

UNIVERSITÄT HAMBURG

Institut für Organische Chemie

**Synthese von hochglycosylierten
O-Glycopeptiden vom Glycophorin-
und Mucin-Typ**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
Des Fachbereichs Chemie
Der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gunther Klich
aus Hamburg

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1995 bis Februar 1999
im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.
Geschäftsführender Direktor ist Prof. Dr. J. Voß.

Meinem akademischen Lehrer, Prof. Dr. H. Paulsen, danke ich für die Überlassung des
Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und sein stetes Interesse im Verlauf der Arbeit.

Summary

In this thesis highly glycosylated glycopeptides with Tn-antigenic structure (GalNAc) corresponding to protein sequences of human Glycophorin A^N and human Mucin MUC1 were synthesised and characterised. Furthermore studies towards synthesis of an 13-fold GalNAc-glycosylated MUC2-repeating unit were carried out and peptide derivatives corresponding to sequences of HIV and human chorionic gonadotropin β (hCG β) were synthesised.

Corresponding to the N-terminus sequence of human glycophorin A^N the 9-fold GalNAc-glycosylated 18-mer peptide **16** was synthesised and characterised. The synthesis was done according to experiences from the synthesis of the hexaglycosylated decapeptide **15** using the Fmoc-Pfp-ester-technique and an automatic peptide-synthesiser with PEGA-resin carrying Rink-linker. The GalNAc-units were introduced as glycosylazide building-blocks. During the solid-phase-synthesis experimental indications for the formation of a rigid shape of the growing glycopeptide were obtained. After glycopeptide synthesis the azide groups of the saccharides were reduced using thioacetic acid. Although detailed optimised processing conditions were acquired for the reduction impurities were found and their separation was difficult. The application of azide building-blocks seems to be limited in complex syntheses of highly glycosylated glycopeptides. The deprotection of the GalNAc-residues using hydrazin at the polymeric support was successful in the synthesis of the 9-fold glycosylated 18-mer peptide **16** in contrast to the deacetylation in solution using NaOMe. Finally execution of RP-HPLC purification was difficult because of impurities containing thioacetamide instead of acetamide. The identification of the glycopeptides was done by ESI-mass-spectrometry.

NMR-characterisation of the 9-fold glycosylated 18-mer peptide **16** and the reference-peptide **26** was done using ¹H¹H-TOCSY, ¹H¹³C-HMQC and ¹H¹³C-HMBC experiments and led to a full determination of the connectivity in the peptide sequence and the positions of different GalNAc-units. Additional ¹H¹H-NOESY spectra confirmed the connectivity in the peptide backbone and to carbohydrate sidechains. CD-spectroscopy showed evident indications of a new structure in the vicinal glycosylation cluster of the glycophorin analoga. Analytical investigation gave indication of interesting conformations in the highly glycosylated glycopeptides and are the basis for NMR-constrained MMC- and MD-conformational analyses for compounds **15** (Schuster 1999) and **16** (Herfurth 1997). These conformational analyses showed the formation of a new "wave type"-structure of the peptide backbone induced by the vicinal glycosylation-cluster. Qualitative structural indications from experimental observations were confirmed and quantified in these analyses. The experimental and theoretical data were used as a basis for the characterisation of glycopeptides corresponding to mucin sequences.

In the parallel syntheses of the MUC1 repeating unit glycopeptides **17** and **18**, glycosylated with GalNAc at different positions the application of already reduced acetamide building-blocks was compared to the azide-method. The more effective acetamide-method was used successfully in the syntheses of the pentaglycosylated repeating unit **19** and the dimeric 10-fold glycosylated MUC1 repeating unit **20**. The reduction of the building-blocks previously to the insertion in solid-phase-synthesis occurs quantitatively and substitutes the costly reaction

using thioacetic acid. *O*-deacetylation using hydrazin at the polymeric support was successful in every synthesis and is the method of choice. RP-HPLC purification of the glycopeptides was successful in every case. Identification of the glycopeptides was done by MALDI-TOF mass-spectrometry.

Characterisation of glycopeptides corresponding to the MUC1 repeating unit was carried out according to experiences from the characterisation and conformational analyses of the glycophorin derivatives. Experimental observations from MALDI-TOF mass-spectrometry, CD-spectroscopy and 2D-NMR-spectroscopy were interpreted. The objective of the analysis was the determination of synthetically structures and the observation of indications of interesting structural effects. The complete determination of the peptide sequences and the positions of the different GalNAc-units was realised for the repeating unit glycopeptides **17**, **18** and **19** using $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC and $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC experiments. Additional $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY spectra confirmed the connectivity in the peptide backbone and to carbohydrate sidechains.

Integration of the rows in the $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY spectra of the MUC1 repeating unit glycopeptides led to qualitative, time-average NOE-signatures. The interpretation of the observed NOE-contacts showed indications of turn-structures in the central antigenic ^9DTR -motiv in all glycopeptides. CD-spectra of the glycopeptides confirmed these observations. The shape of these turn-structures seems to be influenced by the different glycosylation pattern in the region of the DTR-sequence. Glycopeptide **18**, monoglycosylated at the DTR-motiv showed furthermore evidence of a second turn-structure located at the sequence $^{13}\text{APGS}$. According to these turn-structures in the monoglycosylated repeating unit **18** an expansive structural determined region of about 10 amino-acid units exists. The shape of this region differs from the conformation of the corresponding peptide (Fontenot 1995) dependent on the glycosylation of the peptide. Observations from the characterisation of the pentaglycosylated repeating unit **19** showed indications of a lot of structural interesting effects. Conformational analysis of a pentaglycosylated repeating unit glycopeptide with TF-antigenic structure (Dojahn 1998) showed an extended turn-structure in the antigenic DTR-motiv and confirmed the indications from the characterisation of the GalNAc-carrying glycopeptide **19**.

In the synthesis of the decaglycosylated dimeric MUC1 repeating unit **20** the yield of the synthesis of the monomeric Unit **19** with 19 % was reduced to 4 % because of the repetition of the condensed sequence. This is exactly a proportional development of the yield while doubling the peptide-coupling-reactions. Characterisation of the dimeric glycopeptide **20** was done using $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY and $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY spectroscopy. Heteronuklear experiments were not successful because of the signal-overlap in the carbon spectra. NMR- and CD-spectra showed partial similar regions, but indicate a slight different structure in both repeating units of the dimeric compound **20** compared together and to the monomer **19**. This observation shows the importance of the syntheses of extended structures consisting of repeating units to understand natural extended mucin-type structures.

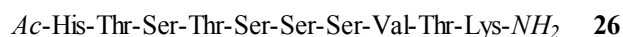
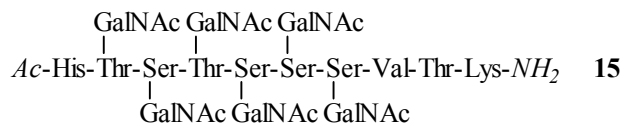
Antibody-binding-studies using different glycosylated MUC1 repeating unit glycopeptides (Karsten 1998) showed an enhanced binding-activity of a number of antibodies to the DTR-motiv monoglycosylated glycopeptide **18**. The particularly importance of this glycosylation pattern for the binding to the antibodies is compatible with the observed structural indications of the solubilised MUC1-glycopeptide. The central sequence of the monoglycosylated MUC1 repeating unit consisting of 13 amino-acid units **21** was synthesised for crystallisation-experiments in order to get an X-ray structural analysis. NMR-characterisation shows a structure of the synthetic monoglycosylated tridecapeptide **21** similar to the structure of the monoglycosylated repeating unit of the MUC1 glycoprotein.

The synthesis of the 13-fold glycosylated MUC2 repeating unit **22** resulted in a number of products which could not all be separated. The synthesised compound **22** was identified using MALDI-TOF mass-spectrometry. Because of the small amount of the compound a complete purification could not be optimised. In contrast to the nonglycosylated compound **27** which was synthesised and fully characterised the spacefilling glycosyl-side-chains in alternating order especially with prolin seem to hinder the synthesis. The efficiency of the Fmoc-Pfp-ester technique was demonstrated by quantitative synthesis of the likewise prolin-rich hCG β -peptide-sequence **28**. The synthesis of the tridecaglycosylated MUC2 repeating unit **22** seems to represent a border for the method.

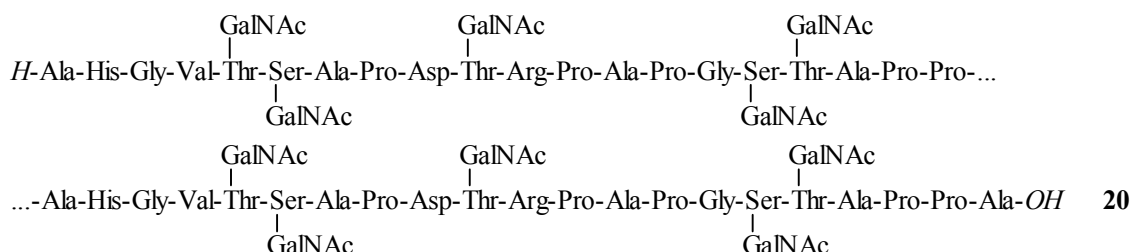
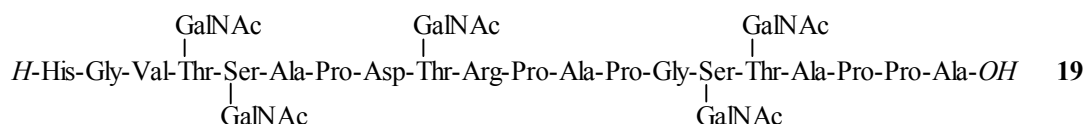
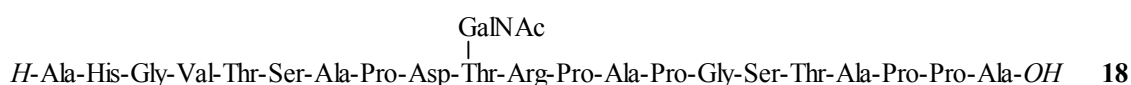
A newly glycosyl-amino-acid analogon based on a Asn-N-2- bound glucitol (Schäfer 1998) was tested as building-block in solid-phase-synthesis. The successfully synthesised and characterised glycopeptide-mimeticum corresponding to a V3-loop sequence from the HIV-1 gp120 glycoprotein will be used in T-cell proliferation studies.

Glycophorin A^N

GalNAc GalNAc GalNAc GalNAc GalNAc
Ac-Leu-Ser-Thr-Thr-Glu-Val-Ala-Met-His-Thr-Ser-Thr-Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Lys-NH₂ 16
 GalNAc GalNAc GalNAc GalNAc

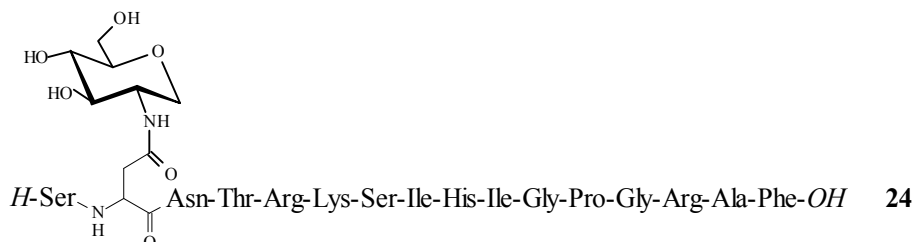


MUC1



$\begin{array}{cccccccccccccccccccc} \text{GalNAc} & \text{GalNAc} & & \text{GalNAc} & \text{GalNAc} & \text{GalNAc} & \text{GalNAc} & & \text{GalNAc} & & & \text{GalNAc} & & & \text{GalNAc} \\ | & | & & | & | & | & | & & | & & & | & & & | \\ \text{H-Thr-Thr-Thr-Pro-Ile-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Val-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Gly-Thr-Gln-Thr-OH} \\ | & & & & & & & & & & & | & & & | \\ \text{GalNAc} & & & \text{GalNAc} & \text{GalNAc} & & \text{GalNAc} & & & & & \text{GalNAc} & & & \text{GalNAc} \end{array}$

22



Ac-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH **10**



* Verbindung **22** konnte aufgrund von Verunreinigungen nicht eingehend charakterisiert werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Tn-Antigen (GalNAc) hochglycosylierte Glycopeptide aus den Proteinsequenzen des humanen Glycophorin A^N und dem humanen Mucin MUC1 synthetisiert und charakterisiert. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Synthese der mit 13 GalNAc-Resten glycosylierten MUC2-Repeating Unit angestellt und Peptidderivate aus den Sequenzen des HIV und des humanen Chorio Gonadotropin β (hCG β) synthetisiert.

Aus dem N-Terminus der Sequenz des humanen Glycophorin A^N wurde das 9-fach glycosylierte 18-mer Peptid **16** synthetisiert und charakterisiert. Die Synthese erfolgte aufbauend auf Erfahrungen aus der Darstellung des hexaglycosylierten Decapeptides **15** mit der Fmoc-Pfp-Ester-Technik am automatischen Peptidsynthesizer an Rink-Linker tragendem PEGA-Harz. Die GalNAc-Einheiten wurden über Glycosylazid-Building-Blocks eingeführt. Bei der Festphasensynthese wurden experimentelle Hinweise auf die Ausbildung einer starren Gestalt des wachsenden Glycopeptides am Harz erhalten. Nach der Glycopeptidsynthese wurden die Azidgruppen der Saccharidreste mit Thioessigsäure reduziert. Trotz eingehend optimierter Reaktionsführung der Reduktion wurden schwer abtrennbare Verunreinigungen gefunden. Der Einsatz der Azid-Building-Blocks scheint bei der Synthese komplexer hoch glycosylierter Glycopeptide limitiert zu sein. Die Entblockierung der GalNAc-Reste mit Hydrazin am polymeren Träger hat sich bei der Synthese des 9-fach glycosylierten 18-mer Peptides **16** gegenüber der Deacetylierung in Lösung mit NaOMe bewährt. Die abschließende RP-HPLC-Reinigung war aufgrund der Thioacetamidverunreinigungen aufwendig. Die Identifizierung des Glycopeptides erfolgte über ESI-Massenspektrometrie.

Die NMR-Charakterisierung des 9-fach glycosylierten 18-mer Peptides **16** und des Referenzpeptides **26** über ¹H¹H-TOCSY, ¹H¹³C-HMQC und ¹H¹³C-HMBC Experimente führte zu einer vollständigen Bestimmung der Peptidsequenzen und der Zuordnung der Positionen der individuellen GalNAc-Reste. Ergänzend erstellte ¹H¹H-NOESY Spektren bestätigten die Konnektivitäten im Peptidrückgrat und der Kohlenhydratreste. Die CD-Spektroskopie zeigte deutliche Hinweise auf das Vorliegen einer neuartigen Struktur im vicinalen Glycosylierungscluster der Glycophorinanaloga. Die durchgeführten analytischen Untersuchungen gaben Hinweise auf interessante Konformationen in den hochglycosylierten Glycopeptiden und sind die Basis für NMR-gestützte MMC- und MD-Konformationsanalysen an den Verbindungen **15** (Schuster 1999) und **16** (Herfurth 1997). Die Konformationsanalysen zeigten die Ausbildung einer neuartigen "Wave Type"-Struktur des Peptidrückgrates, induziert durch die clusterartige vicinale Glycosylierung. Die qualitativen Strukturhinweise aus den experimentellen Betrachtungen wurden in diesen Arbeiten bestätigt und quantifiziert. Die experimentellen und theoretischen Daten sind als Grundlage der Charakterisierungen von Glycopeptiden aus den Mucinsequenzen verwendet worden.

Bei der parallelen Synthese der mit GalNAc an verschiedenen Positionen glycosylierten MUC1 Repeating Unit Glycopeptide **17** und **18** am Wang-Harz wurde der Einsatz bereits reduzierter Acetamid-Building-Blocks mit der Azid-Methode verglichen. Die bessere

Acetamid-Methode wurde bei den Synthesen der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** und der dimeren 10-fach glycosylierten MUC1 Repeating Unit **20** erfolgreich eingesetzt. Die Reduktion des Building-Blocks vor der Festphasensynthese erfolgt quantitativ und ersetzt die aufwendige Thioessigsäurereaktion. Die *O*-Deacetylierung mit Hydrazin am polymeren Träger wurde in allen Fällen erfolgreich durchgeführt und ist die Methode der Wahl. Die RP-HPLC Reinigung der Glycopeptide war in allen Fällen erfolgreich. Die Identifizierung der Glycopeptide geschah über MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Die Charakterisierung der Glycopeptide der MUC1 Repeating Unit wurde auf den Ergebnissen aus den Charakterisierungen und Konformationsanalysen der Glycophorinderivate basierend durchgeführt. Hierbei wurden experimentelle Beobachtungen aus MALDI-TOF Massenspektrometrie, CD Spektroskopie und 2D-NMR-Untersuchungen interpretiert. Die Zielsetzung der Untersuchungen war hierbei die eindeutige Determinierung der synthetisierten Strukturen und die Beobachtung von Hinweisen auf interessante Struktureffekte. Die vollständige Bestimmung der Peptidsequenzen und der Positionen der individuellen GalNAc-Reste konnte für die Repeating Unit Glycopeptide **17**, **18** und **19** über $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Experimente durchgeführt werden. Ergänzend erstellte $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren bestätigten die Konnektivitäten im Peptidrückgrat und der Kohlenhydratreste.

Integration der Zeilen in den $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren der MUC1 Repeating Unit Glycopeptide führte zu qualitativen, zeitlich gemittelten NOE-Signaturen. Die Interpretation der beobachteten NOE-Kontakte zeigt Hinweise auf Turnstrukturen im zentralen antigenen ^9DTR -Motiv in allen Glycopeptiden. CD-Spektren der Glycopeptide bestätigen diese Beobachtungen. Die Gestalt dieser Turnstrukturen scheint von den unterschiedlichen Glycosylierungsmustern in und um die DTR-Sequenz herum beeinflusst zu sein. Bei dem Glycopeptid **18** mit der Monoglycosylierung im DTR-Motiv wurden weiterhin Hinweise auf eine weitere Turnstruktur in der Sequenz $^{13}\text{APGS}$ gefunden. Mit diesen vorliegenden Turnstrukturen liegt in der monoglycosylierten Repeating Unit **18** ein ausgedehnter strukturell determinierter Bereich über 10 Aminosäureeinheiten vor, dessen Gestalt sich aufgrund der Glycosylierung von der Konformation des Peptides (Fontenot 1995) unterscheidet. Die Beobachtungen aus der Charakterisierung der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** zeigten Hinweise auf eine Vielzahl strukturell interessanter Effekte. Die Konformationsanalyse eines pentaglycosylierten Repeating Unit Glycopeptides mit TF-Antigenstrukturen (Dojahn 1998) zeigte eine ausgeprägte Turnstruktur im antigenen DTR-Motiv und bestätigte die Hinweise aus der Charakterisierung des GalNAc tragenden Glycopeptides **19**.

Bei der Synthese der decaglycosylierten dimeren MUC1-Repeating Unit **20** wird die Ausbeute der Synthese der monomeren Einheit **19** von 19 % durch die Wiederholung der angeknüpften Sequenz auf 4 % reduziert. Dies entspricht einer proportionalen Entwicklung der Ausbeute bei der Verdoppelung der Anzahl der Peptidkupplungsreaktionen. Die Charakterisierung des dimeren Glycopeptides **20** wurde über $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektroskopie durchgeführt. Heteronukleare Experimente waren aufgrund der

starken Überlagerungen der Kohlenstoffsignale nicht erfolgreich. Die NMR- und CD-Spektren zeigen teilweise gleiche Effekte, weisen jedoch auf eine leicht veränderte Struktur in den beiden Repeating Units des Dimeren **20** zueinander und im Vergleich zum Monomeren **19** hin. Dies zeigt die Wichtigkeit der Synthese einer ausgedehnten Struktur aus Repeating Units um die ausgedehnten natürlichen Strukturen zu verstehen.

Antikörper-Bindungsstudien mit den unterschiedlich glycosylierten MUC1-Repeating Unit Glycopeptiden (Karsten 1998) zeigten eine erhöhte Bindungsaktivität einer Anzahl von Antikörpern mit dem im DTR-Motiv monoglycosylierten Glycopeptid **18**. Die besondere Bedeutung dieses Glycosylierungsmusters für die Antikörperbindung steht im Einklang mit den beobachteten Strukturhinweisen des gelösten MUC1-Glycopeptides. Die zentrale Sequenz der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit aus 13 Aminosäureeinheiten **21** wurde für Kristallisationsversuche zu einer angestrebten Röntgenstrukturanalyse synthetisiert. Die NMR-Charakterisierung zeigt, daß die Struktur des synthetischen monoglycosylierten Tridecapeptides **21** mit der Struktur der gesamten monoglycosylierten Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins im Wesentlichen übereinstimmt.

Die Synthese der 13-fach glycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** ergab eine Mehrzahl von Produkten, die nicht alle getrennt werden konnten. Die synthetisierte Verbindung **22** wurde über MALDI-TOF Massenspektrometrie nachgewiesen. Aufgrund der geringen entstandenen Substanzmenge konnte die vollständige Reinigung jedoch nicht optimiert werden. Im Gegensatz zur unglycosylierten Verbindung **27**, welche synthetisiert und vollständig charakterisiert wurde, scheinen die raumfüllenden Glycosylreste in alternierender Anordnung insbesondere mit Prolin die Synthese zu behindern. Die Leistungsfähigkeit der angewendeten Fmoc-Pfp-Ester Technik wurde mit der quantitativen Synthese der ebenfalls prolinreichen hCG β -Peptidsequenz **28** deutlich gezeigt. Bei einer Synthese der tridecaglycosylierten MUC2-Repeating Unit **22** hingegen wurde die Methode an ihre Grenzen geführt.

Ein neuartiges Glycosylaminosäureanalogon auf der Basis eines Asn-N-2- verknüpften Glucitols (Schäfer 1998) wurde auf die Einsatzfähigkeit als Building-Block in der Festphasensynthese getestet. Das erfolgreich synthetisierte und charakterisierte Glycopeptidmimetikum einer Sequenz aus der V3-Loop des HIV-1 gp120 Glycoproteins wird in T-Zell Proliferationsstudien eingesetzt..

Abkürzungen

Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Acetanhydrid
CD	Circular Dichroismus
Boc	1,1-Dimethylethyloxycarbonyl
COSY	Correlated Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Dhbt-OH	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DIPEA	Ethyldi-(2-propyl)-amin
DMF	Dimethylformamid
DQF	Doppelquantenfilter
ELISA	Enzyme Linked Immunogenic Sorbens Assay
ES	Electronenspray
Et	Ethyl
FID	Free Induction Decay
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GC	Gaschromatographie
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> , -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ges.	Gesättigt
IR	Infrarot
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,3-benzotriazol
NEM	4-Ethylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement And Exchange Spectroscopy
ORD	Optische Rotationsdispersion
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEGA	Polyethylenglycoldimethylacrylamid-Copolymer
Pfp	Pentafluorphenyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl

Rink	p-(α -Amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxyessigsäure
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
^t Bu	1,1-Dimethylethyl
TFA	Trifluoressigsäure
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time Of Flight
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation

Kohlenhydrate*

Ara	Arabinose
Fuc	Fucose
GalN ₃ Ac ₃	3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranose
GalNAc	2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranose
Glc	Glucose
GlcNAc	2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose
Glu	Glucositol
Man	Mannose
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
Rha	Rhamnose
Xyl	Xylose

*Kohlenhydrate ohne Präfix besitzen D-Konfiguration.

Aminosäuren*

Ala A	Alanin	His H	Histidin	Phe F	Phenylalanin
Arg R	Arginin	Hyl	5-Hydroxylysin	Pro P	Prolin
Asn N	Asparagin	Hyp	4-Hydroxyprolin	Ser S	Serin
Asp D	Asparaginsäure	Ile I	Isoleucin	Thr T	Threonin
Gln Q	Glutamin	Leu L	Leucin	Tyr W	Tyrosin
Glu E	Glutaminsäure	Lys K	Lysin	Val V	Valin
Gly G	Glycin	Met M	Methionin		

*Aminosäuren ohne Präfix besitzen L-Konfiguration.

Inhalt

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Glycoproteine	2
1.2 Strukturen der O-Glycoproteine	3
1.3 Biosynthese der O-Glycoproteine	6
1.4 Humanes Glycophorin A	7
1.5 Humane Mucine	9
1.6 Glycoproteine des Humanen Immunodeficiency Virus	13
1.7 Humanes Chorio Gonadotropin β	14
1.8 Synthese von Glycopeptiden	16
1.9 Analytische Methoden zur Charakterisierung der synthetischen Glycopeptide	20
2. Ergebnisse und Diskussion	22
2.1 Darstellung der Aminosäurederivate für die Glycopeptidsynthesen	22
2.2 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Glycophorin A ^N	26
2.3 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC1	44
2.4 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC2	87
2.5 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Immunodeficiency Virus (HIV)	95
2.6 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Chorio Gonadotropin β	99
3. Experimenteller Teil	102
3.1 Material	102
3.2 Darstellung der Aminosäurederivate	105
3.3 Derivatisierung des PEGA-Harzes mit dem Rink-Linker	108
3.4 Reaktionen an fester Phase	108
3.5 Synthese der Glycopeptide	110
4. Literatur	141
5. Anhang	146

Danksagung

Ich danke meinen Mitarbeitern Frau C. Diotel, Frau Dr. A. Kleen, Frau Dr. N. Mathieux und Herrn Dr. M. Springer für die perfekte Teamarbeit und den Spaß bei der Arbeit. Für die vielen netten Diskussionen danke ich Frau Dr. E. Farkas und Herrn Dr. H.-W. Tunger. Besonderen Dank an Frau H. Nürnberger für die vielen kleinen Gefallen und natürlich für die Synthese eines Teiles der Glycosylaminosäuren. Für die unchemischen aber dafür um so wichtigeren Tips und Tricks danke ich Frau A. Raffay.

Für die ausgezeichnete Kooperation im Rahmen der Projekte danke ich Herrn Prof.Dr. K. Bock und Herrn Prof.Dr. M. Meldal vom Carlsberg-Institut in Kopenhagen (SCI*920765). Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. T. Lindhorst, Herrn Dr. V. Vill, Herrn Prof.Dr. J. Thiem und insbesondere Herrn Prof.Dr. B. Meyer aus der Universität Hamburg (SFB 470). Mein Dank gilt auch Frau Dr. I. Brockhausen vom Hospital of sick children in Toronto, Herrn Prof.Dr F.-G. Hanisch (Universität Köln) und Frau Dr. J. Taylor-Papadimitriou (London). Ich danke Herrn Dr. M. Schreiber vom Bernhard Nocht Institut Hamburg und Herrn O. Schuster (Universität Hamburg). Insbesondere Herrn A. Schäfer von der Universität Hamburg danke ich für die interessante und amüsante Zusammenarbeit.

Den Praktikanten im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie (13.360) der Universität Hamburg danke ich für Ihren über das geforderte Maß hinausgehenden Einsatz. Die Arbeiten von Frau N. Öztürk und Frau T. Piezkalla sind auszugsweise an diese Arbeit angehängt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester wurden im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums der Organischen Chemie (13.105) an der Universität Hamburg hergestellt. Mein Dank gilt den aufgeführten Praktikanten für ihre durchweg gute und sorgfältige Arbeit. Beteiligt waren: C. Clasen, S. Heiligkeitag, O. Herzog, H. Kargerer, S. Knob, O. Konrad, M.-O. Matthies, O. Petermann, T. Piezkalla, C. Polefka, C. Schiller, M. Siedler, O. Sperling und A. Wichmann.

Meinen ausdrücklichen Dank richte ich an Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. J. Pieper und Herrn M. Meyer für die Aufnahme der NMR-Spektren und Unterstützung bei NMR-spektroskopischen Problemen.

Für die unbürokratische Aufnahme der Routine-NMR-Spektren danke ich Frau I. Schult.

Ich danke Frau A. Jensen vom Carlsberg-Institut für die Anfertigung der ESI-Massenspektren.

Für die Aufnahme der FAB-Massenspektren danke ich Frau A. Meiners.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden von Frau E. Krüger, Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinic (Universität Münster), Herrn S. Kötter und Herrn Dr. B. Lindner (Forschungszentrum Borstel) angefertigt. Für die Hilfe meinen herzlichen Dank.

Frau A. Höppner danke ich für die Aufnahme der CD-Spektren.

Herzlichen Dank an Herrn Dr. S. Peters vom Carlsberg-Institut in Kopenhagen für die hilfreiche Zusammenarbeit bei der automatischen Peptidsynthese und die Anfertigung der Aminosäurenanalyse.

Für die weitere Unterstützung dort danke ich Herrn Dr. E. Meinjohans.

Für die Ausführung der gaschromatographischen Untersuchungen danke ich Herrn Dr. P. Philipp und Herrn Dr. P. Francke.

Besonderen Dank verdient Herr Dr. W. Raffay für die Beratung und Betreuung in EDV-Fragen.

Selbstverständlich geht mein ausdrücklicher Dank an meine Eltern für die Ermöglichung des Studiums der Chemie.

Auch meinen Paten Herrn K.-H. Seidler nebst Frau und Herrn W. Pesenecker gilt hier mein Dank.

Meiner Schwester Ursula danke ich für die Erweckung des Forschergeistes.

Meiner Freundin Imke danke ich für die Dämpfung desselben.

Für alles, worüber hier nichts geschrieben steht, danke ich meiner Frau Stephanie.

Erklärung

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßte, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzte, und die Arbeit vorher nicht an anderer Stelle eingereicht habe.

Hamburg, den 15. März 1999

Gunther Klich

1. Einleitung

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Glycoproteine	2
1.2 Strukturen der O-Glycoproteine	3
1.3 Biosynthese der O-Glycoproteine	6
1.4 Humanes Glycophorin A	7
1.5 Humane Mucine	9
1.6 Glycoproteine des Humanen Immunodeficiency Virus	13
1.7 Humanes Chorio Gonadotropin β	14
1.8 Synthese von Glycopeptiden	16
1.9 Analytische Methoden zur Charakterisierung der synthetischen Glycopeptide	20

1. Einleitung

Aus Kohlenhydraten und Proteinen werden in vielen biologischen Prozessen Glycokonjugate gebildet, die in Lebensvorgängen essentiell sind oder zumindest eine entscheidende Rolle spielen (Varki 1993, Review). Es sind Strukturen vieler Verbindungen aufgeklärt worden, die sowohl aus Kohlenhydrateinheiten als auch aus Proteinanteilen aufgebaut sind. Die aus Kohlenhydrat- und Proteinfragmenten aufgebauten Glycoproteine in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen weit verbreitet. Glycoproteine kommen sowohl in löslicher Form als auch in den Membranen verankert vor. Bei Zellmembranen liegen die Kohlenhydratreste häufig extrazellulär und können antigen oder rezeptiv wirken. So binden die Oligosaccharide Hormone, Viren, Bakterien und Zellen (Sharon 1993, Review). Es gehören fast alle Serumproteine, viele Plasmaproteine, die Blutgruppensubstanzen, viele Enzyme, Rezeptoren und auch Proteohormone zu den Glycoproteinen (Stryer 1994).

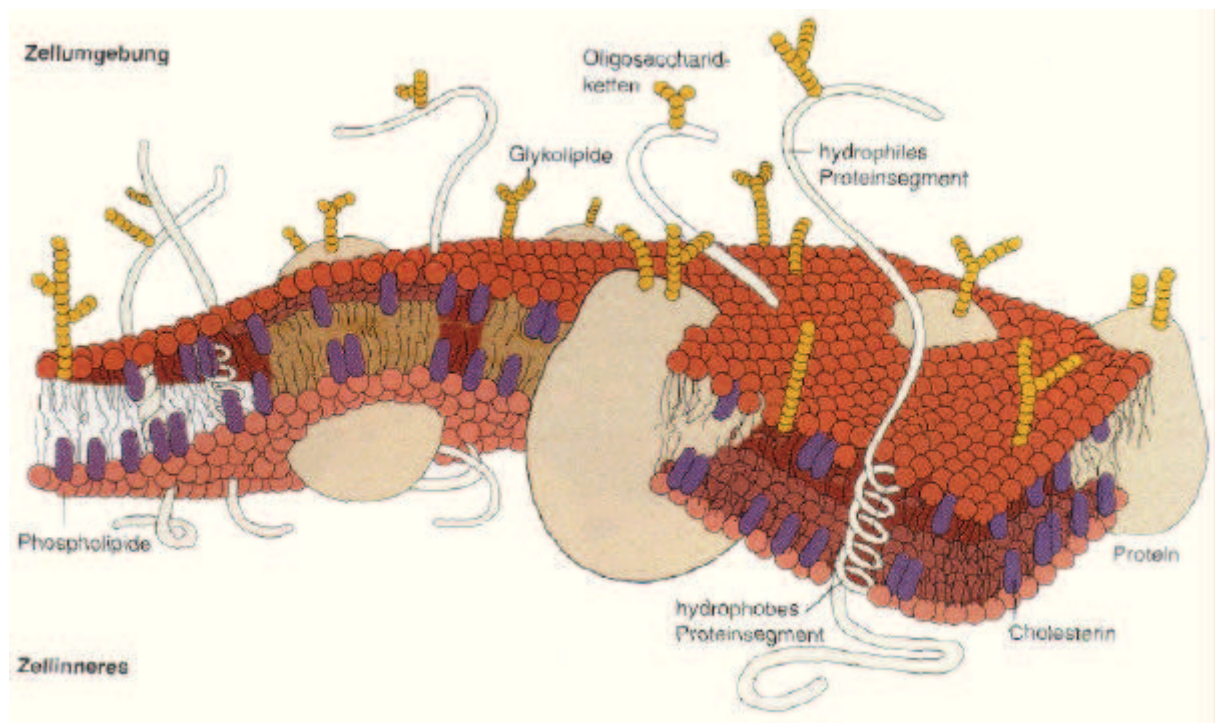


Abbildung 1.1: Modell der Struktur der Zellmembran. Die Doppelschicht ausbildenden Phospholipide sind als rote Kügelchen mit Schwänzen, die stabilisierenden Cholesterinmoleküle sind violett dargestellt. Langgestreckte oder kugelförmige Glycoproteine und Glycolipide ragen aus der Membran hervor (Strenger 1996).

Die Glycoproteine sind besonders an zellulären Transportvorgängen, Zelldifferenzierung, Zell-Zelladhäsion und hormoneller Zellerkennung beteiligt (Gottschalk 1972). Die Kohlenhydratkomponenten der Glycoproteine greifen bei hormonellen wie bei bakteriellen (Boren 1993) und viralen (Gambaryan 1995) Zellerkennungsvorgängen ein. Bei der Steuerung des zellulären Transportes von Proteinen durch die Zellmembran spielt der Kohlenhydratanteil der Proteine eine Rolle (Hirschmann 1993). Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Proteinen durch Proteasen in der Zelle wird durch die Glycosylierung beeinflusst (Fisher 1991). Eine Folge dieser weit gestreuten Funktionsvielfalt der Glycoproteine in der Biologie ist deren Beteiligung an

Krankheiten wie Krebs, Aids, Autoimmunkrankheiten und mikrobakteriellen Infektionen (Stryer 1994). Die Kohlenhydratkomponenten der Glycoproteine zeigen signifikante Veränderungen in ihrer Struktur und relativen Gestalt während des Wachstums, der Entwicklung und der Differenzierung. Verschiedene Veränderungen der Kohlenhydratseitenketten erscheinen in Krankheitsbildern des Krebses, insbesondere des metastasierenden Tumors, der Leukämie, sowie verschiedener entzündlicher Prozesse (Brockhausen 1997).

1.1. Glycoproteine

Die Stoffklasse der Glycoproteine wird gebildet von Proteinen, welche eine oder mehrere Oligosaccharidketten kovalent an deren Proteingerüst gebunden tragen. Diese Oligosaccharidstrukturen können bis zu 85 % der Masse der Glycoproteine einnehmen. Je nach Art der glycosidischen Bindung zwischen dem reduzierenden Ende der Kohlenhydratseitenkette und der funktionellen Gruppe der Aminosäure im Protein unterscheidet man zwischen N-, O- und S-Glycoproteinen. Bei den O-Glycoproteinen ist der Kohlenhydratanteil über eine O-glycosidische Bindung mit einer Hydroxylaminosäure verbunden. Die vorherrschenden Glycosylierungsmuster der O-Glycoproteine sind die Core A- und Core B-Strukturen (siehe Abbildung 1.2). Bei der Core A-Struktur ist 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactopyranose (GalNAc) α -glycosidisch an die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin geknüpft. In der Core B-Struktur ist Serin an der Hydroxylgruppe mit D-Xylose β -glycosidisch glycosyliert (Montreuil 1980). Die Glycoproteine mit einer Core A-Struktur sind sehr weit verbreitet, während die Core B-Struktur bevorzugt in Proteoglycanen aufzufinden ist (Fransson 1985). Die O-glycosidische Bindung von D-Galactose (Lamport 1973), L-Fucose (Hallgren 1975), D-Mannose (Tanner 1987), N-Acetyl-D-glucosamin (Hart 1988) und D-Glucose (Hase 1990) an Threonin oder Serin tritt sehr viel seltener auf. Außer Serin und Threonin werden auch andere glycosylierte Hydroxylaminosäuren gefunden. So ist D-Galactose in Kollagen an 5-Hydroxylysin O-glycosidisch gebunden (Spiro 1967), und in den Zellwänden höherer Pflanzen findet man Glycopeptide mit einer Bindung zwischen L-Arabinose und 4-Hydroxyprolin (Lamport 1971).

Core A D-Gal- β (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser

Core B D-Gal- β (1-3)-D-Gal- β (1-4)-D-Xyl- β (1-O)-Ser

Core C D-Man- α (1-4)-D-GlcNAc- β (1-4)-D-GlcNAc- β (1-N)-Asn
 |
 α (1-3)
 D-Man

Abbildung 1.2: Die Core-Strukturen der Glycoproteine. Core A und B sind die Grundstrukturen der O-Glycoproteine, Core C besitzt eine N-glycosidische Verknüpfung zwischen der Aminosäure und der ersten Kohlenhydrateinheit (siehe Text).

Die β -glycosidische Verknüpfung zwischen N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und der Amidgruppe des Asparagins findet man in der Substanzklasse der N-Glycoproteine. Die allen N-Glycopeptiden gemeinsame Grundstruktur eines Pentasaccharides wird als Core C-Struktur bezeichnet (siehe Abbildung 1.2). Bei der Core C-Struktur schließen sich an die erste GlcNAc-Einheit eine weitere GlcNAc- und drei Man-Einheiten an (Berger 1985). An diese Pentasaccharidbasisstruktur schließen sich weitere Oligosaccharidketten an. Je nach Aufbau werden drei weitere Haupttypen unterschieden, die als “complex”, “high mannose” und “hybrid” bezeichnet werden (Montreuil 1984).

In vielen Glycoproteinen treten O- und N-Glycosylierung nebeneinander auf (Fukuda 1987). Eine Auflistung der bekannten Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen dem Peptidteil und dem Kohlenhydratrest zeigt die Vielfalt der möglichen Strukturen auf (siehe Tabelle 1.1).

Kohlenhydrat	Glc GlcNAc GalNAc l-Rha	GlcNAc GalNAc Man	Glc Gal Xyl	l-Fuc	Gal	Gal l-Ara	Glc	Glc Gal
Verknüpfung	N	O	O	O	O	O	O	S
Aminosäure	Asn	Ser/Thr	Ser	Thr	Hyl	Hyp	Tyr	Cys

Tabelle 1.1: Übersicht der Vielfalt verschiedener Glcosylierungskombinationen (siehe Text).

1.2 Strukturen der O-Glycoproteine

O-Glycane werden auf vielen löslichen und membrangebundenen Glycoproteinen gefunden. Diese Oligosaccharidreste bestehen aus den Monosaccharidkomponenten GalNAc, Gal, Fuc, GlcNAc und NeuNAc und tragen teilweise Sulfatgruppen. Ein Charakteristikum der natürlich vorkommenden O-Glycane ist die extreme Microheterogenität. Die Strukturanalyse der Kohlenhydratkomponenten der isolierten Glycopeptide setzt eine definierte Abspaltung der Oligosaccharide voraus. Chemische Methoden wie die β -Eliminierung in alkalischer Borhydridlösung oder der Einsatz von Hydrazin sind sehr verbreitet (Brockhausen 1997). Eine besonders effektive Methode zur Abspaltung der vollständigen O-Glycane ohne Beschädigung des Proteingerüsts basiert auf den Einsatz von Trifluormethansulfonsäure (Gerken 1989). Bei dieser Methode verbleibt das direkt gebundene GalNAc-Monosaccharid am Proteingerüst und die komplexen terminalen Oligosaccharide werden abgespalten (Gerken 1992). Neben den chemischen Methoden haben sich auch chemoenzymatische Vorgehensweisen etabliert. So ist der Einsatz von O-Glycanasen (Iwase 1988), Sialidasen, Endo- und Exoglycosidasen beschrieben (Brockhausen 1997).

Zur detaillierten Analyse der Saccharidstrukturen muß die heterogene Mischung der den Glycoproteinen abgespaltenen O-Glycane aufgetrennt werden. Zur Reinigung der Oligosaccharide

haben sich die Elektrophorese, HPLC, Gelfiltration, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie durchgesetzt. Besonders gute Ergebnisse weisen die Lectin- und Antikörperchromatographie auf, die hochspezifisch sind und einen eingeschränkten Einsatzbereich haben. Die Strukturen der aufgereinigten Oligosaccharide können auf verschiedenen Wegen bestimmt werden. Chemische Methoden scheitern hierbei jedoch stets an der nicht verfügbaren benötigten hohen Substanzmenge. Der Einsatz chromatographischer Methoden wie Gaschromatographie, Aminosuckeranalyse im Aminosäureanalysator, HPLC oder HPAE sind sehr effektiv und verbreitet. Die hohe Empfindlichkeit dieser Methoden zeichnet die Chromatographie gegenüber der chemischen Analyse aus, es bedarf jedoch stets den Einsatz von Standards, da es sich generell um vergleichende Analysen handelt. Der Einsatz von Lectinen, immunologischen und enzymatischen Methoden erweitert das Spektrum der Analyse hierbei erheblich (Brockhausen 1997).

Die Massenspektrometrie wird eingesetzt zur Bestimmung der molekularen Masse der Glycane. Über Fragmentbetrachtungen und durch Kombination der Technik mit partiellem Abbau der Oligosaccharidketten können Informationen über Strukturelemente gewonnen werden. Insbesondere die Technik der Fast-Atom-Bombardment (FAB) Massenspektrometrie wurde erfolgreich in der Aufklärung der O- und auch N-Glycanstrukturen eingesetzt. Moderne Analysen stützen sich jedoch auf die Techniken der Elektrospray- (ESI) und Matrix Assisted Laser Desorption- (MALDI) Ionisations Massenspektrometrie. Es stellt sich als schwierig heraus, die O-Glycanstrukturen den zugehörigen Threonin- oder Serin-Glycosylierungsstellen zuzuordnen. In der Massenspektrometrie sind die Glycosidbindungen im Allgemeinen labiler als die Peptidbindungen und ein Auffinden glycosylierter Peptidfragmente erweist sich als schwierig. Eine Kombination von Methylierungsanalyse, Gaschromatographie und Massenspektrometrie ist die heute am häufigsten eingesetzte Methode der O-Glycopeptidanalyse (Brockhausen 1997).

Protonen-NMR Analysen sind sehr erfolgreich in der Strukturaufklärung der O-Glycopeptide. Auch auf Heteroatome gestützte Untersuchungsergebnisse fließen dank immer empfindlicher werdenden Geräten und daraus resultierenden Techniken immer mehr in die Strukturanalyse ein. Ein entscheidender Vorteil der NMR Spektroskopie ist die zerstörungsfreie Analyse der O-Glycanstrukturen. Mit Betrachtung der Chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten können die O-Glycanstrukturen inklusive der anomeren Bindungen determiniert werden. Dies bedarf zwar auch einer Vergleichsanalyse zu standardisierten Verbindungen, jedoch liegt hier eine große Menge an Vergleichsdaten vor und durch den Einsatz höherdimensionaler Techniken kann die NMR Spektroskopie bei Bedarf zur absoluten, nicht vergleichenden Analyseform erweitert werden (Brockhausen 1997).

Die einzige in der Vielzahl der O-Glycane stets vorkommende Bindung ist die α -O-glycosidische Verknüpfung des GalNAc mit den Aminosäuren Serin und Threonin. Dieses besondere Strukturelement wird auch Tⁿ-Antigen bezeichnet. Sowohl das Tⁿ-Antigen als auch die sialylierte Form STⁿ (NeuNAc α 2-6GalNAc α 1-OSer/Thr) wurden als Tumorassoziierte Anti-

gene beschrieben, obwohl diese Strukturen teilweise in Dickdarm- und Speicheldrüsensekreten natürlich vorkommen (Schachter 1992). Aktuell sind acht verschiedene Corestrukturen der O-Glycoproteine beschrieben (siehe Abbildung 1.3), von denen die Core-1 und Core-2 Strukturen in den meisten Glycoproteinen dominieren (Hounsell 1996).

Core 1	D-Gal- β (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser
Core 2	D-Gal- β (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser β (1-6) D-GlcNAc
Core 3	D-GlcNAc- β (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser
Core 4	D-GlcNAc- β (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser β (1-6) D-GlcNAc
Core 5	D-GalNAc- α (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser
Core 6	D-GlcNAc- β (1-6)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser
Core 7	D-GalNAc- α (1-6)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser
Core 8	D-Gal- α (1-3)-D-GalNAc- α (1-O)-Thr/Ser

Abbildung 1.3: Die verschiedenen Core-Strukturen der O-Glycopeptide (Hounsell 1996).

Die verschiedenen Corestrukturen der O-Glycoproteine werden gewebespezifisch exprimiert. Lösliche und auf Zelloberflächen lokalisierte Glycoproteine tragen oft sialylierte Core-1 Strukturen. Die Core-1 Struktur, auch als Thomson-Friedenreich(TF)-Antigen bezeichnet, kann ebenso wie die Tⁿ-Antigenstruktur an der 6-Position des GalNAc sialyliert werden [NeuNAc α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α 1-OSer/Thr]. Zusätzlich findet an der 3-Position der Galactose eine Glycosylierung mit Sialylsäure statt (NeuNAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-OSer/Thr). Beide Strukturen werden unter dem Begriff STF-Antigen zusammengefaßt. Auch die disialylierte Form (NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-6)GalNAc α 1-OSer/Thr) wird beobachtet (siehe Kapitel 1.4 und 1.7). Die Core-1 Struktur ist im Allgemeinen mit einer hohen Anzahl Kohlenhydrateinheiten substituiert, die im Falle der Krebserkrankung unvollständig gebildet werden und daher als TF-Antigen oder als Tⁿ-Antigen als Tumorassoziiertes Antigen vorkommt (Springer 1984). Die Strukturen der Core 3, 4, 5, 7 und 8 sind bisher nur in Mucinen gefunden

worden (siehe Kapitel 1.5). Obwohl die Core-5 Struktur in Mucinen verschiedener Spezies gefunden wird, hat diese Struktur beim Menschen oncofetalen Charakter. Dies zeigt das natürliche Vorkommen der Core-5 Struktur im Fruchtwasser (Meconium, Hounsell 1985) und das Auftreten der Struktur im humanen Adenocarcinom (Kurosaka 1983). O-Glycane mit der Core-6 Struktur wurden bisher nur in humanen Glycoproteinen gefunden (Brockhausen 1995). Die Core-7 Struktur ist auf O-Glycoproteinen des Speicheldrüsensekretes des Rindes lokalisiert (Chai 1992) und die Struktur des Core-8 kommt in Mucinen des humanen Bronchialtraktes vor (van Halbeek 1994). Außer der Core-1 Struktur können auch die Strukturen der Core 3, 4, 5, 7 und 8 an den jeweiligen GalNAc-Einheiten in 6-Position sialyliert sein (Brockhausen 1997).

O-Glycanketten können über 20 Monosaccharideinheiten enthalten, die über unterschiedliche Kettenverzweigungen miteinander verknüpft sind. In humanen Glycoproteinen sind die Core Strukturen meist mit N-Acetylglucosamineinheiten ($\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}3\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}3/4$) verlängert. Oft werden fucosylierte, sialylierte und sulfatierte O-Glycane gefunden. Viele Glycoproteine tragen gewebespezifische Antigene oder Blutgruppenantigene, was eine große Vielfalt der O-Glycanstrukturen bewirkt. Einige wichtige Beispiele sind die Blutgruppenantigene A, B und H, das i-Antigen, das Forssmann-Antigen und die verschiedenen Lewis-Antigene. Eine detaillierte Betrachtung dieser Strukturen mit den in diesem Zusammenhang wichtigen Referenzen ist zu finden in BROCKHAUSEN (1997).

1.3 Biosynthese der O-Glycopeptide

Die Struktur und relative Menge der Glycanketten in den Glycoproteinen ist das Ergebnis einer sensitiven Regulierung der Biosynthese. Am Beginn der Biosynthese der Glycoproteine steht der Aufbau des Proteins an den Ribosomen. Bei N-Glycoproteinen wird dem ribosomal gebundenen Peptid eine als Dolicholpyrophosphat in der Lipidmembran gebundene Oligosaccharideinheit angefügt (Schachter 1992). In den biosynthetischen Pfaden der O-Glycoproteine werden die Kohlenhydrateinheiten individuell über Nucleotid-Kohlenhydrat-Donoren schrittweise an das Proteingerüst addiert. Dies geschieht vorwiegend im Golgiapparat über sequentielle Aktionen der Glycosyltransferasen. Die Abfolge der Glycosylierungsreaktionen ist von der relativen Aktivität und Spezifität der Glycosyltransferasen sowie von der intrazellulären Lokalisierung der Enzyme und der Substrate geleitet. Sowohl die N-Glycan synthetisierenden Glycosyltransferasen, als auch diejenigen für O-Glycane sind in den verschiedenen Teilen des Golgi lokalisiert. Die Anordnung entspricht hierbei der Abfolge ihrer Aktion, so daß das Glycoprotein beim Durchwandern des Golgi spezifisch glycosyliert wird. Mit wenigen Ausnahmen synthetisieren Glycosyltransferasen nur eine spezielle Art von Bindungen zwischen spezifischen Kohlenhydrateinheiten. Die allgemeine Reaktionsweise der Glycosyltransferasen im Golgi kann in vivo folgendermaßen beschrieben werden (Brockhausen 1997):

$\text{Nucleotid-Glycosyl-Donor} + \text{Peptid-Acceptor} \rightarrow \text{Nucleotid} + \text{Glycosyl-Peptid-Product}.$

Die O-Glycosylierung der Threonin- und Serineinheiten in Mucinen wird von einer Familie von UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen kontrolliert. Die Größe dieser Enzymfamilie wird aktuell auf 10 bis 12 Transferasen geschätzt. Die ersten beiden geklonten UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen GalNAc-T1 und GalNAc-T2 weisen ein identisches Sequenzmotiv in ihren cDNA auf. Unter Zuhilfenahme dieses Motives wurden kürzlich GalNAc-T3 und GalNAc-T4 gefunden (Bennett 1998). Vollständige Glycosylierung der Mucin Glycoproteine ist nur mit dem kooperativen Einsatz der GalNAc-Transferasen möglich. Eine umfangreiche Beschreibung der Komplexität in der Biosynthese O-verknüpfter Oligosaccharide über verschiedene Polypeptid:N-acetylgalactosamintransferasen ist von MARCH (1996) erstellt worden.

1.4 Humanes Glycophorin A

Die Mehrzahl der bei Säugern auf der Oberfläche der Erythrocyten auftretenden Glycoproteine bilden die Glycophorine. Glycophorine entfalten Rezeptorfunktionen und bestimmen über die Art und Struktur ihrer terminalen Saccharidkomponenten die Blutgruppenspezifität (Jamieson 1972).

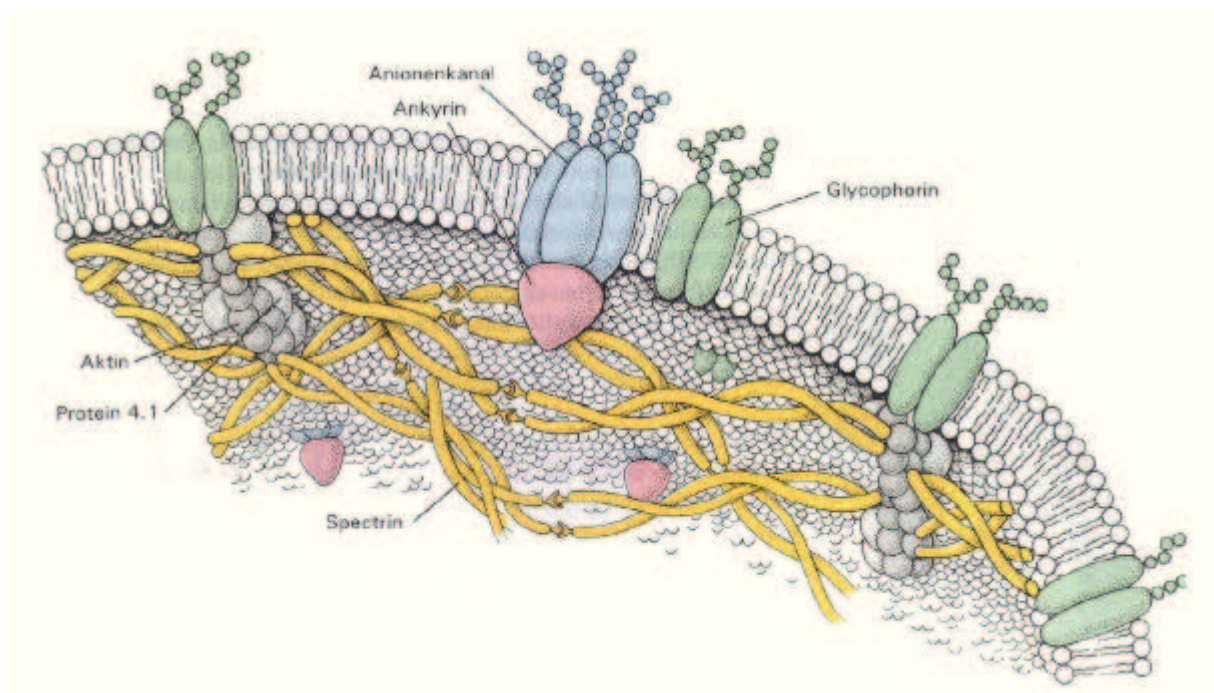


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der vermuteten Verbindung des Erythrocytenmembranskeletts mit der Plasmamembran. Spektrin (gelb) ist über Aktin (rot) mit dem Anionenkanalprotein (blau) und über Protein 4.1, das gleichzeitig ein Aktinfilament bindet, mit Glycophorin verbunden (Shohet 1984).

Bei einem der Hauptsialoglycoproteinen der Erythrocytenmembran, Glycophorin A, liegen sowohl N- als auch O-Glycosylierung nebeneinander vor (Furthmayr 1978). In der Zusammensetzung nehmen die Kohlenhydratanteile 60 % der Gesamtmasse des Glycoproteins ein. Die Extraktion aus den Membranen und die Trennung von anderen auf der Oberfläche der Erythrocyten auftretenden Glycoproteinen ermöglichte die Aufklärung der Primärstruktur des

131 Aminosäuren enthaltenden Glycoproteins. Es stellte sich heraus, daß die Verschiedenheit an zwei Stellen der Primärstruktur des Glycoproteins mit den Blutfaktoren M und N einhergeht. Diese Faktoren erwirken die Unterscheidung über Agglutinierung der roten Blutkörper im auf den jeweiligen Faktor sensibilisierten Versuchsmedium. Im Glycophorin A^M sind gegenüber dem Glycophorin A^N die terminale Aminosäure Leu gegen Ser und die an Position fünf befindliche Glutaminsäure durch Glycin ausgetauscht (Tomita 1978). Eine allgemeine wichtige Funktion des Glycophorin A ist die Stabilisierung der zellulären Gestalt der Erythrocyten über eine Assoziation des Glycoproteins mit dem Protein 4.1 (Anderson 1984, siehe Abbildung 1.4). Diese Assoziation wird über die Einwirkung von Polyphosphoinositiden reguliert (Anderson 1985). Es wurde weiterhin gezeigt, daß K562-Zellen durch Glycophorin A gegen den Angriff natürlicher Killerzellen geschützt werden. Der Protektionsgrad korreliert hierbei mit dem Maß der Integration des Glycoproteins in die Zellmembran der K562-Zellen. Der Haupteffekt scheint hierbei durch die N-Glycane erzeugt zu werden (El Ouagari 1995).

Untersuchungen über Protein-Lipid-Wechselwirkungen ergaben eine Einteilung des Makromoleküls in drei Abschnitte, den internen-, den intramembranen und den externen Bereich. Unter Zuhilfenahme von Faltungsuntersuchungen (Schulte 1979) wurde ein Modell der molekularen Anatomie des Glycophorin A entworfen (Marchesi 1979). Danach ist der externe Teil in Schleifen gelegt, der intramembrane Teil bildet eine α -Helix und der interne Teil liegt in zufälliger Orientierung vor (siehe Abbildung 1.5).

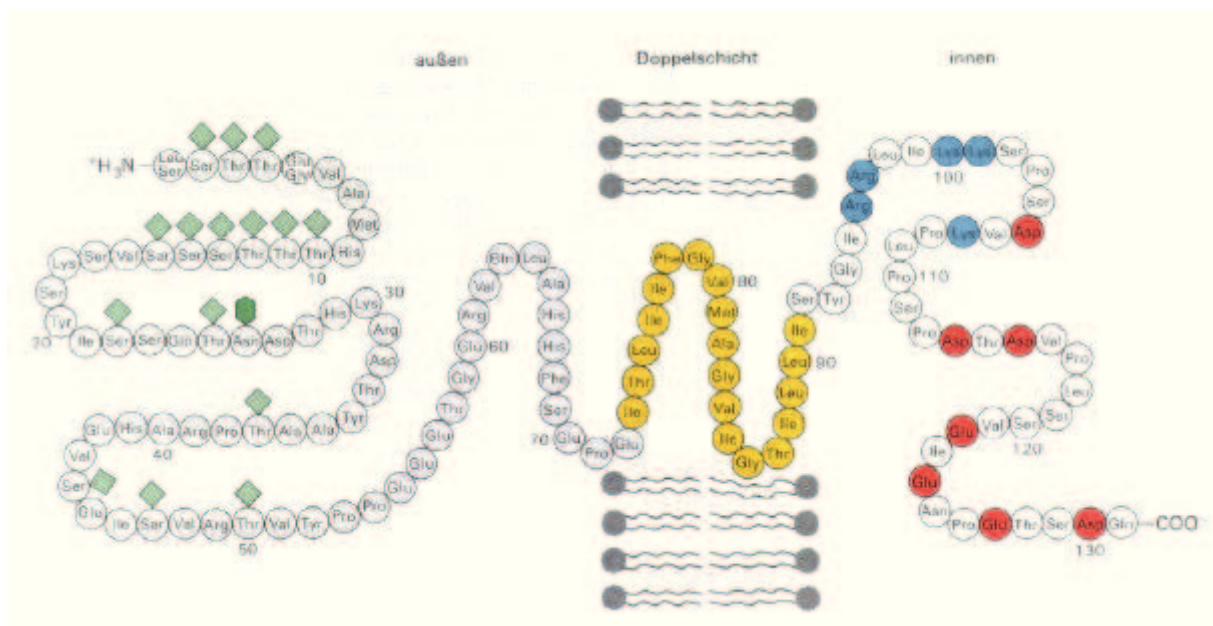


Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz und Transmembranlage von Glycophorin A aus der Erythrocytenmembran. Die 15 O-gebundenen Kohlenhydrateinheiten sind hellgrün dargestellt, die eine N-gebundene dunkelgrün. Die in der Doppelschicht verborgenen hydrophoben Reste (gelb) bilden eine transmembrane α -Helix. Das Carboxylende des Moleküls, das sich auf der cytosolischen Seite der Membran befindet, ist reich an negativ (rot) und positiv geladenen (blau) Resten (Marchesi 1985).

Der extrazelluläre Teil des Glycophorin A ist hochglycosyliert mit 15 O-Glycanen und einem N-Glycan. Der an Position 26 vorliegende N-glycosidisch gebundene Rest ist vom "complex"

Typus mit zwei N-Acetylneuraminsäureresten. Des weiteren ist an dem GlcNAc am reduzierenden Ende eine Fucoseeinheit geknüpft. Die Basisstruktur der O-Glycosylierung des Glycophorin A ist die Core-1 Struktur. Diese wird durch zwei N-Acetyl-Neuraminsäurereste fortgeführt (Dill 1990): NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-6)GalNAc α 1-OSer/Thr. Von strukturellem Interesse ist die Anordnung der O-Glycane in Clustern von Ser-2 bis Thr-4 und besonders von Thr-10 bis Ser-15.

Die Konformation des externen Teils ist für die biologische Aktivität des Glycophorin A entscheidend. Die Faltung des Peptidrückgrades wird dabei von den Kohlenhydratresten beeinflusst. PAVIA (1983) zeigte, daß die Wechselwirkungen zwischen Monosaccharidresten (GalNAc) und dem N-terminalen Ende des Glycophorin A^M zu einer Unbeweglichkeit der Einheit führt. Hierbei wurde das die äußersten fünf Aminosäuren enthaltende dreifach glycosylierte Fragment des N-Terminus untersucht. Die Autoren fanden, daß die Präsenz des GalNAc eine gestreckte Konformation induziert, die durch den Ausbau des Kohlenhydratteils um die zweite Gal-Einheit weiter beeinflusst wird (Pépe 1991). Das 39 Aminosäureeinheiten beinhaltende extrazelluläre N-terminale T1-Fragment des Glycophorin A wurde aus humanen Erythrocyten isoliert. NMR-Untersuchungen zeigen eine wohldefinierte Saccharidstruktur und eine ausgedehnte Peptidrückgratstruktur im T1-Fragment. Die experimentellen Beobachtungen wurden mit Metropolis-Monte-Carlo Analysen bestätigt. Die gestreckte Peptidrückgratstruktur wird induziert durch Interaktionen mit den Gal β 1-3GalNAc-Fragmenten aus den Oligosaccharidseitenketten. Auch die Disaccharidkonformation ist durch diese Wechselwirkungen zum Peptidrückgrat stabilisiert. (Pieper 1996). Von besonderem Interesse ist nun die Untersuchung, ob dieser im nativen Glycoprotein durch Disaccharide hervorgerufene Effekt auch von der Präsenz der Monosaccharideinheiten (GalNAc) ausgelöst wird.

1.5 Humane Mucine

Mucine sind Glycoproteine aus viskosen Sekreten (Mucus = Schleim), welche als lösliche Glycoproteine durch Epithelzellen sekretiert werden oder auf der Zelloberfläche verankert sind (membrangebundene Mucine, siehe Abbildung 1.6). Mucine wurden aus dem Atemwegstrakt, der Verdauungs- oder Genitalregion isoliert und zeigen unterschiedliche molekulare Zusammensetzungen auf (Gum 1992). Die wichtigsten Mucine wurden aus dem Speichel von Menschen, aus Milchdrüsen von Menschen und Mäusen, dem Darmtrakt von Menschen und Ratten, aus dem Atemtrakt von Menschen, Hunden und Ratten, der Submaxillarisdrüse von Rindern und Schweinen, sowie aus der Haut von Fröschen isoliert. Den Mucinen ist gemeinsam, daß es sich um Makromoleküle mit einer Molekularmasse von über 100 kD handelt, bei denen der Gewichtsanteil der Kohlenhydrate 50 % bis 80 % beträgt (Rose 1992).

Verantwortlich für die viskosen Eigenschaften der Mucine sind zum einen intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteingruppen der Glycoproteinketten. Wechselwirkungen der Oligosaccharidreste untereinander sowie Hydratisierungseffekte tragen weiterhin einen bedeutenden Anteil zu der Gelbildung der Mucine bei. Durch die hohe Glycosylierung

sind die Mucine in der Lage in großem Maße Wasser zu speichern, weshalb die wäßrigen Lösungen der Mucine einen gelartigen Charakter erhalten. Für den strukturellen Aufbau der Mucine sind negativ geladene und N-Acetylneuraminsäure- und Sulfatgruppen charakteristisch, die an den terminalen Positionen der Kohlenhydratseitenketten positioniert sind. Die gegenseitige Abstoßung der vielen negativ geladenen Gruppen und die großen Mengen an gebundenen Wassermolekülen bewirken ein starkes räumliches Anschwellen des Makromoleküls. Dieses resultiert in der ausgeprägten Viskosität und Gleitfähigkeit der Lösungen der Mucine. Die membrangebundenen Mucine enthalten in ihrer Proteinsequenz ein lipophiles transmembranes Proteinfsegment, mit dem sie in der Plasmamembran fest verankert sind (Strous 1992).

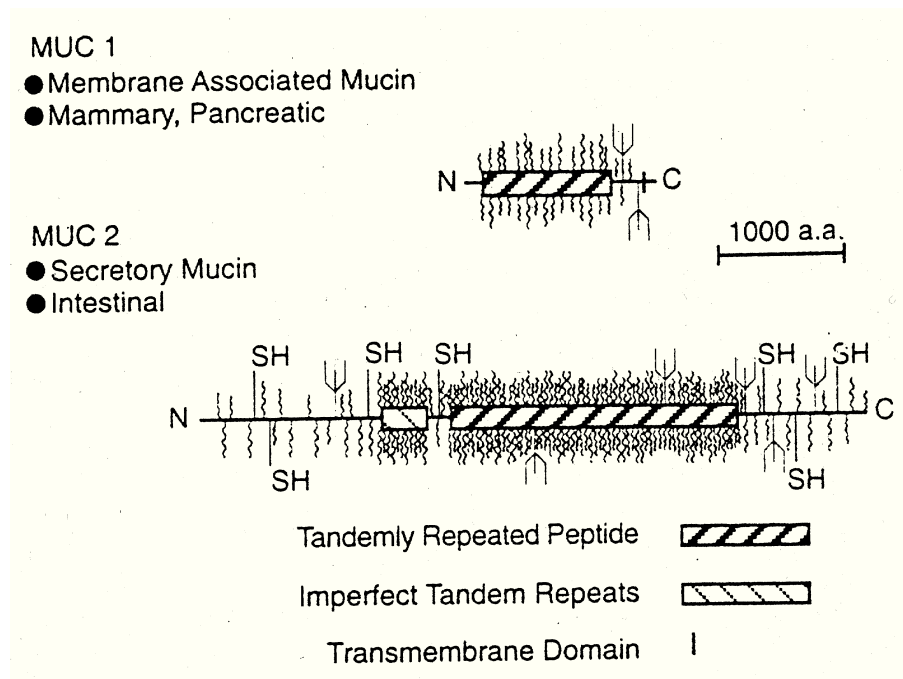


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des membrangebundenen Mucin Glycoproteins MUC1 und des sekretorischen Makromoleküls MUC2 (Kim 1996). Aus dem Schema werden die Bedeutung der Repeating Units und die hohe Glycosylierung der Mucine deutlich.

