

### AAV 1: Kaiser-Test

Der Test auf freie Aminogruppen erfolgte wie von Kaiser *et al.* beschrieben<sup>[205]</sup>. Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

- Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol
- Lösung 2: 2 ml 1 mM KCN (aq.) in 98 ml Pyridin
- Lösung 3: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol

Der Kaiser-Test stellt eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis freier Aminogruppen dar. Einige Harzkugeln werden in einem Kunststoffreaktionsgefäß mit je 2-3 Tropfen der Lösungen 1-3 versetzt und 5 min bei ca. 80 °C im Wasserbad erhitzt. Eine Blaufärbung der Lösung, bzw. des Harzes deutet auf freie Aminogruppen hin, die mit Ninhydrin zu einem als Ruhemanns Purpur bekannten Farbstoff reagieren (Abb. 8.1).



Ruhemanns Purpur

Abbildung 8.1.: Entstehender Farbstoff bei der Ninhydrin-Reaktion.

### AAV 2 : manuelle Kupplungen

Die Kupplungen werden in Kunststoffspritzen mit eingesetzter PE-Fritte (Firma Porex, Material: XS-49040, Stärke: 3,0 mm, mittlere Porenweite: 40 - 100 µm) durchgeführt. Eine allgemeine Vorgehensweise ist in Tab. 8.2 gezeigt.

**Tabelle 8.2.:** Vorgehen bei der Festphasenpeptidsynthese.

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	DMF	Quellen, Waschen	1	10
2	20 % Piperidin in DMF	Fmoc-Entschützen	2	10
3	20 % Piperidin in DMF	Fmoc-Entschützen	2	1
4	DMF	Waschen	10	1
5	DCM	Waschen	2	3
6	Fmoc-Xaa-OH	Kupplung	1	2-12h
7	DMF	Waschen	10	1
8	DCM	Waschen	2	3
9	10 % Ac <sub>2</sub> O in DMF	Capping	2	15
10	DMF	Waschen	10	1
11	DCM	Waschen	2	3

Anmerkungen zu:

- Schritt 3: Falls die Menge des abgespaltenen Fluoren-Derivates unter den Erwartungen blieb, wurde so lange Fmoc entschützt, bis kein Dibenzofulven mehr nachweisbar war.
- Schritt 6: Die jeweilige Aminosäure (Xaa) wird im 5-fachen Überschuss eingesetzt. Gekuppelt wird mit HBTU/HOBt/DIPEA in NMP im Verhältnis 0,95:1,5:2 bezogen auf ein Äquivalent Aminosäure.
- Schritt 6: Aufgrund der 2005 publizierten explosiven Eigenschaften von HOBt<sup>[111]</sup> und der daraus resultierenden Beschaffungsproblematik wurden spätere Synthesen ohne Zusatz von HOBt durchgeführt. Sowohl eigene Beobachtungen als auch Untersuchungen in der Literatur<sup>[107,112]</sup> belegen eine nahezu identische Kupplungseffizienz.
- Schritt 9: Vor der Acetylierung wird mithilfe des Kaisertests (AAV 1) auf Vollständigkeit der Kupplung geprüft. Bei unvollständiger Kupplung wird die Kupplung wiederholt (↔ Schritt 6).

### **AAV 3 : Photometrische Bestimmung der Harzbeladung/Kupplungsausbeute**

Um die Beladung des Harzes, bzw. die Ausbeute des vorangegangenen Kupplungsschrittes zu bestimmen, wird UV-spektroskopisch die Menge an abgespaltenem Fmoc bestimmt. Hierzu werden die vereinigten Abspalllösungen entsprechend verdünnt und die Absorption bei 301 nm gemessen. Anhand der bekannten Gesamtmenge und bekanntem Extinktions-

koeffizienten ( $\epsilon_{301} = 7800 \frac{l}{mol \cdot cm}$ )<sup>[206]</sup> kann die abgespaltene Menge an Fmoc und damit die Menge an Peptid auf dem Harz bestimmt werden.

#### AAV 4: Capping der freien Aminofunktionen

Dieser Schritt wird sowohl nach jeder Aminosäurekupplung zur Deaktivierung der nicht reagierten Aminofunktionen, als auch nach beendeter Synthese zur Acetylierung des N-Terminus durchgeführt.

In einer Einwegspritze mit eingesetzter PE-Fritte wird das Harz 2·15 min mit einer 10 %igen Acetanhydridlösung (Ac<sub>2</sub>O) in DMF behandelt. Anschließend wird zehnmal mit DMF und zweimal mit DCM gewaschen.

#### AAV 5: Kupplungen am Peptidsynthesizer

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem ABI 433A Peptidsynthesizer mit einem Series 200 UV/VIS Detektor der Firma Applied Biosystems nach einem Standard Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Protokoll<sup>[102]</sup>. Als Steuerungssoftware wurde SynthAssist3.1 verwendet. Für den stets verwendeten 20 µmol-Ansatz werden hierzu folgende Lösungen bzw. Lösungsmittel verwendet:

**Tabelle 8.3.:** Verwendete Reagenzien bei der automatisierten Peptidsynthese.

Lösung	Reagenzien	Konzentration
DIPEA	DIPEA	1,6 M in NMP
HOBt/HBTU	HOBt	0,38 M in NMP
	HBTU	0,38 M in NMP
Cappinglösung	Ac <sub>2</sub> O	0,5 M in NMP
	DIPEA	0,125 M in NMP
	HOBt	0,015 M in NMP
Piperidin		<i>biotech. grade</i>
NMP		<i>peptide grade</i>
DCM		<i>peptide grade</i>
Methanol		<i>HPLC grade</i>

Die Aminosäuren (100 µmol, 5 Äquivalente bezogen auf die Harzbeladung) werden in 440 µl NMP gelöst, in die jeweilige Kartusche überführt und in den Synthesizer geladen. Die Kupplungszeit beträgt 35 min pro Kupplungsschritt.

Um eine einwandfreie Förderung der verwendeten Reagenzien zu gewährleisten, werden vor der Synthese die entsprechenden *Flow-Tests* durchgeführt. Hierzu wird das *chemistry-*

file „Flow Test 1-18 (VML)Alternate.kem“ verwendet. Für die eigentliche Synthese wird das *chemistry-file* „20µM spezial.kem“ verwendet. Die jeweiligen *sequence-* und *run-files* werden vor jeder Synthese individuell erstellt.

Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz jeweils 8 min mit 22%iger Piperidinlösung in NMP behandelt und die Absorption bei 301 nm gemessen. Beträgt die Absorption beim zweiten Schritt weniger als 4% des ersten, wird mit der Synthese fortgefahren. Andernfalls wird das Harz erneut mit Piperidinlösung behandelt.

Nach Kupplung und Capping der letzten Aminosäure wird das Harz mit NMP und DCM gewaschen und zur weiteren Behandlung in eine Einwegspritze mit eingesetzter PE-Fritte überführt.

Die einzelnen Module sind in Tab. 8.4 und Tab. 8.5 beschrieben. Eine Auflistung der Reihenfolge der Module bei den verwendeten Zyklen ist in Tab. 8.6 gezeigt. In Anhang C sind die verwendeten Module aufgelistet.

**Tabelle 8.4.:** Beschreibung der Module für das bei den *Flowtests* verwendete *chemistry-file* „Flow Test 1-18 (VML)Alternate.kem“

Modul	Funktion
A	Bottle 10 to RV
B	Bottle 10 to Cartridge
C	Bottle 9 to Cartridge
D	Bottle 5 to Cartridge
E	Bottle 10 to Cart, Act, RV
F	Bottle 9 to Act Top w/Drain
G	Bottle 10 to RV Top
H	Measure 7 to Cartridge
I	Measure 8 to Cartridge
a	Bottle 1 to RV
b	Bottle 2 to RV
c	Barcode Reader
d	Bottle 4 to RV
e	Bottle 5 to RV
f	Bottle 6 to RV
g	Bottle 7 to Waste
h	Bottle 8 to Waste
i	Bottle 9 to RV

**Tabelle 8.5.:** Beschreibung der Module für das bei der Synthese verwendete *chemistry-file* „20µM spezial.kem“

Modul	Funktion
A	Read Cart & Add 7 & 8
B	Deprotection UV 4.0 %
C	Cap 1 min
D	NMP Washes
E	Read Cart & Add 2X(7 & 8)
F	Transfer, Clean Cart & Couple
G	Initial DCM Washes
H	-
I	Vortex (5 min.)
a	Re-Set Ch 2
b	*Cond Deprotection* 150
c	Final DCM Washes
d	NMP Wash from Act.
e	MeOH, NMP to Aux
f	-
g	-
h	*Cond Cap* 2 min
i	* Conditional Vortex (5 min.)

**Tabelle 8.6.:** Reihenfolge der bei der automatisierten Synthese mit dem *chemistry-files* „20µM spezial.kem“ verwendeten Module.

Zyklus	Module	Anwendung für
Kuppeln ohne FmocDepro	DAFIICId	Fmoc-entschütztes Harz
Single Couple, Cond Cap/5eq 15min länger	BbDAFIIIIiCid	alle weiteren Kupplungen
Final wash	Dc	nach beendeter Synthese

**AAV 6: Abspalten von der festen Phase (RinkAmid-Harz)**

Neben dem Abspalten des Peptids vom polymeren Träger werden im selben Schritt die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen abgespalten.

Wenn weder Methionin noch Cystein in der Sequenz enthalten sind, wird das Harz in einer Einwegspritze mit PE-Fritte zweimal 3 h mit einer Lösung aus TFA/TIS/Wasser

(95:2,5:2,5) geschüttelt. Die Lösung wird langsam in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalten *tert*-Butyl-methyl-ether (MTBE) getropft (etwa 10-faches Volumen der Gesamtmenge Abspalllösung), wobei das Peptid ausfällt. Das Harz wird weitere zweimal mit TFA gewaschen. Die MTBE-Suspension wird über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wird 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 4000 rpm zentrifugiert, die überstehende Lösung abdekantiert und das verbliebene Pellet erneut mit kaltem MTBE resuspendiert. Diese Schritte werden weitere zweimal wiederholt. Danach wird das Pellet in wenigen ml  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% TFA) gelöst und die wässrige Lösung lyophilisiert.

Enthält die Sequenz Methionin und/oder Cystein, so wird anstatt der oben beschriebenen Abspalllösung eine Lösung aus TFA/EDT/TIS/Wasser (94:2,5:1:2,5) verwendet.

Für Testabspaltungen für anschließende MALDI-TOF-MS-Experimente werden einige Harzkugeln in ein Eppendorfgefäß überführt und ca. 1 h mit TFA geschüttelt. Anschließend wird die TFA im Stickstoffgegenstrom entfernt. Das Peptid wird in einigen  $\mu\text{l}$  Wasser/MeCN (1:1) aufgenommen und mit der jeweiligen Matrixlösung 1:1 auf dem MALDI-*target* gemischt (8.1.3).

### **AAV 7: Generelles Vorgehen**

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Peptide in einem  $20\text{ }\mu\text{mol}$ -Ansatz an einem Polystyrol Rink-Amid-Harz synthetisiert. Dazu wird das Harz zunächst 30 - 60 min in DMF gequollen. Anschließend wird nach AAV 2 Fmoc abgespalten und die erste Aminosäure angeknüpft. Nach etwa zwei Stunden Kupplungszeit wird das Harz gewaschen und über Nacht erneut mit frischer Kupplungslösung geschüttelt. Nach den DMF/DCM-Waschschritten wird nach AAV 1 ein Kaiser-Test durchgeführt. Ist dieser negativ, werden evtl. noch freie Aminogruppen nach AAV 4 mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  gecappt. Andernfalls wird die Kupplung wiederholt. Die weitere Synthese erfolgt in der Regel am Peptidsynthesizer nach AAV 5. Das beladene Harz wird dann wieder in eine wie beschrieben präparierte Kunststoffspritze gegeben. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird nach AAV 2, Schritt 1-5 entfernt. Anschließend wird nach AAV 4 mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  acetyliert. Das Peptid wird nun nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten und ausgefällt.

## 8.3. Synthetisierte Peptide

### 8.3.1. dsRBP-ZFa-Peptide

#### Darstellung von Fmoc-Ile-Gly-Lys(Boc)-Thr-Lys(Aloc)-Ile-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Leu-Arg(Pbf)-Leu-RAM (66)

**Durchführung:** 504,4 mg TentaGel R RAM-Harz (Beladungsdichte: 0,18 - 0,22 mmol/g) wurden in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 109,2  $\mu\text{mol}$ . Die erste Aminosäure wurde nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer. Statt der sonst verwendeten 5 Äquivalente Aminosäure wurden in beiden Fällen 10 Äquivalente eingesetzt.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$  1588,9; berechnet: 1588,1

#### Darstellung von Fmoc-Glu(OAll)-Tyr(tBu)-Ile-Gly-Lys(Boc)-Thr-Lys(Aloc)-Ile-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Leu-Arg(Pbf)-Leu-RAM (67)

Das Harz von Synthese **66** wurde wieder in eine Spritze mit eingesetzter PE-Fritte überführt. Fmoc-Tyr(tBu)-OH und Fmoc-Glu(OAll)-OH wurden nach AAV 2 gekuppelt, wobei erneut je 10 Äquivalente Aminosäure eingesetzt wurden. Da der Kaisertest (AAV 1) nach der Glu(OAll)-Kupplung uneindeutig war und im MALDI-TOF-MS Produkt und Edukt nachweisbar waren, wurde ein weiteres mal nach AAV 2 gekuppelt. Dieses mal mit 5 Äquivalenten Aminosäure und unter Verwendung von HATU/HOAt als Kupplungsreagenz.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1921,9$ ; berechnet:  $m/z = 1921,1$

#### Darstellung von Ac-Val-Val-Ala-Glu-Ser-[Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys]-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (25)

Etwa 80% des Harzes von Synthese **67** (theoretisch ca. 80  $\mu\text{mol}$ ) wurden 1 h in DMF und 30 min in DCM gequollen. Zur Abspaltung der Allylschutzgruppen wurden Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (193 mg, 2 eq.) und HNBMe<sub>2</sub> (79 mg, 16 eq.) unter Stickstoffatmosphäre in einigen ml DCM gelöst, zum Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Danach wurde je fünfmal mit DCM, NMP und wieder DCM gewaschen und die gesamte Prozedur mit frisch hergestellter Abspatlösung wiederholt.

Zur *side chain-to-side chain* Zyklisierung wurden PyAOP (217 mg, 5 eq.), HOAt (57 mg, 5 eq.) und DIPEA (108 mg, 10 eq.) in 1 ml NMP gelöst und zum Harz gegeben. Nach 18 h wurde zehnmal mit NMP und dreimal mit DCM gewaschen und der Reaktionsfortschritt mit Hilfe einer Testabspaltung (s. AAV 6) per MALDI-TOF-MS untersucht. Da sowohl

zyklisiertes als auch nicht zyklisiertes Peptid nachweisbar waren, wurde die Zyklisierung für weitere 48 h wiederholt. Nach erneutem zehner- bzw. zweimaligen Waschen mit NMP und DCM wurde ein Kaisertest nach AAV 1 durchgeführt. Da dieser positiv war wurden die verbleibenden, nicht abreagierten Aminofunktionen nach AAV 4 mit Ac<sub>2</sub>O gecappt.

Die restlichen Aminosäuren wurden nach AAV 2 gekuppelt. Danach wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 abgespalten, der N-Terminus nach AAV 4 acetyliert und nach AAV 6 vom Harz abgespalten.

**Ausbeute (Rohprodukt):** 132 mg (Da das Peptid sehr schwer löslich war wurden diverse Lösungsversuche in verschiedensten Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei konnte das Peptid in DMSO, in reinem HFIP und mit Abstrichen in 30 %iger Essigsäure gelöst werden. Auch wurde die Aufreinigung in mehreren, zeitlich sehr weit auseinanderliegenden Schritten durchgeführt. Eine präzise Angabe der Ausbeute ist daher nicht möglich.)

**Retentionszeit:** 17,5 min bei 20 - 35 % B' in 30 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 2084,7; berechnet: m/z = 2084,2

**NMR-Spektren:**

<sup>1</sup>H: p3919gp (dg\_060116/1)

TOCSY: mlevgp19 (dg\_060116/3)

COSY: cosydfgp19 (dg\_060118/4)

NOESY: noesygp19 (dg\_060116/4)

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgp (dg\_060118/12)

**Tabelle 8.7.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung **25** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2
Val1	8,145	4,058	2,014	0,905/0,936	-	-
Val2	8,215	4,098	2,039	0,926/0,926	-	-
Ala3	8,422	4,307	1,374	-	-	-
Glu4	8,326	4,365	1,989/2,114	2,501/2,481	-	-
Ser5	8,326	4,368	3,865/3,820	-	-	-
Glu6	8,246	4,280	1,933/1,999	2,260/2,260	-	-
Tyr7	8,169	4,602	3,046/2,929	-	7,117	6,820
Ile8	8,094	4,053	1,833	1,460;1,178/0,872	0,844	-
Gly9	8,246	3,851/4,058	-	-	-	-
Lys10	8,017	4,363	1,845/1,770	1,392	1,649	2,963
Thr11	8,177	4,274	4,156	-	1,201	-
Lys12	8,311	4,320	1,782/1,686	1,339	1,475	3,086/3,227
Ile13	8,129	4,103	1,830	1,465;1,188/0,885	0,844	-

Fortsetzung von Tab. 8.7						
Lys14	8,366	4,267	1,755	1,382	1,648	2,968
Asn15	8,389	4,660	2,837/2,731	-	-	-
Leu16	8,243	4,291	1,651	1,588	0,856	0,921
Arg17	8,298	4,315	1,777/1,853	1,616/1,651	-	7,188
Leu18	8,107	4,307	1,667	1,588	0,846/0,921	-

**Tabelle 8.8.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **25** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta_{1/2}$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\epsilon_{1/2}$
Val1	62,473	32,607	20,835	-	-
Val2	62,473	32,607	20,835	-	-
Ala3	54,857	18,960	-	-	-
Glu4	56,380	28,706	32,768	-	-
Ser5	58,665	63,997	-	-	-
Glu6	59,934	29,975	34,292	-	-
Tyr7	57,903	38,862	-	133,616	118,583
Ile8	62,473	38,354	27,437/17,281	12,711	-
Gly9	45,463	-	-	-	-
Lys10	56,380	33,276	24,898	-	42,162
Thr11	62,473	69,863	21,597	-	-
Lys12	52,411	33,276	24,898	30,483	41,654
Ile13	61,458	38,354	27,437/17,281	12,711	-
Lys14	56,380	33,276	24,898	-	42,162
Asn15	53,333	38,862	-	-	-
Leu16	55,618	42,416	20,328	24,898/23,374	-
Arg17	56,380	30,483	29,214	45,463	-
Leu18	55,111	42,416	20,328	24,898/23,374	-

**Tabelle 8.9.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **25** in Hz.

${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Val1	7,20	Tyr7	7,20	Ile13	n.d.
Val2	7,60	Ile8	6,40	Lys14	5,90
Ala3	5,90	Gly9	6,80	Asn15	7,90
Glu4	7,20	Lys10	6,60	Leu16	n.d.
Ser5	6,40	Thr11	6,60	Arg17	n.d.
Glu6	7,20	Lys12	7,20	Leu18	6,60

**Darstellung von Ac-[Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys]-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (26)**

**Durchführung:** Das Produkt wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **25** erhalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 14,3 min bei 20 - 35 % B' in 30 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1599,2$ ; berechnet:  $m/z = 1599,0$

**Darstellung von Ac-Val-Val-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys(Ac)-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (27)**

**Durchführung:** Das Produkt wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **25** erhalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 27,1 min bei 20 - 35 % B' in 30 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2145,5$ ; berechnet:  $m/z = 2144,2$

**Darstellung von Ac-Val-Val-Ala-Glu-Ser-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys(Ac)-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (28)**

**Durchführung:** Das Produkt wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **25** erhalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 36 min bei 20 min 23 % B' und 23 - 33 % B' in 20 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2015,5$ ; berechnet:  $m/z = 2015,2$

**Darstellung von Ac-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (29)**

**Durchführung:** Es wurden 35,3 mg TentaGel R RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,6 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 24,3  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 21,18  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die ersten beiden sowie die letzten acht Aminosäuren (Glu8-Ser1) nach AAV 2 gekuppelt wurden. Nach Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 und Acetylieren des N-Terminus nach AAV 4 wurde das Peptid nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** 3,8 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ , 6%

**Retentionszeit:** 6,1 min bei 30 - 38 % B in 15 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 2701,1$ ; berechnet:  $m/z = 2699,5$

**NMR-Spektren:**

<sup>1</sup>H: p3919gp (hm\_tl20070208/2)

TOCSY: mlevgp19 (hm\_tl20070208/3)

COSY: cosydfgp19 (hm\_tl20070209/3)

NOESY: noesygp19 (hm\_tl20070208/4)

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgpsisp2.2 (hm\_tl20070209/4)

**Tabelle 8.10.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung 29 (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)). Die Glutaminreste 8 und 22 konnten nicht unterschieden werden und sind daher in der Tabelle unten aufgelistet.

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2
Ser1	8,116	4,746	3,821	n.d.	-	-
Pro2	-	4,466	2,271/2,249	2,004/1,905	3,832/3,740	-
Val3	7,994	4,037	2,032	0,936/0,914	-	-
Val4	7,934	4,058	2,056	0,904/0,917	-	-
Ala5	8,202	4,272	1,388	-	-	-
Glu6	8,197	4,294	2,120	2,486	-	-
Ser7	8,132	4,337	3,907	n.d.	-	-
Tyr9	7,987	4,552	3,066	-	7,080	6,789
Ile10	7,869	4,058	1,810	1,458;1,170/0,885	0,872	-
Gly11	8,088	3,907	-	-	-	-
Lys12	8,079	4,316	1,862/1,777	1,453/1,389	1,660	2,981/2,960
Thr13	7,949	4,249	4,186	1,175	-	-
Lys14	8,168	4,251	1,798/1,733	1,410/1,345	1,646/1,626	2,959/2,939

8. Experimenteller Teil

Fortsetzung von Tab. 8.10						
Ile15	7,916	4,058	1,840	1,458;1,170/0,875	0,830	-
Lys16	8,190	4,208	1,754/1,733	1,410/1,346	1,647	2,960/2,937
Asn17	8,211	4,639	2,808/2,722	-	7,528/6,834	-
Leu18	8,088	4,228	1,647/1,626	1,604	0,912/0,853	-
Arg19	8,138	4,251	1,840/1,776	1,646/1,582	3,175	7,178
Leu20	7,878	4,273	1,648/1,604	1,582	0,919/0,816	-
Arg21	8,090	4,252	1,862/1,776	1,646/1,625	3,175	7,179
Gln23	8,132	4,267	1,948/1,926	2,314/2,271	-	n.d.
Glu?1	8,162	4,316	2,121/1,991	2,445	-	-
Glu?2	8,176	4,273	2,119/1,991	2,357	-	-

**Tabelle 8.11.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **29** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K). Die Glutaminreste 8 und 22 konnten nicht unterschieden werden und sind daher in der Tabelle unten aufgelistet.

