

# Peptid- und DNA-Synthese

Vortrag von Tobias Brodmann

## Inhalt:

<b>1. Peptidsynthese.....</b>	<b>2</b>
1.1 Einleitung.....	2
1.2 Aminosäuren.....	3
1.3 Peptide.....	5
1.4 Proteinstrukturen.....	6
1.4.1 $\beta$ -Faltblatt.....	7
1.4.2 $\alpha$ -Helix.....	8
1.4.3 Turnstrukturen.....	9
1.5 Peptidsynthese.....	10
1.5.1 Schutzgruppen für die Peptidsynthese.....	11
1.5.2 Aktivierung der Carbonsäurefunktion.....	13
1.5.3 Peptid-Festphasensynthese.....	16
<b>2. DNA-Synthese.....</b>	<b>19</b>
2.1 Einleitung.....	19
2.2 Struktur der DNA.....	19
2.3 Synthese der DNA.....	23
2.3.1 Synthese der Nucleoside.....	23
2.3.2 Synthese der Nucleotide.....	24
2.3.3 Schutzgruppen in der DNA-Synthese.....	26
2.3.4 Der Kopplungsvorgang und das Capping.....	28
<b>3. Literaturverzeichnis.....</b>	

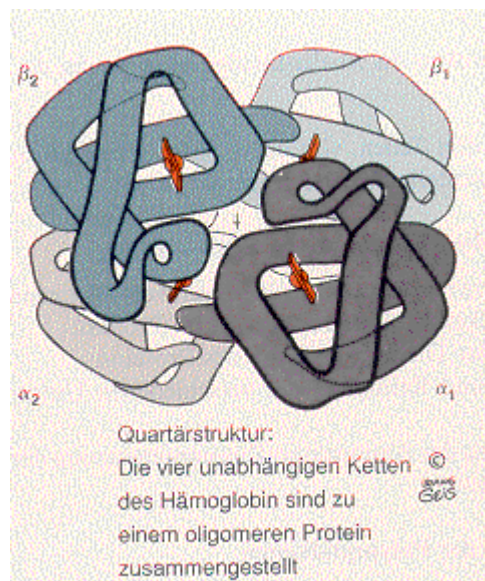
# 1. Peptidsynthese

## 1.1 Einleitung

Proteine spielen in dem menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle. Sie sind die molekularen Werkzeuge für die meisten zellulären Funktionen. Proteine werden u.a. als Elemente zur Speicherung und zum Transport anderer Stoffe, zur Signalübermittlung innerhalb des Organismus und zur Bewegung und Abwehr von Fremdstoffen eingesetzt. Zusätzlich regulieren Proteine in Form von Enzymen den Stoffwechsel, indem sie chemische Reaktionen in der Zelle selektiv beschleunigen. Allgemein sind Proteine darauf spezialisiert, andere Moleküle spezifisch und reversibel zu binden. In Übereinstimmung mit ihren verschiedenen Funktionen variieren sie auch stark in ihrer Struktur. Jeder Proteintyp besitzt eine einzigartige dreidimensionale Gestalt oder Konformation [1].

Trotz ihrer Verschiedenartigkeit sind alle Proteine Polymere, die aus demselben Satz von 20 Aminosäuren aufgebaut sind, den universellen Monomeren der Proteine. Polymere aus Aminosäuren, die in bestimmter Reihenfolge miteinander verknüpft sind, werden Polypeptide genannt. Ein Protein besteht aus einer oder mehreren Polypeptidketten, die in spezifischer Konformation gefaltet und gewunden sind (siehe Abb. 1).

Aminosäuren sind organische Moleküle, die sowohl eine Carboxyl- als auch eine Aminogruppe tragen. Zellen bauen ihre mehrere tausend verschiedene Proteine aus nur 20 Arten von Aminosäuren auf. Zwar treten in Organismen noch einige andere Aminosäuren mit wichtigen Funktionen auf, diese werden aber nicht in Proteine eingebaut.



**Abb. 1:** Quartärstruktur d. Hämoglobin [4]

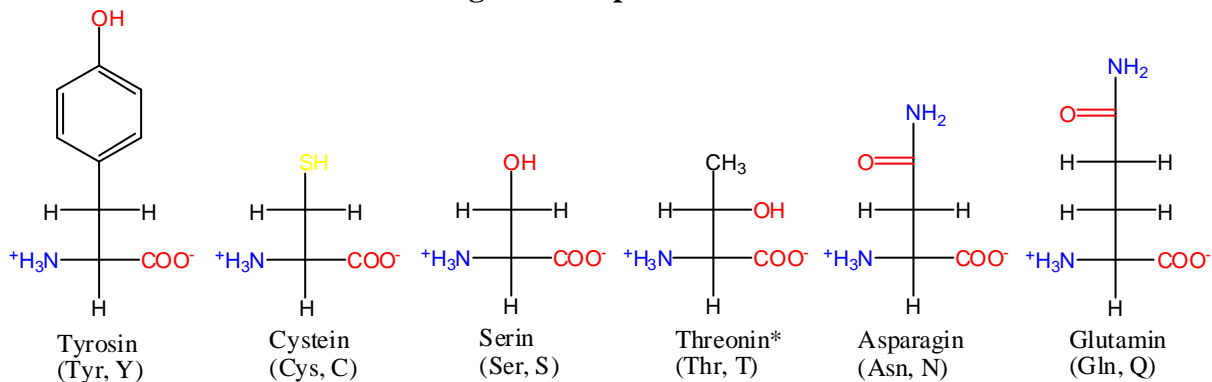
## 1.2 Aminosäuren

Aminosäuren spielen als Bestandteile der Peptide und Proteine sowie als Ausgangsprodukt für die Biosynthese einer Vielzahl stickstoffhaltiger Naturstoffe eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Organismen. Sie sind organische Moleküle, die sowohl eine Carboxyl- als auch eine Aminogruppe tragen. Korrekt bezeichnet handelt es sich um  $\alpha$ -Aminosäuren, die eine  $\alpha$ -Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ) und eine Carboxylgruppe ( $-\text{COOH}$ ) enthalten.

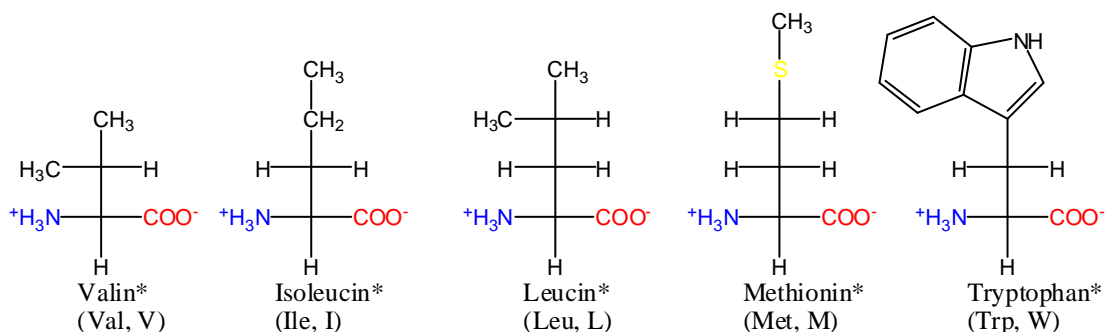
Nur Mikroorganismen und Pflanzen können alle benötigten Aminosäuren selbst synthetisieren. Essentielle Aminosäuren, die Tieren und Menschen mit der Nahrung zugeführt werden müssen, sind die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Lysin, Phenylalanin und Tryptophan (in Abb. 2 mit \* versehen) [9].

Man kann die Aminosäuren nach den Eigenschaften ihrer Seitenketten ordnen. In Klammern sind der Drei-Buchstaben-Code und der Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren angegeben.

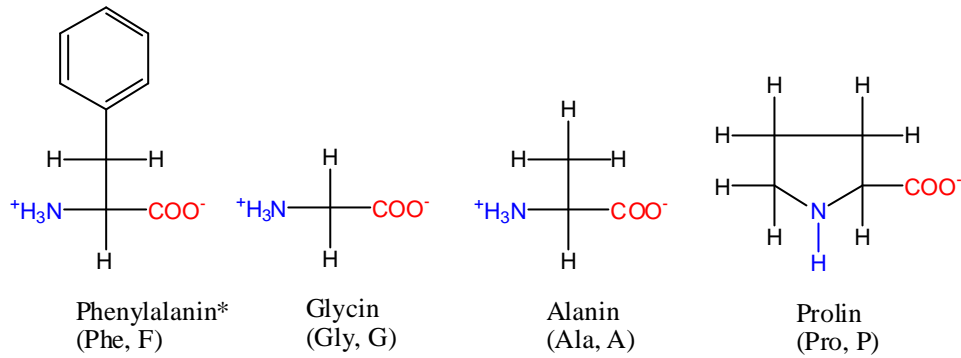
### Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten



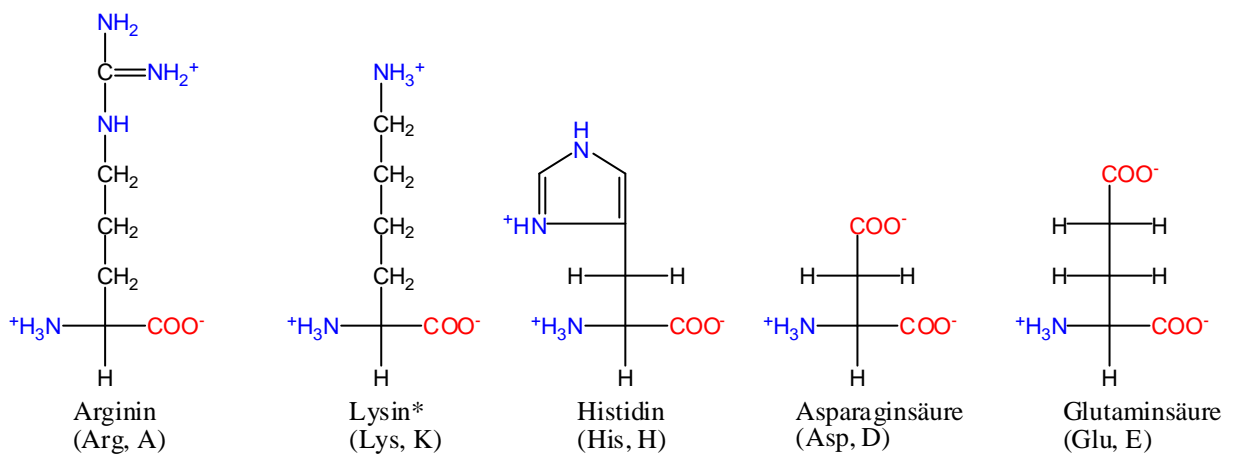
### Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten I



## Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten II

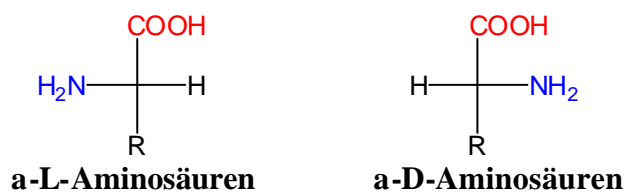


## Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten



**Abb. 2:** Darstellung der 20 „Standard“-Aminosäuren, aus denen alle Proteine zusammengesetzt sind [20]

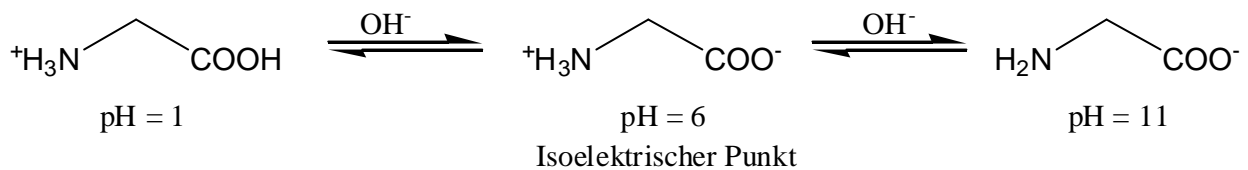
Mit einer Ausnahme (Glycin) bestehen  $\alpha$ -Aminosäuren aus einem asymmetrischen Kohlenstoffatom und sind daher chiral. Von den zwei möglichen Enantiomeren trifft man in den Proteinen nur solche mit L-Konfiguration an. In der FISCHER-Projektion, bei der die C-Kette senkrecht und das C-Atom mit der niedrigsten Positionsnummer oben steht, ist die Aminogruppe der L-Aminosäuren links, die der D-Aminosäuren rechts angeordnet.



L-Aminosäuren können racemisieren, wobei die Racemisierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert, der Temperatur und anderen Faktoren wie der Anwesenheit von Metallionen abhängt.

Ein besonderes Problem stellt die Racemisierung während der chemischen Peptidsynthese dar.