Allen Mucin Glycoproteinen ist gemeinsam, daß die Kohlenhydratseitenketten durch eine 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactopyranosyleinheit (GalNAc) α -glycosidisch am reduzierenden Ende mit der Hydroxylgruppe von Threonin- oder Serineinheiten verbunden sind (Core A-Struktur). Neben ihrem hohen Kohlenhydratanteil zeichnen sich die meisten Mucine durch einen repetitiven Proteinteil aus, welcher einen hohen Anteil von Prolin, Threonin- und Serineinheiten enthält (Spicer 1991).

Das Vorkommen dieser repetitiven Proteinteile (Repeating Units) deutet auf die Wichtigkeit einer lokalen Sekundärstruktur hin, welche für die Glycosylierung durch die Polypeptid-GalNAc-Transferase ausschlaggebend ist. Der repetitive Proteinteil besteht aus aneinandergereihten Peptidsequenzen, die sich nach einer bestimmten Anzahl von Aminosäureeinheiten wiederholen (Repeating Unit). Die Länge dieser Repeating Units variiert zwischen 6 (RIM) und 169 Aminosäuren (MUC6). Diese an Serin und Threonin reichen Abschnitte bilden den zen-

tralen Bereich der Mucinmoleküle. Hier sind die meisten der vorkommenden Hydroxylaminosäuren glycosyliert. Die kleineren terminalen Regionen der Proteinkette zeigen keine charakteristische Aminosäurezusammensetzung. In diesen Regionen befinden sich N-glycosidisch gebundene Kohlenhydratanteile sowie Cysteineinheiten, welche die Proteine mittels Disulfidbrücken vernetzen. Aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils der Mucine ist es schwierig, die Primärstruktur des Proteingerüsts (Apomucin) zu isolieren und zu sequenzieren. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden aus unterschiedlichen Quellen Apomucin-cDNAs geklont und aus deren Nucleotidsequenz die Peptidsequenz der Glycoproteine abgelesen (Verma 1994). Die aktuelle Nomenklatur der bekannten Mucin-cDNAs, deren Herkunft und die repetitiven Teile der Proteinsequenz sind der Tabelle 1.2 vorgestellt.

Mucine aus tierischem Gewebe:

Mucin	Repetitive Einheit	Vorkommen
BSM	keine repetitiven Abschnitte	Rind, Submaxillarisdrüse
CTM	keine repetitiven Abschnitte	Hund, Atemtrakt
FIM	VPTTPETTT	Frosch, Integument
PSM	GAGPGTTASSVGVGTETARPSVAGSGTTGTVSGAS-GSTGSSSGSPGATGASIGQPETSRLSVAGSS	Schwein, Submaxillarisdrüse
RIM	TTTPDV	Ratte, Darmtrakt

Mucine aus humanem Gewebe:

Mucin	Repetitive Einheit	Vorkommen
MUC1	PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA	Milchdrüse
MUC2	PTTTPITTTTTVTPTPTPTGTQT	Darmtrakt
MUC3	HSTPSFTSSITTTETTS	Darmtrakt
MUC4	TSSASTGHATPLPVD	Bronchialtrakt
MUC5	TTSTTSAP	Bronchialtrakt
MUC6	SPFSSTGPM TATS FQTTTTYPTPSHPQTTLPTHVPPFSTSLV-TPSTGTVWPTH AQMATSASIHSTPTGTIPPPTTLKATG-STHTAPPMTPPTSGTSQAHSFSTAKTSTSLHSHTSSTHH-PEVTPTSTTTITPNPTSTGTSTPVAHTTSATSSRLPTPFTTH-SPPTGS	Magen
MUC7	WAAPPTPSATTPAPPSSSAPPG	Speicheldrüse
MUC8	YSGPRPLQEGTPGSRAAHALSRRGHRVHELPTSSPGGDTGF	Bronchialtrakt

Tabelle 1.2: Bezeichnung, repetitive Proteinsequenzen und Herkunft der bisher bekannten verschiedenen Mucin-cDNA aus tierischen (Verma 1994) und humanen Geweben (Kim 1996).

Die Gemeinsamkeiten der bisher untersuchten Mucine in verschiedenen Geweben sind der hohe Kohlenhydratanteil, die relativ starke Präsenz der fünf Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin, Serin und Threonin, die repetitiven Regionen in der Proteinsequenz sowie eine cysteinreiche

Domäne außerhalb der repetitiven Region (Xu 1992, siehe auch Abbildung 1.6). Bei der Untersuchung verschiedener Mucine wurde festgestellt, daß die Sialylierungs- und Sulfatierungsmuster für das jeweilige Gewebe spezifisch sind (Feizi 1987). Auch die Verzweigungsmuster der Oligosaccharidseitenketten zeigen Gewebespezifität auf (Cornfield 1992). Es wurde gezeigt, daß die Gestalt des Peptidteils der Substrate von Glycosyltransferasen den Haupteinfluß auf die O-Glycosylierung ausübt (Brockhausen 1990). Möglicherweise sind Mucine mit verschiedenen Peptidsequenzen in den Repeating Units auch unterschiedlich glycosyliert (Granovsky 1994).

Mucine lassen sich in Seren von Tumorpatienten nachweisen und lösen eine Immunantwort aus, die möglicherweise klinische Relevanz in der Diagnose und der Prognose des Krankheitsverlaufs hat (Lan 1990). Eine Regression der Biosynthese der Kohlenhydratseitenketten und ein Expression von Mucinen ist ein Anzeichen für viele Formen des Krebses und der Leukämie (Xerri 1990). Die Expression der Mucine MUC1-5 variiert in verschiedenen Zelltypen und in Krebszellen (Roussel 1996). Es wurde gezeigt, daß eine Veränderung der Glycosylierungsmuster in den Mucinen viele Tumorerkrankungen begleitet. Die aus tumorösem Gewebe isolierten Mucine weisen verkürzte Saccharidstrukturen vor. Aus dieser abnormalen, reduzierten Glycosylierung der Glycoproteine resultiert eine Zugänglichkeit des Peptidrückgrates für Antikörper (Kim 1996). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus Antikörperuntersuchungen werden immunotherapeutische Ansätze basierend auf Peptid- und Kohlenhydratstrukturen tumoröser MUC1-Glycoproteine diskutiert (Koganthy 1996).

Erste Strukturuntersuchungen mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und ^{13}C -NMR-Relaxationsanalysen an nativen und modifizierten Mucinen der Submaxillarisdrüse von Rindern (Gerken 1986) und Schweinen (Gerken 1987) wiesen auf eine gestreckte Gestalt der Glycoproteine hin). Durch die Weiterentwicklung der NMR-Techniken, insbesondere der angewandten NOE-Untersuchungen (Gerken 1989), und durch die Erweiterung der angewandten Analysemethoden um Circular Dichroismus und Light-Scattering Studien konnten genauere Ergebnisse erzielt werden. Es zeigte sich, daß eine Streckung des Proteingerüsts in Abhängigkeit von der Glycosylierung der Hydroxylaminosäurepositionen auftritt (Shogren 1989). Es wurden so Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen der Peptidkette und Saccharidresten gefunden, welche die Konformation des Proteinerückgrates beeinflussen. Diese Hinweise wurden auch über stochastische Dynamikuntersuchungen an Modellverbindungen bestätigt (Butenhof 1992).

Bei der NMR-Untersuchung synthetischer Peptide analog zu der Sequenz der Repetitiven Einheit des Mucins MUC1 wurden Hinweise auf eine Turnstruktur in der Sequenz Asp-Thr-Arg (DTR) gefunden (Tendler 1990) und mittels Metropolis Monte Carlo Berechnungen bestätigt (Scanlon 1992). Systematische Untersuchungen zur Konformation synthetischer Peptide analog zu der MUC1 Repeating Unit determinierten die Sekundärstruktur der unglycosylierten MUC1 Peptide und zeigten Turnstrukturen in einem Trimer der Repeating Unit (Fontenot 1995). Erste Untersuchungen mit Glycopeptidfragmenten aus der Sequenz der Repetitiven

Einheit des MUC1 zeigten keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Turnstruktur durch eine Glycosylierung an der N-terminalen Seite der DTR-Sequenz (Liu 1995). Es zeigt sich, daß nur eine systematische Analyse der Strukturen und der Antikörperspezifität synthetischer, verschiedenartig glycosylierter Glycopeptide aus den Repetitiven Einheiten der humanen Mucine die äußerst komplexen Zusammenhänge der Glycosylierung dieser Glycoproteine beleuchten kann.

1.6 Glycoproteine des Humanen Immunodeficiency Virus

Das Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), eine 1981 bekannt gewordene Infektionskrankheit des Immunsystems, wird von dem Human Immunodeficiency Virus (HIV) verursacht. Die Wirtszellen des HIV sind die T4-Lymphocyten, die bei der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Das im Durchmesser etwa 100 nm große HIV-Virion weist in seiner Lipiddoppelschichtmembran zwei Glycoproteine auf. Das transmembrane Glycoprotein gp41 ist über eine Disulfidbrücke mit dem Oberflächenprotein gp120 verknüpft (siehe Abbildung 1.7). HIV dringt in die T4-Lymphocyten durch Wechselwirkungen des gp120 der Virushülle mit dem Plasmamembranrezeptor CD4 ein. Die beiden Membranen fusionieren und das Virusgenom wird direkt in das Cytosol entlassen (Stryer 1994).

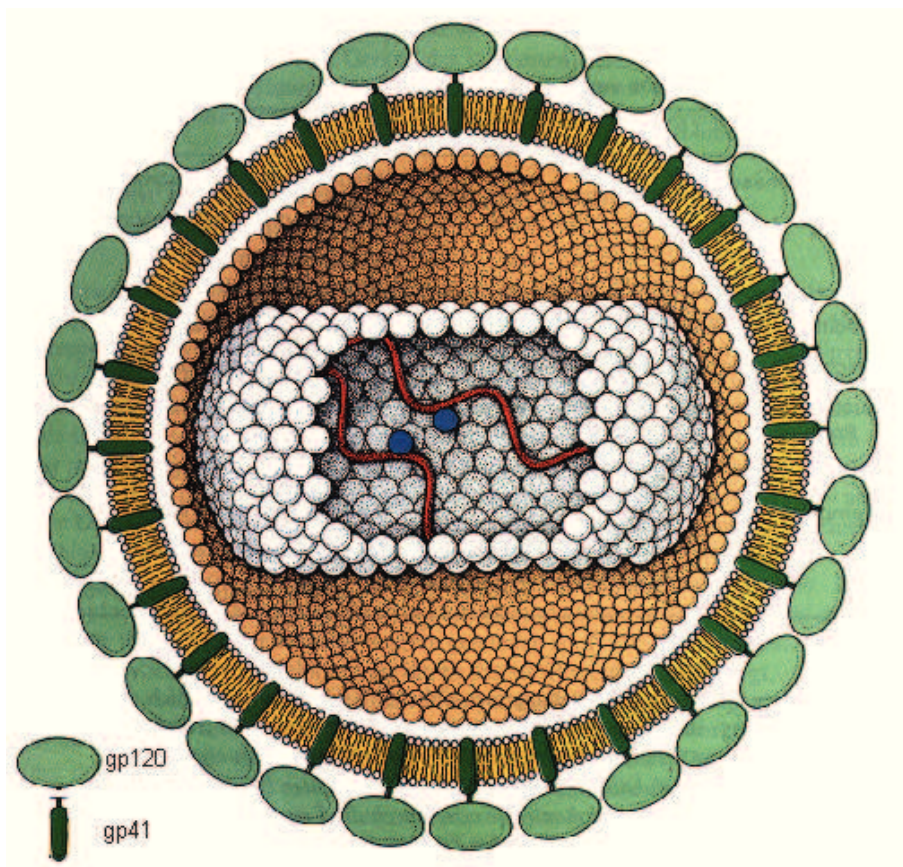


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Humanen Immunodeficiency Virus (HIV). Die Glycoproteine der Membranhülle sind gekennzeichnet. Das Core des Virus enthält die beiden Proteinuntereinheiten p18 (orange) und p24 (weiß), ein RNA-Genom (rot) und Reverse Transkriptase (blau) (Gallo 1987).

Ein wichtiges therapeutisches Ziel ist die Verhinderung der Bindung des Virus an die Zelle und des nachfolgenden Fusionsprozesses. Die Bindung des gp120 Glycoprotein an den CD4-Rezeptor stellt den ersten Schritt der HIV:Zell-Wechselwirkung und des Eintrittes des Virus in die Zelle dar (Dalglish 1984). Nach der Bindung an den CD4-Rezeptor tritt eine Wechselwirkung des gp 120 mit den auf der Zelloberfläche lokalisierten Corezeptoren CCR5 und CXCR4 auf (Alkhatib 1996). Es wurde gezeigt, daß die Wechselwirkung zwischen dem gp120 Glycoprotein und den Corezeptoren von der dritten variablen Schleife (V3-Loop) der gp120-Struktur vermittelt wird (Cocchi 1996). Mutationsstudien an der V3-Loop lassen eine Abhängigkeit des Auftretens der Corezeptor-Wechselwirkung von der Aminosäuresequenz in der V3-Loop vermuten (Speck 1997). Eine mögliche Strategie zur Verhinderung der Bindung des Virus an die Zelle ist die Blockade der viralen Infektion über den Einsatz synthetischer Peptide und Peptidderivate, welche die V3-Loop Domäne des gp120 Glycoproteins nachahmen. Bei den Untersuchungen der antiviralen Eigenschaften von V3-Loop Peptiden muß dabei sichergestellt werden, daß von den eingesetzten Substraten keine inhibitorischen Effekte auf die beteiligten aktivierten T-Zellen ausgeübt werden (Sakaida 1998). Dieser Effekt würde eine antivirale Aktivität durch Verringerung der T-Zellanzahl vortäuschen.

1.7 Humanes Chorio Gonadotropin β

Eine wichtige Gruppe von Glycoproteinen bilden die vom humanen Hypophysenvorderlappen produzierten glandotropen Peptidhormone Follicotropin FSH, Lutropin LT und Thyrotropin TSH, sowie das Chorio Gonadotropin hCG (siehe Abbildung 1.8). Follicotropin ist ein Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und Lutropin ein luteinisierendes Hormon (LH), es fördert die Eireifung, den Eisprung und die Gelbkörperbildung bei der Frau, während Thyrotropin ein thyrotropes stimulierendes Hormon (TSH) ist, das die Funktion der Schilddrüse reguliert (Talmadge 1984). Das von frühen Trophoblasten produzierte hCG stimuliert den Gelbkörper zur Bildung vom schwangerschaftserhaltenden Steroidhormon Progesteron. Schon wenige Tage nach der Befruchtung einer Eizelle steigt die Konzentration von hCG im Blut und Urin stark an; auf dem Nachweis von hCG im Urin beruht einer der effektivsten Schwangerschaftstests. (Schäffler 1995).

Die gonadotropen Hormone bestehen aus zwei Untereinheiten, einer α -Kette aus 96 Aminosäureresten, die bei allen vier Hormonen ähnlich ist, und der hormonspezifischen β -Kette (Römpp 1995). Die beiden Untereinheiten werden durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Die Möglichkeit der Darstellung von Hybriden aus isolierten α -Einheiten von FSH, TSH, LH und hCG desselben Ursprungs weist auf eine bei allen vier Hormonen weitgehend identische α -Einheit hin. Die Aktivität der dargestellten Hybride wird bestimmt von der jeweiligen β -Einheit. Diese β -Einheit ist im Chorio Gonadotropin ein 139 Aminosäure-reste langes 37 kD Glycoprotein. Sowohl die α - als auch β -Einheit des hCG weisen N-Glycosylierungsstellen auf. Die Kohlenhydratreste der α -Einheit besitzen eine Complex Type

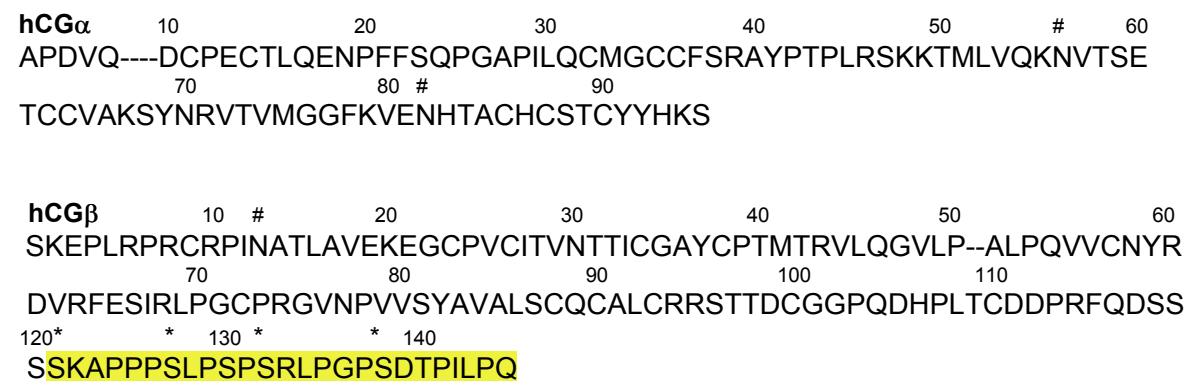


Abb. 1.8: Aminosäuresequenz der α - und β -Einheit des hCG. Die Sterne stehen für glycosylierte Aminosäuren (# N-glycosyliert, * O-glycosyliert), die Leerstellen in den Sequenzen stehen für Codon-Gen-Entfernungen im hCG. Der schattierte Teil kennzeichnet die 23 zusätzlichen Aminosäuren des hCG β gegenüber FSH, LH und TSH.

Auch die β -Einheit ist bei allen vier Hormonen an Asn 13 oder Asn 30 *N*-glycosyliert. Sowohl in der α - als auch in der β -Untereinheit sind als Saccharideinheiten Galactose, Mannose, Galactosamin, Glucosamin, Fucose und Sialinsäure vertreten. Im Gegensatz zum FSH, LH und TSH weist hCG β am N-Terminus eine zusätzliche prolin- und serinreiche Sequenz aus 23 Aminosäuren auf, die zusätzlich *O*-glycosyliert ist (Talmadge 1984). In dieser Sequenz sind spezifisch die Serinpositionen Ser-121, Ser-127, Ser-132 und Ser-138 glycosyliert (Abbildung 1.8), obwohl eine O-Glycosylierung am Thr 140 auch denkbar wäre.

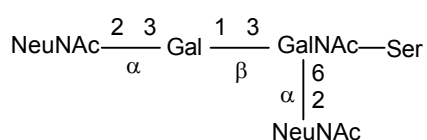


Abbildung 1.9: O-glycosidische Verknüpfung der Oligosaccharide im C-terminalen Proteinfragment des hCG β .

In dem C-terminalen Proteinfragment des hCG liegen nur O-glycosidische Bindungen vor. Die Serinpositionen sind mit einem Tetrasaccharid der nebenstehenden Kohlenhydratzusammensetzung des Oligosaccharides glycosyliert (Kessler 1979). Diese zusätzliche Sequenz des hCG β ist aufgrund der spezifischen Glycosylierung des Serin von Interesse, da bisher keine spezifisch Serin glycosylierenden Transferasen isoliert werden konnten, während die

Familie der bekannten Glycosyltransferasen vorrangig Threonin und zum Teil auch Serin glycosylieren (Brockhausen 1997). Unglycosylierte Peptidfragmente aus der Sequenz des hCG β eignen sich nur als Substrate zur Untersuchung serinspezifischer Glycosyltransferasen, wenn die Peptide keine Substrate für die bekannten Glycosyltransferasen darstellen. Der C-Terminus des hCG β sollte Sequenzen beinhalten, die diesen Erfordernissen genügen.

1.8 Synthese von O-Glycopeptiden

Aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit natürlich vorkommender, homogener Glycoproteine ist die chemische Synthese der geeignete Weg, zu Modellsubstanzen zu gelangen. Hierbei ist die schrittweise Festphasensynthese der Fragmentkondensation in Lösung vorzuziehen. Synthesen ausgedehnter Peptidstrukturen über die Kondensation von Peptiden an polymergebundene Peptide ergaben interessante Resultate. Die Reaktion ist allerdings ausschließlich mit cysteinhaltigen Peptidsequenzen durchführbar (Dawson 1994). Der langwierige Weg über Schrittweisen Aufbau zu ausgedehnten Peptidstrukturen zu gelangen ist ebenso erfolgreich und zudem universell einsetzbar (Fontenot 1991/1993). Enzymatische Glycopeptidsynthesen sind bisher wenig beschrieben, geben aber Anlaß zu Erwartungen zukünftiger interessanter Ergebnisse (Witte 1997). Bei der Festphasenglycopeptidsynthese hat sich speziell der Einsatz glycosylierter Aminosäurederivate gegenüber der Blocksynthese, der nachträglichen Glycosylierung am Peptid, bewährt (Paulsen 1985). Neuere Untersuchungen zeigen die generelle Möglichkeit der Glycosylierung synthetischer Peptide am polymeren Träger (Schleyer 1997), eine effiziente Synthese ist jedoch über diese Syntheseroute nicht zu erwarten.

Die Wahl der Schutzgruppen in den glycosylierten Aminosäurederivaten (Building Blocks) für die Festphasensynthese ist nicht trivial. Im Kohlenhydrateil der Building Blocks werden in der Festphasenglycopeptidsynthese meist Acetat-, Benzoat- und Benzylschutzgruppen eingesetzt (Anisfield 1990). Die Aminofunktion des Aminosäureteils der Building Blocks wird über die Benzyloxycarbonyl- (Z-), 2-(4-Pyridyl)-ethyloxycarbonyl- (4-Pyroc-), Allyloxycarbonyl- (Aloc-) oder 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl- (Fmoc-) Schutzgruppe blockiert. Letztere ist wegen der quantitativen Abspaltung schon bei recht milden, basischen Bedingungen im Regelfall vorzuziehen (Carpino 1972). Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird Piperidin als Reagenz empfohlen (Bardaji 1991).

Gegenüber der Methode der in situ Aktivierung freier oder geschützter Carboxylgruppen in der Peptidkupplung hat sich der Einsatz von Aktivestern zur Peptidsynthese durchgesetzt (Christensen 1993). Nicht für alle Aminosäurederivate sind jedoch Aktivester zugänglich. Peptidkupplungen mit carboxylfreien Aminosäurederivaten lassen sich unter Zuhilfenahme einer milden Base mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU, Knorr 1989) oder O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU, Carpino 1993) durchführen. Die Dhbt- und Pfp-Aktivester werden aufgrund ihrer leichten Handhabbarkeit häufig eingesetzt (Atherton 1988). Für den Schutz der Seitenkettenfunktionalitäten der unglycosylierten Aminosäurederivate sind basenstabile Gruppen erforderlich, die leicht sauer entfernt werden können (Fields 1990). Zur Blockierung von Hydroxyl- und Carbonylresten eignet sich die tBu-Gruppe, bei Aminofunktionen hat sich die Boc-Schutzgruppe bewährt (Chang 1980).

Die glycosylierten Aminosäurebausteine lassen sich über eine Glycosidsynthese der Fmoc-geschützten Aminosäure-Pfp-Ester von Serin und Threonin mit 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galacto-pyranosyl-Derivaten (Ac₃GalN₃) herstellen. Man erhält hier im Gegensatz

zur entsprechenden Reaktion mit der Acetamidverbindung das erwünschte α -Anomer (Paulsen 1976). Die alternative Reaktion mit Galactal und N-Iodosuccinimid (NIS) über das 2-Desoxy-2-iod- α -D-talopyranosyl-Zwischenprodukt mit nachfolgender Inversion durch Natriumazid ist in ähnlichen Systemen verlustreich (Kessler 1987). Da die Trennung der Anomere der Glycosylaminosäure nicht gelingt, sondern am Glycopeptid erfolgen muß, scheidet diese Methode für Mehrfachglycosylierung aus. Der Einsatz von Thioglycosiden unter Katalyse über Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtrifluormethansulfonat (DMTST) ergibt bei Serin-Derivaten recht gute Ausbeuten (Ravenscroft 1982).

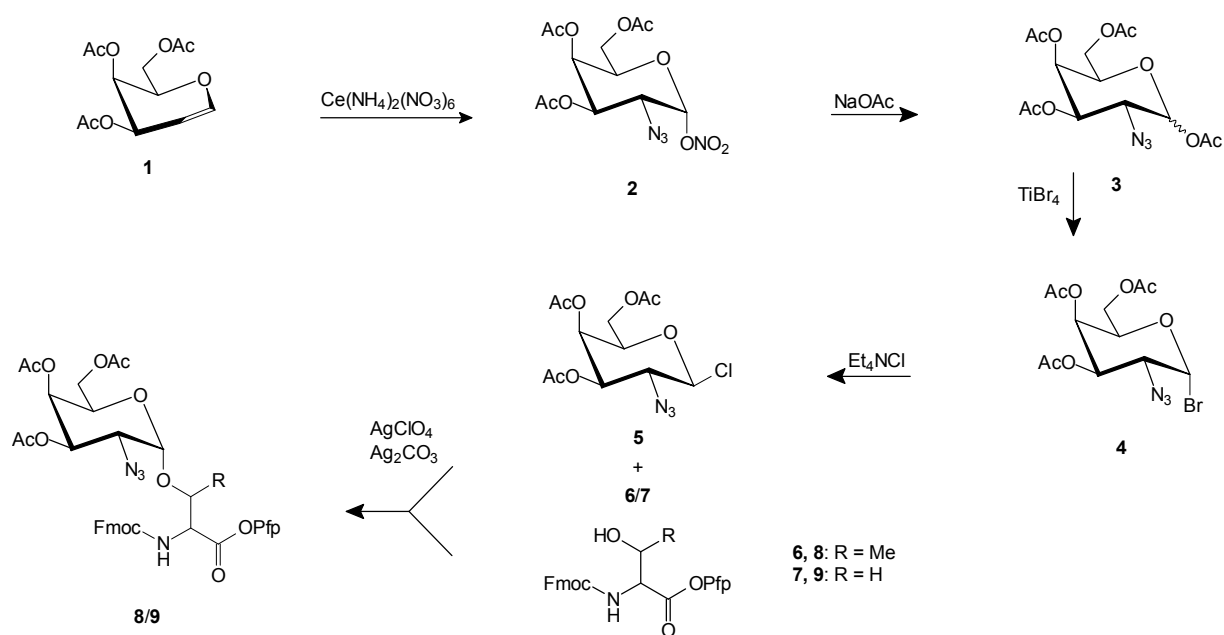


Abbildung 1.10: Darstellung der Galactosylazid-Building-Blocks **8** und **9** mit Glycosylhalogenosen über Silber-salzkatalyse (Paulsen 1994).

Die größten Erfolge in der Synthese der Glycosyl-Building-Blocks werden mit Halogenosen über Silbersalzkatalyse erzielt (siehe Abbildung 1.10) (Paulsen 1994). Hierbei wird ausgehend vom 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galactal (**1**) mit Natriumazid und Diammoniumcer(IV)hexanitrat in Acetonitril das 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylnitrat (**2**) dargestellt (Lemieux 1979). Dieses wird mit Natriumacetat in Essigsäure zu 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranose (**3**) überführt und sodann durch Titan-tetrabromid in 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**4**) umgesetzt (Paulsen 1978). Eine alternative Variante, zum Bromid **4** zu gelangen, ist von BRODDEFALK (1993) vorgestellt worden. Die über Lithiumbromid führende Methode arbeitet ohne zwischenzeitliche, aufwendige Reinigung, ist jedoch nicht für größere Ansätze geeignet. Die guten Glycosyldonoreigenschaften des Bromides **4** werden noch übertroffen von dem über Tetraethylammoniumchlorid zugänglichen 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosylchlorid (**5**, Helferich 1974). Dessen Umsetzung mit den Serin- und Threoninakzeptoren **6** und **7** geschieht über Ka-

talyse mit Silbercarbonat und Silberperchlorat. So sollten Ausbeuten von 78 % für N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threoninpentafluorphenylester **8** ($\alpha:\beta = 14:1$) und 70 % für N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serinpentafluorphenylester **9** ($\alpha:\beta = 6:1$) erzielt werden.

Nach der Glycosidsynthese kann die Reduktion der Azidogruppe zur Aminogruppe an der Glycosylaminosäure durchgeführt werden. Alternativ kann man auch direkt nach der Festphasensynthese am Harz oder der Abspaltung folgend in Lösung ein Reduktionsschritt durchführen. Reagenzien wie Schwefelwasserstoff (Adachi 1977), und Nickelchlorid / Natriumborhydrid / Borsäure (Ferrari 1983) und Wasserstoff über Lindlar-Katalysator (Ijima 1989) erfordern eine *N*-Acetylierung nach dem Reduktionsschritt. Eine Einstufenreaktionen mit Thioessigsäure (Rosen 1988) oder Dimethylphenylphosphan (Coimier 1991) zeichnet sich hingegen durch eine elegantere Reaktionsführung aus. Erstere Methode erzielt mit bis zu 93 % im allgemeinen die höchsten Ausbeuten, es bilden sich jedoch stets Thioacetamidnebenprodukte. Die relativ langen Reaktionszeiten von bis zu fünf Tagen sind zwar von Nachteil, die Reduktion mit Thioessigsäure ist im Vergleich zu den alternativen Darstellungsformen jedoch vorzuziehen. Eine vielversprechende Methode ist vor kurzem an Kohlenhydraten erfolgreich studiert worden: Nach PEI (1993) führt die Reduktion mit threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol und *N,N*-Diisopropylethylamin innerhalb von Minuten zu quantitativem Umsatz. Bei der Synthese eines hochglycosylierten Glycopeptid aus dem humanen Glycophorin wurde mit dieser Methode jedoch ohne Erfolg getestet (Klich 1994).

Die Reaktionsverfolgung der Reduktion mit Thioessigsäure am Harz ist über IR-Spektroskopie möglich. Hierbei wird eine definierte Menge Harz abgenommen, gewaschen, getrocknet und mit Kaliumbromid zu einem Pressling verarbeitet. Die beobachtete Azidbande im Spektrum bei $\nu = 2110\text{--}2120\text{ cm}^{-1}$ läßt nach LAMBERT-BEER (Atkins 1988) über die Extinktion, das logarithmische Verhältnis der Transmission zur Absorption, quantitative Aussagen über den aktuellen Zustand der Reaktion zu (Paulsen 1994).

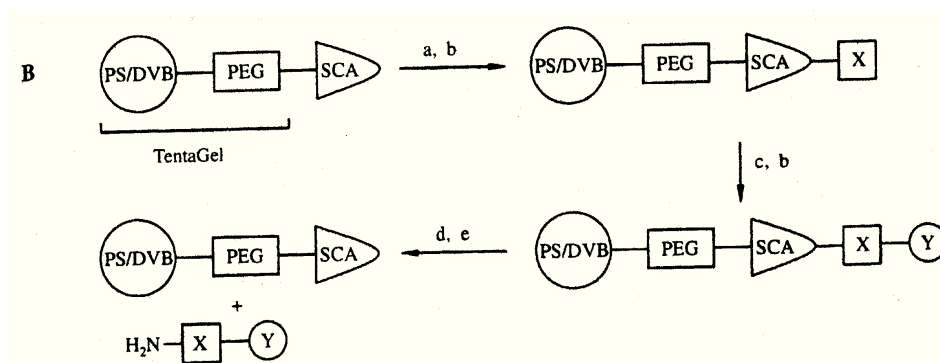


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung eines Beispiels der Festphasenpeptidsynthese. Es bedeuten: PS/DVB: Polystyrol-divinylbenzol-Copolymer, PEG: Polyethylenglycol als Spacer, SCA: Safety Catch Amid Linker, a) Kupplung des Aminosäurederivates X an der polymeren Träger, b) Waschen, c) Anknüpfung des Aminosäurederivates Y an X, d) Abspaltung des Peptides vom Träger (Früchtel 1996).

Die Technik der Festphasensynthese besitzt eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Synthese in Lösung (siehe Abbildung 1.11). Dies sind die leichte Handhabung, die einfache und zeitextensive Reinigung zwischen den Kupplungen durch Waschen des Trägers und nicht zuletzt die Automatisierbarkeit. Die Continuous Flow Technik zeichnet sich hier durch die erzielte ständige Durchmischung besonders aus. Der polymere Träger wird dabei in eine Säule gefüllt und mit den Reagenz- und Waschlösungen durchspült. Diese Vorgehensweise bedarf natürlich eines besonders druckstabilen Polymers. Nicht alle kommerziellen Harze eignen sich auch für diese Technik. Beispiele für druckstabile Polymere sind Pepsyn K[®] oder Macrosorb SPR[®], welche aus Polyamiden in porösen Kieselgurnatrices aufgebaut sind (Atherton 1981). Wird das Kieselgur durch Polystyroldivinylbenzol-Copolymer substituiert, gelangt man zum Polyhi-pe[™] (Small 1989). Dieses Polymer und das Polyethylenpolystyrol-Pfropfcopolymer Tentagel[®] (Bayer 1991) stellen die besten kommerziellen Harze dar. Das Polyethylenglycoldimethylacrylamid-Copolymer PEGA (Meldal 1995) besitzt allerdings eine höhere Belegungsdichte und ist deshalb vorzuziehen. Zudem lädt sich dieses Polymer nicht statisch auf, was die Handhabbarkeit des Harzes erleichtert. Die amidfreien vernetzten Copolymere Polyoxyethylen-polyoxypropylen POEPOP und Polyoxyethylen-polystyrol POEPS (Meldal 1996) sind hochspezifisch für Glycosylierungsreaktionen am Polymer optimiert. Für die Glycosyl-Building-Block Methode eignen sich diese neuen Polymere ebenso gut wie das PEGA-Harz. Für den Einsatz der Batch-Technik, der manuellen Festphasensynthese ohne Durchmischung, ist die Wahl des Harzes nicht eingeschränkt. Hier lassen sich sehr gute Ergebnisse mit dem preiswerten 4-Alkoxybenzylalcohol substituierten Polystyrolpolymeren erreichen (Wang 1973).

Die Verbindung zwischen Harz und Peptid, der Linker, sollte unter milden, aber definierten Bedingungen zu spalten sein. Die Natur des Linkers bestimmt das Vorliegen des C-terminalen Endes des Peptides als Säure, Amid oder Hydrazid. Die Wahl des Linkers wird meist von der Stabilität des gewünschten Peptides bestimmt. Die wichtigsten Vertreter der Linker verdeutlichen diese Auswahlkriterien (Bielfeldt 1993). So sei hier die 4-Alkoxybenzylalcohol-Gruppe (Wang 1973) genannt, die mit wässriger Trifluoressigsäure (TFA, 95 %) oder TFA in Dichlormethan (50 %) abgespalten wird und zur Säure führt. Ebenfalls zur Säure gelangt man mit der 4-Alkoxy-2-methoxybenzylalcohol-Gruppe (Mergler 1988), bei deren Abspaltung vom Harz mit 0.5 % TFA in Dichlormethan die Möglichkeit der Gewinnung geschützter Peptide besteht. Ein weiteres Beispiel zur Säure zu gelangen ist die 4-Bromcrotonsäure (Kunz 1988). Hier gelingt die Abspaltung unter neutralen Bedingungen über Pd(0)-Katalyse und ist für säurelabile Peptide geeignet. Basische Abspaltung ist bei der 4-Hydroxymethylbenzoesäure-Gruppe (Atherton 1989) durchzuführen. Bei Abspaltung mit Natronlauge erhält man die Säure, unter ammoniakalischen Bedingungen das Peptidamid. Eine interessante Variante der Abspaltung stellt die Photolyse dar: Der 4-Hydroxymethyl-2-nitrobenzoesäure-Linker führt nach UV-Bestrahlung (350 nm) zur Säure (Fields 1990). Ein säurelabiler Linker, dessen Abspaltung mit 95 % TFA in Wasser das Amid ergibt, liegt mit der Rink-Gruppe (Rink 1987) vor. Diese Verbindung wird oft verwendet und ist kommerziell erhältlich.

Die Durchführung einer Festphasensynthese läßt sich soweit automatisieren, daß nach einmaliger Einwaage der Aminosäurederivate in einen Autosampler und Befüllen von Vorratsbehältern mit Lösungsmittel (meist DMF) und Abspaltungsreagenz (zur Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppen) eine computergesteuerte Durchführung der Synthese möglich ist. Hierzu bedarf es eines Pumpenkreislaufes, der nach dem Continuous Flow Verfahren arbeitet und einer an einen Rechner angeschlossenen Überwachungseinheit. Als Indikator zur Überwachung der Kupplungsschritte eignet sich die Ionenpaarbildung von Dhbt-OH mit freien Aminogruppen (Peters 1992). Die sehr empfindliche Farbgebung läßt sich über UV-Absorption detektieren. Befindet sich das Harz in einer Glasküvette, welche von UV-Licht definierter Wellenlänge durchstrahlt wird, läßt sich anhand der mit einem Photodetektor bestimmten Transmission der Anteil freier Aminogruppen und somit der Fortgang der Reaktion bestimmen. Ein angeschlossener Rechner kann über die Veränderung der Daten den derzeitigen Zustand feststellen und entsprechend die Reaktion im richtigen Zeitpunkt beenden. Zur Kontrolle läßt sich ein Monitor dazuschalten, so daß der Vorgang auch visuell zugänglich ist.

1.9 Analytische Methoden zur Charakterisierung der synthetischen Glycopeptide

Zur Strukturbestimmung von Kohlenhydraten und Glycokonjugaten ist die Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spektroskopie eine sehr leistungsfähige Analysemethode (Hesse 1991). In der Proteinchemie gehört neben der NMR-Spektroskopie (Wüthrich 1989) die Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie zur Determinierung von Struktur und Gestalt zur Routineanalytik (Greenfield 1996). Mit der Einführung der Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Massenspektrometrie, insbesondere im Zusammenhang mit der Time Of Flight (TOF) Analysetechnik hat der Massenspektrometrie an Proteinderivaten an Bedeutung gewonnen. Neben der Bestätigung der Molekularmasse läßt sich aus dem Fragmentierungsverhalten von Glycopeptiden auf deren Primärstruktur schließen (Müller 1997).

Da mit einer hohen Anzahl von Atomen die Komplexität der eindimensionalen NMR-Spektren stark zunimmt, werden in hohem Maße zwei- und höherdimensionale Techniken verwendet (Fribolin 1994). So lassen sich die chemischen Verschiebungen der Protonen in Peptiden und Kohlenhydraten in $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren zuordnen (Braunschweiler 1983). Bei dieser Spektrenform finden während einer Mischzeit keine Wechselwirkungen der Protonen mit dem statischen Magnetfeld B_0 statt und die skalare Kopplung zwischen den Kernen führen zu einem Magnetisierungstransfer. Dieser Transfer setzt sich über die Nachbarkerne hinaus zu entfernteren Kernen fort. Das so erzielte Muster gekoppelter Protonen hilft insbesondere im direkten Vergleich mit dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Aue 1976), die Kopplungspartner zu identifizieren. Im $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrum lassen sich nur die direkten skalaren Kopplungen erkennen. Die Verknüpfungen der Spinsysteme, die unterbrochen sind von nichtprotonierten Atomen, wie sie beispielsweise die Carbonylgruppe in Peptiden darstellt, können durch $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC Experimente ermittelt werden (Summers 1986). Die so erhaltenen Kreuzkorrelationen (NH_{i+1} , C_i) und ($\text{H}\alpha_i$, C_i) ermöglichen eine sequentielle Zuordnung. Im Gegensatz zu

^1H -NOESY-Spektren, welche auf dipolaren Wechselwirkungen durch den Raum beruhen, werden in ^1H ^{13}C -HMBC-Spektren keine nichtsequentiellen Kopplungen beobachtet.

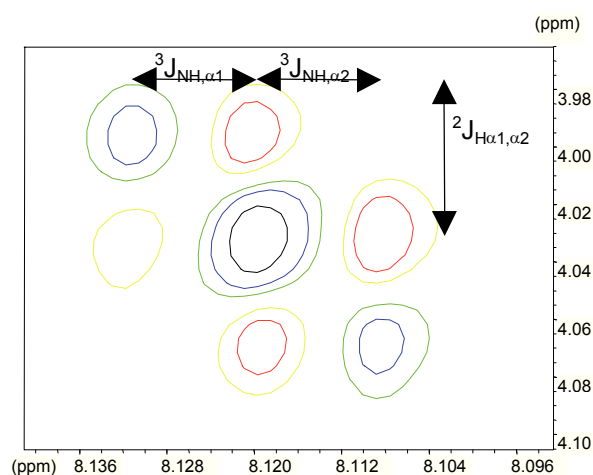


Abbildung 1.12: Bestimmung der Kopplungskonstanten aus dem ^1H ^1H -ECOSY. Abgebildet ist das Kreuzkorrelationssignal für Gly(NH, $\alpha_{1/2}$) des Glycopeptides **10** aus dem hCG β .

Da aus eindimensionalen ^1H -NMR Spektren bei Überlagerungen der Signale nicht alle Kopplungskonstanten ermittelt werden können, empfiehlt sich die Aufnahme eines phasensensitiven Spektrums ^1H ^1H -COSYDQFTPI (Wüthrich 1986). Durch die Phasenzunahme als Funktion der Zeit erscheinen die reinen Absorptionskreuzsignale als gut aufgelöste Multipllett-Strukturen in beiden Frequenzdomänen. An diesen Signalen lassen sich bei genügender digitaler Auflösung die Kopplungen separiert ausmessen. Eine übersichtliche Variante der phasensensitiven ^1H ^1H -COSY Spektren stellt das Differenzspektrum der Tripelquantenfilter- und

Doppelquantenfiltertechnik, das ^1H ^1H -ECOSY dar (Griesinger 1987). Dieser Spektrentyp ist durch die mathematische Subtraktionsroutine von redundanten Informationen befreit und daher sehr übersichtlich (siehe Abbildung 1.12).

Die aus den Heterokernexperimenten ermittelte Art der Verknüpfung der einzelnen Spinsysteme untereinander, die Konnektivität, wird mittels ^1H ^1H -NOESY-Spektroskopie überprüft. Der zugrundeliegende Kern-Overhauser-Effekt ist ein reines Relaxationsphänomen und ist somit nur an den effektiven räumlichen Abstand der Kopplungspartner und nicht an die skalare Kopplung zwischen den Kernen gebunden (Günther 1992). Aus der Integration der einzelnen NOE-Korrelationssignale in den Zeilen der ^1H ^1H -NOESY-Spektren lassen sich relative Abstände der einzelnen Protonen ermitteln, wenn sichergestellt ist, daß die untersuchten Protonen ein vergleichbares Relaxationsverhalten zeigen. Die Untersuchung des Relaxationsverhaltens der Protonen in Glycoproteinen wurde über NOE-Aufbaumessungen (Pieper 1996, Schuster 1998) durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß bei hochglycosylierten Glycopeptiden eine qualitative Aussage über die NOE-Signaturen bei NOE-Messungen mit einer Mischzeit in der NOESY-Pulssequenz von etwa 300 ms getroffen werden kann. Die so erhaltenen Daten repräsentieren die zeitlich gemittelte Gestalt des Moleküls und lassen ausschließlich qualitative Aussagen über das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen zu. Eine gute Verifizierung der erhaltenen zeitlich gemittelten NOE-Signaturen ist durch den Vergleich mit aufgenommenen CD-Spektren möglich (Greenspan 1996).

2. Ergebnisse und Diskussion

Inhalt	Seite
2. Ergebnisse und Diskussion	22
2.1 Darstellung der Aminosäurederivate für die Glycopeptidsynthesen	22
2.1.1 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester über Glycosylhalogenide	22
2.1.2 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester über das Glycosylimidat	23
2.1.3 Vergleich der Synthesewege zur Glycosylierung der Serin- und Threonin- verbindungen	24
2.1.4 Reduktion der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester	24
2.1.5 Andere Aminosäurederivate	24
2.2 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Glycophorin A ^N	26
2.2.1 Festphasenglycopeptidsynthese der Glycopeptide aus dem humanen Glycophorin A ^N	26
2.2.2 Reduktion der Azidgruppen am polymeren Träger mit Thioessigsäure	28
2.2.3 O-Deacetylierung der GalNAc-Reste am polymeren Träger mit Hydrazin	31
2.2.4 NMR-Charakterisierung der Glycopeptide 15 , 16 und 26	33
2.2.5 ORD der Glycopeptide 15 , 16 und 26	39
2.2.6 Untersuchungen zur Konformation der Glycopeptide 15 und 16	41
2.3 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC1	44
2.3.1 Synthese der diglycosylierten Repeating Unit 17 aus der MUC1-Sequenz	46
2.3.1.1 Darstellung und Reinigung der Verbindung 17	47
2.3.1.2 Circular Dichroismus des diglycosylierten Glycopeptides 17	49
2.3.1.3 NMR-Charakterisierung der diglycosylierten Repeating Unit 17	50
2.3.1.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit 17	53
2.3.2 Synthese der monoglycosylierten Repeating Unit 18 aus der MUC1-Sequenz	53
2.3.2.1 Massenspektrometrie an der MUC1-Repeating Unit 18	55
2.3.2.2 Circular Dichroismus des monoglycosylierten Glycopeptides 18	56
2.3.2.3 NMR-Charakterisierung der monoglycosylierten Repeating Unit 18	57
2.3.2.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit 18	61
2.3.3 Synthese der pentaglycosylierten Repeating Unit 19 aus der MUC1-Sequenz	62
2.3.3.1 Darstellung, Reinigung und Identifizierung der Verbindung 19	63
2.3.3.2 Circular Dichroismus des pentaglycosylierten Glycopeptides 19	64
2.3.3.3 NMR-Charakterisierung der pentaglycosylierten Repeating Unit 19	65
2.3.3.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit 19	68

2.3.3.5 Konformationsanalyse einer pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit	69
2.3.4 Synthese der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit 20	70
2.3.4.1 Darstellung, Reinigung und Identifizierung der Verbindung 20	71
2.3.4.2 Circular Dichroismus des decaglycosylierten dimeren Glycopeptides 20	73
2.3.4.3 NMR-Charakterisierung der pentaglycosylierten Repeating Unit 20	74
2.3.4.4 Diskussion der Charakterisierung der dimeren MUC1-Repeating Unit 20	76
2.3.5 Bemerkungen zur Konformation der unterschiedlich glycosylierten MUC1 Repeating Units im antigenen APDTR-Motiv	77
2.3.6 Ergebnisse aus den Antikörper-Bindungsstudien der MUC1-Repeating Units	79
2.3.7 Synthese des monoglycosylierten Tridecapeptides 21 für die Kristallisation als Komplex mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 zur Röntgenstrukturanalyse	81
2.3.7.1 Synthese und Charakterisierung des monoglycosylierten Tridecapeptides 21	82
2.4 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC2	87
2.4.1 Synthese und Charakterisierung der MUC2 Repeating Unit 27	88
2.4.2 Untersuchungen zur Synthese der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit 22	89
2.5 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Immunodeficiency Virus (HIV)	95
2.5.1 Synthese und Charakterisierung des HIV-1 V3-Loop Glucitylpeptides 24	96
2.6 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Choriogonadotropin β	99

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Darstellung der Aminosäurederivate für die Glycopeptidsynthesen

Zur Synthese der Glycopeptide wird in dieser Arbeit die Methode der Glycosyl-Building-Blocks in Verbindung mit der Fmoc-Pfp-Ester-Technik angewandt (siehe Einleitung). Hierfür werden die mit 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranose und 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranose an Serin oder Threonin glycosylierten Bausteine **8**, **9**, **11** und **12** verwendet, die in Abbildung 2.1.1. dargestellt sind. Die Abbildung zeigt die in dieser Arbeit verwandten Synthesewege zur Darstellung der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester in graphischer Form. Bei den Synthesen ist der Schritt der Glycosidsynthese **5** + **6/7** $\rightarrow$ **8/9** bzw. **13** + **6/7** $\rightarrow$ **8/9** der entscheidende Schritt.

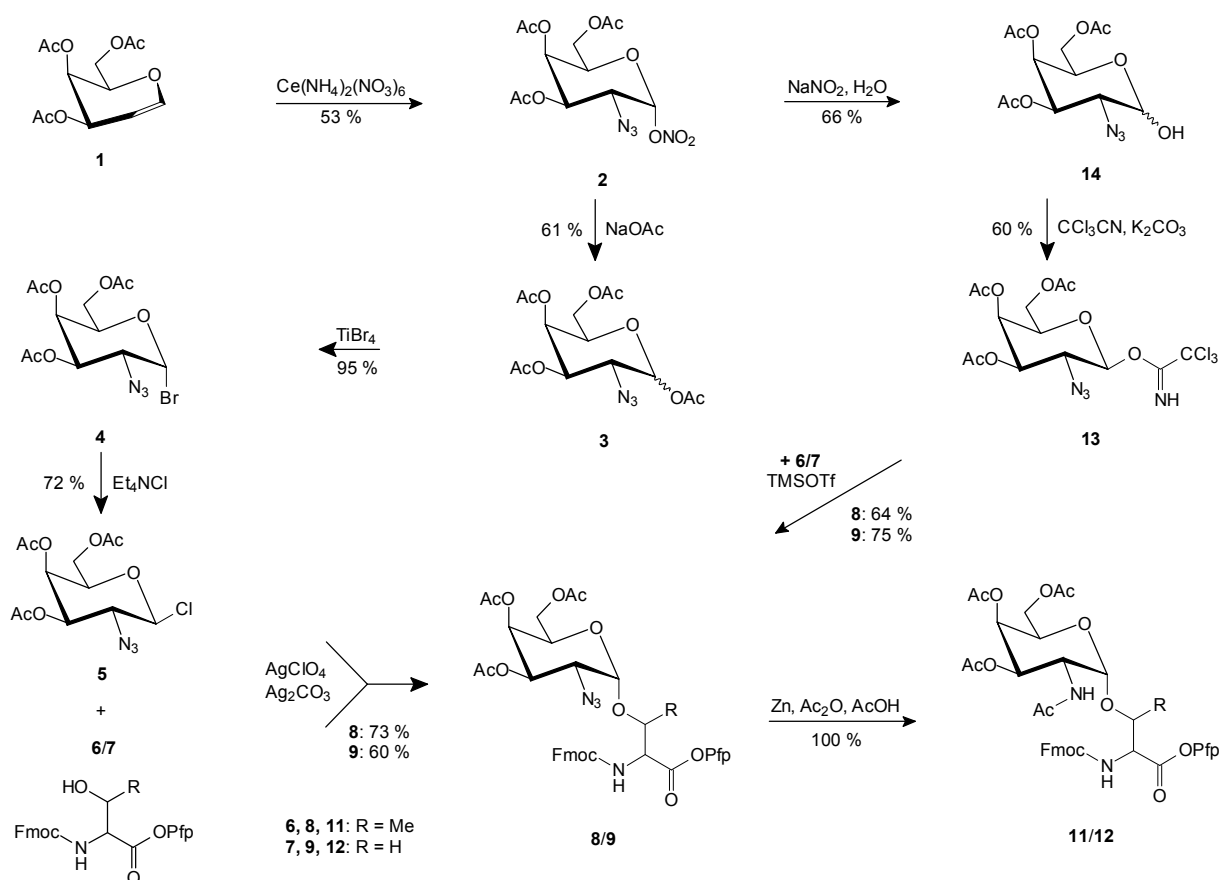


Abbildung 2.1.1: Eingeschlagene Routen zur Synthese der glycosylierten Aminosäuren **8**, **9**, **11** und **12** mit den erzielten Einzelausbeuten.

2.1.1 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester über Glycosylhalogenide

Die Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem Glycophorin A **15**, **16** und der Glycopeptidsequenz **17** aus dem MUC1 erfolgt mit den Azido-Bausteinen **8** und **9** (Bielfeldt 1992). Bei der Darstellung der hierfür verwendeten glycosylierten Fmoc-Aminosäurederivate **8** und **9**, die im Experimentellen Teil beschrieben werden, wurden die folgenden Beobachtungen gemacht.

Die hier erzielten Gesamtausbeuten der im Grammaßstab durchgeführten Synthesen liegen bei 16 % für das Threoninderivat **8** und bei 14 % für die Serinverbindung **9** bezogen auf 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal **1**. Die Literaturwerte von 19 % (Ser) und 21 % (Thr) sind also in diesen Maßstab zu etwa 75 % erreichbar. Dieses gute Ergebnis ist im wesentlichen auf die leichte Handhabbarkeit der Verbindungen zurückzuführen. Entgegen der bisherigen Meinungen sind die reaktiven Zwischenverbindungen ohne besondere Maßnahmen einzusetzen. So ist die Kristallisation des Glycosylbromides **4** erfolgreich und die aus Diethylether kristallisierten farblosen Rhomben (Schmelzpunkt 101.3 °C) sind nur mäßig hydrolyseempfindlich. Die Kristalle können in normaler Atmosphäre bei 250 K über sechs Monate gelagert werden und weisen weder analytisch (Schmelzpunkt, ¹H-NMR) noch im Einsatz bei der Synthese Veränderungen auf. Für das Chlorid **5** wird nach Kristallisation aus Diethylether ein Schmelzpunkt von 133.5 °C gefunden. Die berichteten 81 % Ausbeute werden mit 72 % nicht erreicht, die Reinheit der erhaltenen farblosen Rhomben ist jedoch wahrscheinlich höher, da ein Schmelzpunkt von 102 °C berichtet wird. Die chromatographische Reinigung der Glycosylaminosäuren **8** und **9** wird über MPLC mit ungetrocknetem Kieselgel durchgeführt. Hierbei wird isokratisch mit einfach destillierten Lösungsmitteln chromatographiert. Die erzielten Ausbeuten in diesem Teil der Synthese sind mit 73 % (**8**) und 60 % (**9**) identisch mit den berichteten Werten (Bielfeldt 1992). Die MPLC-Reinigung ist insbesondere in größeren Maßstäben wesentlich effizienter als die beschriebenen HPLC-Trennungen.

2.1.2 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester über das Glycosylimidat

Bei den Synthesen der Glycopeptidsequenzen aus dem MUC1 **18**, **19**, **20**, **21** und der Glycopeptidsequenz **22** aus dem MUC2 wird die Glycosidsynthese zu den Glycosylaminosäuren **8** und **9** über das Glycosylimidat als Glycosyldonor durchgeführt (Frische 1996). Die Ergebnisse sind ebenfalls im Experimentellen Teil beschrieben.

Die in dieser Arbeit erzielten Gesamtausbeuten der im Grammaßstab durchgeführten Synthesen liegen bei 14 % für die Threoninverbindung **8** und bei 16 % für das Serinderivat **9** bezogen auf 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal **1**. Die Literaturwerte von 17 % (Ser) und 14 % (Thr) sind also in diesen Maßstab zu 100 % für den Building Block **8** und zu etwa 94 % für Verbindung **9** erreichbar. Bei der Darstellung des Glycosyldonors **13** werden die Ergebnisse von FRISCHE (1996) mit einer Ausbeute von 40 % (bezogen auf das Galactal **1**) exakt reproduziert. Im Falle des Building-Blocks **9** wird bei MPLC-Reinigung auch bei Einsatz ungetrockneten Kieselgels eine Ausbeute von 75 % erzielt (80 % berichtet mit einem Anomerenverhältnis $\alpha/\beta = 6:1$). Verbindung **8** wird ebenso über MPLC chromatographiert und mit 64 % Ausbeute erhalten (82 % berichtet). Da diese Reinigung des Glycosyl-Building-Blocks **8** über MPLC bei der Halogenid-Methode gleiche Ausbeuten liefert, sollte die geschilderte Ausbeute von FRISCHE (1996) überprüft werden.

2.1.3 Vergleich der Synthesewege zur Glycosylierung der Serin- und Threoninverbindungen

Die in dieser Arbeit erzielten und in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschriebenen Ausbeuten weisen auf eine differenziert durchzuführende Betrachtung der Synthesen hin. Der N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serinpentafluorphenylester **9** wird in der Synthese über die Glycosylhalogenide in 16 % Ausbeute (gegenüber 14 % über das Glycosylimidat) erfolgreicher synthetisiert. Das analoge Threoninderivat **8** wird hingegen über das Glycosylimidat in 16 % Ausbeute (gegenüber 14 % über die Glycosylhalogenide) mit größerem Erfolg erhalten. Wird jedoch die Wirtschaftlichkeit der Synthesen betrachtet, so ist in jedem Fall der Weg über die Glycosylhalogenide sowohl zeitlich als auch finanziell aufwendiger. Besonders hohe Kosten fallen hier für die in der Glycosidsynthese verwendeten Silberverbindungen an. Ein Vorteil der Synthese über das Glycosylimidat ist der kürzere Syntheseweg, der eine Reaktionsstufe weniger aufweist. Dieser Syntheseweg ist also auch für den Fall der Verbindung **9** in Betracht zu ziehen, trotz einer um 12 % niedrigeren Ausbeute in Relation zur Halogenid-Methode.

2.1.4 Reduktion der Azidgruppen in den glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern

Wie bei der Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Glycophorin A^N gezeigt wird (siehe Kapitel 2.2.2), ist der Verwendbarkeit der glycosylierten Fmoc-Aminosäurederivate **8** und **9** in der Synthese hochglycosylierter Glycopeptide Grenzen gesetzt. Der direkte Einsatz dieser azidischen Verbindungen in der Festphasensynthese bedarf eines Reduktionsschrittes am Glycopeptid. Da dieser sich als sehr komplex herausstellt, wird bei späteren Synthesen der Glycopeptidsequenzen aus dem MUC1 **18**, **19**, **20**, **21** und der Glycopeptidsequenz **22** aus dem MUC2 die Reduktion der Azidgruppen bereits vor der Festphasensynthese an den Bausteinen **8** und **9** durchgeführt (siehe Abbildung 2.1.1) (Frische 1996). Die Reduktionsreaktionen bei den Glycopeptidsequenzen aus dem Glycophorin A **15**, **16** und der Glycopeptidsequenz **17** aus dem MUC1 erfolgen an der Festphase und sind bei den einzelnen Verbindungen beschrieben.

Die Reduktion der Azidgruppen direkt an den Glycosylbausteinen **8** und **9** erfolgt mit Zink in Acetanhydrid (Frische 1996). Die Reaktion verläuft quantitativ und die Produkte **11** und **12** können ohne Chromatographie zur Peptidsynthese verwendet werden. Die Glycosyl-Building-Blocks **11** und **12** sind als aufgeschäumter Sirup in normaler Atmosphäre bei 250 K über sechs Monate lagerfähig. Sie weisen dann weder analytisch (HPLC, ¹H-NMR), noch im Einsatz bei der Festphasenglycopeptidsynthese Veränderungen auf. Dies ist ein wichtiges Ergebnis für die Handhabbarkeit und Flexibilität der Festphasensynthese.

2.1.5 Andere Aminosäurederivate

Für die Synthese der Glycopeptidanaloga **23** und **24** wird der Baustein **25** verwendet, der von A. Schäfer (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde. Die für die manuelle Festphasensynthese verwendete unglycosylierte Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester wurden im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums hergestellt (Kisfaludi 1983). Die Synthesen sind im Experimentellen Teil beschrieben (siehe auch Tabelle **3.1**).

Die Glycopeptide **15**, **16** und **26** werden mittels einer automatischen Festphasensynthese mit photometrischer Überwachung synthetisiert (Dryland 1986). Hierbei wird zuerst an das PEGA-Harz der Rink-Linker angeknüpft. Dieser Linker erzeugt bei der Abspaltung des synthetisierten Glycopeptids eine C-terminale Amidgruppe (siehe Abbildung 2.2.2). Das

derivatisierte Harz wird direkt in die Syntheseapparatur gegeben. Zur Peptidkupplung wird den verwendeten Fmoc-Pfp-Estern als Indikator der Peptidkupplungsreaktion Dhbt-OH zugegeben. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen nach den einzelnen Peptidkupplungsreaktionen erfolgt mit Piperidin (20 % in DMF). Der Syntheseverlauf ist in Abbildung 2.2.2 schematisch dargestellt.

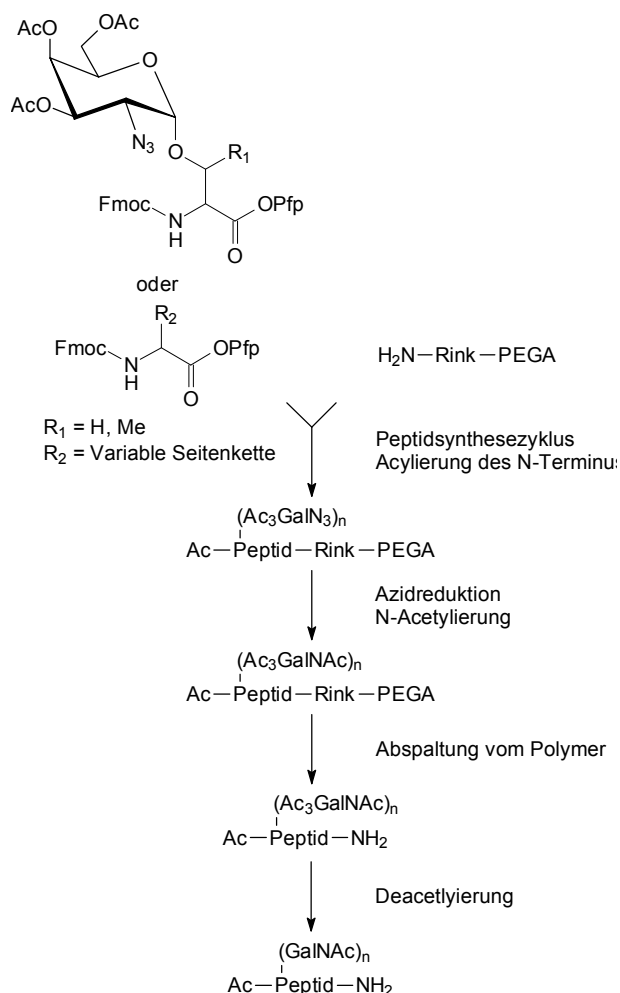


Abbildung 2.2.2: Schema der Festphasenglycopeptidsynthese mit Glycosylazidbausteinen. Als polymerer Träger wird PEGA verwendet, welches mit dem Rink-Linker substituiert ist und direkt den Peptidkupplungsreaktionen unterworfen wird. Am Ende der Peptidsynthese werden die Azidgruppen in den Kohlenhydratresten des Glycopeptides reduziert. Das Ac_3GalNAc tragende Glycopeptid wird vom Polymer abgespalten und die GalNAc-Reste werden in Lösung deacetyliert.

Die Wahl des PEGA-Harzes für diese Synthese mit Dhbt-OH als Indikator der Kupplungsreaktionen hat sich hierbei als nicht empfehlenswert erwiesen. Die Ionenpaarbildung des Dhbt-OH unter Gelbfärbung mit freien Aminogruppen darf nicht durch UV-Absorption des Harzes gestört werden. Bei dem verwendeten PEGA-Harz ist aber im Verlauf der Synthese eine starke UV-Absorption zu beobachten. Diese führt dazu, daß bei langsamen Peptidkupplungsschritten die anfängliche starke Absorption am Detektor eine Nulllinie erzeugt. Diese Nulllinie wird vom angeschlossenen Computerprogramm als konstante Absorption registriert und das Programm veranlaßt den Peptidsynthesizer, die Reaktion

vorzeitig abubrechen. Daher muß bei der Synthese der Glycopeptide **15**, **16** und **26** auf eine vollautomatische Synthese verzichtet werden. Statt dessen werden die Syntheseschritte visuell an einem angeschlossenen Monitor überwacht und die Vollständigkeit der Kupplungen anhand der Graphen abgeschätzt. Beispielgraphen für verschiedene Reaktionen des hexaglycosylierten Decapeptides **15** sind in KLICH (1994) zu finden.

Deutlich ist bei allen beobachteten Kupplungsreaktionen zu erkennen, daß die Glycosyl-Building-Blocks **8** und **9** mit ein bis zwei Stunden Reaktionszeit schneller reagieren als die unglycosylierten Aminosäurederivate, die in drei bis sechs Stunden abreagieren (Daten im Experimentellen Teil). Aufgrund der zu erwartenden zunehmenden sterischen Behinderung der Reaktion durch die Vergrößerung der Aminosäureseitenkette bei den glycosylierten Verbindungen ist dies ein überraschendes Resultat. Bei der Synthese des Peptides **26** wird eine langsamere Reaktion beobachtet, da wie zu erwarten die wachsende Peptidkette am Harz eine Präsentation der Funktionellen Aminogruppe bei der Kupplungsreaktion behindert. Bei der am Harz wachsende Glycopeptidkette (**15** und **16**) ist die jeweils analoge Aminogruppe offenbar besser verfügbar. Möglicherweise formen sich Sekundärstrukturelemente während der Festphasensynthese, die im Falle der Glycopeptidsynthesen induziert durch die voluminösen Kohlenhydratreste eine starre, gestreckte Peptidkonformation hervorrufen. Eine derartige Struktur würde die freien Aminogruppen in eine günstige Position für die Kupplungsreaktion dirigieren.

2.2.2 Reduktion der Azidgruppen am polymeren Träger mit Thioessigsäure

Die Reduktion der Azidgruppen in 2-Position der Galactosereste mit Thioessigsäure an der Festphase ist eine elegante Reaktion, die mit einer in situ Acylierung der gebildeten Aminogruppe erfolgt (Bielfeldt 1992). Es wird in einem Schritt aus der Azidgruppe die erwünschte Acetamidgruppe erhalten (siehe Abbildung 2.2.3). Der Einsatz labiler Schwefelverbindungen wie der Thioessigsäure ist jedoch nicht unproblematisch. Es zeigte sich, daß die stets als Nebenprodukt gebildeten Thioacetamidderivate nicht nur die Ausbeute beeinträchtigen, sondern teilweise nicht lösbare Trennprobleme darstellen (Klich 1997). Untersuchungen zur Reinigung der Thioessigsäure wurden daher bei der Synthese der Verbindung **15** durchgeführt (Klich 1994).