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\varepsilon_{1/2}$
Ser1	53,525	60,692	-	-	-
Pro2	60,630	29,248	47,906/25,930	-	-
Val3	59,921	29,840	18,025	-	-
Val4	58,750	29,962	18,406/18,321	-	-
Ala5	52,610	16,368	-	-	-
Glu6	49,933	25,930	30,331	-	-
Ser7	56,388	60,514	-	-	-
Tyr9	55,426	36,051	-	130,520	115,600
Ile10	58,749	35,893	24,652/14,796	10,097	-
Gly11	42,878	-	-	-	-
Lys12	53,656	30,319	22,145	26,303	37,578
Thr13	59,729	66,947	18,897	-	-
Lys14	53,759	30,106	22,145	26,224	39,357
Ile15	58,749	35,895	24,817/14,670	10,067	-
Lys16	54,037	30,185	22,250	26,271	39,385
Asn17	n.d.	35,881	-	-	-
Leu18	53,169	39,685	24,241	22,100/20,892	-
Arg19	53,759	27,673	24,860	40,592	-
Leu20	52,877	39,700	24,008	22,156/20,654	-

Fortsetzung von Tab. 8.11

Arg21	53,759	27,688	24,967	40,577	-
Gln23	52,900	25,943	30,315	-	-
Glu?1	53,674	25,812	30,381	-	-
Glu?2	52,877	26,146	31,216	-	-

**Tabelle 8.12.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **29** in Hz. Die Glutaminreste 8 und 22 konnten nicht unterschieden werden und sind daher in der Tabelle unten aufgelistet.

$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Ser1	7,2	Ile10	5,8	Leu18	7,3
Pro2	-	Gly11	n.d.	Arg19	6,8
Val3	6,5	Lys12	7,2	Leu20	6,8
Val4	6,8	Thr13	7,5	Arg21	6,8
Ala5	n.d.	Lys14	8,5	Gln23	7,2
Glu6	8,3	Ile15	8,5	Glu?1	7,2
Ser7	7,2	Lys16	8,2	Glu?2	8,2
Tyr9	7,5	Asn17	7,5		

### Darstellung von Ac-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-His-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-His-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (**30**)

**Durchführung:** Es wurden 32,0 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen.

Das Peptid wurde wie in AAV 7 beschrieben synthetisiert, wobei die ersten beiden Aminosäuren von Hand gekuppelt wurden. Die Sequenz wurde am Synthesizer komplettiert, wobei die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nicht abgespalten werden sollte. Etwa ein Viertel des Harzes wurde zur Synthese von Peptid **34** zurückgehalten, der Rest nach AAV 3 Fmoc-entschützt. Der bestimmte Absorptionswert war viel zu niedrig, sodass keine glaubwürdige Ausbeute angegeben werden kann. Bei der Synthese von **34** ergaben sich bei der weiteren Synthese deutlich höhere Werte, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass bereits am Peptidsynthesizer ein Großteil der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppen abgespalten wurde.

Das Peptid wurde nach AAV 4 N-terminal acetyliert und nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** > 6 mg, 2,2  $\mu$ mol, > 11 %

**Retentionszeit:** 15,2 min bei 20 - 23 % B in 30 min (präparative Säule)

8. Experimenteller Teil

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2715,9$ ; berechnet:  $m/z = 2716,5$

**NMR-Spektren:**

$^1\text{H}$ : p3919gp (DG\_080211/2)

TOCSY: mlevgpph19 (DG\_080211/3)

COSY: cosydfgpph19 (DG\_080211/4)

NOESY: noesygpph19 (DG\_080211/5)

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: hsqcedetgpsisp2.2pr.hm (DG\_080213/3)

**Tabelle 8.13.:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **30** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2	H $\zeta$ 1/2
Ser1	8,25	4,75	3,87/3,81	n.d.	-	-	-
Pro2	-	4,48	2,28/1,90	2,02	3,85/3,73	-	-
Val3	8,18	4,06	2,02	0,95	-	-	-
Val4	8,15	4,09	2,05	0,93	-	-	-
Ala5	8,36	4,30	1,38	-	-	-	-
Glu6	8,29	4,31	2,08/1,98	2,45	-	n.d.	-
Ser7	8,27	4,36	3,83/3,79	n.d.	-	-	-
His8	8,44	4,69	3,23/3,10	-	7,20	8,58	-
Tyr9	8,23	4,56	2,97	-	7,08	6,80	-
Ile10	8,05	4,13	1,81	1,42;1,14/0,86	0,83	-	-
Gly11	7,99	3,92	-	-	-	-	-
Lys12	8,26	4,37	1,85/1,74	1,44	1,68	2,99	7,53
Thr13	8,09	4,38	4,15	n.d.	-	-	-
His14	8,59	4,71	3,25/3,14	-	7,25	8,59	-
Ile15	8,17	4,13	1,83	1,44;1,16/0,90	0,86	-	-
Lys16	8,44	4,27	1,76	1,45/1,38	1,68	2,99	7,53
Asn17	8,42	4,68	2,84/2,75	-	7,60/6,90	-	-
Leu18	8,28	4,28	1,61	1,59	0,93/0,86	-	-
Arg19	8,29	4,30	1,85/1,79	1,62	3,21	7,19	-
Leu20	8,05	4,33	1,64	1,59	0,93/0,86	-	-
Arg21	8,30	4,29	1,85/1,79	1,62	3,21	7,19	-
Glu22	8,35	4,35	2,13/2,00	2,45	-	-	-
Gln23	8,37	4,31	2,13/2,01	2,39	-	7,54/6,85	-

**Tabelle 8.14.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **30** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\varepsilon_{1/2}$
Ser1	n.d.	63,60	-	-	-
Pro2	63,59	32,29	27,54	50,98	-
Val3	62,92	32,85	20,99	-	-
Val4	62,53	33,09	21,14	-	-
Ala5	52,90	19,35	-	-	-
Glu6	56,66	29,26	33,87	n.d.	-
Ser7	58,76	63,87	-	-	-
His8	n.d.	29,09	n.d.	-	n.d.
Tyr9	58,31	39,09	n.d.	133,51	118,49
Ile10	61,41	39,09	27,54/17,60	13,05	-
Gly11	45,45	-	-	-	-
Lys12	56,56	33,39	25,21	29,30	42,26
Thr13	62,13	70,13	21,76	-	-
His14	n.d.	29,06	n.d.	-	n.d.
Ile15	61,44	39,09	27,55/17,95	13,05	-
Lys16	56,77	33,41	25,20	29,27	42,43
Asn17	n.d.	38,95	n.d.	-	-
Leu18	55,95	42,78	27,21	25,20	-
Arg19	56,20	30,76	27,25	43,65	-
Leu20	55,89	42,74	21,21	25,10	-
Arg21	56,51	30,76	27,25	43,65	-
Glu22	56,2	29,99	33,42	n.d.	-
Gln23	56,06	29,26	34,25	n.d.	-

**Tabelle 8.15.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **30** in Hz.

${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Ser1	6,48	Tyr9	7,01	Asn17	7,03
Pro2	-	Ile10	7,84	Leu18	6,67
Val3	6,61	Gly11	5,66	Arg19	n.d.
Val4	6,9	Lys12	6,54	Leu20	6,42
Ala5	n.d.	Thr13	7,31	Arg21	n.d.
Glu6	6,58	His14	8,07	Glu22	6,93
Ser7	6,67	Ile15	7,34	Gln23	6,73
His8	8,22	Lys16	7,7		

**Darstellung von Ac-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Leu-Asn-Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Gly-Ile-Tyr-Glu-Ser-Glu-Ala-Val-Val-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> (31)**

**Durchführung:** Es wurden 117,5 mg TentaGel R RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,17 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 19,1  $\mu$ mol (berechnet: 19,98  $\mu$ mol).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die ersten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden.

**Ausbeute:** 3,0 mg, 1,1  $\mu$ mol, 6%

**Retentionszeit:** 8,5 min bei 20 - 30 % B in 15 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2700,2$ ; berechnet:  $m/z = 2699,5$

**NMR-Spektren:**

${}^1H$ : p3919gp (dg070921/2)

TOCSY: mlevgp-ph19 und mlevsgp-ph (dg070921/3 und 4)

COSY: cosydefsgp-ph (dg070921/6)

NOESY: noesygp-ph (dg070921/5)

${}^1H$ - ${}^{13}C$  HSQC: hsqcetgpsisp2.2 (dg070921/7)

**Tabelle 8.16.:**  ${}^1H$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **31** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2
Gln1	8,377	4,211	2,084/1,966	2,388	-	-
Glu2	8,552	4,291	2,012/2,085	2,445	-	-
Arg3	8,283	4,258	1,827/1,780	1,616	-	-
Leu4	8,061	4,305	1,863	1,568	0,868/0,915	-

Fortsetzung von Tab. 8.16						
Arg5	8,229	4,305	1,827/1,756	1,590	-	-
Leu6	8,159	4,327	1,591	1,639	0,868 / 0,915	-
Asn7	8,371	4,679	2,797/1,750	-	-	-
Lys8	8,230	4,305	1,828/1,755	1,359	1,579/1,662	2,974
Ile9	8,076	4,117	1,862	1,475;1,194/0,892	0,880	-
Lys10	8,419	4,375	1,827/1,733	1,445/1,381	1,663	2,973
Thr11	8,102	4,328	4,188	-	-	-
Lys12	8,383	4,305	1,851 / 1,780	1,462	1,687	2,995
Gly13	8,374	3,931	-	-	-	-
Ile14	7,903	4,141	1,756	1,264;1,057/0,797	0,797	-
Tyr15	8,260	4,608	2,926/3,033	-	7,109	6,807
Glu16	8,181	4,352	2,060/1,920	2,387	-	-
Ser17	8,280	4,375	3,859	-	-	-
Glu18	8,307	4,375	2,130/1,966	2,458	-	-
Ala19	7,996	4,305	0,891	-	-	-
Val20	8,092	4,094	2,130	0,868/0,915	-	-
Val21	8,279	4,422	2,061	0,950	-	-
Pro22	-	4,422	2,324/2,304	2,081/2,070	3,697/3,901	-
Ser23	8,333	4,375	3,884	-	-	-

**Tabelle 8.17.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **31** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\epsilon_{1/2}$
Gln1	56,772	29,359	33,111	-	-
Glu2	56,856	27,667	33,287	-	-
Arg3	56,856	30,786	27,371	43,641	-
Leu4	55,698	42,635	27,309	23,647/25,159	-
Arg5	55,808	33,222	29,382	43,641	-
Leu6	55,563	42,627	27,382	23,654/25,172	-
Asn7	n.d.	37,174	-	-	-
Lys8	56,746	33,310	19,402	29,347	42,396
Ile9	61,463	38,885	27,605/17,785	13,051	-
Lys10	56,008	33,227	25,104	25,100	41,553
Thr11	61,962	70,239	-	-	-

Fortsetzung von Tab. 8.17

Lys12	55,698	27,504	27,521	29,358	42,396
Gly13	45,473	-	-	-	-
Ile14	61,507	39,167	27,158/17,635	13,165	-
Tyr15	58,121	38,996	-	133,544	118,517
Glu16	55,847	29,498	34,188	-	-
Ser17	56,378	64,133	-	-	-
Glu18	58,632	29,184	-	-	-
Ala19	52,742	20,249	-	-	-
Val20	62,462	33,087	21,342	-	-
Val21	59,996	32,880	20,714	-	-
Pro22	63,550	32,374	24,814	51,379	-
Ser23	56,620	64,074	-	-	-

Tabelle 8.18.:  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **31** in Hz.

$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Gln1	7,1	Ile9	10,3	Ser17	8,9
Glu2	6,9	Lys10	8,1	Glu18	6,9
Arg3	7,0	Thr11	6,9	Ala19	8,8
Leu4	7,3	Lys12	7,3	Val20	10,5
Arg5	n.d.	Gly13	6,6	Val21	10,4
Leu6	7,4	Ile14	7,3	Pro22	-
Asn7	7,2	Tyr15	7,2	Ser23	10,3
Lys8	n.d.	Glu16	10,3		

### Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-His-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-His-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (**34**)

**Durchführung:** Der zurückgehaltene Teil des Harzes von Peptid **30** wurde in DMF gequollen, die Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 abgespalten und Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH nach AAV 2 gekuppelt. Nach negativem Kaisertest (AAV 1) wurde nach AAV 3 die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, wobei die photometrische Bestimmung der Harzbeladung einen Wert von ca. 2  $\mu$ mol ergab. Anschließend wurde nach AAV 4 acetyliert und nach AAV 6 vom Harz abgespalten.

**Ausbeute:** 2,6 mg, 0,8  $\mu\text{mol}$

**Retentionszeit:** 15,1 min bei 20 - 25 % B in 39 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 3273,7$ ; berechnet:  $m/z = 3276,5$

**Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (36)**

**Durchführung:** Es wurden 120,5 mg TentaGel R RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,17 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 19,92  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 20,48  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die ersten beiden Aminosäuren, die Aminosäuren Ile<sup>11</sup> - Ser<sup>8</sup>, sowie Ser<sup>2</sup> und Glu(PEG-biotinyl)<sup>1</sup> von Hand nach AAV 2 gekuppelt wurden. Bei letzterer wurden lediglich zwei Äquivalente statt der üblichen fünf eingesetzt (die Harzbeladung nach Kupplung von Ser<sup>2</sup> betrug 6,4  $\mu\text{mol}$  (32 % bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge)). Nach Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 und Acetylieren des N-Terminus nach AAV 4 wurde das Peptid nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** 2,8 mg, 0,9  $\mu\text{mol}$ , 4,5%

**Retentionszeit:** 19 min bei 20 - 40 % B in 30 min (Analytische Säule, 38 °C)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 3258,4$ ; berechnet:  $m/z = 3259,6$

**Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Leu-Asn-Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Gly-Ile-Tyr-Glu-Ser-Glu-Ala-Val-Val-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> (37)**

**Durchführung:** Es wurden 39,2 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 24,7  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 24,7  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die ersten drei Aminosäuren (bis Val<sup>22</sup>) sowie die letzten zehn Aminosäuren (Ile<sup>10</sup> bis Glu<sup>1</sup>) von Hand nach AAV 2 gekuppelt wurden. Bei der Anknüpfung der letzten Aminosäure (Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH) wurden lediglich zwei statt der normalerweise fünf Äquivalente eingesetzt. Die photometrische Bestimmung der Harzbeladung nach AAV 3 nach Kupplung von Glu<sup>2</sup> betrug 8,55  $\mu\text{mol}$  (35 % bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge).

**Ausbeute:** 4,7 mg, 1,37  $\mu\text{mol}$ , 5,5%

**Retentionszeit:** 15,4 min bei 20 - 40 % B in 40 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 3257,7$ ; berechnet:  $m/z = 3259,6$

**Darstellung von Ac-Cys-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-His-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-His-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (38)**

**Durchführung:** Es wurden 33,7 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 21,55  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 21,23  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde nach AAV 7 synthetisiert, wobei die erste und die letzten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 16,5 min bei 20 - 40 % B in 42 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2818,6$ ; berechnet:  $m/z = 2819,5$

**Darstellung von Ac-Cys-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Leu-Asn-Lys-Ile-His-Thr-Lys-Gly-Ile-Tyr-Glu-Ser-His-Ala-Val-Val-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> (39)**

**Durchführung:** Es wurden 34,0 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 21,42  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 20,15  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde nach AAV 7 synthetisiert, wobei die erste und die letzten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden. Der Ansatz wurde nach Kupplung von Gln1 geteilt, eine Hälfte des Harzes wurde für die Synthese von weiteren Funktionalitäten eingefroren.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 11,6 min bei 20 - 40 % B in 42 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2819,0$ ; berechnet:  $m/z = 2819,5$

<sup>1</sup>H: zgesgppr.hm (DG\_090602/1)

TOCSY: mlevesgpphpr.hm (DG\_090602/2)

NOESY: noesyegpph (DG\_090602/3)

**Darstellung von Ac-Cys-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (40)**

**Durchführung:** Es wurden 40,0 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 19,88  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 25,2  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde nach AAV 7 synthetisiert, wobei die erste und die letzten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden.

**Ausbeute:** 5,3 mg, 1,9  $\mu\text{mol}$ , 10%

**Retentionszeit:** 39 min bei 20 - 28 % B in 50 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2803,4$ ; berechnet:  $m/z = 2802,5$

**Darstellung von Ac-Cys-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Leu-Asn-Lys-Ile-Lys-Thr-Lys-Gly-Ile-Tyr-Glu-Ser-Glu-Ala-Val-Val-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> (41)**

**Durchführung:** Es wurden 37,4 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 20,08  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 23,56  $\mu\text{mol}$ ).

Das Peptid wurde nach AAV 7 synthetisiert, wobei die erste und die letzten beiden Aminosäuren nachh AAV 2 gekuppelt wurden.

**Ausbeute:** 4,2 mg, 1,5  $\mu\text{mol}$ , 7%

**Retentionszeit:** 29,9 min bei 5 - 35 % B in 40 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2801,3$ ; berechnet:  $m/z = 2802,5$

**Darstellung von Ac-Pro-Val-Val-Ala-Glu-Ser-His-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-His-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (42)**

**Durchführung:** Das Peptid wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von Peptid **30** erhalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 20,7 min bei 20 - 23 % B in 30 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2629,0$ ; berechnet:  $m/z = 2629,5$

**NMR-Spektren (pH = 3):**

<sup>1</sup>H: p3919gp (DG\_100608/6)

TOCSY: mlevesgpqh (DG\_100608/4)

COSY: cosydfesgpqh (DG\_100608/3)

NOESY: noesyegpqh (DG\_100608/5)

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgpsisp2.2 (DG\_100608/7)

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC: hmbcgpndqf (DG\_100608/8)

**NMR-Spektren (pH = 6,5):**

<sup>1</sup>H: zgesgppr.hm (DG\_100629/2)

TOCSY: mlevesgpqhpr.hm (DG\_100629/3)

**Tabelle 8.19.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung **42** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2	H $\zeta$ 1/2
Pro1	-	4,40	2,27	1,96	3,62	-	-
Val2	8,22	4,09	2,03	0,91	-	-	-

8. Experimenteller Teil

Fortsetzung von Tab. 8.19							
Val3	8,33	4,10	2,05	0,91	-	-	-
Ala4	8,39	4,29	1,37	-	-	-	-
Glu5	8,31	4,29	1,96	2,42	-	n.d.	-
Ser6	8,28	4,33	3,80	n.d.	-	-	-
His7	8,45	4,68	3,22/3,08	-	n.d.	n.d.	-
Tyr8	8,25	4,56	2,95	n.d.	7,08	6,79	-
Ile9	8,06	4,12	1,80	1,14/1,41	0,85	-	-
Gly10	7,99	3,90	-	-	-	-	-
Lys11	8,27	4,34	1,84	1,43	1,73	n.d.	n.d.
Thr12	8,09	4,28	4,13	1,17	-	-	-
His13	8,59	4,67	3,13/3,25	-	n.d.	n.d.	-
Ile14	8,18	4,11	1,82	1,14/1,43	0,88	-	-
Lys15	8,45	4,27	1,75	1,39	n.d.	2,97	7,54
Asn16	8,43	4,66	2,83/2,74	-	n.d.	-	-
Leu17	8,29	4,28	1,61	n.d.	0,89	-	-
Arg18	8,30	4,29	1,81	1,60	3,20	7,18	-
Leu19	8,05	4,31	1,61	n.d.	0,86	-	-
Arg20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Glu21	8,37	4,33	2,11/1,99	2,41	-	n.d.	-
Gln22	8,38	4,29	2,12/1,99	2,38	-	n.d.	-

**Tabelle 8.20.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **42** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\epsilon_{1/2}$
Pro1	62,9	32,8	n.d.	51,5	-
Val2	62,5	33,0	21,1	-	-
Val3	n.d.	33,0	25,0	-	-
Ala4	52,6	19,4	-	-	-
Glu5	n.d.	n.d.	33,6	n.d.	-
Ser6	n.d.	63,8	-	-	-
His7	n.d.	29,0	n.d.	120,5	n.d.
Tyr8	n.d.	39,0	n.d.	133,5	118,5
Ile9	n.d.	n.d.	27,5/19,4	13,0	-
Gly10	45,3	-	-	-	-

Fortsetzung von Tab. 8.20

Lys11	58,7	30,7	25,0	33,3	n.d.
Thr12	56,2	70,0	21,7	n.d.	-
His13	n.d.	28,9	n.d.	120,5	n.d.
Ile14	61,3	39,1	27,5/19,4	23,6	-
Lys15	62,1	n.d.	n.d.	n.d.	42,3
Asn16	n.d.	38,9	n.d.	-	-
Leu17	n.d.	42,6	27,2	17,5	-
Arg18	n.d.	30,8	28,0	43,6	-
Leu19	n.d.	42,6	27,2	n.d.	-
Arg20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Glu21	56,3	n.d.	n.d.	n.d.	-
Gln22	55,1	29,7	34,1	n.d.	-

**Tabelle 8.21.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **42** in Hz. Die Werte in Klammern sind ungewöhnlich hoch und daher nicht sehr vertrauenswürdig.

${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Pro1	-	Ile9	6,72	Leu17	n.d.
Val2	6,59	Gly10	(12,95)	Arg18	n.d.
Val3	5,56	Lys11	6,65	Leu19	(12,95)
Ala4	6,74	Thr12	6,59	Arg20	n.d.
Glu5	n.d.	His13	6,82	Glu21	6,56
Ser6	n.d.	Ile14	(12,71)	Gln22	n.d.
His7	6,50	Lys15	(12,91)		
Tyr8	7,08	Asn16	6,87		

### Darstellung von Ac-CVPC-NH<sub>2</sub> (**43**)

**Durchführung:** Es wurden 31,7 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 21,54  $\mu$ mol (berechnet: 19,97  $\mu$ mol).

Das Peptid wurde wie in AAV 7 beschrieben synthetisiert, jedoch erfolgten sämtliche Kupplungen in der Spritze mit eingesetzter PE-Fritte (AAV 2). Nach Abspalten der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 ergab sich eine Harzbeladung von 17,7  $\mu$ mol.

## 8. Experimenteller Teil

---

Nach Ausfällen in kaltem MTBE konnte kein Niederschlag beobachtet werden. Daher wurde die Lösung am Vakuum eingengt, der verbliebene Feststoff zweimal mit Wasser aufgeschlämmt und am Vakuum getrocknet. Anschließend wurde RP-HPLC-chromatographisch gereinigt.

