

7. Festphasenpeptidsynthese

7.1 Einführung in die Problemstellung

Peptide haben als Regulations- und Wirkstoffe für alle Lebensvorgänge eine essentielle Bedeutung. In den vergangenen Jahrzehnten wurden enorme Fortschritte hinsichtlich der Aufklärung ihrer Struktur und Funktionsweise erzielt, was vor allem zu einem besseren Verständnis biochemischer Regulationsmechanismen beigetragen hat. Die Vielfalt der über Peptidbindungen verknüpfbaren Aminosäuren und Aminosäurederivate sowie der sich daraus ableitenden strukturellen Aspekte von Peptiden sind wesentliche Untersuchungsgegenstände des Forschungsgebiets der Peptidchemie.

Die von Bruce Merrifield 1963 entdeckte Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) ist ein Prozess, der aufgrund seines Charakters von sich wiederholenden Schritten ideal zur Automatisierung geeignet ist. SPPS basiert auf der schrittweisen Anlagerung von α -Amino- und Seitenketten-geschützten Aminosäuren an einen unlöslichen Träger (Harz) unter Ausbildung einer Amidbindung zwischen der Peptidkette und der jeweils neu einzuführenden Aminosäure (Abb. 1). In den meisten Fällen besteht der polymere Träger aus Polystyrolkugeln, in denen die Polymerketten mit 1 % Divinylbenzol leicht quervernetzt wurden. Die Synthese erfolgt entgegen der natürlichen Proteinbiosynthese vom C- zum N-Terminus. Als Schutz für die N^α -Funktion des Peptidrückgrates werden z.B. die säurelabile Boc- oder die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe verwendet (Abb. 2). Diese sollen gewährleisten, dass an jede Peptidkette pro Syntheseschritt nur ein Aminosäurebaustein gekoppelt wird. Nach Entfernen dieser Schutzgruppe kann die nächste N^α -geschützte Aminosäure unter Verwendung von Kopplungsreagenzien zugegeben werden.

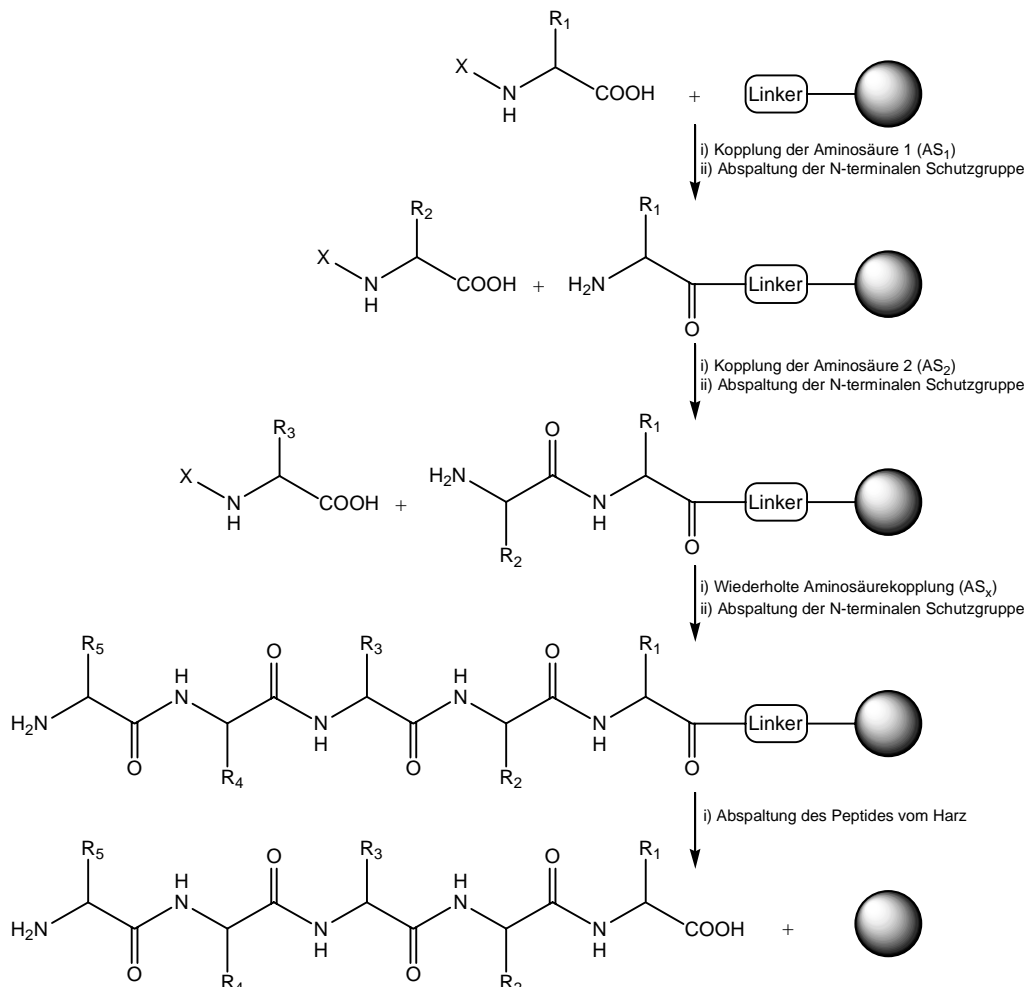
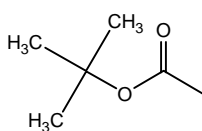