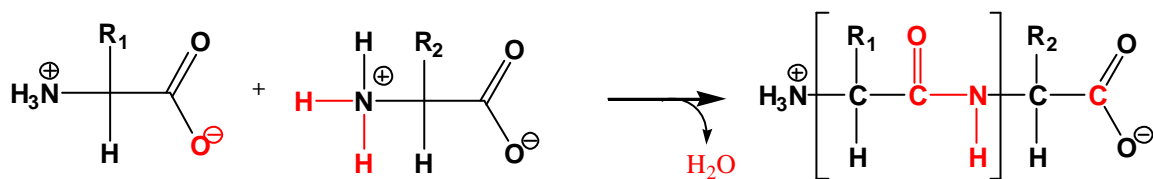
Aminosäuren zeigen sowohl saure als auch basische Eigenschaften, sind also amphoter. In saurer Lösung ist eine Aminosäure vollständig protoniert. Bei einem pH-Wert von 6 liegen die meisten vorhandenen Teilchen in der zwitterionischen Form der Aminosäure vor. Der pH-Wert der Lösung an diesem Punkt entspricht dem pH-Wert einer Lösung von Aminosäure in reinem Wasser. Dieser Punkt wird Isoelektrischer Punkt genannt. Die intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen sowie die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen besitzen an diesem Punkt ein Maximum.



**Abb. 3:** Aminosäuren in unterschiedlichen pH-Bereichen [10]

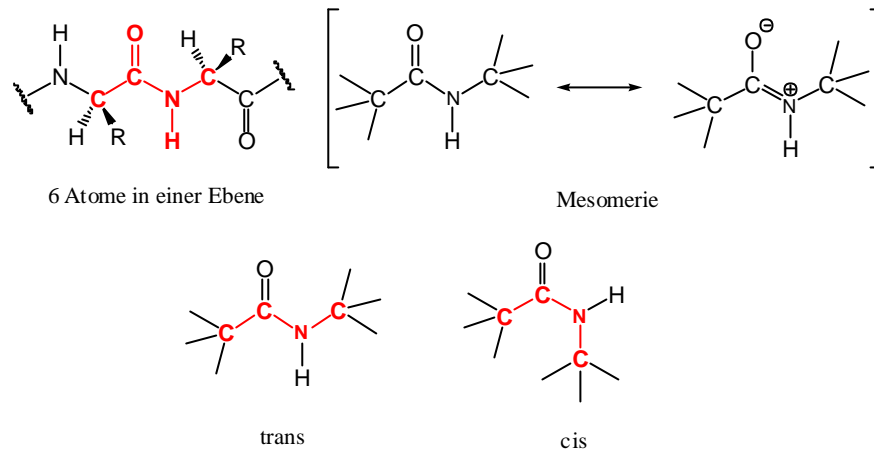
### 1.3 Peptide

Peptide entstehen durch wiederholte, amidartige Verknüpfung der  $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure. Die bei diesen Kondensationsreaktionen entstehenden Polypeptide besitzen ein sich wiederholendes Rückgrat  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CHR}-$ , an das die Aminosäuresseitenketten geknüpft sind.



**Abb. 4:** Durch Kondensation zweier Aminosäuren entsteht ein Dipeptid; die Peptidbdg. ist rot dargestellt [4]

Die chemischen Eigenschaften der Peptide werden zum großen Teil durch die Amidgruppe bestimmt. Das freie Elektronenpaar am Stickstoffatom kann in Konjugation zur Carbonylgruppe treten, wodurch die Peptidbindung stark resonanzstabilisiert ist. Der durch diese Mesomerie entstehende Doppelbindungscharakter äußert sich auch in der Bindungslänge von 0.132 nm der C-N-Bindung (C=N-Doppelbdg.: 0.125 nm, C-N-Einfachbdg.: 0.147 nm) [14].



**Abb. 5:** Struktur der Peptidbindung [14]

Durch den Doppelbindungscharakter ist die Amidbindung in Peptiden nicht frei drehbar und somit relativ starr. Dadurch können cis- und trans-Anordnungen unterschieden werden. Bei den meisten Peptiden und Proteinen liegt die Amidgruppe in der thermodynamisch stabileren trans-Form vor.

#### 1.4 Proteinstrukturen

Bei der Synthese eines Polypeptids in einer Zelle faltet sich die Kette spontan, um die typische funktionelle Konformation des Proteins anzunehmen. Dabei wird die sich bildende dreidimensionale Proteinstruktur durch eine Vielzahl chemischer Bindungen zwischen Teilen der Kette stabilisiert. Es können vier verschiedene Strukturebenen unterschieden werden.

##### 1. Primärstruktur

Die Primärstruktur ist die einzigartige Abfolge seiner Aminosäuren. Selbst eine geringfügige Änderung der Primärstruktur kann die Konformation und Funktionsfähigkeit eines Proteins beeinflussen.

Bsp.: usw.-Cys-Ser-Leu-Tyr-usw.

Anfang der 50er Jahre wurde an der Universität Cambridge von Frederick Sanger zum ersten Mal die Aminosäuresequenz des Hormons Insulin bestimmt [1].

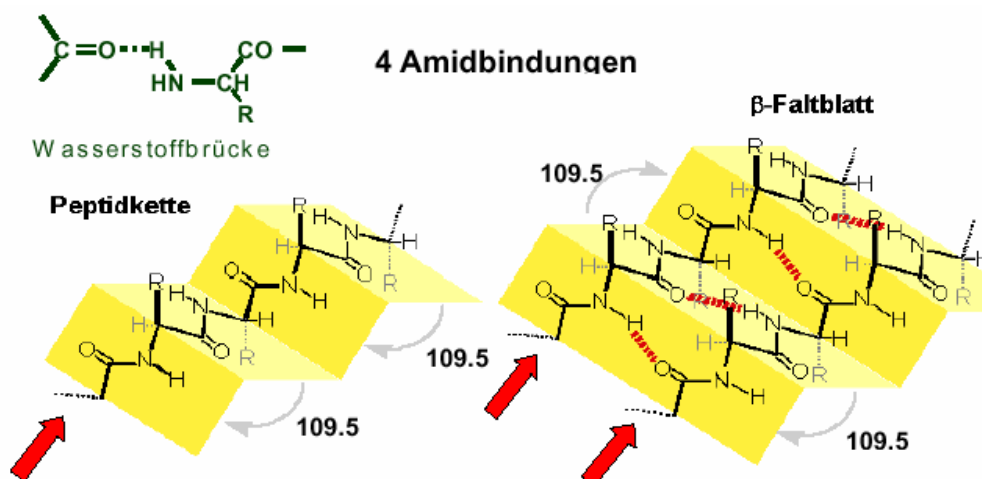
##### 2. Sekundärstruktur

Die meisten Proteine haben in ihrer Polypeptidkette Abschnitte, die wiederholt in bestimmten Mustern gedreht oder gefaltet sind und zur Gesamtkonformation des Proteins beitragen. Diese Windungen und Faltungen werden als Sekundärstrukturen bezeichnet

und resultieren aus Wasserstoffbrücken. Durch Röntgenbeugungsuntersuchungen von Corey und Pauling (Nobelpreis 1954) konnten diese Strukturen erkannt werden.

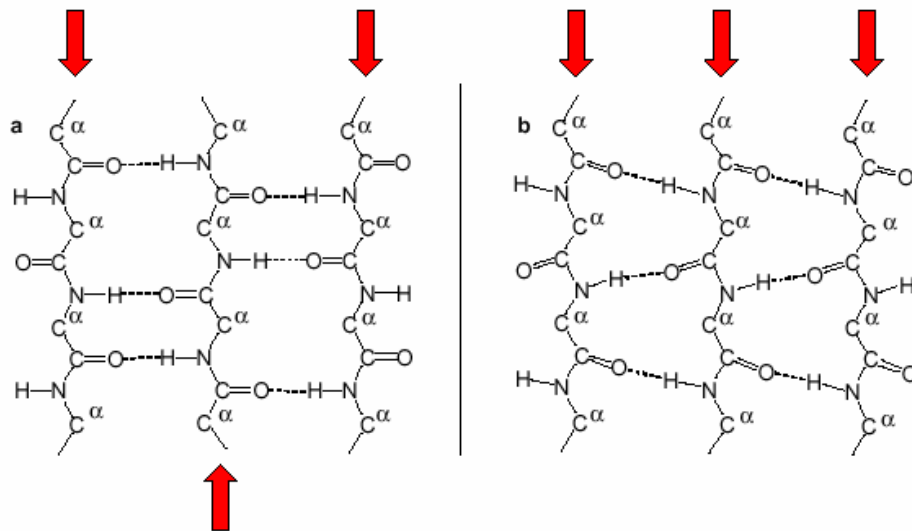
#### 1.4.1 Das $\beta$ -Faltblatt

Faltblattstrukturen können sowohl innerhalb einer Polypeptidkette als auch zwischen verschiedenen Polypeptidketten ausgebildet werden. Beim  $\beta$ -Faltblatt liegen die Peptidketten in nahezu gestreckter Konformation vor. Die Seitenreste stehen abwechselnd nach beiden Seiten senkrecht von der Faltblatt-Ebene ab, in welcher Wasserstoffbrückenbindungen die Ketten zusammenhalten.



**Abb. 6:**  $\beta$ -Faltblattstruktur von Proteinen, Strangrichtung, Wasserstoffbrücken, und Bindungswinkel [14]

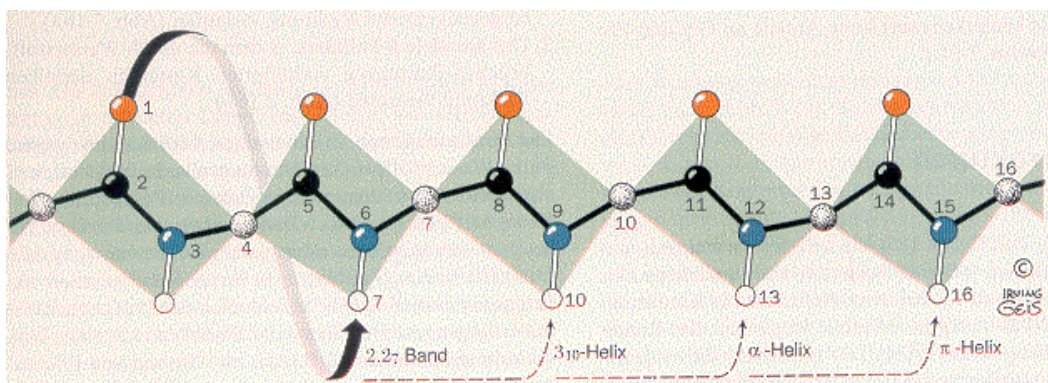
Die Ketten können entweder parallel oder antiparallel nebeneinander angeordnet sein. Bei dem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt verlaufen die benachbarten Polypeptidketten in entgegengesetzter Richtung (links), bei dem parallelen  $\beta$ -Faltblatt verlaufen die durch Wasserstoffbrückenbindungen verknüpften Ketten in derselben Richtung (rechts). Bei der antiparallelen Anordnung sind die NH- und die CO-Gruppe der Aminosäure in einem Strang jeweils über WBB mit der CO- und NH-Gruppe eines Partners auf dem benachbarten Strang verbunden. Im parallelen Fall ist das Muster der Wasserstoffbrücken etwas komplizierter. In jeder Aminosäure ist die NH-Gruppe mit der CO-Gruppe auf dem benachbarten Strang über eine WBB verknüpft, wohingegen die CO-Gruppe mit einer NH-Gruppe Wasserstoffbrücken bildet, die auf dem Strang zwei Reste weiter gelegen ist [10].



**Abb. 7:** Antiparallele (links) und parallele (rechts) Faltblattstruktur (nach Corey u. Pauling) [14]

#### 1.4.2 Die $\alpha$ -Helix

Die  $\alpha$ -Helix ist eine feine Spirale, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten wird. Eine Helix wird durch die Zahl  $n_m$  charakterisiert, wobei  $n$  die Zahl der Aminosäureeinheiten pro Spiralgang und  $m$  die Anzahl der Atome des durch die Wasserstoffbrücke gebildeten Ring ist, benannt. Es gibt mehrere helicale Konformationen, die Polypeptide ausbilden könnten. Nur die  $\alpha$ -Helix besitzt aber erlaubte Konformationswinkel und starke, stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Helix kann rechts- oder linksgängig sein. Die rechtsgängige  $\alpha$ -Helix dreht aufwärts gegen den Uhrzeigersinn und beendet nach 3,6-Aminosäure-Einheiten eine Windung. Rechts- und Linksschraube verhalten sich zueinander wie Enantiomere. Die WBB werden zwischen der 1. und 4. Peptidbindung ausgebildet.



**Abb. 8:** Anordnung der Wasserstoffbrücken bei verschiedenen Polypeptid-Helices [4]

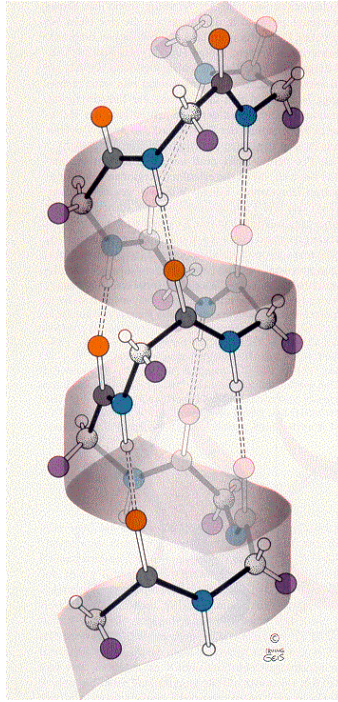


Abb. 9: Rechtsgängige  $\alpha$ -Helix [4]

### 1.4.3 Turnstrukturen

Ein weiteres wichtiges Konformationselement ist der Turn. Unter einem Turn versteht man eine Richtungsänderung der Peptidkette um  $180^\circ$ . Dabei können sowohl vier Aminosäuren beim  $\beta$ -Turn als auch drei Aminosäuren beim  $\gamma$ -Turn beteiligt sein. Die beteiligten Aminosäuren werden entsprechend ihrer Position von 1 bis 4 bzw. von 1 bis 3 durchnummeriert. Die Turns werden über eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff C=O in der Position 1 und dem Amidproton N-H des Aminosäurerestes in der Position 4 bzw. 3 stabilisiert [13].