**Ausbeute:** 3,4 mg, 7,4  $\mu\text{mol}$ , 37 %

**Retentionszeit:** 20,6 min bei 10 - 20 % B in 59 min (präparative Säule)

**ESI-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 462,1$ ; berechnet:  $m/z = 462,2$

**NMR-Spektren:**

$^1\text{H}$ : zgesgppr.hm (DG\_100630/2)

TOCSY: mlevesgpphpr.hm (DG\_100630/3)

COSY: cosydfesgpphpr.hm (DG\_100630/5)

NOESY: noesyedgpph (DG\_100630/4)

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: hsqcedetgpsisp2.2 (DG\_100630/6)

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC: hmbcgplpndprqf (DG\_100630/7)

**Tabelle 8.22.:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **43** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2
Cys1	8,48	4,48	2,95	-	-
Val2	8,89	4,48	2,11	0,96/1,00	-
Pro3	-	3,91	2,33	2,08/1,99	3,72
Cys4	8,37	4,50	2,89	-	-

**Tabelle 8.23.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **43** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$ 1/2	C $\delta$ 1/2
Cys1	59,8	28,1	-	-
Val2	n.d.	32,6	20,2/27,4	-
Pro3	63,2	32,1	27,4	51,1
Cys4	58,4	28,1	-	-

**Darstellung von Ac-Ser-Glu-Ser-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Tyr-Gln-Ser-Arg-Lys-His-Ala-Asn-Lys-Val-Arg-Arg-Tyr-Met-Ala-NH<sub>2</sub> (45)**

**Durchführung:** Es wurden 31,7 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 20,34  $\mu$ mol (berechnet: 19,97  $\mu$ mol).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die ersten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden. Nach beendeter Synthese wurde ein Viertel der Harzmenge in eine separate Spritze mit eingesetzter PE-Fritte gegeben um Peptid **47** zu synthetisieren. Beim restlichen Harz wurde nach AAV 3 die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, der N-Terminus nach AAV 4 acetyliert und das Peptid nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 18,3 min bei 10 - 25 % B in 25 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2830,0$ ; berechnet:  $m/z = 2829,5$

**NMR-Spektren:**

<sup>1</sup>H: p3919gp (DG\_080206/2)

TOCSY: mlevgp19 (DG\_080206/3)

COSY: cosydfgp19 (DG\_080206/4)

NOESY: noesygp19 (DG\_080206/5)

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgpsisp2.2pr.hm (DG\_080207/3)

**Tabelle 8.24.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung **45** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2	H $\zeta$ 1/2
Ser1	8,287	4,218	3,915/3,847	n.d.	-	-	-
Glu2	8,629	4,369	2,141/2,072	2,454	-	n.d.	-
Ser3	8,332	4,411	3,922/3,855	n.d.	-	-	-
Gln4	8,269	4,272	2,117/2,024	2,366	-	-	-
Lys5	8,163	4,219	1,830/1,786	1,472	1,677	n.d.	7,515
Leu6	8,009	4,304	1,626/1,561	n.d.	0,914/0,860	-	-
Ala7	8,053	4,196	1,297	-	-	-	-
His8	8,285	4,628	3,212/3,142	-	7,215	8,595	-
Tyr9	8,152	4,519	3,014	-	7,107	6,804	-
Gln10	8,280	4,294	2,042/1,945	2,327	-	-	-
Ser11	8,298	4,349	3,915/3,872	n.d.	-	-	-
Arg12	8,335	4,334	1,743/1,639	1,864	3,185	n.d.	7,159/7,148

## 8. Experimenteller Teil

Fortsetzung von Tab. 8.24							
Lys13	8,227	4,219	n.d.	1,402/1,345	1,682	2,972	7,518
His14	8,501	4,692	3,251/3,171	-	n.d.	n.d.	-
Ala15	8,389	4,326	1,375	-	-	-	-
Asn16	8,499	4,691	2,798/2,748	-	n.d.	-	-
Lys17	8,352	4,336	1,819/1,743	1,437/1,398	1,678	3,121	7,510
Val18	8,157	4,067	2,044	0,921/0,904	-	-	-
Arg19	8,411	4,304	1,735/1,602	1,537	3,180	n.d.	7,136/7,127
Arg20	8,313	4,288	1,713/1,549	1,494	3,155	n.d.	7,136/7,125
Tyr21	8,342	4,543	2,987	-	7,115	6,812	-
Met22	8,185	4,413	2,042/1,915	2,496/2,444	-	n.d.	-
Ala23	8,147	4,218	1,397	-	-	-	-

**Tabelle 8.25.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **45** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\varepsilon_{1/2}$
Ser1	57,228	63,885	-	-	-
Glu2	58,736	33,787	33,724	n.d.	-
Ser3	58,905	63,886	-	-	-
Gln4	56,885	29,064	n.d.	n.d.	-
Lys5	56,754	33,125	25,191	29,302	n.d.
Leu6	55,742	42,523	n.d.	25,165/23,540	-
Ala7	52,675	19,278	-	-	-
His8	55,535	23,013	n.d.	120,437	n.d.
Tyr9	58,597	38,997	n.d.	133,481	118,824
Gln10	56,064	30,005	34,000	n.d.	-
Ser11	56,872	63,886	-	-	-
Arg12	56,509	27,565	31,073	43,603	-
Lys13	56,988	33,372	24,880	29,328	42,387
His14	57,821	29,295	n.d.	120,598	n.d.
Ala15	52,606	19,641	-	-	-
Asn16	53,591	39,336	n.d.	-	-
Lys17	59,474	33,109	25,024	29,324	43,110
Val18	62,671	32,936	20,899/21,318	-	-
Arg19	56,252	31,059	27,310	43,644	-

Fortsetzung von Tab. 8.25

Arg20	56,621	31,411	27,310	43,608	-
Tyr21	58,221	38,997	n.d.	133,563	118,424
Met22	55,276	33,241	32,047	-	n.d.
Ala23	52,625	19,632	-	-	-

**Tabelle 8.26.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **45** in Hz.

$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Ser1	6,3	Tyr9	6,9	Lys17	6,5
Glu2	6,3	Gln10	7,8	Val18	6,8
Ser3	6,3	Ser11	5,8	Arg19	7,1
Gln4	7,0	Arg12	6,3	Arg20	6,7
Lys5	5,6	Lys13	6,4	Tyr21	7,3
Leu6	7,1	His14	7,1	Met22	7,7
Ala7	5,4	Ala15	6,2	Ala23	5,3
His8	7,7	Asn16	7,1		

### Darstellung von **Ac-Ala-Met-Tyr-Arg-Arg-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Arg-Ser-Gln-Tyr-His-Ala-Leu-Lys-Gln-Ser-Glu-Ser-NH<sub>2</sub>** (**46**)

**Durchführung:** Es wurden 32 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 23,81  $\mu$ mol (berechnet: 20,2  $\mu$ mol).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die erste Aminosäure nach AAV 2 gekuppelt wurde. Vor Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 wurden ca. 20 % des Harzes in eine separate Spritze mit eingesetzter PE-Fritte gegeben um Peptid **48** zu synthetisieren. Die photometrische Bestimmung der Harzbeladung ergab 14,38  $\mu$ mol. Nach Acetylieren des N-Terminus nach AAV 4 wurde das Peptid nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** 30,7 mg, 10,65  $\mu$ mol, 56% (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 40 min bei 5 - 20 % B in 50 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2830,9$ ; berechnet:  $m/z = 2829,5$

**Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Ser-Glu-Ser-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Tyr-Gln-Ser-Arg-Lys-His-Ala-Asn-Lys-Val-Arg-Arg-Tyr-Met-Ala-NH<sub>2</sub> (47)**

**Durchführung:** Das separierte Harz von Synthese 45 wurde in DMF gequollen und nach AAV 3 N-terminal Fmoc-entschützt. Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH wurde nach AAV 2 gekuppelt, wobei nur zwei statt der sonst üblichen fünf Äquivalente eingesetzt wurden. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt, der N-Terminus nach AAV 4 acetyliert und das Peptid nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 15,7 min bei 10 - 30 % B in 20 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 3389,7; berechnet: m/z = 3389,5

**Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Ala-Met-Tyr-Arg-Arg-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Arg-Ser-Gln-Tyr-His-Ala-Leu-Lys-Gln-Ser-Glu-Ser-NH<sub>2</sub> (48)**

**Durchführung:** Das abgetrennte Harz von Synthese 46 wurde zunächst in DMF gequollen. Dann wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 3 abgespalten (Harzbeladung 5,5 µmol). Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH wurde nach AAV 2 gekuppelt, wobei zwei statt der üblichen fünf Äquivalente eingesetzt wurden. Nach Acetylieren des N-Terminus nach AAV 4 wurde nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** 2,7 mg, 0,8 µmol, 17% (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 54,3 min bei 5 - 30 % B in 75 min (präparative Säule)

**ESI-MS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 3391,5 ; berechnet: m/z = 3389,5

**Darstellung von Ac-Cys-Ala-Met-Tyr-Arg-Arg-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Arg-Ser-Gln-Tyr-His-Ala-Leu-Lys-Gln-Ser-Glu-Ser-NH<sub>2</sub> (50)**

**Durchführung:** Es wurden 32 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 20,05 µmol (berechnet: 20,16 µmol).

Das Peptid wurde gemäß AAV 7 synthetisiert, wobei die letzten beiden Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt wurden.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 36 min bei 5 - 30 % B in 50 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:** [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 2932,9; berechnet: m/z = 2932,5

**NMR-Spektren:**

<sup>1</sup>H: zgesgppr.hm (DG\_090622/1)

TOCSY: mlevsgpphpr.hm (DG\_090622/2)

COSY: cosydfesgpphpr.hm (DG\_091118/2)

NOESY: noesyegpph (DG\_090622/3)

 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: hsqcedetgpsisp2.2 (DG\_091118/3)**Tabelle 8.27.:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **50** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2	H $\zeta$ 1/2
Cys1	8,33	4,51	3,33	-	-	-	-
Ala2	8,67	4,30	1,37	-	-	-	-
Met3	8,19	4,33	1,94	2,46	-	0,92	-
Tyr4	7,98	4,56	3,07/2,96	-	7,11	6,81	-
Arg5	8,04	4,24	1,78/1,71	1,54	3,17	7,17	-
Arg6	8,25	4,29	1,82/1,76	1,65/1,59	3,20	7,20	-
Val7	8,16	4,07	2,05	0,91	-	-	-
Lys8	8,45	4,25	1,74	1,43/1,37	1,67	2,98	7,53
Asn9	8,46	4,63	2,81/2,72	-	7,63/6,95	-	-
Ala10	8,31	4,23	1,31	-	-	-	-
His11	8,49	4,65	3,26/3,17	-	7,29	8,61	-
Lys12	8,34	4,29	1,82/1,73	1,41	1,67	2,98	7,53
Arg13	8,50	4,35	1,86/1,78	1,65	3,19	7,18	-
Ser14	8,44	4,42	3,84	-	-	-	-
Gln15	8,46	4,29	1,99/1,89	2,23	-	7,51	-
Tyr16	8,24	4,47	2,91	-	7,06	6,78	-
His17	8,24	4,56	3,17/3,04	-	7,22	8,58	-
Ala18	8,27	4,20	1,36	-	-	-	-
Leu19	8,30	4,31	1,62	1,56	0,92/0,85	-	-
Lys20	8,35	4,29	1,82/1,73	1,41	1,67	2,98	7,53
Gln21	8,49	4,33	2,10/1,99	2,36	-	7,55/6,88	-
Ser22	8,43	4,42	3,87	-	-	-	-
Glu23	8,48	4,44	2,16/1,99	2,46	-	-	-
Ser24	8,30	4,40	3,85	-	-	-	-

8. Experimenteller Teil

**Tabelle 8.28.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **50** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma_{1/2}$	$\text{C}\delta_{1/2}$	$\text{C}\epsilon_{1/2}$	$\text{C}\zeta_{1/2}$
Cys1	59,94	32,18	-	-	-	-
Ala2	53,38	22,48	-	-	-	-
Met3	56,41	32,87	32,33	-	25,04	-
Tyr4	53,26	38,65	-	133,33	118,33	157,54
Arg5	56,43	30,96	27,23	43,42	-	-
Arg6	56,42	30,88	27,59	43,55	-	-
Val7	62,52	33,11	20,91	-	-	-
Lys8	56,58	33,23	24,78	25,10	42,33	-
Asn9	53,46	38,99	177,36	-	-	-
Ala10	52,91	19,41	-	-	-	-
His11	59,18	28,93	131,37	119,92	136,61	-
Lys12	56,44	33,27	24,84	29,23	42,35	-
Arg13	58,77	31,08	29,26	43,52	-	-
Ser14	58,58	63,98	-	-	-	-
Gln15	69,70	29,69	33,88	-	-	-
Tyr16	58,34	39,05	-	133,28	118,29	157,49
His17	54,90	29,62	131,33	119,97	135,66	-
Ala18	52,76	19,33	-	-	-	-
Leu19	55,39	42,67	27,35	21,10	-	-
Lys20	56,42	33,27	24,80	29,32	42,36	-
Gln21	56,42	29,71	33,88	-	-	-
Ser22	60,29	64,06	-	-	-	-
Glu23	56,32	29,33	33,51	-	-	-
Ser24	63,09	63,96	-	-	-	-

**Tabelle 8.29.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **50** in Hz.

${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Cys1	6,4	Asn9	7,2	His17	8,1
Ala2	7,2	Ala10	6,3	Ala18	6,4
Met3	7,8	His11	7,1	Leu19	7,8
Tyr4	7,8	Lys12	n.d.	Lys20	n.d.
Arg5	8,2	Arg13	6,9	Gln21	7,7
Arg6	7,7	Ser14	7,0	Ser22	6,5
Val7	8,3	Gln15	8,6	Glu23	7,0
Lys8	8,0	Tyr16	7,9	Ser24	8,1

**Darstellung von Ac-Val-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (68)**

**Durchführung:** Das Peptid wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **36** erhalten.

**Ausbeute:** 1,9 mg, 0,8  $\mu$ mol

**Retentionszeit:** 11,0 min bei 20 - 40 % B' in 30 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2416,3$ ; berechnet:  $m/z = 2416,4$

**Darstellung von Ac-Ala-Glu-Ser-Glu-Tyr-Ile-Gly-Lys-Thr-Lys-Ile-Lys-Asn-Leu-Arg-Leu-Arg-Glu-Gln-NH<sub>2</sub> (69)**

**Durchführung:** Das Peptid wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **36** erhalten.

**Ausbeute:** 1,8 mg, 0,8  $\mu$ mol

**Retentionszeit:** 8,2 min bei 20 - 40 % B' in 30 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2317,7$ ; berechnet:  $m/z = 2317,3$

### 8.3.2. Rnt1p-Peptide

**Darstellung von**

**Ac-Ser-Leu-Asp-Met-Asn-Ala-Lys-Arg-Gln-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ile-Gly-NH<sub>2</sub> (51)**

**Durchführung:** Das Peptid wurde von Andrea Gerster im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit synthetisiert und charakterisiert.<sup>[179]</sup>

**Ausbeute:** 12,2 mg, 7,0  $\mu$ mol, 7%

**Retentionszeit:** 6,2 min bei 30 - 70 % B' in 20 min

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1751,1$ ; berechnet:  $m/z = 1751,0$

**NMR-Spektren:**

## 8. Experimenteller Teil

<sup>1</sup>H: p3919gp (ag060131/4)  
 TOCSY: mlevgp19 (ag060131/5)  
 COSY: cosydfgp19 (ag060131/8)  
 NOESY: noesygp19 (ag060131/6)  
<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgp (ag060206/3)

**Tabelle 8.30.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung **51** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2	H $\zeta$ 1/2
Ser1	8,278	4,440	3,853/3,833	n.d.	-	-	-
Leu2	8,354	4,353	1,632	1,623	0,922/0,869	-	-
Asp3	8,433	4,680	2,962/2,830	-	-	-	-
Met4	8,351	4,414	2,106/2,015	2,614/2,518	-	2,097	-
Asn5	8,328	4,645	2,848/2,778	-	7,600/6,939	-	-
Ala6	8,053	4,252	1,401	-	-	-	-
Lys7	8,161	4,257	1,834/1,764	1,469/1,398	1,679	2,994	7,524
Arg8	8,141	4,262	1,851/1,770	1,615	3,193	7,173	n.d.
Gln9	8,325	4,274	2,000/1,936	2,307	-	7,471/6,849	-
Leu10	8,184	4,258	1,524/1,436	1,551	0,884/0,814	-	-
Tyr11	8,079	4,586	3,093/2,947	-	7,124/7,109	6,823/6,808	-
Ser12	8,088	4,394	3,824/3,795	n.d.	-	-	-
Leu13	8,202	4,373	1,629	1,623	0,934/0,881	-	-
Ile14	8,041	4,157	1,787	1,477;1,191/0,907	0,858	-	-
Gly15	8,418	3,932/3,859	-	-	-	-	-

**Tabelle 8.31.:** <sup>13</sup>C-chemische Verschiebungen von Verbindung **51** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$ 1/2	C $\delta$ 1/2	C $\epsilon$ 1/2
Ser1	58,574	63,906	-	-	-
Leu2	55,580	42,375	27,092	24,934/23,600	-
Asp3	53,910	38,390	-	-	-
Met4	56,320	32,551	31,916	-	16,789
Asn5	53,910	38,517	-	-	-
Ala6	53,116	19,175	-	-	-
Lys7	56,289	32,805	24,990	29,175	42,198

Fortsetzung von Tab. 8.31

Arg8	56,289	30,880	27,180	43,448	-
Gln9	56,289	29,377	33,800	-	-
Leu10	56,289	42,550	27,000	24,850/23,588	-
Tyr11	57,940	38,810	-	133,598	118,492
Ser12	58,574	63,906	-	-	-
Leu13	55,580	42,375	27,092	24,934/23,600	-
Ile14	61,550	38,644	27,473/17,444	n.d.	-
Gly15	44,991	-	-	-	-

**Tabelle 8.32.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **51** in Hz.

${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		${}^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Ser1	6,6	Ala6	5,6	Tyr11	7,2
Leu2	6,6	Lys7	6,9	Ser12	7,2
Asp3	7,2	Arg8	6,6	Leu13	7,2
Met4	6,6	Gln9	6,6	Ile14	6,9
Asn5	7,2	Leu10	6,6	Gly15	7,2

**Darstellung von Ac-Gly-Ile-Leu-Ser-Tyr-Leu-Gln-Arg-Lys-Ala-Asn-Met-Asp-Leu-Ser-NH<sub>2</sub> (52)**

**Durchführung:** Es wurden 34,7 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 22,69  $\mu$ mol (berechnet: 21,86  $\mu$ mol). Die erste Aminosäure wurde nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer. Der Ansatz wurde in zwei Chargen aufgeteilt. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 12,46  $\mu$ mol. Nach Abspalten der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde nach AAV 4 acetyliert und nach AAV 6 von der festen Phase abgespalten.

**Ausbeute:** 10,5 mg, 6  $\mu$ mol, 40% (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 10,5 min bei 30 - 40 % B in 21 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 1749,9$ ; berechnet:  $m/z = 1749,9$

**NMR-Spektren:**

## 8. Experimenteller Teil

<sup>1</sup>H: p3919gp (DG-080514/2)  
 TOCSY: mlevgp19 (DG-080514/4)  
 NOESY: noesygp19 (DG-080514/3)  
<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC: hsqcedetgp (DG\_080515/2)

**Tabelle 8.33.:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Verbindung **52** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2
Gly1	8,261	3,932	-	-	-	-
Ile2	8,155	4,147	1,859	1,455;1,194/0,906	0,892	-
Leu3	8,305	4,348	1,633	1,487	0,911/0,851	-
Ser4	8,215	4,345	3,913/3,827	-	-	-
Tyr5	8,102	4,447	3,072	-	7,111	6,829
Leu6	7,896	4,131	1,620	1,500	0,896/0,862	-
Gln7	8,020	4,213	2,058	2,362	-	7,501/6,861
Arg8	8,122	4,237	1,830/1,774	1,663/1,603	3,183	n.d.
Lys9	8,192	4,223	1,816	1,658	1,721	2,979
Ala10	8,189	4,240	1,392	-	-	-
Asn11	8,273	4,628	2,850/2,778	-	7,588/6,899	-
Met12	8,213	4,431	2,119/2,008	2,516/2,605	-	n.d.
Asp13	8,415	4,682	2,929/2,789	-	-	-
Leu14	8,218	4,365	1,685	1,634	0,937/0,863	-
Ser15	8,178	4,385	3,882	-	-	-

**Tabelle 8.34.:** <sup>13</sup>C-chemische Verschiebungen von Verbindung **52** (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$ 1/2	C $\delta$ 1/2	C $\epsilon$ 1/2
Gly1	42,645	-	-	-	-
Ile2	58,934	35,992	24,787	14,752	-
Leu3	52,767	39,469	24,048	22,355/20,600	-
Ser4	56,264	61,050	-	-	-
Tyr5	56,326	35,437	-	130,491	115,613
Leu6	53,319	39,500	n.d.	10,227	-
Gln7	n.d.	26,541	31,312	-	-
Arg8	n.d.	28,019	24,879	40,772	-

Fortsetzung von Tab. 8.34

Lys9	50,994	30,297	26,449	30,235	39,459
Ala10	50,282	16,445	-	-	-
Asn11	50,803	36,022	-	-	-
Met12	53,135	30,020	29,250	-	-
Asp13	50,742	35,929	-	-	-
Leu14	52,767	n.d.	24,233	n.d.	-
Ser15	55,743	61,165	-	-	-

**Tabelle 8.35.:**  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **52** in Hz.

$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Gly1	5,4	Leu6	5,4	Asn11	6,8
Ile2	6,9	Gln7	6,3	Met12	7,1
Leu3	6,0	Arg8	6,1	Asp13	7,1
Ser4	n.d.	Lys9	n.d.	Leu14	n.d.
Tyr5	n.d.	Ala10	n.d.	Ser15	6,1

### Darstellung von **Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Ser-Leu-Asp-Met-Asn-Ala-Lys-Arg-Gln-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ile-Gly-NH<sub>2</sub> (53)**

Es wurden 36,8 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 24,77  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 23  $\mu\text{mol}$ ). Die erste Aminosäure wurde nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer.

Der Ansatz wurde in zwei Chargen aufgeteilt. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 10,6  $\mu\text{mol}$ . Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH wurde nach AAV 2 gekuppelt. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde nach AAV 3 abgespalten (Harzbeladung: 8,95  $\mu\text{mol}$ ). Anschließend wurde nach AAV 4 der N-Terminus acetyliert sowie das Peptid von der festen Phase abgespalten (AAV 6).

**Ausbeute:** 3,6 mg, 1,6  $\mu\text{mol}$ , 12% (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 15,5 min bei 25 - 35 % B in 21 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2307,6$ ; berechnet:  $m/z = 2309,9$

**Darstellung von Ac-Glu(PEG-biotinyl)-Gly-Ile-Leu-Ser-Tyr-Leu-Gln-Arg-Lys-Ala-Asn-Met-Asp-Leu-Ser-NH<sub>2</sub> (54)**

Es wurden 34,7 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 22,69  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 21,86  $\mu\text{mol}$ ). Die erste Aminosäure wurden nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer. Der Ansatz wurde in zwei Chargen aufgeteilt. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 5,5  $\mu\text{mol}$ . Fmoc-Glu(PEG-biotinyl)-OH wurde nach AAV 2 gekuppelt, wobei zwei anstatt der üblichen fünf Äquivalente eingesetzt wurden. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde nach AAV 3 abgespalten (Harzbeladung: 4,77  $\mu\text{mol}$ ). Anschließend wurde nach AAV 4 der N-Terminus acetyliert sowie das Peptid von der festen Phase abgespalten (AAV 6).

**Ausbeute:** 4,6 mg, 2,0  $\mu\text{mol}$ , 30% (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 31,5 min bei 20 - 40 % B in 42 min (analytische Säule)

**ESI-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 2309,3$ ; berechnet:  $m/z = 2309,9$

**Darstellung von MeO-PEG<sub>98-113</sub>-Ser-Leu-Asp-Met-Asn-Ala-Lys-Arg-Gln-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ile-Gly-NH<sub>2</sub> (57)**

Es wurden 36,8 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 24,77  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 23  $\mu\text{mol}$ ). Die erste Aminosäure wurden nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer. Der Ansatz wurde in zwei Chargen aufgeteilt. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 9,54  $\mu\text{mol}$ . Der PEG-Linker **56** wurde nach AAV 2 gekuppelt, wobei dreimal anstatt wie sonst zweimal mit frischer Kupplungslösung versetzt wurde. Anschließend wurde das Peptid von der festen Phase abgespalten (AAV 6).

**Ausbeute:** 7,4 mg,  $\sim 1,1$   $\mu\text{mol}$ ,  $\sim 10\%$  (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Harzmenge unter anteiliger Berücksichtigung der Aufteilung des Ansatzes)

**Retentionszeit:** 39,7 min bei 20 - 50 % B in 50 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 6180,8 - 6841,8$ ; berechnet:  $m/z = 6178,3 - 6838,3$

**NMR-Spektren:**

<sup>1</sup>H: zgesgppr.hm (DG\_090325/2)

TOCSY: mlevesgpphpr.hm (DG\_090325/3)

COSY: cosydfesgpph (DG\_090327/3)

NOESY: noesyegpph (DG\_090325/4)

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: hsqcedetgpsisp2.2 (DG\_090327/4)

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC: hsqcetf3gp (DG\_090327/7)

### Darstellung von 4,4'-bis(Iodacetamid)Azobenzol (60)<sup>[181]</sup>

**Durchführung:** 0,5 g (2,35 mmol) 4,4'-Diaminobenzol wurden in 100 ml trockenem THF gelöst und unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre mit 3 eq. (0,95 ml) Triethylamin versetzt. Über 50 min wurden tropfenweise 3 eq. (0,55 ml) Chloressigsäurechlorid zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene orangene Suspension wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde ein orange-roter Feststoff erhalten der ohne weitere Charakterisierung umgesetzt wurde.