Zur Reduktion der Azidgruppen an den Kohlenhydratresten des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** werden die bei der Synthese des hexaglycosylierten Decapeptides **15** gewonnenen Erkenntnisse genutzt. Dort wurde das reduzierte Glycopeptid in hoher Reinheit und vertretbarer Ausbeute erhalten. Zur Frage des Auftretens schwefeliger Nebenprodukte in der Thioessigsäure wurden ausgiebige Untersuchungen aufgeführt. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß Sauerstoff und insbesondere Temperatureffekte die Zersetzung der Thioessigsäure in zum Teil hochpolymere Schwefelverbindungen stark beschleunigen. Konsequentes Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre sowie Reinigung und Lagerung des gereinigten Reagenzes bei 250 K sind also Voraussetzung für eine geringe Menge an Nebenprodukten. Es zeigten sich bei der Darstellung des Glycopeptides **15** jedoch auch nach

Reduktion mit frisch kondensierter Thioessigsäure (Reinheit 99.98 %) Schwierigkeiten bei der Abtrennung von Thioacetamidderivaten. Wegen der höheren Komplexität der Verbindung **16** gegenüber dem Glycopeptid **15** sind hier also noch größere Trennprobleme zu erwarten. Die Anzahl der zu erwartenden Nebenverbindungen steigt mit der Anzahl der möglichen Thioacetamidierungen und somit mit der Anzahl der im Molekül enthaltenen GalNAc-Reste. So sind hier allein neun verschiedene mögliche Verbindungen denkbar, wenn nur einer der GalNAc-Reste durch ein schwefelhaltiges GalN(S)Ac ausgetauscht wird. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung der Thioacetamidderivate besteht in der nachträglichen Schwefelung der Acetate durch die in der Azidreduktion entstehenden aktiven Schwefel(0)-Verbindungen. Um dies auszuschließen, muß in den Reaktionen die Thioessigsäure möglichst häufig erneuert werden.

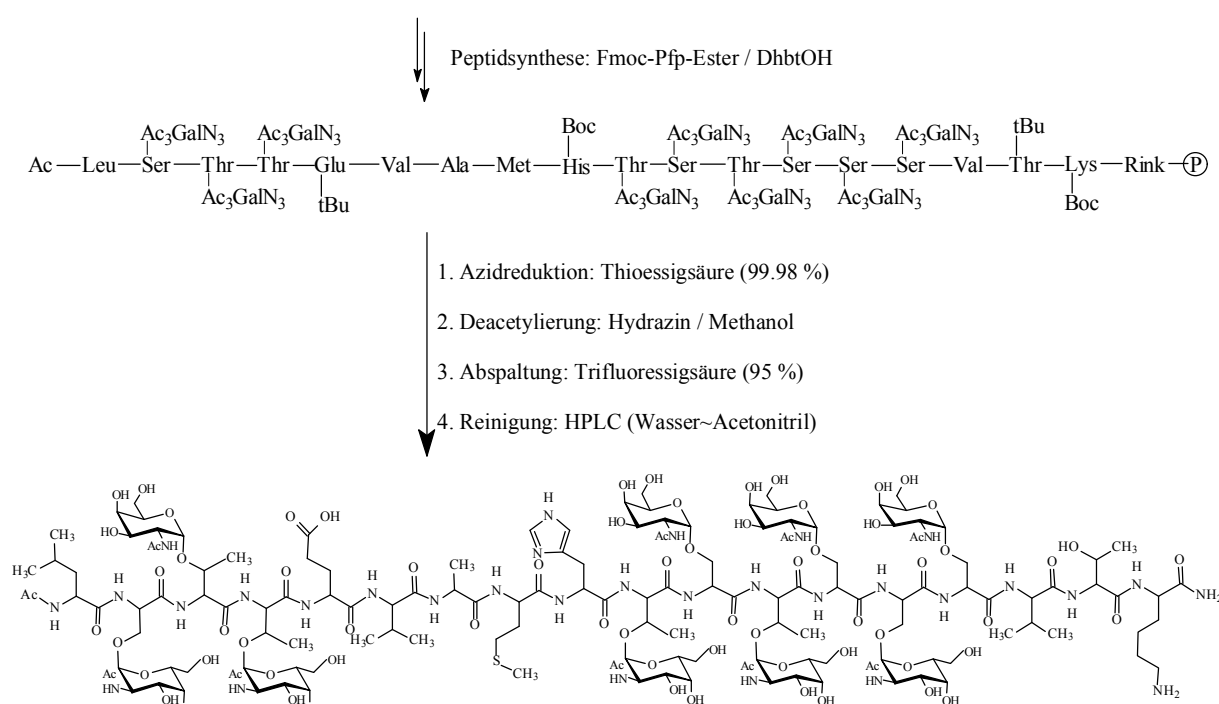


Abbildung 2.2.3: Übersicht der nach der Festphasenpeptidsynthese durchgeführten Reaktionen zum nonglycosylierten Octadecapeptid **16**.

Es wird somit bei der Reduktionsreaktion zum neun GalNAc-Reste tragenden Glycopeptid **16** mit höchster Sorgfalt gearbeitet. Das Harz wird in einer Schlenkfritte im Stickstoffgegenstrom bei RT mit frisch kondensierter Thioessigsäure (250 K, Reinheit 99.98 %) versetzt. Nach einer Stunde wird die Thioessigsäure abfiltriert und durch frisches Reagenz ersetzt. Weitere Erneuerungen geschehen nach drei Stunden, nach sieben Stunden und des weiteren alle sieben Stunden. Die Reduktion wird IR-spektroskopisch anhand der Intensitätsabnahme der Azidbande bei $\nu = 2114 \text{ cm}^{-1}$ verfolgt (Abbildung 2.2.4). Die gezeigten IR-Spektren zeigen den Ausgangszustand mit einer starken azidischen Absorption und den Endzustand ohne die Absorptionsbande in einer Graphik.

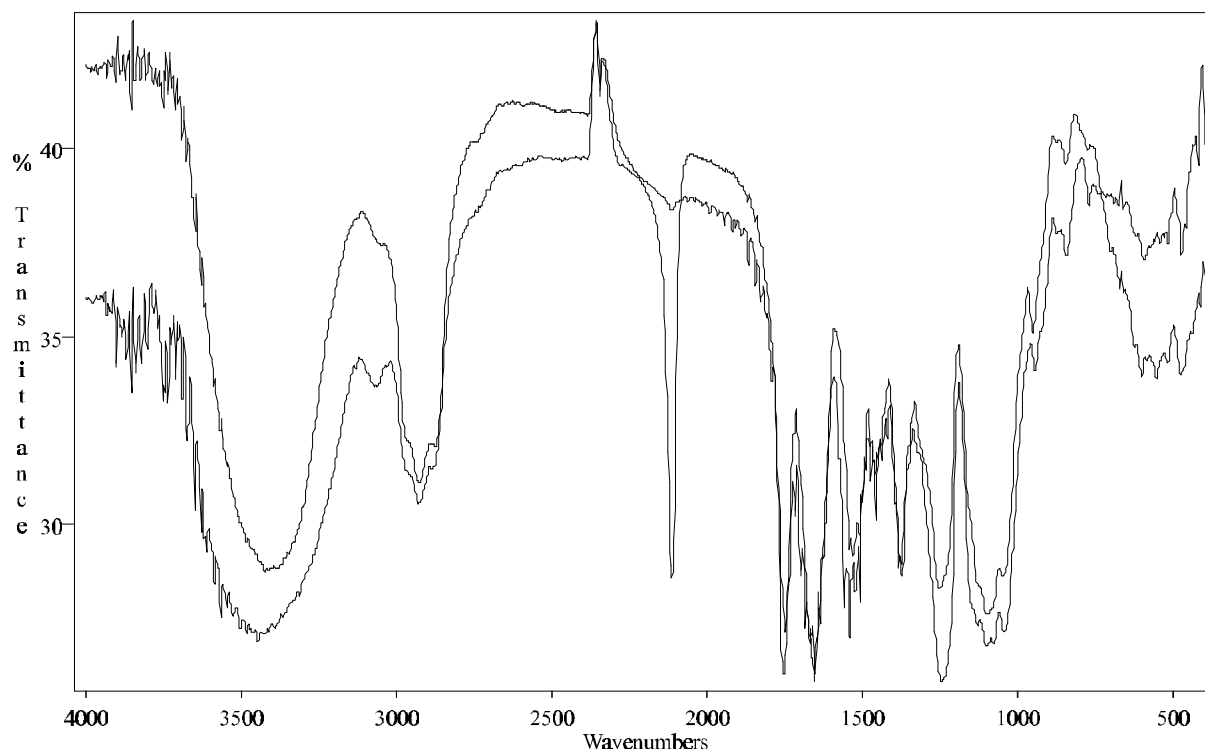


Abbildung 2.2.4: IR-Reaktionsverfolgung der Azidreduktion in den Kohlenhydratresten des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16**. Die IR-Spektren des Ausgangs- und Endzustandes sind in einer Graphik übereinandergelegt. Deutlich erkennbar ist das Fehlen der Azidbande bei $\nu = 2114 \text{ cm}^{-1}$ in dem finalen Spektrum.

Eine lineare Regression der Meßwerte ergibt den theoretischen Endpunkt der Reaktion (Abbildung 2.2.4). Die Reduktion wird binnen 47 Stunden erfolgreich durchgeführt. Ein Vergleich mit der Reduktion der Azidgruppen in der Verbindung **15** zeigt exakt die gleichen Reaktionsbedingungen. Auch dort wurde die Reaktion in 47 Stunden beendet. Dies bestätigt erneut die Beobachtung, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Azidreduktion mit Thioessigsäure von der Anzahl der Azidgruppen im Molekül unabhängig ist (Klich 1994).

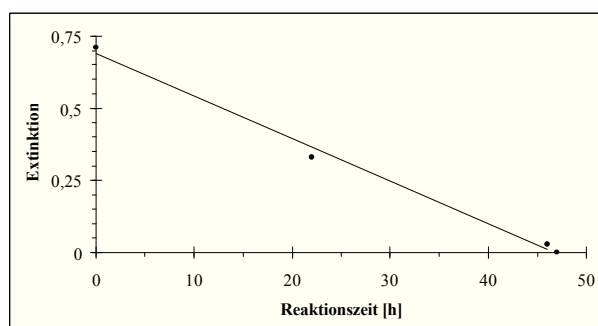


Abbildung 2.2.5: Graphisches Ergebnis der Linearen Regression zur IR-Reaktionsverfolgung der Azidreduktion in den Kohlenhydratresten des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16**. Gezeigt ist die Ausgleichsgerade (-) zu den Meßwerten (.) der Abnahme der Azidbande während der Reduktion.

Zur Kontrolle der Synthese wird ein Teil des Glycopeptides vom Harz abgespalten, der HPLC unterworfen und von dem Hauptprodukt ein ES-Massenspektrum angefertigt (Daten im Experimentellen Teil). Das HPLC-Chromatogramm zeigt neben der Hauptsubstanz eine Anzahl an Nebenprodukten. Ein ES-Massenspektrum der isolierten Fraktion stimmt mit der erwarteten Struktur überein, zeigt jedoch höhermolekulare, schwefelhaltige Verunreinigungen auf. Das 1D $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt alle erwarteten Signale in

entsprechender Intensität. Signale bei $\delta = 2.7 \text{ ppm}$ weisen auf Thioacetamiderivate als Nebenprodukte in noch nachweisbarer Menge hin. Demnach ist die Reduktion der

Azidgruppen in den Kohlenhydratresten des nonaglycosylierten Octadecapeptides wie erwartet erfolgreich verlaufen, die Abtrennung der Nebenprodukte durch HPLC-Chromatographie erfordert jedoch eine eingehende Optimierung.

2.2.3. *O*-Deacetylierung der GalNAc-Reste am polymeren Träger mit Hydrazin

Nach den bei der Synthese des hexaglycosylierten Decapeptides **15** gewonnenen Erkenntnissen ist die *O*-Deacetylierung acetatgeschützter hochglycosylierter Glycopeptide nach ZEMPLÉN (1929) mit Löslichkeitsproblemen verbunden (Klich 1994). Bei Durchführung der katalytischen Verseifung mit Natriummethanolat in Methanol fällt das teilweise deacetylierte Glycopeptid aus der Lösung aus. Werden wässrige Systeme verwendet, tritt durch partielle β -Eliminierung bei einem Teil der Substanz eine Abspaltung von Glycosidresten auf. Für das nonaglycosylierte Octadecapeptid **16** wird deswegen auf die Methode zur Deacetylierung am polymeren Träger zurückgegriffen (Bielfeldt 1993). Hierbei wird Hydrazinhydrat in methanolischer Lösung auf das Harz gegeben und nach Reaktionsende mit Methanol ausgewaschen (siehe Abbildung 2.2.3). Diese leicht durchzuführende Reaktion ist analytisch jedoch schwer zu verfolgen. Zur Überprüfung der Reaktion muß erst eine Probe des Glycopeptides vom Harz abgespalten und aufgearbeitet werden. Eine HPLC-Verfolgung dieser Reaktion erweist sich dadurch als ebenso unpraktikabel wie eine Verfolgung der Deacetylierung über NMR-Spektroskopie wie es bei der Verbindung **15** durchgeführt wurde. Die Massenspektrometrie ist eine sehr geeignete Methode zur Detektion geringer Mengen Substanz in Gemischen. Ein MALDI-TOF Massenspektrometer, welches bei den im Folgenden beschriebenen Synthesen eingesetzt wird, stand während der Zeit dieser Synthese noch nicht zur Verfügung.

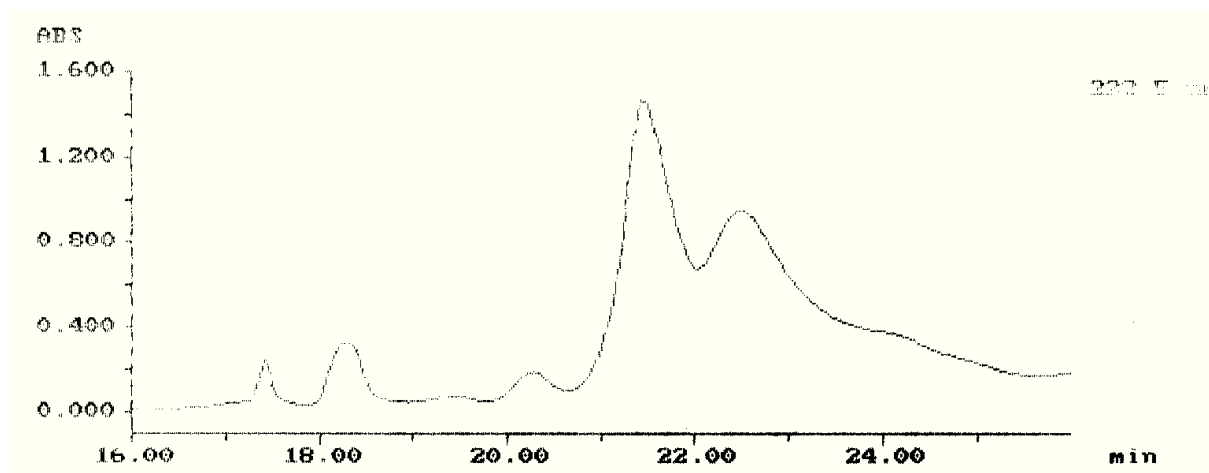


Abbildung 2.2.6: Ausschnitt aus dem präparativen HPLC-Chromatogramm der filtrierten Rohsubstanz **16** nach der Abspaltung vom polymeren Träger. Die Fraktion des Hauptsignals bei 21.5 min beinhaltet neben dem Glycopeptid **16** noch Thioacetamiderivate.

Die *O*-Deacetylierung der GalNAc-Reste im nonaglycosylierten Octadecapeptid **16** mit methanolischem Hydrazinhydrat am polymeren Träger läßt sich binnen sechs Stunden erfolgreich durchführen. Nach der Abspaltung vom Harz sind im 1D ^1H -NMR Spektrum der ungereinigten, filtrierten Rohsubstanz keine *O*-Acetate zu beobachten. Die anschließende

HPLC-Reinigung zeigt wie erwartet neben der Hauptschubstanz eine Anzahl an Nebenprodukten (siehe Abbildung 2.2.6).

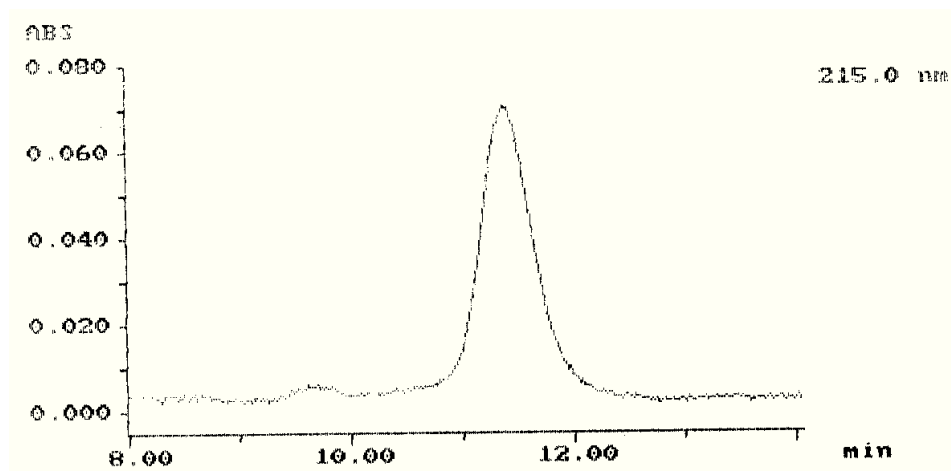


Abbildung 2.2.7: Ausschnitt aus dem analytischen HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten nonaglycosylierten Octadeca-peptides 16.

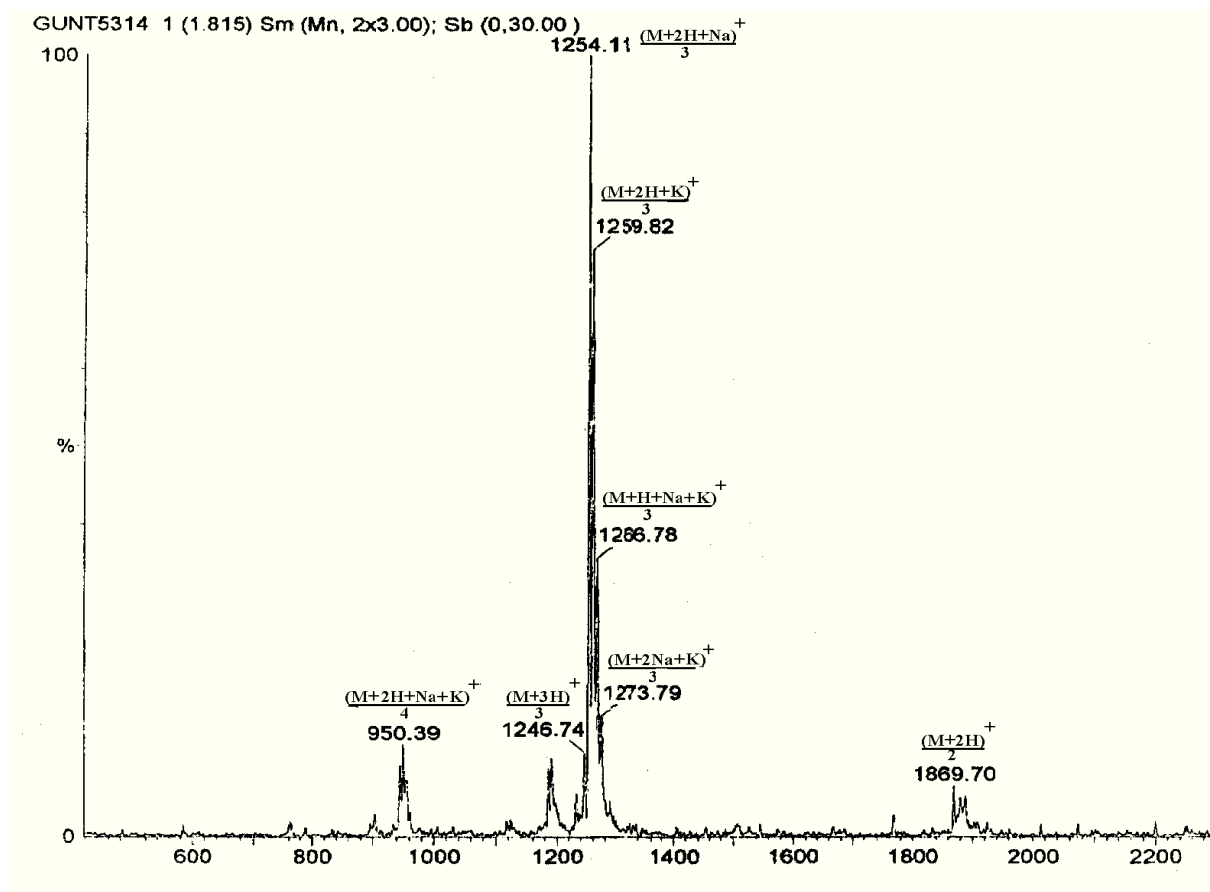


Abbildung 2.2.8: Ausschnitt aus dem ES-Massenspektrum des nonaglycosylierten Octadeca-peptides 16. Die strukturell relevanten Signale sind in der Abbildung gekennzeichnet.

Ein ES-Massenspektrum der isolierten Hauptfraktion zeigt die Hauptkomponente neben höhermolekularen, schwefelhaltige Verunreinigungen an. Das 1D ^1H -NMR Spektrum zeigt alle erwarteten Signale in entsprechender Intensität. Signale bei $\delta = 2.7$ ppm weisen auf Thioacetamidderivate hin. Dieses erwartete Resultat erfordert eine sorgfältige Optimierung

der HPLC-Reinigung. Nach wiederholter Reinigung mit verschiedenen Lösungsmittelgradienten (Daten im Experimentellen Teil) ist die Abtrennung der Thioacetamidderivate erfolgreich. Die analytische Überprüfung mittels HPLC zeigt, daß Verbindung **16** dann rein ist (siehe Abbildung 2.2.7). Auch das ES-Massenspektrum des Glycopeptides **16** zeigt keine Verunreinigungen mehr an (siehe Abbildung 2.2.8).

Die Gesamtausbeute der Synthese des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** beträgt 41 % (bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes). Gegenüber der Synthese des hexaglycosylierten Decapeptides **15** (26 %) ist dies eine effektive Verbesserung. Ausschlaggebend auf diese Ausbeutesteigerung ist hierbei der Einsatz der *O*-Deacetylierung der N-Acetyl-Galactosaminreste am polymeren Träger mit Hydrazin anstelle der *O*-Deacetylierung in Lösung mit Natriummethanolat.

2.2.4. NMR-Charakterisierung der Glycopeptide 15, 16 und 26

Die Charakterisierung der Glycopeptide **15**, **16** und **26** mittels NMR-Spektroskopie hat das Ziel, alle Protonen in dem jeweiligen Molekül zweifelsfrei zu identifizieren. Hierbei wird eine Strategie entwickelt, die auch bei der NMR-Charakterisierung der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Verbindungen zum Einsatz kommen wird. Aussagen zur Sekundärstruktur lassen sich auch über die hier verwendeten Aufnahmetechniken treffen. Quantitative Aussagen über Distanzen zwischen Protonen erfordern allerdings aufwendige Untersuchungen der zeitlichen Aufbauraten der individuellen NOE-Effekte. Für die weitergehende Untersuchung der Sekundärstruktur ist eine hierauf basierende NMR-constrained Molekular Dynamik Simulation eine aussagefähige Untersuchungsmethode. Da diese Untersuchungsmethode umfangreich ist und eingehende spezielle Techniken erfordert, werden NOE-Aufbauraten Messungen und Molekular Dynamik Untersuchungen der Verbindung **15** von SCHUSTER (eingereicht) und im Falle des Glycopeptides **16** von HERFURTH (1997) durchgeführt. Auszüge aus diesen Arbeiten sind im Kapitel 2.2.6. wiedergegeben.

Bei der Strukturaufklärung des hexaglycosylierten Decapeptides **15** wurde ausschließlich auf ^1H -NMR Spektroskopie zurückgegriffen (Klich 1994). Diese Einschränkung war bestimmt von dem zu der Zeit zur Verfügung stehenden Spektrometer (Bruker AMX 400). Zwar ist dieses Spektrometer durchaus in der Lage, ausgezeichnete ^{13}C -NMR Spektren nicht isotopenangereicherter Substanzen zu erzeugen, jedoch ist die Aufnahme hochaufgelöster ^1H - ^{13}C -Korrelationen nicht erfolgreich. Dies wird verursacht von der systemimmanenten Schwankung des Locksignals der analogen Aufnahmetechnik. Bei Langzeitmessungen von mehreren Tagen, wie für ^1H - ^{13}C -Korrelationen notwendig ist, führt dies zu keinem brauchbaren Ergebnis (Sinnwell, persönliche Mitteilung).

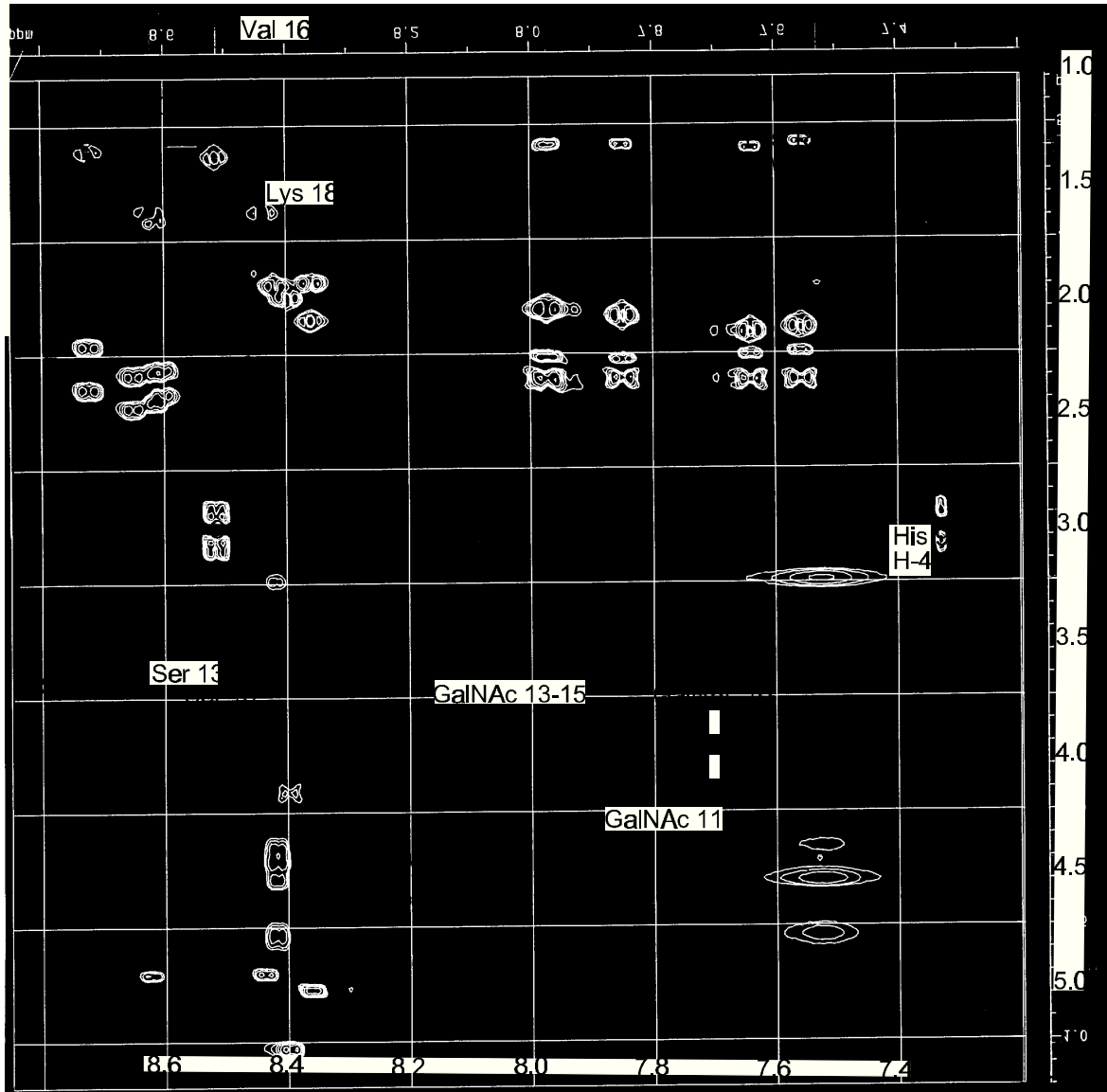
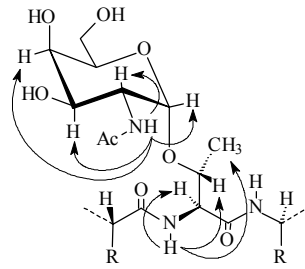


Abbildung 2.2.9: Oben: Beispiel für die beobachteten skalare Kopplungsverhältnisse in den Peptidfragmenten über ^1H - ^1H -TOCSY Experimente. Unten: Übersichtlicher Ausschnitt aus einem ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum des hexaglycosylierten Decapeptides **15** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$. Gezeigt sind die Korrelationssignale der Amidprotonen des Peptidrückgrates (links) mit den Seitenkettenprotonen und die Korrelationssignale der Amidprotonen der GalNAc-Reste (rechts) mit den Kohlenhydratprotonen.

Die rein auf die Untersuchung der Protonen gestützte NMR-Charakterisierung der Verbindung **15** folgt im wesentlichen der Strategie von WÜTHRICH (1986). Die Zuordnung der Chemischen Verschiebungen zu einzelnen Peptidfragmenten bzw. den Kohlenhydratseitenketten erfolgt dabei über ^1H - ^1H -COSY- und ^1H - ^1H -TOCSY-Experimente (Abbildung 2.2.9). Die hier beobachteten Kopplungen entstammen immer einem isolierten

Kopplungssystem und gestatten keine Aussage über die Konnektivitäten der Aminosäure- und Kohlenhydrateinheiten. Die Kopplungskonstanten werden aufgrund von Überlagerungen der Signale nicht über eindimensionale Protonenspektren ermittelt. Phasensensitive ^1H - ^1H -COSY-Experimente gestatten die Ermittlung von Kopplungskonstanten aus den Korrelationssignalen. Bei Quantenfilterexperimenten wird zudem noch das Intensitätsverhältnis zwischen den Diagonalsignalen und den Korrelationssignalen verbessert, so daß auch Kopplungen der Kopplungspartner mit ähnlicher Chemischer Verschiebung beobachtet werden können. Die Aufnahme von ^1H - ^1H -COSYDQFTPI-Spektren führt hier zur vollständigen Aufklärung der Kopplungsverhältnisse.

Bei der Zuordnung der Konnektivität zwischen den oben beschriebenen Fragmenten, insbesondere bei der Determinierung der glycosidischen Bindungen, werden ^1H - ^1H -NOESY-Experimente herangezogen. Diese Spektroskopieform beruht auf dipolaren Wechselwirkungen durch den Raum und nicht auf skalare Wechselwirkungen über chemische Bindungen. Daher determiniert die Zuordnung der Korrelationssignale aus dem ^1H - ^1H -NOESY Spektrum ausschließlich die räumliche Anordnung der Protonen. Da die räumliche Zuordnung der Positionen meist auf die Konnektivität schließen läßt, ist dieses Verfahren sehr erfolgreich. Auch im Falle des hexaglycosylierten Decapeptides **15** ergab sich eine eindeutige Bestimmung der Konnektivität. Es darf jedoch nicht unbeachtet gelassen werden, daß gerade bei ausgedehnten Molekülstrukturen wie den Peptiden auch räumliche Anordnungen der Protonen denkbar sind, die falsche Konnektivitäten vortäuschen. Als Beispiele seien hier nur die typischen Proteinstrukturen der Helices oder Schleifen (Turns) genannt, in denen in der Primärstruktur nicht benachbarte Fragmente räumlich dauerhaft benachbart sind. Das Auftreten von Anlagerungseffekten wie im Faltblatt zeigt, daß sich diese Problematik sogar intermolekular auswirken kann.

Die Strukturaufklärung der Peptide **16** und **26** basiert auf NMR-Spektren, die von dem Spektrometer Bruker DRX 500 erzeugt sind. Neben einem 25 % höheren Magnetfeld ist der Vorteil dieses modernen Spektrometers in der digitalen Aufnahmetechnik zu sehen. Diese Technik gestattet durch die kontinuierliche digitale elektromagnetische Abstimmung wesentlich empfindlichere Aufnahmetechniken und längere Aufnahmezeiten (siehe dazu auch Kapitel 2.3).

Die Zuordnung der Chemischen Verschiebungen zu einzelnen Peptidfragmenten bzw. den Kohlenhydratseitenketten erfolgt für die Verbindungen **16** und **26** ebenso über ^1H - ^1H -COSY- und ^1H - ^1H -TOCSY-Experimente wie im Falle des hexaglycosylierten Decapeptides **15**. Es zeigt sich hierbei, daß sich die Bestimmung der Chemischen Verschiebungen der Protonen in der Peptidkette ohne Schwierigkeiten durchführen läßt. Dieses wird der hohen Dispersion von $\Delta\delta = 0.7$ ppm (**16**), bzw. $\Delta\delta = 0.5$ ppm (**26**) in den Resonanzen der Amidprotonen im Peptidrückgrat zugeschrieben. Die Zuordnung der Kohlenhydratseitenketten des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** wird begünstigt von der hohen Dispersion der GalNAc-NH Resonanzen von $\Delta\delta = 0.6$ ppm. Die Dispersion der Resonanzen im Falle der GalNAc-H-2 Protonen mit $\Delta\delta = 0.11$ ppm ist ebenso recht hoch. Die H-1 Resonanzen sind

mit $\Delta\delta = 0.05$ noch differenzierbar, für H-3 und H-4 Protonen werden bei kleineren Differenzen der individuellen Chemischen Verschiebungen jedoch Überlagerungen beobachtet. Der Magnetisierungstransfer, ausgehend von den Protonen mit den wohl dispergierten Resonanzen, kann im ^1H - ^1H -TOCSY Spektrum durch die annähernd parallele Ausrichtung der H-4 und H-5 Protonen im N-Acetyl-Galactosaminring ($J_{4,5} = 0.5$ Hz, siehe Kapitel 2.3) nicht vollständig beobachtet werden. Die Chemischen Verschiebungen der Protonen H-5 und H-6a/b können auf diese Weise nicht ermittelt werden.

Auch bei der Ermittlung der Kopplungskonstanten in den Verbindungen **16** und **26** wird im Wesentlichen das bei dem Glycopeptid **15** angewandte Analysekonzept verfolgt. Die oben beschriebenen phasensensitiven Spektren beinhalten eine große Menge an redundanter Information. Außerdem liegt bei Verbindungen wie dem nonaglycosylierten Octadeca-peptid **16** eine derartige Komplexität vor, daß selbst die Korrelationssignale eine sehr hohe Überlagerung zeigen. Daher wird die Aufnahme von ^1H - ^1H -ECOSY-Spektren vorgezogen, die als Differenzspektren quantengefilterter Aufnahmen frei von redundanten Informationen und damit übersichtlicher sind. Die Kopplungsverhältnisse der Peptidfragmente werden dadurch in den Verbindungen **16** und **26** vollständig ermittelt. Der Kohlenhydratteil im Glycopeptid **16** kann soweit aufgeklärt werden, daß mit der Ermittlung der Kopplungsverhältnisse der GalNAc-NH, H-1, H-2 und H-3 Protonen keine wesentlichen Informationen im Verborgenen bleiben. Obwohl der reduzierte Informationsgehalt der ^1H - ^1H -ECOSY-Spektren prinzipiell eine hohe Differenzierung erlaubt, können für die schwach dispergierten H-4, H-5 und H-6a/b Protonen keine Kopplungsverhältnisse ermittelt werden.

Bei der Zuordnung der Konnektivität zwischen den Peptidfragmenten, insbesondere bei der Determinierung der glycosidischen Bindungen, werden bei den Peptiden **16** und **26** heteronukleare Experimente herangezogen. Bei den mittels digitaler Aufnahmetechnik möglich gewordenen inversen Experimenten werden nach ^{12}C -Resonanzunterdrückung und anschließender Entkopplung der ^{13}C -Multipletts Protonenspektren gemessen, welche die Kopplungsinformation der ^{13}C -Kerne enthalten. Gegenüber den auf Kohlenstoffspektren basierenden ^{13}C - ^1H -Korrelationen ist also eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung zu registrieren. Aus der stetig wachsenden Vielfalt der Möglichkeiten inverser Aufnahmetechniken werden hier die ^1H - ^{13}C -HMQC und ^1H - ^{13}C -HMBC Techniken ausgewählt. Das ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektrum zeigt die direkte Kopplung über die Bindung zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff [$^1J(\text{C}, \text{H})$]. Die Aufnahme dieses Spektrums dient der Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen zu den entsprechenden Kernen unter Zuhilfenahme der beobachteten Protonenresonanzen. Die wesentliche Information zur Konnektivität erhält man aus dem ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (Abbildung 2.2.10). Hier werden die Kopplungen $^2J(\text{C}, \text{H})$ und $^3J(\text{C}, \text{H})$ entfernter Kerne aufgedeckt, während die $^1J(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen unterdrückt werden.

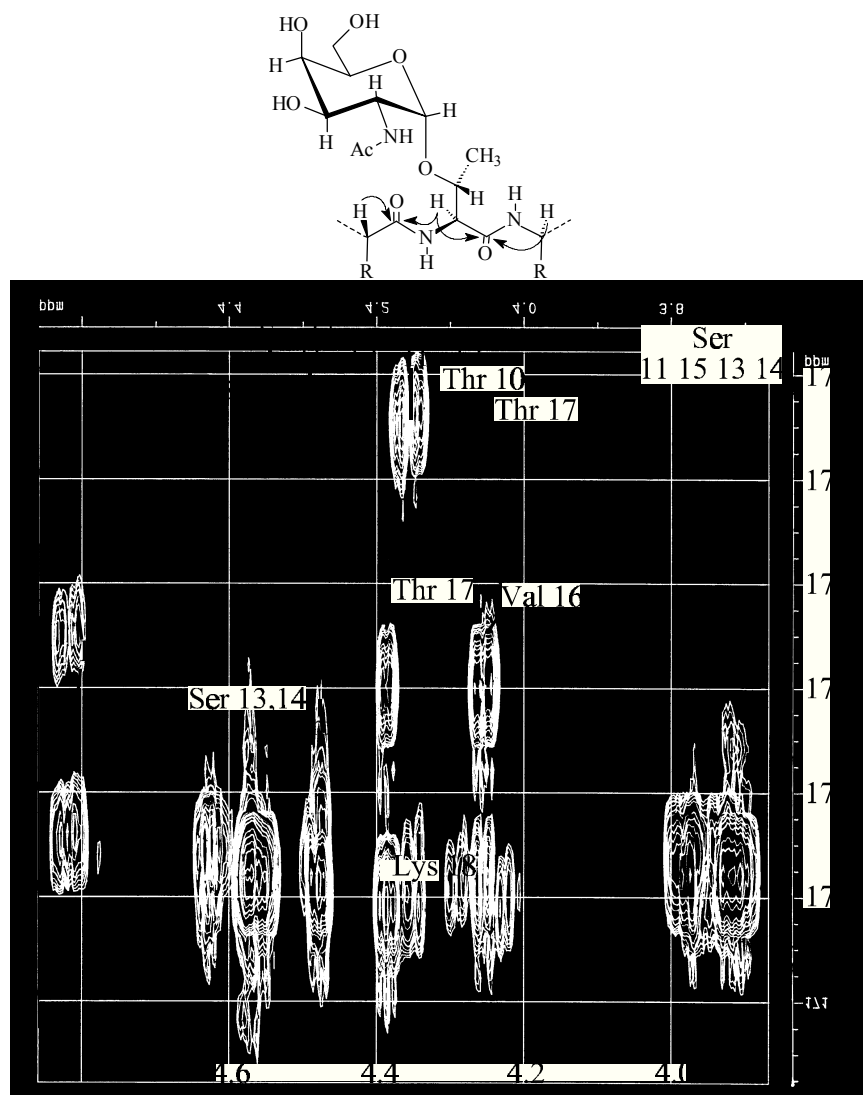


Abbildung 2.2.10: Oben: Beispiel für die beobachteten skalare Kopplungsverhältnisse in den Peptidfragmenten über ^1H - ^{13}C -HMBC Experimente. Unten: Übersichtlicher Ausschnitt aus dem ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum des Decapeptides **26** in D_2O . Gezeigt sind die ^2J -Korrelationssignale der CH_α -Protonen zu den fragmentinternen Carbonylkohlenstoffisotopen. Deutlich erkennbar sind auch ^3J -Kopplungen einiger Protonen zu Carbonylkohlenstoffisotopen benachbarter Peptidfragmente.

Mit Hilfe dieser Informationen werden die Kopplungssysteme, die über ^1H - ^1H -COSY- und ^1H - ^1H -TOCSY-Experimente ermittelt werden, überprüft und ergänzt. Dabei zeigt sich eine Bestätigung der über Protonenspektroskopie erhaltenen Daten. Als Ergänzung werden aus den Resonanzen der C-5 und C-6 Kohlenstoffisotope die Chemischen Verschiebungen der Protonen H-5 und H-6a/b ermittelt. Die beobachteten $^2\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen gestatten eine Bestimmung der Konnektivitäten in dem Peptidrückgrat. Konkret werden hier ausgehend von den Chemischen Verschiebungen der CH_α Protonen die dazugehörigen Resonanzen der fragmentinternen Carbonylkohlenstoffisotope ermittelt. Deren Kreuzrelationen zu den Amidprotonen der benachbarten Peptidfragmente führen zu einer vollständigen Ermittlung der Konnektivitäten in den Verbindungen **16** und **26**. Insbesondere die beobachteten $^3\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen gestatten teilweise eine vereinfachte Bestimmung der Konnektivitäten in dem Peptidrückgrat. Abbildung 2.2.10 zeigt hier als übersichtliches Beispiel die auf $^3\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -

Kopplungen zurückzuführenden Kreuzresonanzen zwischen den CH α Protonen und den Carbonylkohlenstoffisotopen der jeweiligen benachbarten Peptidfragmente. Diese sind in einem Ausschnitt mit den auf $^2J(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen beruhenden Kreuzresonanzen zwischen den CH α Protonen und den Carbonylkohlenstoffisotopen der jeweiligen eigenen Peptidfragmente gezeigt. Mittels $^3J(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen über das jeweilige Sauerstoffatom der glycosidischen Bindung hinweg gelingt auch und die vollständige Determinierung der glycosidischen Bindungen zwischen dem Peptid und den Kohlenhydratseitenketten. Diese Informationen werden zudem verifiziert durch die ebenfalls angefertigten ^1H - ^1H -NOESY-Experimente (siehe Abbildung 2.2.11).

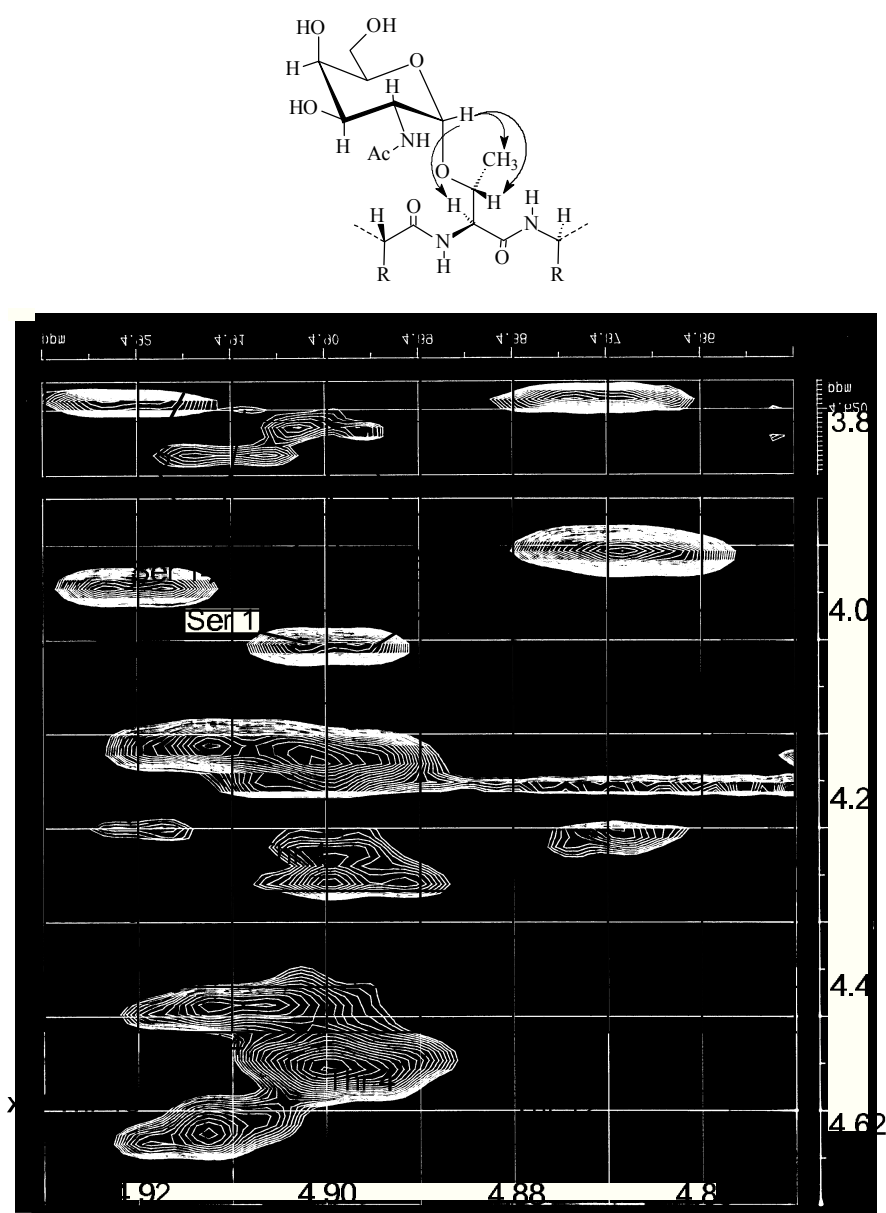


Abbildung 2.2.11: Oben: Beispiel für die beobachteten dipolaren Kopplungsverhältnisse in den glycosylierten Peptidfragmenten über ^1H - ^1H -NOESY Experimente. Unten: Ausschnitt aus einem ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** in D_2O . Gezeigt sind die deutlichen dipolaren Korrelationssignale der GalNAc-H-1 Protonen zu den Ser β und Thr β Protonen, sowie einige schwächere Signale zu den Thr α Protonen.

Als Ergebnis dieser NMR-Untersuchungen können trotz der starken Überlappung der GalNAc- und Ser-/Thr-Signale alle Protonen der drei Verbindungen zugeordnet werden können. Die Werte sind in den Tabellen im Experimentellen Teil zusammengefaßt.

2.2.5. ORD der Glycopeptide 15, 16 und 26

Die Optische Rotationsdispersion (ORD) wird aufgezeigt durch die Aufnahme von Circular Dichroismus Spektren (CD) (Greenfield 1996, Review). Die CD-Spektren der Glycopeptide **15**, **16** und **26** eignen sich dabei hervorragend zum Aufdecken eines Einflusses der Glycosylierungscluster auf die Struktur des Peptidrückgrates. Die CD gestützten Aussagen über die Sekundärstruktur der Glycopeptide haben dabei rein qualitativen Charakter. Umfangreichere Experimente schließen Meßreihen bei variablen Konzentrationen und insbesondere bei unterschiedlichen Temperaturen ein. Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen ist die qualitative Untersuchung von Effekten, die hervorgerufen werden durch die clusterartige hohe Glycosylierung. Die hohe Empfindlichkeit des Meßverfahrens und dessen effiziente Durchführung sind dabei in diesem Zusammenhang bedeutungsvoller, als die Quantifizierbarkeit der Ergebnisse. Für die eingehende Untersuchung der Sekundärstruktur ist die NMR-constrained Molekular Dynamik Analyse eine wesentlich aussagekräftigere Untersuchungsmethode (siehe Kapitel 2.2.6). Diese Methode ist zeitlich und apparativ aufwendig. Daher ist ein durch CD-Spektroskopie in Erfahrung gebrachter Hinweis auf einen Effekt ein wichtiger Beitrag für die Abschätzung den Möglichkeiten weiterer Untersuchungen.

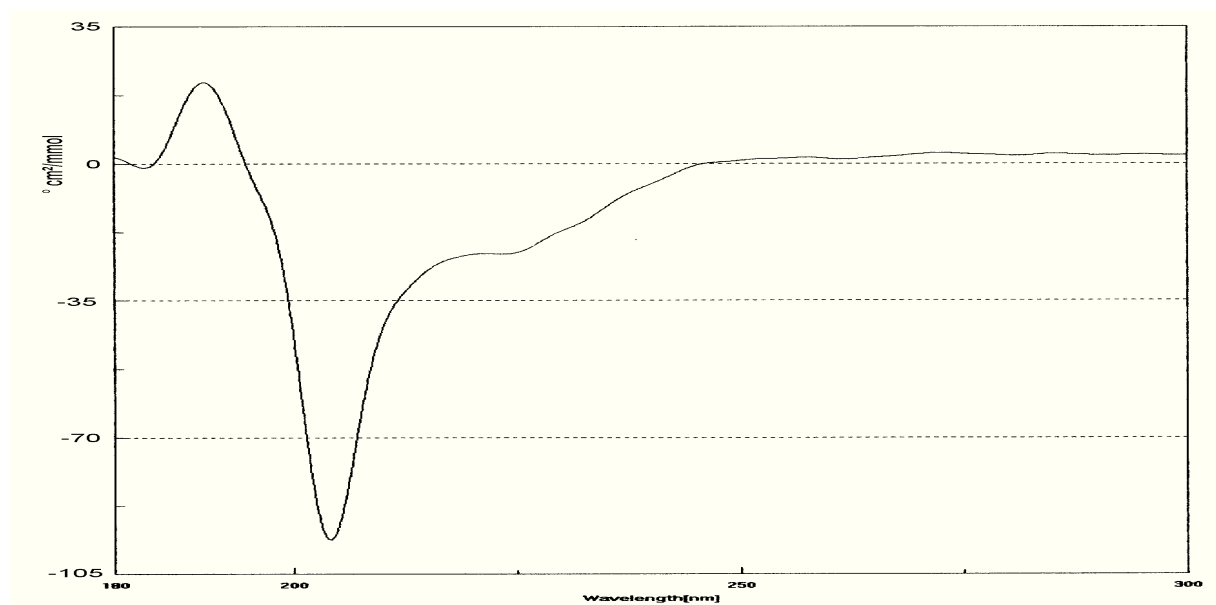


Abbildung 2.2.12: CD-Spektrum des Decapeptides **26**, ein Beispiel für die ORD-Effekte eines Peptides mit zufälliger Sekundärstruktur (random coil structure).

Das CD-Spektrum des Decapeptides **26** (siehe Abbildung 2.2.12) ist ein typisches Beispiel für eine ungeordnete, zufällige Sekundärstruktur des Peptides (random coil structure). Dies zeigt

sich an dem positiven Effekt bei 190 nm, dem starken negativen Effekt bei 204 nm und dem negativen Effekt bei 224 nm.

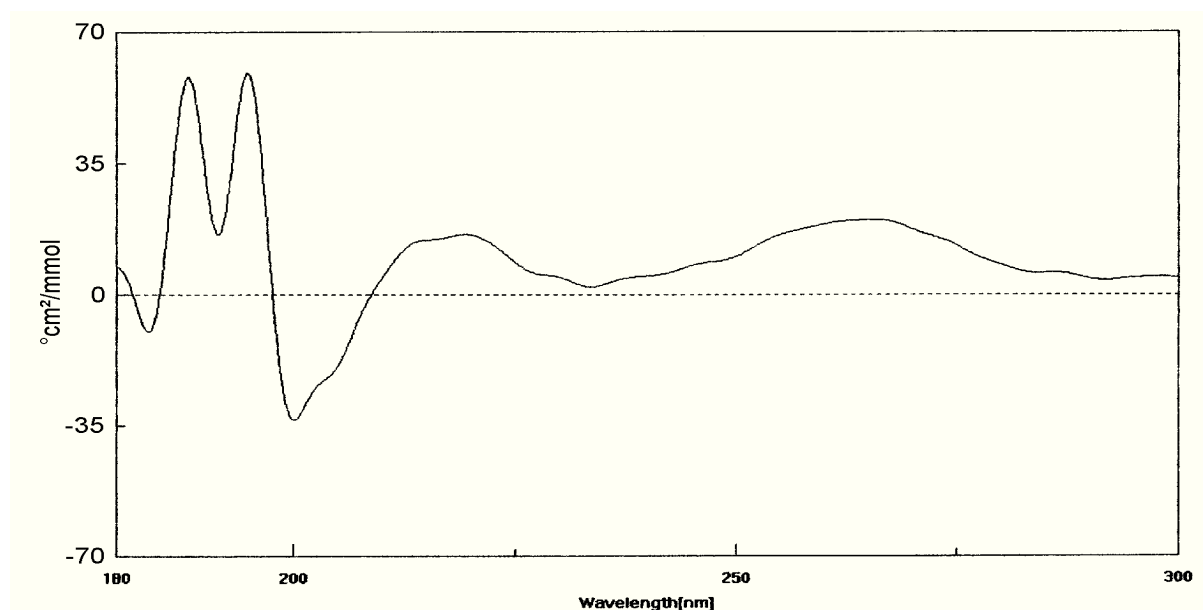


Abbildung 2.2.13: CD-Spektrum des hexaglycosylierten Decapeptides **15**. Deutlich ist ein dramatischer Unterschied zum CD-Spektrum des Decapeptides **26** zu erkennen, der nicht auf ungestörte Überlagerung mit GalNAc-CD-Spektren zurückzuführen ist (siehe Text). Das Spektrum ist zum besseren Vergleich mit den umliegenden Abbildungen vertikal gedehnt.

Die Glycopeptide **15** und **16** hingegen zeigen sehr ungewöhnliche Effekte (Abbildungen 2.2.13 und 2.2.14). Beide Glycopeptide zeigen gegenüber der Verbindung **26** erhöhte positive Effekte bei 188-189 nm. Eine starke negative Optische Rotationsdispersion bei 200-201 nm, die bei dem nonaglycosylierten Octadecapeptid **16** stärker ist als bei dem hexaglycosylierten Decapeptid **15**, ist bei dem Glycosylierungscluster zu beobachten. Ebenso treten positive Effekte bei 217 nm auf. Das CD-Spektrum von GalNAc zeigt einen positiven Effekt bei 190 nm und einen negativen Effekt bei 209 nm (Coduti 1977). Der vorhandene negative Wert bei 209 nm in dem CD-Spektrum des Peptides **26** sollte sich also durch die Glycosylierung in dem Glycopeptid **15** noch erniedrigen, da sich CD-Banden von Kohlenhydraten und Peptiden additiv verhalten (Watanabe 1981). Statt dessen ist bei 209 nm im CD-Spektrum der Glycopeptide **15** und **16** jeweils ein Wert um den Nullpunkt zu beobachten. Die hier beobachteten Effekte sind demnach nicht auf die ungestörte Überlagerung der Peptid- und der Kohlenhydratbanden zurückzuführen. Vielmehr ist hiermit ein Beweis für die Induktion einer vollkommen neuen Sekundärstruktur des Peptidrückgrates durch die Glycosylierungscluster zu sehen.

Interessant in diesem Zusammenhang sind auch die individuellen Effekte des hexaglycosylierten Decapeptides **15** gegenüber dem nonaglycosylierten Octadecapeptid **16**. Positive CD-Effekte bei 195 nm und 265 nm sind hier nur bei Verbindung **15** zu finden. Das Auftreten eines Effektes in der aromatischen Region (265 nm) kann in diesem Molekül nur vom His-9 herrühren und weist auf eine hohe Ordnung am N-Terminus des Glycopeptides **15**

hin. Die ORD bei 195 nm scheint hiermit einherzugehen. Das Fehlen dieser Banden in dem CD-Spektrum des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** zeigt an, daß sich mit der Verlängerung der Peptidkette am N-Terminus neue Strukturelemente bilden.

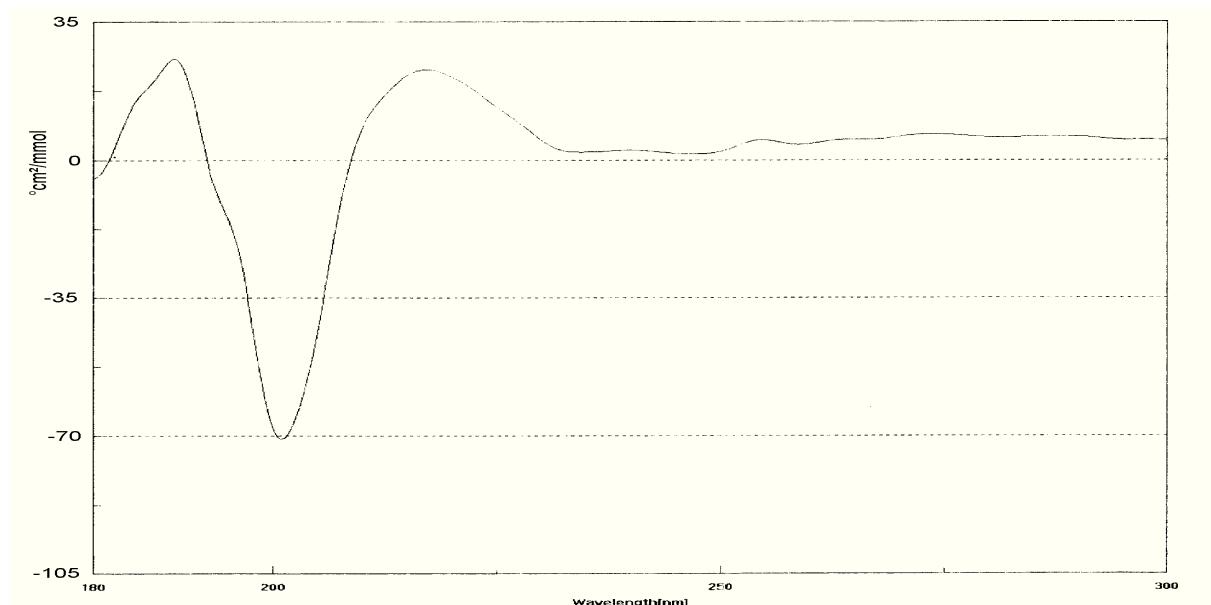


Abbildung 2.2.14: CD-Spektrum des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16**. Es ist partielle Übereinstimmung zu dem CD-Spektrum des hexaglycosylierten Decapeptides **15** zu erkennen, aber auch signifikante Unterschiede sind offensichtlich (siehe Text).

2.2.6 Untersuchungen zur Konformation der Glycopeptide **15** und **16**

Die dreidimensionale Struktur des Glycopeptides **15** His-Thr*-Ser*-Thr*-Ser*-Ser*-Ser*-Val-Thr-Lys, mit an sechs benachbarten Peptidfragmenten (Thr-10 bis Ser-15) gebundenen 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactose Einheiten (* = GalNAc), wurde mittels NMR Spektroskopie und Moleküldynamik Simulation untersucht (Schuster 1999). Im folgenden ist eine Zusammenfassung dieser Arbeit angeführt.

Das hexaglycosylierte Decapeptid ist Teil der extracellulären Domäne des humanen Glycophorin A und zeigt eine gestreckte Struktur des Peptidrückgrates induziert durch die O-Glycosylierung. Weiterhin zeigt jede GalNAc Einheit genau einen NOE Kontakt des jeweiligen NHAc Protons zu dem Amidproton des Peptidfragments, an dem der Kohlenhydratrest direkt gebunden ist. Dies indiziert eine starke Präferenz für die Orientierung aller GalNAc Einheiten zum N-Terminus hin. NOE-Aufbaukurven werden genutzt, um Distanzen zwischen 42 Protonen zu determinieren. In Verbindung mit ϕ Winkeln des Peptidrückgrates, ermittelt aus ^3J -Kopplungskonstanten, resultierten hieraus Constraints für eine Moleküldynamik Simulation in Wasser. Die NMR Daten und die Moleküldynamik Simulationen zeigen eine Bevorzugung einer gestreckten Peptidrückgratstruktur. Die GalNAc Einheiten sind alternierend an gegenüberliegenden Seiten des Peptidrückgrates angeordnet und reduzieren die Flexibilität des Peptidrückgrates. Die Konformation des Moleküls ist relativ rigide und zeigt eine „wave type“ 3D Struktur des Peptidrückgrates in dem Glycosylierungscluster.

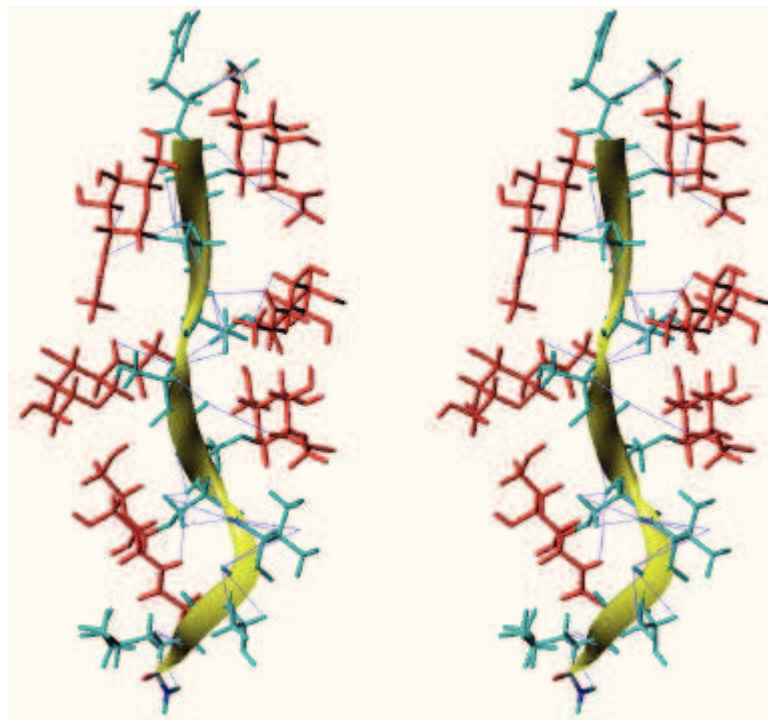


Abbildung 2.2.15: Stereoansicht einer energieoptimierten gemittelten Struktur des hexaglycosylierten Decapeptides **15**, erhalten aus den letzten 100 ps der 1000 ps andauernden constrained Moleküldynamik Simulation (Schuster 1999). GalNAc Einheiten sind in rot dargestellt, Peptidseitenketten in Zyan. Das gelb schattierte Band zeigt das Peptidrückgrat. Die Abstands-Constraints sind als blaue Linien eingetragen.

Die Konformation des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** aus der extrazellulären Domäne des Glycophorin A^N wurde von HERFURTH (1997) untersucht. Im folgenden ist eine Zusammenfassung dieser Arbeit angeführt.

Mittels NOESY-Spektroskopie konnten vier strukturelevante $\text{NH}_i\text{CH}\alpha_{i-1}$ -Abstände bestimmt werden, die auf eine gestreckte Konformation des Peptidrückgrates deuten. Die ermittelten NH-NH(GalNAc)-Abstände lagen im Bereich von 2.14 Å für Thr-3 bis 2.86 Å für Ser-11 und zeigten eine relativ hohe Fixierung bezüglich des Peptidrückgrates. Für GalNAc-9 konnte zusätzlich ein NOE-Kontakt zu Val-16 mit 2.40 Å bestimmt werden. Die Bestimmung der NH-H α -Kopplungskonstanten und die anschließende Analyse über die Karplus-Funktion lieferte Werte von ca. -150° oder ca. -90° für den ϕ -Winkeln des Peptidrückgrates. Die Konformationsanalyse mittels MMC-Simulation wurde mit dem Programm GEGOP durchgeführt. Von verschiedenen Startkonformationen ausgehend wurden für die Winkel des Peptidrückgrates annähernd gleiche Verteilungsformen gefunden, die auf eine gestreckte Struktur deuten. Dies zeigt sich auch in der *constrained* MMC-Simulation. Zusätzlich konnte in allen drei Simulationen die Bevorzugung der Stellung der glycosidischen Bindung mit den NH-Kontakten der N-Acetyl- α -D-galactosamin-Einheiten zu den NH-Protonen der Aminosäuren bestätigt werden.

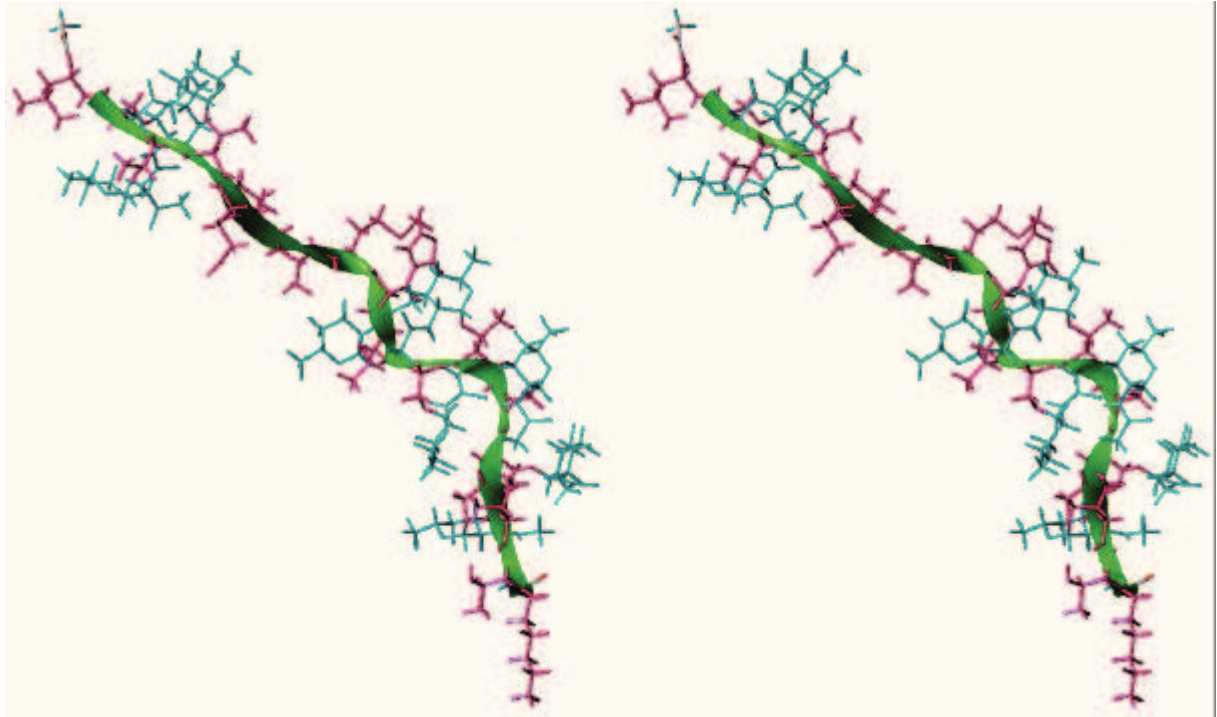
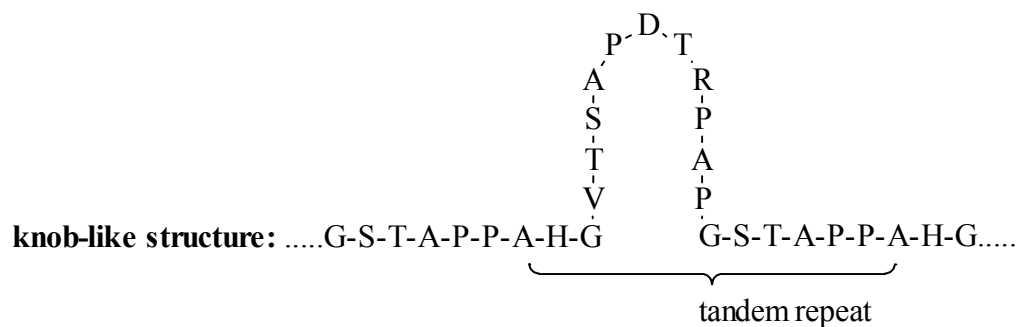


Abbildung 2.2.16: Die experimentellen Daten der NH-H α Kopplungskonstanten und die ermittelten Protonenabstände wurden verwendet, um eine Struktur des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** zu generieren. Gezeigt ist die Endkonformation der constrained Energieminimierung (Herfurth 1997).