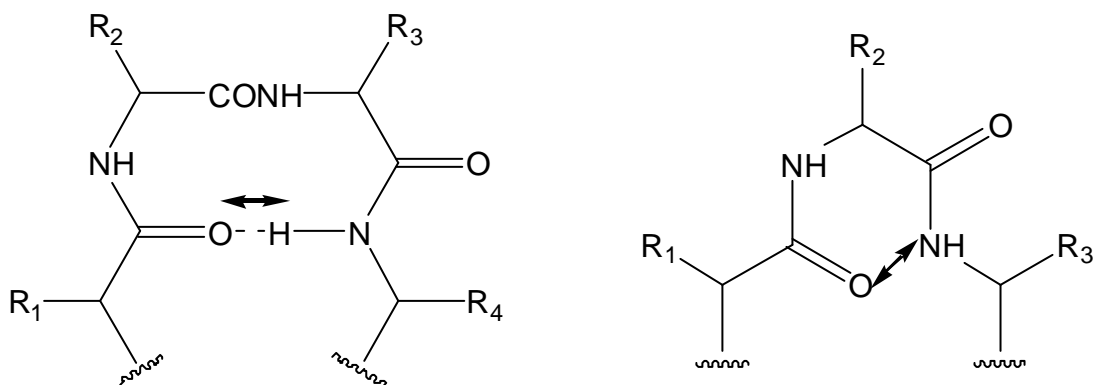


Abb. 10: Turnstrukturen:  $\beta$ -Turn (links),  $\gamma$ -Turn (rechts) [13]

Aufgrund verschiedener Winkelkombinationen an den Positionen 2 und 3 des  $\beta$ -Turns wird dieser in sechs Typklassen unterteilt.

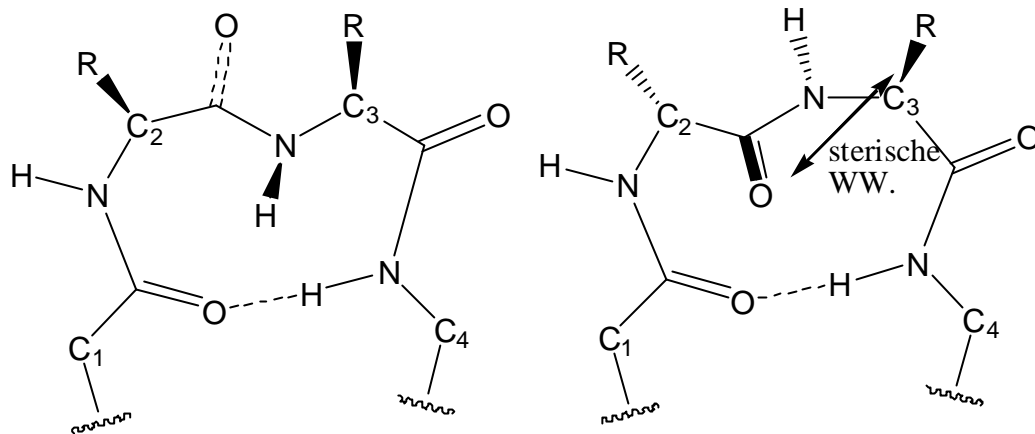


Abb. 11: Typ 1 und 2 des  $\beta$ -Turns [12]

### 3. Tertiärstruktur

Die meisten Proteine falten sich über die Sekundärstruktur hinaus, bei der Alpha-Helices oder Beta-Faltblätter entstehen, noch weiter. Diese nächste Stufe der Faltung bezeichnet man als Tertiärstruktur. Diese Struktur wird durch verschiedene Bindungen stabilisiert.

### 4. Quartärstruktur

Viele Proteine bestehen aus zwei oder mehr Polypeptidketten, die zu einem funktionsfähigen Molekül assoziiert sind. Die Quartärstruktur ist die Gesamtstruktur eines Proteins, die sich aus der Zusammenlagerung seiner Polypeptide ergibt.

## 1.5 Peptidsynthese

Bei der Biosynthese der Proteine wird die Reihenfolge der Aminosäuren der Polypeptidkette durch den in der DNA verankerten genetischen Code festgelegt.

Bei einer Totalsynthese von Peptiden werden wiederholt Amidbindungen aus der  $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe der anderen Aminosäure geknüpft. Bei dem Mechanismus der Amidbildung handelt es sich um einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe wird von dem Stickstoffatom des Amins nucleophil angegriffen. Das instabile tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt dann durch Abspaltung einer Abgangsgruppe.

Bei einer Peptidsynthese muss die geringe Carbonylaktivität der Carboxylgruppe berücksichtigt werden. Die unterschiedlichen Carbonsäurederivate weisen unterschiedliche Carbonylaktivitäten und somit unterschiedliche Reaktivitäten bei Additions-Eliminierungs-Reaktionen auf [5].

Resonanzstabilisierung nimmt ab, Reaktivität steigt

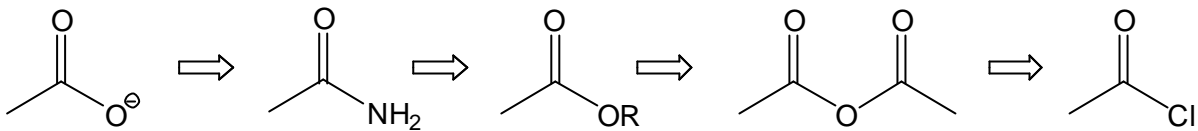


Abb. 12: Stabilisierung bei Carbonsäurederivaten [5]

Um eine Peptidbindung bilden zu können, muss die Carboxylatfunktion aktiviert werden.

Das zweite Problem der chemischen Peptidsynthese besteht darin, eine festgelegte und eindeutige Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren zu erreichen. Dafür ist eine umfangreiche Schutzgruppenchemie erforderlich. Funktionelle Gruppen der Seitenketten von Aminosäuren müssen während der Synthese permanent geschützt werden (OH-Gruppen werden häufig in Ether überführt, die im Vergleich zu Boc-Schutzgruppen sehr säurestabil sind). Die  $\alpha$ -Aminogruppe muss dagegen temporär geschützt werden. Weiterhin müssen die Versuchsbedingungen und Schutzgruppen so gewählt werden, dass eine Racemisierung der Aminosäuren verhindert wird. Eine Peptidsynthese verläuft im allgemeinen in drei Stufen:

1. Einführung der Schutzgruppen
2. Aktivierung und Kupplungsreaktion
3. Abspaltung der Schutzgruppen

### 1.5.1 Schutzgruppen für die Peptidsynthese

Für die Kupplung muss die Aminogruppe der einen Aminosäure geschützt werden, da sonst nach der Aktivierung der Carboxylat-Gruppe die Aminosäure mit sich selbst reagieren könnte.

Folgende Schutzgruppen für die Aminogruppe werden häufig in der Peptidsynthese verwendet:

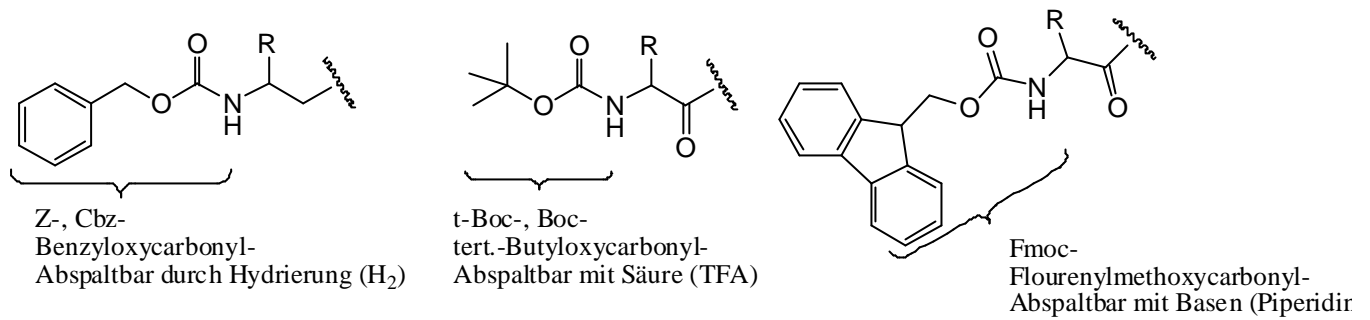


Abb. 13: Gebräuchliche Schutzgruppen für die Aminogruppe [14]

Bei diesen Schutzgruppen handelt es sich um Ester der Carbaminsäure (Urethane).

Die Benzyloxycarbonylgruppe kann durch Umsetzen der Aminkomponente mit Benzylchloroformiat oder durch Umsetzung des Natriumsalzes der Aminosäure mit Cbz-N-Hydroxysuccinimid eingeführt werden.

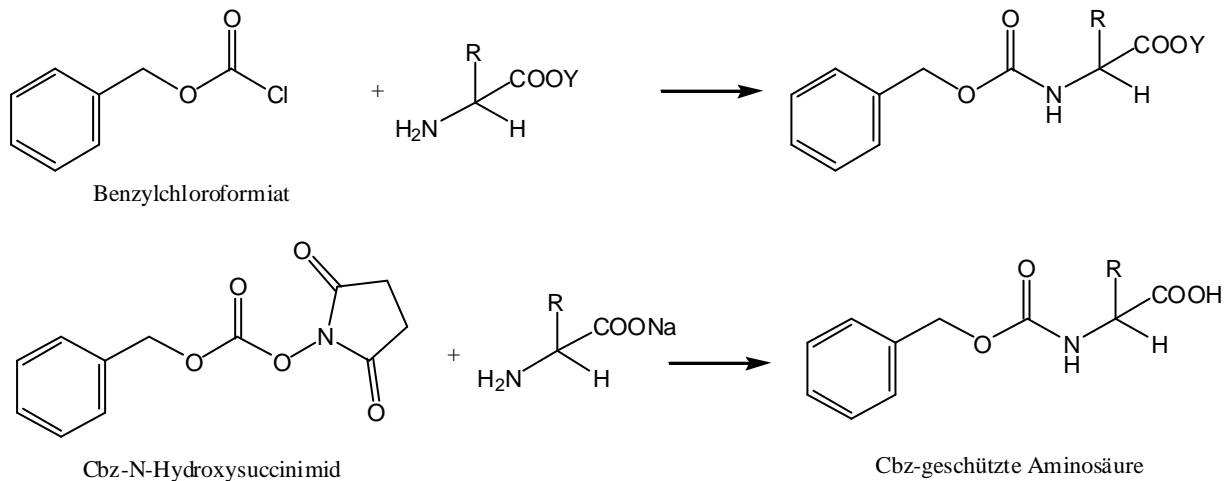


Abb. 14: Einführung der Cbz-Schutzgruppe [14]

Die Abspaltung der Benzyloxycarbonylschutzgruppe kann durch katalytische Hydrierung oder durch säurekatalysierte Hydrolyse erfolgen.

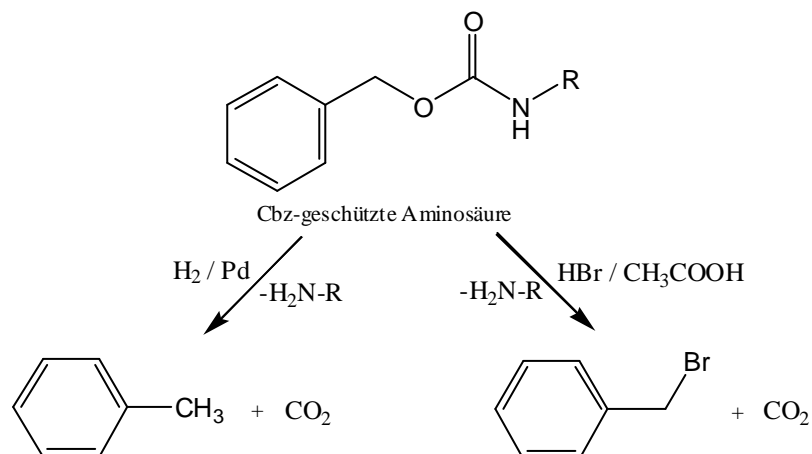


Abb. 15: Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe [14]

Eine weitere wichtige Schutzgruppe ist die tert.-Butyloxycarbonylgruppe (t-Boc-). Die Aminogruppe kann z.B. mit t-Butyloxycarbonylazid umgesetzt und so geschützt werden.