20 mmol (3,14 g) NaI wurden in trockenem Aceton/THF (120 ml/40 ml) gelöst, zu dem orange-roten Feststoff gegeben, und unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre und Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, nach 18 h war kein Edukt mehr erkennbar. Der entstandene Feststoff (NaCl) wurde abfiltriert und die rote Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Zur Entfernung von überschüssigem NaI wurde der erhaltene orange Feststoff in 30 ml THF aufgenommen und der unlösliche Feststoff abfiltriert. Zu der erhaltenen THF-Lösung wurden ~30 ml eiskaltes Wasser zugegeben bis eine Trübung auftrat. Der über Nacht ausgefallene gelbe Feststoff wurde abzentrifugiert, danach wurde ein weiteres mal aus THF/Wasser umkristallisiert. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 30 mg, 55  $\mu\text{mol}$ , 5%

**NMR:**  $\delta^1\text{H}$  [ppm] (d6-DMSO, 400 MHz): trans-Form: 10,66 (s, 2H); 7,87 (d, 4H); 7,77 (d, 4H); 3,87 (s, 4H)

(Literatur<sup>[181]</sup>: 10,65 (s, 2H); 7,86 (d, 4H); 7,77 (d, 4H); 3,86 (s, 4H)

Zusätzlich wurde ein zweiter Signalsatz erhalten bei dem es sich vermutlich um die cis-Form handelt:

10,44 (s, 2H); 7,50 (d, 4H); 6,84 (d, 4H); 3,79 (s, 4H)

### Darstellung von Ac-Ser-Leu-Asp-Met-Asn-Cys-Arg-Lys-Gln-Leu-Tyr-Ser-Cys-Ile-Gly-NH<sub>2</sub> (61)

**Durchführung:** Es wurden 33,0 mg PS AM RAM-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,63 mmol/g in einer Spritze mit eingesetzter PE-Fritte eingewogen. Die photometrische Bestimmung nach AAV 3 ergab eine Harzbeladung von 20,35  $\mu\text{mol}$  (berechnet: 20,79  $\mu\text{mol}$ ). Die ersten beiden Aminosäuren wurden nach AAV 2 gekuppelt, der Rest nach AAV 5 am Peptidsynthesizer. Der automatisierten SPPS folgte eine manuelle Abspaltung der N-

## 8. Experimenteller Teil

terminalen Fmoc-Schutzgruppe wie in AAV 2 beschrieben. Anschließend wurde nach AAV 4 der N-Terminus acetyliert sowie das Peptid von der festen Phase abgespalten (AAV 6).

**Ausbeute:** 14,8 mg, 8,4  $\mu\text{mol}$ , 41%

**Retentionszeit:** 40,5 min bei 18 - 25 % B in 49 min (präparative Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 1771,8$ ; berechnet:  $m/z = 1771,7$

**NMR-Spektren:**

$^1\text{H}$ : p3919gp (DG\_080912/2)

TOCSY: mlevgpph19 (DG\_080912/3)

COSY: cosydfgpph19 (DG\_080912/4)

NOESY: noesygpph19 (DG\_080912/5)

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: hsqcedetgpsisp2.2pr.hm (DG\_080919\_2/3)

**Tabelle 8.36.:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **61** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	NH	H $\alpha$ 1/2	H $\beta$ 1/2	H $\gamma$ 1/2	H $\delta$ 1/2	H $\epsilon$ 1/2
Ser1	8,287	4,408	3,848	-	-	-
Leu2	8,377	4,351	1,599	1,628	0,922/0,869	-
Asp3	8,407	4,665	2,907/2,791	-	-	-
Met4	8,337	4,431	2,177/2,019	2,612/2,517	-	2,088
Asn5	8,428	4,690	2,859/2,806	-	7,633/6,945	-
Cys6	8,148	4,473	2,945	-	-	-
Lys7	8,340	4,301	1,848/1,779	1,469/1,405	1,677	2,994
Arg8	8,208	4,279	1,280/1,759	1,630	3,182	7,185
Gln9	8,382	4,281	2,000/1,934	2,300	-	7,483/6,858
Leu10	8,233	4,237	1,526/1,421	1,502	0,883/0,813	-
Tyr11	8,135	4,615	3,093/2,939	-	7,118	6,820
Ser12	8,149	4,430	3,814	-	-	-
Cys13	8,363	4,550	2,945	-	-	-
Ile14	8,239	4,171	1,886	1,484;1,203/0,926	0,868	-
Gly15	8,490	3,936/3,892	-	-	-	-

**Tabelle 8.37.:**  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Verbindung **61** (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (95:5); pH = 3; T = 300 K. Als Referenz diente TSP (0,0 ppm)).

	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$ 1/2	C $\delta$ 1/2	C $\epsilon$ 1/2
Ser1	58,330	63,761	-	-	-

Fortsetzung von Tab. 8.37

Leu2	55,253	42,102	n.d.	24,729/23,335	-
Asp3	53,205	38,633	-	-	-
Met4	55,799	32,312	31,824	-	16,033
Asn5	53,430	38,514	-	-	-
Cys6	58,546	27,787	-	-	-
Lys7	56,290	32,625	24,843	28,974	42,101
Arg8	55,998	30,695	26,948	43,282	-
Gln9	55,458	29,287	33,618	-	-
Leu10	55,641	42,323	n.d.	24,586/23,325	-
Tyr11	57,480	38,674	-	133,063	118,014
Ser12	58,012	63,664	-	-	-
Cys13	58,164	27,726	-	-	-
Ile14	61,418	38,466	27,106/17,211	12,667	-
Gly15	42,041	-	-	-	-

Tabelle 8.38.:  $H^N$ - $H^\alpha$ -Kopplungskonstanten von Verbindung **61** in Hz.

$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]		$^3J(H^N-H^\alpha)$ [Hz]	
Ser1	6,5	Cys6	7,6	Tyr11	7,1
Leu2	7,0	Lys7	7,1	Ser12	7,3
Asp3	7,9	Arg8	7,0	Cys13	7,0
Met4	6,7	Gln9	7,2	Ile14	6,7
Asn5	8,0	Leu10	7,4	Gly15	6,5

### Darstellung von Ac-Ser-Leu-Asp-Met-Asn-Cys(cycloPL)-Arg-Lys-Gln-Leu-Tyr-Ser-Cys(cycloPL)-Ile-Gly-NH<sub>2</sub> (**62**)

**Durchführung:** 2,5 mg (1,41  $\mu$ mol) **61** wurden in 1,25 ml TrisCl-Puffer (15,5 M, pH = 8) gelöst und mit 1 eq TCEP zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Unter Rühren wurden 1,4 eq **60** in 1,75 ml DMSO zugegeben. Nach 10, bzw. 20 min wurden jeweils weitere 1,4 eq **60** in 0,2 ml DMSO zugegeben. Nach 15 min Rühren im Dunkeln wurde weitere 15 min bei Umgebungslicht gerührt.

Durch Zugabe von ~10 ml Wasser wurde der überschüssige Linker ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Lösung lyophilisiert. Die erhaltenen 2 mg gelben Feststoffes wurden mittels HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** Spuren

**Retentionszeit:** 28,7 min bei 20 - 45 % B in 50 min

**MALDI-TOF-MS:**  $[M+H]^+$ :  $m/z = 2063,7$ ; berechnet:  $m/z = 2064,4$

**Anmerkung:** Eine Versuchsreihe zur Optimierung der Reaktionsbedingungen (in reinem DMSO, Peptid 5-fach verdünnt, Peptid 2-fach konzentriert) brachte keine Verbesserung der Ausbeute.

## 8.4. Verwendete Oligonukleotide

Bis auf die beiden selbst transkribierten RNA-Konstrukte **55** und **10** wurden sämtliche Oligonukleotide bei der Firma Metabion, Martinsried, bestellt. In Tab. 8.39 sind die Sequenzen sämtlicher verwendeter Oligonukleotide aufgelistet. Die Transkriptionsbedingungen der beiden selbst hergestellten RNAs sind in 8.4.1 beschrieben.

**Tabelle 8.39.:** Verwendete Oligonukleotidsequenzen.

Oligo	Sequenz
<b>2</b>	5'-GGA AAA UAA CUU CGG UUA UUU UCC-3'
<b>3</b>	5'-GGA AAA UAA CUU-3'
<b>4</b>	5'-GGA AAA TAA CTT CGG TTA TTT TCC-3'
<b>5</b>	5'-GGA AAA TAA CTT-3'
<b>6</b>	5'-CGT CGA CCG CGT-3'
<b>7</b>	5'-CGT CGA CGT CAT-3'
<b>8</b>	5'-CAT AGA CTA GTA-3'
<b>9</b>	Mischung aus <i>S. cerevisiae</i> tRNA
<b>10</b>	5'-GGG CUC GUA UGG CGC AGU GGU AGC GCA GCA GAU UGC AAA UCU GUU GGU CCU UAG UUC GAU CCU GAG UGC GAG CU-3'
<b>11</b>	5'-GCT CGT ATG GCG CAG TGG TAG CGC AGC AGA TTG CAA ATC TGT TGG TCC TTA GTT CGA TCC TGA GTG CGA GCT-3'
<b>12</b>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC CCT GAA GTA CAG CTC CAC CAG CGT TTT TCG GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG GTC A-3'
<b>13</b>	5'-GGA CCC TGA AGT ACA GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GAA CTT CAG GGT CA-3'
<b>14</b>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'

Fortsetzung von Tab. 8.39

15	5'-GGA CCC TGA AGT TCA TCT GCA CCA CCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GAA CTT CAG GGT CA-3'
16	5'-GGA CCC TGA AGT ACA GCT CCA CCA GCG TTC GCG GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG GTC A-3'
17	5'-GCC TGA AGT ACA GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GAA CTT CAG GA-3'
18	5'-GGA AGT ACA GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GAA CTT CA-3'
19	5'-GGT ACA GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GAA CA-3'
20	5'-GCA GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GAT GA-3'
21	5'-GCT CCA CCA GCG TTT TTC GGT GGT GCA GA-3'
22	5'-GGG UGG GUU CCU GGA ACU AUU GUU UUU UCA GGG UGG GUG UAA AAG CAA UUG UUC CAG GAA CCA G-3'
23	5'-GGG UUC CUG GAA CUA UUG UUU UUU CAU UUU UGU AAA AGC AAU UGU UCC AGG AAC CAG-3'
24	5'-Biotin-GGA AAA UAA CUU CGG UUA UUU UCC-3'
44	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TAC CAT GTT CAG AAG AAC GTG GTG TCT C-3'
55	5'-GGG AUA CCA UGU UCA GAA GAA CGU GGU GUC UC-3'
70	5'-TGT CTT CGC CTT CTT ACG CAC TTT CCT TTG GAC TTC TTC CTT TCT TTC CCT CGA CTA AGC ACC C-3'

### 8.4.1. RNA-Transkription

#### Transkription von 55 (5'-GGA AUA CCA UGU UCA GAA GAA CGU GGU AUC UC-3')

Herstellung und Amplifizierung des entsprechenden dsDNA-Templates durch PCR wurde mit den „Peqlab Taq“-Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Die dabei eingesetzten Substanzen incl. Menge und Endkonzentration sind Tab. 8.40 zu entnehmen.

Der 10x Taq-Puffer Y besteht aus 200 mM Tris·HCl pH = 8,55, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % Tween 20, 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Als Templat bzw. Primer wurden verwendet:

Templat: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TAC CAT GTT CAG AAG AAC GTG GTA TCT C-3'

## 8. Experimenteller Teil

**Tabelle 8.40.:** Menge der bei der PCR eingesetzte Substanzen und deren Endkonzentration, sowohl für die Testreihe zur Bestimmung der optimalen *annealing* Temperatur als auch für die präparative PCR.

	µl (T-Reihe)	µl präp. PCR	Endkonzentration [µM]
10x Taq-Puffer Y	40	10	1-fach
25mM dNTPs	3,2	0,8	
100 µM Primer A	4	1	1
100 µM Primer B	4	1	1
200 nM Templat	4	1	0,2
ddH <sub>2</sub> O	340	85	
Taq DNA Polymerase	4	1	
Gesamtvolumen	400	100	

**Tabelle 8.41.:** Einzelne Schritte bei der PCR. Nach der initiativen Denaturierung werden die Schritte 2-4 25 mal wiederholt. Danach wird auf 0 °C abgekühlt.

Schritt Nr.	Prozedur	T [°C]	Dauer
1	Denaturierung zu Beginn	94 °C	2 min.
2	Denaturierung	94 °C	50 sek.
3	<i>Annealing</i>	56 °C	60 sek.
4	Elongation	72 °C	50 sek.
5		0 °C	

Primer A: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'

Primer B: 5'-GAG ATA CCA CGT TCT TCT G-3'

Zur Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur wurde zunächst eine PCR bei verschiedenen Temperaturen (52 °C - 72 °C) durchgeführt. Im Agarose-Gel (2,5% in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borat, 20 mM EDTA)) sind Produktbanden bei 54 °C und 58 °C zu sehen. Daher wurde die folgende präparative PCR bei 56 °C durchgeführt.

Für die präparative PCR wurden die in Tab. 8.40 aufgeführten Bestandteile (außer der Polymerase) in 8 PCR-tubes zusammengegeben und auf 94 °C erwärmt. Dann wurde die Taq DNA Polymerase zugegeben und die Zyklen 2-4 in Tab. 8.41 25 mal durchgeführt. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit 10 Vol. % Natriumacetat (3 M, pH = 5,4) versetzt. Nach Zugabe der doppelten Menge Ethanol wurde das PCR-Produkt bei -80 °C ausgefällt, zentrifugiert, abdekantiert und in 80 µl Wasser resuspendiert.

Zur Transkription der RNA wurden die in Tab. 8.42 aufgeführten Bestandteile in Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl DNaseI wurde weitere 20 min bei 37 °C inkubiert und wie oben beschrieben aus EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und mittels präparativer Polyacrylamid Gel-

**Tabelle 8.42.:** Menge der eingesetzten Substanzen für die RNA-Transkription.

	Menge [ $\mu$ l]
PCR-Produkt	40
5x Transkriptionspuffer	40
25 mM NTPs	20
ddH <sub>2</sub> O	97
T7 RNA Polymerase	3

elektrophorese (PAGE) aufgereinigt. Die erhaltene intensive Bande wurde ausgeschnitten, zerkleinert und in 500  $\mu$ l Wasser über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Nach Filtration durch Glaswolle wurde erneut aus Ethanol ausgefällt und in 20  $\mu$ l Wasser resuspendiert. Eine UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmung ergab eine Konzentration von 19,2  $\mu$ M, was einer Gesamtmenge RNA **55** von 0,365 nmol entspricht.

**Transkription von 10 (5'-GCU CGU AUG GCG CAG UGG UAG CGC AGC AGA UUG CAA AUC UGU UGG UCC UUA GUU CGA UCC UGA GUG CGA GCU-3')**

Die Transkription der tRNA<sup>Cys</sup> wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Templat, bzw. Primer wurden verwendet:

Templat: 5'-TCG TAT GGC GCA GTG GTA GCG CAG CAG ATT GCA AAT CTG TTG GTC CTT AG-3'

Primer A: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG TAT GGC GCA GTG GTA GC-3'

Primer B: 5'-AGC TCG CAC TCA GGA TCG AAC TAA GGA CCA ACA GAT TTG CAA TCT GC-3'

Für die PCR wurden die in Tab. 8.40 aufgeführten Bestandteile (außer der Polymerase) in 8 PCR-tubes zusammengegeben und auf 94 °C erwärmt. Dann wurde die Taq DNA Polymerase zugegeben und die Zyklen 2-4 in Tab. 8.41 25 mal durchgeführt. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit 10 Vol. % Natriumacetat (3M, pH = 5,4) versetzt. Nach Zugabe der doppelten Menge Ethanol wurde das PCR-Produkt bei -80 °C ausgefällt, zentrifugiert, abdekantiert und in 120  $\mu$ l Wasser resuspendiert.

Zur Transkription der RNA wurden die in Tab. 8.42 aufgeführten Bestandteile in Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l DNaseI wurde weitere 20 min bei 37 °C inkubiert und wie oben beschrieben aus EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 50  $\mu$ l Wasser resuspendiert und mittels präparativer PAGE aufgereinigt.

Die erhaltene intensive Bande wurde ausgeschnitten, zerkleinert und in 500  $\mu\text{l}$  Wasser über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Nach Filtration durch Glaswolle wurde erneut aus Ethanol ausgefällt und in 30  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert. Eine UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmung ergab eine Konzentration von 84,4  $\mu\text{M}$ , was einer Gesamtmenge RNA **10** von 2,5 nmol RNA entspricht.

## 8.5. Proteinexpression

### 8.5.1. Puffer und Medien

#### DYT Agarplatten

Zur Herstellung der Agarplatten wurden zunächst 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 16 g Agar eingewogen, in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 10 ml 20 %ige, steril filtrierte Glukoselösung und entsprechend Antibiotika zugegeben. Die Platten wurden gegossen und bei 4 °C aufbewahrt.

#### DYT-Medium

16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl und 2,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen wurden 10 ml 20 %ige, steril filtrierte Glukoselösung und entsprechend Antibiotika zugegeben.

#### LB-Medium

10 g Trypton, 10 g NaCl und 5 g Hefeextrakt wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

#### SOC-Medium

20 g Trypton und 5 g Hefeextrakt wurden in einem Liter Wasser gelöst. Die weiteren Salze wurden aus entsprechenden Stammlösungen zu der in Klammern stehenden Endkonzentration dazugegeben: NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM) und  $\text{MgSO}_4$  (10 mM). Nach autoklavieren wurde steril filtrierte Glukose dazugegeben (20 mM).

#### M9-Medium

17,12 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g NaCl und 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert. Danach wurden 4 g Glukose (gelöst in  $\sim 20$  ml  $\text{H}_2\text{O}$ , steril filtriert), 100 mg Celtone und 10 ml 100x BME Vitamine hinzugegeben. Die weiteren Salze

wurden aus entsprechenden Stammlösungen zu der in Klammern stehenden Endkonzentration dazugegeben:  $\text{MgSO}_4$  (1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3 mM) und  $\text{ZnSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ), sowie entsprechende Antibiotika.

#### **Transformationspuffer pH = 6,7**

Der Transformationspuffer bestand aus 10 mM Pipes, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl und 55 mM  $\text{MnCl}_2$ .

#### **Lysepuffer pH = 6,1**

Der Lysepuffer bestand aus 20 mM MES, 10 mM DTT, 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , einer Spatelspitze  $\text{MgSO}_4$  und DNase sowie einer Protease-Inhibitor-Tablette.

### **8.5.2. Transformation und Expression**

Sowohl die Anzucht der Bakterien als auch die IPTG-induzierte Überexpression des Proteins wurden in den S1-Laboratorien der Arbeitsgruppe Stürmer, Fachbereich Biologie durchgeführt.

#### **Lösen des Plasmids**

Das Plasmid (für *E. coli* Expression von *Xenopus laevis* ZFa 1-128 mit optimierten Codons 77 und 78) wurde von Prof. Peter E. Wright, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA zur Verfügung gestellt. Zum Versenden wurden 10  $\mu\text{l}$  einer 100 ng/ $\mu\text{l}$  Lösung in wässrigem Puffer auf ein Filterpapier gegeben, markiert und Trocknen gelassen. Zum Herauslösen wurde der markierte Teil des Filterpapiers ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (10 mM, pH = 7,5) wurde 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend 2 min zentrifugiert. Die Plasmidhaltige Pufferlösung wurde in 5 Aliquote aufgeteilt. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Aliquote bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### **Transformation**

*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta Zellen wurden nach folgendem Schema kompetent gemacht und mit dem oben beschriebenen Plasmid transformiert<sup>[207,208]</sup>:

1. Die Zellen wurden auf einer DYT-Agar-Platte mit Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  wachsen gelassen.

## 8. Experimenteller Teil

---

2. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in jeweils 5 ml DYT-Medium mit Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
3. In einem 100 ml Anzuchtkolben wurden 10 ml SOC-Medium mit 200 µl der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C geschüttelt bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,7 erreicht hatten.
4. Der Kolben wurde 10 min auf Eis geschüttelt.
5. Die Lösung wurde 10 min bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert.
6. Das Zellpellet wurde in 5 ml Transformationspuffer resuspendiert. Der Überstand wurde verworfen.
7. Die Suspension wurde 10 min bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert.
8. Das Zellpellet wurde erneut in 1,5 ml Transformationspuffer resuspendiert. Der Überstand wurde verworfen.
9. Es wurden 10 µl Plasmidlösung hinzugegeben und für 40 min bei 4 °C inkubiert.
10. Die Suspension wurde 40 s auf 42 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert.
11. Nach Zugabe von 1,5 ml DYT-Medium mit Chloramphenicol wurde 70 min bei 37 °C geschüttelt.
12. Die transformierten Zellen wurden auf DYT-Agar-Platten mit Chloramphenicol und Carbenicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.
13. Zur Herstellung von Cryo-Kulturen wurden einzelne Kolonien in je 1 ml Medium (DYT bzw. LB) inokuliert, bis zu einer OD<sub>600</sub> ≥ 0,6 wachsen gelassen, mit 8% DMSO versetzt und auf -80 °C schockgefroren.

### Expression

Das generelle Vorgehen bei den Testexpressionen war:

1. Die transformierten Zellen aus 8.5.2 wurden auf DYT-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C anwachsen gelassen.
2. 1-2 ml des jeweiligen Antibiotika enthaltenden Mediums wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Es wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
3. Die Vorkulturen wurden 15 min bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert, abdenkantiert und in 1 ml Medium aufgeschlämmt.

4. 50 ml des jeweiligen Antibiotika enthaltenden Mediums wurden mit 100 µl Vorkultur inokuliert. Anschließend wurde bei 37 °C solange geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,9 erhalten wurde.
5. Zur Induktion der Überexpression des gewünschten Proteins wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugegeben. Die Kulturen wurden bei 37 °C geschüttelt bis der OD<sub>600</sub>-Wert nicht mehr zunahm.
6. Zur gelelektrophoretischen Untersuchung wurden 20 µl der Zellsuspension in einem Eppendorf-Gefäß mit 10 µl *loading buffer* gegeben, 10 min auf 99 °C erhitzt und 1 min geschüttelt.

Die präparative Expression wurde nach dem unten stehenden Schema durchgeführt, wobei die Punkte 1-4 analog denen der Testexpressionen war. Als Medium diente <sup>15</sup>N markiertes M9-Medium mit <sup>15</sup>N markiertem Celstone.

Als Antibiotikum wurde sowohl bei den DYT-Agarplatten, als auch im Wachstumsmedium Ampicillin (100 mg/l) verwendet.

1. Die transformierten Zellen aus 8.5.2 wurden auf DYT-Agarplatten mit Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C anwachsen gelassen.
2. 1-2 ml des jeweiligen Selektionsmarker enthaltenden Mediums wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Es wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
3. Die Vorkulturen wurden 15 min bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert, abdekantiert und in 1 ml Medium aufgeschlämmt.
4. 50 ml des jeweiligen Selektionsmarker enthaltenden Mediums wurden mit 100 µl Vorkultur inokuliert. Anschließend wurde bei 37 °C solange geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,9 erhalten wurde.
5. Es wurde erneut 15 min bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert, abdekantiert und resuspendiert. Mit der erhaltenen Suspension wurden je 500 ml M9-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker inokuliert.
6. Bei 37 °C wurde geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 erhalten wurde.
7. Zur Induktion der Überexpression des gewünschten Proteins wurden je 500 µl 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration 1 mM) zugegeben. Die Kulturen wurden bei 37 °C geschüttelt bis der OD<sub>600</sub>-Wert nicht mehr zunahm (etwa 5 h).