In diesem Teil der Arbeit wird die Synthese von Glycopeptidsequenzen aus dem weit verbreiteten humanen epithelen Mucin MUC1 beschrieben. Humane Mucine sind an Threonin oder Serin glycosylierte Tandem Repeat Proteine (siehe Einleitung). Die Wiederholungseinheit (Repeating Unit) im Transmembranteil des MUC1 Proteins ist potentiell glycosyliert mit fünf Oligosacchariden (siehe Abbildung 2.3.1). Die Frage der Positionen der Glycosylierungen und der Struktur der Oligosaccharide ist vielfach wenig bekannt, da die *O*-Glycane starke Heterogenität in der Struktur zeigen. In Fällen des Brustkrebses haben chemische und immunochemische Untersuchungen ergeben, daß die den Tumor begleitende reduzierte Biosynthese der Glycosyltransferasen zu einer unvollständigen Glycosylierung des MUC1 Proteins führt (Hanisch 1989, Brockhausen 1995). Die am häufigsten beobachteten verkürzten Saccharidstrukturen sind das Tⁿ- und das TF-Antigen, die in Abbildung 2.3.1 mit aufgeführt sind.

* = β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc-1 (TF-Antigen)
oder = α -D-GalNAc-1 (Tⁿ-Antigen)

TR3: [-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-P-A-H-G-V-T-S-A-]₃



Die unvollständige Glycosylierung des MUC1 Glycoproteins im Tumorgewebe ermöglicht es dem Immunsystem, das Peptidrückgrat des Mucins zu erkennen. Das bevorzugte Ziel der meisten gegen das tumoröse Mucin gerichteten peptidspezifischen Antikörper liegt in der Tandem Repeat Einheit des MUC1 und umfaßt ein Motiv der Sequenz DTR (Price 1997, summary report). So erkennen z.B. cytotoxische T-Zellen aus Brustkrebspatientinnen das unglycosylierte DTR-Motiv (Jerome 1991). Die Möglichkeit der Entwicklung von Impfstoffen gegen Tumorleiden basierend auf den MUC1 Tandem Repeat Peptiden sind in der Entwicklung (Apostolopoulos 1994).

Die unglycosylierten MUC1 Tandem Repeat Polypeptide bestehend aus einer Repeating Unit (TR1) und aus drei Einheiten (TR3, siehe Abbildung 2.3.1) wurden chemisch synthetisiert und mittels Circular Dichroismus (Fontenot 1993) und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie charakterisiert (Fontenot 1995). Diese Studien zeigten die räumliche Anordnung der Tandem Repeats in einer Polyprolin- β -turnhelix auf. Es wurde demonstriert, wie die Tertiärstruktur des Proteins durch die Sekundärstruktur des vorhandenen antigenen Strukturelements DTR beeinflusst wird. Die NMR-Daten weisen auf eine wiederkehrende knopf- oder buckelartige Struktureinheit (“knob-like structure“) in der Polyprolin- β -turnhelix hin. Aus der Hauptachse des Peptidrückgrates treten diese knobs hervor und das vorherrschende antigene Strukturelement DTR bildet hierbei eine leicht zugängliche Angriffsspitze der knobs.

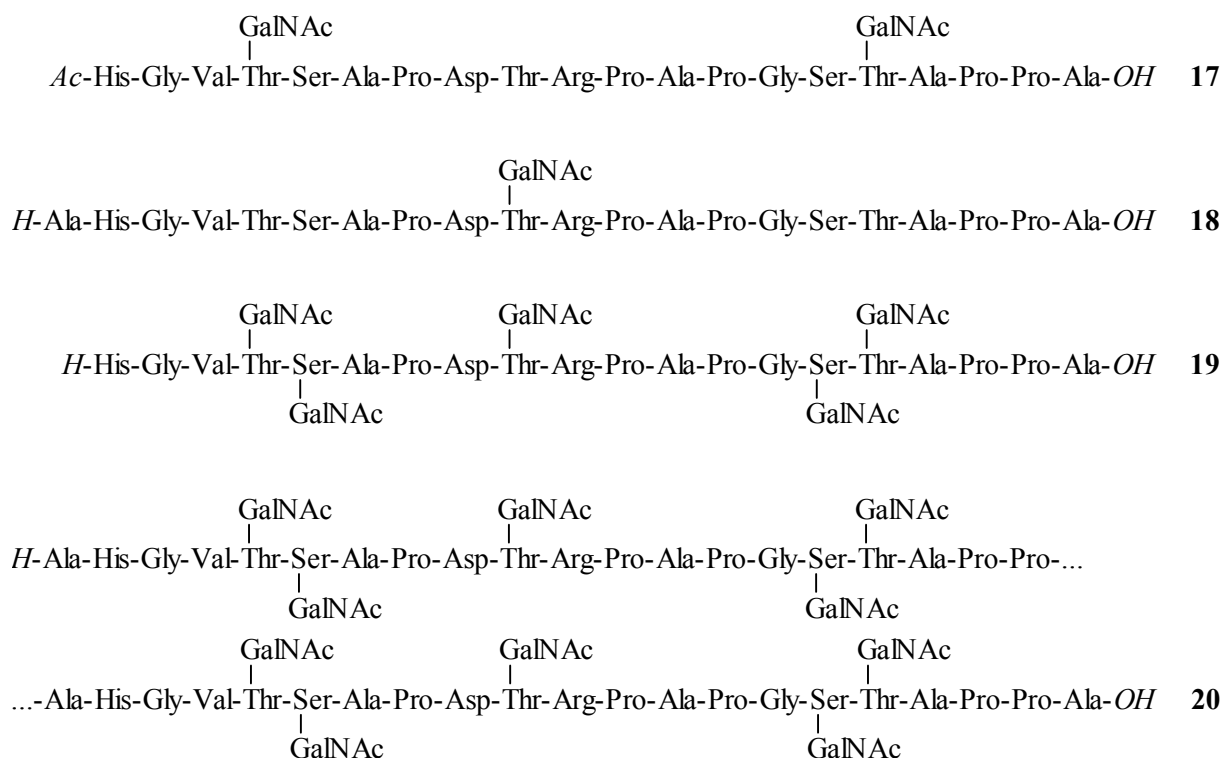


Abbildung 2.3.2: In diesem Teil der Arbeit synthetisierte Glycopeptide aus der Repeating Unit des MUC1.

Die von FONTENOT (1995) erhaltenen Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der Position des antigenen Strukturelements DTR auf. In den dortigen Untersuchungen zeigt sich, daß sich die knob-like structure im Fragment TR1 nicht ausbildet. Die gewählte Sequenz des Peptides zerschneidet die Repeating Unit des MUC1 zwischen -A und P- (siehe Abbildung 2.3.1). Sehr deutlich ist die Schleife jedoch im TR3-Fragment zu beobachten, in dem die vollständige APDTR-Sequenz gleich zweimal vorliegt. Die Ausbildung der knob-like structure bedarf offensichtlich die vollständige Präsenz des APDTR Strukturelements. Als eine Quintessenz dieser Ergebnisse wird das antigene Strukturelement APDTR bei weiteren Synthesen zentral in der zu synthetisierenden Peptidsequenz positioniert (siehe auch Abbildung 2.3.2).

Glycosylierungsstudien *in vitro* zeigen, daß normalerweise mit Glycosyltransferasen verschiedener Herkunft keine Glycosylierung im Bereich des APDTR-Motives möglich ist

(Nishimori 1994, Stadie 1995, Wandall 1997). Im Gegensatz hierzu wurde aber gezeigt, daß *in vivo* alle möglichen Positionen und auch das APDTR-Motiv glycosyliert werden können. Ferner wurde *O*-Glycosylierung am APDTR-Motiv in dem der Milchproduktion assoziierten MUC1 gefunden (Müller 1997). Diese Ergebnisse geben Anlaß zu weiteren Untersuchungen über die Antigenität der immunodominanten Region, insbesondere bietet sich ein Vergleich mit unterschiedlich glycosylierten synthetisch dargestellten Fragmenten an.

Um den Einfluß der Glycosylierung auf die Struktur und Antigenität der MUC1 Glycopeptide zu studieren und mit den Ergebnissen der unglycosylierten Peptide TR1 und TR3 zu vergleichen, werden in dieser Arbeit die in Abbildung 2.3.2 dargestellten Glycopeptidsequenzen synthetisiert und charakterisiert. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Variationen der Repeating Unit des MUC1, die an verschiedenen Glycosylierungsstellen durch Glycosylierung mit dem Tⁿ-Antigen GalNAc glycosyliert sind. Die aus den Charakterisierungen der Glycopeptide erhaltenen Hinweise auf das Vorliegen interessanter Strukturen ermöglichen gezielte Konformationsanalysen, welche die Gestalt der ermittelten Strukturen quantitativ beschreiben könnten. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten vereinfachen zusätzlich die Betrachtung parallel hierzu synthetisierter Verbindungen mit Thomson-Friedenreich(TF)-Antigenstruktur. Hierzu sind Betrachtungen in Kapitel 2.3.3 angestellt. Die Untersuchungen über die Antigenität der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen werden parallel zu den im folgenden vorgestellten strukturellen Untersuchungen durchgeführt (Karsten 1998). Auszüge dieser Arbeit werden in Kapitel 2.3.6 vorgestellt.

2.3.1 Synthese der diglycosylierten MUC1-Repeating Unit 17



Die Synthese der diglycosylierten MUC1-Repeating Unit 17 wird in paralleler Syntheseführung nach der „batch“-Methode durchgeführt (Merrifield 1963). Die klassische Syntheseform mit ruhendem Polymer in einer Glasfritte eignet sich insbesondere bei der Verwendung der Aktivester in der Peptidsynthese mit Dhbt-OH als optischen Indikator. Die parallele Syntheseführung bei der gleichzeitigen Darstellung verschiedener Peptidsequenzen macht diese Syntheseführung der automatisierten Synthese gegenüber konkurrenzfähig. Durch den Einsatz des Farbindikators Dhbt-OH wird eine ständige Reaktionsoptimierung erreicht und es werden hohe Ausbeuten erzielt. Wegen der Empfindlichkeit der Farbreaktion ist die Eigenfärbung des Polymers und dessen Stabilität sehr wichtig. Das von der Firma Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg) vertriebene Wang-Polymer B1000 (Wang 1972) ist für diesen Einsatz sehr gut geeignet. Eine rein weiße Eigenfarbe und eine relativ hohe Belegung (450 $\mu\text{mol/g}$) zeichnen dieses Polymer aus.

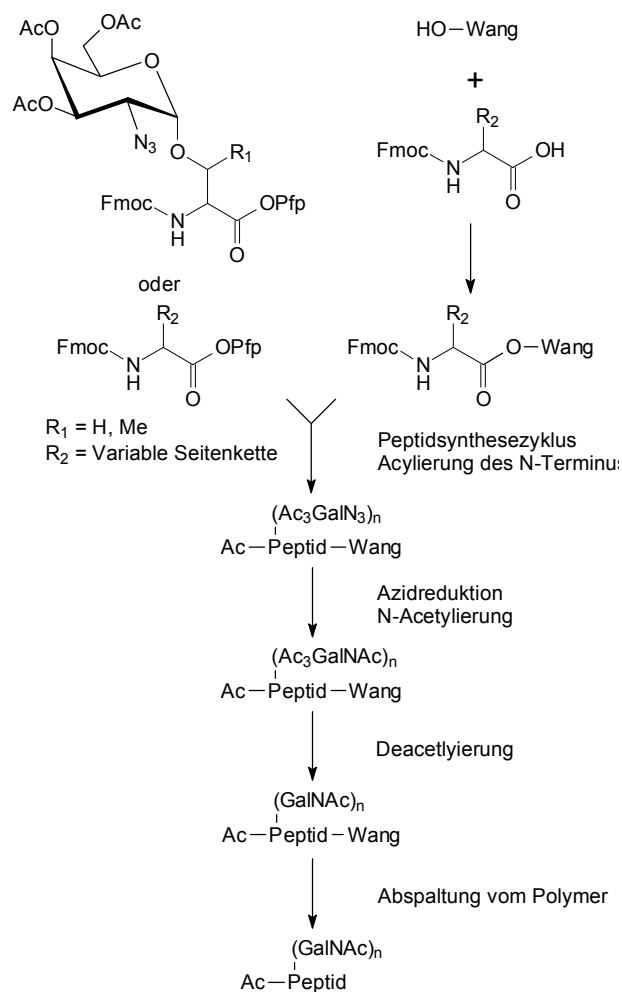


Abbildung 2.3.3: Schema der Festphasenglycopeptidsynthese am Wang-Polymer. Als polymerer Träger wird hier Wang-Harz verwendet, welches den Linker bereits trägt. Die erste Aminosäure wird ankondensiert und erst dann werden die Peptidkupplungsreaktionen durchgeführt. Nach der Peptidsynthese und der Azidreduktion wird die Deacetylierung als Festphasenreaktion durchgeführt und das GalNAc tragende Glycopeptid vom Harz abgespalten.

Die Anknüpfung der ersten Aminosäure Fmoc-Alanin an das Polymer erfolgt als Veresterung mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,3-benzotriazol (MSNT) als Aktivatorreagenz (Blankemeyer-Menge 1990). Die Abspaltung des Glycopeptides vom Harz am Ende der Synthese erzeugt eine Carbonsäurefunktion am C-Terminus der Verbindung **17** (siehe Abbildung 2.3.3). Die *O*-Deacetylierung wird nach den Erfahrungen aus den Synthesen der Glycophorinderivate am polymeren Träger mit Hydrazin durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3).

2.3.1.1 Darstellung und Reinigung der Verbindung 17

Die Verbindung **17** repräsentiert die gesamte Sequenz einer Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins, glycosyliert mit dem Monosaccharid GalNAc an den beiden Threonineinheiten, welche das antigene DTR-Motiv umgeben. Die Peptidkupplungsreaktionen der Synthese der diglycosylierten MUC1-Repeating Unit **17** sind nach jeweils einigen Stunden beendet. Das Verblässen der gelben Indikatorfärbung wird rein qualitativ genutzt. Es werden daher keine vergleichenden Aussagen über die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Kupplungsreaktionen getroffen. Die gewählte

Form der parallelen Durchführung der Synthese macht die zeitliche Optimierung der Einzelsynthese überflüssig. Nach der Peptidsynthese wird die Azidreduktion mit Thioessigsäure am polymeren Träger wie erwartet in 47 Stunden erfolgreich durchgeführt. Die Durchführung der Reduktion gleicht exakt der an dem Glycopeptid **16** durchgeführten Reaktion und wird nicht erneut beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2).

Die *O*-Deacetylierung der GalNAc-Reste in der diglycosylierten Repeating Unit **17** mit methanolischem Hydrazinhydrat am polymeren Träger wird binnen sechs Stunden erfolgreich durchgeführt. Nach der Abspaltung vom Harz sind im MALDI-TOF Massenspektrum der ungereinigten, filtrierten Rohsubstanz keine *O*-acetathaltigen Derivate zu beobachten. Die anschließende HPLC-Reinigung zeigt neben der Hauptschubstanz einige Nebenprodukte. Diese Verbindungen werden bei der chromatographischen Reinigung neben der Hauptkomponente separiert. Die Nebenprodukte liegen nach HPLC-chromatographischer Beurteilung in ausreichender Reinheit vor, um jeweils als einzelne Verbindung angesehen werden zu können. Die Auswaage der gefriergetrockneten HPLC-Nebenfraktionen zeigt durchweg eine Masse der Einzelfraktion im Bereich von 1 % der erzielten Ausbeute des Glycopeptides **17**. Bei der eindimensionalen NMR-Analyse zeigt sich neben der erwarteten Thioacetamidderivate eine Anzahl kleiner Mengen an Abbruchprodukten ohne die Dominanz einer bestimmten Sequenz. Die Threonineinheiten beinhaltenden Nebenprodukte enthalten durchweg Kohlenhydratprotonen mit normalen chemischen Verschiebungen. Freies Galactosamin ist in keiner der Fraktionen zu beobachten. Es sind somit keine Hinweise auf Abspaltung des GalNAc von den Threonineinheiten zu beobachten. Auf eine Sequenzbestimmung der Abbruchprodukte wird aufgrund der geringen Substanzmengen verzichtet. Es scheint also bei der Synthese der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** eine generelle leichte Unvollständigkeit der Reaktionsausbeute in den einzelnen Peptidkupplungsreaktionen vorzuliegen.

Die Auswirkung der Primärstruktur auf die Kupplungsreaktionen an der Festphase sind sehr differenziert. So wirkt sich die Ausbildung von Strukturelementen während der Festphasensynthese der hochglycosylierten Glycophorinsequenzen offenbar positiv auf die Synthese aus (siehe Kapitel 2.2.1). Bei der Synthese der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** beeinflussen die hauptsächlich peptidischen Sequenzabschnitte die Ausbeute der Synthese offenbar negativ.

Die gereinigte diglycosylierte MUC1 Repeating Unit **17** wird massenspektrometrisch identifiziert. Die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse als Routineanalyse ohne eingehende Optimierung erweist sich als erfolgreich. Hier zeigt sich der Vorteil des Einsatzes der MALDI-TOF Massenspektrometrie als schnelle und doch sehr exakte Analysemethode. Die mäßige Ausbeute der Synthese mit 10 % (bezogen auf die Belegung Harzes) zeigt die sequenzabhängigen Schwierigkeiten der Peptidsynthese auf. Die aufwendige chromatographische Abtrennung der Thioacetamidnebenprodukte aus der Azidreduktion beeinflusst die Ausbeute der Synthese ferner negativ. Von der Anwendung der Methode der Azido-Bausteine bei der Synthese von Glycopeptiden aus der MUC1 Sequenz ist demnach

abzuraten. In den Synthesen der im folgenden beschriebenen Glycopeptide der MUC1 Repeating Unit werden daher die in Kapitel 2.1.4 beschriebenen reduzierten, Galactosamin tragenden Building Blocks verwendet, wie es in dem Schema in Abbildung 2.3.7 gezeigt wird.

2.3.1.2 Circular Dichroismus des diglycosylierten Glycopeptides 17

Das Circular Dichroismus Spektrum der Verbindung **17** zeigt im Wesentlichen einen positiven Effekt bei 188.8 nm, einen starken negativen Effekt bei 204.1 nm und einen schwachen positiven Effekt bei 223-227 nm (siehe Abbildung 2.3.5). Das CD-Spektrum des unglycosylierten MUC1-Glycopeptides TR3 wurde von 195-260 nm aufgenommen (Fontenot 1993). Daher kann der Effekt bei 188.8 nm nicht mit dem TR3 verglichen werden. Über einen ausgeprägten negativen Effekt bei 198 nm, der charakteristisch für eine Polyprolin I Konformation ist, wird bei dem unglycosylierten MUC1 Peptid berichtet. Der hier aufgefundene Effekt ist in der Lage demgegenüber deutlich verschoben und liegt bei 204.1 nm. Der CD-Effekt liegt in dem für die Polyprolin II Konformation typischen Bereich. Interessant ist die relativ hohe Intensität des Signals mit $-161.15 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$ während Poly-L-Prolin selbst eine Intensität von etwa $-600 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$ erzeugt (Greenfield 1996). Dies spricht für das relativ dominante Vorliegen einer der Polyprolin II Struktur ähnelnden Konformation in der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** in wässriger Lösung.

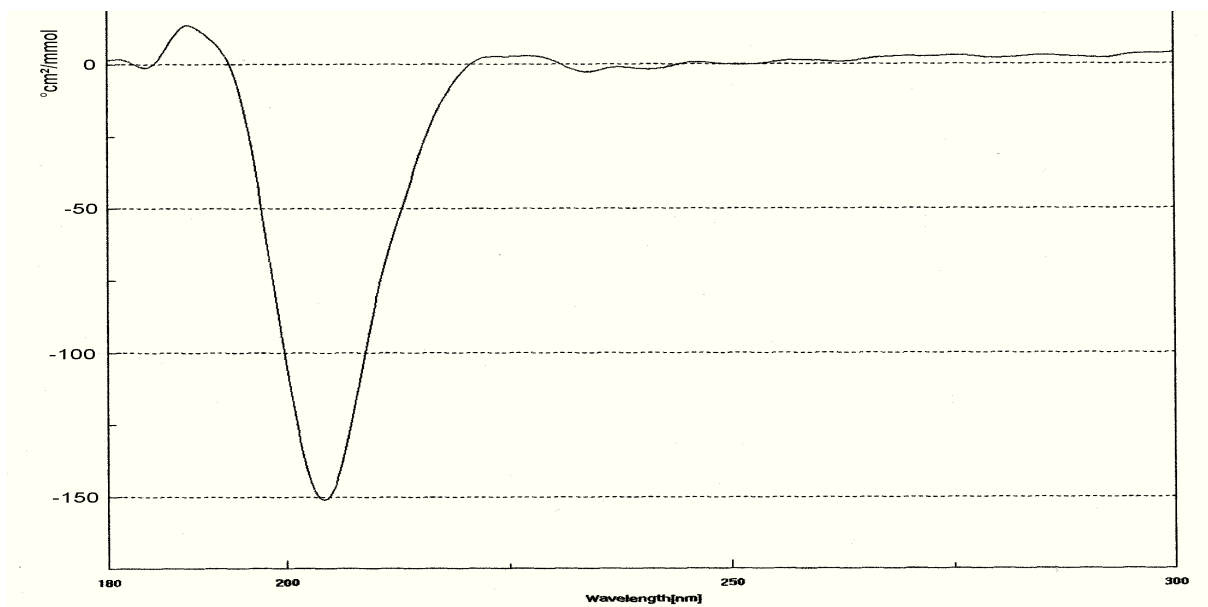


Abbildung 2.3.4: CD-Spektrum der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17**. Das Spektrum zeigt einen starken negativen Effekt bei 204.1 nm, der auf die Ausbildung einer Polyprolin II Struktur hinweist (siehe Text). Die das antigene DTR-Motiv umgebenden Glycosylierungen scheinen also eine Veränderung der Konformation aus einer für Polyprolin I spezifischen Gestalt in eine der Polyprolin II Konformation ähnelnden Struktur zu erwirken. Wie schon im Falle der Glycopeptide aus der Sequenz des Glycophorin diskutiert (siehe Kapitel 2.2.5) soll auch für die MUC1-

Glycopeptide keine quantitative CD Analyse angestellt werden. Hinweise auf das Vorliegen einer Polyprolin II Konformation werden auch NMR-spektroskopisch gefunden.

2.3.1.3 NMR-Charakterisierung der diglycosylierten Repeating Unit 17

Die NMR-Charakterisierung der diglycosylierten MUC1-Repeating Unit **17** hat das Ziel, die Verbindung zweifelsfrei zu identifizieren und Hinweise auf die zeitlich gemittelte Konformation des Moleküls in wäßriger Lösung zu erhalten. Die über MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Verbindung wird zuerst einer Routine NMR Untersuchung unterworfen. Diese Untersuchung beinhaltet die Aufnahme eines ^1H -1D-NMR Spektrums am AMX400 Spektrometer in D_2O (99.8 %) als Lösungsmittel. Das Glycopeptid **17** zeigt ein komplexes Spektrum mit relativ geringer Dispersion der Resonanzen. Die Integration der differenzierten spektralen Bereiche zeigt die erwarteten Werte für die Protonen (Wüthrich 1986). Es zeigt sich, daß die in mäßiger Ausbeute synthetisierte Verbindung in einer hohen Reinheit vorliegt. Die Analyse der aufgenommenen ^1H ^1H -TOCSY und ^1H ^1H -NOESY Spektren erlaubt hier erst in Kombination mit den $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Spektren eine eindeutige Bestimmung der Peptid- und Kohlenhydratresonanzen der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** (siehe Kapitel 2.2.4). Die beobachteten $^2\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen gestatten eine Bestimmung der Konnektivitäten in dem Peptidrückgrat (siehe Abbildung 2.3.5).

Aus dem weiterhin aufgenommenen ^1H ^1H -ECOSY Spektrum lassen sich die Kopplungskonstanten aller vorhandenen Protonen ermitteln. Die Werte für die $^3\text{J}(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ -Kopplungskonstanten der glycosylierten Threonineinheiten Thr-5 und Thr-17 haben einen Wert von 1.9 Hz bzw. 2.2 Hz und sind charakteristisch für die orthogonale Ausrichtung der $\text{H}\alpha$ - $\text{H}\beta$ Protonen, induziert durch die Glycosylierung mit GalNAc. Die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten in den glycosylierten Positionen sind mit 9.0 Hz (Thr-5) und 8.7 Hz (Thr-17) in dem für glycosylierte Threonineinheiten typischen β -Sheet-Bereich (Wüthrich 1986). Die Verhältnisse der $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten in dem antigenen DTR-Motiv sind unauffällig. Die Werte von 7.2 Hz-7.6 Hz-7.2 Hz für die Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc)-Arg weisen nicht auf das Vorliegen einer definierten Struktur im DTR-Motiv in der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** hin. In den übrigen Bereichen der Sequenz finden sich mit Werten von 5.5 Hz für Ala-18 bis 7.6 Hz für Val-4 keine strukturell aufschlußreichen Kopplungskonstanten. Die im weiteren Verlauf der Arbeit folgende qualitative Analyse der NOE-Effekte wird die Bedeutung der Kopplungskonstanten im DTR-Motiv verifizieren.

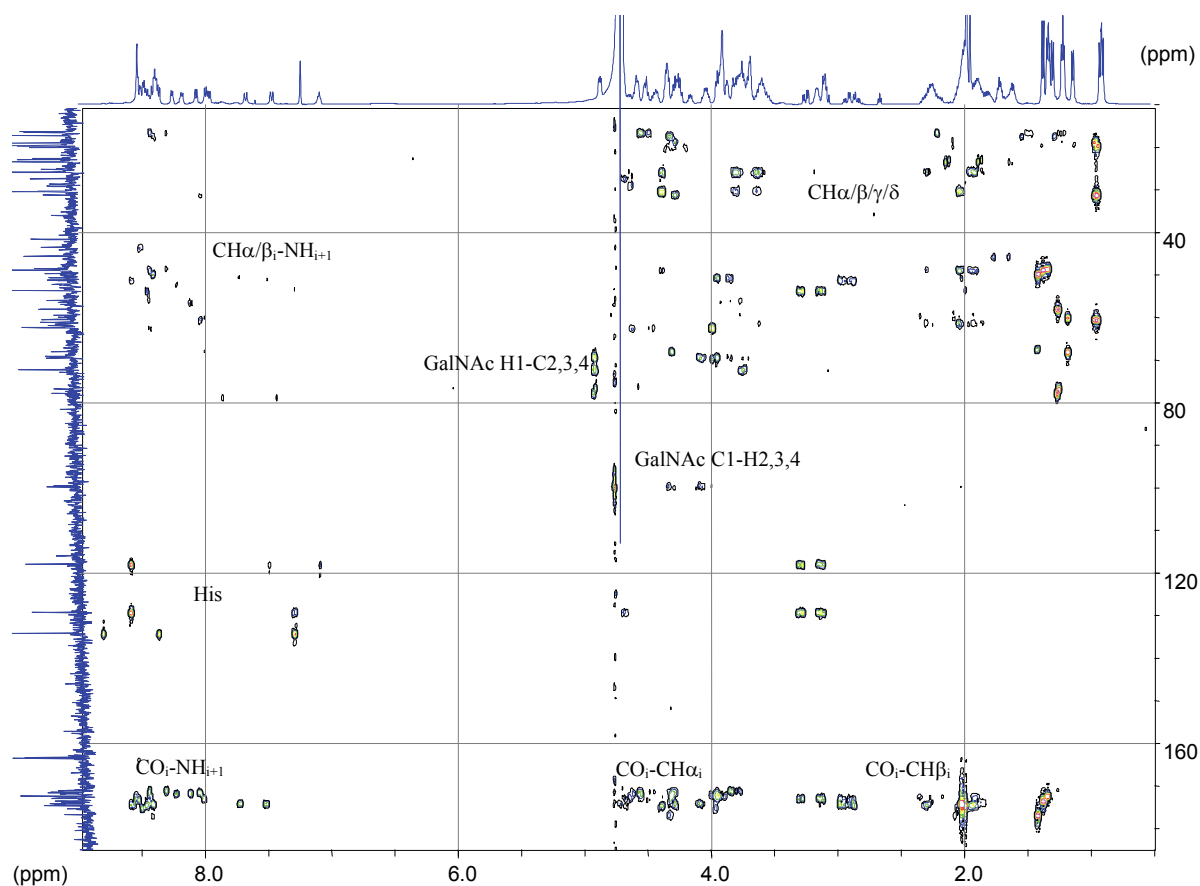


Abbildung 2.3.5: Übersicht über ein $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC Spektrum der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17**. Die Bereiche der Korrelationen sind markiert, insbesondere der Vergleich der Korrelationen $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+1}$ (links unten) mit den $\text{CO}_i\text{-CH}\alpha_i$ (mittig unten) führt zur Determinierung der Konnektivität der Aminosäureeinheiten im Glycopeptid.

Ein Vergleich der Daten mit den Kopplungskonstanten des unglycosylierten TR3 Peptides (Fontenot 1995) zeigt deutliche Unterschiede. Die dort geschilderten Werte sind sehr ungewöhnlich und nicht weiter kommentiert. So wird von Werten für die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten von 13.5 Hz für Arg-11 und Ala-18, sowie von 12.1 Hz bzw. 11.0 Hz für Glycin-5 und Glycin-15 berichtet. Diese unrealistisch hohen Werte für die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten lassen einen systematischen Fehler in der Auswertung der Kopplungskonstanten wahrscheinlich werden. Daher wird auf einen eingehenden Vergleich der Kopplungskonstanten mit Werten aus dem TR3-Peptid, auch in weiteren Teilen dieser Arbeit, verzichtet. Die Aussagekraft der Werte für die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten ist nur im Zusammenhang mit der Analyse der NOE-Effekte zu sehen, die im weiteren Verlauf beschrieben wird.

Die qualitative Analyse der zeitlich gemittelten NOE-Effekte zeigt einen hohen Anteil an β -sheet artigen Strukturanteilen (Wüthrich 1986). Die Charakteristika dieser β -Sheet artigen Struktur sind die starken $\alpha\text{-N}(i,i+1)$ Effekte, die in den Bereichen Val-4 bis Asp-8 und Pro-11 bis Gly-15 zu finden sind, in Kombination mit der Abwesenheit von $\text{N-N}(i,i+1)$ Effekten (Abbildung 2.3.6). Auffällig ist das Fehlen eines $\alpha\text{-N}(i,i+1)$ NOE-Kontaktes zwischen Asp-9 und Thr-10. Der hier aufzufindende mittelstarke $\text{N-N}(i,i+1)$ Effekt in Kombination mit dem

starken α -N ($i,i+1$) NOE-Effekt zwischen Pro-8 und Asp-9 ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines β -Turns (Wüthrich 1986). Dieses Vorliegen einer β -Turnstruktur verwundert in Anbetracht der unauffälligen Kopplungskonstanten, die nicht auf einen strukturell geordneten Bereich hinweisen. Die Werte der Kopplungskonstanten für einen β -Turn liegen bei 4 Hz-5 Hz oder bei 7 Hz-9 Hz für die $^3J(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten der beteiligten zentralen Aminosäureeinheiten (Wüthrich 1986). Die vorliegenden Kopplungskonstanten von 7.2 Hz-7.6 Hz für die Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc) sind aber davon deutlich verschieden.

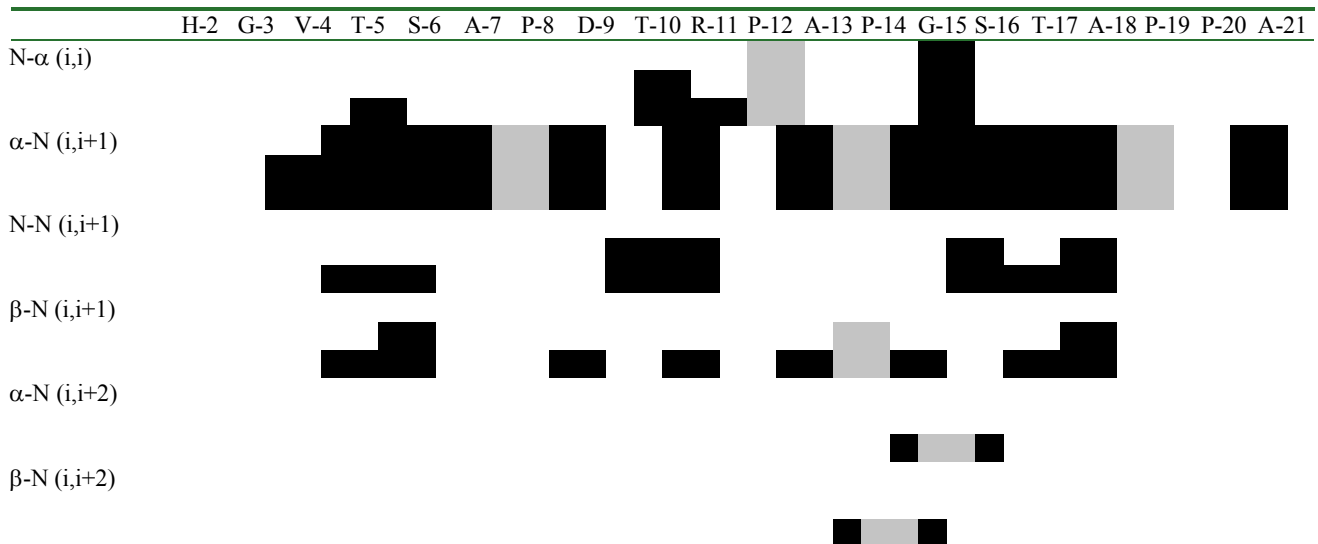


Abbildung 2.3.6: Übersicht über die sequentiellen und nachbarschaftlichen $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOE-Effekte der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17**. Die Sequenz ist oben als Einbuchstabencode zu erkennen. Links sind die verschiedenen relevanten NOE-Effekte aufgetragen. Dargestellt sind die qualitativ nach stark, mittel und schwach differenzierten NOE-Effekte anhand der Höhe des Farbbalkens (Wagner 1986). Für Prolin werden anstelle der NH-Protonen die $\text{CH}\delta$ -Protonen betrachtet.

Einige der weiteren auftretenden NOE-Effekte sind darüber hinaus sehr interessant. So erscheint eine interessante NOE-Signatur im Bereich der Sequenz Ala-13 bis Ala-18. Hier liegen mittelstarke N-N ($i,i+1$) NOE-Effekt zwischen Gly-15 und Ser-16, sowie zwischen Thr-17 und Ala-18 vor. In der Umgebung dieser NOE-Effekte finden sich schwache nachbarschaftliche NOE-Effekte. Hierbei handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen Ala-13 und Gly-15 [β -N ($i,i+2$)], sowie zwischen Pro-14 und Ser-16 [α -N ($i,i+2$)]. Diese Effekte deuten auf eine sehr hohe Ordnung in diesem Molekülteil hin und weisen auf das Vorliegen einer definierten Struktur in der Sequenz APGSTA hin.

Offenbar beeinflusst die Ausbildung einer definierten Struktur in der APGSTA-Sequenz die Konformation des β -Turns im DTR-Motiv. Dies wird deutlich in den gegenüber einer Turnstruktur veränderten Kopplungskonstanten. Der Einfluß scheint jedoch das generelle Vorliegen der Turnstruktur nicht zu verhindern, da die NOE-Signatur in dem DTR-Motiv der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** auf einen β -Turn hinweist.

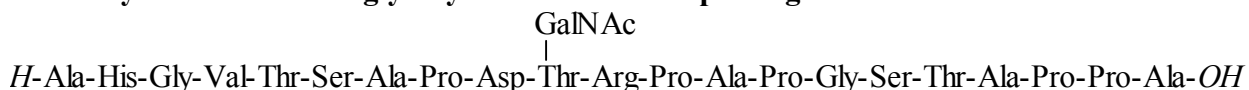
2.3.1.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit 17

Der in Kapitel 2.3.1.2 beschriebene starke negative CD-Effekt kann mit dem Vorliegen einer zweiten Struktureinheit neben dem im DTR-Motiv vorliegenden β -Turn erklärt werden. Die dort beschriebenen Hinweise auf das Vorliegen einer Polyprolin II Konformation können mit der ausgebildeten definierten Struktur an der APGSTA-Sequenz im Zusammenhang stehen. In Kombination mit der benachbarten Struktureinheit im DTR-Motiv erstreckt sich ein strukturell geordneter Bereich über zehn Aminosäureeinheiten, der ein Turnmotiv enthält. Dieser strukturbildende Bereich beinhaltet neben der strukturell einflußreichen Glycosylierungseinheit Thr-17 zwei Prolineinheiten. Somit ist der Wechsel von der für den unglycosylierten Fall des TR3-Peptides bestimmten Polyprolin I Struktur (Fontenot 1993) in eine dem Polyprolin II ähnlichen Struktur in der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit 17 erklärlich.

Die einleitend in diesem Kapitel 2.3 erwähnte Strukturanalyse mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie an den unglycosylierten MUC1 Tandem Repeat Polypeptiden TR1 und TR3 ergaben das Vorliegen einer “knob-like structure“ (Fontenot 1995). Die dort aufgeführten strukturbestimmenden NOE-Kontakte zeigen Unterschiede sowohl im antigenen DTR-Motiv, als auch in der APGSTA-Sequenz. Weder die NOE-Signatur eines β -Turns im DTR-Motiv noch besondere Effekte im Bereich der APGSTA-Sequenz sind dort beschrieben. Das zeigt einen strukturprägenden Unterschied in der Konformation des Peptidgerüsts durch die Glycosylierung am Threonin-17.

Aus den experimentellen Befunden läßt sich für die diglycosylierte MUC1 Repeating Unit 17 das Vorliegen einer wohldefinierten Struktur ableiten, die sich von Asp-8 bis zum Thr-17 erstreckt. Diese Region besteht aus dem antigenen Motiv DTR, das eine β -Turn Struktur ausbildet und der Sequenz APGSTA, die weitere geordnete Elemente enthält. Für eine Quantifizierung der Konformation und insbesondere zur Untersuchung der dynamischen Aspekte der Glycopeptidstruktur in der Verbindung 17 könnte eine NMR-constrained Molekular Dynamik Analyse angestellt werden (siehe Kapitel 2.2.6). Das Ergebnis einer solchen Analyse würde Aufschluß über die Konformation der Glycopeptidstruktur in wäßriger Lösung geben. Ob eine eingehende Analyse der Konformation der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit 17 ratsam ist, läßt sich nur durch einen Vergleich der hier beschriebenen strukturellen Hinweise mit im weiteren Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die verschiedenen glycosylierten MUC1 Repeating Units entscheiden.

2.3.2 Synthese der monoglycosylierten MUC1-Repeating Unit 18



Die Verbindung 18 repräsentiert die Sequenz der Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins, glycosyliert am zentralen antigenen DTR-Motiv (siehe Abbildung 2.3.2). Die Synthese der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit 18 wird größtenteils analog zur Synthese der

diglycosylierten Verbindung **17** durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Die Einführung der Kohlenhydratkomponente geschieht allerdings mit den Glycosylaminosäurebausteinen, die bereits reduziertes GalNAc tragen (siehe Abbildung 2.3.7) (Frische 1996). Diese bessere Methode des Einsatzes reduzierter, GalNAc tragender Aminosäurederivate wird bei der Synthese des Glycopeptides **18** eingesetzt und sollte deutlich weniger Verunreinigungen liefern, als bei der Synthese der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** beobachtet wurden. Dort war eine Reduktion der Azidgruppe am polymeren Träger notwendig. Die Ergebnisse dieser Synthese dienen auch, Erfahrungen für die Synthese der höher glycosylierten Verbindungen zu gewinnen, die nach diesem Verfahren synthetisiert werden.

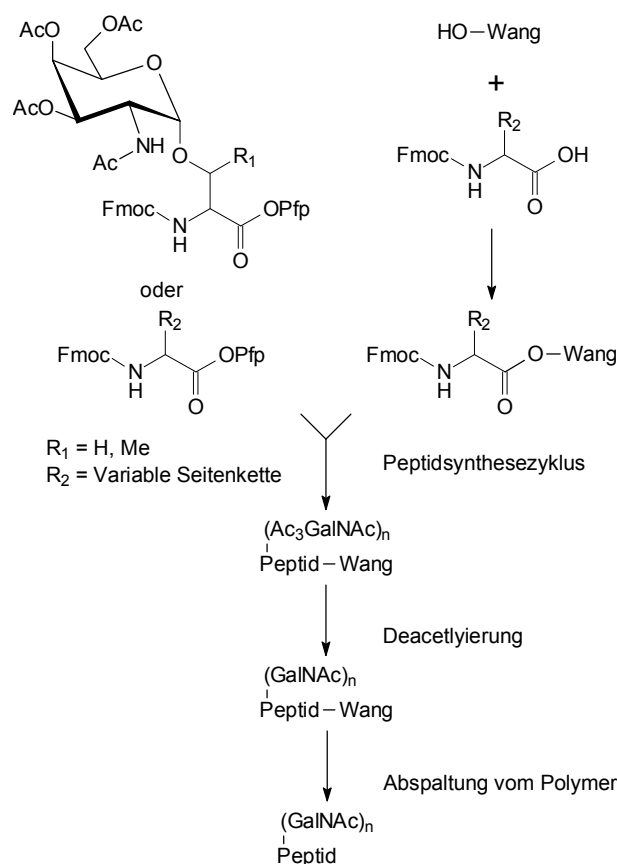


Abbildung 2.3.7: Schema der Festphasenglycopeptidsynthese mit N-Acetylgalactosamidbausteinen. Der aufwendige und nebenproduktreiche Reduktionsschritt am Polymer entfällt durch den Einsatz reduzierter Glycosylaminosäurebausteine.

Der Einsatz der reduzierten, GalNAc tragenden Glycosylaminosäuren in der Festphasensynthese erweist sich wie erwartet unproblematisch. Der Vorteil der Synthese über die reduzierten Glycosylaminosäuren zeigt sich deutlich. Die Glycopeptidsynthese wird ohne einen komplizierten Reduktionsschritt am Polymer, wie in Kapitel 2.2.2 eingehend beschrieben, wesentlich effizienter. Die zeitintensive Reduktionsreaktion mit Thioessigsäure gibt eine Vielzahl von Verunreinigungen, deren Entfernung eine aufwendige Reinigung erfordert. Die Reduktion der glycosylierten azidischen Building-Blocks **8** und **9** mit Zink erfolgt hingegen quantitativ und benötigt keinen zusätzlichen Reinigungsschritt in der Synthese (siehe Kapitel 2.1.4). Diese Verbesserungen in der Synthese durch den Einsatz der

reduzierten glycosylierten Aminosäurederivate **11** und **12** ermöglicht die Planung der Synthese von Glycopeptiden wie **19** und **20**, deren Komplexität den Erfolg einer Synthese über die Thioessigsäurereduktion fragwürdig werden läßt.

Die *O*-Deacetylierung der Galactosamin-Einheit in der Verbindung **18** erfolgt ebenso wie bei den Glycopeptiden **16** und **17** in sechs Stunden mit Hydrazinhydrat am Polymer. Die HPLC-Reinigung des Abspaltungsproduktes vom Harz zeigt wie erwartet deutlich weniger Nebenprodukte als bei der Synthese der diglycosylierten Repeating Unit **17**. Eine Analyse der Nebenprodukte der monoglycosylierte MUC1 Repeating Unit **18** zeigt eine ähnlich verteilte Anzahl kleiner Mengen an Peptidabbruchprodukten wie in der Synthese der Verbindung **17** (siehe Kapitel 2.3.1.1). Auch in dieser Synthese ist kein Hinweis auf Abspaltung von Galactosamin von den Glycopeptidfragmenten zu finden. Durch die Abwesenheit von Thioacetamiddervaten der Glycopeptide ist die chromatographische Reinigung in diesem Falle unkomplizierter und beeinträchtigt die Gesamtausbeute unwesentlich.

Die gereinigte monoglycosylierte MUC1 Repeating Unit **18** wird massenspektrometrisch identifiziert (siehe folgendes Kapitel). Die gute Ausbeute der Synthese mit 43 % (bezogen auf die Belegung Harzes) und die problemlose Durchführung aller Reaktionen und der Reinigung zeigen die Effektivität der gewählten Synthesekombination.

2.3.2.1 Massenspektrometrie an der MUC1-Repeating Unit 18

Ein Blick auf das MALDI-TOF Massenspektrum der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** zeigt neben dem Massensignal $(M+H)^+$ und dem Natrium tragenden Fragment $(M+Na)^+$ ein Fragment bei $M = 1561.31$ (siehe Abbildung 2.3.8). Dieses aus Dihydroxyzimtsäurematrix aufgenommene Spektrum ist zur Beobachtung des Massensignals und nicht zur Fragmentierung optimiert, denn es wurden 50 schwache Laserimpulse akkumuliert. Das Auftreten eines deutlichen Fragmentes mit der Intensität von 12 % relativ zum Hauptsignal deutet hier also auf eine bevorzugte Fragmentierungsstelle hin. Ein Vergleich mit Untersuchungen über die Fragmentierung von Glycopeptidfragmenten aus dem der Milchproduktion assoziierten MUC1 (Goletz 1997) läßt eine Identifizierung der Sequenz des Fragmentes als AHGVTSAPDT(GalNAc)RPAP zu. Dieses Fragment, auch als M-GSTAPPA bezeichnet, weist als Besonderheit eine intakte Glycosylierung bei gleichzeitigem Bruch der Peptidkette auf. Über das Auffinden von glycosylierten Fragmenten in MALDI-TOF Massenspektren wird auch in anderen MALDI-TOF Untersuchungen an Glycopeptiden der MUC1 Sequenz berichtet (Müller 1997). Ein Auftreten glycosylierter Fragmente ist aber stets begleitet durch ein deutlich stärkeres Erscheinen der analogen unglycosylierten Fragmente.

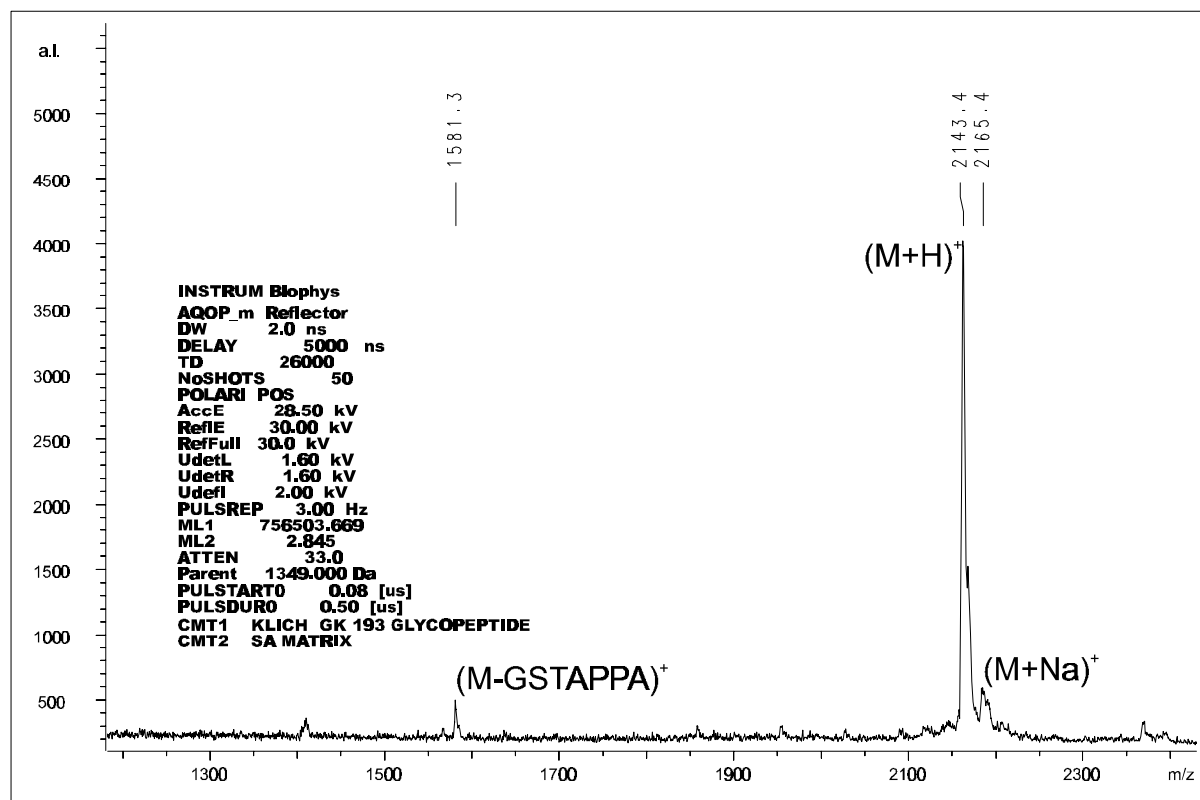


Abbildung 2.3.8: MALDI-TOF Massenspektrum der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18**. Die Fragmentzuordnungen sind an den Signalen vermerkt. Die Aufnahmeparameter sind im Spektrum eingetragen.

Das Fragmentierungsverhalten der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** ist ungewöhnlich und die relativ starke Präsenz der M-GSTAPPA Fragmentierung weist auf eine bevorzugte Bruchstelle in der Sequenz hin. Der Bruch der Peptidkette an der Position -P G-überrascht hierbei nicht. Dieses Motiv, das häufig in den Sequenzen der Kollagene erscheint, wirkt durch die Kombination der starren Prolineinheit mit der kleinen Glycineinheit exponierend auf das Peptidrückgrat. In vielen Fällen wird ein Turn durch das -PG-Motiv induziert (Mayo 1991). Das Auffinden des intakten, glycosylierten AHGVTSAPDT(GalNAc)RPAP-Fragmentes ohne paralleles deutliches Erscheinen des analogen unglycosylierten Fragmentes deutet auf das Vorliegen einer den Saccharidrest stabilisierenden Struktur in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit hin. Nur so ist das Aufbrechen der Peptidkette neben der intakten glycosidischen Bindung zu erklären.

2.3.2.2 Circular Dichroismus des monoglycosylierten Glycopeptides **18**

Das Circular Dichroismus Spektrum der Verbindung **18** zeigt im Wesentlichen einen positiven Effekt bei 188.2 nm, einen starken negativen Effekt bei 205.7 nm und einen schwachen negativen Effekt bei 232.54 nm (siehe Abbildung 2.3.9). Das CD-Spektrum ähnelt stark demjenigen des diglycosylierten MUC1-Repeating Unit **17** (siehe Abbildung 2.3.4). Der hier aufgefundene starke negative Effekt ist in der Wellenlänge um 1.6 nm verschoben und liegt bei 205.7 nm. Der CD-Effekt liegt damit genau in dem für die Polyprolin II Konformation typischen Bereich. Auch hier zeigt sich eine hohe Intensität des Signals (-204.79 °cm²/mmol). Dies spricht für ein dominantes Vorliegen der monoglycosylierten

MUC1 Repeating Unit **18** in einer der Polyprolin II Struktur ähnelnden Konformation in wäßriger Lösung. Die weiteren Unterschiede des hier betrachteten CD-Spektrums sind im Bereich von 223-228 nm zu finden. Hier zeigt sich ein schwach negativer Bereich im Spektrum des Glycopeptides **18** im Gegensatz zu einem schwach positiven Bereich in dem Spektrum des Glycopeptides **17**. Deutliche positive Optische Rotationsdispersion ist in diesem Bereich bei den hochglycosylierten Glycophorinderivaten zu beobachten (siehe Kapitel 2.2.5) und geht möglicherweise mit höherer Glycosylierung einher. Dies läßt sich durch einen Vergleich mit dem CD-Spektrum der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit gleichfalls **19** feststellen (siehe Kapitel 2.3.3).

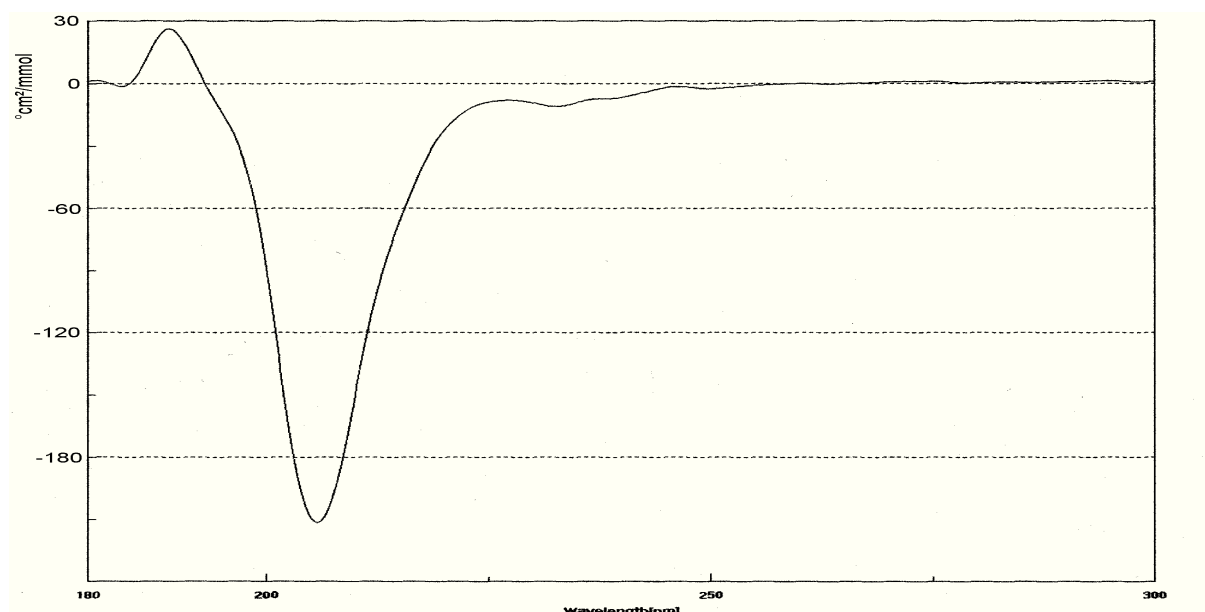


Abbildung 2.3.9: CD-Spektrum der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18**. Das Spektrum zeigt einen starken negativen Effekt bei 205.7 nm, der auf die Ausbildung einer Polyprolin II Struktur hinweist (siehe Text).

Die Glycosylierung am antigenen DTR-Motiv scheint eine Veränderung der Konformation aus einer für Polyprolin I spezifischen Gestalt in eine der Polyprolin II Konformation ähnelnden Struktur zu induzieren. Dieser Effekt der Glycosylierung verdeutlicht den Einfluß des antigenen DTR-Motives auf die Gestalt des Glycopeptides. Die erhaltenen Hinweise auf das Vorliegen einer Polyprolin II Konformation sind deutlich und werden NMR-spektroskopisch verifiziert.

2.3.2.3 NMR-Charakterisierung der monoglycosylierten Repeating Unit **18**

Die NMR-Charakterisierung der monoglycosylierten MUC1-Repeating Unit **18** orientiert sich an den Ergebnissen aus den Untersuchungen des diglycosylierten Glycopeptides **17** (siehe Kapitel 2.3.1.3). Von der über MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Verbindung wird ein 1D-¹H-NMR Spektrum am AMX400 Spektrometer in D₂O (99.8 %) als Lösungsmittel aufgenommen. Das Spektrum des Glycopeptides **18** ist übersichtlich und zeigt eine relativ hohe Dispersion der Resonanzen. Die Integration der differenzierten spektralen Bereiche zeigt die erwarteten Werte für die Protonen (Wüthrich 1986). Es zeigt sich, daß die

in guter Ausbeute synthetisierte Verbindung in einer exzellenten Reinheit vorliegt. Die gute Ausbeute der Synthese ermöglicht eine apparativ wenig aufwendige NMR-Analyse. Die Analyse der daraufhin aufgenommenen ^1H - ^1H -TOCSY und ^1H - ^1H -NOESY Spektren in Kombination mit den ^1H - ^{13}C -HMQC und ^1H - ^{13}C -HMBC Spektren erlaubt eine eindeutige Bestimmung der Peptid- und Kohlenhydratresonanzen der monoglycosylierte MUC1 Repeating Unit **18**. Die beobachteten $^2\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen gestatten eine eindeutige Bestimmung der Konnektivitäten in dem Peptidrückgrat.

Es ergibt sich aus den Routineuntersuchungen allerdings eine hohe Komplexität der Spektren der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** im Bereich der peptidischen $\text{H}\alpha$ - und $\text{H}\beta$ -Protonen, sowie der Kohlenhydratresonanzen. Ein ^1H - ^1H -ECOSY Spektrum wird somit zur Auswertung der Kopplungskonstanten herangezogen, da die Überlagerung der Signale im 1D- ^1H -NMR Spektrum eine Erhebung der Daten erschweren (siehe Abbildung 2.3.10).

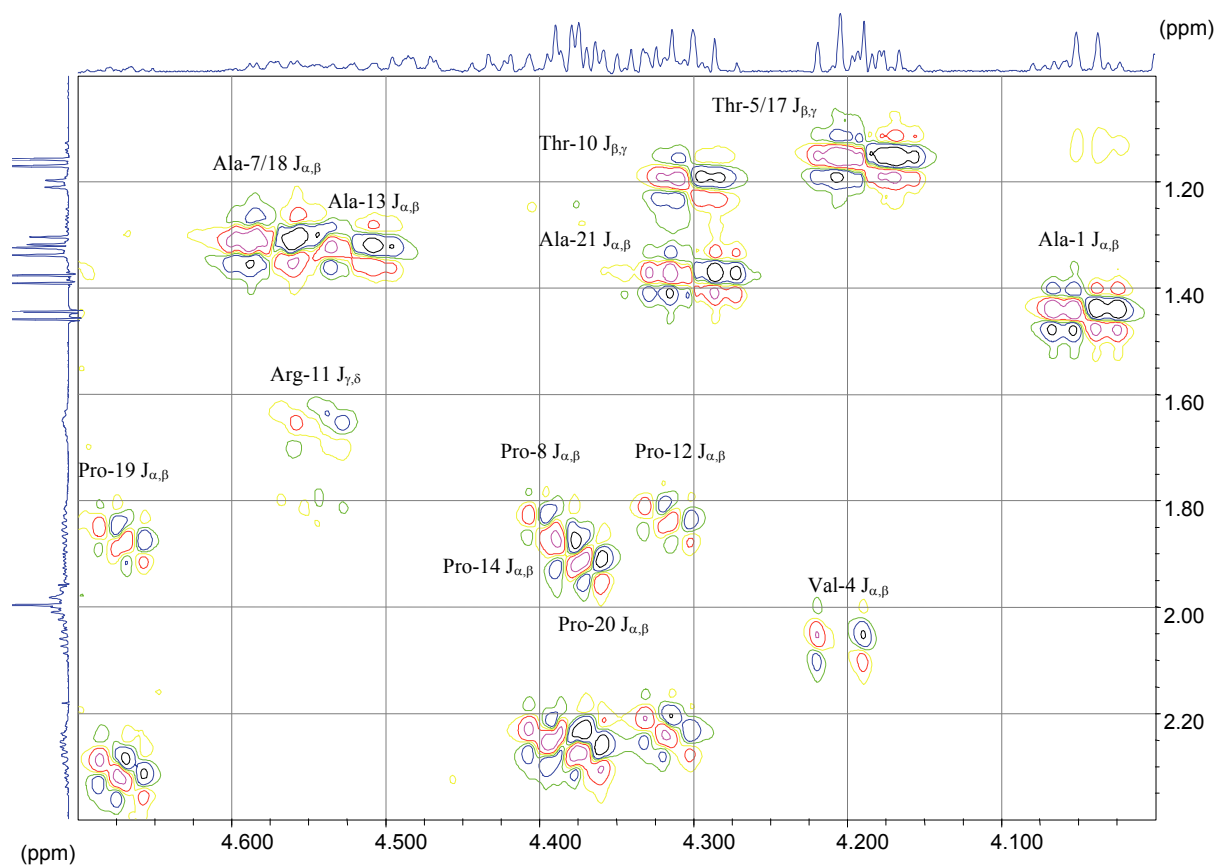


Abbildung 2.3.10: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -ECOSY Spektrum der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** in H_2O . Gezeigt ist der Bereich der Kopplungen der peptidischen $\text{H}\alpha$ - und $\text{H}\beta$ -Protonen. Die Markierung der Signale ist exemplarisch und zeigt die Auflösung der Überlagerungen im Spektrum auf, so daß eine Erhebung der Kopplungskonstanten möglich wird.

Aus dem ^1H - ^1H -ECOSY Spektrum lassen sich die Kopplungskonstanten aller vorhandenen Protonen ermitteln. Die Verhältnisse der Kopplungskonstanten in dem antigenen DTR-Motiv sind unauffällig. Die Werte der $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten von 7.4 Hz-7.3 Hz-5.9 Hz

für die Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc)-Arg weisen nicht auf das Vorliegen einer definierten Struktur im APDTR-Motiv in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** hin. Der Wert für die $^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ -Kopplungskonstante des Thr-10 hat einen Wert von 1.7 Hz und ist charakteristisch für die orthogonale Ausrichtung der Protonen, induziert durch die Glycosylierung mit GalNAc am Threonin. Auffällig sind die $^3J(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten in den Threonineinheiten. Mit einem Wert von 7.3 Hz hat die Kopplungskonstante des Amidprotons zum $\text{CH}\alpha$ -Proton im Thr-10 etwa den gleichen Wert wie im unglycosylierten Thr-10 des Glycopeptides **17**. Ähnliches läßt sich bei Thr-17 beobachten, wo der für glycosylierte Positionen typische Wert von 8.7 Hz in der diglycosylierten Repeating Unit vorliegt, im unglycosylierten Fall der Verbindung **18** allerdings auch ein hoher Wert von 8.2 Hz beobachtet wird. Einzig die $^3J(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstante in dem glycosylierten Thr-5 zeigt in der Verbindung **17** einen über 1 Hz größeren Wert als im unglycosylierten Thr-5 in der Sequenz des Glycopeptides **18**. Diese Beobachtung spricht entweder für eine nur geringfügige Änderung der Konformation durch Glycosylierung an Thr-10 und Thr-17 oder für das Zusammenspiel gegenläufiger Faltungseffekte. In den weiteren Bereichen der Sequenz finden sich mit Werten von 5.3 Hz für Ala-13 bis 7.7 Hz für Val-4 keine strukturell aufschlußreichen Kopplungskonstanten. Die folgende NMR-Analyse der NOE-Effekte wird die Bedeutung der beobachteten Kopplungskonstanten verifizieren.

Die qualitative Analyse der gemittelten NOE-Effekte zeigt für die monoglycosylierte Repeating Unit **18** (siehe Abbildung 2.3.11) eine differenziertere NOE Signatur als im Falle des diglycosylierten Glycopeptides **17** (vergleiche Abbildung 2.3.6). Es liegt auch hier der starke α -N ($i, i+1$) NOE-Effekt zwischen Pro-8 und Asp-9 in Kombination mit einem mittelstarken N-N ($i, i+1$) Effekt zwischen Asp-9 und Thr-10 vor, was auf einen β -Turn hinweist. Das Vorliegen eines schwachen δ -N ($i, i+1$) Effektes zwischen Pro-8 und Asp-9 sowie eines schwachen α -N ($i, i+1$) Effektes zwischen Asp-9 und Thr-10 ist jedoch im Zusammenhang mit einer Turnstruktur nicht beschrieben (Wüthrich 1986). In Anbetracht der Kopplungskonstanten im DTR-Motiv, die nicht auf einen strukturell geordneten Bereich hinweisen, muß hier von einer veränderten Turnstruktur ausgegangen werden.

Einige der weiteren auftretenden NOE-Effekte sind darüber hinaus sehr interessant. So erscheint ein deutlicher $\text{H}\beta$ - $\text{H}\delta$ ($i, i+1$)-NOE-Effekt zwischen Ala-7 und Pro-8. Dieser Effekt in der Imminosäureeinheit Prolin kann ähnlich betrachtet werden wie ein $\text{H}\beta$ -NH ($i, i+1$)-Effekt in einem Fragment einer am Stickstoff protonierten Aminosäure. Zusätzlich liegt ein schwacher $\text{H}\beta$ -NH ($i, i+2$)-Effekt zwischen Ala-7 und Asp-9 vor. Diese Ausdehnung des geordneten Bereiches des antigenen DTR-Motives in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** bis zum Ala-7 deckt sich mit den für das unglycosylierte TR1 Peptid gemachten Beobachtungen (Fontenot 1995). Dort wurde festgestellt, daß sich keine Struktur im Bereich der Sequenz DTR ausbildet, wenn die Sequenz des Peptides zwischen Alanin und Prolin geschnitten ist. Eine β -Sheet artige Struktur mit starken α -N ($i, i+1$) Effekten zeigt sich im anschließenden N-terminalen Bereich von Val-4 bis Ala-7.