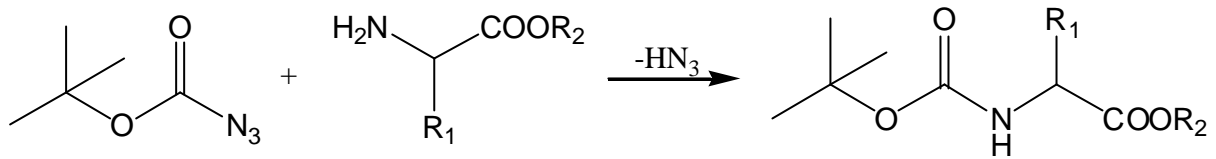
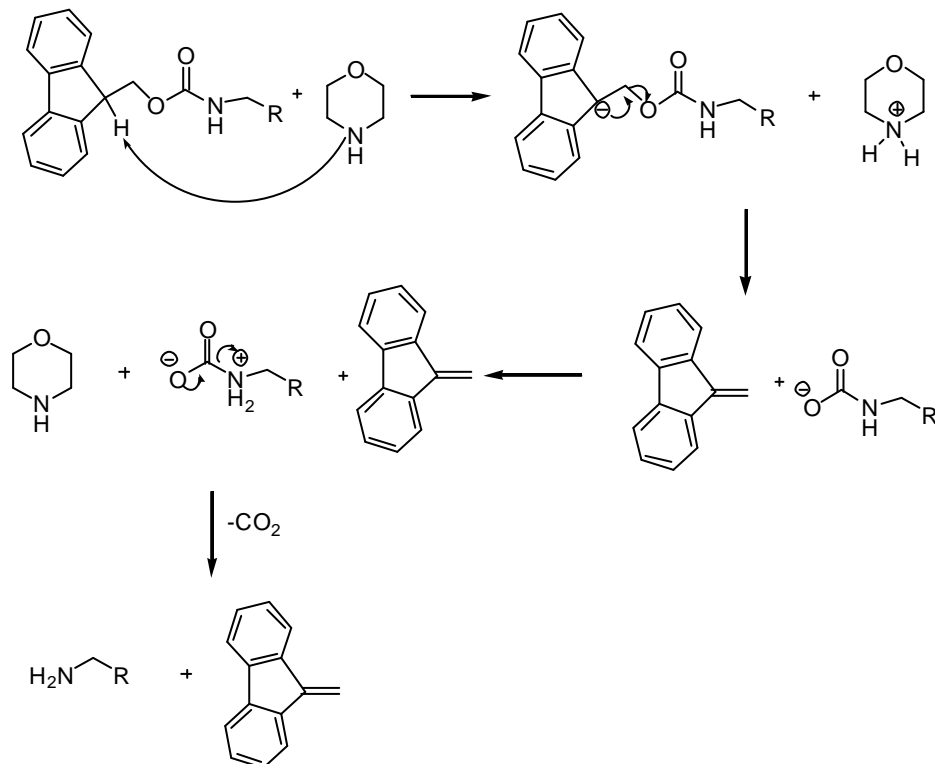


Abb. 16: Einführung der t-Boc-Schutzgruppe [14]

Durch säurekatalysierte Hydrolyse kann die t-Boc-Schutzgruppe entfernt werden. Durch Protonierung und Abspaltung eines Carbokations entsteht die instabile Carbamidsäure, die zu dem Amin und  $\text{CO}_2$  zerfällt. Die t-Boc-Schutzgruppe ist somit leichter als die Benzyloxycarbonylgruppe abspaltbar. Auf diese Weise kann z.B. Cbz als permanente Schutzgruppe eingesetzt werden, während die tBoc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe dient.

Die 9-Flourenylmethoxycarbonyl-(Fmoc-)Schutzgruppe hat den Vorteil, dass sie extrem säurebeständig ist, d.h., die Entschützung von Boc- und benzylichen Schutzgruppen ist ohne gleichzeitige Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe möglich.

Die Fmoc-Schutzgruppe wird nach einem E1cb-Mechanismus abgespalten unter Bildung einer Carbanion-Zwischenstufe.



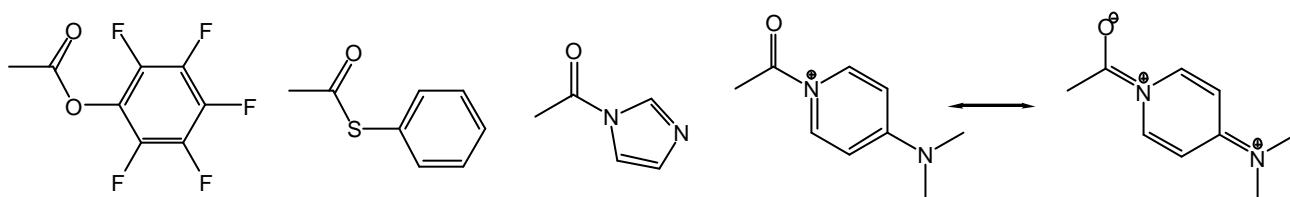
**Abb. 17:** Abspaltung d. Fmoc-Schutzgruppe

### 1.5.2 Aktivierung der Carbonsäurefunktion

Die Aktivierung der Carboxylgruppe spielt in den Kupplungsmethoden zur Peptidbildung eine entscheidende Rolle. Es gibt mehrere Methoden, die eine racemisierungsarme Aktivierung ermöglichen. Es spielen dabei u.a. der Einsatz von Aziden, aktivierten Estern, gemischten Anhydriden und die Carbodiimid-Methode eine bedeutende Rolle.

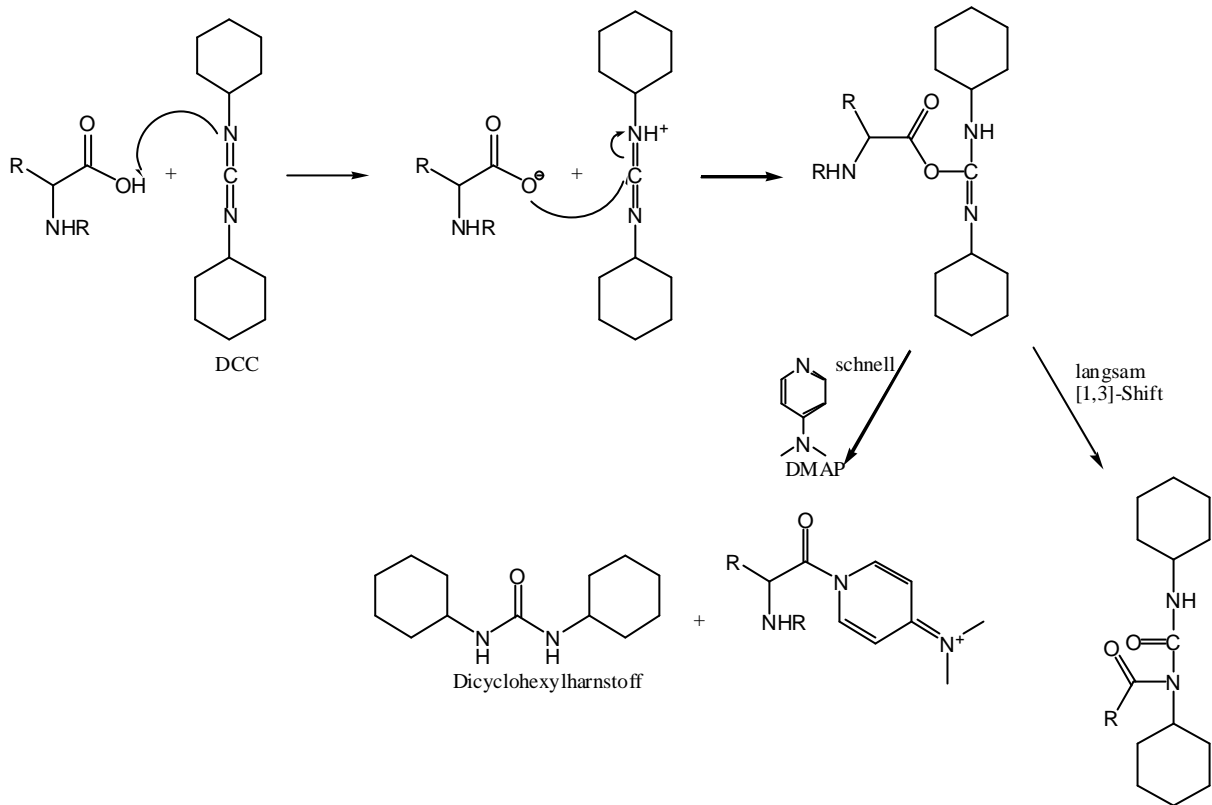
Als Beispiele sollen hier die Pentafluorphenylester, Thioester und die Carbodiimid-Methode unter Beteiligung des sog. „Steglich“-Reagenzes Dimethylaminopyridin (DMAP) gezeigt werden.

Thioester erhöhen die Carbonsäureaktivität wegen der geringen Neigung des Schwefels Doppelbindungen zu bilden. Bei Acylpyridinium als Fluchtgruppe würde eine Resonanz zu einer doppelt positiv geladenen Teilstruktur führen, was energetisch sehr ungünstig ist.

**Abb. 18:** Methoden der Aktivierung der Carbonsäurefunktion

Bei der Carbodiimid-Methode bildet sich aus dem Carbodiimid und der Carboxylgruppe der Aminosäure ein reaktionsfähiger O-Acyl-isoharnstoff. Häufig wird als Carbodiimid Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) eingesetzt. Der O-Acyl-isoharnstoff kann direkt mit dem Amin zum gewünschten Amid oder zuerst mit einer weiteren Carboxylatgruppe zu einem Anhydrid reagieren, welches dann mit einem Amin zum Amid weiterreagiert. Allerdings treten hier einige Probleme auf. Aufgrund der sehr hohen Reaktivität des O-Acyl-isoharnstoffs neigt dieser zur Racemisierung. Außerdem erfolgt ein [1,3]-Acylshift, der zu einem unreaktiven Acylharnstoff führt.

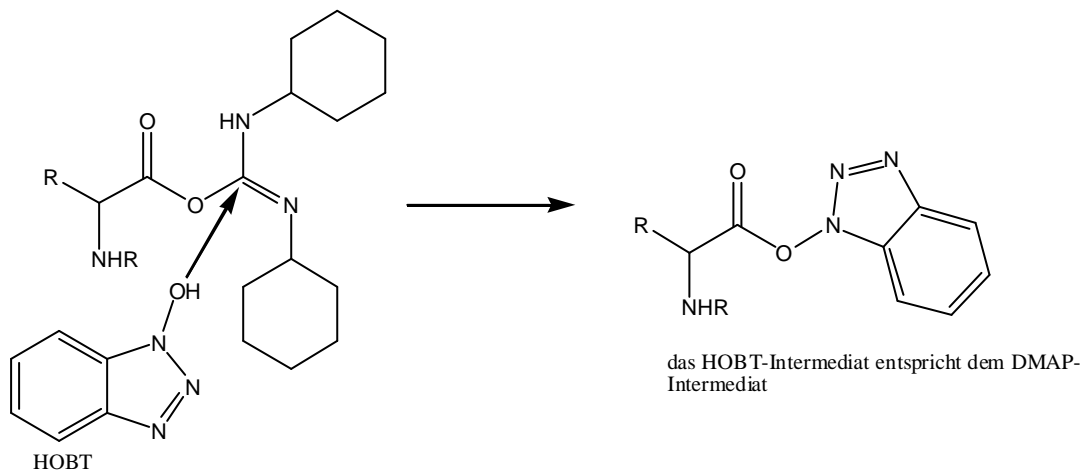
Durch gleichzeitigen Zusatz von Dicyclohexylcarbodiimid und sog. Additiven lässt sich diese Problematik und somit der Racemisierungsgrad herabsetzen und die Ausbeute erhöhen. Bei den Additiven kann es sich um Pentafluorphenylgruppen oder auch DMAP handeln.



**Abb. 19:** Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid [12]

Der Vorteil bei der Aktivierung mit DCC ist, dass das entstandene Nebenprodukt Dicyclohexylharnstoff als weißer Niederschlag ausfällt und somit bei Reaktionen in Lösung gut abzutrennen ist. Bei Festphasenreaktionen hingegen kann statt DCC auch Diisopropylcarbodiimid, DIC, verwendet werden, welches gut löslich ist [9].

Häufig wird statt DMAP auch Hydroxybenzotriazol (HOBT) verwendet, wodurch die Gefahr der Racemisierung weiter vermindert werden kann.



**Abb. 20:** Aktivierung mit Hilfe des HOBT-Reagenzes [12]

Mit Hilfe der optimalen Schutzgruppen und Aktivierungsreagenzien kann schlussendlich die Kupplung zweier Aminosäuren erfolgen.