Abb. 1. Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese

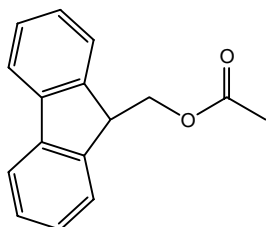
Das resultierende Peptid ist über einen „Linker“, einer reversibel abspaltbaren Ankergruppierung, am Harz gebunden und kann nach der Abspaltung, in Abhängigkeit vom Linker, u.a. als Säure oder Säureamid erhalten werden. Die Seitenkettenschutzgruppen werden oftmals so gewählt, dass sie gleichzeitig mit der Abspaltung des Peptids vom Harz entfernt werden können. Im Unterschied zur Boc-Strategie, wo sehr starke Säuren (HF, Trifluormethansulfonsäure) notwendig sind, erfolgt die Abspaltung bei der Fmoc-Strategie unter milderen Bedingungen (Trifluoressigsäure). N,N-Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan (DCM) sind die vorrangig in der SPPS eingesetzten Lösungsmittel für die Kopplung und Waschvorgänge.

Die Peptidsynthese kann mit verschiedenen Techniken ausgeführt werden. In einem Filterreaktionsgefäß werden die Reagenzien unter manueller (siehe Versuchsdurchführung) oder Computer-gesteuerter Kontrolle zugegeben und entfernt. Während hier einzelne Verbindungen entstehen, existieren auch multiple und kombinatorische Methoden zur simultanen Synthese einer Vielzahl verschiedener Peptiden, was z.B. für Screening-Zwecke bei der Wirkstoffsuche von Interesse ist.

Schutz von NH_2 -Gruppen

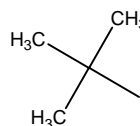


tert.-Butyloxycarbonyl (Boc)



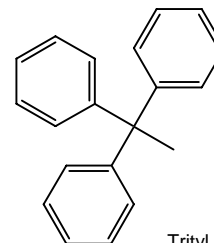
9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)

Schutz von COOH-Gruppen



tert.-Butyl ($t\text{Bu}$)

Schutz von OH-Gruppen



Trityl (Trt)

Abb. 2. α -Amino- und Seitenkettenschutzgruppen in der SPPS

Im Versuch wird das säurelabile Rink-Amid-MBHA-Harz verwendet (Abb. 3). Dieses Harz besteht aus einem modifizierten Rink-Amid-Linker, der über Norleucin (Nle) an das MBHA (4-Methylbenzhydrylamin)-Harz gekoppelt ist. Es ist ideal zur Herstellung von Peptidamiden nach der Fmoc-Strategie geeignet.