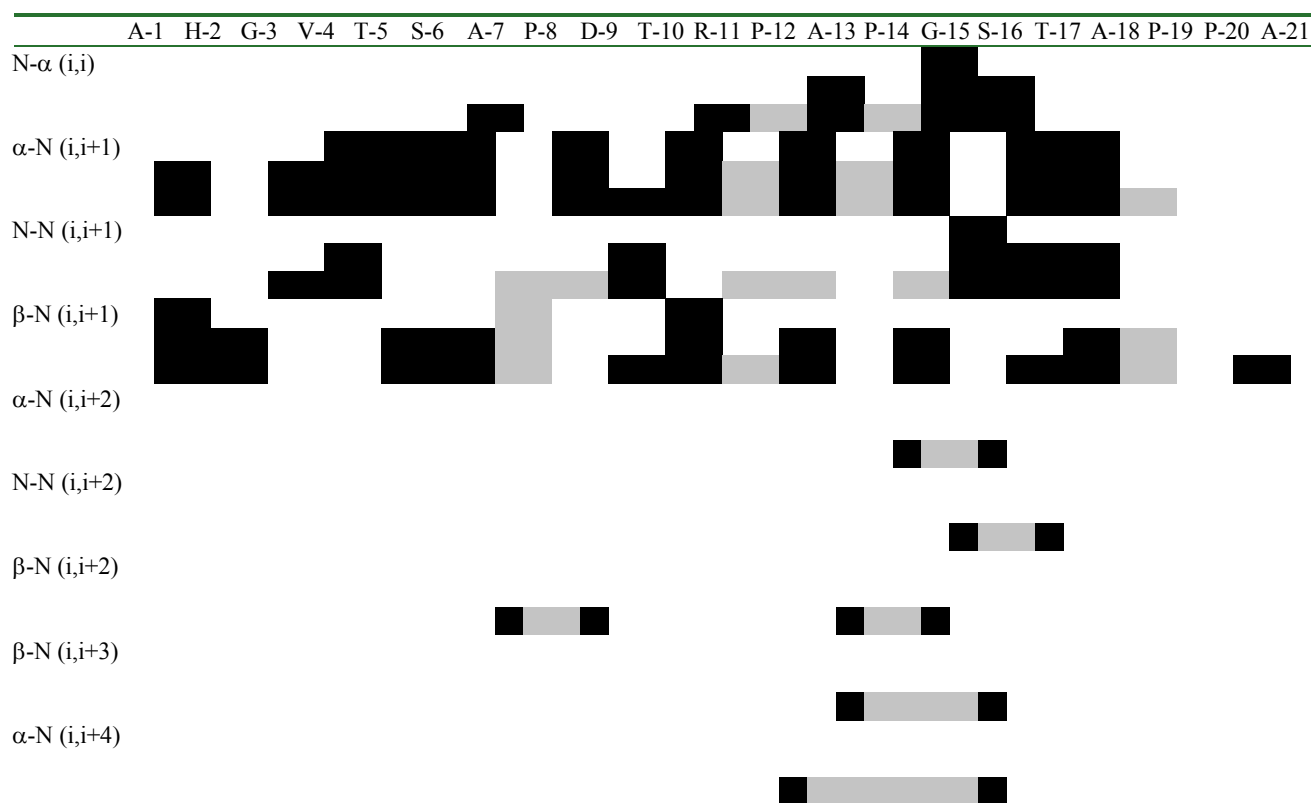


Abbildung 2.3.11: Übersicht über die sequentiellen und nachbarschaftlichen ^1H -NOE-Effekte der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18**. Die Sequenz ist oben als Einbuchstabencode zu erkennen. Links sind die verschiedenen relevanten NOE-Effekte aufgetragen. Dargestellt sind die qualitativ nach stark, mittel und schwach differenzierten NOE-Effekte anhand der Höhe des Farbbalkens. Für Prolin werden anstelle der NH-Protonen die CH_δ -Protonen betrachtet. Deutlich ist in der Sequenz PAPGS eine Vielzahl von Wechselwirkungen einschließlich der NOE-Signatur des β -Halfturns zu sehen (siehe Text).

Eine sehr komplexe NOE-Signatur findet sich im Bereich der Sequenz Pro-12 bis Thr-17. Hier liegt ein starker α -N (i,i+1) NOE-Effekt zwischen Pro-14 und Gly-15 in Kombination mit einem starken N-N (i,i+1) Effekt zwischen Gly-15 und Ser-16 vor. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines β -Halfturns (Wüthrich 1986). In der Umgebung dieser NOE-Effekte finden sich eine Vielzahl schwacher nachbarschaftlicher NOE-Effekte. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Wechselwirkungen zwischen Pro-14 und Ser-16 [α -N (i,i+2)], Pro-12 und Ser-16 [α -N (i,i+4)], sowie zwischen Gly-16 und Thr-17 [N-N (i,i+2)]. Auch NOE-Kontakte zu Seitenkettenprotonen sind vorhanden mit β -N (i,i+2) zwischen Ala-13 und Gly-15, sowie β -N (i,i+3) zwischen Ala-13 und Ser-16. Diese Effekte deuten auf eine sehr hohe Ordnung in diesem Molekülteil hin und erhärten den Hinweis auf das Vorliegen einer definierten Struktur wie der eines Halfturns in der Sequenz PAPGST.

Offenbar beeinflusst die Ausbildung der Halfturn-Struktur in der PAPGST-Sequenz die Konformation der Turnstruktur im APDTR-Motiv. Dies wird deutlich in den gegenüber einer Turnstruktur veränderten Kopplungskonstanten. Der Einfluß scheint jedoch das generelle Vorliegen der turnartigen Struktur nicht zu verhindern, da die NOE-Signatur in dem APDTR-Motiv der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** auf einen β -Turn hinweist.

2.3.2.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit 18

Betrachtet man das ungewöhnliche Fragmentierungsverhalten des Glycopeptides **18** in den MALDI-TOF massenspektrometrischen Untersuchungen aus Kapitel 2.3.2.1, kann von einer Bevorzugung einer Konformation in der Sequenz PAPGST ausgegangen werden, welche das Peptidrückgrat an der -PG- Bindung exponiert und destabilisiert. Diese Bindung kann dann unter Energiezufuhr (Laser in der MALDI) leichter gespalten werden, als die im Molekül befindliche glycosidische Bindung. Dies wäre für die relativ starke Präsenz des M-GSTAPPA-Fragmentions im Massenspektrum eine Erklärung.

Der in Kapitel 2.3.2.2 beschriebene starke negative CD-Effekt entspricht dem Vorliegen einer zweiten Struktureinheit neben dem APDTR-Motiv. Die dort beschriebenen Hinweise auf das Vorliegen einer Polyprolin II Konformation können mit der ausgebildeten Halfturn-Struktur an der PAPGST-Sequenz im Zusammenhang stehen. In Kombination mit der direkt benachbarten Struktureinheit im APDTR-Motiv erstreckt sich ein strukturell geordneter Bereich über elf Aminosäureeinheiten, der ein Turn- und ein Halfturn-Motiv enthält. Dieser strukturbildende Bereich beinhaltet neben der strukturell einflußreichen Glycosylierungseinheit drei Prolineinheiten. Somit wäre der Wechsel von der für den unglycosylierten Fall des TR3-Peptides bestimmten Polyprolin I Struktur (Fontenot 1993) in eine dem Polyprolin II ähnlichen Struktur in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** verständlich.

Im Vergleich zu der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** ist festzustellen, daß in dem Glycopeptid **18** eine ähnliche gemittelte Konformation vorliegen muß. Das CD-Spektrum, viele der Kopplungskonstanten und Teile der NOE-Signatur der beiden Verbindungen weisen deutliche Parallelen auf. Eine detaillierte Betrachtung der Ergebnisse der Charakterisierungen beider Glycopeptide zeigt jedoch deutliche Unterschiede. Das ungewöhnliche Fragmentierungsverhalten in der MALDI-TOF Massenspektrometrie der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** ist bei der Verbindung **17** nicht aufzufinden. Die Glycosylierung am Thr-17 scheint zwar wenig Auswirkung auf die Kopplungskonstanten in dieser Position zu haben, die im Glycopeptid **18** leicht zu spaltende Peptidbindung Pro-14 - Gly-15 wird aber offensichtlich durch die nachbarschaftliche Glycosylierung am Thr-17 stabilisiert. Auch der in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** beobachtete Halfturn in der PAPGST-Sequenz ist in dem dort glycosylierten Glycopeptid **17** derart verändert, daß eine vom Halfturn deutlich abweichende gemittelte Konformation vorliegt. Diese Ergebnisse werden im Folgenden bestätigt durch die Betrachtung der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**, in der sowohl Thr-10, als auch Thr-5 und Thr-17 glycosyliert sind.

Aus den experimentellen Befunden läßt sich für die monoglycosylierte MUC1 Repeating Unit **18** das Vorliegen einer wohldefinierten Struktur ableiten, die sich vom Ala-6 bis zum Thr-17 erstreckt. Diese Region besteht aus dem antigenen Motiv APDTR, das eine β -turnartige Struktur ausbildet und der Sequenz PAPGST, welche einen Halfturn bildet. Diese der Gestalt der Polyprolin II Struktur ähnelnde Konformation des Glycopeptides sollte zum einen die glycosidische Bindung zwischen GalNAc und Thr-10 stabilisieren und die Peptidbindung zwischen Pro-14 und Gly-15 destabilisieren.

2.3.3 Synthese der pentaglycosylierten Repeating Unit 19 aus der MUC1-Sequenz



Die Festphasenglycopeptidsynthese der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** wird analog zur Synthese der monoglycosylierten Repeating Unit **18** durchgeführt. Als polymerer Träger wird das Wang-Harz B1250 (Bachem) verwendet. Dieses Polymer ist eine Weiterentwicklung des in den vorher beschriebenen Synthesen verwendeten Wang-Harz

B1000 mit einer Steigerung der Belegungsrate von $450 \mu\text{mol/g}$ auf $950 \mu\text{mol/g}$. Laut Herstellerangaben haben diese Polymere außer der veränderten Belegungsrate die gleichen Eigenschaften. Die Eigenfärbung des Harzes B1250 ist äußerst gering und damit empfiehlt sich dieses Polymer für die Synthese der komplexen Verbindung **19**. Die beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten ähneln den bei dem Glycopeptid **18** angestellten Beobachtungen. Ein beschleunigender Effekt der Peptidkupplungsreaktionen wie in der Synthese der vicinal hochglycosylierten Glycophorinderivate wird nicht beobachtet. Die Verteilung der Glycosylierungspositionen über das ganze Glycopeptid erzeugt offensichtlich nicht den positiven konformativen Effekt auf die Festphasensynthese, wie ihn die Glycosylierungscluster in der Synthese der Glycopeptide **15** und **16** induzierten. Die *O*-Deacetylierung der fünf Galactosamineinheiten in der Verbindung **19** erfolgt auch in diesem Fall, wie in den vorangehenden Synthesen beschrieben, in sechs Stunden mit Hydrazinhydrat am polymeren Träger.

Trotz der Abwesenheit von Thioacetamidderivaten der Glycopeptidfragmente ist die chromatographische Reinigung des Glycopeptides **19** aufwendig. Die HPLC-Reinigung des Rohproduktes nach der Abspaltung vom Harz zeigt einige Nebenprodukte, deren Analyse wie bei den teilglycosylierten Repeating Units **17** und **18** eine Anzahl kleiner Mengen an Peptidabbruchprodukten ergibt. Die Abtrennung der höher glycosylierten Nebenprodukte bei der chromatographischen Reinigung ist schwieriger, als die analoge Abtrennung der Nebenprodukte in den Reinigungen bei den vorangehenden Synthesen. Die deutlich höhere Hydrophilie der hochglycosylierten Glycopeptide scheint dieses zu bewirken. Ähnliche Schwierigkeiten bei der chromatographischen Reinigung treten auch bei stark hydrophoben Peptiden auf (Schulz-Riechel, mündliche Mitteilung). Am günstigsten verhalten sich semipolare Peptide in der Chromatographie, wie dies in der Synthese der monoglycosylierten Verbindung **18** beobachtet wurde. Auch in der Synthese der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** ist kein Hinweis auf Abspaltung von Galactosamin von den Glycopeptidfragmenten zu finden.

Die gereinigte pentaglycosylierte MUC1 Repeating Unit **19** wird massenspektrometrisch identifiziert (siehe Abbildung 2.3.12). Als Hauptfragment tritt neben dem Massensignal $(M+H)^+$ ein Fragment bei $M = 2699.0$ auf, welches das für *O*-Glycopeptide zu erwartende einfach deglycosylierte Fragmentation $(M+H-\text{GalNAc})^+$ repräsentiert. Die hohe Signalintensität dieses Fragmentes mit 30 % des Massenpeaks läßt sich durch die Summe von fünf möglichen Fragmentierungswegen erklären. Ob diese einfache Erklärung zutrifft, oder eine bevorzugte Struktur dieses Signal erzeugt, läßt sich nur durch eingehende massenspektrometrische Untersuchungen klären. Derartige Untersuchungen über das Fragmentierungsverhalten der in dieser Arbeit synthetisierten Glycopeptide aus der MUC1-Sequenz sind in Arbeit (Hanisch, mündliche Mitteilung), können jedoch in dieser Diskussion nicht mehr berücksichtigt werden.

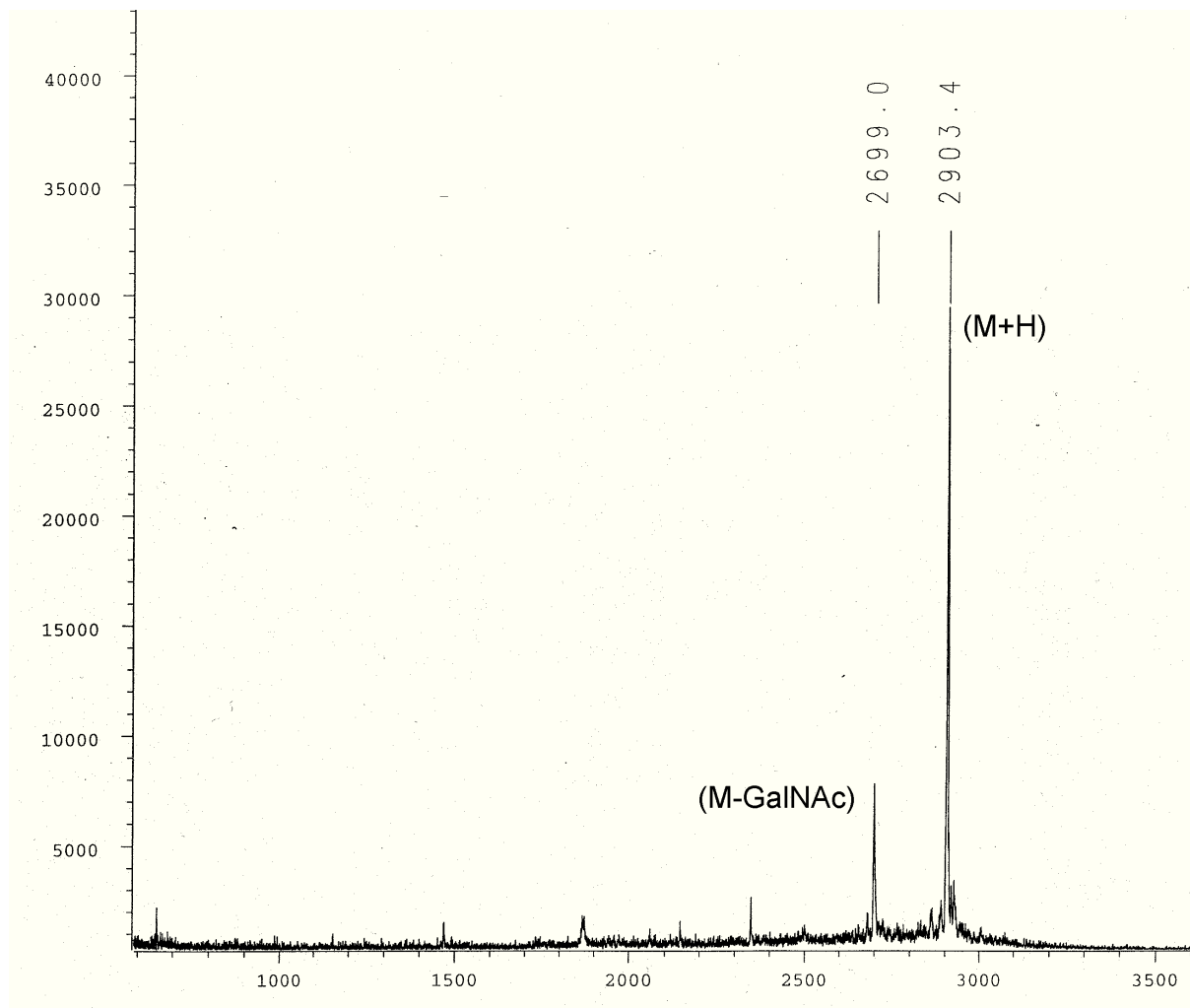


Abbildung 2.3.12: MALDI-TOF Massenspektrum der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. Die Zuordnung der Hauptfragmente ist an den Signalen vermerkt.

Ebenso wie bei der massenspektrometrischen Untersuchung des an Thr-17 glycosylierten Glycopeptides **17** tritt bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** nicht das bei der monoglycosylierten Verbindung **18** aufgefundene Fragmentation (M-GSTAPPA) auf. Diese Beobachtung verdeutlicht die Abhängigkeit der Spaltung des Peptidrückgrates von der Glycosylierung.

Die relativ befriedigende Ausbeute der Synthese mit 19 % (bezogen auf die Belegung Harzes) ist im Wesentlichen auf das Entstehen von Abbruchprodukten und die daraus resultierende aufwendige Durchführung der Reinigung zurückzuführen.

2.3.3.2 Circular Dichroismus des monoglycosylierten Glycopeptides **19**

Das Circular Dichroismus Spektrum der Verbindung **19** zeigt im Wesentlichen einen positiven Effekt bei 187.7 nm, einen starken negativen Effekt bei 200.8 nm mit einer Schulter bei 209.0 nm und einen schwachen positiven Effekt bei 225.8 nm (siehe Abbildung 2.3.13). Auffällig ist die Breite der beobachteten Bande bei 200.8 nm und die angegliederte Schulter. Die Lagen der beobachteten starken CD-Effekte in den Spektren der teilglycosylierten Glycopeptiden **17** und **18** können von dieser Bande vollständig abgedeckt werden, wenn auch

die Intensität um etwa 50 % reduziert ist. Auch der starke beschriebene Effekt im Spektrum des unglycosylierten TR3-Peptides (Fontenot 1993) läßt sich in diese sehr breite Bande einpassen. Sogar die Effekte des nonaglycosylierten Glycophorinfragmentes **16** werden vollständig überlagert, was überrascht, da die dort vorliegenden Glycosylierungscluster hier nur durch zwei Paare von vicinalen Glycosylierungen repräsentiert werden.

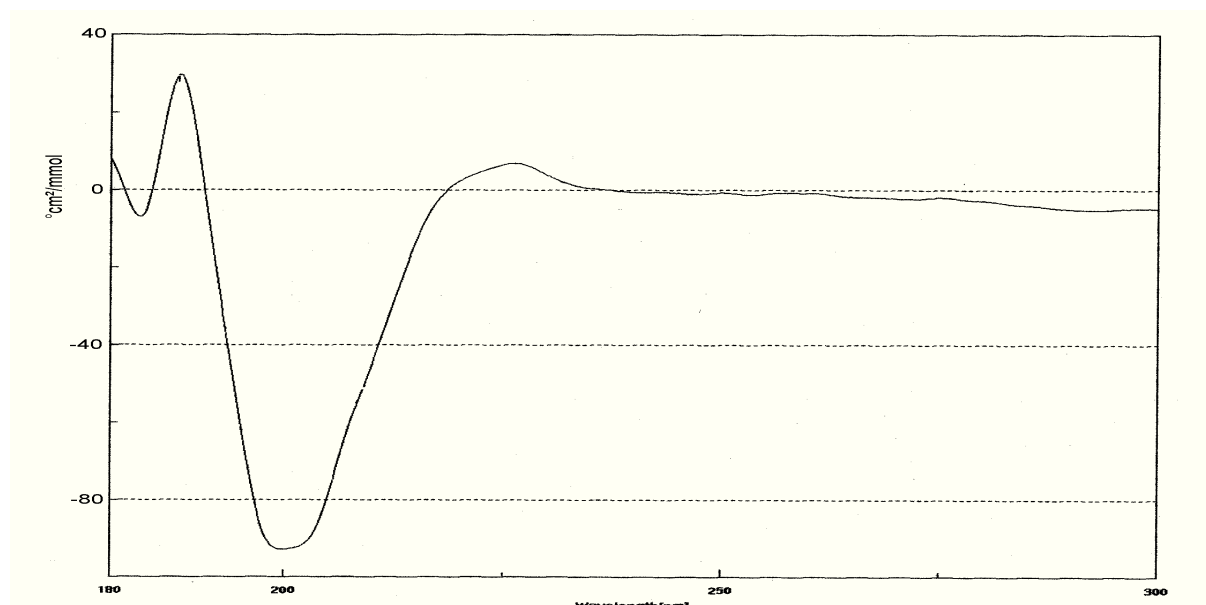


Abbildung 2.3.13: CD-Spektrum der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. Das Spektrum zeigt eine sehr breite Bande bei 200,8 nm mit einer Schulter bei 209,0 nm. Diese offensichtliche Überlagerung verschiedener CD-Effekte ist deutlich verschieden von den Effekten, die in den Spektren der teilglycosylierten Glycopeptide **17** und **18** zu beobachten sind (siehe Text).

Die Beobachtungen sprechen für das Vorliegen mehrerer überlagerter CD-Effekte in dem Bereich von etwa 195-210 nm. Diese Effekte sind in der Intensität geringer als die beobachteten Banden in den MUC1-Verbindungen **17** und **18**, was für eine schwächere Ausprägung der Einzeleffekte spricht. Eine Differenzierung der Effekte erfordert eine aufwendige CD-Untersuchung, auf die hier zugunsten der folgenden NMR-spektroskopischen Betrachtung verzichtet wird. Das vorliegende CD-Spektrum deutet auf jeden Fall auf interessante strukturelle Effekte in der perglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** hin und könnte als Anlaß für eine eingehende Konformationsanalyse angesehen werden.

2.3.3.3 NMR-Charakterisierung der pentaglycosylierten Repeating Unit **19**

Die NMR-Charakterisierung der pentaglycosylierten MUC1-Repeating Unit **19** orientiert sich an den Ergebnissen aus den Untersuchungen der teilglycosylierten Glycopeptide **17** und **18** (siehe Kapitel 2.3.1.3 und 2.3.2.3). Mit dem über MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierten Glycopeptid wird eine ¹H-1D-NMR Untersuchung in D₂O (99,8 %) als Lösungsmittel durchgeführt. Das Spektrum der Verbindung **19** ist sehr komplex und zeigt eine relativ geringe Dispersion der Resonanzen. Die Integration der differenzierten spektralen Bereiche zeigt allerdings die erwarteten Werte für die Protonen (Wüthrich 1986). Es zeigt

sich, daß die Verbindung in einer sehr hohen Reinheit vorliegt. Die Analyse der aufgenommenen $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren erlaubt in Kombination mit den $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Spektren eine eindeutige Bestimmung der Peptid- und Kohlenhydratresonanzen der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. Die beobachteten $^2\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen gestatten eine eindeutige Bestimmung der Konnektivitäten in dem Peptidrückgrat.

Aus dem aufgenommenen $^1\text{H}^1\text{H}$ -ECOSY Spektrum lassen sich die Kopplungskonstanten der meisten Protonen ermitteln. Die Verhältnisse der Kopplungskonstanten in dem antigenen APDTR-Motiv sind mit Werten der $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten von 6.7 Hz-9.2 Hz-7.6 Hz für die Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc)-Arg sehr interessant. Im Gegensatz zu den beobachteten Werten für die teilglycosylierten Glycopeptide **17** und **18** weisen diese Kopplungskonstanten auf das Vorliegen einer β -Turn Struktur im APDTR-Motiv in der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** hin (Wüthrich 1986). Der Werte für die $^3\text{J}(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ -Kopplungskonstanten der glycosylierten Threonineinheiten Thr-5/10/17 haben jeweils einen Wert von 1.8 Hz und sind charakteristisch für die orthogonale Ausrichtung der Protonen, induziert durch die Glycosylierung mit GalNAc am Threonin. Auch die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten in den Threonineinheiten sind sämtlich mit Werten um 9 Hz charakteristisch für glycosylierte Threoninpositionen.

Für Serin lassen sich keine analogen charakteristischen Aussagen über Kopplungskonstanten machen (vergleiche Kapitel 2.2.4). Bei den $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten der jeweils zum glycosylierten Serin benachbarten Aminosäureeinheiten Ala-7 und Gly-15 sind allerdings Veränderungen festzustellen. Im Ala-7 findet sich mit 5.2 Hz ein mehr als 1 Hz niedrigerer Wert als in den teilglycosylierten Verbindungen **17** und **18**. An der Position Gly-15 läßt sich in der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** eine Dispersion der Gly- $\text{H}\alpha$ -Protonen beobachten. Während in den teilglycosylierten Repeating Unit Glycopeptiden Entartung der geminalen Glycinprotonen zu jeweils einem Doublettsignal mit $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Werten um 6 Hz beobachtet wird, liegt hier ein Doppeldoublet(dd)-System mit $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Werten von 4.3 Hz und 5.2 Hz, sowie einer geminalen $^2\text{J}(\text{H}\alpha, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstante von 16.9 Hz vor. Diese beobachtete magnetische Dispersion deutet auf eine durch die Glycosylierung induzierte Konformationsänderung hin. Die beschriebenen Beobachtungen sprechen für die Ausbildung definierter Strukturen in der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. Die im folgenden beschriebene qualitative NMR-Analyse der NOE-Effekte wird die Bedeutung der beobachteten Kopplungskonstanten verifizieren.

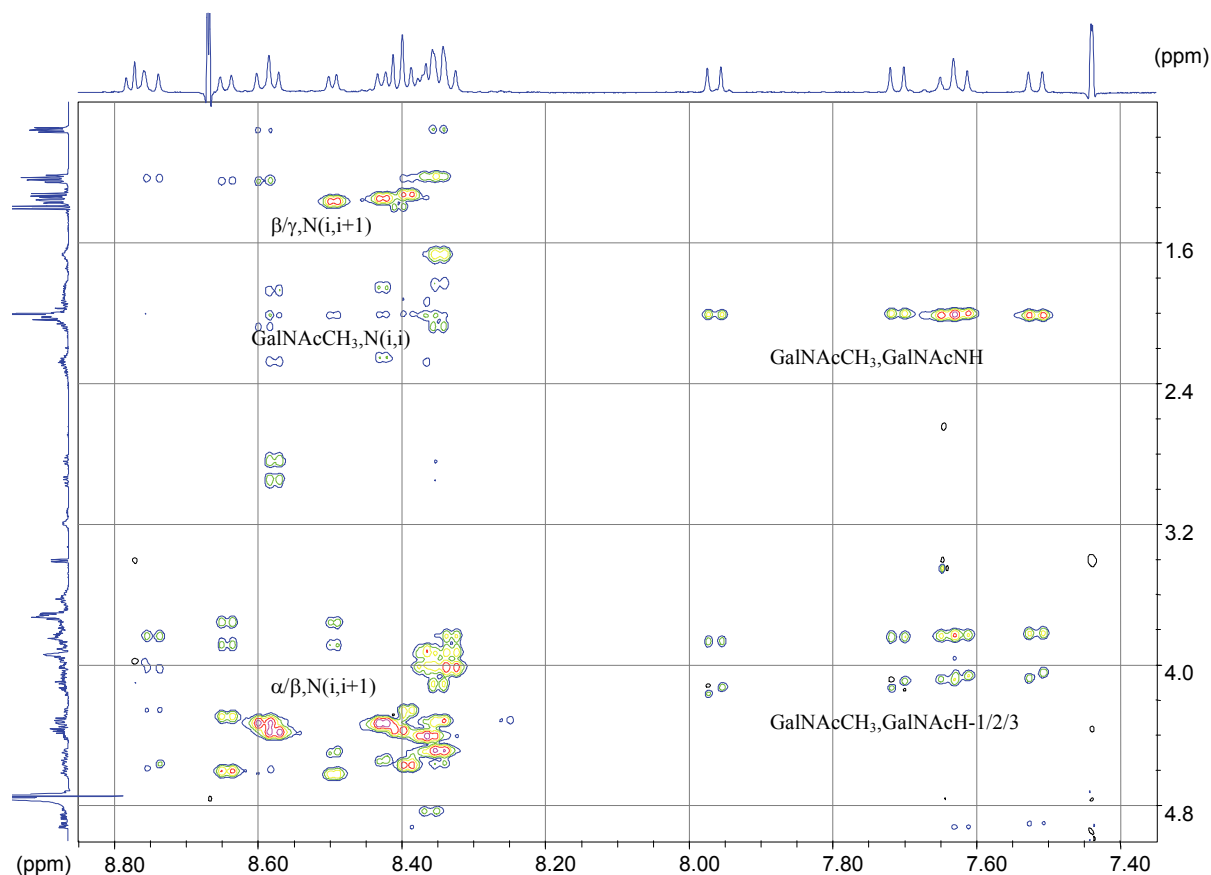


Abbildung 2.3.14: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -NOESY Spektrum der pentaglycosylierten Repeating Unit **19**. Gezeigt sind die strukturell Interessanten NOE-Kontakte der Seitenkettenprotonen zu den peptidischen Amidprotonen benachbarter Aminosäurepositionen $\alpha/\beta/\gamma,\text{N}(i,i+1)$ (links). Weiterhin sind NOE-Effekte der GalNAc-Reste zu sehen. Die gewählte Schnittdarstellung repräsentiert qualitativ etwa die zeitlich gemittelte NOE-Signatur (positive Effekte: schwarz = schwach, negative Effekte: blau = schwach, grün/gelb = mittel, rot/magenta = stark).

Die qualitative Analyse der gemittelten NOE-Effekte zeigt für die pentaglycosylierte Repeating Unit **19** (siehe Abbildung 2.3.15) eine NOE Signatur, die sich von den für die teilglycosylierten Glycopeptides **17** und **18** beobachteten Signaturen unterscheidet (vergleiche Abbildungen 2.3.6 und 2.3.11). Es liegt auch hier der starke $\alpha\text{-N}(i,i+1)$ NOE-Effekt zwischen Pro-8 und Asp-9 in Kombination mit einem mittelstarken N-N ($i,i+1$) Effekt zwischen Asp-9 und Thr-10 vor, jedoch ist auch ein starker $\alpha\text{-N}(i,i+1)$ NOE-Effekt zwischen Asp-9 und Thr-10 zu beobachten. Dieser Effekt läßt auf eine auf neun Aminosäureeinheiten ausgedehnte β -Sheet artige Region von Gly-3 bis Arg-11 mit ausgeprägten $\alpha\text{-N}(i,i+1)$ NOE-Effekten schließen. Die zusätzlich beobachteten N-N ($i,i+1$) Effekte zwischen Val-3 und Thr-4, Ser-6 und Ala-7 sowie zwischen Asp-9 und Thr-10 weisen auf eine differenzierte Struktur in diesem Glycopeptidteil hin. Obwohl die Kopplungskonstanten im APDTR-Motiv der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** auf eine dem β -Turn ähnelnde Gestalt hinweisen, deutet die qualitative NOE-Signatur auf eine davon verschiedene interessante Struktur hin.



Abbildung 2.3.15: Übersicht über die sequentiellen und nachbarschaftlichen ^1H -NOE-Effekte der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. Die Sequenz ist oben als Einbuchstabencode zu erkennen. Links sind die verschiedenen relevanten NOE-Effekte aufgetragen. Dargestellt sind die qualitativ nach stark, mittel und schwach differenzierten NOE-Effekte anhand der Höhe des Farbbalkens. Für Prolin werden anstelle der NH-Protonen die CH_δ -Protonen betrachtet.

Im Bereich der Sequenz Arg-11 bis Thr-17 liegt bei dem Glycopeptid **19** eine weniger komplexe NOE-Signatur vor, als bei der monoglycosylierten Verbindung **18**. Von der Position Arg-11 bis zum Gly-15 ähnelt das Bild der NOE-Signatur der diglycosylierten Repeating Unit **17**. Dies beinhaltet auch den nachbarschaftlichen β -N (i,i+2) Effekt zwischen Ala-13 und Gly-15. Das Fehlen eines α -N (i,i+1) NOE-Effektes zwischen Ser-16 und Thr-17 bei der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** ist jedoch ungewöhnlich, da vicinal glycosylierte Aminosäureeinheiten meist einen starken α -N (i,i+1) NOE-Effekt zeigen (Schuster, eingereicht). Die beobachteten NOE-Effekte deuten auf eine hohe Ordnung in der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** hin weisen im Vergleich zu den nur teilweise glycosylierten Verbindungen auf eine spezifische Gestalt des Glycopeptides hin.

2.3.3.4 Diskussion der Charakterisierung der MUC1-Repeating Unit **19**

Die in Kapitel 2.3.3.2 beobachteten, stark überlagerten negativen CD-Effekte weisen auf das Vorliegen komplexer Zustände bezüglich der Konformation der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** hin. Ein Vergleich zu den weiteren, in dieser Arbeit synthetisierten Glycopeptiden aus der MUC1 Repeating Unit läßt vermuten, daß in dem Glycopeptid **19** eine strukturelle Ordnung in der APDTR-Turn-Region vorliegt. Hiervon hervorgerufene CD-Effekte überlagerten sich mit einem von den vicinalen Glycosylierungen hervorgerufenen Effekt wie er bei den hochglycosylierten Glycophorin A^N Sequenzen beobachtet werden kann. Die im APDTR-Motiv der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** gefundenen Kopplungskonstanten haben ein für einen β -Turn spezifisches Muster. Die beobachteten gemittelten NOE-Kontakte sprechen für die Ausbildung definierter Konformationen, die jedoch von der β -Turn Struktur abweichen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die beobachtete Dispersion der Glycin H_α -Protonen, die auf eine eingeschränkte Flexibilität des Peptidrückgrates an dieser Position hinweist. Insgesamt betrachtet liegt in der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** eine wohldefinierte Struktur vor, die sich vom

Gly-3 bis zum Ala-18 erstreckt. Diese Region beinhaltet fünf Glycosylierungsstellen sowie das antigene Motiv APDTR. Die mittels qualitativer Methoden gefundenen Hinweise auf interessante konformative Effekte lassen eine eingehendere Untersuchung der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** sinnvoll erscheinen.

Für eine detaillierte Untersuchung der Glycopeptidstruktur der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit wird auf ein parallel zu dieser Arbeit synthetisiertes Glycopeptid zurückgegriffen (Karsten 1998). Diese Verbindung trägt eine jeweils um eine Einheit verlängerte Kohlenhydratstruktur an den gleichen Positionen wie das Glycopeptid **19**. Es handelt sich bei diesen Disaccharidresten um das TF-Antigen Gal β (1-3)-GalNAc (siehe Abbildung 2.3.1) Bei der Untersuchung handelt es sich um eine NMR-constrained Molekular Dynamik Analyse (Dojahn 1998). Ausschnitte dieser Arbeit sind im folgenden Kapitel vorgestellt.

2.3.3.5 Konformationsanalyse einer pentaglycosylierten MUC1-Repeating Unit

Ein Glycopeptid aus der Sequenz der MUC1 Repeating Unit wurde synthetisiert, welches pentaglycosyliert ist mit dem TF-Antigen Gal β (1-3)-GalNAc analog zu dem Glycopeptid **19** (Karsten 1998). Zur Synthese und Charakterisierung dieses Glycopeptides wurde auf die Erfahrungen aus der hier beschriebenen Synthese und insbesondere den NMR-Untersuchungen der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** zurückgegriffen. Zur Ermittlung der Konformation des pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit Glycopeptides wurden eingehende Untersuchungen angestellt (Dojahn 1998).

Das synthetische mit dem TF-Antigen pentaglycosylierte 21-mer-Peptid aus der extrazellulären Domäne des humanen Mucins MUC1 wurde NMR-spektroskopisch vollständig analysiert. Hierauf basierend wurden constrained Metropolis Monte Carlo Simulationen durchgeführt. Weitere unconstrained Metropolis Monte Carlo Simulationen und Moleküldynamiksimulationen ergänzen die Beobachtungen. Das Untersuchte komplexe Glycopeptid zeigt eine relativ unbewegliche, gestreckte Konformation. Die *O*-Glycosylierung der Serin- und Threonineinheiten mit Gal β (1-3)-GalNAc bewirkt einen Verlust an Flexibilität im Peptidrückgrat. Hierbei ist der hauptsächliche Einfluß der Kohlenhydratseitenketten auf das direkt an das Peptidrückgrat gebundene N-Acetylgalactosamin zurückzuführen. Die gestreckte Gestalt des Peptidrückgrates wird unterbrochen von Strukturelementen der Polyprolinhelix. Das APDTR-Motiv in der Region um das Threonin-10 zeigt deutlich die Gestalt eines Turns. Das Auffinden des Turns bestätigt die Hinweise aus den Untersuchungen der mit GalNAc substituierten Glycopeptide. Das Turnmotiv spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Präsentation des Asp-Thr-Arg-Motives gegenüber Antikörpern.

Die Verbindung **20** repräsentiert die zweimal aufeinanderfolgende Sequenz der Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins, perglycosyliert am zentralen antigenen APDTR-Motiv sowie an den umgebenden Hydroxyaminosäureeinheiten (siehe Abbildung 2.3.2). Die decaglycosylierte dimere Repeating Unit **20** stellt somit ein MUC1 Glycopeptid dar, welches als Dimeres der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** aufzufassen ist. Die Synthese und Charakterisierung dieses Glycopeptides soll klären, ob sich in einer dimeren Repeating Unit strukturelle Effekte auffinden lassen, die über die Summe der in der monomeren Einheit gefundenen Effekte hinausgeht.

2.3.4.1 Darstellung Reinigung und Identifizierung der Verbindung 20

Die Synthese des 41 Aminosäureeinheiten beinhaltenden Dimeren **20** ist im Prinzip eine Weiterführung der Synthese des Glycopeptides **19** (siehe Kapitel 2.3.2). Im zweiten Abschnitt der Synthese wird eine Verlängerung der Glycopeptidkette mit der identischen Sequenz durchgeführt. Die hierbei gemachten Beobachtungen ähneln denen aus der Synthese der ersten Wiederholungseinheit. Es zeigt sich, daß mit länger werdender Peptidkette die Reaktionszeiten generell leicht zunehmen. Die Beobachtung der Dhbt-OH-Farbreaktion wird mit zunehmender Dauer der Synthese und Länge der synthetisierten Glycopeptidkette immer schwieriger. Das anfangs annähernd farblose Wang-Polymer verfärbt sich nach etwa zwanzig Aminosäurekupplungen zunehmend sichtbar gelbbraun. Diese Farbe unterscheidet sich zwar vom intensiven Gelb des Dhbt-O⁻-Aminkomplexes der Indikatorfarbreaktion, aber eine Beurteilung des Fortschrittes der Kupplungsreaktionen wird jedoch bei stärkerer Eigenfärbung des Harzes immer schwieriger. Nach etwa vierzig Peptidkupplungen ist die Dhbt-OH-Farbreaktion nicht mehr zu Verfolgen.

Die *O*-Deacetylierung der zehn Galactosamin-Einheiten in der dimeren Verbindung **20** erfolgt auch in diesem Fall, wie in den vorangehenden Synthesen beschrieben, in sechs Stunden mit Hydrazinhydrat am polymeren Träger. Dieses Ergebnis zeigt die Einsetzbarkeit der *O*-Deacetylierungsreaktion auch an hochglycosylierten *O*-Glycopeptiden mit Hydrazinhydrat an der Festphase. Die chromatographische Reinigung des dimeren Glycopeptides **20** ist aufwendig. Die HPLC-Reinigung des Rohproduktes nach der Abspaltung vom Harz zeigt eine Vielzahl von Nebenprodukten, deren Analyse wie bei der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** eine Anzahl jeweils kleiner Mengen an Peptidabbruchprodukten ergibt. Die Abtrennung der größeren Anzahl von Nebenprodukten in der chromatographischen Reinigung ist jedoch aufwendiger. Nach mehrfacher HPLC-Reinigung bei verschiedenen Elutionsgradienten ist die Reinigung dennoch erfolgreich. Auch in der Synthese der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** ist kein Hinweis auf Abspaltung von Galactosamin von den Glycopeptidfragmenten zu finden.

Die gereinigte decaglycosylierte dimere MUC1 Repeating Unit **20** wird massenspektrometrisch identifiziert (siehe Abbildung 2.3.17). Als Hauptfragment tritt neben dem gesuchten Massensignal $(M+H)^+$ ein Fragment bei $M = 2922.3$ auf, welches das für MALDI-TOF Massenspektrometrie ungewöhnliche Molekularion $(M+2H)^{2+}$ darstellt. Die hohe Signalintensität dieses Fragmentes mit 40 % des Massenpeaks läßt auf eine deutliche Präsenz dieses doppelt geladenen Moleküls schließen. Dieses Verhalten spricht für eine Stabilisierung der Ladung innerhalb des 41-mer Glycopeptides und einer insgesamt gegenüber einer Ionisierung stabilen Struktur des dimeren Glycopeptides **20**. Interessanter Weise ist bei analogen Bedingungen in der MALDI-TOF Massenspektrometrie hier nicht die starke Präsenz der deglycosylierten Fragmente wie in dem Spektrum der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** zu beobachten. Diese Beobachtung spricht für eine Stabilisierung der Bindungen der Glycosidreste an das Peptidrückgrat bei der größeren Peptidstruktur des Dimeren **20**.

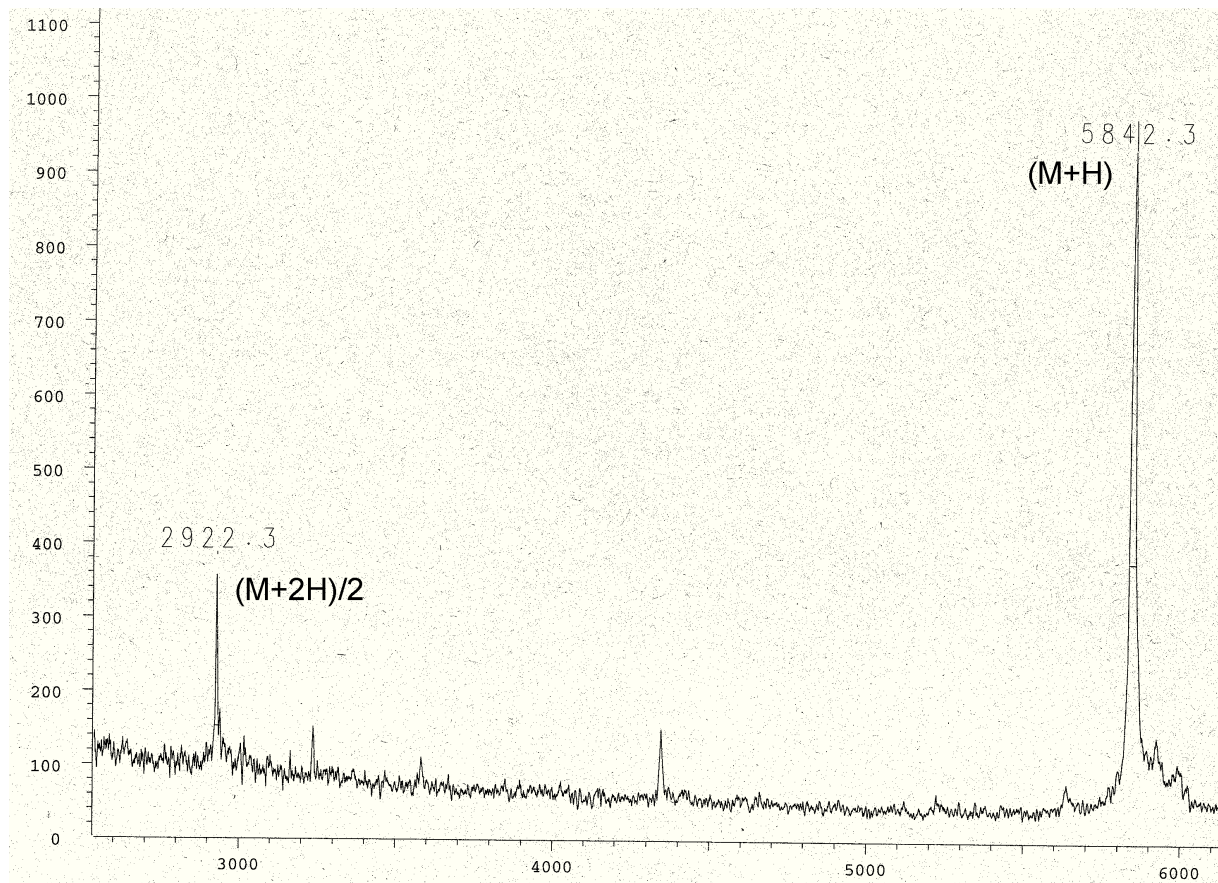


Abbildung 2.3.17: : MALDI-TOF Massenspektrum der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20**. Die Zuordnung der Hauptfragmente ist an den Signalen vermerkt.

Die beobachtete Ausbeute bei der Synthese der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** mit 4 % (bezogen auf die Belegung Harzes) ist das Ergebnis der linearen Weiterführung der Glycopeptidsynthese der pentaglycosylierten Repeating Unit **19**. Offensichtlich sind die Ausbeuten der einzelnen Peptidkupplungen maßgebend für die Gesamtausbeute, da sich aus der Ausbeute von 19 % bei der Synthese der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** der hier beobachtete Wert von 4 % über $(0.19)^2 \sim 0.04$ errechnen läßt. Die Ausbeute der Synthese der monomeren MUC1 Repeating Unit läßt sich somit in der Synthese der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** reproduzieren. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Ausbeute der einzelnen Peptidkupplungsreaktionen bei längeren Glycopeptidstrukturen. Eine erneute Weiterführung der Glycopeptidsynthese basierend auf dem dimeren Glycopeptid **20** ist mit der gewählten Synthesform nicht durchführbar. Aus der Gleichung $(0.19)^3 = 0.007$ ergibt sich eine zu erwartende Ausbeute von unter 1 % für die Synthese eines trimeren perglycosylierten MUC1 Repeating Unit Glycopeptides. Die Beobachtungen aus der Synthese des Dimeren sprechen somit nicht für eine vielversprechende Möglichkeit der Synthese eines pentadecaglycosylierten trimeren MUC1 Repeating Unit Glycopeptides über die Festphasenglycopeptidsynthese.

Die hier gemachten Beobachtungen zur Synthese ausgedehnterer Glycopeptidstrukturen werden der Synthese oligomerer teilglycosylierter Repeating Unit Glycopeptiden aus der MUC1-Sequenz zu Grunde gelegt (N. Öztürk, mündliche Mitteilung). Es läßt sich zeigen, daß

eine vertretbare Synthese eines Pentameres einer Repeating Unit eine Ausbeute von über 40 % bei der Synthese des Monomeren voraussetzt. Die Synthese der monoglycosylierten Repeating Unit **18** wurde mit 42 % Ausbeute durchgeführt. Nach der Gleichung $(0.42)^5 = 0.013$ ist somit eine Ausbeute von mehr als einem Prozent zu erwarten. Bei einer Ansatzgröße von 1 mmol ist somit eine zur Charakterisierung und zum Einsatz im Immunoassay ausreichende Menge von 13 μ mol des Glycoproteins zu erwarten.

2.3.4.2 Circular Dichroismus des decaglycosylierten dimeren Glycopeptides 20

Das Circular Dichroismus Spektrum der Verbindung **20** zeigt im Wesentlichen einen positiven Effekt bei 185.4 nm, einen starken negativen Effekt bei 200.2 nm mit Schultern bei 194.4 nm und bei 209.0 nm sowie einen schwachen positiven Effekt bei 223.8 nm (siehe Abbildung 2.3.18). Auffällig ist die Breite der beobachteten Bande bei 200.8 nm und die angegliederten Schultern. Diese beobachteten Effekte unterscheiden sich bei näherer Analyse von den in dem pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** beobachteten CD-Effekten. Die dort beobachteten Effekte sind durch die in Kapitel 2.3.3.5 beschriebene Konformationsanalyse einer pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit verifiziert. Durch den Vergleich kann angenommen werden, daß das gefundene Turn Motiv im CD-Spektrum durch die Hauptbande bei etwa 200 nm repräsentiert ist.

Der stärkste negative CD-Effekt (200.2 nm) tritt im Spektrum der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** an etwa der gleichen Position auf, wie bei dem Glycopeptid **19** (200.8 nm). Bei ähnlicher Gestalt der Bande in beiden Spektrum zeigt die Intensität des CD-Effektes von 218.23 $^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$ für die decaglycosylierte dimere MUC1 Repeating Unit **20** einen etwa 2.2-fach höheren Wert, als in der monomeren Verbindung. Das doppelte Vorliegen aller Sequenzabschnitte würde rechnerisch aber nur den zweifachen molaren CD-Effekt erwarten lassen. Dies bedeutet eine Verstärkung des CD-Effektes um etwa 10 % gegenüber der Summe der Einzeleffekte. Die beobachtete Schulter bei 209 nm zeigt mit der identischen Lage in beiden Spektren und einer Intensität von 111.58 $^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$ für das Dimere **20** einen um 4 % erhöhten doppelten Wert des Monomeren **19** (54.69 $^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$). Diese Verstärkung der Optischen Rotationsdispersion weist auf eine Stabilisierung der ausgebildeten Turnstruktur im APDTR-Motiv durch die Bildung des Dimeren hin.

Die Schulter im CD-Spektrum der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** bei 194.4 nm zeigt eine weitere Veränderung in der Struktur der Repeating Unit bei Bildung einer dimeren Einheit an. Dieser Effekt ist im Spektrum des monomeren nicht zu beobachten. Das Auftreten dieses negativen CD-Effektes geht einher mit einer Verschiebung und deutlichen Abschwächung des beobachteten positiven Effektes von 187.8 nm (31.45 $^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$) auf 185.4 nm (28.49 $^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$). Hier liegt ein Hinweis vor, daß sich bei der Verlängerung der Glycopeptidsequenz im dimeren Glycopeptid die Effekte verschiedener Struktureinheiten kompensieren. Diese Erklärung liegt nahe, da bei der kovalenten Bildung einer dimeren Einheit immer eine neue Region der Verknüpfung vorliegt, während die statistische Bedeutung der randständigen Regionen abnimmt.

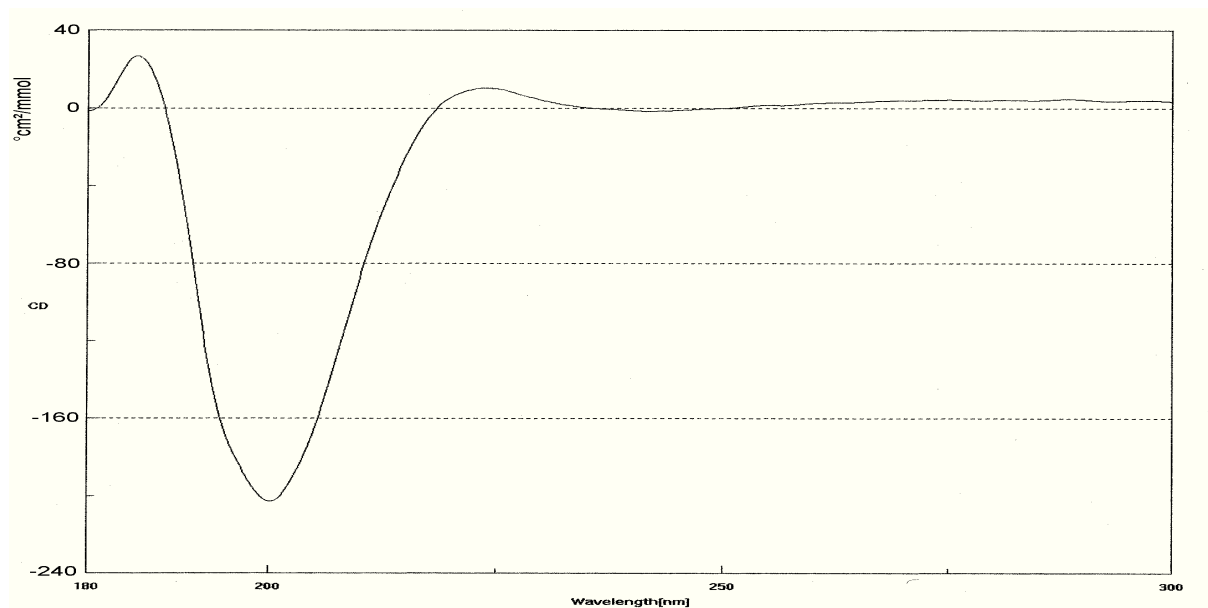


Abbildung 2.3.18: CD-Spektrum der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20**. Das Spektrum zeigt eine sehr breite Bande bei 200.2 nm mit Schultern bei 194.4 nm und 209.0 nm. Das Spektrum ist in einer Skalierung dargestellt, die den direkten Vergleich zur monomeren pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** erlaubt (siehe Text).

Die aufgeführten Beobachtungen sprechen für eine Stabilisierung der Peptidstruktur in der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** durch die Verlängerung der Sequenz gegenüber dem Monomeren. Die bei der Bildung des Dimeren neu auftretende Verknüpfungseinheit und die relative Verringerung der Bedeutung der Randbereiche gewinnen im CD-Spektrum an Bedeutung. Das vorliegende CD-Spektrum deutet auf interessante strukturelle Effekte in der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** hin. Diese Effekte werden im Folgenden NMR-spektroskopisch untersucht.

2.3.4.3 NMR-Charakterisierung der decaglycosylierten dimeren Repeating Unit **20**

Die NMR-Charakterisierung der decaglycosylierten dimeren MUC1-Repeating Unit **20** orientiert sich an den Ergebnissen aus der Untersuchung der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** (siehe Kapitel 2.3.3.3). Mit dem durch MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisierten Glycopeptid wird eine ^1H -1D-NMR Untersuchung in D_2O (99.8 %) als Lösungsmittel durchgeführt. Das Spektrum der dimeren Verbindung **20** ist sehr komplex und zeigt eine relativ geringe Dispersion der Resonanzen. Die Integration der differenzierten spektralen Bereiche zeigt die erwarteten Werte für die Protonen (Wüthrich 1986). Es zeigt sich, daß das synthetisierte Glycopeptid in einer hohen Reinheit vorliegt. Aufgrund der hohen Komplexität der Spektren werden ^1H - ^1H -TOCSY und ^1H - ^1H -NOESY mit erhöhter Auflösung von 8k Datenpunkten aufgenommen. Wegen der geringen Menge des synthetisierten Glycopeptides ist die Aufnahme der Spektren sehr zeitintensiv. Die Analyse der aufgenommenen ^1H - ^1H -TOCSY und ^1H - ^1H -NOESY Spektren des Dimeren basiert auf einer vergleichenden Untersuchung mit den Ergebnissen aus der Charakterisierung des analogen monomeren Glycopeptides **19**. Auf eine Aufnahme von ^1H - ^{13}C -HMQC und ^1H - ^{13}C -HMBC Spektren der decaglycosylierten dimeren MUC1-Repeating Unit **20** wird wegen der hohen

notwendigen Aufnahmezeit verzichtet. Die zu erwartende starke Überlagerung der Kohlenstoffresonanzen würde eine differenzierte Auswertung dieser Spektren wahrscheinlich unmöglich machen. Aus dem ^1H - ^1H -ECOSY Spektrum werden trotz der starken Überlagerungen die meisten Kopplungskonstanten bestimmt.

Die Kopplungskonstanten der Amidprotonen des Peptidrückgrates und der GalNAc-Einheiten der decaglycosylierten dimeren MUC1-Repeating Unit **20** können aus den 1D- ^1H -Spektren ermittelt werden. Ebenso werden so die Werte für die Kopplungskonstanten der anomeren GalNAc-H-1 Protonen und einiger Seitenkettenprotonen erhalten. Die Verhältnisse der Kopplungskonstanten in den beiden vorliegenden antigenen DTR-Motiv Regionen sind interessanterweise nicht identisch mit denen in der monomeren Verbindung **19**. Mit Werten der $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten von 5.5 Hz-7.3/8.4 Hz-6.6 Hz für die Kopplungen in den Fragmenten Asp-Thr(GalNAc)-Arg liegt ein Unterschied zwischen den beiden Threoninpositionen innerhalb eines Glycopeptides vor. Die Kopplungskonstante von 8.4 Hz für Thr-10 liegt im Bereich der beobachteten 9.2 Hz im DTR-Motiv der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19**. In der zweiten Repeating Unit liegt jedoch ein Wert von etwa 7.3 Hz wie in den teilglycosylierten Glycopeptiden **17** und **18** vor. Des weiteren sind die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten im Asp-9 in beiden Repeating Units des dimeren Glycopeptides **20** mit 5.5 Hz deutlich niedriger, als die beobachteten 6.7 Hz im Monomeren. Diese Unterschiede weisen auf die Veränderung in der Konformation der Turnstruktur der perglycosylierten MUC1-Repeating Unit in der dimeren Struktur hin.

Der beobachteten Werte für die $^3\text{J}(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ -Kopplungskonstanten der glycosylierten Threonineinheiten haben jeweils einen Wert von 1.8-2.2 Hz und sind charakteristisch für die orthogonale Ausrichtung der Protonen, induziert durch die Glycosylierung mit GalNAc am Threonin. Auch die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten in den Threonineinheiten sind mit Ausnahme der oben diskutierten DTR-Position mit Werten von 8.1-9.3 Hz charakteristisch für glycosylierte Threoninpositionen. Die beschriebenen Beobachtungen sprechen für die Ausbildung von Strukturen in der decaglycosylierten dimeren MUC1-Repeating Unit **20**, die teilweise von den in der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** vorliegenden Zuständen abweichen. Die folgende Betrachtung der NOE-Effekte wird die Beobachtungen der Kopplungskonstanten ergänzen.

Eine qualitative Analyse der gemittelten NOE-Effekte kann für die decaglycosylierte Repeating Unit **20** nicht mit der angewandten 2D-NMR Technik durchgeführt werden. Das ^1H - ^1H -NOESY Spektrum zeigt eine starke Überlappung der zweimal auftretenden Korrelationssignale in den meisten Positionen aus der Repeating Unit. Viele Signale analoger Aminosäureeinheiten decken sich exakt, was eine Differenzierung der einzelnen Effekte unmöglich macht. Die meisten beobachteten Gesamteffekte gleichen den bei der monomeren Verbindung **19** gefundenen NOE Kontakten (vergleiche Abbildungen 2.3.14 und 2.3.19). Unterschiede sind in den NOE-Effekten im Bereich um das Gly-23 zu finden. Die hier beobachteten α -N (i,i+1) NOE-Effekte zwischen Ala-21 und His-22 sowie zwischen Gly-23 und Val-24 sind im C-terminalen Bereich und in dem Monomeren nicht aufzufinden. Die

beobachteten NOE-Effekte deuten auf eine Ordnung in der decaglycosylierten dimeren Repeating Unit **20** hin, die teilweise von der Konformation der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** abweicht.

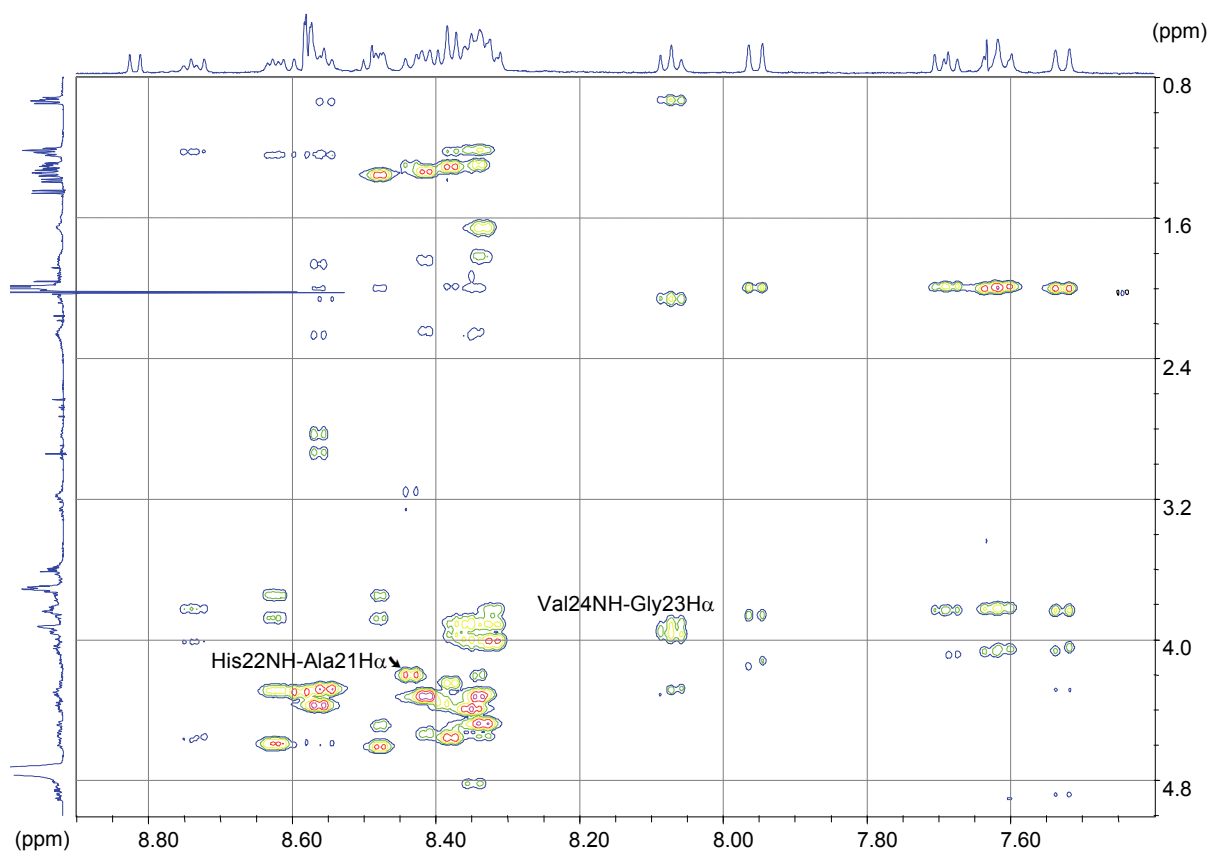


Abbildung 2.3.19: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -NOESY Spektrum der decaglycosylierten dimeren Repeating Unit **20**. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Spektrum zum Vergleich mit der Abbildung 2.3.14 aus dem pentaglycosylierten Monomeren **19**. Die Schnittliniendarstellung ist für diesen Vergleich entsprechend gewählt.

2.3.4.4 Diskussion der Charakterisierung der dimeren MUC1-Repeating Unit **20**

Die in Kapitel 2.3.4.2 beobachteten, stark überlagerten negativen CD-Effekte weisen auf das Vorliegen einer gemittelten Konformation in der decaglycosylierten dimeren Repeating Unit **20** hin welche von der Gestalt der pentaglycosylierten Repeating Unit **19** leicht abweicht. Zum einen wird die Turnkonformation im APDTR-Motiv offensichtlich stabilisiert, zum anderen wirkt sich die hier vorliegende zentrale Lage der im Monomeren terminalen Aminosäureeinheiten aus. Die in den APDTR-Motiven der dimeren Repeating Unit **20** gefundenen Kopplungskonstanten bestätigen eine Veränderung der strukturellen Verhältnisse im Dimeren gegenüber dem Monomeren. Auch die Gestalt der beiden APDTR-Regionen im dimeren Glycopeptid ist demnach nicht identisch. Die beobachtete Veränderung in den $^3J(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten im Gly-23 der dimeren Verbindung sind im Zusammenhang mit den gefundenen gemittelten NOE-Kontakten zu sehen. Die im monomeren Glycopeptid nicht beobachteten NOE-Kontakte in der Umgebung des Glycins sprechen für die Ausbildung einer definierte Konformationen in diesem Bereich. Die Gestalt

dieser verbindenden Region des Glycopeptides kann für die Präsentation des APDTR-Motives im MUC1-Glycoprotein von großer Wichtigkeit sein.

2.3.5 Bemerkungen zur Konformation der unterschiedlich glycosylierten MUC1 Repeating Units im antigenen APDTR-Motiv

Bei den synthetischen und analytischen Betrachtungen ausgedehnter chemischer Strukturen wie der Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins ist es notwendig, Modelle zum Verständnis der Struktur der Verbindungen zu erstellen. Die abstrakte Vorstellung der möglichen vorliegenden Strukturen wird ohne eine bildliche Vorstellung der Gestalt der Glycopeptide überfordert. Die meisten aktuellen Methoden der räumlichen Darstellung chemischer Strukturen basieren auf vereinfachten Energieminimierungen aus vorgewählten Startkonformationen der Moleküle. Mit dem Programm Hyperchem (Version 3, Hypercube Media Concepts inc., Boulder, Colorado, USA) liegt eine einfach zu bedienende, relativ leistungsstarke Software für den Einsatz auf dem PC vor. In Kapitel 2.5 wird ein Beispiel der Arbeit mit Hyperchem vorgestellt. Das generelle Problem vereinfachter Energieminimierungen ist die Abhängigkeit des Ergebnisses von der gewählten Startkonformation. Ohne eingehendere Analysen ist dieses Problem nicht zu umgehen.

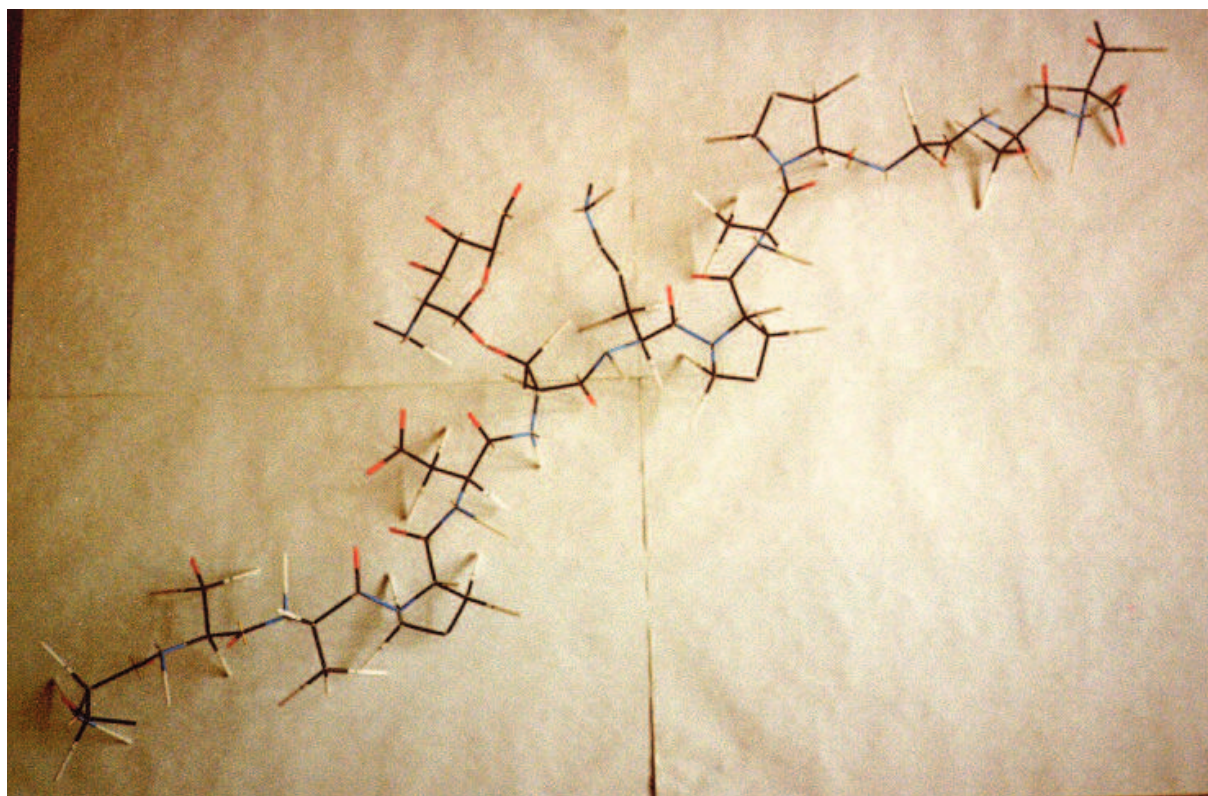


Abbildung 2.3.20: Das monoglycosylierte Repeating Unit Glycopeptid **21** ist mit dem Framework Molecular Models Stecksystem (Prentice-Hall, Eaglewood Hills, New Jersey, USA) dargestellt. Die abgebildete gestreckte Gestalt des Glycopeptides ist nur der Übersichtlichkeit wegen gewählt.