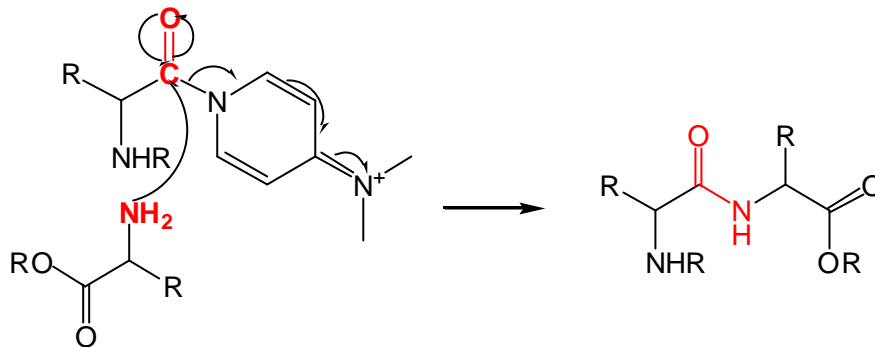


Abb. 21: Kupplung zweier Aminosäuren [12]

Unter den für Peptidsynthese entwickelten Strategien kann man zunächst zwischen einem stufenweisen Aufbau der Peptidkette und einer Fragmentkondensation nach stufenweisem Aufbau dieser Fragmente unterscheiden.

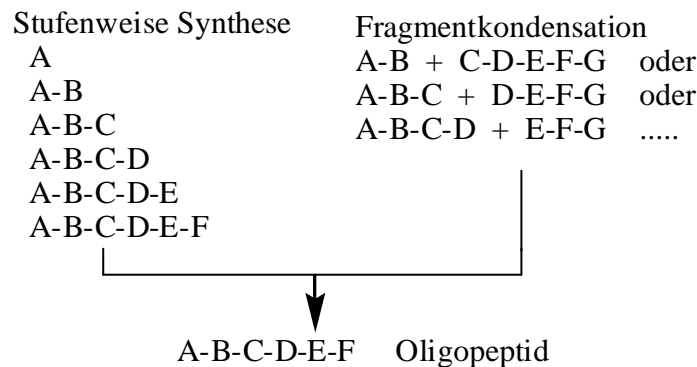


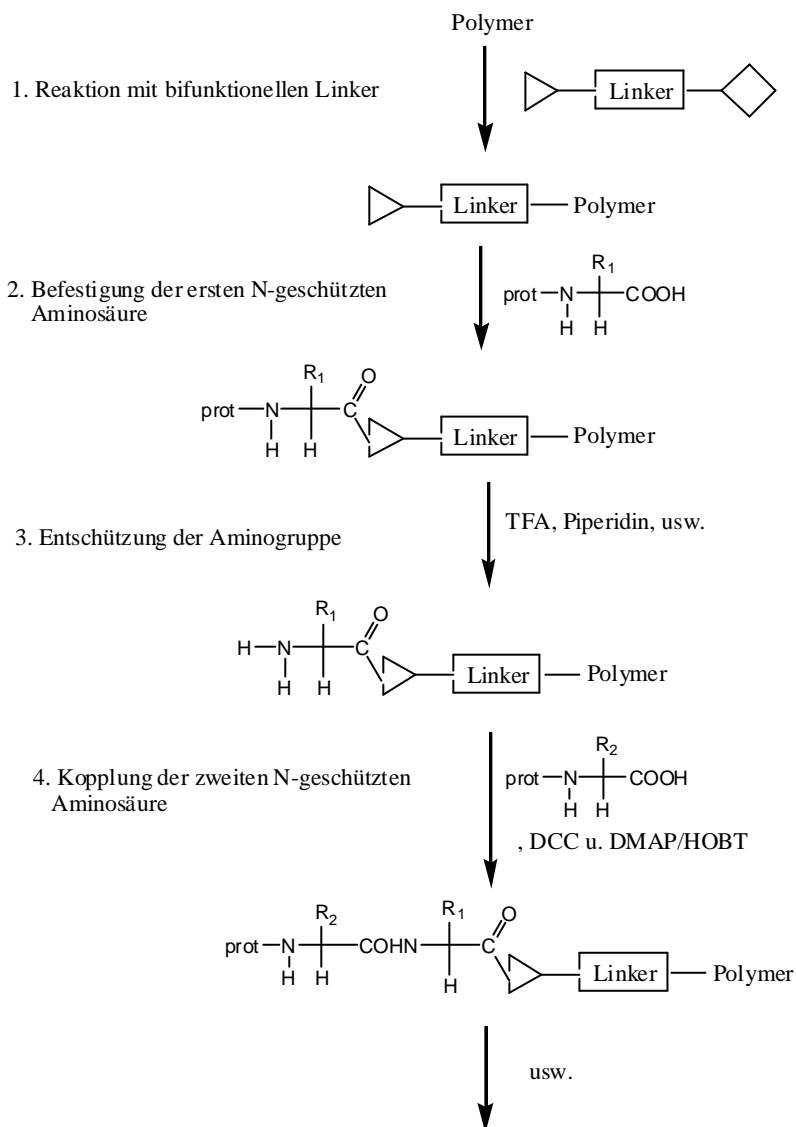
Abb. 22: Strategien d. Peptidsynthese

### 1.5.3 Peptid-Festphasensynthese

Bei der Festphasensynthese wird das Peptid an einem Polymer hergestellt. Diese Methode wurde 1963 von Merrifield (Nobelpreis 1984) in die Peptidsynthese eingeführt und hat im Vergleich mit den bisherigen Kupplungsreaktionen mehrere Vorteile. Die Immobilisierung ermöglicht, dass die verwendeten Reagenzien schnell gewaschen werden können und das mit großen Überschüssen gearbeitet werden kann. Desweiteren ermöglicht die Festphasensynthese eine Automatisierung der Peptidsynthese. Heute gibt es Peptidsynthesegeräte, die Peptide mit über 100 Aminosäuren synthetisieren können.

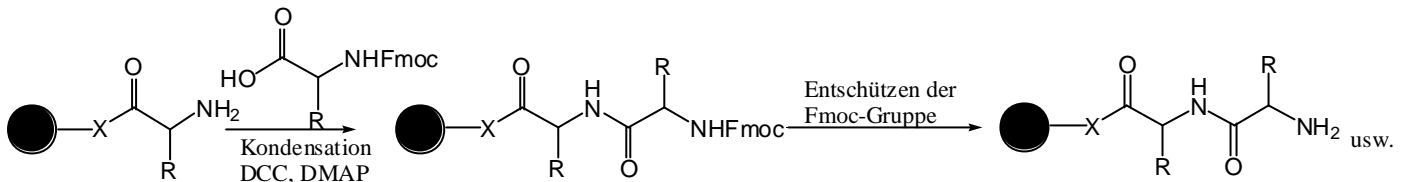
### Reaktionsschritte der Peptid-Festphasensynthese:

1. Anhängen der Aminosäure an das Harz
2. Ablösen der Aminoschutzgruppe
3. Kupplung durch Aktivierung z.B. mit DCC/DMAP oder HOBT
4. Wiederholung der Schritte 2 und 3
5. Ablösen des Peptids von dem Harz



**Abb. 23:** Schema d. Peptid-Festphasensynthese [9]

Nach jedem Reaktionsschritt muss das am Träger gebundene Peptid abfiltriert und gewaschen werden. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Festphasensynthese ist eine möglichst quantitative Kupplungsreaktion, da es sonst zur Bildung von Fehlsequenzen innerhalb eines Peptids kommt.



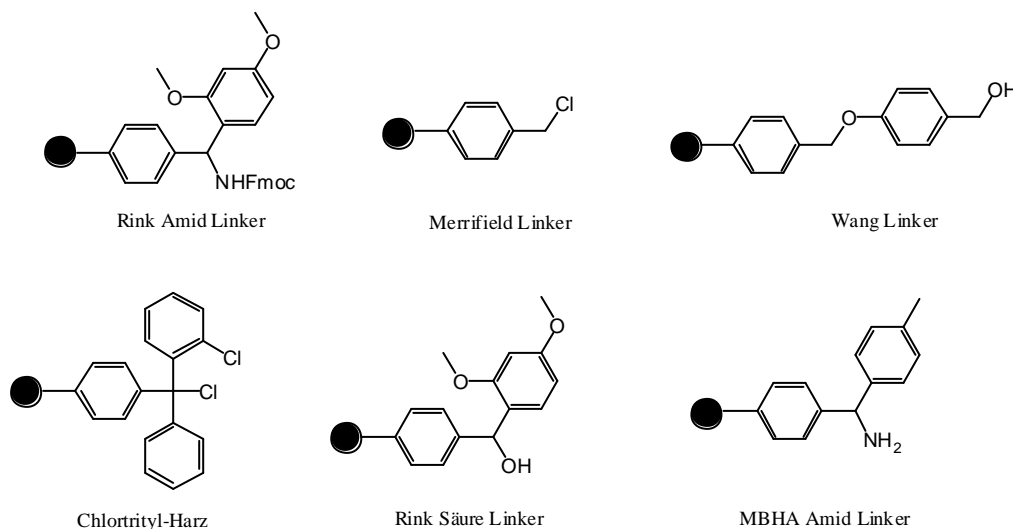
**Abb. 24:** Kupplungsreaktion [12]

Der Linker ist das Bindeglied zwischen dem polymeren Träger und dem Peptid und muss ebenso wie die permanenten Schutzgruppen am Ende einer Synthese spaltbar sein, um das Peptid freizusetzen. Der Linker legt fest, ob nach der Abspaltung eine terminale Carbonsäure oder eine andere Gruppe wie z.B. ein Amid erhalten wird.

Zu den wichtigen Eigenschaften eines Harz-Polymers gehören eine möglichst große Oberfläche bzw. Quell-Eigenschaften, sowie die Beladung und Inertheit gegenüber den Reagenzien. Bei dem Harz-Polymer handelt es sich meistens um Polystyrol, das mit ca. 1 % Divinylbenzol versetzt wurde. Die Funktionalisierung kann z.B. über eine Chlormethylierung geschehen. Durch den Linker wird schließlich die Möglichkeit der Abspaltung des Peptids von dem Harz-Polymer gewährleistet. Es gibt viele verschiedene Linker, die bei der Peptidsynthese eingesetzt werden können. Bei den vielen Linkern kann mit Hilfe unterschiedlich starker Säuren das Peptid abgespalten werden. Es gibt jedoch auch andere Linker, z.B. Nitrobenzylharze oder Allylharze, die mit Licht oder Pd(0) abgespalten werden.

In der unteren Abbildung sind mehrere Linker dargestellt. Wang-Harze besitzen z.B. einen p-Alkoxybenzylesterlinker. Das fertige Peptid kann mit moderaten Säuren (z.B. mit TFA) abgespalten werden.

Peptide, die an MBHA-Linkern (MBHA = p-Methylbenzhydrylamin) gebunden sind, können mit HF abgespalten werden. Allerdings werden hier Peptidamide erhalten.



**Abb. 25:** Auswahl an Linker für d. Festphasensynthese [19]

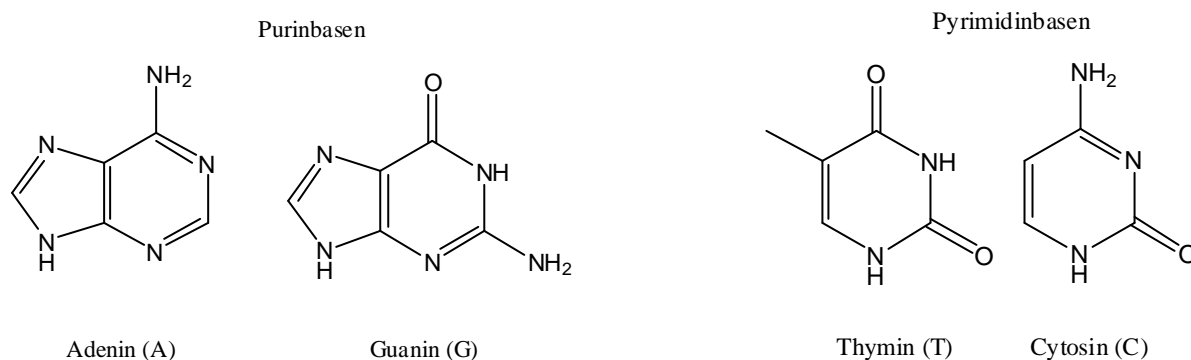
## 2. DNA-Synthese

### 2.1 Einleitung

Wenn die Primärstruktur die Konformation eines Proteins bestimmt, was bestimmt dann die Primärstruktur? Die Baupläne für die Proteinsynthese sind in bestimmten Bereichen der Chromosomen, den Genen, enthalten, die aus definierten Abschnitten langer Ketten von Desoxyribonucleinsäure (DNA), einem Polymer, das zur Verbindungsklasse der Nucleinsäuren gehört, bestehen. Die Nucleinsäuren treten in allen Zellen des Tier- und Pflanzenreiches auf. Sie regeln den Aufbau der Proteine, die für das Leben und die Funktion jeder Zelle notwendig sind. DNA ist unter den Molekülen dahingehend einzigartig, dass sie Anweisungen für ihre eigene Replikation enthält. Die Brücke zwischen der genetischen Information und der Proteinsynthese bildet die Ribonucleinsäure oder RNA. Obwohl ein DNA-Molekül die codierte Anleitung für die Synthese eines bestimmten Proteins enthält, stellt es dieses Protein nicht wirklich selbst her. Stattdessen dirigiert es die Synthese eines RNA-Typs, den man Boten-DNA (messenger-RNA, mRNA) bezeichnet. Das mRNA-Molekül interagiert dann mit der Proteinsynthesemaschinerie (Ribosome), um die Herstellung eines Polypeptids anzuleiten [1].