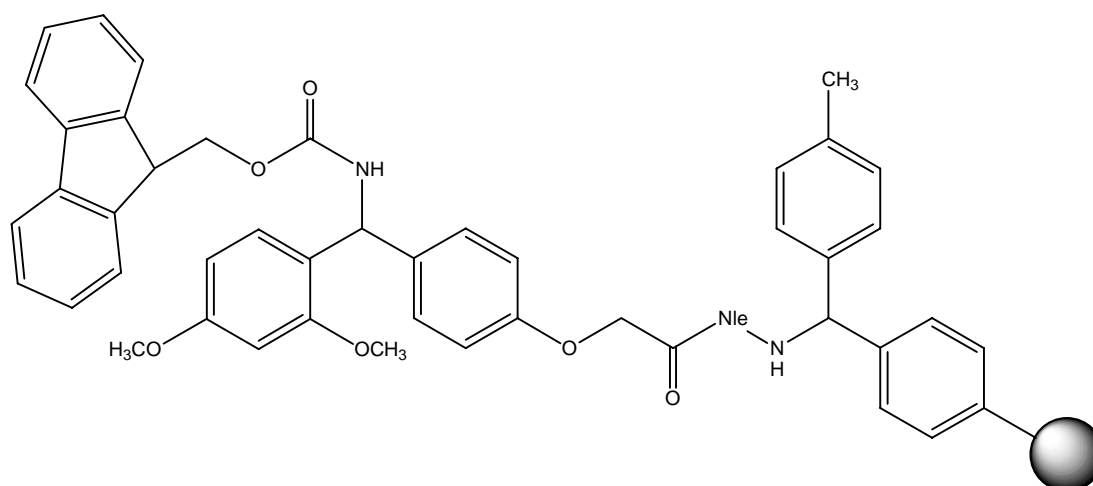


Abb. 3. 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxyacetamido-norleucyl-MBHA-Harz (Rink-Amid-MBHA-Harz)

Im Praktikum werden Peptide nach der Fmoc-Strategie mit HBTU und HOBt als Kopplungsreagenzien und Diisopropylethylamin (DIEA) als Hilfsbase synthetisiert. HBTU und HOBt gehören zu einer Reihe von kommerziell erhältlichen Kopplungsreagenzien, die aus der Carboxylgruppe der zu koppelnden Fmoc-Aminosäure zunächst einen Aktivester erzeugen, der dann aminolytisch an der Aminogruppe gespalten werden kann. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe zur Kettenverlängerung erfolgt mit einer 20 %igen Piperidin/DMF-Lösung.

7.2. Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

7.2.1 Festphasenpeptidsynthese

50 mg Rink-Amid-MBHA-Harz (0,64 mmol/g Beladung) werden mit einer Fmoc-Aminosäure beladen. Dazu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Die Beladung des Harzes ist durch spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration des gebildeten Dibenzo-fulven-Piperidin-Adduktes zu ermitteln. Anschließend wird die erste Aminosäure gekoppelt. Zur Erhöhung der Ausbeute werden Doppelkopplungen durchgeführt (siehe Protokoll).

Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe erneut abgespalten. Danach ist eine weitere Aminosäure anzukoppeln. Die Fmoc-geschützten Dipeptide werden nach Trocknung im zweiten Teil des Versuches (Versuch 8, Aminosäureanalytik) abgespalten und für die HPLC und MALDI-Massenspektrometrie vorbereitet.

Aufgaben:

- 1) Anhand der Fmoc-Bestimmung sind die Ausgangsbeladung und die Ausbeute der ersten Aminosäurekopplung zu ermitteln (Angaben jeweils in mmol/g und %).
- 2) Über das Trockengewicht des Harzes nach der Synthese, die Beladung nach der ersten Kopplung und die Molmasse des Fmoc-Dipeptides ist der Massezuwachs nach Ankopplung der beiden Aminosäuren zu berechnen.
- 3) Nach Bestimmung des Gewichtes an Rohprodukt ist die Ausbeute zu berechnen und bezüglich der theoretischen Ausbeute in Prozent anzugeben.