Die Arbeit mit plastischen Modellen ist durch den vermehrten Einsatz der elektronischen Medien unpopulär geworden. Diese einfach zu handhabende Methode der Erarbeitung von

Molekülmodellen ist jedoch im Vergleich zu der abstrakten Darstellungsweise am Monitor nützlich. Der Aufbau komplexer Strukturen wie der Glycopeptide ist mit dem Framework Molecular Models Stecksystem (Prentice-Hall, Eaglewood Hills, New Jersey, USA) leicht zu bewerkstelligen (siehe Abbildung 2.3.20). Der praktische Umgang mit den Modellen wie Drehen und Biegen erzeugt ein gutes Verständnis für die räumliche Gestalt der Moleküle als die rein optische Betrachtung. Ein Nachteil ist die nicht vorhandene graphische Präsentationsmöglichkeit, welche die Vorstellung der Ergebnisse für unbeteiligte Personen nicht möglich macht. Die Aufnahme von Photos wie in Abbildung 2.3.20 dargestellt erweist sich als unpraktisch, da die mechanische Fixierung interessanter Konformationen sehr aufwendig ist. Somit wird hier nur exemplarisch eine übersichtliche, zufällig ausgewählte gestreckte Gestalt des in Kapitel 2.3.7 vorgestellten monoglycosylierten Tridecapeptides **21** gezeigt.

Die in den ^1H -NOESY NMR-Spektren ermittelten qualitativen gemittelten NOE-Kontakte können leicht mit dem plastischen Modell verifiziert werden. Die hier vorgestellte graphische Darstellung der so angestellten Beobachtungen als Freihandzeichnung hat reinen Modellcharakter und der so erstellten Abbildung 2.3.21 sind keine quantifizierenden Aussagen zu entnehmen. Es wird eine Beschreibung der beobachteten zeitlich gemittelten Konformationen in den APDTRPA-Regionen der unterschiedlich glycosylierten synthetischen Glycopeptide aus der Repeating Unit des MUC1 Glycoproteins angegeben. Die beschriebenen Effekte basieren auf starken NOE-Effekten, die in den ^1H -NOESY-Spektren der Glycopeptide gefunden wurden.

Betrachtet man die Modelle der an variierenden Positionen glycosylierten MUC1 Glycopeptide **17**, **18** und **19**, so fällt auf, dass die gefundenen NOE-Effekte die bevorzugten Konformationen der meisten Teile der Glycopeptide weitgehend bestimmt. An wenigen Positionen wie in den terminalen Bereichen sind keine Beobachtungen räumlicher Nachbarschaften zu machen. Dies ist schon anhand der Komplexität der NOE-Signaturen in den Abbildungen 2.3.6, 2.3.11 und 2.3.15 leicht zu sehen. In dem Bereich um das antigene DTR-Motiv ist über eine auffällige Beobachtung zu berichten. Bei den am Thr-17 glycosylierten Glycopeptiden **17** und **19** sind durchgängig über NOE-Effekte in der Gestalt determinierte Regionen vom Gly-3 bis zum Arg-11 und von Pro-12 bis zum Ala-18 zu finden. Im Bereich zwischen Arg-11 und Pro-12 liegt eine gemittelte Konformation vor, bei der es keine Annäherungspunkte zwischen den Arginin- und Prolinprotonen gibt. Dieser räumliche Bereich ist groß und ist in der Skizze mit zwei Positionen und einem Pfeil angedeutet (siehe Abbildung 2.3.21). Nur die gemittelte Gestalt der an Thr-10 monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** ist durchgehend von Gly-3 bis Ala-18 über NOE-Effekte determiniert. Dies ist ein aus den zeitlich gemittelten NOE-Signaturen der Glycopeptide ersichtlicher Unterschied in der Gestalt der verschiedenen glycosylierten Glycopeptide. Die simple graphische Darstellung als Freihandzeichnung in Abbildung 2.3.21 beschreibt den aufgefundenen Effekt hinreichend.

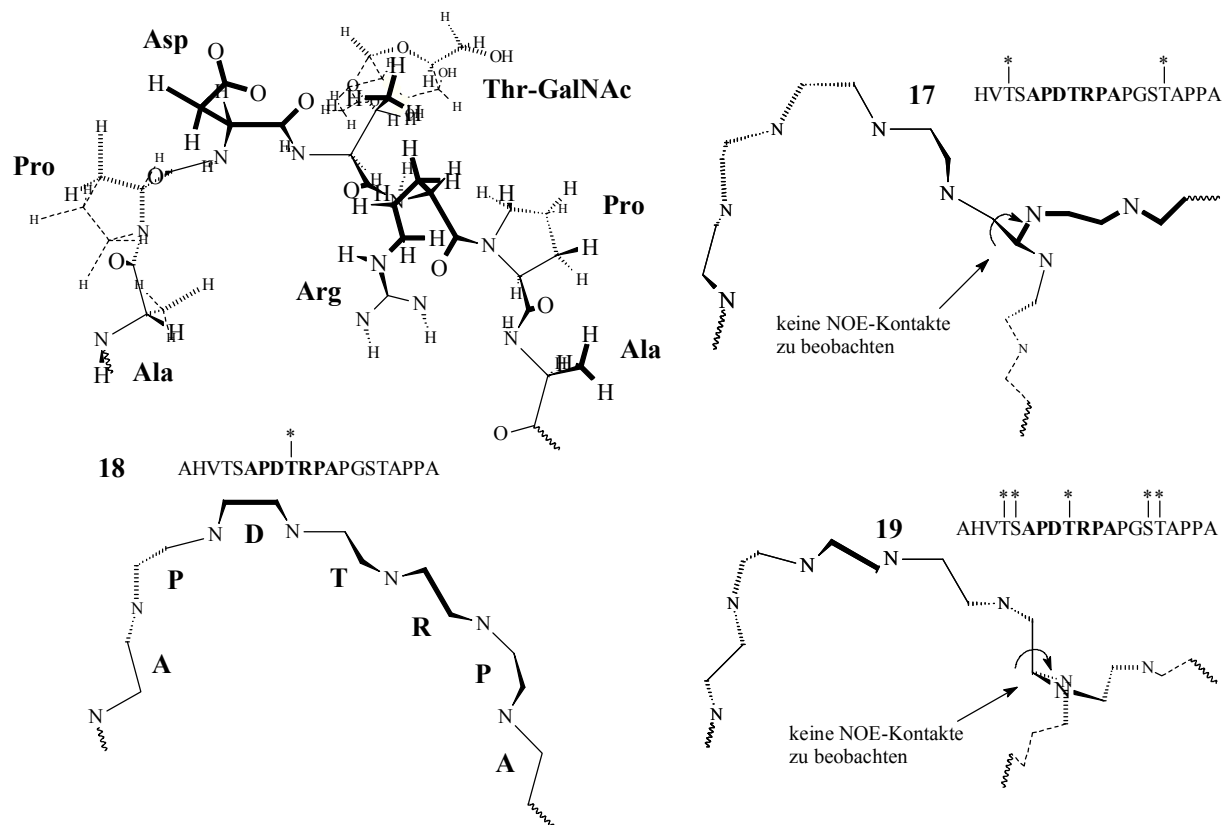


Abbildung 2.3.21: Skizze der am plastischen Modell beobachteten mittleren Gestalten der APDTRPA-Region in den unterschiedlich glycosylierten MUC1 Glycopeptiden. Oben links ist ein Versuch der Darstellung aller beteiligten Atome in der monoglycosylierten Repeating Unit 18 zu sehen. Die anderen Bilder zeigen die im Peptidrückgrat liegende Kohlenstoff- und Stickstoffatome in den verschiedenen glycosylierten MUC1 Glycopeptiden 17, 18 und 19. Die Sequenzen der Verbindungen sind mit angegeben, es bedeutet * = GalNAc.

Diese Beobachtung eines spezifischen strukturellen Effektes in der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit 18 ist im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Halfturmkonformation in der PAPGST-Sequenz der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit 18 zu sehen. Diese charakteristische Gestalt dieses Glycopeptides ist von starkem Interesse, da in den im folgenden beschriebenen antigenen Untersuchungen ein besonderes Verhalten der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit Glycopeptide zu beobachten ist.

2.3.6 Ergebnisse aus den Antikörper-Bindungsstudien der MUC1-Repeating Units

Das epithele Mucin MUC1 ist ein wichtiger Tumormarker des Brustkrebses und anderer Karzinome. In tumorösem MUC1 sind die Kohlenhydratseitenketten stark verkürzt und man nimmt an, daß das somit freigelegte DTR-Motiv der Angriffspunkt für die tumorspezifischen Antikörper ist. Bisher wurde davon ausgegangen, daß im antigenen DTR-Motiv keine Glycosylierung vorliegt. Die Effektivität der immunogenen Reaktion mit dem DTR-Motiv des MUC1 Glycoproteins schien auf der hohen Anzahl der wiederholenden Tandem Repeat Einheiten zu beruhen. Es werden hier Ausschnitte aus den Untersuchungen über die Antigenität einzelner Repeating Unit Glycopeptide gegen eine Anzahl von DTR-Motiv-Antikörpern angegeben (Karsten 1998).

Die Antigenität synthetischer Repeating Unit Glycopeptide aus der Sequenz des MUC1 Glycoproteins gegen eine großen Anzahl von anti-MUC1-Antikörpern mit DTR-Spezifität ist abhängig von der unterschiedlichen Glycosylierung der Glycopeptide. Es wird gezeigt, daß die Antigenität stark erhöht ist, wenn die Threoninposition in dem zentralen DTR-Motiv eine Tⁿ-Antigen- oder TF-Antigeneinheit trägt. Die ausgeprägtesten Effekte werden bei den Glycopeptiden beobachtet, wenn nur diese Position mit dem Monosaccharid GalNAc glycosyliert ist (Verbindung **18**).

Es wurden 28 monoclonale anti-MUC1-Antikörper mit DTR-Spezifität auf ihre Bindung zu synthetischen 20-mer (HGV20) und 21-mer (AHG21) Tandem Repeat Glycopeptiden getestet. Die Glycopeptide sind O-glycosyliert mit GalNAc (Tⁿ) oder Galβ1-3GalNAc (TF) an definierten Serin und Threoninpositionen. Das synthetische Tandem Repeat Peptid TAP25 (TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) wurde als Referenz eingesetzt. Die Bindungsmessungen wurden mit ELISA Experimenten durchgeführt. Hier wurden die Glycopeptide als immobilisierte Antigene oder als Inhibitor in Lösung eingesetzt. Zwölf Antikörper zeigten eine signifikant erhöhte Bindung zu den Glycopeptiden, welche im DTR-Motiv (Thr-10) glycosyliert sind im Vergleich mit anderen an den Positionen Thr-5, Ser-6, Ser-16 und Thr-17 glycosylierten Positionsisomeren und dem unglycosylierten Peptid (siehe Abbildung 2.3.22). Hierbei handelt es sich um die monoclonalen Antikörper 214D4, A76-A/C7, B27.29, BCP8, E29, Ma552, MF06, SM-3, VU-3-C6, VU-11-D1, VU11-E2 und VU-12-E1. Sechs anti-MUC1-Antikörper waren unreaktiv mit dem monomeren unglycosylierten Repeat Peptid, zeigten jedoch Bindungseffekte zu dem monoglycosylierten Glycopeptid **18**.

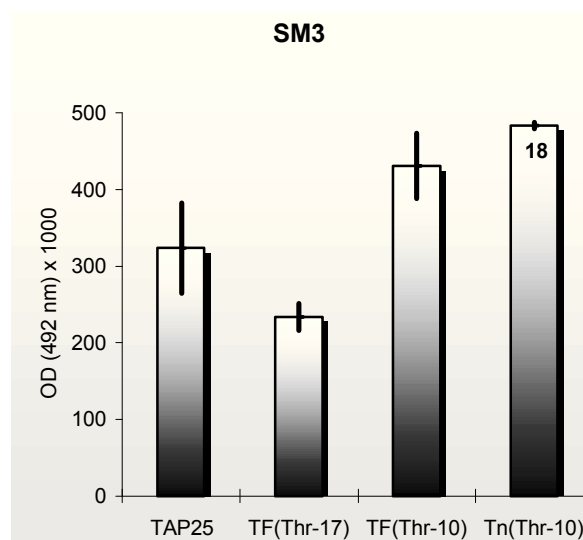


Abbildung 2.3.23: Beispiel aus den Bindungsmustern der monoclonalen anti-MUC1-Antikörper mit den MUC1 Repeating Unit Glycopeptiden (Karsten 1998). Dargestellt sind die Ergebnisse der ELISA-Tests mit dem SM3-Antikörper und dem unglycosylierten Peptid TAP25 sowie den monoglycosylierten Repeating Unit Glycopeptiden. Diese MUC1 Glycopeptide tragen Galβ1-3GalNAc (TF) Kohlenhydratreste an den Threoninpositionen Thr-10 / Thr-17 oder GalNAc (Tn) an Thr-10 (Verbindung **18**).

Diese verschiedenen Ergebnisse legen nahe, daß die Glycosylierung mit GalNAc am DTR-Motiv für die beobachteten verstärkten Effekte von Bedeutung ist. Die kürzlich gemachte Entdeckung von in vivo am DTR-Motiv glycosylierten, der Milchproduktion assoziierten

MUC1 Glycoproteine gibt einen Hinweis, daß auch in vivo das DTR-Motiv glycosyliert sein kann (Müller 1997). Möglicherweise ergeben sich aus diesen Ergebnissen Konsequenzen für das Design effizienter Tumorimpfstoffe.

2.3.7 Synthese des monoglycosylierten Tridecapeptides 21 für die Kristallisation als Komplex mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 zur Röntgenstrukturanalyse

Kürzlich wurde das Tridecapeptid TSAPDTRPAPGST aus der Repeating Unit des MUC1 synthetisiert, welches das antigene APDTR-Strukturelement zentral beinhaltet. Dieses Tridecapeptid wurde in einem Komplex mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 kristallisiert (Dokurno, im Druck, siehe Abbildung 2.3.2). Der Antikörper SM3 zeigt eine hohe Selektivität in der spezifischen Reaktion mit Tumorassoziiertem Mucin (Girling 1989). SM3 erkennt das DTR-Motiv der Repeating Unit bei unvollständig glycosyliertem epithelen Mucin MUC1 (Burchell 1987). Dieser Antikörper besitzt somit ein Potential für therapeutische und diagnostische Anwendung (Granowska 1996).

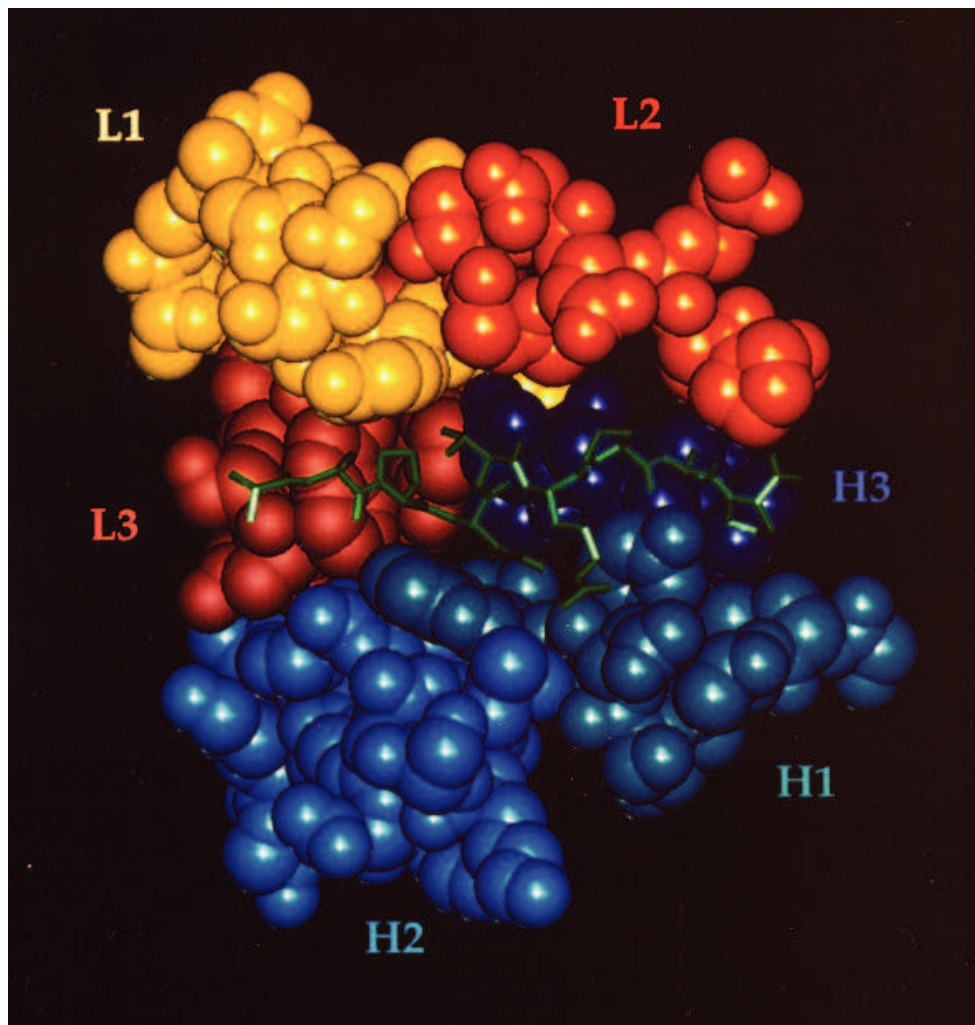


Abbildung 2.3.23: Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse des SM3-Antikörperkomplexes mit dem Tridecapeptid TSAPDTRPAPGST aus der Repeating Unit des MUC1. Gezeigt ist die Moleküloberflächenansicht der SM3-MUC1 Peptidwechselwirkung. Dargestellt ist das CPK Modell der SM3-Combining Site mit den individuell gekennzeichneten CDR-Loops. Das in grün gekennzeichnete Peptid bildet Kontakte zu allen CDR's aus, außer H2 (Dokurno, im Druck).

Das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse des Peptid-SM3-Komplexes zeigt, daß eine konformationelle Veränderung in der gebundenen Form des Peptides gegenüber der von FONTENOT (1995) gefundenen Struktur in wäßriger Lösung festzustellen ist (Dokurno, im Druck). Wie aus Abbildung 2.3.23 ersichtlich wird, liegt das Peptid in der Bindungsstelle des SM3 Antikörpers in einer vollkommen gestreckten Konformation vor. Der in Lösung vorliegende β -Turn hat sich bei der Bindung des Peptides am Antikörper aufgelöst. Diese Veränderung in der Konformation des peptidischen Bindungssubstrates wirft die Frage nach der Konformation eines analogen glycosylierten Peptides in dem SM3-Komplexes auf. Nach den in den Kapiteln 2.3.1-2.3.6 beschriebenen Untersuchungen sollte ein solches Glycopeptid nur am antigenen DTR-Motiv glycosyliert sein. Der Einsatz der monoglycosylierten MUC1 Repeating Unit **18** zur Kristallisation mit dem SM3-Antikörper erscheint ungünstig. Mit wachsender Größe und höherer Glycosylierung der Peptide stellt der jeweilige komplexgebundene Teil eine relativ kleinere Einheit dar. Die höhere Flexibilität der ungebundenen Teile des Glycopeptides dürften die Ausbildung eines Kristallgitters erschweren.

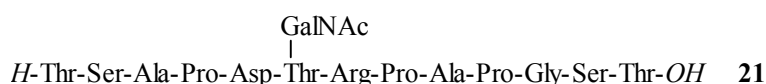


Abbildung 2.3.24: Sequenz des monoglycosylierten Tridecapeptides **21**. Dieses Glycopeptid wird synthetisiert für die Kristallisation als Komplex mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 zur Röntgenstrukturanalyse.

Es sollte daher das ebenfalls zu synthetisierende monoglycosylierte Tridecapeptid **21** (siehe Abbildung 2.3.24) wie das analoge Peptid in einem Komplex mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 kristallisiert werden. Die Kristallisation wird am Protein Structure Laboratory (Imperial Cancer Fund, London) durchgeführt. Das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse soll mit dem Ergebnis des unglycosylierten Peptides verglichen werden um Aussagen über den Einfluß der Glycosylierung auf die Struktur des Komplexes mit dem Anti-Brusttumor-Antikörper SM3 zu erlangen. Ein detailliertes Bild der Konformation des SM3-Komplexes der Verbindung **21** kann möglicherweise Parallelen zu den Untersuchungen über die Antigenität der MUC1 Glycopeptide aufdecken (siehe Kapitel 2.3.6).

2.3.7.1 Synthese und Charakterisierung des monoglycosylierten Tridecapeptides **21**

Die Durchführung der Synthese des monoglycosylierten Tridecapeptides aus der MUC1 Repeating Unit **21** basiert auf den Erfahrungen aus der Synthese der monoglycosylierten Repeating Unit **18**. Die Sequenz dieses Glycopeptides enthält zentral diejenige von Verbindung **21**. Die Verkürzung der Glycopeptidsequenz um jeweils vier Aminosäureeinheiten am C- und N-Terminus hat das Verhalten der Verbindung bei der Synthese nicht verändert. Die in Kapitel 2.3.2 getroffenen Aussagen lassen sich auf die

Synthese des aus 13 Aminosäureeinheiten aufgebauten Glycopeptides **21** übertragen. Mit der hohen Ausbeute von 72 % (bezogen auf die Belegung Harzes) wird die Effektivität des gewählten Syntheseweges bestätigt. Das MALDI-TOF Massenspektrum bestätigt die Struktur und zeigt keine weiteren aussagekräftigen Fragmentierungen auf.

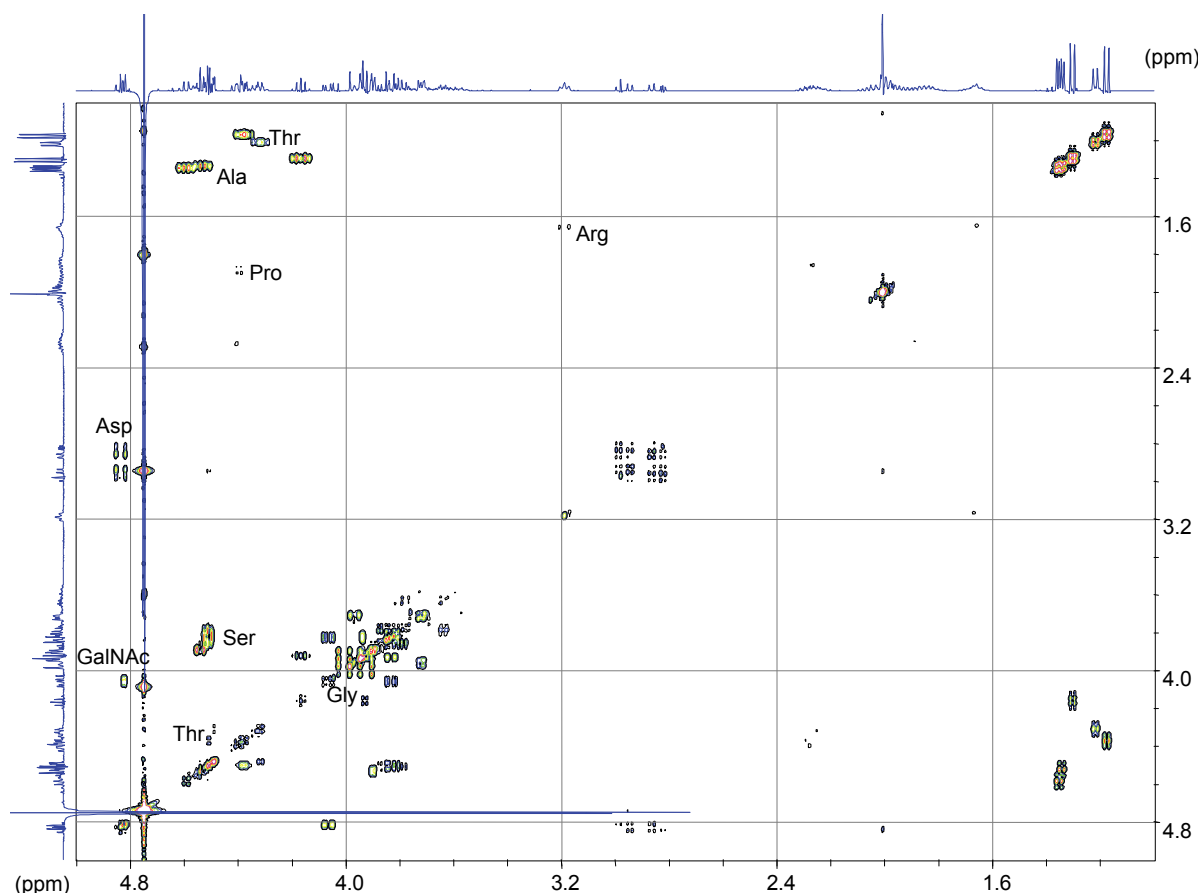


Abbildung 2.3.25: ^1H - ^1H -COSY Spektrum des monoglycosylierten Tridecapeptides **21** aus der MUC1 Repeating Unit in D_2O . Gezeigt ist eine Übersicht wichtiger Korrelationssignale. Die Markierung der Signale ist exemplarisch und zeigt den hohen Informationsgehalt des Spektrums an.

Die NMR-Charakterisierung des Glycopeptides **21** stützt sich größtenteils auf die Daten aus der Analyse der monoglycosylierten Repeating Unit **18** mit dem identischen Glycosylierungsmuster. Die Vorgehensweise der Evaluierung der Daten ist auch aus der Analyse dieses Glycopeptides übernommen. Die hier gefundenen Hinweise werden mit den Beobachtungen aus den Untersuchungen an dem Glycopeptid **18** verglichen. Aussagen über potentielle prägnante Strukturunterschiede werden anhand des qualitativen Vergleichs der NMR-Daten getroffen. Bei der Verbindung **21** ist schon mit den Informationen aus der Routineanalyse eine weitgehende Identifizierung des Glycopeptides möglich. Nach der Einsicht in das ^1H -1D-NMR Spektrum wird zur weiteren Identifizierung ein ^1H - ^1H -COSY Spektrum aufgenommen (Abbildung 2.3.25). Die automatisierte Aufnahme des Spektrums am AMX400 Spektrometer mit nur acht kumulierten Scans ergibt hierbei schon ein hervorragendes Ergebnis. Nach der Auswertung des ^1H - ^1H -COSY Spektrums kann mit Gewißheit die Präsenz der Kohlenhydrat- und aller Aminosäureeinheiten im Glycopeptid bestätigt werden.

Weitergehende Analysen des monoglycosylierten Tridecapeptides **21** beinhalten die Aufnahme von $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren, sowie von $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Spektren. Die Durchführung der Analyse dieser Spektren basiert auf den sehr guten Ergebnissen der Routineuntersuchung. Die Spektren werden am DRX500 Spektrometer gemessen und alle Experimente können dank der hohen Substanzmenge in einer Nacht durchgeführt werden. Die Analyse der zweidimensionalen Spektren führt zu einer eindeutigen Sequenzbestimmung mittels Heteronuklearer Spektroskopie (Vergleiche Kapitel 2.3.1.2). Die aufgenommenen $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Spektren erlauben eine eindeutige Bestimmung der Peptid- und Kohlenhydratresonanzen. Die sehr gute Qualität des ^1H -1D NMR-Spektrums ermöglicht die Ermittlung der Kopplungskonstanten und erübrigt die Aufnahme eines phasensensitiven 2D-Spektrums. Die Anwendung der Gauß-Operation in der Option Window-Funktion ermöglicht die Erzeugung einer hohen Auflösung des eindimensionalen Spektrums. Aus dem derart manipulierten Spektrum lassen sich die Kopplungskonstanten des Glycopeptides **21** ermitteln.

Interessant sind vor allem die Werte für die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten. Es fällt auf, das im antigenen DTR-Motiv das Muster der Kopplungskonstanten eines β -Turns zu sehen ist. Während die $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten der Alaninfragmente in den umliegenden Bereichen um 5.5 Hz liegen, sind mit Werten von 7.3 Hz-8.6 Hz-7.0 Hz für die Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc)-Arg in β -Turn Strukturen auftretende Daten aufzufinden (Wüthrich 1986). Die $^3\text{J}(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ -Kopplungskonstante des Threonin 10 zeigt mit 2.3 Hz einen um 0.5 Hz höheren Wert, als in der Verbindung **18** vorliegt. Die gleichzeitige Vergrößerung der $^3\text{J}(\text{NH}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten der Kopplungen in dem Fragment Asp-Thr(GalNAc)-Arg um 1.3 Hz im Threonin und um 1.1 Hz im Arginin deutet auf eine Veränderung der räumlichen Anordnung im antigenen Motiv hin.

Die $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren in Wasser (10 % D_2O) bestätigen die aus dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY gewonnenen Ergebnisse. Die zeitlich gemittelte NOE-Signatur des aus 13 Aminosäurefragmenten aufgebauten Glycopeptides **21** (siehe Abbildung 2.3.26) ist erwartungsgemäß weniger stark ausgeprägt als die vergleichbare Signatur in der um sechs Aminosäureeinheiten größeren Verbindung **18**. Die hier aufgefundenen NOE-Effekte sind mit Ausnahme zweier schwacher $\text{H}\beta$ -NH (i,i+1)-Effekte auch in der gesamten MUC1-Repeating Unit zu finden. Dies beinhaltet auch die in Kapitel 2.3.2.3 diskutierte NOE-Signatur einer β -Turn Struktur im antigenen APDTR-Motiv. Das oben beschriebene Muster der Kopplungskonstanten bestärkt diesen Hinweis. Auffällig ist das Fehlen der NOE-Kontakte in der PAPGST-Sequenz im Vergleich zur monoglycosylierten Repeating Unit **18**. Es kann vermutet werden, daß die dort beobachteten Strukturhinweise aufgrund der höheren Flexibilität des kleineren Tridecaglycopeptides **21** hier nicht beobachtet werden. Die veränderten Kopplungskonstanten im APDTR-Motiv bestärken die Vermutung, daß hier leicht verschiedene gemittelte Formen der gleichen Sequenz vorliegen.

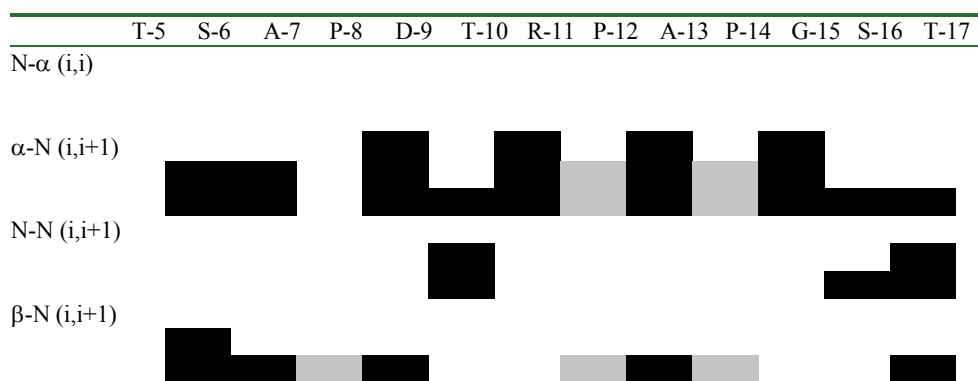


Abbildung 2.3.26: Übersicht über die sequentiellen und nachbarschaftlichen ^1H -NOE-Effekte in dem monoglycosylierten Tridecapeptid aus der MUC1 Repeating Unit **21**. Die Sequenz der Verbindung ist oben als Einbuchstabencode zu erkennen. Links sind die verschiedenen relevanten NOE-Effekte aufgetragen. Dargestellt sind die qualitativ nach stark, mittel und schwach differenzierten NOE-Effekte anhand der Höhe des Farbbalkens. Für Prolin werden anstelle der NH-Protonen die CH_δ -Protonen betrachtet. Deutlich ist in der Sequenz PDTR die von WÜTHRICH (1986) beschriebene NOE-Signatur des β -Turn zu sehen (siehe Text).

Mögliche Unterschiede in den Konformationen der unterschiedlich langen Glycopeptidsequenzen können hervorgerufen werden durch ausgebildete Strukturen in den terminalen Regionen des Glycopeptides **18**. In der Analyse der Verbindung **18** erscheinen dort Hinweise auf einen Halfturn in der PAPGST-Sequenz. Diese Hinweise sind in den Spektren der kürzeren Sequenz des monoglycosylierten Tridecapeptides **21** nicht enthalten. Liegt ein Halfturn vor, so verhindert der Schnitt in der Sequenz bei Thr-17 seine Ausbildung. Die Präsenz der in der Sequenz folgenden Aminosäureposition Ala-18 ist für die Ausbildung einer dominanten Faltung in der PAPGST offenbar notwendig. Ebenso wie Ala-7 im Falle des (AP)DTR-Motives muß hier Ala-18 in der Sequenz PAPGST(A) zur Ausbildung der sequenzspezifischen Gestalt vorliegen.

Das Auftreten einer ausgeprägten Sekundärstruktur wie eines Turns in einem relativ kleinen Glycopeptid wie des Tridecaglycopeptides **21** überrascht, da FONTENOT (1995) feststellte, daß die Sekundärstrukturelemente erst mit zunehmender Größe der unglycosylierten MUC1 Fragmente zum Tragen kommen. Diese offenbar leicht auszubildende β -Turn Struktur deutet auf einen starken Einfluß der Monoglycosylierung in dem Peptidfragment hin. Es zeigt sich also, daß das monoglycosylierte Tridecapeptid **21** in wäßriger Lösung qualitativ betrachtet leichter Sekundärstrukturelemente ausbildet als analoge Peptide. Der Vergleich der Glycopeptidstrukturen mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen bei der monoglycosylierten Repeating Unit **18** zeigt die Abwesenheit der dort beobachteten zweiten Struktureinheit im PAPGST-Fragment aufgrund des Fehlens der folgenden Aminosäureposition Ala-18. Dieser Effekt beeinflußt auch die gemittelte Konformation im APDTR-Motiv in wäßriger Lösung. Eine Übertragung dieser Unterschiede in den gemittelten Konformationen der solvatisierten Glycopeptide auf die Gestalt in gebundener Form am SM3-Antikörper ist jedoch nicht zulässig. Die Ergebnisse der Kristallisation des Glycopeptides **21** als SM3-Komplex und einer Röntgenstrukturanalyse sind somit mit Spannung zu erwarten. Zur Klärung der Frage nach Unterschieden in der gebundenen Konformation bei Verlängerung der Glycopeptidsequenz am C-Terminus müßten N-terminal verkürzte

Strukturen eingesetzt werden, um zu große Peptidstrukturen zu vermeiden. Ein mögliches weiteres Glycopeptid zur Kristallisation als SM3-Komplex und für die Röntgenstrukturanalyse müßte demnach die Sequenz APDT(GalNAc)RPAPGSTA sein.

2.4 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC2

In diesem Teil der Arbeit wird die Synthese der Peptidsequenz und Untersuchungen zur Synthese eines hochglycosylierten Glycopeptides aus dem weit verbreiteten humanen intestinalen Mucin MUC2 beschrieben. MUC2 ist ein bedeutungsvolles im Dickdarm sekretiertes Mucin (Tytgat 1994). Die Repeating Unit des MUC2 Proteins ist potentiell glycosyliert mit vierzehn Oligosacchariden (siehe Abbildung 2.4.1). Über die Positionen der Glycosylierungen und der Struktur der Oligosaccharide in der MUC2 Repeating Unit ist wenig bekannt, da die O-Glycane starke Heterogenität in der Struktur zeigen. Die Expression des MUC2 ist von Krebserkrankungen beeinflusst und unterscheidet sich nach der Art des vorliegenden Tumorbefundes. Bei Adenomen wird oft eine erhöhte Expression beobachtet, während ein Rückgang in carcinomem Gewebe zu verzeichnen ist (Blank 1994). In Kombination mit einer beobachteten andersartig veränderten Expression des MUC5 könnte eine Früherkennung für Adenome entwickelt werden (Buisine 1996).

Ac-Thr-Thr-Thr-Pro-Ile-Thr-Thr-Thr-Thr-Val-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Gly-Thr-Gln-Thr-*OH* **27**

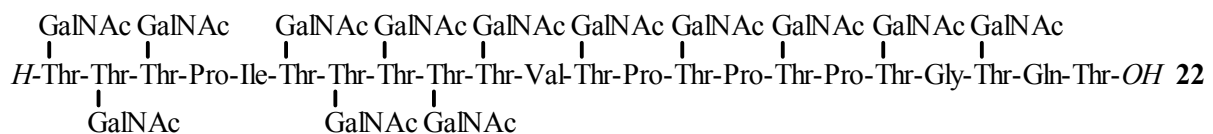


Abbildung 2.4.1: In diesem Teil der Arbeit synthetisiertes Peptid aus der Repeating Unit des MUC2 **27**. Zur Darstellung des tridecaglycosylierten 23-mer Glycopeptid **22** sind Untersuchungen gemacht worden.

Synthetische Peptide und Glycopeptide auf der Basis der MUC2 Sequenz wurden vielfach zur Untersuchung der Substratspezifität von Glycosyltransferasen eingesetzt (Paulsen 1995). Kürzlich wurde eine längere Peptidsequenz PTTTPISTTTMTPTPTPTC aus der semirepetitiven Region des MUC2 Glycoproteins synthetisiert. Dieses 20-mer Peptid wurde als Akzeptor für eine präparative in vitro O-Glycosylierung mit UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase aus der Submaxillarisdrüse des Schweines eingesetzt. Bei dieser enzymatischen Glycosylierung wurden bis zu neun GalNAc-Einheiten an ein Peptid angeknüpft (Reis 1998). Mit einer vollständigen Mischung aus humanen GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen lassen sich weiterhin Fragmente der MUC2-Repeating Unit annähernd vollständig glycosylieren (Irimura 1998). Diese Ergebnisse geben Anlaß zu weiteren Untersuchungen über die Antigenität der MUC2-Repeating Unit, insbesondere synthetische hochglycosylierte MUC2 Repeating Unit Glycopeptide sind hierbei von Interesse.

Um den Einfluß der Glycosylierung auf die Antigenität der MUC2 Glycopeptide zu studieren, wird in dieser Arbeit das in Abbildung 2.4.1 dargestellte Peptid **27** synthetisiert und charakterisiert, welches die vollständige Repeating Unit des MUC2 darstellt. Ferner sollte das vollständig glycosylierte Glycopeptid **22** dargestellt werden. Die Synthese eines hochglycosylierten Glycopeptides mit einer alternierenden Pro-Thr(GalNAc)-Sequenz ist aufgrund der cis/trans Isomerisierung der Prolineinheiten problematisch (Mayo 1991). Liegt

Prolin am reaktiven Ende der wachsenden Peptidkette vor, so kann eines der beiden cis/trans Isomere in einer für die Folgereaktion schwer zugänglichen Position stehen. Die hohe Aktivierungsbarriere der Prolinisomerisierung würde dann die Umwandlung eines sterisch behinderten Isomers in eine für die Reaktion zugängliche Form verhindern. Die Peptidkupplung mit voluminösen Glycosylaminosäuren an einem sterisch behinderten Prolinomer wäre dadurch behindert. Es würde die Ausbeute der Peptidkupplung bei Vorliegen sterisch gehinderter Prolinisomere sinken. Eine Kumulierung dieses Effektes könnte eine Synthese beeinflussen.

2.4.1 Synthese und Charakterisierung der MUC2-Repeating Unit 27

Die Synthese der MUC2 Repeating Unit 27 wird in paralleler Syntheseführung mit der Fmoc-Pfp-Ester-Technik am Wang-Harz B1000 durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Die HPLC-Reinigung und NMR-Charakterisierung des 23-mer Peptides wurden im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie (13.360) unter Anleitung durchgeführt (Jessen 1999) und sind beschrieben im Anhang. Auf eine Analyse der Nebenprodukte der chromatographischen Reinigung wurde hier aus zeitlichen Gründen verzichtet. Die gereinigte MUC2 Repeating Unit 27 wird massenspektrometrisch identifiziert. Die relativ zufriedenstellende Ausbeute der Synthese mit 28 % (bezogen auf die Belegung Harzes) ergibt eine ausreichende Substanzmenge zur Charakterisierung und für mögliche weitere Untersuchungen.

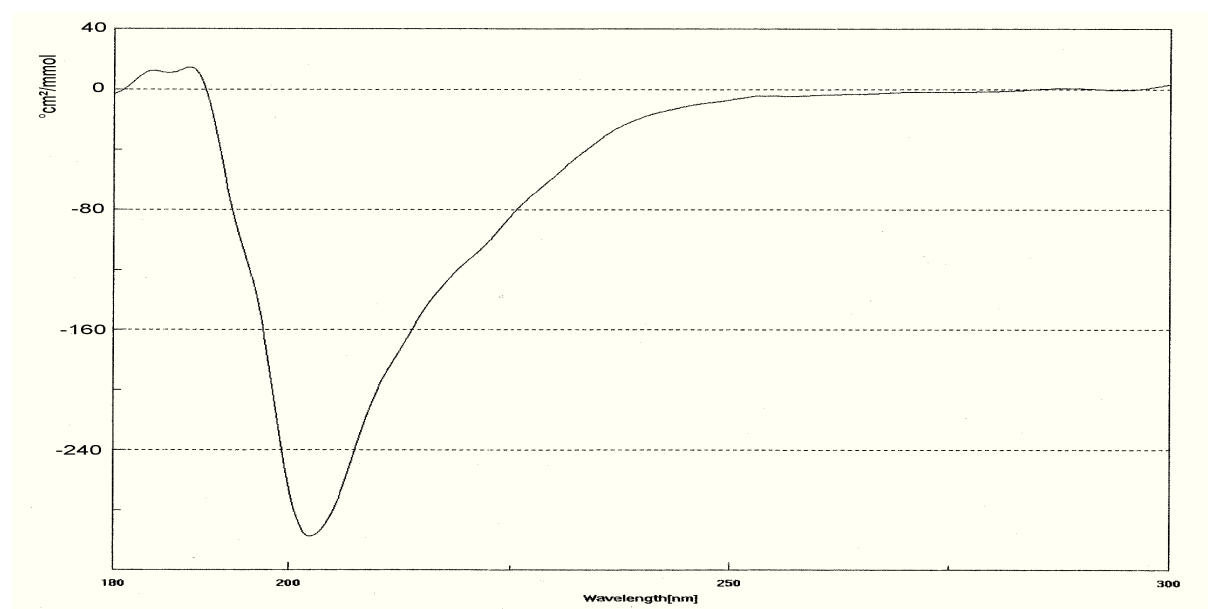


Abbildung 2.4.2: CD-Spektrum der MUC2 Repeating Unit 27. Das Spektrum ähnelt mehr dem CD-Spektrum eines Peptides mit zufälliger Sekundärstruktur, als demjenigen eines typischen prolinreichen Kollagens (siehe Text).

Das Circular Dichroismus Spektrum der Verbindung 27 zeigt im Wesentlichen einen starken negativen Effekt bei 202.2 nm mit Schultern bei 196.0 nm, bei 211.2 nm und bei 221.60 nm

(siehe Abbildung 2.4.2). Über ausgeprägte negative Effekte bei 192 nm mit Schultern bei 205 nm wird bei den prolinreichen Kollagenen berichtet (Mayo 1991). Der hier aufgefundene Effekt ist in der Lage demgegenüber deutlich verschoben und liegt bei 202.2 nm. Das CD-Spektrum des MUC2 Peptides **27** ähnelt mehr dem Spektrum des Peptides **26** (siehe Abbildung 2.2.12), welches in Random Coil Struktur vorliegt.

Die Betrachtung des CD-Spektrums der MUC2 Repeating Unit **27** läßt das Vorliegen des 23-mer Peptides in einer zufälligen räumlichen Orientierung (Random Coil Structure) vermuten. Hinweise aus der NMR-Charakterisierung bestätigen diese Vermutung.

Die NMR-Charakterisierung der MUC2-Repeating Unit **27** zeigt, daß die synthetisierte Verbindung in einer hohen Reinheit vorliegt. Die Analyse der aufgenommenen ^1H -TOCSY und ^1H -NOESY Spektren erlaubt eine eindeutige Bestimmung der meisten Peptidresonanzen. Aufgrund der starken Überlagerung in den Spektren werden ^1H -TOCSY und ^1H -NOESY mit stark erhöhter Auflösung von 32k Datenpunkten aufgenommen. Aufgrund der somit erzeugten hohen Datenmenge ist die Bearbeitung der Spektren apparativ aufwendig und zeitintensiv. Auf eine Aufnahme von hochaufgelösten $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Spektren des Peptides **27** wird wegen der hohen notwendigen Aufnahmezeit verzichtet. Die zu erwartende starke Überlagerung der Resonanzen würde eine differenzierte Auswertung dieser Spektren ebenso wie von ^1H -ECOSY-Spektren wahrscheinlich unmöglich machen. Aus den erhaltenen Daten lassen sich keine Hinweise auf eine dominant ausgeprägte Sekundärstruktur der MUC2 Repeating Unit **27** ermitteln (siehe Anhang).

2.4.2 Untersuchungen zur Synthese der tridecaglycosylierten MUC2-Repeating Unit **22**

Die Verbindung **22** repräsentiert die Sequenz der Repeating Unit des MUC2 Glycoproteins, glycosyliert an dreizehn Threoninpositionen (siehe Abbildung 2.4.1). Die Synthese eines hochglycosylierten Glycopeptides wie der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** stellt eine synthetische Herausforderung dar. Die Sequenz der Glycopeptides beinhaltet drei auffällige Bereiche. Die Sequenzabschnitte Thr-1 bis Thr-3 und Thr-6 bis Thr-10 stellen vicinal glycosylierte Cluster dar. Nach den Ergebnissen aus PAULSEN (1995) und den Synthesen der Glycophorinderivate (siehe Kapitel 2.2) sollten diese Cluster eine Festphasenglycopeptidsynthese nicht nachteilig beeinflussen. Der Einfluß einer alternierenden Sequenz von Glycosylierungen wie dem Abschnitt Thr-10 bis Gln-21 (T*VT*PT*PT*PT*GT*Q, * = GalNAc) auf die Synthese ist jedoch bisher nicht untersucht. Insbesondere der Kernbereich der alternierenden Sequenz mit wechselnden Positionen der glycosylierten Threonineinheiten mit der Iminosäureeinheit Prolin ist ein räumlich sehr komplex strukturierter Bereich. Nach den einleitend erwähnten Überlegungen zur cis/trans-Isomerisierung des Prolins ist in diesem Sequenzabschnitt mit synthetischen Problemen zu rechnen.

Nach den positiven Erfahrungen mit der Einführung der Kohlenhydratkomponenten mit den GalNAc-Building-Blocks **11** und **12** (siehe Abbildung 2.3.7), empfiehlt sich diese Methode für einen Versuch der Synthese der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22**. Diese

Methode des Einsatzes reduzierter, GalNAc tragender Aminosäurederivate sollte wenig Verunreinigungen liefern und die komplexe Synthese nicht mit zusätzlichen aufwendigen chromatographischen Reinigungen erschweren. Die Synthese der unglycosylierten MUC2 Repeating Unit **27** verlief zufriedenstellend. Nach den Beobachtungen der Syntheseausbeuten in Abhängigkeit von der Glycosylierung bei den Glycophorin- und MUC1-Glycopeptiden ist dieses Ergebnis aus der Peptidsynthese jedoch nicht auf die Synthese eines hochglycosylierten Glycopeptides gleicher Peptidsequenz übertragbar. Die Hinweise auf eine zufällige Sekundärstruktur im Peptid **27** und das Fehlen von Hinweisen auf cis/trans-Isomerisierungen in dieser Sequenz lassen jedoch auf einen nicht zu stark ausgeprägten Isomerisierungseffekt bei dem Glycopeptid hoffen.

Der Versuch der Festphasenglycopeptidsynthese der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** wird analog zur Synthese der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** durchgeführt. Als polymerer Träger wird das Wang-Harz B1250 verwendet (siehe Kapitel 2.3.3.1). Die parallele Syntheseführung gestattet den direkten Vergleich der Veränderung der gelben Indikatorfärbung des Dhbt-OH während der Peptidkupplungen mit anderen Glycopeptidsynthesen. Bei den beobachteten Peptidkupplungsreaktionen verblaßte die Gelbfärbung der Dhbt-O⁻-Aminkomplexe bei dem Syntheseansatz zum Glycopeptid **22** stets innerhalb einiger Stunden. Die Beobachtungen ließen keinen Zweifel an dem vollständigen Abreagieren aller vom Dhbt-OH erreichbaren Aminogruppen. Dieses beobachtete Verhalten der wachsenden Glycopeptidkette am Harz ermutigte zur Vollendung aller Peptidkupplungsreaktionen der Festphasenglycopeptidsynthese.

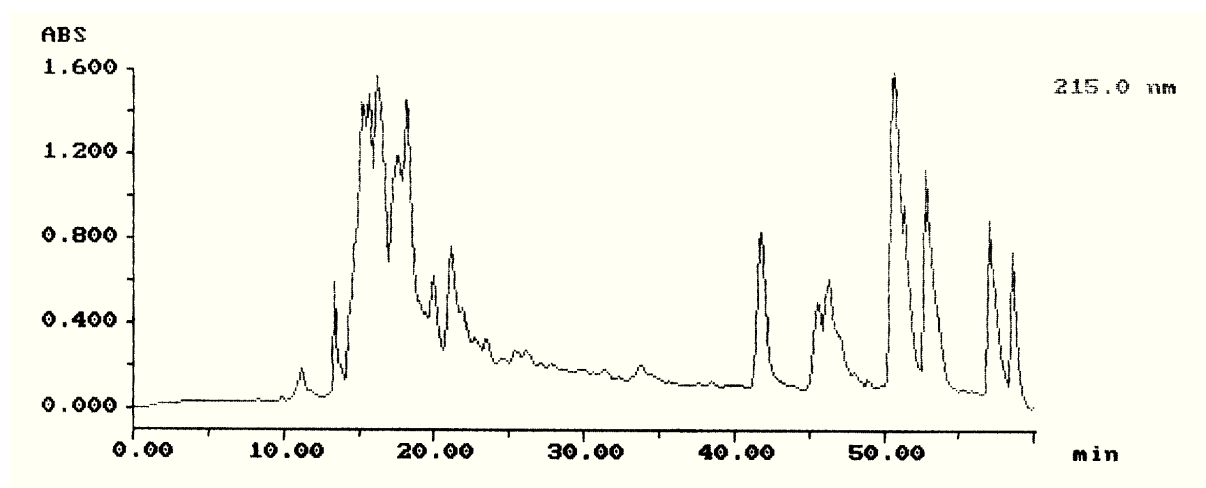


Abbildung 2.4.3: RP-HPLC-Chromatogramm des filtrierten Rohproduktes der Synthese zur tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22**. Zu sehen sind eine Vielzahl eluierter Substanzen in dem polaren Elutionsbereich ab etwa 15 min. Im unpolaren Bereich ab etwa 40 min eluieren Schutzgruppen und Fragmente des Linkers und des Polymeren.

Die *O*-Deacetylierung der peptidisch gebundenen Galactosamineinheiten am Harz nach der Festphasensynthese zur Verbindung **22** erfolgt auch in diesem Fall, wie in den vorangehenden

Synthesen der MUC1 Glycopeptide beschrieben, in sechs Stunden mit Hydrazinhydrat am polymeren Träger.

Die chromatographische Reinigung des Rohproduktes mittels RP-HPLC nach der Abspaltung vom Harz zeigt eine Vielzahl von Nebenprodukten, die sowohl im unpolaren Bereich eluieren (ab etwa 40 min), als auch im stark wäßrigen Gradientenbereich ab etwa 15 min zu beobachten sind (siehe Abbildung 2.4.3). Massenspektrometrische Untersuchungen am ESI Massenspektrometer mit den aufgefangenen HPLC-Fractionen waren nicht erfolgreich. Auch MALDI-TOF Untersuchungen gestalten sich als schwierig. Nach eingehender Optimierung gelingt hier bei den meisten Fraktionen die Erstellung eines Massenspektrums. Die MALDI-TOF massenspektrometrische Analyse der Fraktionen zeigt neben einer Anzahl von Abbruchprodukten in einigen Fraktionen neben anderen Massensignalen die für das tridecaglycosylierte Glycopeptid erwartete charakteristische Molekularmasse $(M+Na)^+ = 4984$. Weitere Chromatographie an RP-HPLC der massenspektrometrisch identifizierten Fraktionen mit eingehend optimierten Gradientenprogrammen ergibt eine optimierte Antrennung der Produkte aus der Festphasensynthese (Abbildung 2.4.4).

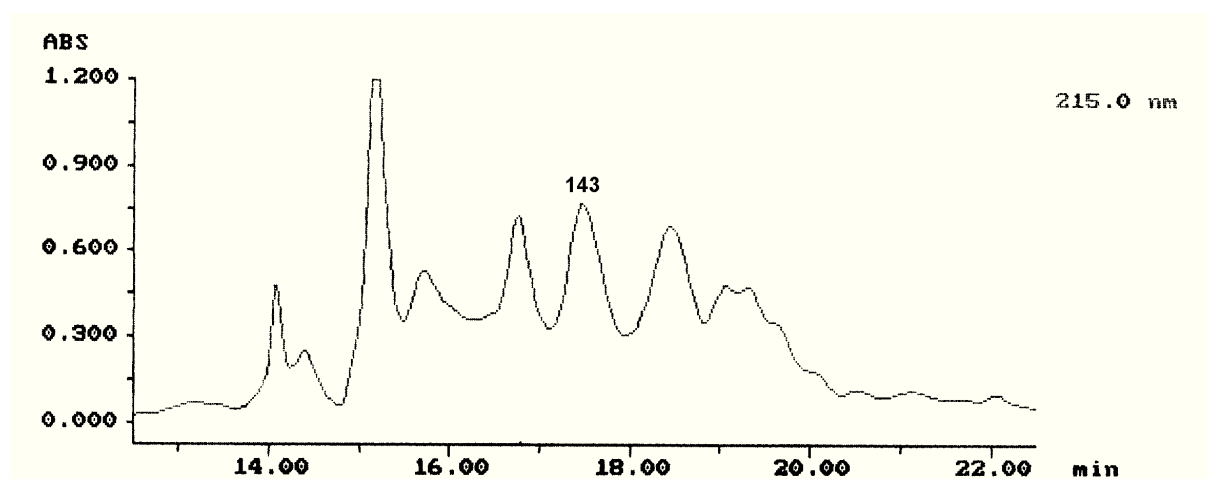


Abbildung 2.4.4: Ausschnitt aus dem RP-HPLC-Chromatogramm der optimierten Antrennung der Produkte aus der Festphasensynthese zur Verbindung **22**. Als Ergebnis dieses finalen Chromatographieschrittes ist eine Fraktion der stark angereicherten tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** (siehe Text).

Ein Problem der optimierten chromatographischen Reinigung ist der Konflikt zwischen Reinheit und Substanzverlust. Versuche zu einer weitere Auftrennung der HPLC-Fractionen ergaben drastischen Substanzverlust, so daß bei dem Resultat der Chromatographie von einer vollständigen Ausnutzung der zur Verfügung stehenden RP-HPLC Chromatographieanlage auszugehen ist. Eine der über optimierte RP-HPLC-Chromatographie erhaltene Fraktion zeigt in der MADLI-TOF massenspektrometrischen Analyse erneut die gewünschte Molekularmasse der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22**, so daß kein Zweifel besteht, daß die tridecaglycosylierte MUC2 Repeating Unit bei der Synthese erhalten wird (siehe Abbildung 2.4.5). Es zeigt sich jedoch auch eine weitere Verunreinigung, so daß die Gewinnung eines reinen Glycopeptides **22** nicht erreicht werden kann. Die Masse des vorliegenden Substanzgemisches mit etwa einem Milligramm läßt auch keine

Ausbeutebetrachtungen zu. Die massenspektrometrischen Ergebnisse sprechen jedoch für die generelle Möglichkeit der Synthese der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22**.

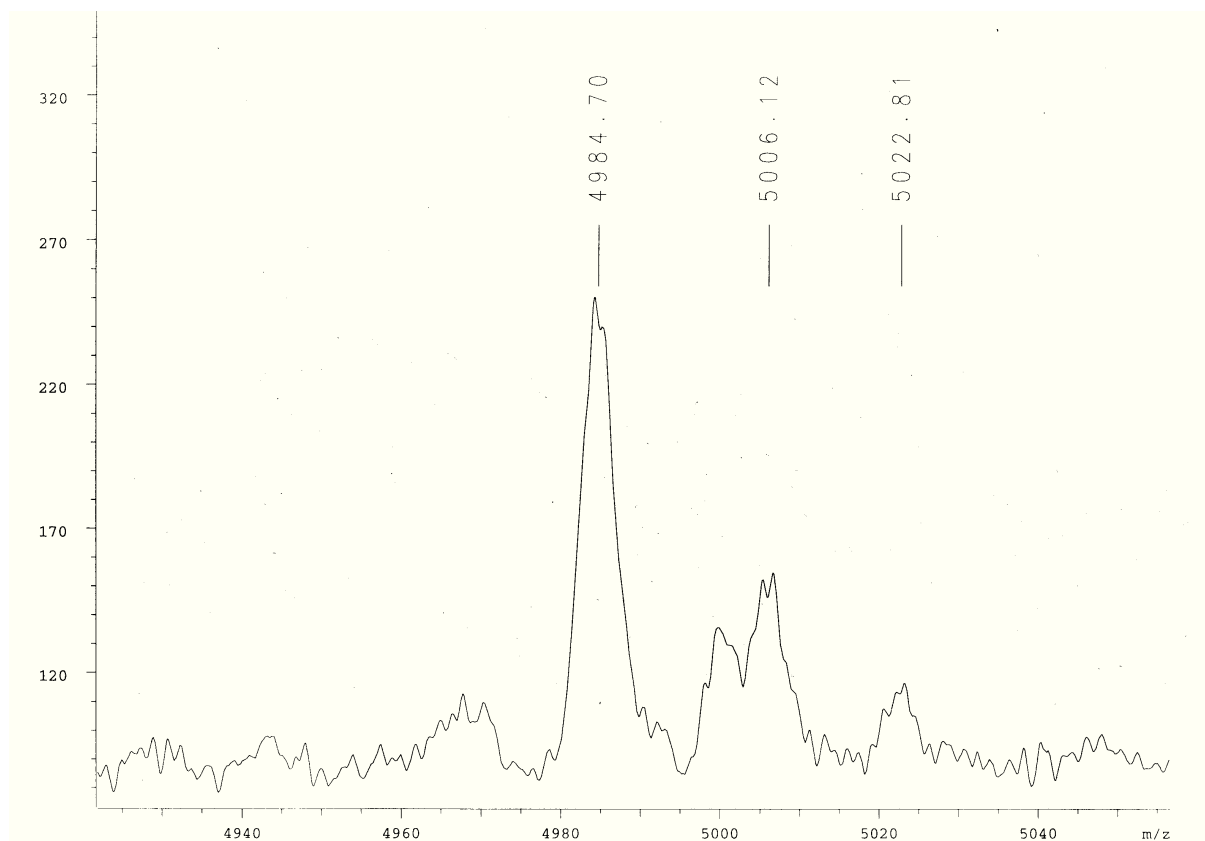


Abbildung 2.4.5: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF Massenspektrum der gekennzeichneten HPLC-Fraktion aus Abbildung 2.4.4. Zu sehen ist das Signal des $(M+Na)^+$ -Fragmentes der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** (4984.7). Es ist deutlich zu sehen, dass eine höhermolekulare Verunreinigung angezeigt wird, bei der es sich nicht um ein acetyliertes Produkt handelt ($M+42$).

NMR-Untersuchungen an kleinen Mengen von Substanzgemischen sind sowohl apparativ als auch zeitlich aufwendig. Daher werden die massenspektroskopischen Untersuchungen nur mit $1D-^1H$ -NMR Spektroskopie verfolgt. Mittels dieser Protonenspektren der HPLC-Fractionen kann über die qualitative Beobachtung der signifikanten Signale eine allgemeine Aussage zur Zusammensetzung der Substanzgemische gemacht werden. Abbildung 2.4.6 zeigt ein $1D-^1H$ -NMR Spektrum der Fraktion, die nach MALDI-TOF Untersuchungen das tridecaglycosylierte MUC2 Repeating Unit **22** enthält. Deutlich ist zu erkennen, daß in allen zu erwartenden Bereichen des Spektrums Signale vorliegen. Insbesondere die Signale bei 4.8 ppm zeigen die Präsenz einer Anzahl von Galactosaminresten an. Eine Differenzierung der Signale verschiedener Glycopeptide ist jedoch nicht möglich. Von weiterführenden 2D-NMR Experimenten wird aufgrund der hohen benötigten Gerätezeit und den sich daraus ergebenden Zweifeln an der Effektivität der Aufnahme abgesehen.

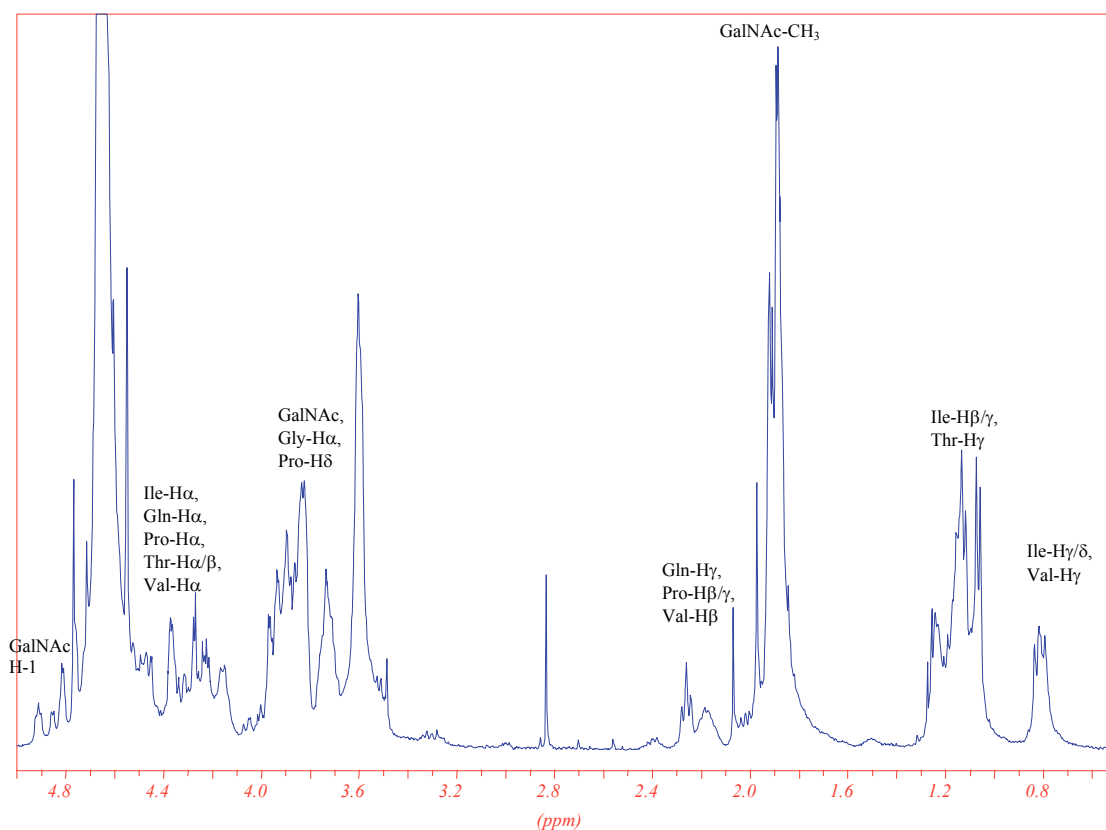


Abbildung 2.4.6: 1D- ^1H -NMR Spektrum der verunreinigten tridecaglycosylierten MUC2-Repeating Unit **22** in D_2O . Gezeigt sind die markierten Bereiche der chemischen Verschiebungen der erwarteten Protonenresonanzen.

Das Circular Dichroismus Spektrum des vorliegenden Substanzgemisches sollte aufgrund der Additivität der ORD-Effekte nur als Hinweis auf vorliegende Struktureffekte in der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** angesehen werden. Das CD-Spektrum zeigt im Wesentlichen positive Effekte bei 185-200 nm, einen starken negativen Effekt bei 208 nm und einen positiven Effekt bei 224 nm (siehe Abbildung 2.4.7). Das CD-Spektrum ähnelt in seiner Gestalt stark demjenigen des nonaglycosylierten Octadecapeptides aus dem N-Terminus des Glycophorin A^N **16** (siehe Abbildung 2.2.14). Der hier aufgefundene starke negative Effekt ist in der Wellenlänge jedoch um 7 nm verschoben und liegt bei 208 nm. Die Beobachtung der Ähnlichkeit des vorliegenden CD-Spektrum zum Spektrum des Glycopeptides **16** überrascht nicht, da die N-terminalen Sequenzen des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** (LS*T*T*EVAMHT*S*T*S*S*S*) und der MUC2 Repeating Unit (T*T*T*PIT*T*T*T*T*) aus ähnlichen vicinalen Glycosylierungsklustern aufgebaut ist. Eine Variation in der Lage um 7 nm ist jedoch ein deutlicher Hinweis auf davon abweichende Struktureffekte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Synthese der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** prinzipiell möglich ist. Als Syntheseform ist der Einsatz der Fmoc-Pfp-Ester Technik allerdings wenig geeignet, da offenbar im Verlauf der Festphasensynthese auftretende cis/trans-Isomerisierungen der Prolineinheiten den Kupplungen entgegenwirken. Diese Sekundärstruktureffekte der am Polymer wachsenden Glycopeptidkette verhindern eine effektive Synthese des Glycopeptides. Methoden zur Umgehung dieser

ausbeutereduzierenden Effekte wie Fragmentkondensation oder der Einsatz N-methylierter Aminosäuren könnten diesen Effekten erfolgreich entgegenwirken. Bei der Reinigung der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22** ist die RP-HPLC recht wirkungsvoll. Eine Verbesserung wäre hier bei ausreichend vorliegender Substanzmenge der zusätzliche Einsatz der HPLC an aminierten Phasen sowie der Gelpermeationschromatographie.