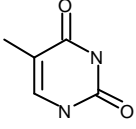
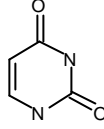
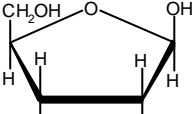
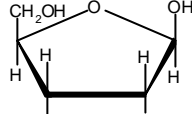
### 2.2 Struktur der DNA

Die Nucleinsäuren sind aus einer heterocyclischen Base der Pyrimidin- und Purinreihe, einer Pentose und Phosphorsäure aufgebaut. Die Pentose ist dabei entweder D-Ribose oder 2-Desoxy-D-ribose. Beide Nucleinsäuren benutzen die Stickstoffbasen Adenin (A), Guanin (G) und Cytosin (C). Thymin (T) findet sich nur in der DNA, Uracil (U) kommt ausschließlich in der RNA vor.



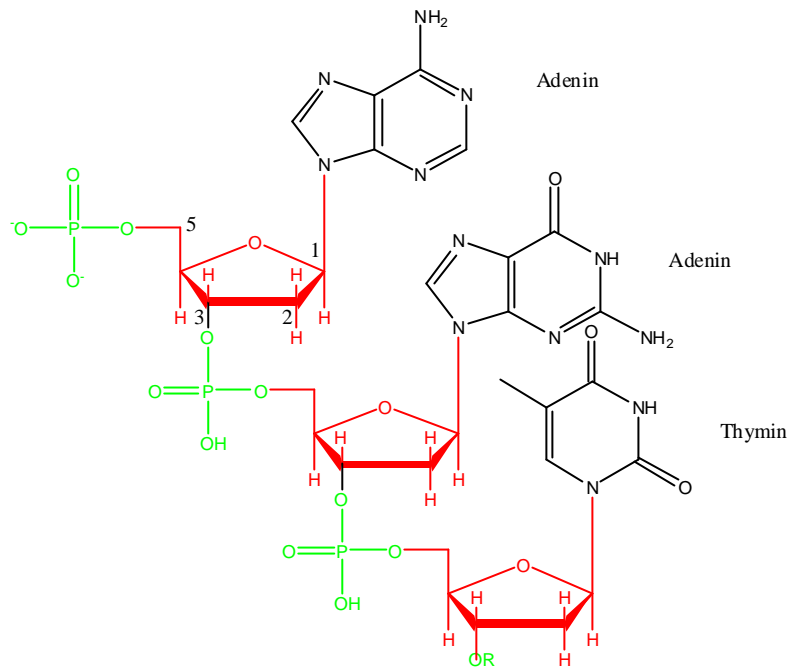
**Abb. 26:** Nucleobasen der DNA

Die Nucleobasen sind N-glykosidisch mit dem Zucker (D-Ribose oder 2-Desoxy-D-ribose) verknüpft und bilden die  $\beta$ -Nucleoside. Ist die 5'-OH-Gruppe des Zuckers in den Nucleosiden mit Phosphorsäure verestert, so liegen die Nucleosid-5'-phosphate oder Nucleotide vor, die als eigentlichen Bausteine der Nucleinsäuren (Polynucleotide) anzusehen sind. Jedes Nucleotid besteht also aus einer Phosphatgruppe, einer Desoxyribose und A, G, C oder T als seiner stickstoffhaltigen Base [1].

DNA-Nucleotide	RNA-Nucleotide
Base ist A, G, C oder  Thymin (T)	Base ist A, G, C, oder  Uracil (U)
 Desoxyribose	 Ribose

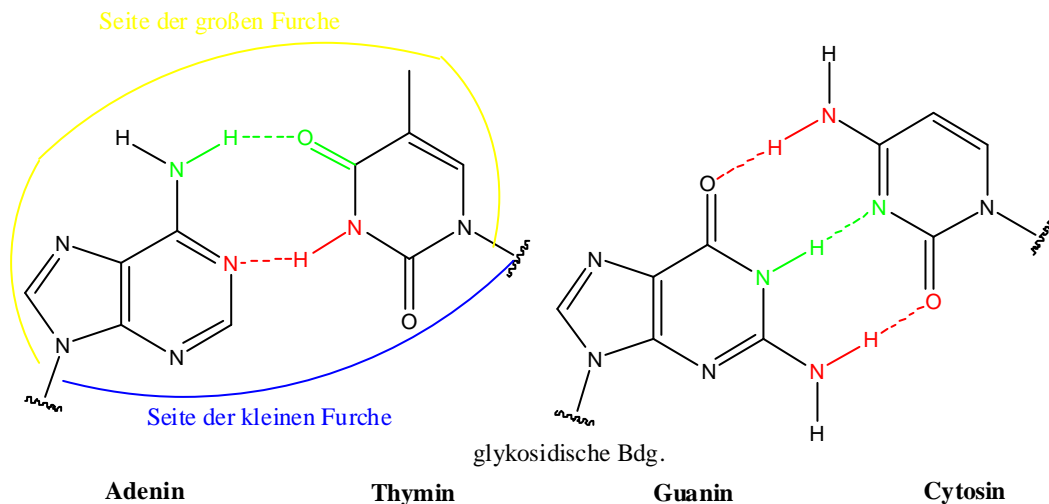
**Tab. 1:** Strukturelle Unterschiede zwischen den Nucleotiden der DNA und der RNA [1]

Mehrere Hunderte und Tausende von Nucleotiden bilden dann einen DNA- bzw. RNA-Strang [1]. In einem DNA-Strang sind die Nucleotide durch Phosphodiesterbindungen, zwischen dem Phosphat eines Nucleotids und dem Zucker des nächsten Monomers miteinander verknüpft. Dies führt zu einem Rückgrat mit einer sich wiederholenden Abfolge von Zucker-Phosphat-Zucker-Phosphat. An dieses Rückgrat sind über die Zucker die stickstoffhaltigen Basen angehängt. Die Basensequenz ist dabei für jedes Gen spezifisch. Die lineare Anordnung von Basen in einem Gen bestimmt die Aminosäuresequenz eines Proteins.



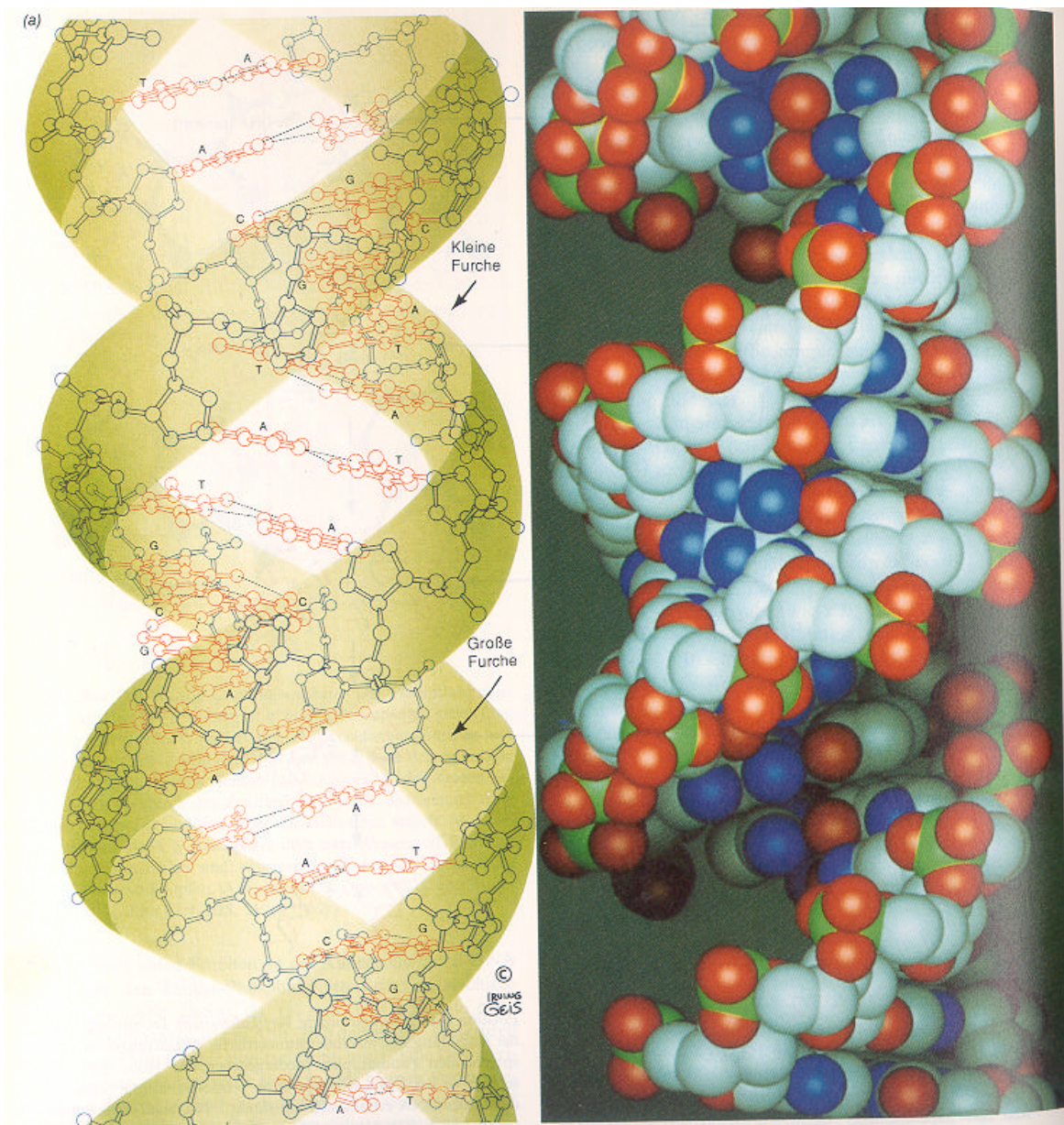
**Abb. 27:** Ausschnitt eines Trinucleotids aus einem DNA-Strang [3]

Die DNA-Moleküle einer Zelle bestehen tatsächlich aus zwei Nucleotidketten, die um eine imaginäre Achse gewunden sind und so eine Doppelhelix bilden. Die Aufklärung der DNA-Struktur gelang durch James Watson und Francis Crick im Jahre 1953. Entscheidend für DNA-Struktur ist die Tatsache, dass die Nucleinsäure-Basen bevorzugt als Keto-Tautomere vorliegen und somit Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) ausbilden können. Die beiden Nucleotidketten werden nämlich durch WBB zwischen den gepaarten Basen zusammengehalten. Allerdings sind nur bestimmte Basen miteinander kompatibel. Adenin (A) paart immer mit Thymin (T), Guanin (G) immer mit Cytosin (C) [3].



**Abb. 28:** Die Watson-Crick-Basenpaare [3]

Damit sind beide DNA-Stränge komplementär zueinander. Die doppelsträngige DNA ist bezüglich ihrer Konformation ein variables Molekül, so dass die rechtsgängige Helix verschiebener DNA-Stränge strukturell leicht unterschiedlich sein kann. Man kennt drei Arten der sog. DNA-Doppelhelix: A-DNA, B-DNA und Z-DNA. B-DNA ist die in der Zelle vorherrschende Form. Die zwei tiefen Furchen an der Außenseite der B-DNA zwischen den Zucker-Phosphat-Ketten sind unterschiedlich groß. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass sich die Oberkante eines jeden Basenpaares strukturell von seiner Unterkante unterscheidet (Abb. 28). In der kleinen Furche beträgt der Winkel zwischen den glykosidischen Bindungen weniger als  $180^\circ$ , während sich die große Furche zur entgegengesetzten Seite eines jeden Basenpaares öffnet [4].