8. Zum Ernten der Zellen wurden diese in 2 Zentrifugenbecher überführt und 30 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Zellpellet mit je 30 ml Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen weggefroren.

### 8.5.3. Plasmidpräparation

Zur Sequenzierung des transformierten Plasmids wurde eine DYT-Agarplatte mit Ampicillin mit Zellen der Cryokultur bestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurden einzelne Kolonien gepickt und in 1 ml LB-Medium (mit Ampicillin) bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Die Zellsuspension wurde 15 min bei 4 °C und 5400 rpm zentrifugiert. Mit dem verbleibenden Pellet wurde mit Hilfe des Quiagen Miniprep-Kits gemäß der beiliegenden Vorschrift<sup>[164]</sup> das Plasmid amplifiziert. Es wurden 50 µl einer 250 µg/ml enthaltenden Lösung erhalten. Diese wurde 1:2 verdünnt und von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert.

### 8.5.4. Reinigung

Je ca. 1 g der eingefrorenen Zellpellets wurden aufgetaut und in ca. 60 ml Lysepuffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde drei mal Hilfe einer *French-Press* aufgeschlossen, anschließend wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifuge 1 h bei 38.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und der folgenden Reinigungsprozedur unterzogen.

### Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie wurden folgende beiden Säulentypen verwendet:

Anionentauscher: HiTrap Q FF, GE Healthcare

Kationentauscher: Hi Trap SP FF, GE Healthcare

Als Puffer wurden verwendet:

Puffer A: 20 mM MES pH 6,1, 2 mM DTT, 50 µM ZnSO<sub>4</sub>

Puffer B: 20 mM MES pH 6,1, 0,6 M NaCl

Zur Ionenaustauschchromatographie wurden zunächst eine Anionentauscher- und zwei Kationentauschersäulen hintereinandergeschaltet und mit Puffer A äquilibriert. Nun wurde der filtrierte Überstand über die Systempumpe direkt auf die Säule aufgetragen. Danach wurde mit Puffer A gewaschen, bis die Basislinie wieder ihren Ausgangswert erreicht hatte (ca. 3 Säulenvolumen). Die Anionentauschersäule wurde entfernt und das Protein mit einem Gradienten auf 100 % Puffer B (1 % / min) eluiert.

Die Fraktionen der beiden Hauptpeaks wurden vereint und mit Hilfe von Centripreps auf ca. 0,6 ml eingengt.

### Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 75 Säule (Säulenvolumen 120 ml) bei 4 °C durchgeführt.

Als Puffer wurde verwendet:

Puffer A: 20 mM Tris pH 6,8, 2 mM DTT, 100 mM NaCl, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>

Die Säule wurde zunächst mit 1,5 Säulenvolumen Wasser, dann mit 2,5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Danach wurden die nach der Ionenaustauschchromatographie aufkonzentrierten Fraktionen injiziert und bei einem Fluß von 1 ml/min aufgetrennt. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 5 ml je Fraktion.

### NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden in folgendem gepufferten System aufgenommen: 20 mM Tris, 20 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, 4 mM NaN<sub>3</sub>, 5 % D<sub>2</sub>O, pH = 6,8. Die Temperatur wurde mit 4% MeOH in MeOD bestimmt und betrug 293 K (an der Temperiereinheit eingestellt: 298 K).

<sup>1</sup>H: zgesgp (DG\_100201/2)

<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC: hsqcetf3gp (DG\_100201/3 und 4)

## 8.6. NMR-Experimente

### 8.6.1. Probenvorbereitung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die lyophilisierten Peptide in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 95:5 gelöst. Dann wurden TSP (Endkonzentration 100  $\mu$ M) und Natriumazid (Endkonzentration 4 mM) zugegeben und der gewünschte pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

### 8.6.2. Spektrometer

Sämtliche 1- und 2D-NMR-Spektren wurden an folgenden Spektrometern aufgenommen:

- Bruker Avance DRX 600 Spektrometer mit 5 mm TXI-H/C/N inversem Tripelresonanz-Probenkopf mit abgeschirmten Z-Gradienten

- Bruker Avance III 600 Spektrometer mit Kryoplattform, 5 mm TCI-H/C/N inversem Tripelresonanz-Kryoprobenkopf mit abgeschirmten Z-Gradienten
- Bruker Avance III 400 Spektrometer mit 5 mm BBFOplus-Breitband-Probenkopf mit abgeschirmten Z-Gradienten

Zur Prozessierung und Auswertung der Spektren wurde folgende Software verwendet:

- MestRe-C, bzw. MestReNova (Mestrelab Research)
- XWINNMR 3.6 (Bruker)
- Topspin 2.1 (Bruker)
- CARA<sup>[209]</sup>

### 8.6.3. Spektren

Bei den synthetisierten Verbindungen sind die Pulsprogramme der aufgenommen Verbindungen angegeben, der Speicherort ist in Klammern dahinter vermerkt. Sämtliche Pulsprogramme sind im Anhang B aufgelistet. Die jeweils verwendete Technik zur Unterdrückung des Wassersignals ist diesen zu entnehmen.

Eindimensionale Spektren wurden in der Regel mit 32k Datenpunkten aufgenommen. Bei 2D-Spektren wurden normalerweise 4k Datenpunkte in der direkten und 512 Datenpunkte in der indirekten Dimension aufgenommen. Die Anzahl der Scans wurde je nach Probenkonzentration individuell angepasst.

Bei der Prozessierung wurde einfaches oder zweifaches *zerofilling* verwendet. Als *window function* diente eine  $\sin^2$ - oder eine Exponentialfunktion. Die Basislinienkorrektur erfolgte automatisch mit einem Polynom fünften Grades.

### 8.6.4. Secondary chemical shifts

Zur Auftragung der chemischen Verschiebungen im Vergleich mit den tabellierten *random-coil*-Werten wurden Balkendiagramme erstellt, die die Abweichung der chemischen Verschiebung von den für *random-coil*-Strukturen typischen Werten zeigen. Dazu wurden die von Schwarzinger *et al.* veröffentlichten Werte<sup>[151]</sup> mit den sequenzabhängigen Korrekturwerten<sup>[152]</sup> verwendet.

Zur Berechnung der *random-coil*-Verschiebungen unter Berücksichtigung der sequenzabhängigen Korrekturfaktoren wurde im Rahmen des Mitarbeiterpraktikums von Moritz

Baier das Programm *Random Coil NMR Shift Calculator*<sup>[210]</sup> entwickelt. Neben den korrigierten *random-coil*-Verschiebungen können damit auch Werte für  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausgegeben werden. Die tabellierten Datensätze sind dabei beliebig erweiterbar. Zum Einfügen der jeweiligen Sequenz und der experimentell bestimmten chemischen Verschiebungen können direkt die CARA Sequenzdateien (\*.seq) und die CARA *atomlists* (\*.prot) ausgelesen werden.

### 8.6.5. NMR-Titrationen

#### Titration von **25** mit den Oligonukleotiden **2**, **3**, **4** und **5**

Zur Titration des zyklischen Peptids **25** mit den vier Oligonukleotidmotiven wurde zunächst je eine ca. 100  $\mu$ M Probe des Peptides in Acetatpuffer pH = 4,5 (10 mM Essigsäure (d4), 20 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 95:5) vorgelegt. Eine 2 mM wässrige Lösung der Oligonukleotide wurde zunächst 5 min auf 80 °C erhitzt und dann im Eisbad auf 0 °C abgekühlt.

Die einzelnen Titrationsschritte sind in Tab. 8.43 - Tab. 8.46 gezeigt.

**Tabelle 8.43.:** Titration von Peptid **25** (c = 0,1 mM in Acetatpuffer pH = 4,5) mit der doppelsträngigen RNA **2**

Substanz	Zugabe [ $\mu$ l]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
2 mM <b>2</b>	2	0,02	20 %
2 mM <b>2</b>	4	0,06	60 %
2 mM <b>2</b>	4	0,1	100 %
2 mM <b>2</b>	10	0,2	200 %
2 mM <b>2</b>	13	0,33	330 %

**Tabelle 8.44.:** Titration von Peptid **25** (c = 0,1 mM in Acetatpuffer pH = 4,5) mit der einzelsträngigen RNA **3**.

Substanz	Zugabe [ $\mu$ l]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
2 mM <b>3</b>	2	0,02	20 %
2 mM <b>3</b>	4	0,06	60 %
2 mM <b>3</b>	4	0,1	100 %
2 mM <b>3</b>	5	0,15	150 %
2 mM <b>3</b>	13	0,28	280 %

**Tabelle 8.45.:** Titration von Peptid **25** ( $c = 0,1$  mM in Acetatpuffer pH = 4,5) mit der doppelsträngigen DNA **4**

Substanz	Zugabe [ $\mu$ l]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
2 mM <b>4</b>	2	0,02	20 %
2 mM <b>4</b>	4	0,06	60 %
2 mM <b>4</b>	4	0,1	100 %
2 mM <b>4</b>	10	0,2	200 %
2 mM <b>4</b>	13	0,33	330 %

**Tabelle 8.46.:** Titration von Peptid **25** ( $c = 0,1$  mM in Acetatpuffer pH = 4,5) mit der einzelsträngigen DNA **5**

Substanz	Zugabe [ $\mu$ l]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
2 mM <b>5</b>	2	0,02	20 %
2 mM <b>5</b>	4	0,06	60 %
2 mM <b>5</b>	4	0,1	100 %
2 mM <b>5</b>	10	0,2	200 %
2 mM <b>5</b>	13	0,33	330 %

**Titration der Peptide 29 und 31 mit der dsDNA 13**

Zur Titration der Peptids **29** und **31** mit der doppelsträngigen *hairpin* DNA-Motiv **13** wurde zunächst je eine 150  $\mu$ M Peptidlösung in Acetatpuffer pH = 4,5 (10 mM Essigsäure (d4), 20 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M TSP in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 95:5) vorgelegt. Zur Titration wurde eine 1,77 mM wässrige Lösung der DNA verwendet, die einzelnen Titrationsschritte sind in Tab. 8.47 und in Tab. 8.48 gezeigt.

**Tabelle 8.47.:** Titration von Peptid **29** ( $c = 150$   $\mu$ M) mit dem DNA *hairpin*-Motiv **13**

Substanz	Zugabe [ $\mu$ l]	Konzentration [ $\mu$ M]	relativer Anteil [%]
1,77 mM <b>13</b>	2	17,7	12 %
1,77 mM <b>13</b>	2	35,4	24 %
1,77 mM <b>13</b>	4	70,8	47 %
1,77 mM <b>13</b>	6	123,9	83 %
1,77 mM <b>13</b>	6	177	118 %

**Tabelle 8.48.:** Titration von Peptid **31** ( $c = 150 \mu\text{M}$ ) mit dem DNA *hairpin*-Motiv **13**

Substanz	Zugabe [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
1,77 mM <b>13</b>	2	17,7	12 %
1,77 mM <b>13</b>	2	35,4	24 %
1,77 mM <b>13</b>	4	70,8	47 %
1,77 mM <b>13</b>	6	123,9	83 %
1,77 mM <b>13</b>	6	177	118 %

**Titration von Peptid 42 mit  $\text{ZnSO}_4$  und Peptid 43**

Es wurden 3,7 mg **42** in 600  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  95:5 (2,3 mM), 4 mM  $\text{NaN}_3$  und 100  $\mu\text{M}$  TSP vorgelegt. Zunächst wurde 0,1 M  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung schrittweise bis zu einer  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration von 3,5 mM (150 %) zugegeben. Danach wurde das Tetrapeptid Ac-CVPC-NH<sub>2</sub> dazutitriert, ebenfalls bis zu einer Konzentration von 3,5 mM (150 %).

Da die Zinksulfatlösung in mehreren Puffern zur Präzipitation neigte wurde in wässriger Lösung gemessen und der pH-Wert nach jedem Titrationsschritt überprüft und gegebenenfalls nachjustiert.

**Tabelle 8.49.:** Titration von **42** mit 0,1 M  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung und Tetrapeptid **43** bei pH = 6,5. Die Konzentration des vorgelegten Peptides betrug 2,3 mM

Substanz	Zugabe [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
0,1 M $\text{ZnSO}_4$	1,2	0,23	10 %
0,1 M $\text{ZnSO}_4$	4,8	1,15	50 %
0,1 M $\text{ZnSO}_4$	2,4	1,6	70 %
0,1 M $\text{ZnSO}_4$	3,6	2,3	100 %
Peptid <b>43</b>	0,5 mg	2,3	100 %
0,1 M $\text{ZnSO}_4$	6,0	3,45	150 %

**Titration von **43** mit  $\text{ZnSO}_4$  und **42****

Es wurden 2,4 mg **43** in 600  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  95:5 (8,6 mM), 4 mM  $\text{NaN}_3$ , 100  $\mu\text{M}$  TSP und 11 mM TCEP vorgelegt. Die einzelnen Titrationsschritte sind Tab. 8.50 zu entnehmen.

**Tabelle 8.50.:** Titration von **43** mit 0,57 M  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung bei pH = 6,5. Die Konzentration des vorgelegten Peptides betrug 8,6 mM

Substanz	Zugabe [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [mM]	relativer Anteil [%]
0,57 mM $\text{ZnSO}_4$	2,5	2,15	25 %

Fortsetzung von Tab. 8.50

0,57 mM ZnSO <sub>4</sub>	2,5	4,3	50 %
0,57 mM ZnSO <sub>4</sub>	5,0	8,6	100 %

---

## 8.7. SPR-Experimente

Sämtliche SPR-Experimente wurden an einem Biacore T100-System (GE Healthcare) durchgeführt. Als Kontrollsoftware diente die *Biacore T100 Control Software (Version 1.1)*, die Auswertung der Daten wurde mit der *T100 Evaluation Software (Version 1.1)* durchgeführt. Zur Immobilisierung der Liganden wurden entweder Streptavidin-funktionalisierte (Series S Sensor Chip SA) oder Carboxymethyl-funktionalisierte (Series S Sensor Chip CM5) Sensorchips mit jeweils vier Flußzellen verwendet. Sämtliche Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt.

### 8.7.1. Verwendete Puffer und Lösungen

#### PBS-Puffer pH = 7,2

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O und 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt, anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und steril filtriert.

#### PBS-Puffer 4 mM NaN<sub>3</sub> pH = 7,2

PBS-Puffer wurde mit ~260 mg NaN<sub>3</sub> versetzt. Der pH-Wert wurde eingestellt, anschließend wurde steril filtriert.

#### PBS-Puffer mit 5 % DMSO

1 l PBS Puffer wurde mit 50 ml DMSO versetzt. Nach einstellen des PH-Wertes wurde steril filtriert.

#### HBS-N

In einen Liter H<sub>2</sub>O wurden 2,383 g HEPES (10 mM) und 8,766 g NaCl (150 mM) gelöst. Mit HCl und NaOH wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

### **HBS-P**

Zur Herstellung des HBS-P-Puffers wurde HBS-N-Puffer mit 0,5 % (v/v) Tween20 versetzt.

### **HBS-RNA pH = 7,0**

4,76 g HEPES und 4,19 g KCl wurden in 1 l H<sub>2</sub>O mit 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung und 100 µl 0,1 M ZnSO<sub>4</sub>-Lösung versetzt und steril filtriert. Nach Zugabe von 1,54 g DTT wurde erneut steril filtriert.

### **0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH = 7,0**

2,185 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O und 0,538 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl, bzw. NaOH auf 7,0 eingestellt.

### **10 mM Natriumborat-Puffer pH = 8,5 / 1 M NaCl**

Zur Herstellung von 0,2 M Stammlösungen wurden 1,534g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O und 0,247 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in jeweils 20 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösungen wurden je nach gewünschtem pH-Wert zusammengegeben, 1 ml mit H<sub>2</sub>O auf 20 ml aufgefüllt und mit 1,16 g NaCl versetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl und NaOH eingestellt und filtriert.

### **0,1 M Natriumacetat, pH = 4**

Zur Herstellung von 0,2 M Stammlösungen wurden 1,36 g Natriumacetat und 0,6 g (0,57 ml) Essigsäure in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zusammentitrieren der beiden Stammlösungen eingestellt, anschließend wurde 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und filtriert.

### **50 mM NaOH / 1 M NaCl**

0,584 g NaCl und 0,5 ml 1 M NaOH wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

### **Glycin pH = 1,5 - 4,5**

37,6 mg Glycin wurden in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und filtriert. Der jeweilige pH-Wert wurde mit NaOH, bzw. HCl eingestellt.

### **1 mM HCl**

1 M HCl wurde mit H<sub>2</sub>O 1:1000 verdünnt und filtriert.

### **1, bzw. 4 M NaCl**

2,922 g, bzw. 11,688 g NaCl wurden in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und filtriert.

### **50 % Ethylenglykol**

Ethylenglykol wurde 1:1 mit H<sub>2</sub>O gemischt und filtriert.

### **0,4 M EDC / 0,1M NHS**

76,7 mg EDC und 11,5 mg NHS in jeweils 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Die beiden Lösungen wurden direkt vor Verwendung 1:1 gemischt.

### **50 mM Cystein / 1 M NaCl**

0,09 g Cystein und 0,584 g NaCl wurden in 10 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH = 4 gelöst und filtriert.

### **1 M Ethanolamin pH = 7,00**

0,611 mg (0,6 ml) Ethanolamin wurden in 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7 gegeben und filtriert.

### **1 M Ethanolamin pH = 8,5**

0,611 mg (0,6 ml) Ethanolamin wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH, bzw. HCl eingestellt.

### **50 mM BMPH**

7,43 mg BMPH wurden in 500 µl 10 mM Natriumboratpuffer pH 8,5 / 1M NaCl direkt vor der Verwendung gelöst und filtriert.

## **8.7.2. Immobilisierung**

### **Protein 1 via Aminkupplung**

Für das *pH-Scouting* wurden 1 µM Proteinlösungen in Acetatpuffer pH = 4,5, 5, 5,5 und 5,9 hergestellt. Dabei erwies sich pH = 5 als am geeignetsten.

Zum Immobilisieren des Proteins wurde eine Flusszelle eines CM5-Sensorchips zunächst einige Male mit 50mM NaOH/1M NaCl behandelt. Nach Aktivieren der Oberfläche (zweimal 5 min mit EDC/NHS) wurde das Protein (1 $\mu$ M Lösung in Acetatpuffer pH = 5,0) mit zwei 5 minütigen Injektionen immobilisiert. Anschließend wurde mit Ethanolamin (einmal 5 min) nicht gebundenes Protein gewaschen und nicht reagierte Aminogruppen auf der Chipoberfläche gecappt.

Als Laufpuffer diente HBS-RNA, die Flussgeschwindigkeit betrug 5  $\mu$ l/min. Die Netto-Belegung betrug etwa 3000 RU.

#### **dsRNA 2 über 5'-Biotin-tag**

Zur Immobilisierung der dsRNA **2** wurde ein kommerziell erworbenes 5'-Biotin-modifiziertes Derivat verwendet. Zunächst wurden zwei Flusszellen eines SA-Sensorchips mit 50mM NaOH/1M NaCl behandelt. Danach wurde eine 2  $\mu$ M dsRNA-Lösung solange über die betreffende Flusszelle geleitet, bis keine weitere RU-Zunahme mehr zu beobachten war (etwa 3 min). Um eine Verschleppung des Liganden zu verhindern wurde nach dem Immobilisieren zusätzlich das „*Extrawash*“-Modul verwendet (50 mM NaOH/1M NaCl in 50 % Isopropanol)

Als Laufpuffer diente HBS-N, die Flussgeschwindigkeit betrug 10 - 30  $\mu$ l/min. Die Netto-Belegung betrug etwa 1300 RU.

#### **N-terminal Biotin-funktionalisierte Peptide auf einem SA-Chip**

Zur Immobilisierung Biotin-funktionalisierter Peptide wurden zunächst die zu belegenden Flusszellen sowie die Referenzzelle drei mal eine Minute mit 50mM NaOH/1M NaCl behandelt. Danach wurden die Flusszellen mehrere Male für einige Minuten mit einer 1  $\mu$ M Peptidlösung behandelt bis eine Belegung von etwa 1000 RU erreicht wurde. Als Laufpuffer dienten PBS oder HBS-N. Die Flussgeschwindigkeit betrug 10  $\mu$ l/min.

#### **N-terminal Cystein-funktionalisierte Peptide auf einem CM-5-Chip**

Der Sensorchip wurde zunächst drei mal eine Minute mit 50mM NaOH/1M NaCl vorbehandelt. Danach wurde einige Male EDC/NHS injiziert, bis kein signifikanter RU-Anstieg mehr zu beobachten war. Die Maleimid-Funktionalitäten wurden durch mehrfache Injektionen mit BMPH eingeführt, die verbliebenen NHS-Ester wurden mit Ethanolamin gecappt. Nun wurde das jeweilige Cystein-modifizierte Peptid durch Injektionen von 1  $\mu$ M Lösungen in HBS-N-Puffer immobilisiert, bis kein signifikanter RU-Anstieg mehr zu beobachten war. Nicht reagierte Maleimid-Gruppen wurden anschließend mit 50 mM Cystein/1 M NaCl gecappt. Als Laufpuffer diente HBS-N, die Flussgeschwindigkeit betrug 5  $\mu$ l/min.

**Tabelle 8.51.:** Detaillierte Beschreibung der bei den ITC-Messungen eingesetzten Substanzen, Mengen und Parameter.

Parameter	9 in 1	2 in 1	9 in Puffer	Puffer in Puffer
Puffer	HBS-RNA	HBS-RNA	HBS-RNA	HBS-RNA
Temperatur [°C]	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
c(Zelle) [µM]	20 µM	30 µM	-	-
c(Spritze) [µM]	100 µM	300 µM	300 µM	-
Injektionsvolumen [µl]	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Anzahl Injektionen	20	20	20	20
Zeit zwischen den Injektionen	180 s	180 s	180 s	180 s
Rührgeschwindigkeit [rpm]	100	100	100	100

### 8.7.3. Bindungsexperimente

Für die Bindungsexperimente wurden Verdünnungsreihen in 96-well-Platten mit dem jeweiligen Liganden hergestellt. Dabei wurde der jeweilige Ligand, beginnend mit der niedrigsten Konzentration, in aufeinanderfolgenden Zyklen injiziert. Um die Reproduzierbarkeit der Bindungsexperimente zu überprüfen wurde nach Injektion der höchsten Konzentration einmal Puffer und einmal ein Aliquot Ligand einer mittleren Konzentration der Verdünnungsreihe injiziert. Die optimalen Regenerationsbedingungen wurden in Vorexperimenten bestimmt. In der Regel wurden 1 M NaCl oder 50 mM NaOH / 1 M NaCl verwendet.

## 8.8. ITC-Experimente

Die ITC-Experimente wurden an einem MicroCal ITC<sub>200</sub>-System (GE Healthcare) mit einer 200 µl Probenzelle durchgeführt. Als Puffer für die zu titrierenden Substanzen und die Referenzzelle wurde HBS-RNA (s. Abschnitt 8.7) verwendet. Die Zugabe erfolgte mit Hilfe einer 40 µl Spritze.

Die Parameter der einzelnen Experimente sind in Tab. 8.51 beschrieben.