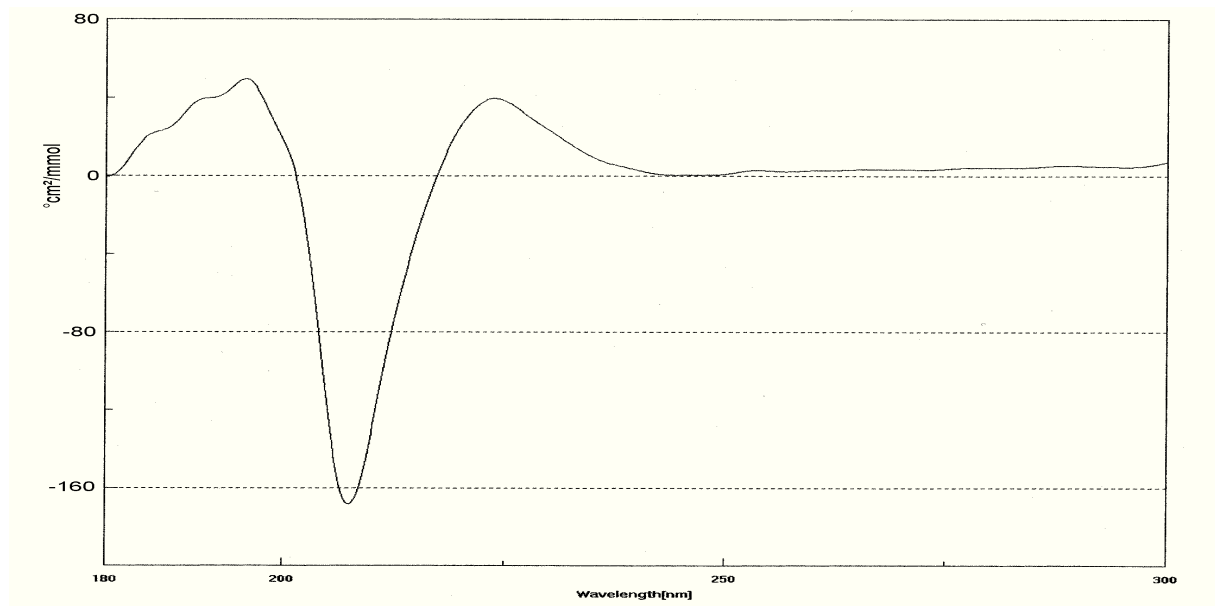
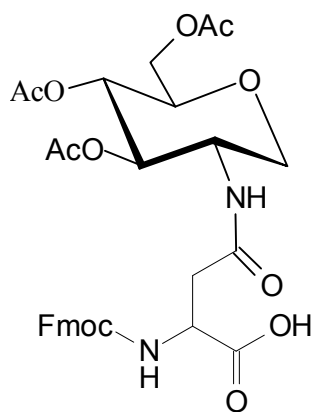


Abbildung 2.4.7: CD-Spektrum eines Gemisches von Glycopeptiden und der tridecaglycosylierten MUC2 Repeating Unit **22**. Das Spektrum ähnelt dem CD-Spektrum des nonaglycosylierten Octadecapeptides aus der Sequenz des Glycophorin A^N (siehe Text).

2.5 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Immunodeficiency Virus (HIV)

In diesem Teil der Arbeit wird die Synthese eines Glycopeptidanalogs aus dem Humanen Immunodeficiency Virus (HIV) beschrieben. Das HIV-1 trägt auf seiner Oberfläche das Glycoprotein gp120, welches mit seinen Kohlenhydratstrukturen einen einhüllenden Effekt auf die Virusoberfläche ausübt (External Envelope Glycoprotein). Das Glycoprotein gp120 ist an einer Bindung zu menschlichen Zellen über deren CD4-Rezeptor beteiligt, welche den Viruseintritt in die Zelle einleitet (siehe Einleitung). Die V3-Loop des gp120 ist eine bedeutende Domäne, die als ersten Schritt der Verschmelzung des Virus mit der Zelle (Fusion) den Kontakt zum CD4-Rezeptor der anvisierten Zelle ausbildet. In dem zweiten Schritt der Fusion tritt die V3-Loop mit den chemokinen Rezeptoren CCR5 oder CXCR4 in Wechselwirkung. Dieser zweite Schritt der HIV:Zell-Fusion kann mit synthetischen V3-Loop Peptiden inhibiert werden, welche das hochkonservierte GPGRAPH-Motiv des HIV-1 Untertypen B enthalten (Nehete 1993). Die Region des GPGRAPH-Motives und der N-seitige benachbarte Abschnitt der Proteinsequenz wird als Principal Neutratising Determinant (PND) des gp120 bezeichnet. Erhöhte antivirale Aktivität wurde bei dem Einsatz hochverzweigter Peptidkonstrukte auf der Basis der PND-Sequenzen beobachtet (Yahi 1995), was auf eine Beteiligung kleiner V3-Peptidsegmente an der gp120:Corezeptor-Bindung hinweist.

Die Synthese und Charakterisierung immunogener Peptide aus der PND der V3-Loop wurde durchgeführt und Loop-Strukturen über CD- und NMR-Untersuchungen nachgewiesen (Chandrasekhar 1991). Das Glycoprotein gp120 und speziell die V3-Loop ist hochglycosyliert (Back 1994) und diese Glycosylierung ist für die virale Funktion und Infektiösität des HIV-1 von Bedeutung (Schomming 1996). Daher sind synthetische V3-Loop Glycopeptide und Glycopeptidmimetika von Interesse für immunologische und konformationelle Untersuchungen. Die synthetischen Derivate sollten analog zu den untersuchten Peptiden (Chandrasekhar 1991) das GPGRAPH-Motiv und die N-seitig positionierte, natürliche und konservierte N-Glycosylierung (gp120-306) enthalten.



25 "Glucitol"

Abbildung 2.5.1: Das Glycosylaminosäureanalogon **25** als Mimetikum der N-glycosidischen Asn(GlcNAc)-Building-Blocks

Kürzlich wurde die Synthese des Glycosylaminosäureanalogs N^{α} -(9'-Fluorenylmethyloxycarbonyl)- N^{γ} -[3,4,6-tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-glucitol-2]-L-asparagin **25** als Mimetikum der N-glycosidischen Asn(GlcNAc)-Einheit vorgestellt (Schäfer 1998). Dieser festphasensynthetische Building Block ist durch eine neuartige Amidbindung zwischen der 2-Aminofunktion der Kohlenhydratkomponente und der Seitenkette der Aminosäure Asparagin charakterisiert. Diese unnatürliche Bindung soll die enzymatische Stabilität eines zu synthetisierenden Glycopeptidmimetikums gegenüber der natürlichen N-glycosidischen Struktur erhöhen. Eine weitere Stabilisierung erhält die Verbindung durch die Reduktion der zyklischen Acetalstruktur in einen zyklischen Ether (siehe Abbildung 2.5.1). Hier wird nun mit der Synthese des V3-Loop Glucitylpeptides **24** (siehe Abbildung 2.5.2) die Möglichkeit des Einsatzes des neuen

Glycosylaminosäuremimetikums demonstriert und ein interessantes Glycopeptidmimetikum charakterisiert, welches nun Zellproliferationsstudien zur Verfügung steht (Schreiber, mündliche Mitteilung).

Ac-Thr-Asn(Glucitol)-Asp-Thr-OH **23**

H-Ser-Asn(Glucitol)-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-His-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-OH **24**

Abbildung 2.5.2: In diesem Teil der Arbeit synthetisierte Glucitylpeptide **23** aus der Testsynthese zum generellen Einsatz des Building-Blocks und das HIV-1 V3-Loop Glucitylpeptid **24**, welches neben der konservierten natürlichen N-Glycosylierungsposition 306 C-terminal das GPGRF-Motiv enthält.

2.5.1 Synthese und Charakterisierung des HIV-1 V3-Loop Glucitylpeptides **24**

Zum Testen der generellen Einsatzmöglichkeit des Building-Blocks **25** wird am Peptidsynthesizer Pioneer (Perceptive Biosystems GmbH, Hamburg) die Synthese des Glucityltetrapeptides **23** durchgeführt (siehe Experimenteller Teil). Das am Rink-Linker tragendem PEGA-Harz (siehe Kapitel 2.2.1) synthetisierte acetylierte Glucityltetrapeptid wird nach HPLC-Reinigung in 21 % Ausbeute erhalten. Die *O*-Deacetylierung mit Natriummethanolat in Methanol ergibt das Glucityltetrapeptid **23** in 60 % Ausbeute. Die Verbindung wird massenspektrometrisch identifiziert. Die Gesamtausbeute von 13 % (bezogen auf die Belegung Harzes) ergibt eine ausreichende Substanzmenge zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung über ¹H¹H-COSY-Experimente. Zur bildlichen Darstellung der neuartigen Struktur in diesem Glucitylpeptid wird eine vereinfachte Metropolis Monte Carlo Energieminimierung mit dem Programm Hyperchem (Version 3, Hypercube Media Concepts inc., Boulder, Colorado, USA) durchgeführt. Diese vereinfachte Energieminimierung auf der Basis einer Freihandzeichnung mit einem Formeleditor läßt keine zuverlässigen Angaben über die Ausgangskonformation zu und soll keine Aussagen über bevorzugte Endkonformationen darstellen. Der einfache und unproblematische Einsatz dieses Programmes erzeugt jedoch ein übersichtliches Bild einer der möglichen Energieminima der Verbindung **23** und ist zur Anschauung gut geeignet (siehe Abbildung 2.5.3).

Die Synthese des V3-Loop Glucitylpeptides **24** wird in paralleler Syntheseführung mit der Fmoc-Pfp-Ester-Technik am Wang-Harz B1000 durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Der Einsatz des Glycosylaminosäureanalogons **25** in der Festphasensynthese als freie Aminosäure wird mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) als Peptidkupplungsreagenz durchgeführt. Nach der Festphasensynthese wird die *O*-Deacetylierung mit Hydrazin am polymeren Träger für sechs Stunden durchgeführt. Die Abspaltung der Verbindung vom Harz HPLC-Reinigung folgt die massenspektrometrische Identifizierung des Glucitylpeptides **24**. Neben der reinen Verbindung **24** zeigen sich mit 16 % bezogen auf die Belegung des Harzes deutliche Reste des triacetylierten Glucitylpeptides. Die Ergebnisse aus den *O*-Deacetylierungsreaktionen der Mucine lassen sich demnach nicht direkt auf dieses Glucitylpeptid übertragen. Längere Reaktionszeiten oder höhere Hydrazinkonzentrationen wären Ansätze für eine Optimierung bei zukünftigen

Synthesen. Interessanterweise lassen sich nur Spuren teilacetylierter Verbindungen nachweisen. Bei der *O*-Deacetylierungsreaktion mit Hydrazin scheinen demnach die auftretenden teilacetylierten Zwischenprodukte der Reaktion gegenüber dem triacetylierten Edukt bevorzugt zu reagieren. Ein schrittweiser Abbau der Acetatschutzgruppen scheint bei dieser Festphasenreaktion ungünstig zu sein.

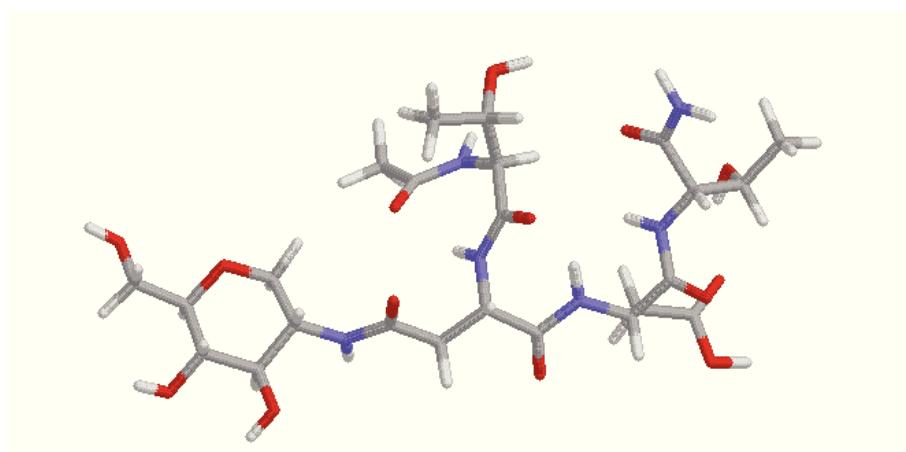


Abbildung 2.5.3: Ein anschauliches Bild einer der möglichen Energieminima des Glucitylpeptides **23**. Das Bild ist das Ergebnis einer vereinfachten Metropolis Monte Carlo Energieminimierung auf der Basis einer Freihandzeichnung (siehe Text).

Die Ausbeute der Synthese mit 14 % (bezogen auf die Belegung des Harzes) ergibt eine ausreichende Substanzmenge des Glucitylpeptides **24** zur Charakterisierung und für weitere Untersuchungen. Von einer Deacetylierung des entstandenen triacetylierten Glucitylpeptides wird vorerst abgesehen.

Die NMR-Charakterisierung des V3-Loop Glucitylpeptides **24** über $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Experimente führt zu einer vollständigen Zuordnung der Protonen. Die Präsenz der Glucitoleinheit wird durch die beobachteten NOE-Kontakte des Asp-2- δ -NH Protons zu dem Asn-2- β -CH und dem Glucityl-H-2 Protons demonstriert (siehe Abbildung 2.5.4). Die qualitative zeitlich gemittelte NOE-Signatur des V3-Glucitylpeptides **24** weist auf hauptsächlich ungeordnete Sequenzabschnitte ohne eine vorherrschende Konformation hin (siehe Abbildung 2.5.5). Dies beinhaltet auch die Umgebung der *N*-Glucitylierungsstelle, was einen Kontrast zu den beobachteten Wechselwirkungen zwischen den Kohlenhydratresten und dem Peptidrückgrat in den O-Glycopeptiden darstellt. Die vom Peptidrückgrat abgewandte Gestalt des Glucitolrestes in Abbildung 2.5.3 weist auch auf eine axiale Stellung zum Peptidrückgrat hin.

Die gemittelte NOE-Signatur an der Position Pro-12-Gly-13 und der N-N (*i,i*+2)-NOE-Kontakt zwischen Gly-13 und Ala-15 weisen auf das Vorliegen einer schwach ausgeprägten Turnstruktur hin (siehe auch bei den MUC1-Glycopeptiden). Diese Wechselwirkung überrascht, da bei den V3-Loop Peptiden mit einer ähnlichen Sequenz (RP-Peptide) die Ausbildung von Turnstrukturen nur beobachtet wurde, wenn das GPGRF-Motiv zentral in

der Peptidsequenz enthalten ist (Chandrasekhar 1991). Bei C-terminaler Lage des Motives wurden keine Hinweise auf ausgebildete Turnstrukturen erhalten. Die V3-Loop Peptidsequenz RP142 (YNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGC) zeigte eine dem Glucitylpeptid **24** vergleichbare, wenn auch stärker ausgeprägte NOE-Signatur.

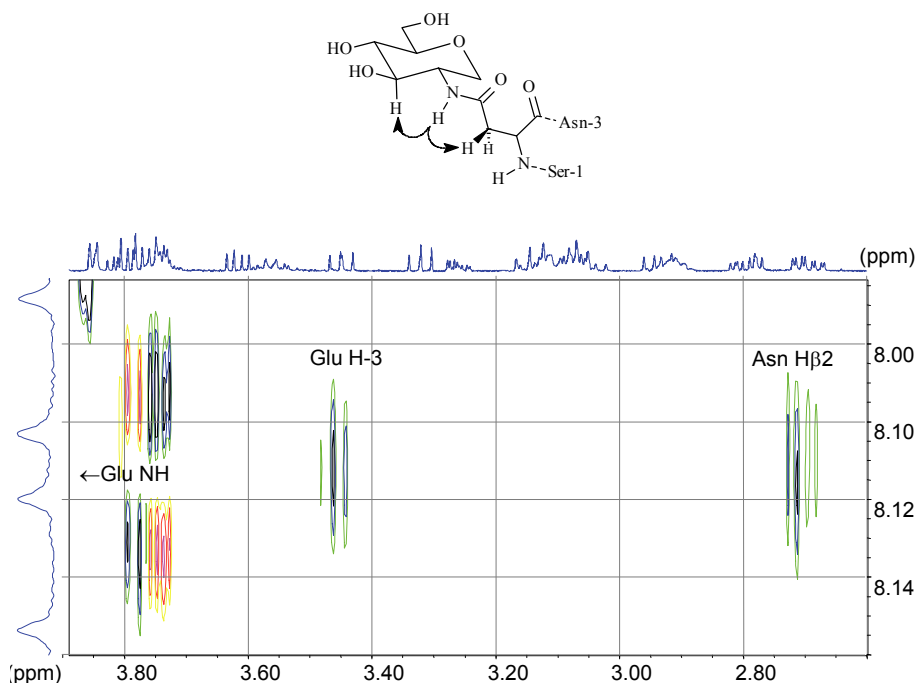


Abbildung 2.5.4: Ausschnitt aus dem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY Spektrum des Glucitylpeptides **24**. Gezeigt sind die Kreuzrelationen zwischen dem Asn2-NH Proton und dem Asn- β_2 - bzw. dem Glu-H-3-Proton (siehe Skizze oben). Dieser NOE-Kontakt zeigt die Bindung zwischen dem Glucitol und dem Peptidteil an.

	S-1	N-2	N-3	T-4	R-5	K-6	S-7	I-8	H-9	I-10	G-11	P-12	G-13	R-14	A-15	F-16
N- α (i,i)																
α -N(i,i+1)																
N-N (i,i+1)																
β -N (i,i+1)																
N-N (i,i+2)																

Abbildung 2.5.5: Qualitative zeitlich gemittelte NOE-Signatur des HIV-1 V3-Loop Glucitylpeptides **24**. Die NOE-Signatur an der Position Pro-13-Gly-13 und der N-N (i,i+2)-NOE-Kontakt zwischen Gly-13 und Ala-15 weisen auf das Vorliegen einer schwach ausgeprägten Turnstruktur hin.

Das Circular Dichroismus Spektrum des V3-Loop Glucitylpeptides **24** zeigt im Wesentlichen positive Effekte bei 184.4 nm und bei 192 nm, einen starken negativen Effekt bei 204.8 nm mit Schultern bei 199.4 nm und 211.8 nm, sowie einen negativen Effekt bei 226.6 nm (siehe Abbildung 2.5.6). Das CD-Spektrum zeigt eine für ungeordnete Peptidstrukturen (Random Coil Structure) typische Gestalt (siehe auch Abbildung 2.2.12). Die bei der qualitativen NOE-

Betrachtung beobachteten Hinweise auf eine schwach ausgeprägte Turnstruktur werden durch Circular Dichroismus nicht bestätigt.

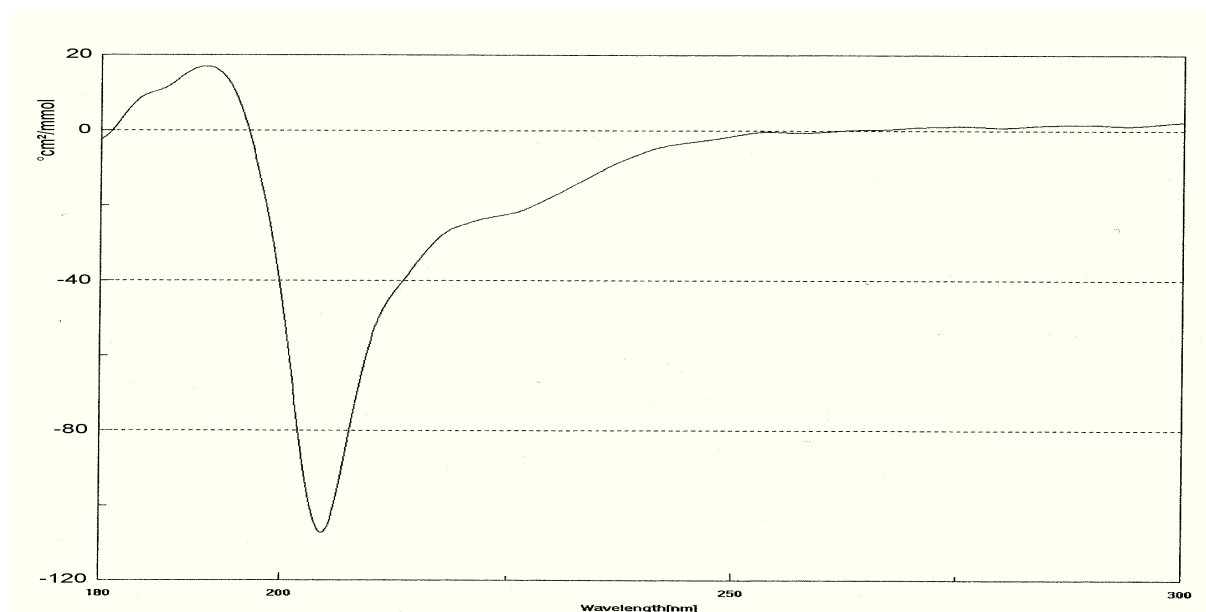


Abbildung 2.5.6: CD-Spektrum des HIV-1 V3-Loop Glucitylpeptides **24**. Das Spektrum ähnelt stark dem CD-Spektrum eines Peptides mit Random Coil Struktur (siehe Text).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich das neue Glycosylaminosäuremimetikum **25** hervorragend für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese eignet. Die erzielten Ausbeuten in den Glucitylpeptidsynthesen liegen bei 14 % und sind nicht optimiert. Der Glucitolrest des synthetisierten V3-Loop Glycopeptidanalogs läßt sich NMR-spektroskopisch nachweisen. Bei der Betrachtung der qualitativen zeitlich gemittelten NOE-Signatur und des CD-Spektrums fallen Hinweise auf eine Random Coil Struktur des V3-Loop Glucitylpeptides **24** auf. Bei Untersuchungen der Inkubation des V3-Loop Glucitylpeptides **24** mit T-Zellen zeigten sich keine inhibitorischen Effekte (Schäfer 1998). Dies zeigt, daß nun die antivirale Aktivität der Verbindung **24** bestimmt werden kann mit dem V3-Loop Glucitylpeptid **24** ein potentieller Kandidat für in vivo Applikationen vorliegt.

2.6 Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Chorio Gonadotropin β

In diesem Teil der Arbeit wird die Synthese von Peptidsequenzen aus dem humanen Chorio Gonadotropin β (hCG β) beschrieben. Das im Hypophysenvorderlappen gebildete glandotrope Peptidhormon hCG stimuliert die Progesteronbildung (siehe Einleitung). Die β -Untereinheit des hCG, ein 37 kD-Glycoprotein mit 139 Aminosäureeinheiten, enthält eine C-terminale Sequenzverlängerung gegenüber den verwandten Peptidhormone FSH, LH und TSH (Talmadge 1984). In diesem 23 Aminosäureeinheiten langen Sequenzabschnitt wurden vier O-glycosylierte Serinpositionen lokalisiert (Stockell 1992). Diese spezifische Glycosylierung der Serinpositionen neben unglycosylierten Serin- und Threonineinheiten weist auf die Beteiligung spezifischer Glycosyltransferasen bei der Biosynthese des hCG β hin (Brockhausen 1997). Bisher sind in der Familie der Glycosyltransferasen kein serinspezifischen Transferasen bekannt. Zur Identifizierung serinspezifischer Glycosyltransferasen in natürlichen heterogenen Enzymmischungen bedarf es Peptidsubstrate, die nicht von den bekannten Glycosyltransferasen glycosyliert werden. Die Sequenz des hCG β bietet sich für die Synthese derartiger Peptide an. Es werden zwei überlappende Peptidsequenzen aus der Sequenz des Humanen Chorio Gonadotropin β synthetisiert und charakterisiert (siehe Abbildung 2.6.1), die zur Untersuchung der Substrateigenschaften mit Glycosyltransferasen an Dr. I. Brockhausen (Hospital of Sick Children, Toronto) weitergegeben werden.

Ac-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH **10**

H-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-OH **28**

Abbildung 2.6.1: In diesem Teil der Arbeit synthetisierte Peptidsequenzen aus dem humanen Chorio Gonadotropin β .

Die Synthese der Peptide aus der Sequenz des hCG β wird in paralleler Syntheseführung mit der Fmoc-Pfp-Ester-Technik am Wang-Harz B1000 durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Die HPLC-Reinigung und NMR-Charakterisierung der beiden 20-mer Peptides wurden im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie (13.360) unter Anleitung durchgeführt (Öztürk 1998, Piezkalla 1999) und sind beschrieben im Anhang. Auf eine Analyse der Nebenprodukte der chromatographischen Reinigung wurde verzichtet. Die gereinigten hCG β -Peptidfragmente **10** und **28** werden massenspektrometrisch identifiziert. Die relativ gute Ausbeute der Synthese des Peptides **10** mit 35 % (bezogen auf die Belegung Harzes) ergibt eine ausreichende Substanzmenge zur Charakterisierung und für mögliche weitere Untersuchungen. Die Synthese des Peptides **28** wird mit einer Ausbeute von 100 % (bezogen auf die Belegung Harzes) durchgeführt. Dieses ausgezeichnete Ergebnis zeigt die Leistungsfähigkeit der gewählten Fmoc-Pfp-Ester Technik bei der Synthese geeigneter Peptidsequenzen. Diese quantitative Gewinnung der reinen Verbindung **28** demonstriert zudem die Möglichkeit der verlustfreien HPLC-Chromatographie.

Die NMR-Charakterisierung der hCG β -Peptidfragmente 10 und 28 zeigt eine hohe Reinheit beider Peptide. Die Analyse der aufgenommenen $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC, $^1\text{H}^1\text{H}$ -ECOSY und $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren erlaubt eine eindeutige Bestimmung der meisten Peptidresonanzen. Aus den erhaltenen Daten lassen sich keine Hinweise auf eine dominante Konformation der Peptide ermitteln (siehe Anhang). Die synthetischen Strukturen der Peptide **10** und **28** und ihre Reinheit werden bestätigt. Die Verbindungen wurden auf ihre Substratspezifität mit den Glycosyltransferasen GalNAc-T1 und GalNAc-T2 untersucht (Brockhausen, mündliche Mitteilung). Hierbei wurde keine signifikante Glycosylierung bei dem Einsatz dieser Transferasen beobachtet. Dies läßt auf die Einsetzbarkeit der hCG β -Peptide **10** und **28** bei der Suche nach serinspezifischen Glycosyltransferasen hoffen. Weitere Untersuchungen mit den Glycosyltransferasen GalNAc-T3 und GalNAc-T4 sind geplant.

3. Experimenteller Teil

Inhalt

3.1 Material	102
3.2 Darstellung der Aminosäurederivate	105
3.2.1 Synthese der Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester	105
3.2.2 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester	105
3.3 Derivatisierung des PEGA-Harzes mit dem Rink-Linker	108
3.4 Reaktionen an fester Phase	108
3.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die vollautomatische Festphasensynthese (AAV)	108
3.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatische Festphasensynthese (AAA)	108
3.4.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die manuelle Festphasensynthese (AAM)	109
3.4.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Azidreduktion mit Thioessigsäure (AAT)	110
3.4.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die <i>O</i> -Deacetylierung mit Hydrazinhydrat (AAH)	110
3.5 Synthese der Glycopeptide	110
3.5.1 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Glycophorin A ^N	110
3.5.2 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC1	119
3.5.3 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC2	133
3.5.4 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Immunodeficiency Virus	135
3.5.5 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Choriogonadotropin β	139

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

Sofern nicht abweichend angegeben, werden die eingesetzten technischen Geräte und Substanzen (Synthesequalität) von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Angegebene Lösungsmittelverhältnisse sind Volumenverhältnisse. Die zu den Synthesen eingesetzten Lösungsmittel werden absolutiert (Autorenkollektiv 1976). DMF (Peptide Grade, Perseptive Biosystems GmbH, Hamburg) wird vor dem Einsatz mit Dhbt-OH (Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) auf Aminfreiheit untersucht. Essigsäure wird bei 280 K ausgefroren. Thioessigsäure wird sechsmal kondensiert (273 K 78 K). Die Reinheit der Thioessigsäure wird gaschromatographisch an einer Rtx-5 Säule (Länge 30 m, Innendurchmesser 32 μm , Filmdicke 250 nm) mit Wasserstoff als Trägergas (2 mL/min , isotherm bei 332 K) überprüft. Mit Ausnahme der Peptidkupplungen werden die Reaktionen in Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Die Verfolgung der Reaktionen geschieht dünnschichtchromatographisch an Kieselgel 60 Aluminiumfolie (GF₂₅₄). Die Detektion erfolgt durch UV-Absorption, bei Glycosiden über Besprühen mit Schwefelsäure (10 % in Ethanol) und anschließende Wärmebehandlung. Halogenide werden mit Fluorescein (2 in Ethanol) und nachfolgend mit Wasserstoffperoxid (50 % in Essigsäure) besprüht, abschließend erwärmt und sofort detektiert. Aminosäuren werden über Besprühen mit Ninhydrin/Collidin (jeweils 4 % in 2-Propanol) und sachte Wärmebehandlung detektiert (Jork 1990).

Peptidkupplungen werden vollautomatisch an PEGA-Harz (M. Meldal, Carlsberg-Institut, Valby, Copenhagen, Denmark), derivatisiert mit Rink-Linker, automatisch an PEGA-Harz, derivatisiert mit Rink-Linker (Perseptive Applied Biosystems, Hamburg), oder manuell an Wang-Harz B1000 bzw. B1250 (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäure-Pfp-ester erfolgt über Dhbt-Aktivester (Atherton 1988). Die Farbveränderung des Harzes, hervorgerufen durch Ionenpaare des Dhbt-OH mit freien Aminogruppen am Harz, wird hierbei als Indikator für das Fortschreiten der Reaktion verwendet. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren erfolgt über in situ-Aktivierung mit TBTU (Fluka, s.o.) oder HATU (Perseptive, s.o.).

Die vollautomatische Synthese der Glycopeptide aus dem humanen Glycophorin A **15**, **16** und **26** wird in einem vollautomatischen Peptidsynthesizer nach dem Continuous Flow Verfahren durchgeführt (Dryland 1986), wobei alle Wasch- und Fmoc-Abspaltungs-Zyklen über das Computerprogramm Pepsyn gesteuert werden (Meldal, s.o.). Die Aminosäuren werden als Fmoc-Dhbt-Ester (Ser und Thr, Bachem, s.o.) oder Fmoc-Pfp-Ester (Calbiochem/Nova Biochem GmbH, Bad Soden/TS.) in Teflongefäße eingewogen, aus denen sie während der Kupplungsreaktion nacheinander herausgewaschen und zyklisch durch die Reaktionszelle gepumpt werden. Das in einer Glassäule befindliche Harz wird kontinuierlich mit den gewünschten Reaktionslösungen durchspült (1.44 mL/min). Während der Kupplungsreaktion wird die Farbveränderung des Harzes mittels einer Photozelle bei $\lambda = 440 \text{ nm}$ gemessen und die Daten werden elektronisch erfaßt. Eine graphische Auftragung der Farbintensität wird auf

einem Monitor wiedergegeben und dient der visuellen Kontrolle. Bei konstanter Transmission kann die Reaktion automatisch oder manuell abgebrochen werden. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird über das Auftreten des Dibenzofulvenadduktes mittels eines UV-Spektrometers bei $\lambda = 320 \text{ nm}$ verfolgt.

Die automatische Synthese der Verbindung **23** wird in dem Peptidsynthesizer Pioneer (Perseptive, s.o.) nach dem Continuous Flow Verfahren durchgeführt, wobei alle Kupplungs-, Wasch- und Fmoc-Abspaltungs-Zyklen über das angehörige Computerprogramm gesteuert werden. Die Fmoc-Aminosäuren (Perseptive, s.o.) werden zusammen mit HATU bzw. im Falle des Building Blocks **25** mit TBTU in Glasgefäße eingewogen, aus denen sie während der Kupplungsreaktion nacheinander herausgewaschen und durch die Reaktionszelle gepumpt werden. Das in einer Glassäule befindliche Harz wird kontinuierlich mit den gewünschten Reaktionslösungen durchspült. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird über die Verfolgung des Auftretens des Dibenzofulvenadduktes mittels eines UV-Spektrometers bei $\lambda = 320 \text{ nm}$ kontrolliert.

Die manuelle Synthese der Glycopeptidsequenzen aus den humanen Mucinen **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22** und **27**, dem HIV **24** und dem hCG β **10** und **28** wird in einer D4-Glasfritte (Gudenrath, Hamburg) nach dem Batch-Verfahren durchgeführt (Merrifield 1963), wobei das Harz ohne manuelle Durchmischung mit der Reaktionslösung bedeckt wird. Die Veresterung des Wang-Harzes mit der ersten C-terminalen Aminosäure geschieht nach BLANKEMEYER-MENGE (1990). Die unglycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester (Kisfaludy 1989) werden im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums der Organischen Chemie an der Universität Hamburg synthetisiert (siehe Anhang). Die Verfolgung der Peptidkupplungen erfolgt optisch über das Verblässen der Gelbfärbung des Dhbt-OH (s.o.).

Azidreduktionen werden IR-spektroskopisch verfolgt. Die Infrarotspektren werden mit einem FT-IR Spektrometer 1720X (Perkin-Elmer Cooperation, Überlingen) oder einem Genesis FT-IR 1001 (ATI Mattson) aufgenommen. Zur Reduktionsverfolgung werden während der Reaktion Harzproben entnommen, gewaschen (D4-Glasfritte, Dichlormethan), im Hochvakuum getrocknet und zu KBr-Presslingen verarbeitet. Die Auswertung erfolgt über die Bestimmung der Extinktionen $[E_\lambda]$ (LAMBERT-BEER), aus denen der theoretische Endpunkt der Reduktion bestimmt wird, indem die Werte gegen die Reaktionszeit $[t]$ aufgetragen werden und über eine lineare Regression extrapoliert werden (Atkins 1988).

MPLC-Reinigungen werden mit destillierten Lösungsmitteln bei 150-600 kPa an Kieselgel 60 (63-200 μm) durchgeführt. HPLC-Trennungen werden an der Niederdruckgradientenpumpe L-6250 und dem Diodenarray-Detektor L-3000 durchgeführt und die Chromatogramme mit der DAD-Manager-Software LiChrograph Version 4 aufgenommen. Hierbei werden filtrierte und entgaste Lösungsmittel verwendet: Eluent A: 1 TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: 1 TFA in wässrigem Acetonitril (98 %, HPLC grade, Johnson Matthey Alfa Products, Karlsruhe). Analytische Trennungen werden an einer Lichrosorb RP-18 Säule (250x4, 5 μm , 1 mL/min), präparative Trennungen an einer Lichrospher RP-18 Säule (250x25, 10 μm , 10 mL/min) oder einer Lichrosorb RP-18 Säule (250x25, 7 μm , 10 mL/min) durchgeführt.

Ultrafiltrationen werden in einer Ultrafiltration-cell 8050 (50 mL) mit einer Diaflo Ultrafiltration-membran YM2 (1000 Da, Amicon GmbH, Witten) bei 355 kPa durchgeführt. Schmelzpunkte werden bestimmt am Polarisationsmikroskop BH (Olympus Winter & Ibe GmbH, Hamburg) mit Heiztisch TP 82 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen). Gefriertrocknungen erfolgen an einer Beta 1102 (Christ Medizinischer Apparatebau, Osterode/Harz). Quantitative Aminosäureanalysen werden an einem LKB Alpha Plus Amino Acid Analyzer (Pharmacia Biotech GmbH, Gießen) nach Hydrolyse der Glycopeptide mit HCl (6 mol/L) bei 383 K (24 h) durchgeführt (Carlsberg-Institut, s.o.).

Optische Drehungen werden mit einem Polarimeter 243 (Perkin-Elmer, s.o.) in 1 dm-Küvetten bei 589 nm bestimmt. Circular Dichroismus wird vermessen am Spectropolarimeter J-500 (Jasco Labor und Datentechnik, Groß Umstadt) über einen Bereich von 180-300 nm in einer 1 cm Quarzglasküvette. Die Scangeschwindigkeit beträgt 5.0 nm/min . Wasser als Lösungsmittel wird separat vermessen und rechnerisch subtrahiert, die aufgenommenen Differenzspektren werden geglättet.

ESI-Massenspektren werden an einem Triple Quadrupol Electrospray Mass Spectrometer VG-Quattro (VG Microtech, Uckfield, East Sussex, England) im positive mode aus wässrigem Acetonitril (50 %) aufgenommen (Carlsberg-Institut, s.o.). FAB-Massenspektren werden an einem doppelt focussierten Massenspektrometer VG-Analytical 70-250 S aufgenommen (VG Microtech, s.o.), als Matrix dient 3-Nitrobenzylalkohol. MALDI-TOF-Massenspektren werden aufgenommen am Biflex III (Bruker, s.o.) im positiv reflector mode aus wässrigem Acetonitril (33 %). Es werden 20 shots des N_2 -Lasers (337 nm) kumuliert und DHB (10 µg/µL) als Matrix verwendet.

NMR-Spektren werden am AC 250P, AMX 400 und DRX 500 (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen) bei 300 K aufgenommen. Bei Messungen in organischen Lösungsmitteln dient Tetrametylsilan ($\delta = 0.000 \text{ ppm}$), bei Messungen in D_2O und $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) dient Aceton ($\delta = 2.222 \text{ ppm}$) als interner Standard für ^1H -NMR-Spektroskopie. Bei ^{13}C -NMR-Messungen wird TFA ($\delta = 115.70 \text{ ppm}$) als Standard gesetzt. Für ^1H -NMR-Spektren werden 1024 Scans (AMX 400) oder 128 Scans (DRX 500) kumuliert. Für ^{13}C -NMR-Spektren werden, soweit nicht abweichend angegeben, 10 K Scans (AMX 400) oder 1024 Scans (DRX 500) kumuliert. Die Zuordnung der Signale erfolgt über ^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -TOCSY- und ^1H - ^1H -NOESY-Experimente sowie über ^1H - ^{13}C -HMQC- und ^1H - ^{13}C -HMBC-Experimente. ^1H - ^1H -TOCSY-Experimente werden mit einer Mischzeit von 90 ms aufgenommen, ^1H - ^1H -NOESY-Experimente mit einer Mischzeit von 300 ms. Eindimensionale NMR-Spektren werden mit der Software WINNMR (Versionen 3.0 bis 6.0) bearbeitet. Zweidimensionale NMR-Spektren werden an einer Workstation Aspect X32 mit der Software UXNMR (Version 940101) oder an einem PC Pentium-S 166 MHz mit der Software WINNMR-2D (Versionen 950901.6 oder 6.0) bearbeitet (alles Bruker, s.o.). Die Auswertung der Kopplungskonstanten erfolgt nach erster Ordnung. Die Aufnahme- und Prozessierungsparameter sind bei den einzelnen Verbindungen aufgeführt.

Konformationelle Aspekte werden mit einem Framework Molecular Models Stecksystem (Prentice-Hall, Eaglewood Hills, New Jersey, USA) oder mit dem Programm Hyperchem (Version 3, Hypercube Media Concepts inc., Boulder, Colorado, USA) überprüft.

3.2 Darstellung der Aminosäurederivate

3.2.1 Synthese der Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester

Für die manuelle Festphasensynthese verwendete unglycosylierte Fmoc-Aminosäure-Pfp-ester werden im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums der Organischen Chemie an der Universität Hamburg hergestellt. Die Substanzen werden in Ethylacetat aus den Fmoc-Aminosäuren und Pentafluorphenol in Gegenwart von DCC synthetisiert (Kisfaludy 1989). Die hierbei erzielten Reaktionsausbeuten sind in der Tabelle 3.1 aufgezeigt. Hierbei konnten die Ausbeuten von KISFALUDY (1989) zum Teil nicht reproduziert werden. Die Problematik der Darstellung liegt in der fraktionierten Kristallisation, die in einigen Fällen die Ausbeuten stark beeinflußt hat. Das gebildete Nebenprodukt Dicyclohexylharnstoff ist aus der Reaktionslösung quantitativ auszukristallisieren, bevor der Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester kristallisiert werden kann. Die Reinheit der Substanzen wird über ¹H-NMR-Spektroskopie und den Schmelzpunkt ermittelt. Die beteiligten Praktikanten sind in der Danksagung aufgeführt.

Fmoc-Aminosäure	Ausbeute / Schmelzpunkt		Fmoc-Aminosäure	Ausbeute / Schmelzpunkt	
	Ergebnis	Literatur		Ergebnis	Literatur
Ala	81 % / 171 °C	93 % / 171 °C	Leu	90 % / 115 °C	96 % / 114 °C
Arg (Pmc)	9 % / 123 °C	- / -	Phe	87 % / 154 °C	93 % / 154 °C
Gln	97 % / 150 °C	97 % / 151 °C	Pro	80 % / 126 °C	82 % / 127 °C
Glu (^t Bu)	33 % / 118 °C	- / -	Ser (^t Bu)	96 % / 34 °C	- / -
Gly	88 % / 160 °C	99 % / 160 °C	Thr (^t Bu)	85 % / < RT	- / -
His (Trt)	18 % / 98 °C	- / -	Val	25 % / 121 °C	85 % / 122 °C
Ile	77 % / 95 °C	78 % / 96 °C			

Tabelle 3.1: Daten der Veresterungen der Fmoc-Aminosäuren mit Pentafluorphenol nach KISFALUDY (1989).

3.2.2 Synthese der glycosylierten Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester

Die Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Glycophorin A **15**, **16** und dem humanen Mucin MUC1 **17** wird über das Glycosylazidverfahren durchgeführt (BIELEFELDT 1992). Die hierfür verwendeten glycosylierten Fmoc-Aminosäurederivate **8** und **9** werden wie unten beschrieben hergestellt.

Die Glycopeptidsequenzen aus dem humanen Mucin MUC1 **18**, **19**, **20**, **21**, und **22** werden über das Glycosylacetamidverfahren dargestellt (Frische 1996). Die hierfür verwendeten glycosylierten Fmoc-Aminosäurederivate **11** und **12** sind im Anschluß beschrieben.

Für die Synthese der Glycopeptidmimetika **23** und **24** wird der Glucitol-Building-Block **25** verwendet, der für die hier beschriebenen Synthesen zur Verfügung gestellt wurde (Schäfer 1998).

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threoninpentafluorphenylester (**8**) und N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serinpentafluorphenylester (**9**)

Die Synthese ist eingehend beschrieben, eine exakte Arbeitsanweisung ist zu finden in KLICH (1994). Alle Substanzen sind über ^1H -NMR, optischen Drehwert und Schmelzpunkt identifiziert. Die Schmelzpunkte konnten in einigen Fällen korrigiert werden.

Die Darstellung der Glycosylakzeptoren N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-threoninpentafluorphenylester (**6**) und N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-serinpentafluorphenylester (**7**) erfolgt ausgehend vom L-Serin bzw. L-Threonin. Die Fmoc-Schutzgruppe wird eingeführt nach PAQUET (1982) in wässrigem Aceton (50 %) mit 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat über Natriumhydrogencarbonat in 41 % (Ser, Smp.: 87 °C) bzw. 96 % (Thr, Smp.: 85 °C) Ausbeute [Lit.: Ser, 89 %, Smp.: 87 °C; Thr, 95 %, Smp.: 85 °C]. Die Veresterung von N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-serin und N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-threonin mit Pentafluorphenol geschieht in Ethylacetat in Gegenwart von DCC nach KISFALUDY (1982). Die Threononverbindung **6** wird in 36 % Ausbeute erhalten (Smp.: 130 °C), das Serinderivat **7** in 62 % Ausbeute (Smp.: 128 °C) [Lit.: Ser, 84 %, Smp.: 125 °C; Thr, 77 %, Smp.: 126 °C].

Die Synthese des Glycosyldonors 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosylchlorid (**5**) geht aus von 3,4,6-Tri-*O*-acetylalactal (**1**). Dieses wird in Acetonitril mit Natriumazid in Gegenwart von Diammoniumcer(IV)hexanitrat in 54 % Ausbeute zum 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylnitrat (**2**) umgesetzt (Lemieux 1979). Der exakte Schmelzpunkt beträgt 103.8 °C [Lit.: 53 %, Smp.: 102-103 °C]. 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-galactopyranose (**3**) erhält man hieraus über die Umsetzung mit Natriumacetat in Essigsäure nach LEMIEUX (1979) in 61 % Ausbeute und mit einem Schmelzpunkt von 105.3 °C [Lit.: 61 %, Smp.: 103 °C]. Das Glycosylacetat **3** wird mit Titan-tetrabromid in Dichlormethan in 95 % Ausbeute zu 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**4**) nach umgesetzt (Paulsen 1978). Das Glycosylbromid **4** kristallisiert in farblosen Rhomben, der Schmelzpunkt beträgt 101.3 °C [Lit.: Smp.: 95 °C]. Die Ausbeute ist nicht beschrieben, da Verbindung **3** ohne Kristallisation direkt umgesetzt wurde. Entgegen der Angabe sind die aus Diethylether kristallisierten farblosen Rhomben nur mäßig hydrolyseempfindlich und in normaler Atmosphäre bei 250 K über sechs Monate lagerfähig. Das Glycosylchlorid **5** wird schließlich durch eine Anomerisierung mit Tetraethylammoniumchlorid in Acetonitril in 72 % Ausbeute erhalten (Adachi 1977). Die aus Diethylether kristallisierten farblosen Rhomben weisen einen Schmelzpunkt von 133.5 °C auf [Lit.: 81 % (bezogen auf Verbindung **3**), Smp.: 102 °C].

Die Glycosidsynthese zu den Verbindungen **8** und **9** wird ausgehend von den oben beschriebenen Glycosylakzeptoren und -donoren im Grammaßstab durchgeführt mit ansonsten zu BIELFELDT (1992) identischen Reaktionsbedingungen. Die chromatographische Reinigung wird in Abweichung dazu über MPLC durchgeführt. Hierbei wird in Petrolether (60/70)/Ethylacetat = 4:1 (**8**) bzw. 3:1 (**9**) isokratisch chromatographiert. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung wird für Verbindung **8** in Chloroform / Methanol = 80:1 vorgenommen. Die Ausbeuten sind 73 % (Smp.: 78.4 °C) für das Threoninderivat **8** und 60 % (Smp.: 72.7 °C) für die Serinverbindung **9** [Lit.: Ser, 70 %, α/β = 6:1, Smp.: 73 °C; Thr, 78 %, α/β = 14:1, Smp.: 78 °C].

Die Gesamtausbeute bezogen auf 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**1**) liegt bei 16 % für die Threoninverbindung **9** und bei 14 % für das Serinderivat **8**.

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threoninpentafluorphenylester (**11**) und N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serinpentafluorphenylester (**12**)

Die Synthese nach FRISCHE (1996) bedient sich derselben Glycosylakzeptoren (**6** und **7**, s.o.) wie die Synthese nach BIELFELDT (1992).

Als Glycosyldonor wird 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**13**) verwendet (Grundler 1984). Dessen Synthese geht aus vom Glycosylnitrat **2**, das durch Diazotierung mit Natriumnitrit in Dioxan und anschließender Hydrolyse mit Wasser in 66 % Ausbeute zu 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranose (**14**) umgesetzt wird [Lit.: 66 %]. Das Glycosyltrichloracetimidat **13** wird in Dichlormethan mit Trichloracetonitril über Kaliumcarbonat in 60 % Ausbeute erhalten [Lit.: 60 %].

Die Glycosidsynthese zu den Azid-Building-Blocks **8** und **9** wird ausgehend von den Verbindungen **6**, **7** und **11** über TMSOTf-Katalyse in Dichlormethan (**8**) bzw. in Dichlormethan/Toluol (1:1) (**9**) durchgeführt. Die Threoninverbindung **8** wird im Zehn-Gramm-Maßstab mit 64 % Ausbeute erhalten und über MPLC mit ungetrocknetem Kieselgel chromatographiert [Lit.: 82 %]. Im Falle der Verbindung **9** wird bei der Reinigung über Säulenchromatographie erhebliche Hydrolyse beobachtet (Ausbeute 20 %), bei der MPLC-Reinigung hingegen konnte auch bei Einsatz ungetrockneten Kieselgels eine Ausbeute von 75 % erzielt werden [Lit.: 80 %, α/β = 6:1]. Die Reduktion der Azidgruppen in den Verbindungen **8** und **9** wird in THF/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) mit Zinkpulver im Überschuß durchgeführt. Die Produkte **11** und **12** können ohne Chromatographie zur Peptidsynthese verwendet werden und sind in normaler Atmosphäre bei 250 K über sechs Monate lagerfähig.

Die Gesamtausbeute bezogen auf 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**1**) liegt bei 14 % für die Threoninverbindung **11** und bei 14 % für das Serinderivat **12**.

3.3 Derivatisierung des PEGA-Harzes mit dem Rink-Linker

Polyethylenglycoldimethylacrylamido-[N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-p-(α -amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxy]-acetat (PEGA-Rink)

N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-p-(α -amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxyessigsäure (Fmoc-Rink, 374 mg, 693 μmol) wird bei RT mit 4-Ethylmorpholin (100 mg, 866 μmol) und 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-oxo-tris(pyrrolidinophosphonium)hexafluorophosphat (186 mg, 578 μmol) in 1.2 mL DMF gelöst und 1 h im Dunkeln gehalten. Währenddessen wird Polyethylenglycoldimethylacrylamidcopolymer (PEGA, 1.100 g, Belegung 175 $\mu\text{mol}/\text{g}$, 193 μmol) mit Piperidin (20 % in DMF) und DMF gewaschen, schließlich mit der obigen Lösung versetzt und mit 800 μL DMF überschichtet. Nach zwei Stunden wird filtriert, mit DMF (5x2 min) gewaschen, 20 min mit Acetanhydrid behandelt und wieder mit DMF (5x2 min) gewaschen. Nach Durchführung des Tests auf freie Amine mit Dhbt-OH wird mit DMF und Dichlormethan gewaschen (je 5x2 min) und im Hochvakuum getrocknet.

Auswaage: 1.478 g PEGA-Rink.

3.4 Reaktionen an fester Phase

3.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die vollautomatische Festphasensynthese (AAV)

Polyethylenglycoldimethylacrylamido-[N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-p-(α -amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxy]-acetat PEGA-Rink (257.0 mg, Belegung 175 $\mu\text{mol}/\text{g}$, 45 μmol) wird bei RT in eine Glassäule überführt, die an den Peptidsynthesizer angeschlossen wird. Es werden die Fmoc-Dhbt-Ester (Ser und Thr) oder Fmoc-Pfp-Ester, vermengt mit Dhbt-OH (1 eq, bezogen auf die Fmoc-Aminosäure-Pfp-ester), entsprechend der gewünschten Sequenz in den mit Teflonblöcken bestückten Autosampler eingewogen. In Bezug auf die Belegung des Harzes werden 3 eq Aminosäurederivat bzw. 1.5 eq der Azid-Building-Blocks **8** und **9** eingesetzt. Zur Fmoc-Abspaltung wird Piperidin (20 % in DMF) 10 min durch die Reaktionssäule gepumpt. Daraufhin werden die Säule und die Leitungen für 25 min mit DMF gespült und der erste Aminosäureaktivester wird, in DMF gelöst, zyklisch durch die Reaktionssäule gepumpt. Nach Beendigung der Kupplung wird das System 25 min mit DMF gespült und die Synthese mit dem nächsten Fmoc-Abspaltungsschritt fortgesetzt. Nachdem die Fmoc-Abspaltung und das Waschen der letzten gekuppelten Aminosäure den Zyklus beendet haben, wird Acetanhydrid (50 % in DMF) 5 min durch die Zelle gepumpt, das Harz weitere 20 min darin belassen und wie zuvor gewaschen. Nach Entnahme aus der Glassäule wird das Harz mit DMF und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

3.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatische Festphasensynthese (AAA)

Polyethylenglycoldimethylacrylamido-[N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-p-(α -amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxy]-acetat (PEGA-Rink) (Belegung 180 $\mu\text{mol}/\text{g}$) wird bei RT in eine im Volumen variable, mit Teflonstopfen verstellbare Glassäule überführt, die an den Peptidsynthesizer angeschlossen wird. Es werden die Fmoc-Aminosäuren in den mit Gläschen

bestückten Autosampler entsprechend der gewünschten Sequenz eingewogen. In bezug auf die Belegung des Harzes werden 4 eq Aminosäurederivat bzw. 2 eq des Glucitol-Building-Blocks **25** eingesetzt. Zur Fmoc-Abspaltung wird Piperidin (20 % in DMF) 10 min durch die Reaktionssäule gepumpt. Daraufhin werden die Säule und die Leitungen für 25 min mit DMF gespült und das erste Aminosäurederivat wird, in DMF gelöst, durch die Reaktionssäule gepumpt. Nach Beendigung der Kupplung wird das System 25 min mit DMF gespült und die Synthese mit dem nächsten Fmoc-Abspaltungsschritt fortgesetzt. Nachdem die Fmoc-Abspaltung und das Waschen der letzten gekuppelten Aminosäure den Zyklus beendet haben, wird Acetanhydrid (50 % in DMF) 5 min durch die Zelle gepumpt, das Harz weitere 20 min darin belassen und wie zuvor gewaschen. Nach Entnahme aus der Glassäule wird das Harz mit DMF und Methanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

3.4.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die manuelle Festphasensynthese (AAM)

Alle Reaktionen werden in größtmöglichen Konzentrationen durchgeführt, was vom sehr unterschiedlichen Quellverhalten der verschiedenen Harze und der Änderung des Verhaltens während der Synthesen bestimmt wird. Das Lösungsmittelvolumen wird hierbei sowie bei allen Waschschritten eben bis zur vollständigen Bedeckung des Harzes erhöht.

Wang-Harz B1000 (Belegung 450 $\mu\text{mol/g}$) bzw. B1250 (Belegung 950 $\mu\text{mol/g}$) wird in eine D4-Glasfritte überführt. Die Veresterung des Harzes mit der ersten Aminosäure wird nach dem Quellen des Harzes in Dichlormethan (5x2 min) und anschließendem Trockensaugen durchgeführt. Verestert wird, gelöst in Dichlormethan, bei RT binnen 2 h mit der Fmoc-Aminosäure, aktiviert durch MSNT (1 eq, bezogen auf die Fmoc-Aminosäure) in Gegenwart von Methylimidazol (0.75 eq, bezogen auf die Fmoc-Aminosäure). Nach einfachem Absaugen der Lösung wird die Reaktion wiederholt. Nach dem Waschen mit Dichlormethan und DMF (jeweils 10x2 min) wird zur Fmoc-Abspaltung Piperidin (20 % in DMF, 2x10 min) auf das Harz gegeben und anschließend wieder gewaschen (DMF, 10x2 min). Für die Peptidkupplungen werden in bezug auf die Belegung des Harzes 3 eq Aminosäurederivat bzw. 1.5 eq glycosyliertes Aminosäurederivat eingesetzt. Die Kupplungen der Aminosäuren werden im Falle der Fmoc-Dhbt-Ester (Ser und Thr) oder Fmoc-Pfp-Ester (übrige Aminosäuren, vermischt mit Dhbt-OH, 1 eq) nach Verschwinden der Gelbfärbung abgebrochen. Die Reaktion wird dabei frühestens nach 3 h beendet. Spätestens nach 22 h wird die Kupplung bei noch bestehender Verfärbung nach einfachem Absaugen der Lösung wiederholt. Nach dem Auswaschen der Reaktionslösung (DMF, 10x2 min) wird der Reaktionszyklus mit der Fmoc-Abspaltung fortgesetzt. Der letzten Fmoc-Abspaltungsreaktion folgt das Waschen mit DMF und Methanol (jeweils 10x2 min). Nach Entnahme aus der Glasfritte wird das Harz im Hochvakuum getrocknet.

3.4.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Azidreduktion mit Thioessigsäure (AAT)

Ein Teil des Harzes wird in einer Schlenkfritte bei RT mit frisch kondensierter Thioessigsäure (Reinheit 99.8 %) versetzt. Nach einer Stunde wird die Säure abfiltriert und durch frisches Reagenz ersetzt. Weitere Erneuerungen geschehen nach drei Stunden, nach sieben Stunden und des weiteren alle sieben Stunden. Die Thioessigsäure wird unter Stickstoffatmosphäre bei 250 K gelagert. Die Reduktion wird IR-spektroskopisch anhand der Intensitätsabnahme der Azidbande bei $\nu = 2114 \text{ cm}^{-1}$ verfolgt (KBr-Pressling: 1 mg Harz, 100 mg KBr, wasserfrei). Eine lineare Regression der ersten drei Meßwerte ergibt einen theoretischen Endpunkt der Reaktion. Hiernach wird das Harz abfiltriert, mit Dichlormethan, Methanol, Toluol, Methanol und Diethylether gewaschen (je 3x2 min) und im Hochvakuum getrocknet.

3.4.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die O-Deacetylierung mit Hydrazinhydrat (AAH)

nach Quellen des Harzes in Methanol (5x2 min) und anschließendem Trockensaugen wird ein Teil des Harzes in einer Glasfritte mit einer methanolischen Lösung des Hydrazinhydrates (130 μL $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1 mL MeOH) bis zur vollständigen Bedeckung versetzt. Nach drei Stunden wird dies nach einfachem Absaugen der Lösung wiederholt. Nach weiteren drei Stunden wird das Harz abfiltriert, mit Methanol und Diethylether gewaschen (je 5x2 min) und im Hochvakuum getrocknet.

3.5 Synthese der Glycopeptide

3.5.1 Synthese der Glycopeptidsequenzen aus dem humanem Glycophorin A^N

Ac-His-Thr-Ser-Thr-Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Lys-*NH*₂ (**26**)

PEGA-Rink (257 mg, Belegung: $175 \mu\text{mol/g}$, 45 μmol) wird nach AAV in den Peptidsynthesizer überführt.

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Lys(Boc)-Pfp (85.3 mg, 3 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (75.0 mg, 3 h), Fmoc-Val-Pfp (77.9 mg, 5 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (71.1 mg, 4 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (71.1 mg, 4 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (71.1 mg, 4 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (73.0 mg, 4'30'' h), Ser(^tBu)-Dhbt (71.1 mg, 5 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (73.0 mg, 5 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (86.5 mg, 6 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (21.7 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (332.3 mg) wird in drei Aliquoten für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 70:30 (10 min) → 60:40 (20 min) → 50:50 (5 min)].

Insgesamt werden 19.9 mg (18.51 μmol) des Decapeptides **26** erhalten (41 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

ES⁺MS kalkuliert für C₄₃H₇₂N₁₄O₁₈ (1075.15 ^g/mol): *M* = 1074.53; gefunden (>10 %): (*M*+2*H*)²⁺/2, 538.58 (100 %); (*M*+*H*+*Na*)²⁺/2, 549.71 (67 %); (*M*+*H*+*K*)²⁺/2, 558.12 (28 %).
 CD (°cm²/mmol, *c* = 58.1 ^μmol/L): ε_{max} = (+) 20.34 (190.0 nm); (+) 11.03 (197.0 nm); (-) 94.62 (204.0 nm); (-) 22.68 (224.4 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: *c* = 13.2 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
cosy90	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	8.926 ppm 3571 Hz	2048	256 / 1024	16	sine ssb = 0
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.920 ppm 4961 Hz	4096	256 / 1024	8	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.920 ppm 4961 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2
cosydfprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.920 ppm 4961 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2
inv4gs	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	8.926 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	16	sine ssb = 4/6
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.920 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	32	sine ssb = 8

¹H-NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ	Hε	NH	CH ₃	H-2	H-4
His-9	8.442 (7.8)	4.793 (6.1) (8.5)	3.385 (16.0)	3.187							8.629 (1.4)	7.330
Thr-10	8.227 (7.6)	4.455 (4.8)	4.267 (6.8)		1.227							
Ser-11	8.293 (7.0)	4.529 (6.0) (6.0)	3.958 (12.0)	3.915								
Thr-12	8.242 (7.8)	4.453 (4.8)	4.326 (6.8)		1.246							
Ser-13	8.343 (7.0)	4.545 (6.0) (5.6)	3.939 (12.0)	3.892								
Ser-14	8.293 (7.0)	4.547 (6.0) (5.6)	3.927 (12.0)	3.881								
Ser-15	8.475 (7.0)	4.602 (6.0) (6.0)	3.951 (12.0)	3.909								
Val-16	8.072 (7.8)	4.230 (7.6)	2.143 (6.8) (6.8)		0.978	0.972						
Thr-17	8.170 (7.6)	4.361 (5.8)	4.200 (6.2)		1.233							
Lys-18	8.282 (7.2)	4.332 (9.6) (5.8)	1.880 (14.4) (8.0)	1.799 (4.8)	1.478 (8.0)	1.463 (8.0)	1.712 (8.0)	3.015 (6.0)	7.450			
Ac/NH ₂	7.066									7.528	2.032	

^{13}C -NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	C α	C β	C γ_1	C γ_2	C δ	C ϵ	CH $_3$	C-2	C-4	C-5
His-9	173.20	53.55	27.32						134.53	118.15	129.47
Thr-10	172.76	59.83	67.90	19.72							
Ser-11	172.84	56.46	61.98								
Thr-12	172.74	59.99	68.15	19.72							
Ser-13	172.94	56.59	62.01								
Ser-14	172.79	56.63	61.88								
Ser-15	173.05	56.59	61.98								
Val-16	174.62	60.69	30.92	19.31	18.65						
Thr-17	172.54	60.08	67.93	19.69							
Lys-18	177.19	54.25	31.30	22.99		27.17	40.16				
Ac	175.15							22.61			

***Ac*-His-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Val-Thr-Lys-NH $_2$ (**15**)**

Synthese und Charakterisierung des Glycopeptides **15** sind ausführlich beschrieben (Klich 1994). Der Vollständigkeit der Daten halber ist die Substanz hier mit aufgenommen.

PEGA-Rink (257 mg, Belegung: 175 $\mu\text{mol/g}$, 45 μmol) wird nach AAV in den Peptidsynthesizer überführt.

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Lys(Boc)-Pfp (85.7 mg, 3 h), Fmoc-Thr(t Bu)-Dhbt (76.0 mg, 3 h), Fmoc-Val-Pfp (78.3 mg, 5 h), **9** (54.5 mg, 2 h), **9** (54.5 mg, 2 h), **9** (54.5 mg, 1'30'' h), **8** (55.4 mg, 1'30'' h), **9** (54.5 mg, 1 h), **8** (55.4 mg, 1 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (86.9 mg, 3 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (22.0 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (394.2 mg) wird in vier Aliquoten nach der AAT behandelt. Die gemessenen IR-Absorptionswerte und der daraus resultierende Reaktionsendpunkt sind im folgenden präsentiert.

Zeit	Absorption	Extinktion $\ln(\frac{E}{E_0})$
0 h	81 %	0.7097
22 h	54 %	0.3297
46 h	21 %	0.0280

Die lineare Regression ergibt eine Abhängigkeit $t(\text{h}) = -0,0147 \ln(\frac{E}{E_0}) + 0,6905$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9941$. Für den theoretischen Wert $\ln(\frac{E}{E_0}) = 0$ ergibt sich daraus ein Reaktionsendpunkt von 47 h.

Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird das Harz für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 80:20 (10 min) → 70:30 (20 min) → 50:50 (10 min)].

Insgesamt werden 56.3 mg (18.44 µmol) der Substanz **Ac₃15** erhalten (41 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

C₁₂₇H₁₈₈N₂₀O₆₆ (3051.0 g/mol), $[\alpha]_D^{20} = +44^\circ$ (c = 1, MeOH).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 13.2 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
cosy90	MeOD 99.95 %	9.256 ppm 3704 Hz	2048	256 / 1024	32	sine ssb = 0
cosydfp	MeOD 99.95 %	9.256 ppm 3704 Hz	8192	256 / 1024	64	qsine ssb = 0

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 1.03 (d, 3 H, J_{CHβ,CHγa} = 6.8 Hz, Val-CH₃γa), 1.07 (d, 3 H, J_{CHβ,CHγb} = 6.8 Hz, Val-CH₃γb), 1.21 (d, 3 H, J_{CHβ,CHγ} = 6.4 Hz, Thr-9-CH₃γ), 1.33 (d, 3 H, J_{CHβ,CHγ} = 6.4 Hz, Thr-2-CH₃γ), 1.36 (d, 3 H, J_{CHβ,CHγ} = 6.4 Hz, Thr-4-CH₃γ), 1.48 (ddd, 2 H, J_{CHβa,CHγ} = 8.8 Hz, J_{CHβb,CHγ} = 7.0 Hz, J_{CHγ,CHδ} = 8.0 Hz, Lys-CH₂γ), 1.67 (dd, 2 H, J_{CHδ,CH} = 7.4 Hz, Lys-CH₂δ), 1.68 (ddt, 2 H, J_{CHα,CHβa} = 6.0 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 11.0 Hz, Lys-CH₂βa), 1.74 (ddt, 2 H, J_{CHα,CHβb} = 8.0 Hz, Lys-CH₂βb), 1.93 (s, 3 H, Ac-CH₃), 1.94 (s, 3 H, Ac-CH₃), 1.94 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 1.96 (s, 3 H, Ac-CH₃), 1.98 (s, 3 H, Ac-CH₃), 1.99 (s, 3 H, Ac-CH₃), 1.99 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.00 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.01 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 2.02 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.02 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.03 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.03 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 2.04 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.05 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.10 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβ} = 6.8 Hz, Val-CHβ), 2.138 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.14 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 2.15 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 2.15 (s, 6 H, 2 Ac-CH₃), 2.92 (dd, 2 H, Lys-CH₂), 3.13 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβa} = 8.0 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 15.4 Hz, His-CH₂βa), 3.33 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβb} = 6.4 Hz, His-CH₂βb), 3.83 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβa} = 4.8 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 10.0 Hz, Ser-3-CH₂βa), 3.86 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβa} = 4.8 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 10.0 Hz, Ser-5-CH₂βa), 3.92 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβa} = 5.2 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 10.4 Hz, Ser-7-CH₂βa), 3.95 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβb} = 6.4 Hz, Ser-3-CH₂βb), 3.97 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβb} = 6.4 Hz, Ser-5-CH₂βb), 3.98 (dd, 1 H, J_{CHα,CHβa} = 5.0 Hz, J_{CHβa,CHβb} = 10.2 Hz, Ser-7-CH₂βa), 4.00-4.21 (m, 12 H, 12 6-H), 4.08 (dd, 2 H, J_{CHα,CHβb} = 6.2 Hz, Ser-6/7-CH₂βb), 4.18 (d, 1 H, Thr-9-CHβ), 4.32-4.45 (m, 6 H, 6 5-H), 4.35 (d, 1 H, Val-CHα), 4.38 (d, 1 H, Lys-CHα), 4.38 (d, 1 H, Thr-2-CHβ), 4.39 (d, 1 H, Thr-4-CHβ), 4.46-4.54 (m, 6 H, 6 2-H), 4.50 (dd, 2 H, Ser-3/5-CHα), 4.52 (d, 1 H, J_{CHα,CHβ} = 4.8 Hz, Thr-9-CHα), 4.62 (dd, 1 H, Ser-6-CHα), 4.63 (d, 1 H, J_{CHα,CHβ} = 2.6 Hz, Thr-2-CHα), 4.65 (d, 1 H, J_{CHα,CHβ} = 2.6 Hz, Thr-4-CHα), 4.66 (dd, 1 H, Ser-7-CHα), 4.88 (dd, 1 H, His-CHα), 5.03 (d, 1 H, J_{1,2} = 4.0 Hz, 1-H), 5.04 (d, 2 H, J_{1,2} = 4.0 Hz, 2 1-H), 5.06 (d, 1 H, J_{1,2} = 3.6 Hz, 1-H), 5.11 (d, 1 H, J_{1,2} = 4.0 Hz, 1-H), 5.12 (d, 1 H, J_{1,2} = 4.0 Hz, 1-H), 5.16 (dd, 1 H, J_{2,3} = 11.6 Hz,

$J_{3,4} = 3.4$ Hz, 3-H), 5.17 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 3-H), 5.18 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 3-H), 5.19 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 3-H), 5.26 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 3-H), 5.27 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 3-H), 5.37-5.45 (m, 6 H, 6 4-H), 7.38 (d, 1 H, $J_{2H,4H} = 0.8$ Hz, His-4H), 7.54 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 10.0$ Hz, NH(Ac)), 7.75 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 9.4$ Hz, NH(Ac)), 7.83 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 8.2$ Hz, NH(Ac)), 7.83 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 10.0$ Hz, NH(Ac)), 7.88 (s, 2 H, NH₂), 7.90 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 8.0$ Hz, NH(Ac)), 7.94 (d, 1 H, $J_{2-H,NH} = 7.8$ Hz, NH(Ac)), 8.18-8.30 (m, 10 H, 10 NH), 8.82 (d, 1 H, His-2H).