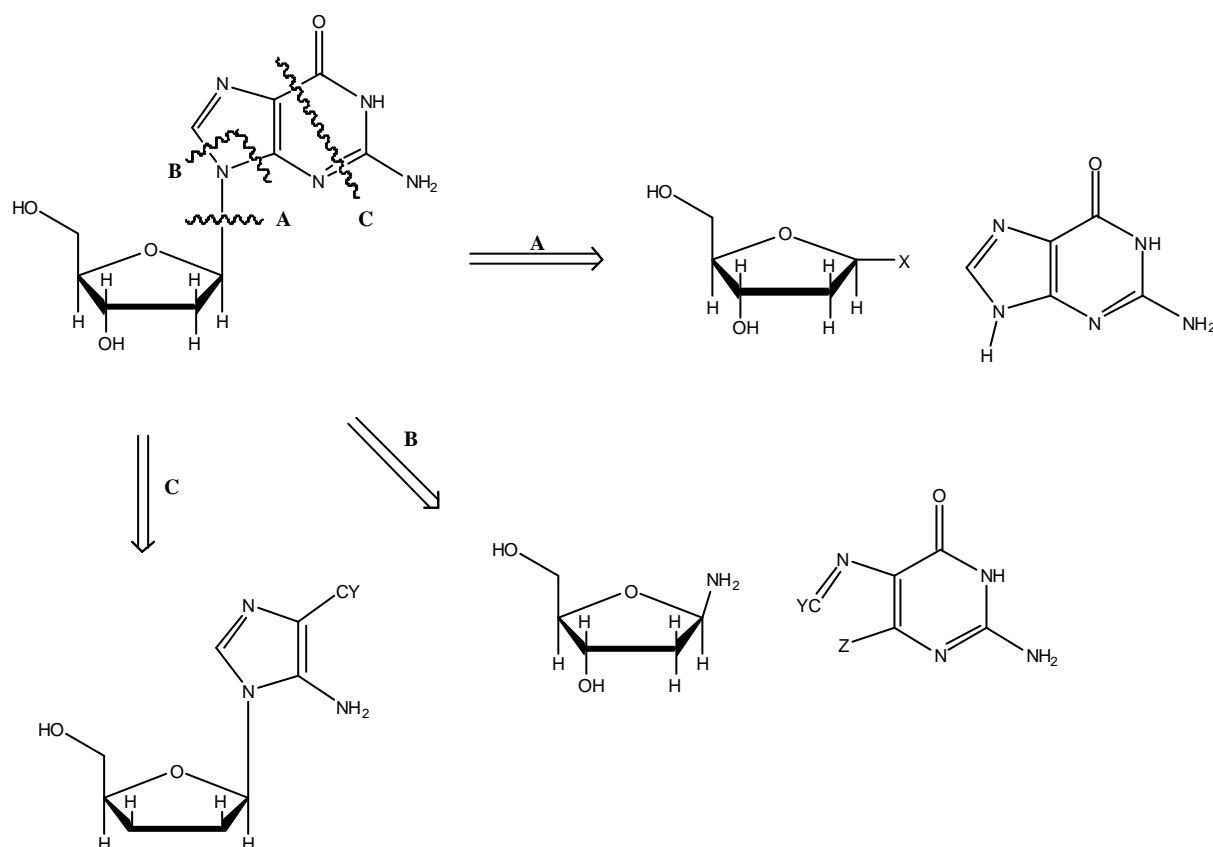
**Abb. 29:** Struktur der A-DNA [4]

## 2.3 Synthese der DNA

### 2.3.1 Synthese der Nucleoside

Die Synthese von Nucleosiden bzw. Nucleosid-Analoga spielt in der organischen Chemie eine wichtige Rolle, da viele dieser Verbindungen anti-virale oder anti-proliferative (anti-tumor) Eigenschaften besitzen. Auf diese Synthesen soll an dieser Stelle allerdings nur prinzipiell eingegangen werden.

Die Synthese der Nucleoside kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Bei den Wegen A und B handelt es sich um eine nucleophile Substitution. Die Abgangsgruppe befindet sich bei A am anomeren Zentrum des Zuckers, bei dem Weg B ist das Nucleophil der Zucker selbst. Weg C bedeutet der Aufbau des Heterocyclus am Zuckergerüst.



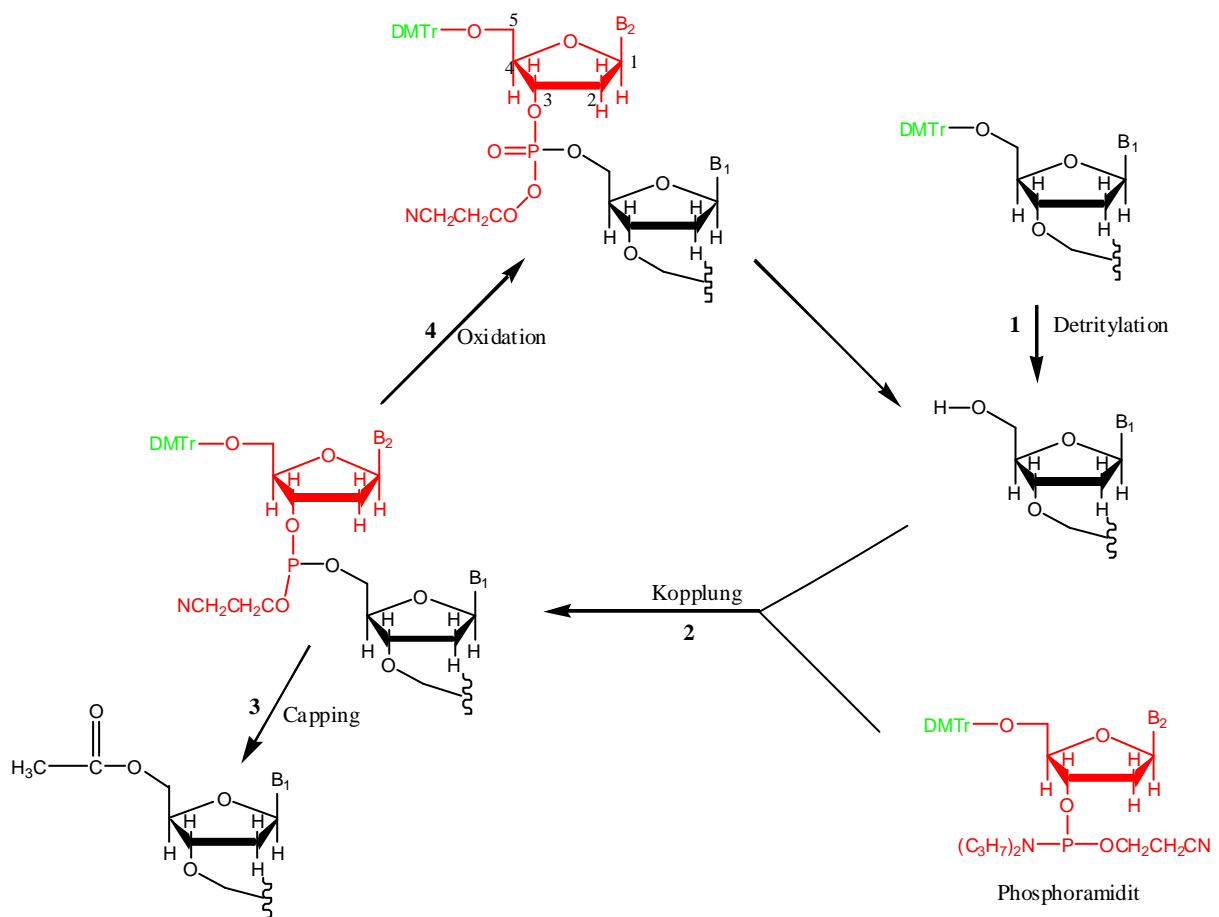
**Abb. 30:** Synthesewege zur Darstellung von Nucleosiden [17]

Bei den Wegen A und B muss die Stereochemie am anomeren Zentrum beachtet werden. Hier tragen häufig Nachbargruppeneffekte eine Rolle zur Stereokontrolle bei.

### 2.3.2 Synthese der Nucleotide

Die chemische Synthese von DNA-Nucleotiden mit definierter Basensequenz ist zu einem unentbehrlichen Verfahren bei molekularen Klonierungstechniken geworden. Die grundlegende Strategie in der Oligonucleotid-Synthese entspricht der Polypeptidsynthese. Geschützte Nucleotide werden an das wachsende Ende der Oligonucleotidkette gekoppelt. Nach Entfernung der Schutzgruppen wird der Prozess so lange wiederholt, bis das gewünschte Oligonucleotid synthetisiert ist. Ältere Methoden wurden auch hier durch Festphasen-Methoden ersetzt.

Die Oligonucleotid-Synthese kann in einem Zyklus dargestellt werden.



**Abb. 31:** Synthesesyklus d. Phosphoramidit-Methode [16]

Diese sog. Phosphoramidit-Methode wurde von R. Letsinger und M. Caruthers entworfen und besteht aus vier Schritten.

Im ersten Schritt wird die Dimethoxytrityl(DMTr)-Schutzgruppe der wachsenden Oligonucleotidkette an C5 durch Säurebehandlung entfernt (**Detritylation**). Diese Kette ist an C3 mit der Festphase verankert.

Die freigewordene OH-Gruppe an C5 des Oligonucleotids kann dann im zweiten Schritt an das 3-Phosphoramidit-Derivat eines Desoxyribonucleosids koppeln und so die nächste Position in der Kette einnehmen (**Kopplung**).

Alle OH-Gruppen der Oligonucleotide die bei der Kopplung nicht reagiert haben, werden durch Acetylierung inaktiviert, um sie von den folgenden Kopplungsreaktionen auszuschließen. Diesen dritten Schritt nennt man auch „**Capping**“ [4].

Der bei der Kopplungsreaktion entstandene Phosphitriester wird im vierten Schritt zum Phosphotriester oxidiert (**Oxidation**). Dabei entsteht die um ein Nucleotid verlängerte Kette.

Die Vorteile der DNA-Festphasensynthese sind die folgenden:

1. Es sind sehr kleine Ansätze möglich (z. B. 0,2 mmol).
2. Die Synthese geht schnell.
3. Durch eine weitestgehende Automation ist nur ein geringer Arbeitsaufwand möglich.
4. Die Synthese weist eine gute Reproduzierbarkeit auf.
5. Die Fehlerhäufigkeit ist sehr gering.

Als Träger wird meistens sog. Controlled Pore Glass (CPG) verwendet, da es sich für die DNA-Festphasensynthese besser eignet als Polystyrol. Mit diesem Träger sind Kupplungsausbeuten von 98 % möglich. Bei dem CPG-Träger handelt es sich um einen Glasträger, der mit primären Aminen funktionalisiert wurde.

Als CPG-Linker dient Succinat (Bernsteinsäureester ROOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOR). Die Produkte der Kopplung des ersten Nucleosids an die Festphase sind käuflich erhältlich.

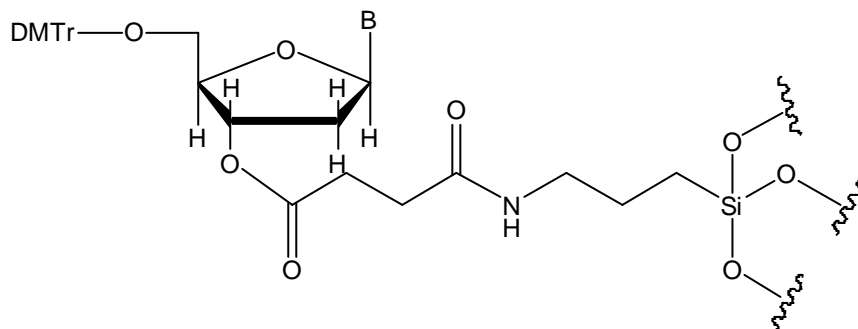
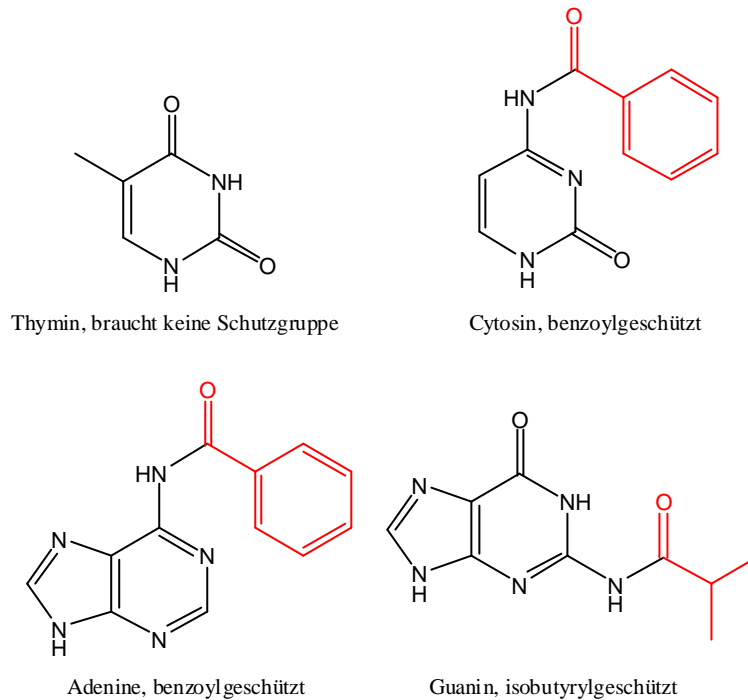


Abb. 32: CPG-Linker mit DMTr-geschütztem Nucleosid [16]

Ähnlich wie bei der Peptidsynthese müssen die bei der DNA-Synthese die funktionellen Gruppen geschützt werden, um ungewollte Nebenreaktionen zu verhindern.

### 2.3.3 Schutzgruppen in der DNA-Synthese

Die Schutzgruppen der Nucleobasen sind permanente Schutzgruppen und sollen erst bei der Aufarbeitung der DNA entfernt werden.



**Abb. 33:** Schutzgruppen der Nucleobasen [16]

Zum Schutz der exocyclischen Aminogruppen in Adenin und Cytosin werden Benzoylgruppen eingesetzt, beim Guanin dagegen findet die Isobutyrylgruppe Verwendung. Bei der Aufarbeitung wird das synthetisierte Oligonucleotid von der Festphase getrennt. Dies erfolgt in konz. Ammoniak bei 55-60 °C. Unter diesen Bedingungen werden auch die verwendeten Acyl-Schutzgruppen der exocyclischen Aminofunktionen der Basen abgespalten. Die Nucleophilie der Lactamfunktionen ist deutlich geringer als die der Aminofunktionen, daher ist ein Schutz an dieser Stelle nicht unbedingt notwendig.