## 8.9. HHR-Experimente

Die Reaktionen wurden in 96-well-Platten bei 25 °C in einem Gesamtvolumen von 50 µl Tris-gepufferter Lösung (50 mM Tris pH = 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) durchgeführt. Als Ribozym wurde „HHR1“, als FRET-Substrat „SL1“ verwendet.<sup>[176]</sup>

In einer separaten Platte wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Peptide hergestellt. In der finalen Platte wurden Ribozym (Endkonzentration 9 nM) und Substrat (Endkonzentration 250 nM) in Puffer vorgelegt. Nach Zugabe der Peptide

(Endkonzentration 0,1 nM - 10  $\mu$ M) wurde die Platte in den Fluoreszenzreader gestellt. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  gestartet, direkt nach der Zugabe wurde die Fluoreszenz zeitabhängig detektiert.

Die für die Konkurrenzexperimente verwendeten Oligonukleotide wurden nach dem Auftauen für ca. 5 min auf 80 °C erhitzt und danach auf 0 °C abgekühlt. Dies sollte gewährleisten, dass die *hairpin*-Motive intramolekulare Basenpaarungen ausbilden. Um eine einheitliche Behandlung zu gewährleisten wurde mit den einzelsträngigen Motiven identisch verfahren.

## 8.10. Electrophoretic mobility shift assay

### 8.10.1. Radioaktive Markierung der DNA

Zur radioaktiven Markierung der doppelsträngigen DNA **17** wurde diese zunächst 30 min mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und T4-Polynukleotidkinase bei 37 °C inkubiert. Danach wurde zur Zerstörung der Kinase 10 min auf 85 °C erhitzt und zur Abtrennung nicht reagierten  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATPs über eine Sephadex G-25-Säule filtriert.

### 8.10.2. Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von freier und mit Peptid gebundener DNA wurde zunächst ein Polyacrylamidgel gegossen (8 % Acrylamid, Vernetzungsgrad 19:1). In die einzelnen Taschen wurden zunächst jeweils 5  $\mu$ l eines zuvor hergestellten *Mastermixes* gegeben. Die Endkonzentrationen sind in Klammern angegeben:

- DNA-Lösung (0,2  $\mu$ M)
- 10x PBS-Puffer (1x, siehe 8.7.1)
- $\text{H}_2\text{O}$
- Coomassie Brilliant Blue G-250

Danach wurden in jede der Taschen 5  $\mu$ l Peptidlösung unterschiedlicher Konzentration aus einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe gegeben. Die jeweiligen Konzentrationen waren für die beiden Peptide **29** und **31** identisch und sind in Tab. 8.52 dargestellt.

Nach beendetem Beladen des Gels wurde dieses solange einem elektrischen Feld ausgesetzt, bis der Coomassie-Farbstoff die gesamte Strecke des Gels durchlaufen hatte. Nach Trocknen über Nacht wurden die radioaktiven Banden an einem Phosphorimager ausgelesen.

**Tabelle 8.52.:** Verwendete Konzentrationen der beiden beim *Gel mobility shift assay* eingesetzten Peptide **29** und **31**.

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
c( <b>29</b> ) [ $\mu\text{M}$ ]	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0
c( <b>31</b> ) [ $\mu\text{M}$ ]	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0

## 8.11. NIR-label

### Darstellung von H-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH<sub>2</sub> (**63**)

**Durchführung:** Das Peptid wurde nach AAV 7 (Abschnitt 8.2) synthetisiert, wobei die Kupplung der ersten Aminosäure ebenfalls am Synthesizer durchgeführt wurde und auf die N-terminale Acetylierung verzichtet wurde.

**Ausbeute:** nicht bestimmt

**Retentionszeit:** 30 - 36 min bei 0 - 10 % B in 42 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1423,2; berechnet: 1423,9

### Darstellung von 64-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH<sub>2</sub> (**65**)

**Durchführung:** **64** (1 eq.), COMU (0,95 eq.) und DIPEA (1,9 eq.) wurden in NMP gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. **63** wurde ebenfalls in NMP gelöst und zu der anderen Lösung hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde die grüne Lösung auf  $\sim 1\text{ml}$  eingengt und mit einer Sephadex PD10-Säule entsalzt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert, aufkonzentriert und per RP-HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** Spuren

**Retentionszeit:** 38 min bei 30 - 50 % B in 62 min (analytische Säule)

**MALDI-TOF-MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z = 2270,4$ ; berechnet:  $m/z = 2274,2$

### Zell-Experimente (durchgeführt von Christian Jüngst, AG Zumbusch)

Zwei Tage vor dem Experiment wurden  $\sim 100.000$  HeLa-Zellen in 35 mm  $\mu$ -dish-Platten (Ibidi) ausgesät und bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag des Experiments wurde eine 2  $\mu\text{M}$  Lösung von **65** in HKR-Puffer (5 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 2,05 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 1 g/l) hergestellt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und 2 ml der Peptidlösung wurden zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Lösung entfernt, danach wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml HKR-Puffer gewaschen. Vor Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde eine Lösung mit Hoechst 33342-Farbstoff zugegeben um die Zellkerne anzufärben. Die Zellen wurden daraufhin einige

Stunden mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes (Zeiss LSM 510 Meta) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> beobachtet.

Hoechst 33342 wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt, die Fluoreszenz wurde mit einem Bandpassfilter bei 420-480 nm detektiert. **65** wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz wurde mit einem Langpass-Filter bei 650 nm detektiert. Bei diesem Aufbau war keine längerwellige Anregung möglich, die Fluoreszenzintensität ist aufgrund der schwachen Absorption von **64** bei 633 nm relativ niedrig.

Zum Vergleich der Emissionsspektren von **65** in HKR Puffer und in lebenden Zellen wurden ~100.000 HeLa-Zellen wie oben beschrieben zwei Tage vor dem Experiment ausgesät. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden Zellbilder mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss Axiovert 200) mit gepulstem Laser (LDH-P-C-690, Picoquant) und TCSPC-Modul (Hydra-Harp 400, Picoquant) aufgenommen. Parallel dazu wurden Fluoreszenzspektren mit einem Dispersionsprisma (PS 857, Thorlabs) und einer CCD-Kamera (Andor Newton DU970N-BV) aufgenommen.



## A. Verwendete Chemikalien

**Tabelle A.1.:** Verwendete Chemikalien, sortiert nach dem jeweiligen Hersteller.

Hersteller	Chemikalien
Acros	Triethylamin, Essigsäureanhydrid, Dimethylsulfoxid, $\text{CDCl}_3$
AppliChem	SDS (ultrapure), Agar, Hefeextrakt
Biorad	SDS-PAGE Standards (low range)
Eurisotop	Celtone, $\text{D}_2\text{O}$ (99,90 % D)
Fischer Scientific	Coomassie Brilliant Blue G-250
Fluka	MTBE, MES, Dinatriumhydrogenphosphat $\cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ , Natrium-dihydrogenphosphat $\cdot \text{H}_2\text{O}$ , Natriumiodid, Ethandithiol, Natriumhypochlorid, Methanol (HPLC <i>grade</i> ), Mercaptoethanol
CIL	$^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid
GLS	HOBt
Iris Biotech	HBTU, Dichlormethan ( <i>peptide grade</i> ), DIPEA ( <i>peptide grade</i> ), DMF ( <i>peptide grade</i> ), NMP ( <i>peptide grade</i> ), Piperidin ( <i>peptide grade</i> ), TFA ( <i>peptide grade</i> ), MeO-PEG-COOH
J.T. Baker	Acetonitril (HPLC <i>grade</i> ), NMP ( <i>peptide grade</i> )
Livchem	COMU
MCAT	Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)
Merck	D-(+)-Glucose-Monohydrat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , Trinatriumphosphat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , Natriumchlorid, Natriumsulfat, $\text{D}_2\text{O}$ (99,8 % D), NaOD, DCl
Metabion	alle bestellten Oligonukleotide

## A. Verwendete Chemikalien

---

### Fortsetzung von Tab. A.1

Novabiochem	Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Glu(biotinyl-PEG)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, HATU, HBTU
Pierce	BMPH
Rapp Polymere	TentaGel R RAM, PS AM RAM, PS AM NH <sub>2</sub>
Riedel-deHaen	KOH, Kaliumdihydrogenphosphat, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid · 10 H <sub>2</sub> O, Natriumhydrogencarbonat, NaOH, Natriumthiosulfat, Natriumtetraborat · 10 H <sub>2</sub> O, Natriumazid
Roche	DNase I, Proteaseinhibitor Tabletten
Roth	IPTG, Tween20, Kaliumiodid, MES, DTT, Deoxycholsäure, Trichloressigsäure, Trypton, HEPES, Guanidin-hydrochlorid, NaCl, Glycerin, Iod, Ampicillin, Chloramphenicol, Carbenicillin
Serva	Acrylamid
Sigma-Aldrich	Sinapinsäure, CHCA, DHB, Piperidin ( <i>biotech grade</i> ), BME-Vitamine, Zinksulfat, Ethanolamin, Natriumtetraborat, NHS, EDC, Trifluortoluol, Acetonitril, Triisopropylsilan, Ethanol (absolut), Trizma Hydrochlorid, Trizma Base, Zinksulfat, tRNA Type X-SA aus <i>S. cerevisiae</i>
VWR	Natriumchlorid

## B. NMR-Pulsprogramme

### p3919gp

```
;p3919gp
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., ; Series A 102, 241 -245 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
1 ze
2 30m pl1:f1
d1
p1 ph1
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl18:f1
p27*0.231 ph3
d19*2
p27*0.692 ph3
d19*2
p27*1.462 ph3
d19*2
p27*1.462 ph4
d19*2
p27*0.692 ph4
d19*2
p0*0.231 ph4
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
30m pl1:f1 mc #0 to 2 F0(zd)
exit
ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
ph31=0 2 2 0
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;use gradient ratio: gp 1
; 20
;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;$Id: p3919gp,v 1.12 2005/11/10 12:17:00 ber Exp $
```

### **zgesgppr.hm**

```
;zgesgppr.hm
;avance-version (07/10/04)
;1D sequence ;water suppression using excitation sculpting with gradients
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
; with presaturation to reduce radiation damping
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d12=20u"
"TAU=de+p1*2/3.1416+50u"
1 ze
2 30m
d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1 BLKGRAD
d1
p1 ph1
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph2:r):f1
```

---

```

4u
d12 pl1:f1
p2 ph3
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph5
4u
p16:gp2
d16
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
4u BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0 1
ph3=2 3
ph4=0 0 1 1
ph5=2 2 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;$Id: zgesgp,v 1.5.6.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $

```

## mlevgpph19

```
;mlevgpph19
;avance-version (07/04/04)
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;phase sensitive
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d12=20u"
in0=infl"
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-4u"
SSCALEF=p7*2/p5+0.5"
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"
"l1=FACTOR1*SCALEF"
1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
4u pl10:f1
(p17 ph26)
;begin MLEV17
4 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 4 times l1
```

---

```

;end MLEV17
(p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl18:f1
p27*0.231 ph4
d19*2
p27*0.692 ph4
d19*2
p27*1.462 ph4
d19*2
p27*1.462 ph5
d19*2
p27*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
ph1=0 2
ph4=0 0 1 1 2 2 3 3
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;l1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time

```

```
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1
; 20
;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 180
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: mlevgpqh19,v 1.10 2007/04/11 13:34:30 ber Exp $
```

### mlevesgpqh

```
;mlevesgpqh
;avance-version (07/10/04)
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;phase sensitive
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
"p2=p1*2"
"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d12=20u"
in0=inf1"
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-d12"
"TAU=de+p1*2/3.1416+54u"
SSCALEF=p7*2/p5+0.5"
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"
"l1=FACTOR1*SCALEF"
1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
d12 pl10:f1
```

---

```

(p17 ph26)
;begin MLEV17
4 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 4 times l1
;end MLEV17
(p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:fl
(p12:sp1 ph2:r):fl
4u
d12 pl1:fl
p2 ph3
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:fl
(p12:sp1 ph4:r):fl
4u
d12 pl1:fl
p2 ph5
4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 1 1
ph3=2 2 3 3
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3
ph22=3

```

```
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
;p0 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p10: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * 11) + (p17*2) = mixing time
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 180
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: mlevesgpqh,v 1.9.2.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $
```

### **mlevesgpqhpr.hm**

```
;mlevesgpqhpr.hm
;avance-version (07/10/04) ;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing ;using two
power levels for excitation and spinlock
;phase sensitive
;cw-presat to reduce radiation damping
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
```

---

```

;CLASS=HighRes
;DIM=2D
;TYPE=
;SUBTYPE=
;COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
"p2=p1*2"
"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d12=20u"
in0=inf1"
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-d12"
"TAU=de+p1*2/3.1416+54u"
SSCALEF=p7*2/p5+0.5"
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"
"l1=FACTOR1*SCALEF"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
d12 pl10:f1
(p17 ph26)
;begin MLEV17
4 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 4 times l1
;end MLEV17 (p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:f1

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
(p12:sp1 ph2:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph3
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph5
4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip29, id0)
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 1 1
ph3=2 2 3 3
ph4=0 0 0 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 2
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19 : presaturation on H2O
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * 11) + (p17*2) = mixing time
```

---

```

;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 180
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: mlevesgpvh,v 1.9.2.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $

```

## cosydfgpph19

```

;cosydfgpph19
;avance-version (07/04/05)
;2D homonuclear shift correlation
;with double quantum filter
;phase sensitive
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;allowing for presaturation during relaxation delay in cases of radiation damping
;phasecycle:
A. Derome & M. Williamson, J. Magn. Reson. 88, 177 - 185 (1990)
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
in0=inf1"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
d0
p1 ph2
d13
p1 ph3
50u pl18:f1 UNBLKGRAD
p16:gp1
d16
p27*0.231 ph4
d19*2
p27*0.692 ph4
d19*2
p27*1.462 ph4
d19*2
p27*1.462 ph5
d19*2
p27*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip29, id0)
exit
ph1=1 1 1 1 0 0 0 0
ph2=0 0 0 0 1 1 1 1
ph3=1 2 3 0 2 3 0 1
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3
ph29=0 0 0 0 1 1 1 1
ph31=0 1 2 3 3 0 1 2
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
```

---

```

;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1
; 30
;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;set pl9 to 120dB when presaturation is not required
; use 75 - 80dB to reduce radiation damping
;Processing
;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: cosydfgpph19,v 1.6 2007/04/11 13:34:29 ber Exp $

```

## cosydfesgpph19

```

;cosydfesgpph
;avance-version (07/10/04)
;2D homonuclear shift correlation
;with double quantum filter
;phase sensitive
;water suppression using excitation sculpting with gradients allowing for presaturation during relaxation delay in
cases of radiation damping
;phasecycle: A. Derome & M. Williamson, J. Magn. Reson. 88, 177 - 185 (1990)
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
in0=inf1"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
"TAU=de+p1*2/3.1416+54u"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
p1 ph2

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
d13
p1 ph3
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph5
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph6:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph7
4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip29, id0)
exit
ph1=1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph3=1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0
ph6=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph7=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph29=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 3 2 1 2 1 0 3 3 2 1 0 1 0 3 2
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
```

---

```

;NS: 16 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;set pl9 to 120dB when presaturation is not required
; use 75 - 80dB to reduce radiation damping
;Processing
;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: cosydfesgpph,v 1.8.2.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $

```

## cosydfesgpphpr.hm

```

;cosydfesgpph
;avance-version (07/10/04)
;2D homonuclear shift correlation
;with double quantum filter
;phase sensitive
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;allowing for presaturation during relaxation delay in cases of radiation damping
;phasecycle: A. Derome & M. Williamson, J. Magn. Reson. 88, 177 - 185 (1990)
T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
in0=infl"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
"TAU=de+p1*2/3.1416+54u"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1

```

```
p1 ph1
d0
p1 ph2
d13
p1 ph3
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph5
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph6:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph7
4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1 & ip29, id0)
exit
ph1=1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph3=1 2 3 0 1 2 3 0 2 3 0 1 2 3 0 1
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0
ph6=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph7=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph29=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 3 2 1 2 1 0 3 3 2 1 0 1 0 3 2
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
```

---

```

;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 16 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;set pl9 to 120dB when presaturation is not required
; use 75 - 80dB to reduce radiation damping
;Processing
;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: cosydfesgpvh, v 1.8.2.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $

```

## noesygpvh19

```

;noesygpvh19
;avance-version (07/04/04)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
"d12=20u"
in0=inf1"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
p1 ph2
d8
p1 ph3
d12 pl18:f1
50u UNBLKGRAD

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
p16:gp1
d16
p27*0.231 ph4
d19*2
p27*0.692 ph4
d19*2
p27*1.462 ph4
d19*2
p27*1.462 ph5
d19*2
p27*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1
; 20
;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
```

---

```
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: noesygp19,v 1.7 2007/04/11 13:34:31 ber Exp $
```

## noesygp19

```
;noesygp19
;avance-version (07/10/04)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson., Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple>
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
in0=in1"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
"TAU=de+p1*2/3.1416+54u"
1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
p1 ph2
d8
p1 ph3
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl0:f1
(p12:sp1 ph4:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph5
4u
p16:gp1
d16
TAU
p16:gp2
d16 pl0:f1
```

```
(p12:sp1 ph6:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph7
4u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
ph1= 0 0 2 2
ph2= 0
ph3= 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3
ph4= 0 0 0 0 1 1 1 1
ph5= 2 2 2 2 3 3 3 3
ph6= 2 3
ph7= 0 1
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 1 3 3 1 1 3 3 1
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 31 : 11
;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: noesyegpph,v 1.8.2.1 2007/10/04 16:52:07 ber Exp $
```

---

## roesygpph19

```
;roesygpph19
;avance-version (07/04/04)
;2D ROESY with cw spinlock for mixing
;phase sensitive
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson 63, 207-213 (1985)
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
"d12=20u"
in0=in1"
"d0=in0/2-p1*2/3.1416-4u"
1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
p1 ph1
d0
4u pl11:f1
p15 ph2
50u pl18:f1 UNBLKGRAD
p16:gp1
d16
p27*0.231 ph3
d19*2
p27*0.692 ph3
d19*2
p27*1.462 ph3
d19*2
p27*1.462 ph4
d19*2
p27*0.692 ph4
d19*2
p0*0.231 ph4
46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=0 2 0 2 1 3 1 3
ph3=0 2 0 2 1 3 1 3
ph4=2 0 2 0 3 1 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p11: f1 channel - power level for ROESY-spinlock
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p15: f1 channel - pulse for ROESY spinlock
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;inf1: 1/SW = 2 * DW
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 30 : 30
;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 30%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;Processing
;PHC0(F1): 180
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
;$Id: roesygpph19,v 1.7 2007/04/11 13:34:31 ber Exp $
```

### hsqcedetgp

```
;hsqcedetgp
;avance-version (07/04/04)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;with multiplicity editing during selection step
;W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum & W. Bermel, Magn. Reson. Chem. 31, 287-292 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
```

---

```

#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d13=4u"
# ifdef LABEL_CN
"p22=p21*2"
# else
# endif /*LABEL_CN*/
"d0=3u"
in0=inf1/2"
"DELTA1=d4-p16-d13-4u"
# ifdef LABEL_CN
"DELTA=d21-p16-d16-larger(p2,p22)-d0*2"
# else
"DELTA=d21-p16-d16-p2-d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/
1 ze
d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
d4 pl2:f2
(center (p2 ph1) (p4 ph6):f2 )
d4 UNBLKGRAD
p28 ph1
d13
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph5) (p22 ph1):f3 )
# else
(p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/
d0
p16:gp1*EA
d16
DELTA
(center (p2 ph1) (p4 ph4):f2 )
d21
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
d4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d13
p16:gp2
DELTA1 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

```

```
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph31=2 0 2 0 0 2 0 2
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: set d21 according to multiplicity selection
; 1/(2J(XH)) XH, XH3 positive, XH2 negative
;cnst2: = J(XH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 80 : 20.1 for C-13
; 80 : 8.1 for N-15
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
; option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hsqcedetgp,v 1.4 2007/04/11 13:34:30 ber Exp $
```

---

## hspcedetgpsisp2.2

```
;hsqcedetgpsisp2.2
;avance-version (07/07/02)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection with decoupling during acquisition using trim pulses
in inept transfer with multiplicity editing during selection step using shaped pulses for all 180degree pulses on f2 -
channel
;with gradients in back-inept
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn. Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Gri-
singer, J. Biomol. NMR 4, 301-306 (1994)
;W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum & W. Bermel, Magn. Reson. Chem. 31, 287-292 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d0=3u"
in0=inf1/2"
"DELTA=d21-cnst17*p24/2-p16-d16-p2-d0*2"
"DELTA1=p16+d16+8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2"
"DELTA3=d24-cnst17*p24/2-p19-d16"
"DELTA4=d4-larger(p2,p14)/2-p16-d16"
"DELTA5=d21-cnst17*p24/2"
1 ze
d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
DELTA2 pl0:f2
4u
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
4u
DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD
p28 ph1
4u
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
(p2 ph7)
d0
p16:gp1*EA
d16
DELTA
```

```
4u
(center (p2 ph1) (p24:sp7 ph4):f2 )
4u
DELTA5 pl2:f2
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp3
d16
DELTA3
(center (p2 ph1) (p24:sp7 ph1):f2 )
DELTA3
p19:gp3
d16 pl2:f2
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p16:gp4
d16
DELTA4 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
DELTA4
p16:gp4
d16
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
4u
p16:gp2
d16 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph31=2 0 0 2
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse (180degree inversion)
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse (180degree refocussing)
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
; = 500usec for Crp60,0.5,20.1
```

---

```

;p16: homospoil/gradient pulse
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; = 2msec for Crp60comp.4
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: set d21 according to multiplicity selection
; 1/(2J(XH)) XH, XH3 positive, XH2 negative
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)
;cnst17: = -0.5 for Crp60comp.4
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 11 : -5 for C-13
; 80 : 8.1 : 11 : -5 for N-15
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz3: 11%
;gpz4: -5%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;cnst17: Factor to compensate for coupling evolution during a pulse (usually +1). A positive factor indicates that
coupling evolution continues during the pulse, whereas a negative factor is necessary if the coupling is (partially)
refocussed.
;$Id: hsqcetgpsisp2.2,v 1.5.2.1 2007/07/04 13:41:19 ber Exp $

```

### hsqcetgpsisp2.3

```

;hsqcetgpsisp2.3
;avance-version (08/09/08)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
;using shaped pulses for all 180degree pulses on f2 - channel
;with gradients in back-inept
;with suppression of COSY type artefacts
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn. Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Gri-
singer, J. Biomol. NMR 4, 301-306 (1994)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d0=3u"
in0=infl/2"
"DELTA=p2+d0*2-4u"
"DELTA1=d2-p16-d16-larger(p2,p14)/2-p1*2/3.1416-4u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2-4u"
"DELTA3=d24-cnst17*p24/2-p19-d16-4u"
"DELTA4=d4-larger(p2,p14)/2-p16-d16-4u"
"DELTA5=d2-p16-d16-larger(p2,p14)/2-de-8u"
"TAU=larger(p2,p14)/2-p2/2"
"l0=0"
1 ze
d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
DELTA2 pl0:f2
4u
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
4u
DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD
p28 ph1
4u
(p1 ph2)
(p3 ph3):f2
d0
(p2 ph7)
d0
p16:gp1*EA
d16 pl0:f2
(p24:sp7 ph8:r):f2
4u
p16:gp1*EA*-1
d16
DELTA pl2:f2
```

---

```

(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
4u
p19:gp3
d16
DELTA3 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p24:sp7 ph9:r):f2 )
4u
DELTA3 pl2:f2
p19:gp3
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
4u
p16:gp4
d16
DELTA4 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
4u
DELTA4
p16:gp4
d16
(p1 ph1)
4u
p16:gp2*-1
d16
DELTA1
if "i0 %2 == 0"
TAU
(p2 ph1)
TAU
else
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
4u
DELTA5
p16:gp2
d16 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F0(iu0 & ip31*2 & zd)
F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph8=0 0 2 2
ph9=0
ph31=0 2 2 0
;p10 : 120dB