Versuchsdurchführung:

Das unten schematisch skizzierte Protokoll ist für die einzelnen Syntheseschritte vorzubereiten und zum Praktikum mitzubringen. Die Berechnung der Einwaagen erfolgt im Praktikum.

Reaktionsschritt	Zeit	Reagenzien	Bemerkungen
1. Quellen	20 min	DMF II	
2. Fmoc-Abspaltung	1. 5 min 2. 15 min	20 % Piperidin/DMF	Abspalllösungen werden in Maßkölbchen zur Fmoc-Bestimmung aufbewahrt!
3. Waschen	10 x 1 min	3 x DMF I 3 x DCM 4 x DMF II	Nach der Fmoc-Abspaltung muß intensiv gewaschen werden!
4. Kopplung	1. 30 min 2. 3 x 1 min* 3. 30 min	4 eq. Fmoc-Aminosäure 4 eq. HBTU 4 eq. HOBt 8 eq. DIEA 500 µl DMF	*Zwischen den Kopplungen wird 3 x mit DMF II gewaschen.

5. Waschen	5 x 1 min	DMF III	
6. Fmoc-Abspaltung	1. ... 2.	
7. Waschen	
8. Kopplung	
9. Waschen	

Nach Kopplung der zweiten Aminosäure wird das Harz getrocknet und gewogen.

Die einzelnen DMF-Lösungen unterscheiden sich wie folgt:

DMF I: niedrige Qualität, Verwendung direkt nach der Fmoc-Abspaltung

DMF II: höchste Qualität, getrocknet und destilliert, Verwendung zur Kopplung, zum Waschen direkt vor und während der Kopplung

DMF III: mittlere Qualität, entgast, Verwendung nach der Aminosäurekopplung

7.2.2 Abspaltung des Peptides vom Harz

Achtung! Zur Durchführung dieses Reaktionsschrittes sind Handschuhe und Schutzbrille zu tragen!

Aufgabe:

Das synthetisierte Fmoc-Dipeptid wird vom polymeren Träger nach unten angegebener Vorschrift entfernt. Nach Trocknung (nächster Tag) wird das Gewicht des Rohproduktes bestimmt.

Versuchsdurchführung:

- Nachdem das Harz gewogen und in ein Plastikreagenzröhrchen überführt wurde, werden 500µl 95 % TFA/H₂O zugegeben. Die Mischung wird eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. In der Zwischenzeit wird Diethylether kalt gestellt und Reagenzröhrchen, Pipetten u.a. für die Peptidfällung vorbereitet.
- Die Harz-Suspension wird nach Ablauf der Reaktionszeit über einen Filter in kaltem Diethylether filtriert und zweimal mit 95 % TFA/H₂O gewaschen. Das Filtrat wird zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird noch zweimal mit Diethylether gewaschen und zentrifugiert.
- Nachdem der Diethylether entfernt wurde, wird der Rückstand in 80 %igem tert. Butanol aufgenommen und für die Lyophilisierung eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgt über Nacht. Am nächsten Tag wird die Probe analytisch mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Versuch 8).

7.3 Kontrollfragen

1. Informieren Sie sich über die Unterschiede zwischen Lösungs- und Festphasenpeptid-synthese (SPPS). Welche Vorteile hat die SPPS gegenüber der Lösungssynthese? Gibt es Nachteile?
2. Welche polymeren Träger werden eingesetzt? Mit welchen Linkern können Peptide als C-terminale Säuren bzw. Säureamide generiert werden?
3. Welche Methoden der Aminosäurekopplung kommen hauptsächlich zum Einsatz? Erläutern Sie zwei verschiedene Reaktionsmechanismen!
4. Aus welchem Grund wird bei der Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger Wasser zugesetzt? Welche anderen Reagenzien kommen zu diesem Zweck ebenfalls zum Einsatz?

7.4 Literaturhinweise

Jakubke, H.-D., Peptide: Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/Oxford, 1996, S. 170-244.

White, P., Dörner, B., Steinauer, R., Novabiochem Synthesis Notes, Kapitel 1-3.
www.merckbiosciences.de/www.vwr.com