Für den Schutz der Phosphatfunktion haben sich  $\beta$ -eliminierbare Gruppen durchgesetzt. Häufig wird eine  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe verwendet. Der Vorteil bei diesem Schutzgruppentyp ist, dass bei der Entschützung nicht das Phosphoratom angegriffen werden muss. Dies vermindert die Gefahr von Nebenreaktionen wie die Spaltung von Internucleotid-

Bindungen. Bei der Aufarbeitung mit konz. Ammoniak wird die Schutzgruppe durch eine  $\beta$ -Eliminierung entfernt. Diese Reaktion geht besonders gut, da am  $\beta$ -C-Atom eine elektronenziehende Gruppe (Cyano-Gruppe) vorhanden ist, die die H-Atome acidifiziert [19].

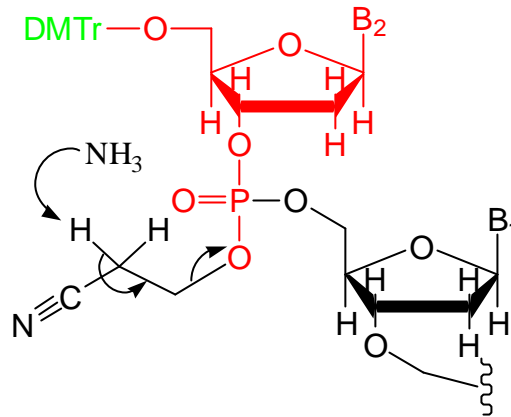


Abb. 34: Entschützung durch  $\beta$ -Eliminierung [19]

Die Hydroxyfunktion an C5 der Desoxyribose muss temporär geschützt werden, da sie nach erfolgter Kopplung für die nächste Kettenverlängerung wieder freigesetzt werden muss. Die Dimethoxytritylgruppe hat sich hier als Schutzgruppe bewährt. Ihr Vorteil liegt in der leichten Einführbarkeit in den Nucleosidbaustein, sowie in der Tatsache, dass die Absorptionseigenschaften der Tritylkationen nach der Abspaltung in einfacher Weise die Bestimmung der Kopplungsausbeute zulässt. Durch die hohe Stabilität des Tritylkations ist die Tritylgruppe gegenüber Säuren sehr labil und lassen sich dadurch gut entschützen.

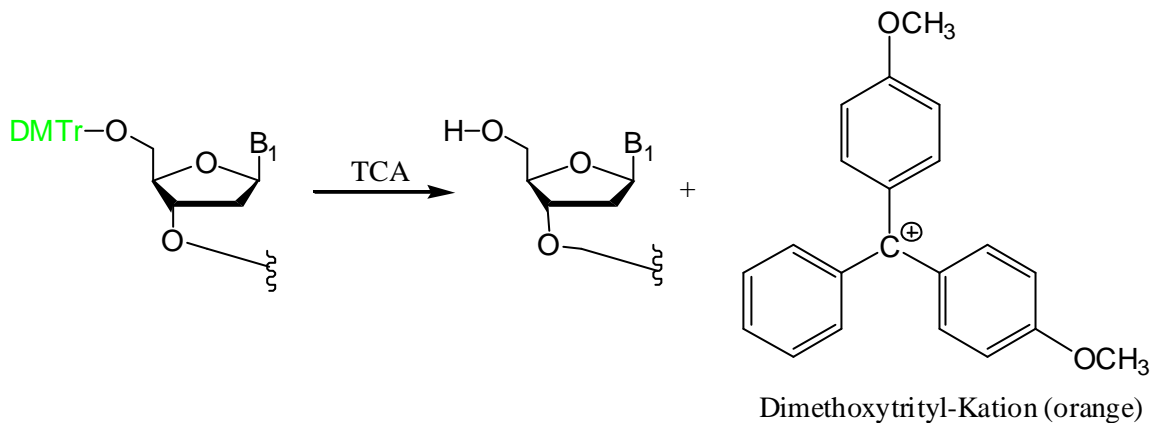


Abb. 35: Entschützung der DMTr-Gruppe [16]

## 2.3.4 Der Kopplungsvorgang und das Capping

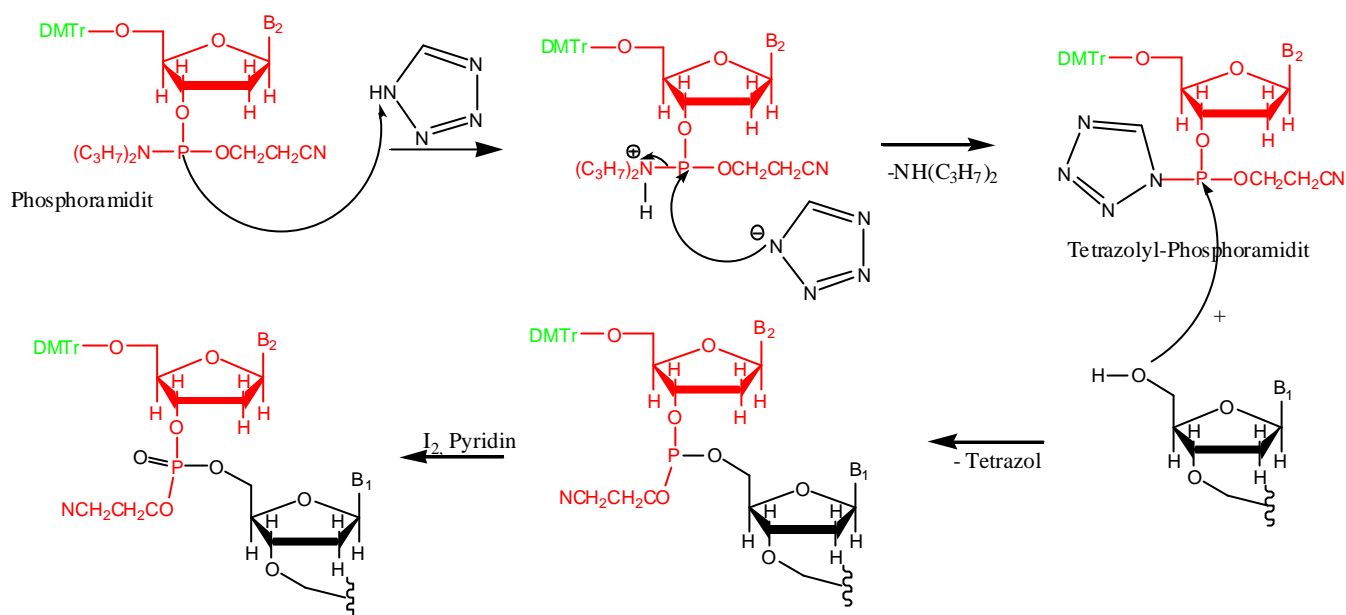
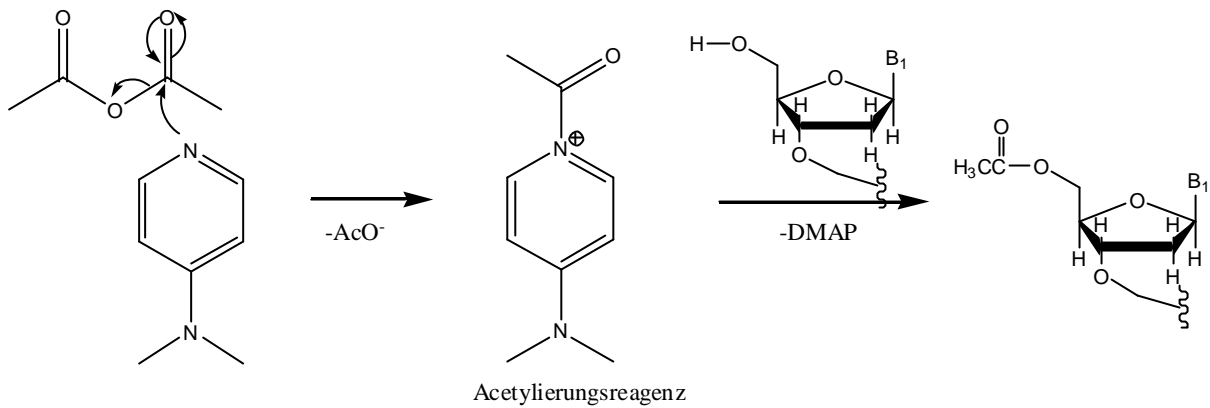


Abb. 36: Der Kopplungsvorgang [16]

Die Phosphoramidite sind chemisch modifizierte Nucleoside, die als Bausteine für die DNA-Synthese dienen. Bei den Phosphoramidit-Nucleosiden befindet sich an dem Phosphoratom eine Diisopropylaminogruppe und eine  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe. Die Phosphoratome liegen daher zunächst in der Oxidationsstufe +III vor. Dies führt zu deutlich kürzeren Kupplungszeiten (vgl. Reaktivität von  $\text{PCl}_3$  gegenüber  $\text{POCl}_3$ ). Bei dem Kupplungsschritt werden die Phosphoramidite an die trägergebundenen Nucleotiden geknüpft. Die Acidität des Tetrazols reicht aus, um das Stickstoffatom der Diisopropylamino-gruppe zu protonieren. Das Phosphoramidit besitzt nun eine protonierte Aminogruppe ist, die eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt. Intermediär entstehen Tetrazolide der P(III)-Spezies als Reaktivester. Diese reagieren mit Nucleophilen wie z.B. der freien Hydroxylgruppe des Nucleotids zu den Triestern. Nach der Kupplung eines DNA-Bausteins mit Hilfe von Tetrazol wird der Phosphitriester mit Iod zum Phosphotriester oxidiert. Eine zugesetzte Base (z.B. Pyridin) fängt das dabei entstehende HI ab.

Die Phosphoramidite sind gegenüber Hydrolyse und Luftoxidation relativ stabil, lassen sich daher isolieren und lagern. Die vergleichsweise gute Handhabbarkeit dieser Bausteine ermöglichte den Ausbau dieses Verfahrens bis hin zur Automatisierung der Routine-Oligonucleotidsynthese.

Durch den sog. Capping-Schritt mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  und z.B. DMAP werden solche 5'-OH-Gruppen der Nucleotide (ca. 2 %), die bei der Kupplung nicht reagiert haben, acetyliert und damit endgültig aus dem Reaktionszyklus entfernt. Dieser Schritt ist wichtig, da es sonst zu DNA-Strängen mit Fehlsequenzen kommt.



**Abb. 37:** Das Capping

Das fertige Oligonucleotid wird durch konz. aq.  $\text{NH}_3$  vom Träger entschützt. Dabei werden auch die Schutzgruppen der exozyklischen Aminofunktionen der DNA-Basen entfernt und die Cyanoethoxy-Schutzgruppe am Phosphotriester durch  $\beta$ -Eliminierung entfernt.

### 3 Literaturverzeichnis

- [1] N. A. Campbell, Biologie, Spektrum Akad. Verlag, Berlin 1998, S. 79-92, 310ff, 427ff.
- [2] P. Christen, R. Jaussi, Biochemie, Springer-Verlag, Heidelberg 2005, S. 168ff
- [3] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, Organic Chemistry, Oxford 2001, S. 1347-1359
- [4] D. Voet, J. G. Voet, Biochemie, VCH Verlag, 1. Auflage, Weinheim 1994, S. 107, 146f, 800ff
- [5] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, Organische Chemie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2000, S. 909ff, 953ff,
- [6] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, E. M Kosower, Organische Chemie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 1994, S.760f
- [7] H. Beyer, W. Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie, Hirzel Verlag, Stuttgart 1998, S.933ff
- [8] H. R. Christen, Grundlagen der organischen Chemie, Otto Salle Verlag, Berlin 1998, S. 206f
- [9] P. Nuhn, Naturstoffchemie, S. Hirzel Verlag, 3. Auflage, Stuttgart 1997, S. 89-163, 257-307
- [10] J. M. Berg, L. Stryer, Biochemie, Spektrum Verlag, 5. Auflage, Berlin 2003, S. 50-79
- [11] <http://online-media.uni-marburg.de/biologie/genetik/boelker/VL-molekulargenetik/DNA%20Replikation1.pdf>
- [12] <http://www.chemie.fu-berlin.de/ag/kalesse/Peptide.pdf>
- [13] <http://www.diss.fu-berlin.de/2001/74/AllgemeinerTeil.pdf>
- [14] <http://www.organik.uni-erlangen.de/vostrowsky/natstoff/11naprote.pdf>
- [15] <http://www.organik.uni-erlangen.de/hirsch/vorlesung/Organik1/12Aminsr/12Aminsre1.pdf>
- [16] <http://uwf.edu/dcdavis/biochem2/syn/syn.pdf>
- [17] <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1/kapitel2.html?/chemie/bioorganic/vorlesung1/k2-01.html>
- [18] [http://www.ub.uni-konstanz.de/v13/volltexte/1999/189//pdf/189\\_2.pdf](http://www.ub.uni-konstanz.de/v13/volltexte/1999/189//pdf/189_2.pdf)
- [19] [http://www.org.chemie.tu-muenchen.de/lehre/lehredateien/scrips/Biopolymere\\_151002.pdf](http://www.org.chemie.tu-muenchen.de/lehre/lehredateien/scrips/Biopolymere_151002.pdf)