```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;pl3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse (180degree inversion)
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse (180degree refocussing)
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
; = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; = 2msec for Crp60comp.4
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)
;cnst17: = -0.5 for Crp60comp.4
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td0: 2
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 11 : -5 for C-13
; 80 : 8.1 : 11 : -5 for N-15
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz3: 11%
;gpz4: -5%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
```

---

;cnst17: Factor to compensate for coupling evolution during a pulse (usually +1). A positive factor indicates that coupling evolution continues during the pulse, whereas a negative factor is necessary if the coupling is (partially) refocussed.

;\$Id: hsqcetgpsisp2.3,v 1.1.2.2 2008/09/10 14:19:27 ber Exp \$

## hsqcedetgpsisppr2.2.hm

;hsqcedetgpsisppr2.2

```
;avance-version (07/07/02)
;HSQC ;2D H-1/X correlation via double inept transfer using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer with multiplicity editing during selection step
;using shaped pulses for all 180degree pulses on f2 - channel with gradients in back-inept
;with presaturation (hm100430)
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn. Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Gri-
singer, J. Biomol. NMR 4, 301-306 (1994)
;W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum & W. Bermel, Magn. Reson. Chem. 31, 287-292 (1993)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d0=3u"
in0=inf1/2"
"DELTA=d21-cnst17*p24/2-p16-d16-p2-d0*2"
"DELTA1=p16+d16+8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p14)/2"
"DELTA3=d24-cnst17*p24/2-p19-d16"
"DELTA4=d4-larger(p2,p14)/2-p16-d16"
"DELTA5=d21-cnst17*p24/2"
1 ze
d11 pl12:f2
20u pl9:f1
20u do:f2
2 d1 cw:f1 ph29
20u do:f1
20u pl1:f1
3 (p1 ph1)
DELTA2 pl0:f2
4u
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph6):f2 )
4u
DELTA2 pl2:f2 UNBLKGRAD
p28 ph1
4u
```

## B. NMR-Pulsprogramme

---

```
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
(p2 ph7)
d0
p16:gp1*EA
d16
DELTA
4u
(center (p2 ph1) (p24:sp7 ph4):f2 )
4u
DELTA5 pl2:f2
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp3
d16
DELTA3
(center (p2 ph1) (p24:sp7 ph1):f2 )
DELTA3
p19:gp3
d16 pl2:f2
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p16:gp4
d16
DELTA4 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
DELTA4
p16:gp4
d16
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
4u
p16:gp2
d16 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph29=0
ph31=2 0 0 2
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse (180degree inversion)
```

---

```

;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 channel - shaped pulse (180degree refocussing)
;spnam7: Crp60comp.4
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
; = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;p16: homospoil/gradient pulse
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; = 2msec for Crp60comp.4
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: set d21 according to multiplicity selection
; 1/(2J(XH)) XH, XH3 positive, XH2 negative
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)
;cnst17: = -0.5 for Crp60comp.4
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 20.1 : 11 : -5 for C-13
; 80 : 8.1 : 11 : -5 for N-15
;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;gpz3: 11%
;gpz4: -5%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;cnst17: Factor to compensate for coupling evolution during a pulse (usually +1). A positive factor indicates that
coupling evolution continues during the pulse, whereas a negative factor is necessary if the coupling is (partially)
refocussed.
;$Id: hsqcedetgpsisp2.2,v 1.5.2.1 2007/07/04 13:41:19 ber Exp $

```

### hspcctf3gp

```
;hsqcctf3gp
;avance-version (07/04/04)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;using f3 - channel
;Davis et al., J. Magn. Reson. 98, 207 - (1992)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d13=4u"
"d26=1s/(cnst4*4)"
"d0=3u"
m0=infl/2"
"DELTA1=d26-p16-d13-4u"
# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p14)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/
1 ze
d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
3 (p1 ph1)
d26 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph6):f3 )
d26 UNBLKGRAD
p28 ph1
d13
(p1 ph2)
3u
p16:gp1
d16
(p21 ph3):f3
d0
# ifdef LABEL_CN
(center (p2 ph5) (p14:sp3 ph1):f2 )
# else
(p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/
d0
```

---

```

p16:gp2*EA
d16
(p22 ph4):f3
DELTA
(ralign (p1 ph1) (p21 ph4):f3 )
d26
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d13
p16:gp3
DELTA1 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d26: 1/(4J(YH))
;cnst4: = J(YH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 50 : 80 : 20.1 for C-13
; 50 : 80 : 8.1 for N-15

```

```
;for z-only gradients:
;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
; option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
;$Id: hsqcetf3gp,v 1.4 2007/04/11 13:34:30 ber Exp $
```

### **hmbcgp1pndprqf**

```
;hmbcgp1pndprqf
;avance-version (07/04/04)
;HMBC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum coherence
;optimized on long range couplings
;with low-pass J-filter to suppress one-bond correlations
;no decoupling during acquisition
;using gradient pulses for selection
;with presaturation during relaxation delay
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d6=1s/(cnst13*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d0=3u"
in0=infl/2"
"DELTA=d6-d12*2-4u"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
d2
p3:f2 ph3
d12 pl9:f1
DELTA cw:f1 ph29
4u do:f1
```

---

```

d12 p1:f1
p3:f2 ph4
d0
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16
p2 ph2
50u
p16:gp2
d16
d0
p3:f2 ph5
4u
p16:gp3
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1QF(id0)
exit
ph1=0
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 2
ph5=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph29=0
ph31=0 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH
;d6 : delay for evolution of long range couplings
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst13: = J(XH) long range
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 50 : 30 : 40.1 for C-13
; 70 : 30 : 50.1 for N-15

```

## *B. NMR-Pulsprogramme*

---

```
;for z-only gradients:  
;gpz1: 50% for C-13, 70% for N-15  
;gpz2: 30%  
;gpz3: 40.1% for C-13, 50.1% for N-15  
;use gradient files:  
;gpnam1: SINE.100  
;gpnam2: SINE.100  
;gpnam3: SINE.100  
;$Id: hmbcgp1pndprqf,v 1.3 2007/04/11 13:34:29 ber Exp $
```

## C. Module Peptidsynthesizer

### 20µM spezial.kem - Read Cart & Add 7&8

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 1	Wait	1	0	1
2 4	Read cartridge	10	0	1
3 6	Needle up	10	0	11
4 7	Eject cartridge	10	0	21
5 8	Advance cartridge	10	0	31
6 5	Needle down	10	0	41
7 9	Flush top valve block with gas to waste	2	0	43
8 70	Flush bottom valve block with loop contents to waste	3	0	46
9 14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	48
10 78	Pressurize manifold	10	0	58
11 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	60
12 98	Begin loop UPPER	2	0	60
13 69	Deliver 0.38 M HBTU to measuring 4 loop (open)	4	0	78
14 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	80
15 63	Transfer measuring loop to cartridge	8	0	88
16 99	End loop UPPER	1	0	88
17 60	Mix cartridge	5	0	93
18 70	Flush bottom valve block with loop contents to waste	3	0	96
19 98	Begin loop UPPER	1	0	96
20 68	Deliver 1.6 M DIEA to measuring 4 loop (open)	4	0	100
21 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	102
22 63	Transfer measuring loop to cartridge	8	0	110
23 99	End loop UPPER	1	0	110
24 60	Mix cartridge	5	0	115
25 14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	117
26 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	119

Abbildung C.1.: Modul A

**20µM spezial.kem - Deprotection UV 4.0%**

	Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1	14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	2
2	118	Flush bottom valve block with NMP 30 to aux. waste	30	0	32
3	1	Wait	1	0	33
4	135	Monitoring reset	2	0	33
5	56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	36
6	2	Vortex reaction vessel on	3	0	39
7	40	Mix reaction vessel	2	0	41
8	3	Vortex reaction vessel off	1	0	42
9	42	Drain reaction vessel to waste	7	0	49
10	50	Flow NMP through reaction vessel to waste	5	0	54
11	42	Drain reaction vessel to waste	7	0	61
12	14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	63
13	56	Deliver NMP to reaction vessel	2	0	65
14	2	Vortex reaction vessel on	1	0	66
15	79	Pressurize piperidine	10	0	76
16	16	Flush bottom valve block with piperidine to waste	2	0	78
17	51	Deliver piperidine to reaction vessel	3	0	81
18	14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	83
19	56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	86
20	78	Pressurize manifold	10	0	96
21	19	Flush bottom valve block with MeOH to waste	2	0	98
22	101	MeOH to Aux	20	0	118
23	1	Wait	4	0	122
24	14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	124
25	118	Flush bottom valve block with NMP 30 to aux. waste	30	0	154
26	1	Wait	4	0	158
27	151	Toggle user function on	108	0	158
28	1	Wait	40	0	198
29	3	Vortex reaction vessel off	1	0	199
30	113	Toggle all off	1	0	199
31	1	Wait	2	0	201
32	42	Drain reaction vessel to waste	3	0	204
33	151	Toggle user function on	108	0	204
34	1	Wait	5	0	209
35	129	Monitoring first peak	1	0	209
36	1	Wait	25	0	234
37	131	Monitoring stop	1	0	234
38	132	Read monitoring peak	1	0	234
39	1	Wait	10	0	244
40	113	Toggle all off	1	0	244
41	133	Begin loop monitoring	3	0	244
42	42	Drain reaction vessel to waste	7	0	687
43	98	Begin loop UPPER	1	0	687
44	56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	690
45	2	Vortex reaction vessel on	3	0	693

**Abbildung C.2.:** Modul B

---

20µM spezial.kem - Deprotection UV 4.0%

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
46 40	Mix reaction vessel	2	0	695
47 3	Vortex reaction vessel off	1	0	696
48 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	703
49 50	Flow NMP through reaction vessel to waste	5	0	708
50 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	715
51 99	End loop UPPER	1	0	715
52 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	717
53 56	Deliver NMP to reaction vessel	2	0	719
54 2	Vortex reaction vessel on	1	0	720
55 79	Pressurize piperidine	10	0	730
56 16	Flush bottom valve block with piperidine to waste	2	0	732
57 51	Deliver piperidine to reaction vessel	3	0	735
58 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	737
59 56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	740
60 78	Pressurize manifold	10	0	750
61 19	Flush bottom valve block with MeOH to waste	2	0	752
62 101	MeOH to Aux	20	0	772
63 1	Wait	4	0	776
64 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	778
65 118	Flush bottom valve block with NMP to aux. waste	30	0	808
66 1	Wait	4	0	812
67 151	Toggle user function on	108	0	812
68 1	Wait	40	0	852
69 3	Vortex reaction vessel off	1	0	853
70 113	Toggle all off	1	0	853
71 1	Wait	2	0	855
72 42	Drain reaction vessel to waste	3	0	858
73 151	Toggle user function on	108	0	858
74 1	Wait	5	0	863
75 129	Monitoring first peak	1	0	863
76 1	Wait	25	0	888
77 131	Monitoring stop	1	0	888
78 132	Read monitoring peak	1	0	888
79 1	Wait	10	0	898
80 113	Toggle all off	1	0	898
81 134	End loop monitoring	40	0	898
82 40	Mix reaction vessel	2	0	900
83 2	Vortex reaction vessel on	1	0	901
84 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	903
85 118	Flush bottom valve block with NMP to aux. waste	20	0	923

Abbildung C.3.: Fortsetzung von Modul B

### C. Module Peptidsynthesizer

#### 20µM spezial.kem - \*Cond Deprotection\* 150

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 137	Do module if condition not met	2	0	0
2 3	Vortex reaction vessel off	1	0	1
3 98	Begin loop UPPER	6	0	1
4 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	3478
5 56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	3481
6 2	Vortex reaction vessel on	1	0	3482
7 40	Mix reaction vessel	2	0	3484
8 1	Wait	3	0	3487
9 3	Vortex reaction vessel off	1	0	3488
10 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	3495
11 50	Flow NMP through reaction vessel to waste	5	0	3500
12 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	3507
13 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	3509
14 56	Deliver NMP to reaction vessel	2	0	3511
15 2	Vortex reaction vessel on	1	0	3512
16 79	Pressurize piperidine	10	0	3522
17 16	Flush bottom valve block with piperidine to waste	2	0	3524
18 51	Deliver piperidine to reaction vessel	3	0	3527
19 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	3529
20 56	Deliver NMP to reaction vessel	3	0	3532
21 1	Wait	475	0	4007
22 78	Pressurize manifold	10	0	4017
23 19	Flush bottom valve block with MeOH to waste	2	0	4019
24 101	MeOH to Aux	20	0	4039
25 1	Wait	4	0	4043
26 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	4045
27 118	Flush bottom valve block with NMP to aux. waste	30	0	4075
28 1	Wait	4	0	4079
29 151	Toggle user function on	108	0	4079
30 1	Wait	40	0	4119
31 3	Vortex reaction vessel off	1	0	4120
32 113	Toggle all off	1	0	4120
33 1	Wait	2	0	4122
34 42	Drain reaction vessel to waste	3	0	4125
35 151	Toggle user function on	108	0	4125
36 1	Wait	5	0	4130
37 129	Monitoring first peak	1	0	4130
38 1	Wait	25	0	4155
39 131	Monitoring stop	1	0	4155
40 132	Read monitoring peak	1	0	4155
41 1	Wait	10	0	4165
42 113	Toggle all off	1	0	4165
43 145	Test X greater than peak	15	0	4165
44 147	Do module if test false	1	0	4165
45 99	End loop UPPER	1	0	4165
46 14	Flush bottom valve block with NMP to waste	2	0	4167
47 118	Flush bottom valve block with NMP to aux. waste	20	0	4187

Abbildung C.4.: Modul b

---

**20µM spezial.kem - NMP Wash from Act.**

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 1	Wait	1	0	1
2 98	Begin loop UPPER	3	0	1
3 3	Vortex reaction vessel off	1	0	54
4 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	61
5 28	Pressurize activator	4	0	65
6 2	Vortex reaction vessel on	1	0	66
7 38	Transfer activator to reaction vessel (top open)	6	0	72
8 40	Mix reaction vessel	2	0	74
9 1	Wait	5	0	79
10 99	End loop UPPER	1	0	79
11 22	Drain activator to waste	5	0	84
12 3	Vortex reaction vessel off	1	0	85
13 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	92
14 14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	94
15 10	Flush bottom valve block with gas 2 to waste	2	0	96

**Abbildung C.5.: Modul d**

**20µM spezial.kem - NMP Washes**

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 1	Wait	1	0	1
2 3	Vortex reaction vessel off	1	0	2
3 98	Begin loop UPPER	6	0	2
4 41	Vent reaction vessel	2	0	149
5 50	Flow NMP through reaction vessel to waste	2	0	151
6 42	Drain reaction vessel to waste	5	0	156
7 56	Deliver NMP to reaction vessel	4	0	160
8 2	Vortex reaction vessel on	1	0	161
9 40	Mix reaction vessel	2	0	163
10 1	Wait	5	0	168
11 3	Vortex reaction vessel off	1	0	169
12 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	176
13 99	End loop UPPER	1	0	176
14 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	183
15 14	Flush bottom valve block with NMP 2 to waste	2	0	185
16 10	Flush bottom valve block with gas 2 to waste	2	0	187

**Abbildung C.6.: Modul D**

**20µM spezial.kem - Transfer, Clean Cart & Couple**

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed	
1	1	Wait	1	0	1
2	5	Needle down	10	0	11
3	98	Begin loop UPPER	8	0	11
4	41	Vent reaction vessel	2	0	104
5	2	Vortex reaction vessel on	1	0	105
6	96	Transfer cartridge to reaction vessel (top closed)	6	0	111
7	1	Wait	3	0	114
8	3	Vortex reaction vessel off	1	0	115
9	99	End loop UPPER	1	0	115
10	40	Mix reaction vessel	2	0	117
11	2	Vortex reaction vessel on	1	0	118
12	62	Drain cartridge to waste	10	0	128
13	98	Begin loop UPPER	3	0	128
14	67	Deliver NMP to cartridge small needle	2	0	144
15	62	Drain cartridge to waste	5	0	149
16	99	End loop UPPER	1	0	149
17	98	Begin loop UPPER	2	0	149
18	65	Deliver NMP to cartridge	22	0	233
19	60	Mix cartridge	10	0	243
20	24	Transfer cartridge to activator	20	0	263
21	62	Drain cartridge to waste	10	0	273
22	99	End loop UPPER	1	0	273
23	98	Begin loop UPPER	2	0	273
24	67	Deliver NMP to cartridge small needle	2	0	282
25	62	Drain cartridge to waste	5	0	287
26	99	End loop UPPER	1	0	287
27	62	Drain cartridge to waste	10	0	297
28	60	Mix cartridge	5	0	302
29	61	Vent cartridge	2	0	304
30	98	Begin loop UPPER	60	0	304
31	2	Vortex reaction vessel on	15	0	2089
32	3	Vortex reaction vessel off	13	0	2102
33	41	Vent reaction vessel	2	0	2104
34	99	End loop UPPER	1	0	2104

**Abbildung C.7.: Modul F**

**20µM spezial.kem - \* Conditional Vortex (5 min.)**

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed	
1	137	Do module if condition not met	2	0	0
2	2	Vortex reaction vessel on	300	0	300
3	3	Vortex reaction vessel off	1	0	301

**Abbildung C.8.: Modul i**

### 20 $\mu$ M spezial.kem - Cap 1 min

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 1	Wait	1	0	1
2 9	Flush top valve block with gas to waste	2	0	3
3 42	Drain reaction vessel to waste	10	0	13
4 77	Pressurize Cappinging	10	0	23
5 17	Flush bottom valve block with Cappinging to waste	2	0	25
6 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	27
7 2	Vortex reaction vessel on	1	0	28
8 52	Deliver Cappinging to reaction vessel	6	0	34
9 40	Mix reaction vessel	2	0	36
10 41	Vent reaction vessel	2	0	38
11 1	Wait	60	0	98
12 3	Vortex reaction vessel off	1	0	99

Abbildung C.9.: Modul C

### 20 $\mu$ M spezial.kem - Final DCM Washes

Function Number	Name	Time	Add Time	Elapsed
1 1	Wait	1	0	1
2 12	Flush bottom valve block with DCM to waste	2	0	3
3 9	Flush top valve block with gas to waste	2	0	5
4 10	Flush bottom valve block with gas to waste	2	0	7
5 98	Begin loop UPPER	6	0	7
6 2	Vortex reaction vessel on	1	0	188
7 55	Deliver DCM to reaction vessel	5	0	193
8 40	Mix reaction vessel	2	0	195
9 1	Wait	5	0	200
10 3	Vortex reaction vessel off	1	0	201
11 42	Drain reaction vessel to waste	7	0	208
12 41	Vent reaction vessel	2	0	210
13 49	Flow DCM through reaction vessel to waste	3	0	213
14 42	Drain reaction vessel to waste	10	0	223
15 99	End loop UPPER	1	0	223
16 42	Drain reaction vessel to waste	30	0	253
17 29	Flow DCM through activator to waste	5	0	258
18 22	Drain activator to waste	20	0	278
19 11	Flush top valve block with DCM to waste	2	0	280
20 12	Flush bottom valve block with DCM to waste	2	0	282
21 10	Flush bottom valve block with gas to waste	5	0	287
22 9	Flush top valve block with gas to waste	5	0	292

Abbildung C.10.: Modul c



# Literaturverzeichnis

- [1] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.
- [2] J. Markl, *Markl Biologie*, Ernst Klett Verlag: Stuttgart, **2010**.
- [3] G. Wise, L. Goldstein, Electron microscope localization of nuclear RNA's that shuttle between cytoplasm and nucleus and nuclear RNA's that do not, *J. Cell Biol.* **1973**, *56*, 129-38.
- [4] A. Travers, Regulation by anti-sense RNA, *Nature* **1984**, *311*, 410.
- [5] L. He, G. J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522-31.
- [6] A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing Plants, *Science* **1999**, *286*, 950-2.
- [7] S. D. Gilbert, R. T. Batey, Riboswitches: fold and function, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 805-7.
- [8] B. Beal, Duplex RNA-binding enzymes: headliners from neurobiology, virology and development, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 257-66.
- [9] E. Bernstein, A. Denli, G. Hannon, The rest is silence, *RNA* **2001**, *7*, 1509-21.
- [10] T. Melcher, S. Maas, A. Herb, R. Sprengel, P. Seeburg, M. Higuchi, A mammalian RNA editing enzyme, *Nature* **1996**, *379*, 460-4.
- [11] M. O'Connell, A. Gerber, W. Keller, Purification of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) involved in editing of brain glutamate receptor B pre-mRNA, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 473-8.
- [12] B. Williams, PKR, a sentinel kinase for cellular stress, *Oncogene* **1999**, *18*, 6112-20.
- [13] M. Delarue, RNA Structure, *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1989**, *3*, 182-96.

- [14] SYBYL 7.0, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [15] H. M. Möller, M. A. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, P. E. Wright, Solution structure of the N-terminal zinc fingers of the *Xenopus laevis* double-stranded RNA-binding protein ZFa, *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 718-30.
- [16] C. Carlson, O. Stephens, P. Beal, Recognition of Double-Stranded RNA by Proteins and Small Molecules, *Biopolymers* **2003**, *70*, 86-102.
- [17] A. Lingel, M. Sattler, Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 107-15.
- [18] T. Hermann, D. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 829-49.
- [19] R. Batey, R. Rambo, J. Doudna, Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2326-43.
- [20] J. Nowakowski, I. J. Tinoco, *Nucleic acid structure: RNA structure in solution*, Oxford Science Publication: Oxford, **1999**.
- [21] V. Dötsch, Protein-DNA interactions, *Methods Enzymol.* **2001**, *339*, 343-57.
- [22] C. Garvie, C. Wolberger, Recognition of specific DNA sequences, *Molecules and Cells* **2001**, *8*, 937-46.
- [23] D. J. Segal, C. F. Barbas 3rd, Design of novel sequence-specific DNA-binding proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 34-9.
- [24] D. E. Wemmer, Designed sequence-specific minor groove ligands, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439-61.
- [25] D. Jantz, B. T. Amann, G. J. Gatto Jr., J. M. Berg, The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 789-99.
- [26] M. Foster, D. Wuttke, I. Radhakrishnan, D. Case, J. Gottesfeld, P. Wright, Domain packing and dynamics in the DNA complex of the N-terminal zinc fingers of TFIIIA, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 605-8.
- [27] J. Hanas, D. Hazuda, D. Bogenhaben, F. Wu, C. Wu, *Xenopus* transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14120-5.
- [28] P. J. Finerty Jr., B. L. Bass, A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids, *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 195-208.

- 
- [29] I. Fierro-Monti, M. Mathews, Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 241-6.
- [30] D. St Johnston, N. H. Brown, J. G. Gall, M. Jantsch, A conserved double-stranded RNA-binding domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10979-83.
- [31] S. J. McCormack, D. C. Thomis, C. E. Samuel, Mechanism of interferon action: Identification of a RNA binding domain within the N-terminal region of the human RNA-dependent P1/eIF-2 $\alpha$  protein kinase, *Virology* **1992**, *188*, 47-56.
- [32] S. Green, M. Mathews, Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 2478-90.
- [33] R. Stefl, L. Skrisovska, F. H. Allain, RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 33-8.
- [34] J. Ryter, S. Schultz, Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7505-13.
- [35] A. Ramos, S. Grunert, J. Adams, D. Micklem, M. Proctor, S. Freund, M. Bycroft, D. St Johnston, G. Varani, RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain, *EMBO J.* **2000**, *19*, 997-1009.
- [36] H. Wu, A. Henras, G. Chanfreau, J. Feigon, Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8307-12.
- [37] J. Blaszczyk, J. Gan, J. Tropea, D. Court, D. Waugh, X. Ji, Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA, *Structure* **2004**, *12*, 457-66.
- [38] J. Gan, J. E. Tropea, B. P. Austin, D. L. Court, D. S. Waugh, X. Ji, Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III, *Cell* **2006**, *124*, 355-66.
- [39] J. Gan, G. Shaw, J. E. Tropea, D. S. Waugh, D. L. Court, X. Ji, A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III, *Mol. Microbiol.* **2008**, *67*, 143-54.
- [40] R. Stefl, F. C. Oberstrass, J. L. Hood, M. Jourdan, M. Zimmermann, L. Skrisovska, C. Maris, L. Peng, C. Hofr, R. B. Emeson, F. H. Allain, The solution structure of the ADAR2 dsRBM-RNA complex reveals a sequence-specific readout of the minor groove, *Cell* **2010**, *143*, 225-37.

- [41] J. Vargason, G. Szittyta, J. Burgyan, T. Tanaka Hall, Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor, *Cell* **2003**, *115*, 799-811.
- [42] K. Ye, L. Malinina, D. Patel, Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing, *Nature* **2003**, *426*, 874-8.
- [43] J. Chao, J. Lee, B. Chapados, E. Debler, A. Schneemann, J. Williamson, Dual modes of RNA-silencing suppression by flock house virus protein B2, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 952-7.
- [44] A. Lingel, B. Simon, E. Izaurralde, M. Sattler, The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 1149-55.
- [45] J. Diprose, J. Grimes, G. Sutton, J. Burroughs, A. Meyer, S. Maan, P. Mertens, D. Stuart, The core of bluetongue virus binds double-stranded RNA, *J. Virol.* **2002**, *76*, 9533-6.
- [46] D. Lu, M. Searles, A. Klug, Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition, *Nature* **2003**, *426*, 96-100.
- [47] P. J. Finerty Jr., B. L. Bass, Subsets of the zinc finger motifs in dsRBP-ZFa can bind double-stranded RNA, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4001-7.
- [48] M. Yang, W. May, T. Ito, JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27399-406.
- [49] F. Hellborg, W. Qian, C. Mendes-Vidal, C. Asker, M. Kost-Alimova, M. Wilhelm, S. Imreh, K. Wiman, Human wig-1, a p53 target gene that encodes a growth inhibitory zinc finger protein, *Oncogene* **2001**, *20*, 5466-74.
- [50] D. Israeli, E. Tessler, Y. Haupt, A. Elkeles, S. Wilder, R. Amson, A novel p53-inducible gene PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4384-92.
- [51] S. Varmeh-Ziaie, I. Okan, Y. Wang, K. Magnusson, P. Warthoe, M. Strauss, K. Wiman, Wig-1. A new p53-induced gene encoding a zinc finger protein, *Oncogene* **1997**, *15*, 2699-704.
- [52] C. Zhou, R. H. Huang, Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16142-7.

- [53] A. Andreeva, A. G. Murzin, A fortuitous insight into a common mode of RNA recognition by the dsRNA-specific zinc fingers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, E128-9.
- [54] G. Chanfreau, M. Buckle, A. Jacquier, Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3142-47.
- [55] G. Chanfreau, S. Abou Elela, M. Ares, C. Guthrie, Alternative 3'-end processing of U5snRNA by RNase III, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 2741-51.
- [56] J. Cavaille, M. Nicoloso, J. Bachellerie, Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides, *Nature* **1996**, *383*, 732-5.
- [57] Z. Kiss-Laszlo, Y. Henry, J. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer, T. Kiss, Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs, *Cell* **1996**, *85*, 1077-88.
- [58] K. Tycowski, M. Shu, J. Steitz, A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products, *Nature* **1996**, *379*, 464-6.
- [59] P. Ganot, M. Bortolin, T. Kiss, Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs, *Cell Adhes. Commun.* **1997**, *89*, 799-809.
- [60] J. Ni, A. Tien, M. J. Fournier, Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA, *Cell* **1997**, *89*, 565-73.
- [61] S. Knight, B. Bass, A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*, *Science* **2001**, *293*, 2269-71.
- [62] M. Danin-Kreiselman, C. Lee, G. Chanfreau, RNase III-mediated deradation of unspliced pre-mRNA's and lariats introns, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1279-89.
- [63] D. Ge, B. Lanontagne, S. Abou Elela, RNase III-mediated silencing of a glucose-dependent repressor in yeast, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 140-5.
- [64] G. Chanfreau, P. Legrain, A. Jacquier, Yeast RNase III as a Key Processing Enzyme in Small Nucleolar RNAs Metabolism, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 975-88.
- [65] H. Wu, P. Yang, S. Butcher, S. Kang, G. Chanfreau, J. Feigon, A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for *Saccharomyces cerevisiae* RNase III, *EMBO J.* **2001**, *20*, 7240-9.

- [66] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459-76.
- [67] Q. Liu, D. J. Segal, J. B. Ghiara, C. F. Barbas 3rd, Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5525-30.
- [68] W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: effects of compound structure on RNA versus DNA interaction strength, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098-104.
- [69] E. V. Scott, R. L. Jones, D. L. Banville, G. Zon, L. G. Marzilli, W. D. Wilson,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR investigations of actinomycin D binding selectivity with oligodeoxyribonucleotides containing multiple adjacent d(GC) sites, *Biochemistry* **1988**, *27*, 915-23.
- [70] E. V. Scott, G. Zon, L. G. Marzilli, W. D. Wilson, 2D NMR investigation of the binding of the anticancer drug actinomycin D to duplexed dATGCGCAT: conformational features of the unique 2:1 adduct, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7940-51.
- [71] W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Cegla, J. Sychala, M. Demeunynck, J. Lhomme, G. Krishnan, D. Kennedy, Bulged-Base nucleic acids as potential targets for antiviral drug action, *New J. Chem.* **1994**, *18*, 419-23.
- [72] V. Peytou, R. Condom, N. Patino, R. Guedj, A. M. Aubertin, N. Gelus, C. Bailly, R. Terreux, D. Cabrol-Bass, Synthesis and antiviral activity of ethidium-arginine conjugates directed against the TAR RNA of HIV-1, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4042-53.
- [73] S. Kirk, N. Luedtke, Y. Tor, Neomycin-Acridine Conjugate: A Potent Inhibitor of Rev-RRE Binding, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 980-1.
- [74] Y. C. Liaw, Y. G. Gao, H. Robinson, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H. Wang, Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9913-8.
- [75] M. Jourdan, J. Garcia, J. Lhomme, M. P. Teulade-Fichou, J. P. Vigneron, J. M. Lehn, Threading bis-intercalation of a macrocyclic bisacridine at abasic sites in DNA: nuclear magnetic resonance and molecular modeling study, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14205-13.

- [76] V. Guelev, J. Lee, J. Ward, S. Sorey, D. W. Hoffman, B. L. Iverson, Peptide bis-intercalator binds DNA via threading mode with sequence specific contacts in the major groove, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 415-25.
- [77] M. Zhao, L. Janda, J. Nguyen, L. Streckowski, W. D. Wilson, The interaction of substituted 2-phenylquinoline intercalators with poly(A).poly(U): classical and threading intercalation modes with RNA, *Biopolymers* **1994**, *34*, 61-73.
- [78] C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, The binding mode of drugs to the TAR RNA of HIV-1 studied by electric linear dichroism, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1460-4.
- [79] L. Ratmeyer, M. L. Zapp, M. R. Green, R. Vinayak, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Inhibition of HIV-1 Rev-RRE interaction by diphenylfuran derivatives, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13689-96.
- [80] Q. Vicens, E. Westhof, RNA as a drug target: the case of aminoglycosides, *Chem-BioChem* **2003**, *4*, 1018-23.
- [81] F. Walter, Q. Vicens, E. Westhof, Aminoglycoside-RNA interactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 694-704.
- [82] D. Moazed, H. F. Noller, Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA, *Nature* **1987**, *327*, 389-94.
- [83] T. Pape, W. Wintermeyer, M. Rodnina, Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3800-7.
- [84] Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site, *Structure* **2001**, *9*, 647-58.
- [85] Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747-55.
- [86] Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-88.
- [87] A. Giannis, T. Kolter, Peptidomimetics for Receptor Ligands - Discovery, Development, and Medical Perspectives, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-67.
- [88] J. Gante, Peptidomimetics - Tailored Enzyme Inhibitors, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699-720.

- [89] R. A. Wiley, D. H. Rich, Peptidomimetics derived from natural products, *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327-84.
- [90] G. L. Olson, *et al.* Concepts and progress in the development of peptide mimetics, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3039-49.
- [91] V. J. Hruby, Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1073-82.
- [92] S. H. Ferreira, L. H. Greene, V. A. Alabaster, Y. S. Bakhle, J. R. Vane, Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme, *Nature* **1970**, *225*, 379-80.
- [93] J. A. Martin, M. A. Mobberley, S. Redshaw, A. Burke, A. S. Tyms, T. A. Ryder, The inhibitory activity of a peptide derivative against the growth of simian immunodeficiency virus in C8166 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *176*, 180-8.
- [94] D. Jiao, K. Russel, V. J. Hruby, Locally constrained tyrosine analogues with restricted side chain dynamics, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3511-20.
- [95] L. A. Schuresko, R. S. Lokey, A practical solid-phase synthesis of Glu7-phalloidin and entry into fluorescent F-actin-binding reagents, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3547-9.
- [96] M. Katsara, T. Tselios, S. Deraos, G. Deraos, M. T. Matsoukas, E. Lazoura, J. Matsoukas, V. Apostolopoulos, Round and round we go: cyclic peptides in disease, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2221-32.
- [97] P. Wipf, Synthetic Studies of Biologically Active Marine Cyclopeptides, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115-34.
- [98] Y. U. Kwon, T. Kodadek, Quantitative comparison of the relative cell permeability of cyclic and linear peptides, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 671-7.
- [99] A. Patgiri, A. L. Jochim, P. S. Arora, A hydrogen bond surrogate approach for stabilization of short peptide sequences in alpha-helical conformation, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1289-300.
- [100] R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-54.

- [101] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using Na-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1981**, 538-46.
- [102] W. Chan, P. White, *Fmoc Solid Phase Synthesis - A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, **2004**.
- [103] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-52.
- [104] A. R. Katritzky, S. Kazuyuki, S. K. Singh, N-Acylation in combinatorial chemistry, *ARKIVOC* **2004**, *i*, 12-35.
- [105] P. White, B. Dörner, Novabiochem Katalog: Peptide Synthesis, 2010.
- [106] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P.), *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-22.
- [107] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-8.
- [108] S. Seeberger, *Kombinatorische Synthese und Screening cyclischer Neoglycopeptide als multivalente Lektinliganden*, Dissertation, Frankfurt am Main **2004**.
- [109] R. Steinauer, F. M. F. Chen, N. L. Benoiton, Studies on racemization associated with the use of benzotriazol-1-yl-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP), *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 295-8.
- [110] D. Hudson, Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures., *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617-24.
- [111] K. D. Wehrstedt, P. A. Wandrey, D. Heitkamp, Explosive properties of 1-hydroxybenzotriazoles, *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126*, 1-7.
- [112] L. A. Carpino, A. El-Faham, G. A. Truran, C. A. Minor, S. A. Kates, G. W. Griffin, H. Shroff, S. A. Triolo, F. Albericio, New approaches for extending the scope of solid-phase peptide synthesis. in *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium*, Mayflower Worldwide Ltd.: Birmingham, 1993.

- [113] N. L. Benoiton, Y. C. Lee, R. Steinaur, F. M. F. Chen, Studies on sensitivity to racemization of activated residues in couplings of N-benzyloxycarbonyldipeptides, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 559-66.
- [114] S. Arttamangkul, B. Arbogast, D. Barofsky, J. V. Aldrich, Characterization of synthetic peptide byproducts from cyclization reactions using online HPLC-ion spray and tandem mass spectrometry, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 357-70.
- [115] S. C. Story, J. V. Aldrich, Side-product formation during cyclization with HBTU on a solid support, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 292-6.
- [116] L. A. Carpino, 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-98.
- [117] F. Albericio, L. A. Carpino, Coupling reagents and activation, *Methods Enzymol.* **1997**, *289* (*Solid-Phase Peptide Synthesis*), 104-26.
- [118] T. Escherich, Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings, *Fortschritte der Medizin* **1885**, *3*, 515-22.
- [119] F. W. Studier, B. A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113-30.
- [120] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* **1990**, *185*, 60-89.
- [121] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366-71.
- [122] K. V. Pervushin, G. Wider, R. Riek, K. Wuthrich, The 3D NOESY-[(1)H,(15)N,(1)H]-ZQ-TROSY NMR experiment with diagonal peak suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9607-12.
- [123] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wuthrich, Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4918-23.
- [124] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wüthrich, NMR analysis of a 900K GroEL - GroES complex, *Nature* **2002**, *418*, 207-10.

- 
- [125] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-46.
- [126] A. Bax, D. G. Davis, MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1985**, *65*, 355-60.
- [127] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2009.
- [128] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **1992**.
- [129] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy., *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-53.
- [130] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-9.
- [131] A. Bax, M. F. Summers, Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-4.
- [132] P. J. Hore, J. O. Norman, L. J. Thomas, Solvent suppression, *Methods Enzymol.* **1989**, *176*, 64-77.
- [133] W. S. Price, Water Signal Suppression in NMR Spectroscopy, *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **1999**, *38*, 289-354.
- [134] D. Gauss, D. Klingler, Enhanced Proton NMR Water Suppression by the WATER-NIXSY Technique, *JBSBC* **2009**, *1*, 25-7.
- [135] D. I. Hoult, Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation, *J. Magn. Res.* **1976**, *21*, 337-47.
- [136] I. D. Campbell, C. M. Dobson, R. G. Ratcliffe, Fourier transform proton NMR in H<sub>2</sub>O. A method for measuring exchange and relaxation rates, *J. Magn. Res.* **1977**, *27*, 455-63.
- [137] J. D. Stoesz, A. G. Redfield, D. Malinowski, Cross relaxation and spin diffusion effects on the proton NMR of biopolymers in H<sub>2</sub>O: Solvent saturation and chemical exchange in superoxide dismutase, *FEBS Lett.* **1978**, *91*, 320-4.
- [138] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenár, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-5.

- [139] V. Sklenár, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, Gradient-Tailored Water Suppression for  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity, *J. Magn. Res., Series A* **1993**, *102*, 241-5.
- [140] M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1998**, *132*, 125-9.
- [141] T. L. Hwang, A. J. Shaka, Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients, *J. Magn. Res., Series A* **1995**, *112*, 275-9.
- [142] T. Parella, P. Adell, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, Effective multiple-solvent suppression scheme using the excitation sculpting principle, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 245-9.
- [143] H. Kessler, S. Seip, *NMR of Peptides*, Two-Dimensional NMR Spectroscopy Wiley VCH: Weinheim, 2. Aufl., **1994**.
- [144] M. Karplus, Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-5.
- [145] M. Karplus, Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-1.
- [146] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, **1998**.
- [147] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311-33.
- [148] D. S. Wishart, B. D. Sykes, The  $^{13}\text{C}$  chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using  $^{13}\text{C}$  chemical-shift data, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-80.
- [149] D. S. Wishart, B. D. Sykes, Chemical shifts as a tool for structure determination, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 363-92.
- [150] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-51.

- 
- [151] S. Schwarzingler, G. J. Kroon, T. R. Foss, P. E. Wright, H. J. Dyson, Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: implementation of random coil shift data in NMRView, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 43-8.
- [152] S. Schwarzingler, G. J. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright, H. J. Dyson, Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2970-8.
- [153] R. W. Woody, Optical rotatory properties of biopolymers, *Journal of Polymer Science: Macromolecular Reviews* **1977**, *12*, 181-320.
- [154] R. W. Wood, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine* **1902**, *4*, 396-402.
- [155] T. Turbadar, Complete Absorption of Light by Thin Metal Films, *Proc. Phys. Soc.* **1959**, *73*, 40-4.
- [156] M. A. Cooper, Optical biosensors in drug discovery, *Nature Reviews: Drug Discovery* **2002**, *1*, 515-28.
- [157] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513-26.
- [158] J. Paolo, Biacore T100: An overview of underlying concepts, basic operation, experimental techniques and potential application, *Präsentation: [http://biomed.brown.edu/epscor\\_proteomics/JPBiacorePresentation.pdf](http://biomed.brown.edu/epscor_proteomics/JPBiacorePresentation.pdf)* **2006**, .
- [159] S. Leavitt, E. Freire, Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 560-6.
- [160] G. J. Praefcke, C. Herrmann, Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen, *Biospektrum* **2005**, *11*, 44-6.
- [161] A. G. Polson, B. L. Bass, Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase, *EMBO J.* **1994**, *13*, 5701-11.
- [162] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406-15.
- [163] H. Möller, Persönliche Mitteilung, 2010.

- [164] QIAprep Miniprep Handbook, 2006.
- [165] H. S. Leong, T. Yates, C. Wilson, C. J. Miller, ADAPT: a database of affymetrix probesets and transcripts, *Bioinformatics* **2005**, *21*, 2552-3.
- [166] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3784-8.
- [167] D. Gauss, *Entwicklung eines Mimetikums des Helix-turn-helix-Motivs aus dem Xenopus laevis double-strandes RNA-binding protein ZFa*, Diplomarbeit, Konstanz **2006**.
- [168] M. Karplus, G. A. Petsko, Molecular dynamics simulations in biology, *Nature* **1990**, *347*, 631-9.
- [169] G. Fuentes, S. G. Dastidar, A. Madhumalar, C. S. Verma, Role of protein flexibility in the discovery of new drugs, *Drug Dev. Res.* **2011**, *72*, 26-35.
- [170] D. B. Melville, Biotin sulfoxide, *J. Biol. Chem.* **1954**, *208*, 495-501.
- [171] K. Upadhyya, I. K. Khattak, B. Mullah, Oxidation of biotin during oligonucleotide synthesis, *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* **2005**, *24*, 919-22.
- [172] S. Boehm, Praktikumsbericht zum Schwerpunktkurs NMR-Spektroskopie **2008**.
- [173] C. Kallay, K. Osz, A. David, Z. Valastyan, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sovago, Zinc(ii) binding ability of tri-, tetra- and penta peptides containing two or three histidyl residues, *Dalton Transactions* **2007**, *36*, 4040-7.
- [174] J. Haseloff, W. L. Gerlach, Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities, *Nature* **1988**, *334*, 585-91.
- [175] A. Jenne, W. Gmelin, N. Raffler, M. Famulok, Real-Time Characterization of Ribozymes by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1300-03.
- [176] A. Jenne, J. S. Hartig, N. Piganeau, A. Tauer, D. A. Samarsky, M. R. Green, J. Davies, M. Famulok, Rapid identification and characterization of hammerhead-ribozyme inhibitors using fluorescence-based technology, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 56-61.
- [177] F. Sicherl, *Synthese und Anwendung orthogonal geschützter Zuckerdiaminosäuren*, Dissertation, Konstanz **2006**.

- [178] E. Nicolás, M. Vilaseca, E. Giralt, A Study of the Use of NH<sub>4</sub>I for the Reduction of Methionine Sulfoxide in Peptides containing Cysteine and Cystine, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5701-10.
- [179] A. Gerster, *Nachbildung der  $\alpha$ 1-Helix des Proteins Rnt1p als minimale Erkennungsstruktur für die kleine Furche von RNA-hairpins*, Zulassungsarbeit Lehramt, Konstanz **2006**.
- [180] H. Rau, *Photoisomerization of Azobenzenes*, Band 2 of *Photochemistry and Photo-physics*, CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, **1990**.
- [181] J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, Photo-control of helix content in a short peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3803-8.
- [182] A. A. Beharry, O. Sadvoski, G. A. Woolley, Photo-control of peptide conformation on a timescale of seconds with a conformationally constrained, blue-absorbing, photo-switchable linker, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4323-32.
- [183] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, P. Hamm, Alpha-helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2379-84.
- [184] N. Pozhidaeva, M.-E. Cormier, A. Chaudhari, G. A. Woolley, Reversible Photocontrol of Peptide Helix Content: Adjusting Thermal Stability of the Cis State, *Bioconj. Chem.* **2004**, *15*, 1297-303.
- [185] L. Chi, O. Sadvoski, G. A. Woolley, A Blue-Green Absorbing Cross-Linker for Rapid Photoswitching of Peptide Helix Content, *Bioconj. Chem.* **2006**, *17*, 670-6.
- [186] V. Borisenko, G. A. Woolley, Reversibility of conformational switching in light-sensitive peptides, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, *173*, 21-8.
- [187] D. G. Flint, J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, Using an Azobenzene Cross-Linker to Either Increase or Decrease Peptide Helix Content upon Trans-to-Cis Photoisomerization, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 391-7.
- [188] A. Prestel, *Synthese eines photoschaltbaren RNA-erkennenden Peptids*, Bachelorarbeit, Konstanz **2008**.
- [189] R. O'Hair, G. E. Reid, Neighboring group versus cis-elimination mechanisms for side chain loss from protonated methionine, methionine sulfoxide and their peptides, *Eur. J. Mass Spectrom.* **1999**, *5*, 325-34.

- [190] L. Moroder, Persönliche Mitteilung, 2009.
- [191] G. Fischer, A. Ehlers, A. Zumbusch, E. Daltrozzo, Near-Infrared Dyes and Fluorophores Based on Diketopyrrolopyrroles, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3750-3.
- [192] G. Fischer, M. Isomäki-Kron Dahl, I. Göttker-Schnetmann, E. Daltrozzo, A. Zumbusch, Pyrrolopyrrole Cyanine Dyes: A New Class of Near-Infrared Dyes and Fluorophores, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4857-64.
- [193] R. Tsien, L. Ernst, A. Waggoner, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer: New York, **2006**.
- [194] J. Lippincott-Schwartz, G. Patterson, Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells, *Science* **2003**, *300*, 87.
- [195] M. Goncalves, Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes, *Chem. Rev.* **2008**, *109*, 190-212.
- [196] A. Becker, C. Henssenius, K. Licha, B. Ebert, U. Sukowski, W. Semmler, B. Wiedenmann, C. Grotzinger, Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 327-31.
- [197] R. Weissleder, C.-H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 375-8.
- [198] Y. Ye, S. Bloch, B. Xu, S. Achilefu, Design, Synthesis, and Evaluation of Near Infrared Fluorescent Multimeric RGD Peptides for Targeting Tumors, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2268-75.
- [199] G. M. Fischer, C. Jungst, M. Isomaki-Kron Dahl, D. Gauss, H. M. Moller, E. Daltrozzo, A. Zumbusch, Asymmetric PPCys: Strongly fluorescing NIR labels, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5289-91.
- [200] M. Lewin, N. Carlesso, C. H. Tung, X. W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, R. Weissleder, Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 410-4.
- [201] A. Prochiantz, Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 629-34.

- [202] P. Lundberg, U. Langel, A brief introduction to cell-penetrating peptides, *J. Mol. Recog.* **2003**, *16*, 227-33.
- [203] T. Holm, H. Johansson, P. Lundberg, M. Pooga, M. Lindgren, U. Langel, Studying the uptake of cell-penetrating peptides, *Nature Prot.* **2006**, *1*, 1001-5.
- [204] A. El-Faham, R. Subiros Funosas, R. Prohens, F. Albericio, COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404-16.
- [205] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-8.
- [206] S. K. Shannon, G. Barany, 4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)phenylhydrazine (FmPH): A New Chromophoric Reagent for Quantitative Monitoring of Solid-Phase Aldehydes, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4586-94.
- [207] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **1990**, *96*, 23-8.
- [208] Z. Kulic, *Towards the structure determination of the protein neurolin*, Masterarbeit, Konstanz **2009**.
- [209] R. L. Keller, *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, Cantina Verlag: Goldau, **2004**.
- [210] M. Baier, Praktikumsbericht zum Schwerpunktkurs NMR-Spektroskopie, Konstanz **2008**.