Thr-2 und Thr-4 können vertauscht sein. Ser-3, Ser-5, Ser-6 und Ser-7 können vertauscht sein. **Ac₁₈15** (56.3 mg, 18.44 μ mol) wird in drei Aliquoten unter Rühren bei RT in 1 mL Methanol gelöst und mit Natriummethanolat (50 μ L, 1 %) bis pH = 8.5 versetzt. Nach zwei Stunden wird 1 mL Wasser hinzugegeben und erneut mit Natriummethanolat (10 μ L, 1 %) bis pH = 8.5 versetzt. Weitere zwei Stunden später wird mit Essigsäure (10 μ L, 100 %) neutralisiert und bei 300 K im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird viermal mit je 25 mL Wasser über einer 1000 Da Membran ultrafiltriert und bei 300 K im Vakuum eingengt.

Insgesamt werden 26.7 mg (11.62 μ mol) des hexaglycosylierten Decapeptides **15** erhalten (63 % bezogen auf **Ac₁₈15**, 26 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

ES⁺MS kalkuliert für C₉₁H₁₅₂N₂₀O₃₆ (2294.35 $\frac{g}{mol}$): $M = 2293.01$; gefunden (>10 %): $(M+H+2Na)^{3+}/3$, 778.82 (67 %). $(M+2H)^{2+}/2$, 1148.4 (100 %).

$[\alpha]_D^{20} = +130^\circ$ (c = 0.1, H₂O).

Aminosäurenanalyse: His(+GalNAc), 3.48; Thr, 3.06; Ser, 4.03; Val, 0.96; Lys, 0.95.

CD ($^{\circ}cm^2/mol$, c = 27.2 $\mu mol/L$): $\epsilon_{max} = (+) 60.68$ (188.2 nm); (+) 58.09 (195.0 nm); (-) 35.30 (200.0 nm); (-) 22.13 (204.4 nm); (+) 20.65 (265.0 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 8.4 $mmol/L$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	12.015 ppm 4808 Hz	2048	512 / 2048	32	sine ssb = 6
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	12.015 ppm 4808 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2
cosydfprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	12.015 ppm 4808 Hz	8192	512 / 2048	32	qsine ssb = 0
cosydftp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	6.066 ppm 2427 Hz	2048	1024 / 2048	32	qsine ssb = 3

¹H-NMR (400 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ	Hε	NH ₂	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
His-9	8.53 (8.2)	4.87 (5.8)	3.31 (15.8)	3.15 (9.4)									8.63 (1.4)		7.33		
Thr-10	8.46 (9.2)	4.64 (2.4)	4.36 (5.8)		1.28					7.66 (9.6)	2.08 (3.6)	4.93 (10.4)	4.10 (3.4)	3.88	3.99	3.99	3.76
Ser-11	8.74 (7.6)	4.90 (6.0)	4.03 (10.8)	3.85 (5.4)						7.87 (9.2)	2.03 (3.6)	4.91 (10.4)	4.17 (3.4)	3.90	4.00	3.98	3.76
Thr-12	8.64 (8.6)	4.64 (2.4)	4.36 (5.8)		1.28					7.57 (9.6)	2.07 (3.6)	4.90 (10.4)	4.12 (3.4)	3.89	3.99	3.99	3.77
Ser-13	8.62 (8.0)	4.69 (6.0)	3.96 (10.4)	3.83 (5.2)						7.99 (9.6)	2.08 (3.6)	4.91 (10.4)	4.20 (3.4)	3.89	3.99	3.98	3.75
Ser-14	8.63 (8.0)	4.57 (5.6)	3.94 (10.6)	3.80 (5.2)						8.00 (9.6)	2.05 (3.6)	4.91 (10.4)	4.20 (3.4)	3.89	4.01	3.98	3.76
Ser-15	8.67 (6.0)	4.68 (6.0)	3.92 (10.6)	3.78 (5.6)						7.99 (9.6)	2.06 (3.6)	4.91 (10.4)	4.20 (3.4)	3.87	3.98	3.97	3.75
Val-16	8.42 (8.2)	4.24 (7.8)	2.09 (7.1)		0.97	0.94											
Thr-17	8.38 (7.6)	4.32 (6.0)	4.14 (6.8)		1.23												
Lys-18	8.44 (8.4)	4.30 (8.2)	1.86 (10.4)	1.79 (6.8)	1.46 (7.6)	1.46 (7.6)	1.69 (7.6)	3.00 (6.4)	7.53								
Ac/NH										7.64	7.11	2.01					

***Ac-Leu-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Glu-Val-Ala-Met-His-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Val-Thr-Lys-NH₂*
(16)**

PEGA-Rink (257 mg, Belegung: 175 $\mu\text{mol/g}$, 45 μmol) wird nach AAV in den Peptidsynthesizer überführt.

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Lys(Boc)-Pfp (85.7 mg, 3 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (76.0 mg, 3 h), Fmoc-Val-Pfp (78.3 mg, 5 h), **9** (54.5 mg, 2 h), **9** (54.5 mg, 2 h), **9** (54.5 mg, 1'30'' h), **8** (55.4 mg, 1'30'' h), **9** (54.5 mg, 1 h), **8** (55.4 mg, 1 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (86.9 mg, 3 h), Fmoc-Met-Pfp (72.5 mg, 4h), Fmoc-Ala-Pfp (60.4 mg, 4 h), Fmoc-Val-Pfp (78.3 mg, 6 h), Fmoc-Glu(^tBu)-Pfp (79.8 mg, 5 h), **8** (55.4 mg, 2 h), **8** (55.4 mg, 1'30'' h), **9** (54.5 mg, 1 h), Fmoc-Leu-Pfp (70.1 mg, 4 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (22.0 mg) zugegeben.

Durch das starke Aufquellen des Harzes wird nach der Kupplung des Histidins bei jedem neuen Kupplungsschritt Harz entnommen, bis das Volumen der Glassäule ohne Druck gefüllt ist. Insgesamt wurden während der folgenden Kupplungsreaktionen 250 mg Harz entnommen, so daß die zu Grunde liegende Ansatzgröße auf 20 µmol korrigiert wird.

Das im Hochvakuum getrocknete Harz (258.1 mg) wird in drei Aliquoten nach der AAT behandelt. Die gemessenen IR-Absorptionswerte und der daraus resultierende Reaktionsendpunkt sind im folgenden präsentiert.

Zeit	Absorption	Extinktion $\ln(E/E_0)$
0 h	83 %	0.7572
22 h	55 %	0.3206
46 h	20 %	0.0265

Die lineare Regression ergibt eine Abhängigkeit $t(h) = -0,0156 \ln(E/E_0) + 0,7252$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9860$. Für den theoretischen Wert $\ln(E/E_0) = 0$ ergibt sich daraus ein Reaktionsendpunkt von 47 h.

Nach dem Trocknen im Hochvakuum wird ein Teil des Harzes (5.0 mg, entsprechend 875 nmol Glycopeptid) für 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 90:10 (5 min) → 85:15 (50 min) → 75:25 (5 min)].

ES⁺MS kalkuliert für C₂₀₄H₃₀₄N₃₁O₁₀₃S (4870.94 g/mol): $M = 4867.92$; gefunden (>10 %): $(M+3H)^{3+}/3$, 1623.64 (13 %); $(M+2H+Na)^{3+}/3$, 1630.97 (100 %); $(M+2H+K)^{3+}/3$, 1636.64 (67 %).

Der Hauptteil des Harzes wird hiernach nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 95:05 (5 min) → 80:20 (60 min) → 75:25 (5 min)].

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 90:10 (5 min) → 85:15 (50 min) → 75:25 (5 min)].

Insgesamt werden 30.7 mg (8.20 µmol) des nonaglycosylierten Octadecapeptides **16** erhalten (41 % bezogen auf die Belegung des korrigierten Harzvolumens).

ES⁺MS kalkuliert für C₁₅₀H₂₅₄N₃₁O₇₆S (3736.92 g/mol): $M = 3734.64$; gefunden (>10 %): $(M+3H)^{3+}/3$, 1248.74 (12 %); $(M+2H+Na)^{3+}/3$, 1254.11 (100 %); $(M+2H+K)^{3+}/3$, 1259.82 (75 %); $(M+H+K+Na)^{3+}/3$, 1273.79 (35 %).

Aminosäurenanalyse: Leu, 1.01; Ser, 5.07; Thr, 5.04; Glu, 0.98; Val, 1.97; Ala, 0.99; Met, 1.02; His(+GalNAc), 4.72; Lys, 0.96.

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 27.2 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 16.22 (185.0 \text{ nm}); (+) 26.70 (189.0 \text{ nm}); (-) 19.72 (195.6 \text{ nm}); (-) 74.41 (201.0 \text{ nm}); (+) 23.91 (217.2 \text{ nm}); (+) 5.15 (255.0 \text{ nm})$.

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: $c = 5.86 \text{ mmol}/\text{L}$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
cosy90	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	8.926 ppm 3571 Hz	2048	256 / 1024	32	sine ssb = 0
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	256 / 1024	16	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	64	qsine ssb = 2
cosydfprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	8192	512 / 2048	64	qsine ssb = 0
ecos3ntp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	5.295 ppm 2684 Hz	4096	512 / 2048	72	qsine ssb = 2
inv4gs	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	5.295 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	32	sine ssb = 4/6
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	64	sine ssb = 8

^{13}C -NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	C α	C β	C γ_1	C γ_2	C δ_1	C δ_2	C ϵ	CH ₃	CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Leu-1	176.47	53.95	41.39	25.81		23.60	22.32									
Ser-2	172.66	54.86	68.32						23.86	175.86	99.57	51.09	69.14	69.45	72.79	62.71
Thr-3	172.70	58.63	78.76	19.94					23.90	175.37	100.77	51.27	69.64	69.45	72.82	62.47
Thr-4	172.01	58.20	77.88	20.03					23.90	175.37	100.33	51.27	69.64	69.45	72.79	62.71
Glu-5	174.22	54.08	14.66	30.78		178.25										
Val-6	174.37	61.08	31.52	19.79	19.76											
Ala-7	176.16	51.19	17.91													
Met-8	174.78	53.68	28.59	31.44				21.49								
His-9	173.22	53.49	27.72									135.00		118.68	130.02	
Thr-10	172.15	58.61	77.47	19.99					23.74	175.29	100.61	51.13	69.46	69.97	72.79	62.71
Ser-11	172.27	54.56	69.69						23.10	175.63	99.44	51.36	69.34	69.77	72.79	62.71
Thr-12	172.47	58.87	78.27	19.94					23.76	175.39	100.28	51.49	69.68	69.93	72.82	62.47
Ser-13	172.38	54.25	69.20						23.68	175.98	99.37	51.00	69.22	69.92	72.83	62.78
Ser-14	172.10	54.48	68.28						24.00	175.68	99.58	51.32	69.29	69.94	72.79	62.71
Ser-15	172.34	54.46	68.42						23.69	175.81	99.31	51.32	69.29	69.26	72.83	62.78
Val-16	174.67	60.63	32.28	19.83	19.40											
Thr-17	172.88	60.69	68.49	20.14												
Lys-18	177.63	54.92	31.89	23.55		27.77		40.65								
Ac	176.02								23.65							

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	H α	H β_1	H β_2	H γ_1	H γ_2	H δ_1	H δ_2	H ϵ	NH ₂	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
Leu-1	8.198 (6.8)	4.364 (5.9)	1.620 (13.0)	1.584 (8.0)	1.678 (7.0)		0.941	0.898											
		(10.1)	(6.0)		(6.8)														
Ser-2	8.537 (7.6)	4.826 (2.3)	4.045 (6.5)								7.964 (9.5)	2.076 (3.4)	4.898 (11.0)	4.186 (3.2)	3.892	3.915	3.978	3.761	3.725
Thr-3	8.568 (7.0)	4.754 (2.3)	4.380 (6.4)		1.297						7.647 (9.5)	2.054 (3.6)	4.875 (11.2)	4.090 (3.0)	3.886	3.898	3.989	3.795	3.743
Thr-4	8.715 (7.6)	4.588 (2.3)	4.299 (6.4)		1.244						7.689 (9.5)	2.054 (3.6)	4.904 (11.2)	4.096 (3.0)	3.876	3.896	3.988	3.761	3.725
Glu-5	8.260 (7.0)	4.430 (7.2)	1.993 (6.3)	1.941 (6.3)	2.590 (15.5)	2.508													
		(7.2)	(7.8)	(7.8)															
Val-6	8.208 (8.4)	3.973 (8.0)	2.028 (7.2)		0.993	0.941													
			(7.0)																
Ala-7	8.362 (7.0)	4.279 (7.6)	1.352																
Met-8	8.397 (8.0)	4.410 (5.5)	2.080 (14.0)	1.978 (8.0)	2.487				2.053										
		(8.5)	(8.0)	(8.0)															
			(8.0)																
His-9	8.597 (6.8)	4.935 (5.6)	3.338 (16.4)	3.208										8.652 (1.4)		7.324			
		(9.8)																	
Thr-10	8.390 (9.2)	4.618 (2.3)	4.343 (6.7)		1.285						7.537 (9.4)	2.065 (4.0)	4.921 (11.0)	4.108 (3.2)	3.876	3.898	3.997	3.761	3.725
Ser-11	8.696 (8.8)	4.881 (5.2)	4.040 (10.4)	3.848							7.851 (8.8)	2.030 (3.8)	4.907 (11.2)	4.153 (2.8)	3.892	3.914	3.971	3.761	3.725
		(5.6)																	
Thr-12	8.390 (9.2)	4.618 (2.3)	4.383 (6.5)		1.280						7.486 (9.5)	2.056 (3.8)	4.874 (11.0)	4.109 (3.2)	3.887	3.910	3.994	3.795	3.743
Ser-13	8.600 (9.6)	4.682 (6.0)	3.940 (11.2)	3.830							7.964 (9.5)	2.080 (3.6)	4.902 (10.8)	4.200 (3.0)	3.878	3.898	3.975	3.748	3.703
		(5.6)																	
Ser-14	8.609 (9.6)	4.567 (6.8)	3.919 (10.4)	3.796							7.986 (9.5)	2.030 (3.6)	4.911 (11.0)	4.185 (3.2)	3.891	3.915	3.987	3.761	3.725
		(5.6)																	
Ser-15	8.646 (7.2)	4.668 (7.2)	3.908 (10.4)	3.757							7.892 (9.7)	2.049 (3.6)	4.915 (11.0)	4.178 (3.4)	3.864	3.886	3.967	3.748	3.703
		(5.6)																	
Val-16	8.394 (9.8)	4.233 (8.0)	2.086 (7.2)		0.968	0.947													
			(7.0)																
Thr-17	8.363 (8.0)	4.301 (6.3)	4.093 (6.8)		1.212														
Lys-18	8.443 (7.0)	4.280 (11.3)	1.810 (14.6)	1.760 (8.8)	1.473 (13.0)	1.431 (6.5)	1.693 (8.0)	1.693 (8.0)	2.993 (6.4)	7.488									
		(5.0)	(7.2)	(6.4)	(5.0)														
			(8.0)																
Ac/NH ₂											7.612	7.086	2.085						

5.2. Sequenzen aus dem humanen Mucin MUC1

Ac-His-Gly-Val-Thr(GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (**17**)

Wang-Harz B1000 (111.1 mg, Belegung $450 \mu\text{mol/g}$, $50 \mu\text{mol}$) wird nach der AAM mit Fmoc-Ala (45.7 mg, $150 \mu\text{mol}$) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 18 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 22 h), **8** (61.6 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 16 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 20 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 21 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (124.4 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), (62.7 mg, 22 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (86.6 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 12 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), **8** (61.6 mg, 22 h), Fmoc-Val-Pfp (78.5 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (96.5 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Nachdem die Fmoc-Abspaltung und das Waschen der letzten gekuppelten Aminosäure den Zyklus beendet haben, wird mit Acetanhydrid (50 % in DMF) 2x15 min behandelt und wie zuvor gewaschen. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (142.9 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAT und hiernach nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und dann mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 90:10 (5 min) → 80:20 (30 min) → 70:30 (5 min)].

Insgesamt werden 11.6 mg ($4.97 \mu\text{mol}$) der diglycosylierten MUC1 Repeating Unit **17** erhalten (10 % bezogen auf die Belegung Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für **17** $\text{C}_{98}\text{H}_{155}\text{N}_{27}\text{O}_{39}$ (2335.50 g/mol): $M = 2334.10$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 2335.47 (100 %); $(M+H-Ac)^+$, 2293.50 (10 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 26.8 \mu\text{mol/L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 14.49$ (188.5 nm); $(-) 161.15$ (204.1 nm); $(+) 2.90$ (223.5 nm); $(+) 3.04$ (227.5 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: $c = 7.1 \text{ mmol/L}$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	72	qsine ssb = 2
ecos3ntp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	9.687 ppm 4845 Hz	4096	512 / 2048	36	qsine ssb = 2
inv4gs	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	9.467 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	32	sine ssb = 4/6
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 200.0 ppm	4096	128 / 512	256	sine ssb = 8

¹³C-NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	Cα	Cβ	Cγ ₁	Cγ ₂	Cδ	Cε	CO	CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
His-2	172.87	52.98	26.60						174.61		133.83		117.56	128.90	
Gly-3	171.53	42.76													
Val-4	174.33	59.80	30.48	18.13	18.07										
Thr-5	172.45	57.34	77.16	18.75				174.67	22.77	99.36	49.94	68.68	69.07	71.69	61.64
Ser-6	171.81	55.70	61.69												
Ala-7	173.48	48.14	15.65												
Pro-8	174.41	60.43	29.55	25.01		48.14									
Asp-9	173.00	50.66	35.79					173.14							
Thr-10	171.91	59.30	67.36	19.17											
Arg-11	173.85	51.53	22.96	21.94		44.78	157.05								
Pro-12	173.98	60.90	29.55	24.96		48.14									
Ala-13	173.48	47.80	15.43												
Pro-14	172.87	59.29	29.55	25.01		48.14									
Gly-15	171.53	42.71													
Ser-16	172.35	55.29	61.79												
Thr-17	171.07	57.34	76.26	18.72				174.04	22.75	99.06	50.00	68.39	68.91	71.82	61.67
Ala-18	172.45	47.80	15.57												
Pro-19	174.36	58.84	28.36	25.01		48.14									
Pro-20	174.23	61.27	29.67	25.01		48.14									
Ala-21	177.19	49.51	16.46												

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα ₁	Hα ₂	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ ₁	Hδ ₂	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
His-2	8.457 (7.5)	4.674 (5.5) (8.6)		3.279 (15.5) (1.0)	3.118						1.975		8.583 (1.6)		7.286			
Gly-3	8.523 (5.8) (5.8)	3.972	3.921															
Val-4	8.037 (7.6)	4.278 (8.2)		2.078 (6.6)		0.944	0.926											
Thr-5	8.565 (9.0)	4.615 (1.9)		4.287 (6.3)		1.244				7.515 (9.6)	2.004	4.918 (3.8)	4.068 (10.6)	3.849 (3.4)	3.939 (1.1)	3.957	3.735	3.704
Ser-6	8.432 (6.9)	4.463		3.830	3.766													
Ala-7	8.433 (6.1)	4.478 (7.25)		1.360														
Pro-8		4.377		2.270	1.886	2.014	2.014	3.789	3.631									
Asp-9	8.580 (7.2)	4.715 (6.5) (7.1)		2.950 (17.2)	2.874													
Thr-10	8.009 (7.6)	4.303 (4.5)		4.193 (6.3)		1.161												
Arg-11	8.224 (7.2)	4.627		1.821	1.717	1.654 (6.5)	1.654 (5.6)	3.190	3.190	7.135								
Pro-12		4.385		2.231	1.845	1.975	1.975	3.786	3.579									
Ala-13	8.440 (5.6)	4.550 (7.3)		1.351														
Pro-14		4.377		2.270	1.886	2.014	2.014	3.789	3.623									
Gly-15	8.495 (5.9)	3.950	3.950															
Ser-16	8.112(7.0))	4.617 (4.7) (6.5)		3.917	3.886													
Thr-17	8.541 (8.7)	4.554 (2.2)		4.329 (6.3)		1.234				7.719 (9.5)	2.004	4.904 (3.8)	4.081 (10.9)	3.842 (3.7)	3.944 (1.3)	3.961	3.739	3.708
Ala-18	8.304 (5.5)	4.538 (7.3)		1.320														
Pro-19		4.627		2.330	1.903	2.030	2.030	3.752	3.623									
Pro-20		4.377		2.270	1.886	2.014	2.014	3.789	3.631									
Ala-21	8.408 (6.6)	4.314 (7.3)		1.398														

***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (18)**

Wang-Harz B1000 (111.1 mg, Belegung 450 $\mu\text{mol/g}$, 50 μmol) wird nach der AAM mit Fmoc-Ala (45.7 mg, 150 μmol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 20 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 17 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 3 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 19 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 20 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 18 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 5 h), Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (124.4 mg, 22 h), **11** (62.7 mg, 22 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (86.6 mg, 21 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 20 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Val-Pfp (78.5 mg, 19 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 3 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (96.5 mg, 20 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (227.9 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 90:10 (5 min) $\rightarrow$ 80:20 (40 min) $\rightarrow$ 70:30 (5 min)].

Insgesamt werden 46.5 mg (21.70 μmol) der monoglycosylierten MUC1-Repeating Unit **18** erhalten (43 % bezogen auf die Belegung Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für **18** $\text{C}_{91}\text{H}_{143}\text{N}_{27}\text{O}_{33}$ (2143.33 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 2142.03$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 2143.37 (100 %); $(M+Na)^+$, 2165.40 (15 %), $(M+H-\text{"GSTAPPA"})^+$, 1561.31 (12 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 29.2 \mu\text{mol/L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 25.81$ (188.4 nm); $(-) 204.79$ (205.7 nm); $(-) 10.67$ (232.5 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 15.5 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	10.501 ppm 5252 Hz	4096	256 / 1024	16	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	10.501 ppm 5252 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2
ecos3nprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	8192	512 / 2048	36	qsine ssb = 2
inv4gspr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	16	qsine ssb = 2
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	16	qsine ssb = 2

¹³C-NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	Cα	Cβ	Cγ ₁	Cγ ₂	Cδ	CO	CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Ala-1	171.38	49.61	17.10											
His-2	172.33	53.36	26.74							134.34		118.01	128.73	
Gly-3	171.51	42.93												
Val-4	174.37	60.05	30.76	18.89	18.11									
Thr-5	172.10	59.53	67.66	19.28										
Ser-6	171.43	55.81	61.76											
Ala-7	173.23	48.31	16.09											
Pro-8	174.37	60.88	29.81	25.27		48.21								
Asp-9	173.57	50.25	35.78				174.59							
Thr-10	172.70	57.71	76.00	18.93			174.37	22.88	99.05	50.48	68.81	69.16	71.95	61.90
Arg-11	166.19	51.69	28.00	24.68		41.14	157.46							
Pro-12	171.38	60.47	29.90	25.25		48.21								
Ala-13	173.23	48.48	15.69											
Pro-14	175.61	60.67	29.74	25.11		48.21								
Gly-15	171.51	43.10												
Ser-16	172.56	56.53	61.82											
Thr-17	172.70	59.37	67.69	19.36										
Ala-18	172.70	48.31	15.98											
Pro-19	172.33	59.17	28.54	24.68		48.21								
Pro-20	174.37	60.67	29.74	25.11		48.21								
Ala-21	177.01	49.23	16.67											

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα ₁	Hα ₂	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ ₁	Hδ ₂	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
Ala-1		4.045 (7.1)		1.452														
His-2	8.821 (7.1)	4.679 (6.6)		3.272 (15.5)	3.197								8.582 (1.3)		7.299			
Gly-3	8.488 (5.9)	3.978 (17.0)	3.922															
Val-4	8.104 (7.7)	4.205 (7.4)		2.060 (6.7)		0.915	0.906											
Thr-5	8.317 (7.8)	4.377 (5.0)		4.178 (6.4)		1.171												
Ser-6	8.279 (7.1)	4.426 (5.5)		3.800	3.800													
Ala-7	8.299 (6.7)	4.576 (7.1)		1.331														
Pro-8		4.393 (8.2)		2.259 (13.0)	1.863	1.983	1.983	3.773	3.617									
Asp-9	8.545 (7.4)	4.819 (7.0)		2.956 (17.1)	2.836													
Thr-10	8.311 (7.3)	4.477 (1.7)		4.306 (6.4)		1.211				7.650 (9.6)	1.996	4.809 (4.1)	4.056 (11.2)	3.825 (2.7)	3.933 (0.6)	3.951 (7.2)	3.729 (11.9)	3.698
Arg-11	8.321 (5.9)	4.554 (7.5)		1.811 (12.5)	1.678	1.674 (12.7)	1.624 (7.0)	3.185 (5.7)	3.185 (5.7)	7.143								
Pro-12		4.317 (8.3)		2.237 (12.5)	1.835 (7.0)	1.979 (6.6)	1.979 (6.6)	3.705 (12.0)	3.566									
Ala-13	8.441 (5.3)	4.522 (7.1)		1.331														
Pro-14		4.385 (6.0)		2.266 (12.5)	1.932	1.991	1.991	3.773	3.617									
Gly-15	8.476 (6.3)	3.961 (6.3)	3.961															
Ser-16	8.121 (6.9)	4.489 (5.5)		3.900 (11.7)	3.841													
Thr-17	8.167 (8.2)	4.337 (4.4)		4.195 (6.4)		1.171												
Ala-18	8.238 (5.8)	4.573 (7.1)		1.312														
Pro-19		4.672 (8.2)		2.316 (11.5)	1.874 (6.7)	2.014 (7.7)	2.014 (7.7)	3.795 (14.0)	3.596									
Pro-20		4.370 (5.5)		2.266 (12.3)	1.932	1.991	1.991	3.773	3.617									
Ala-21	8.409 (6.4)	4.294 (7.2)		1.384														

***H*-His-Gly-Val-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (**19**)**

Wang-Harz B1250 (105.3 mg, Belegung 950 $\mu\text{mol/g}$, 100 μmol) wird nach der AAM mit Fmoc-Ala (91.4 mg, 300 μmol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (89.0 mg), Methylimidazol (18 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 22 h), **12** (123.4 mg, 20 h), Fmoc-Gly-Pfp (139.0 mg, 20 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (248.8 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 17 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (173.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), **12** (123.4 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 21 h), Fmoc-Val-Pfp (157.0 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (139.0 mg, 21 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (193.0 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (49.0 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete festphasengebundene Glycopeptid (**19-Wang**, 319.4 mg) wird in zwei gleiche Teile (159.7 mg) aufgeteilt. Ein Teil wird zur weiteren Synthese verwendet (siehe Verbindung **20**). Der andere Teil wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 95:05 (5 min) $\rightarrow$ 85:25 (40 min) $\rightarrow$ 80:20 (5 min)].

Insgesamt werden 27.2 mg (9.37 μmol) der pentaglycosylierten MUC1 Repeating Unit **19** erhalten (19 % bezogen auf die Belegung Harzes).

MALDI-TOF MS kalkuliert für **19** $\text{C}_{120}\text{H}_{192}\text{N}_{30}\text{O}_{53}$ (2903.05 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 2901.33$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 2902.27 (100 %); $(M+H\text{-GalNAc})^+$, 2699.95 (10 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 21.5 \mu\text{mol/L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 31.46$ (187.8 nm); $(-) 99.84$ (200.8 nm); $(-) 54.69$ (209.0 nm); $(-) 7.22$ (225.8 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 6.69 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	40	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	72	qsine ssb = 2
roesytp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	9.840 ppm 4921 Hz	4096	512 / 2048	80	qsine ssb = 2
ecos3ntp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	5.295 ppm 2684 Hz	8192	512 / 2048	144	qsine ssb = 2
inv4gs	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	6.066 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	64	sine ssb = 4/6
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 200.0 ppm	4096	256 / 1024	180	sine ssb = 8

¹³C-NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	Cα	Cβ	Cγ ₁	Cγ ₂	Cδ	CO	CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
His-2	168.97	52.35	26.34							134.93		119.14	125.97	
Gly-3	171.13	42.39												
Val-4	174.18	59.81	30.76	18.75	18.07									
Thr-5	171.51	57.50	77.07	18.75			174.30	22.70	99.41	50.06	68.73	68.92	71.71	61.59
Ser-6	170.50	53.33	67.90				174.81	22.56	98.35	50.06	68.26	68.90	71.74	61.72
Ala-7	173.03	48.02	15.85											
Pro-8	174.22	60.51	29.61	25.07		48.15								
Asp-9	173.14	50.15	35.63				174.38							
Thr-10	171.38	57.61	75.97	18.85			174.22	22.80	99.00	49.94	68.73	68.96	71.86	61.78
Arg-11	171.46	51.51	27.87	24.58		40.89	157.18							
Pro-12	173.93	60.37	29.72	25.12		48.05								
Ala-13	173.42	48.11	15.67											
Pro-14	175.16	59.81	29.81	25.02		48.25								
Gly-15	171.46	42.69												
Ser-16	171.74	53.83	68.17				174.54	22.50	98.50	50.06	68.17	68.84	71.74	61.69
Thr-17	170.62	57.24	77.01	18.91			174.03	22.73	99.22	50.14	68.61	68.99	71.71	61.70
Ala-18	172.35	47.69	15.90											
Pro-19	172.54	60.96	28.42	25.07		47.86								
Pro-20	174.38	60.57	29.61	25.02		48.15								
Ala-21	176.83	49.00	16.49											

¹H-NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	H α_1	H α_2	H β_1	H β_2	H γ_1	H γ_2	H δ_1	H δ_2	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4
His-2		4.364 (6.4)		3.408	3.408								8.669 (1.4)		7.440
Gly-3	8.772 (6.1) (5.8)	4.120 (17.1)	3.995												
Val-4	8.350 (7.6)	4.330 (7.3)		2.080 (6.7) (6.7)		0.964	0.953								
Thr-5	8.593 (8.6)	4.604 (1.8)		4.295 (7.3)		1.249				7.518 (9.5)	2.015	4.901 (4.0)	4.062 (10.9)	3.823 (2.9)	3.912
Ser-6	8.645 (7.9)	4.625 (5.1) (6.2)		3.893 (11.0)	3.759					7.965 (9.5)	2.010	4.872 (4.0)	4.148 (10.9)	3.869 (3.3)	3.938
Ala-7	8.496 (5.2)	4.500 (7.3)		1.367											
Pro-8		4.386 (5.2) (8.4)		2.279	1.924	2.026	2.026	3.782	3.630						
Asp-9	8.578 (6.7)	4.832 (7.3) (6.6)		2.956 (17.2)	2.833										
Thr-10	8.357 (9.2)	4.493 (1.8)		4.335 (6.4)		1.223				7.641 (8.9)	2.015	4.822 (3.7)	4.073 (10.9)	3.832 (3.0)	3.951
Arg-11	8.347 (7.6)	4.565 (5.9) (3.8)		1.836 (11.0) (7.8)	1.678 (7.4)	1.669 (6.6)	1.669 (6.6)	3.195 (6.1)	3.195	7.162					
Pro-12		4.335 (6.1) (8.5)		2.255 (12.6) (7.3)	1.855 (7.0)	2.079 (6.0) (6.6)	1.990 (6.0) (6.6)	3.715 (10.5)	3.589						
Ala-13	8.428 (5.8)	4.544 (7.0)		1.349											
Pro-14		4.407 (5.5) (8.2)		2.284 (7.3)	1.937 (7.0)	2.013 (6.8)	2.013 (6.8)	3.780 (10.7)	3.649						
Gly-15	8.363 (4.3) (5.2)	4.021 (16.9)	3.921												
Ser-16	8.324 (7.3)	4.795 (4.9) (5.7)		4.025 (10.8)	3.835					7.710 (9.5)	2.004	4.854 (4.0)	4.114 (10.9)	3.841 (3.2)	3.943
Thr-17	8.748 (9.2)	4.575 (1.8)		4.259 (6.4)		1.236				7.617 (9.8)	2.004	4.921 (4.0)	4.081 (10.9)	3.832 (3.2)	3.946
Ala-18	8.393 (5.2)	4.544 (7.3)		1.327											
Pro-19		4.614 (5.7) (8.4)		2.336 (12.8) (6.8)	1.905 (7.2)	2.029	2.029	3.758	3.621						
Pro-20		4.375 (5.4) (8.5)		2.279	1.924	2.026 (6.2)	2.026 (6.2)	3.800 (9.9)	3.623						
Ala-21	8.405 (6.4)	4.311 (7.3)		1.400											

***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(GalNAc)-Ser(GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (20)**

Das festphasengebundene Glycopeptid **19**-Wang (159.7 mg, 50 μ mol) wird nach der AAM der weiteren Synthese zugeführt.

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 22 h), **12** (123.4 mg, 20 h), Fmoc-Gly-Pfp (139.0 mg, 20 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (248.8 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 17 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (173.2 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (151.2 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h), **12** (123.4 mg, 22 h), **11** (125.5 mg, 21 h), Fmoc-Val-Pfp (157.0 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (139.0 mg, 21 h), Fmoc-His(Boc)-Pfp (193.0 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (141.2 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (49.0 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (223.3 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 90:10 (5 min) $\rightarrow$ 80:20 (40 min) $\rightarrow$ 70:30 (5 min)].

Insgesamt werden 12.6 mg (2.16 μ mol) der decaglycosylierten dimeren MUC1 Repeating Unit **20** erhalten (4 % bezogen auf die Belegung Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für **20** C₁₂₀H₁₉₂N₃₀O₅₃ (5841.15 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 5837.67$; gefunden (>10 %): ($M+H$)⁺, 5842.27 (100 %); ($M+2H$)²⁺/2, 2921.45 (52 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 10.7 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 28.49$ (185.4 nm); $(-) 177.01$ (194.4 nm); $(-) 218.23$ (200.2 nm); $(-) 111.58$ (209.0 nm); $(+) 10.98$ (223.8 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: $c = 3.09 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	8192	512 / 2048	40	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	8192	512 / 2048	136	qsine ssb = 2
ecos3ntp	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	5.295 ppm 2684 Hz	8192	512 / 2048	180	qsine ssb = 2

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα ₁	Hα ₂	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ ₁	Hδ ₂	NH	CH ₃	H-1	H-2	H-3	H-4
Ala-1		4.046 (7.2)		1.452											
His-2	8.818 (7.2)	4.686 (5.8) (8.0)		3.275 (15.5)	3.192								8.582 (1.2)		7.299
Gly-3	8.489 (5.5) (4.8)	3.975 (17.0)	3.913												
Val-4	8.079 (7.6)	4.299 (7.3)		2.059 (6.8) (6.7)		0.941	0.921								
Thr-5	8.589 (8.1)	4.590 (1.8)		4.288 (5.9)		1.237				7.527 (9.6)	1.998	4.880 (3.7)	4.053	3.834	3.926
Ser-6	8.625 (7.5)	4.610		3.880	3.744					7.949 (9.6)	1.994	4.857 (3.7)	4.133 (10.6)	3.858	3.927
Ala-7	8.478 (5.6)	4.494 (7.0)		1.354											
Pro-8		4.372 (5.7) (8.2)		2.266	1.861	1.992	1.992	3.777	3.621						
Asp-9	8.561 (5.5)	4.818 (7.2) (6.3)		2.942 (17.0)	2.821										
Thr-10	8.345 (8.4)	4.477 (2.2)		4.307 (6.0)		1.209				7.627 (9.5)	2.000	4.808 (3.7)	4.058	3.824	3.942
Arg-11	8.332 (6.6)	4.552		1.815	1.677	1.656	1.656	3.181 (5.8)	3.181	7.142					
Pro-12		4.320		2.245	1.844	1.988	1.988	3.704	3.579						
Ala-13	8.414 (5.6)	4.532 (7.1)		1.335											
Pro-14		4.394 (5.5) (8.4)		2.273	1.935	2.009	2.009	3.766	3.634						
Gly-15	8.349 (4.6) (5.6)	4.014	3.908												
Ser-16	8.317 (7.2)	4.780 (5.7)		4.014 (11.0)	3.826					7.696 (9.3)	1.989	4.840 (3.4)	4.100	3.829	3.930
Thr-17	8.731 (9.2)	4.561 (1.9)		4.245 (6.3)		1.221				7.613 (10.0)	1.986	4.898 (4.2)	4.066	3.819	3.933
Ala-18	8.378 (6.3)	4.531 (7.2)		1.313											
Pro-19		4.599		2.320	1.885	2.030	2.030	3.745	3.608						
Pro-20		4.320 (5.7) (8.4)		2.255	1.818	1.995	1.995	3.788	3.610						
Ala-21	8.337 (5.7)	4.200 (7.2)		1.294											
His-22	8.434 (7.7)	4.681 (6.0) (8.3)		3.267 (15.8)	3.152								8.574 (1.1)		7.281

¹H NMR (Fortsetzung):

Gly-23	8.369 (5.5) (4.8)	3.979 (17.0)	3.896																
Val-24	8.065 (7.0)	4.280 (7.9)	2.059 (6.8) (6.8)	0.941	0.925														
Thr-25	8.553 (8.1)	4.591	4.288 (5.9)	1.239					7.527 (9.6)	1.998	4.880 (3.7)	4.053	3.834	3.926					
Ser-26	8.619 (7.7)	4.610	3.880	3.744					7.949 (9.6)	1.994	4.857 (3.7)	4.133 (10.6)	3.858	3.927					
Ala-27	8.476 (6.0)	4.480 (7.0)	1.354																
Pro-28		4.372 (5.7) (8.2)	2.266	1.861	1.992	1.992	3.777	3.621											
Asp-29	8.561 (5.5) (6.4)	4.818 (7.2)	2.942 (17.5)	2.820															
Thr-30	8.345 (7.3)	4.478 (2.0)	4.307 (6.0)	1.209					7.627 (9.4)	2.000	4.808 (3.7)	4.058	3.824	3.942					
Arg-31	8.332 (6.6)	4.552	1.815	1.677	1.656	1.656	3.181 (5.8)	3.181	7.142										
Pro-32		4.320	2.245	1.844	1.988	1.988	3.704	3.579											
Ala-33	8.414 (5.6)	4.532 (7.1)	1.335																
Pro-34		4.394 (5.5) (8.4)	2.273	1.935	2.009	2.009	3.788	3.610											
Gly-35	8.317 (4.6) (5.6)	4.014	3.908																
Ser-36	8.322 (6.9)	4.780 (5.5)	4.014 (11.1)	3.820					7.683 (9.4)	1.989	4.836 (3.4)	4.095	3.829	3.930					
Thr-37	8.741 (9.3)	4.561 (1.9)	4.245 (6.3)	1.221					7.608 (9.7)	1.986	4.906 (4.0)	4.066	3.819	3.933					
Ala-38	8.378 (6.3)	4.531 (7.1)	1.303																
Pro-39		4.599	2.320	1.885	2.030	2.030	3.745	3.608											
Pro-40		4.360 (5.7) (8.4)	2.264	1.898	2.009	2.009	3.788	3.610											
Ala-41	8.391 (6.5)	4.304 (7.3)	1.388																

***H*-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-OH (21)**

Wang-Harz B1000 (111.1 mg, Belegung 450 $\mu\text{mol/g}$, 50 μmol) wird nach der AAM mit Fmoc-Thr(^tBu) (59.6 mg, 150 μmol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 21 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 21 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 21 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 21 h), Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (124.4 mg, 22 h), **11** (62.7 mg, 22 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (86.6 mg, 20 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 21 h), Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (188.8 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und dann mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 90:10 (5 min) → 85:15 (20 min) → 75:25 (5 min)].

Insgesamt werden 52.5 mg (35.95 µmol) des monoglycosylierten Tridecapeptides **21** erhalten (72 % bezogen auf die Belegung Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für **21** C₅₉H₉₇N₁₇O₂₆ (1460.54 ^g/mol): *M* = 1459.68; gefunden (>10 %): (*M*+*H*)⁺, 1460.37 (100 %); (*M*+*Na*)⁺, 1482.30 (27 %), (*M*+*K*)⁺, 1498.31 (20 %).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 25.7 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
cosy90	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	4.733 ppm 1894 Hz	2048	256 / 1024	8	sine ssb = 0
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	256 / 1024	8	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	24	qsine ssb = 2
inv4gspr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 222.1 ppm	4096	128 / 512	32	qsine ssb = 4
inv4gsplrndpr	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 222.1 ppm	4096	256 / 1024	8	qsine ssb = 4

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα ₁	Hα ₂	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ ₁	Hγ ₂	Hδ ₁	Hδ ₂	CH ₃	NH	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
Thr-5		3.911 (6.1)		4.153 (6.6)		1.286												
Ser-6	8.761 (7.0)	4.500 (4.8)		3.848 (11.6)	3.791 (6.4)													
Ala-7	8.405 (5.8)	4.576 (7.0)		1.337														
Pro-8		4.389 (8.0)		2.250 (12.6)	1.847 (6.1)	1.978	1.978	3.778 (9.9)	3.624									
Asp-9	8.529 (7.3)	4.809 (7.0)		2.945 (17.1)	2.824													
Thr-10	8.302 (8.6)	4.477 (2.3)		4.298 (6.3)		1.200				1.993	7.639 (9.6)	4.805 (3.7)	4.052 (11.2)	3.823 (3.1)	3.932 (0.5)	3.949 (6.9)	3.737 (11.9)	3.687 (5.2)
Arg-11	8.318 (7.0)	4.549 (7.8)		1.808 (13.0)	1.656 (5.3)	1.656 (6.1)	1.650 (6.6)	3.175 (5.4)	3.175 (5.6)		7.132							
Pro-12		4.313 (8.3)		2.230 (12.9)	1.808 (6.6)	1.966 (7.0)	1.966	3.696 (10.2)	3.566									
Ala-13	8.416 (5.2)	4.515 (7.0)		1.327														
Pro-14		4.373 (8.0)		2.268 (12.7)	1.911 (6.4)	2.011 (6.8)	2.011	3.778 (10.0)	3.624									
Gly-15	8.496 (6.1)	3.992 (17.2)	3.879 (5.8)															
Ser-16	8.120 (7.2)	4.529 (5.5)		3.904 (12.1)	3.879 (4.7)													
Thr-17	8.179 (8.7)	4.484 (3.1)		4.365 (6.6)		1.160												

¹³C NMR (125 MHz):

δ (ppm)	CO	Cα	Cβ	Cγ ₁	Cγ ₂	Cδ	CO	CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Thr-5	168.79	59.26	66.87	19.25										
Ser-6	171.15	56.08	61.79											
Ala-7	173.27	48.55	15.71											
Pro-8	174.42	60.53	29.77	25.19		48.30								
Asp-9	173.32	50.53	35.84				174.65							
Thr-10	171.58	57.78	76.08	18.94			174.43	22.92	99.12	50.33	68.88	69.23	72.02	61.96
Arg-11	171.60	51.74	28.06	24.73		41.19	157.51							
Pro-12	174.12	60.93	29.97	25.26		48.30								
Ala-13	173.74	48.36	16.10											
Pro-14	175.53	61.43	29.87	25.32		48.30								
Gly-15	172.14	43.18												
Ser-16	172.47	56.35	61.95											
Thr-17	174.06	58.71	67.90	19.41										

5.3. Sequenzen aus dem humanen Mucin MUC2

Ac-Pro-Thr-Thr-Thr-Pro-Ile-Thr-Thr-Thr-Thr-Val-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Gly-Thr-Gln-Thr-OH (83)

Wang-Harz B1000 (111.1 mg, 50 μmol) wird nach der AAM mit Fmoc-Thr (51.2 mg, 150 μmol) verestert. Die Reagenzien werden in folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Gln-Pfp (80.2 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 21 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 19 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 19 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 20 h), Fmoc-Val-Pfp (78.5 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 21 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 21 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Ile-Pfp (77.9 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 20 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 13 h),

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Nach der letzten Fmoc-Abspaltungsreaktion und dem Waschen mit DMF wird mit Acetanhydrid (50 % in DMF) 20 min behandelt und letztlich mit DMF und Methanol (jeweils 10x2 min) gewaschen. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (241.4 mg) wird in zwei Aliquoten für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im

Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

Insgesamt werden 32.5 mg (13.8 μmol) der MUC2 Repeating Unit **27** erhalten (28 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 25.0 \mu\text{mol/L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 11.81 (185.0 \text{ nm}); (+) 14.24 (188.8 \text{ nm}); (-) 65.53 (193.0 \text{ nm}); (-) 130.74 (196.0 \text{ nm}); (-) 247.30 (199.4 \text{ nm}); (-) 297.48 (202.2 \text{ nm}); (-) 186.58 (211.2 \text{ nm}); (-) 107.57 (221.6 \text{ nm})$.

Die Reinigung und Charakterisierung eines Aliquotes (15.3 mg) des Peptides **27** wurden durchgeführt im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie der Universität Hamburg und sind beschrieben im Anhang.

H-Pro-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Pro-Ile-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Thr(GalNAc)-Val-Thr(GalNAc)-Pro-Thr(GalNAc)-Pro-Thr(GalNAc)-Pro-Thr(GalNAc)-Gly-Thr(GalNAc)-Gln-Thr-OH (22)

Wang-Harz B1250 (52.6 mg, 50 μmol) wird nach AAM mit Fmoc-Thr (51.2 mg, 150 μmol) verestert. Die Reagenzien werden in folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μL), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Gln-Pfp (80.2 mg, 20 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 19 h), **11** (63.0 mg, 20 h), Fmoc-Val-Pfp (78.5 mg, 19 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Ile-Pfp (77.9 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 21 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), **11** (63.0 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h),

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (96.1 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wässriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 95:05 (5 min) $\rightarrow$ 80:20 (60 min) $\rightarrow$ 75:25 (5 min)].

MALDI-TOF-MS kalkuliert für **22** $\text{C}_{203}\text{H}_{335}\text{N}_{37}\text{O}_{104}$ (4958.15 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 4955.21$; gefunden (>10 %): $(M+\text{Na})^+$, 4981.3 (100 %); $(M+\text{K})^+$, 4996.2 (77 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 25.0 \mu\text{mol/L}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 19.94 (184.6 \text{ nm}); (+) 39.29 (191.0 \text{ nm}); (+) 49.27 (195.8 \text{ nm}); (+) 4.61 (201.2 \text{ nm}); (-) 166.79 (208.0 \text{ nm}); (-) 39.35 (223.8 \text{ nm})$.

5.4. Sequenzen aus dem humanem Immunodeficiency Virus

Ac-Thr-Asn(Glu)-Asp-Thr-NH₂ (23)

PEGA-Rink (277.8 mg, 50 μ mol) wird nach der AAA in den Peptidsynthesizer überführt.

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Thr(^tBu) (79.5 mg, 30 min), Fmoc-Asp(^tBu) (82.3 mg, 30 min), **25** (47.0 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu) (79.5 mg, 30 min).

Den Fmoc-Aminosäuren wird bei der Kupplungsreaktion HATU (57.0 mg) zugegeben, der Verbindung **25** wird TBTU (24.1 mg) und DIPEA (13 μ L) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (300.0 mg) wird in zwei Aliquoten für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 50:50 (10 min)].

Insgesamt werden 8.0 mg (10.5 μ mol) der Verbindung **Ac₃23** erhalten (21 % bezogen auf die Belegung Harzes).

FAB MS kalkuliert für **Ac₃23** C₃₀H₄₆N₆O₁₇ (763.08 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 762.74$; gefunden (>10 %): $(M+Na)^+$, 785.80 (81 %), $(M+H)^+$, 763.80 (100 %), $(M+H-NH_2)^+$, 746.80 (37 %),

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 15.0 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero- filling (F1)	Scans	Window- Funktion
cosy90	D ₂ O 99.96 % (pH = 5.5)	6.066 ppm 3032 Hz	2048	256 / 1024	32	sine ssb = 0

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): $\delta = 1.14$ (d, 3 H, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\gamma} = 6.4$ Hz, Thr-CH₃ γ), 1.18 (d, 3 H, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\gamma} = 6.4$ Hz, Thr-CH₃ γ), 2.01 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.04 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.04 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.06 (s, 3 H, Ac-CH₃), 2.63 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{a}} = 7.1$ Hz, $J_{\text{CH}\beta\text{a},\text{CH}\beta\text{b}} = 15.4$ Hz, Asn-CH₂ β a), 2.77 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{b}} = 6.2$ Hz, $J_{\text{CH}\beta\text{a},\text{CH}\beta\text{b}} = 15.4$ Hz, Asn-CH₂ β b), 2.83 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{a}} = 7.3$ Hz, $J_{\text{CH}\beta\text{a},\text{CH}\beta\text{b}} = 17.1$ Hz, Asn-CH₂ β a), 2.92 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{b}} = 5.6$ Hz, $J_{\text{CH}\beta\text{a},\text{CH}\beta\text{b}} = 17.1$ Hz, Asn-CH₂ β b), 3.41 (dd, 1 H, $J_{1\text{a},1\text{e}} = 11.5$ Hz, $J_{1\text{a},2} = 11.4$ Hz, 1a-H), 3.82 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{5,6\text{a}} = 2.0$ Hz, $J_{5,6\text{b}} = 4.6$ Hz, 5-H), 3.92 (dd, 1 H, $J_{1\text{a},1\text{e}} = 11.5$ Hz, $J_{1\text{e},2} = 5.5$ Hz, 1e-H), 4.02 (ddd, 1 H, $J_{1\text{a},2} = 11.4$ Hz, $J_{1\text{e},2} = 5.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, 2-H), 4.02 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 2.0$ Hz, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 13.0$ Hz, 6-H), 4.12 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta} = 4.6$ Hz, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\gamma} = 6.4$ Hz, Thr-CH β), 4.24 (d, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta} = 4.6$ Hz, Thr-CH α), 4.25 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta} = 5.1$ Hz, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\gamma} = 6.4$ Hz, Thr-CH β), 4.25 (d, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta} = 5.1$ Hz, Thr-CH α), 4.29 (dd, 1 H, $J_{5,6\text{b}} = 4.6$ Hz, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 13.0$ Hz, 6b-H), 4.69 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{a}} = 7.1$ Hz, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{b}} = 6.2$ Hz, Asn-CH α), 4.77 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{a}} = 7.3$ Hz, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta\text{b}} = 5.6$ Hz, Asn-CH α), 4.96 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, 4-H), 5.12 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, 3-H).

Verbindung **Ac₃23** (8.0 mg, 10.5 μ mol) wird unter Rühren bei RT in 1 mL Methanol gelöst und mit Natriummethanolat (50 μ L, 1 %) bis pH = 9.0 versetzt. Nach zwei Stunden wird mit Essigsäure (10 μ L, 100 %) neutralisiert und bei 300 K im Vakuum eingeeengt.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 $\rightarrow$ 85:15 (5 min) $\rightarrow$ 60:40 (10 min) $\rightarrow$ 45:55 (5 min)].

Insgesamt werden 4.0 mg (6.28 μ mol) der Verbindung **23** erhalten (60 % bezogen auf **Ac₃23**, 13 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für C₂₄H₄₀N₆O₁₄ (636.97 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 636.26$; gefunden (>10 %): ($M+Na$)⁺, 658.31 (100 %), ($M+H$)⁺, 637.13 (10 %).

CD ($^{\circ}\text{cm}^2/\text{mmol}$, $c = 50.0 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$): $\epsilon_{\text{max}} = (+) 13.80$ (187.4 nm); $(-) 12.76$ (191.2 nm); $(-) 33.16$ (192.8 nm); $(-) 50.06$ (194.6 nm); $(-) 63.74$ (198.8 nm); $(-) 24.57$ (215.2 nm); $(-) 10.31$ (230.0 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: $c = 8.97 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	256 / 1024	16	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	9.997 ppm 5000 Hz	4096	512 / 2048	32	qsine ssb = 2

¹H-NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	H α ₁	H β ₁	H β ₂	H γ _{1a}	Ac	H-1a	H-1e	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
Thr-1	4.256 (4.6)	4.141 (6.4)		1.151	2.047								
Asn-2	4.726 (6.1) (6.2)	2.841 (15.5)	2.713			3.800 (10.4) (5.1)	3.121 (10.7)	3.731 (9.4)	3.430 (9.0)	3.321 (9.5)	3.248 (5.7) (2.2)	3.783 (12.3)	3.606
Asp-3	4.789 (5.3) (7.6)	2.935 (16.5)	2.841										
Thr-4	4.257 (6.1)	4.257 (6.1)		1.162									

***H*-Ser-Asn(Glu)-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Gly-His-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-OH (24)**

Wang-Harz B1000 (111.1 mg, Belegung 450 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$, 50 μ mol) wird nach der AAM mit Fmoc-Phe (58.1 mg, 150 μ mol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (44.5 mg), Methylimidazol (9 μ L), Dichlormethan (2 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Ala-Pfp (70.6 mg, 20 h), Fmoc-Arg(Pbf)-Pfp (122.3 mg, 17 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (75.6 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 22 h), Fmoc-Ile-Pfp

(78.0 mg, 22 h), Fmoc-His(Trt)-Pfp (117.9 mg, 20 h), Fmoc-Gly-Pfp (69.5 mg, 20 h), Fmoc-Ile-Pfp (78.0 mg, 18 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h), Fmoc-Lys(Boc)-Pfp (95.2 mg, 22 h), Fmoc-Arg(Pbf)-Pfp (122.3 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (81.4 mg, 22 h), Fmoc-Asn-Pfp (78.0 mg, 22 h), **25** (94.1 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (79.3 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (24.5 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (203.2 mg) wird in zwei Aliquoten nach der AAH behandelt. Nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wird für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

HPLC [Eluent A - Eluent B, 100:0 → 90:10 (5 min) → 85:15 (50 min) → 75:25 (5 min)].

Insgesamt werden 12.9 mg (6.78 µmol) der Substanz **24** erhalten (14 % bezogen auf die Belegung Harzes). Zusätzlich werden 15.9 mg (7.84 µmol) der triacetylierten Substanz **Ac₃24** erhalten (16 % bezogen auf die Belegung Harzes). Teilacetylierte Substanzen werden nicht nachgewiesen.

MALDI-TOF MS kalkuliert für **24** C₈₁H₁₃₃N₂₇O₂₆ (1901.14 g/mol): $M = 1899.99$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 1902.4 (100 %); $(M+2H)^{2+}/2$, 952.0 (14 %).

MALDI-TOF MS kalkuliert für **Ac₃24** C₈₇H₁₃₉N₂₇O₂₉ (2027.25 g/mol): $M = 2026.02$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 2028.5 (100 %); $(M+H-Ac)^+$, 1986.5 (14 %).

CD (°cm²/mmol, c = 50.0 µmol/L): ε_{max} = (+) 9.16 (184.8 nm); (+) 16.85 (192.0 nm); (-) 13.38 (197.8 nm); (-) 33.50 (199.4 nm); (-) 107.23 (204.8 nm); (-) 45.78 (211.8 nm); (-) 26.75 (218.6 nm) (-) 21.50 (226.6 nm).

NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter: c = 9.69 mmol/L.

Pulssequenz	Lösungsmittel	Sweepweite	Datenpunkte (F2)	FIDs/Zero-filling (F1)	Scans	Window-Funktion
mlevprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	10.962 ppm 5482 Hz	4096	256 / 1024	8	qsine ssb = 2
noesyprtp	H ₂ O/D ₂ O 9:1 (pH = 3.5)	10.962 ppm 5482 Hz	4096	512 / 2048	40	qsine ssb = 2

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm (J in Hz):

δ (J)	NH	Hα ₁	Hα ₂	Hβ ₁	Hβ ₂	Hγ _{1a}	Hγ _{1b}	Hγ ₂	Hδ ₁	Hδ ₂	Hε ₁	Hε ₂	NH	H-1a	H-1b	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	Arom.
Ser-1		4.145 (4.4) (5.5)		3.993 (12.4)	3.966																	
Asn-2	8.515 (7.4)	4.763 (5.9) (7.8)		2.840 (15.7)	2.744								8.176 (9.1)	3.887 (11.1) (5.1)	3.228 (11.1)	3.820 (10.2)	3.506 (8.6)	3.381 (9.7)	3.321 (2.2) (5.7)	3.861 (12.3)	3.678	
Asn-3	8.858 (7.4)	4.788 (5.8) (7.7)		2.878 (15.8)	2.760								7.493									
Thr-4	8.178 (7.2)	4.277 (4.6)		4.220 (6.4)		1.193																
Arg-5	8.331 (7.0)	4.317 (5.7) (6.5)		1.836 (7.3)	1.753 (7.3)	1.612 (7.3)		1.612 (7.3)	3.176 (5.5)	3.176			7.140								6.625	
Lys-6	8.303 (6.9)	4.310 (5.8) (7.9)		1.801 (7.9)	1.719 (8.0)	1.408 (8.0)		1.408	1.655	1.655	2.970 (7.2)	2.970										
Ser-7	8.290 (6.8)	4.441 (5.8) (7.9)		3.812 (11.3)	3.786																	
Ile-8	8.083 (8.4)	4.162 (7.5)		1.791 (6.7) (6.9)		1.319 (7.2)	1.106 (7.5)	0.822	0.803													
His-9	8.571 (7.9)	4.719 (7.0) (8.0)		3.193 (15.6)	3.101											8.557 (1.4)		7.231				
Ile-10	8.222 (8.4)	4.193 (7.5)		1.796 (6.7) (6.9)		1.421 (7.4)	1.127 (7.5)	0.875	0.810													
Gly-11	8.312 (5.7) (5.6)	4.120 (17.1)	4.039																			
Pro-12		4.443 (9.0) (4.4)		2.260 (11.8) (6.9)	1.971 (6.0)	2.013 (6.6)		2.013 (7.5)	3.649 (11.2)	3.601												
Gly-13	8.471 (5.8)	3.909	3.909																			
Arg-14	8.068 (7.3)	4.271 (5.7) (6.2)		1.747 (7.1)	1.661 (7.1)	1.523 (7.1)		1.523 (7.1)	3.119 (5.6)	3.119			7.084								6.625	
Ala-15	8.243 (6.5)	4.274 (7.2)		1.286																		
Phe-16	8.154 (7.5)	4.614 (5.4) (8.2)		3.182 (14.0)	3.034																7.36- 7.22	

5.5. Sequenzen aus dem humanem Choriogonadotropin β

Ac-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH (10)

Wang-Harz B1000 (50.0 mg, 22.5 μ mol) wird nach der AAM mit Fmoc-Gln (24.9 mg, 67.5 μ mol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (20.0 mg), Methylimidazol (4 μ L), Dichlormethan (1 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 19 h), Fmoc-Leu-Pfp (23.4 mg, 21 h), Fmoc-Ile-Pfp (23.4 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Thr(^tBu)-Dhbt (24.5 mg, 22 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (26.0 mg, 18 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 20 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Gly-Pfp (20.9 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Leu-Pfp (23.4 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (21.3 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 17 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Leu-Pfp (23.4 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (7.3 mg) zugegeben. Nach der letzten Fmoc-Abspaltungsreaktion und dem Waschen mit DMF wird mit Acetanhydrid (50 % in DMF) 20 min behandelt und letztlich mit DMF und Methanol (jeweils 10x2 min) gewaschen. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (103.9 mg) wird für 2 h mit wässriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingeeengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

Insgesamt werden 15.7 mg (7.81 μ mol) des Peptides aus der Sequenz des hCG β **10** erhalten (35 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

Reinigung und Charakterisierung des Peptides **10** wurden im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie der Universität Hamburg durchgeführt und sind beschrieben im Anhang.

H-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-OH (28)

Wang-Harz B1000 (50.0 mg, 22.5 μ mol) wird nach der AAM mit Fmoc-Leu (23.9 mg, 67.5 μ mol) verestert. Die Reagenzien werden in den folgenden Mengen eingesetzt:

MSNT (20.0 mg), Methylimidazol (4 μ L), Dichlormethan (1 mL).

Die zu den Peptidkupplungen eingesetzten Aminosäurederivate werden in folgender Reihenfolge in den angegebenen Quantitäten und Reaktionszeiten eingesetzt:

Fmoc-Arg(Pmc)-Pfp (37.3 mg, 21 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Leu-Pfp (23.4 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 12 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg,

22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Pro-Pfp (22.7 mg, 22 h), Fmoc-Ala-Pfp (21.3 mg, 22 h), Fmoc-Lys(Boc)-Pfp (28.6 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 18 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 22 h), Fmoc-Ser(^tBu)-Dhbt (23.8 mg, 18 h), Fmoc-Asp(^tBu)-Pfp (26.0 mg, 22 h), Fmoc-Gln-Pfp (24.1 mg, 22 h), Fmoc-Phe-Pfp (24.9 mg, 18 h).

Den Fmoc-Aminosäure-Pfp-Estern wird bei der Kupplungsreaktion Dhbt-OH (7.3 mg) zugegeben. Das im Hochvakuum getrocknete Harz (207.8 mg) wird in zwei Aliquoten für jeweils 2 h mit wäßriger Trifluoressigsäure (95 %) versetzt und mit Trifluoressigsäure gewaschen (5x2 min). Die vereinigten Filtrate werden bei 300 K im Vakuum eingengt, mit Toluol und Toluol/Methanol (3:1) codestilliert (jeweils 3x) und im Hochvakuum getrocknet.

Insgesamt werden 46.9 mg (22.5 µmol) des Peptides aus der Sequenz des hCGβ **28** erhalten (100 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

Reinigung und Charakterisierung eines Teiles (15.3 mg) des Peptides **28** wurden durchgeführt im Rahmen des Schwerpunktpraktikums in der Organischen Chemie der Universität Hamburg und sind beschrieben im Anhang.

Literatur

- T. Adachi, Y. Yamada, J. Inoue, M. Saneyoshi, *Synthesis* **1977**, 45-53.
- G. Alkhatib, C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, E.A. Berger, *Science* **1996**, 272, 1955-1958.
- R.A. Anderson, R.E. Lovrien, *Nature* **1984**, 307, 655-658.
- R.A. Anderson, V.T. Marchesi, *Nature* **1985**, 318, 295-298.
- S. Anisfeld, P.T. Landsbury, Jr., *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5560-5567.
- V. Apostolopoulos, I.F.C. McKenzie, *Crit. Rev. Immunol.* **1994**, 14, 293-309.
- E. Atheron, E. Brown, R.C. Sheppard, A. Rosevear, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 1151-1157.
- E. Atherton, J.L. Holder, M. Meldal, R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1988**, 1, 2887-2895.
- E. Atherton, R.C. Sheppard (Hrsg.), *Solid phase peptide synthesis - a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1989**.
- P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim **1988**, 477.
- W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246.
- Autorenkollektiv, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften **1976**, 638-659.
- N.K. Back, L. Smit, J.J. De Jong, W. Keulen, M. Schutten, J. Goudsmit, M. Tersmette, *Virology* **1994**, 199, 2, 431-438.
- E. Bardaji, J.L. Torres, P. Clapes, F. Albericio, G. Barany, R.E. Rodriguez, M.P. Sacristan, G. Valencia, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1991**, 1, 1755-1769.
- E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117-123.
- E.P. Bennett, H. Hassan, M.A. Hollingsworth, G. Merx, A.G. van Kessel, R. Steffensen, H. Clausen, *XIV. International Symposium on Glycoconjugates* **1998**, PO20#81.
- E.G. Berger, E. Buddecke, J.P. Kamerling, A. Kobata, J.C. Paulson, J.F.G. Vliegthart, *Experimenta* **1985**, 38, 1129-1139.
- T. Bielfeldt, S. Peters, M. Meldal, K. Bock, H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, N 7, 857-859.
- T. Bielfeldt, *Dissertation* **1993**, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- M. Blank, E. Klusmann, S. Krüger-Krasagakes, *Int. J. Cancer* **1994**, 59, 301-306.
- B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 12, 1701-1704.
- T. Boren, *Science* **1993**, 262, 1892-1895.
- C. Braunschweiler, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528.
- I. Brockhausen, in: L. Montreuil, J.F.G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.) *Glycoproteins*, Elsevier Pub., New York **1995**, 201-260.

- I. Brockhausen, W. Kuhns, *Glycoproteins and human disease*, Springer Verlag, Heidelberg **1997**.
- I. Brockhausen, G. Möller, G. Merz, *Biochemistry* **1990**, 29, 10206-10212.
- I. Brockhausen, J.M. Yang, J.M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607-617.
- J. Broddefalk, U. Nielsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13 (1), 129-132.
- M.-P. Buisine, A. Janin, V. Maunoury, *Gastroenterol* **1996**, 110, 84-91.
- K.L. Carraway, S.R. Hull, *Glycobiol.* **1991**, 1, 131-145.
- L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3413.
- W.G. Chai, E.F. Hounsell, G.C. Cashmore, *Eur. J. Biochem* **1992**, 203, 257-268.
- K. Chandrasekhar, A.T. Profy, H.J. Dyson, *Biochemistry* **1991**, 30, 9187-9194.
- C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E.O. Lundell, J.D. Haug, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1980**, 15, 59-64.
- C.T. Chang, C.-S.C. Wu, J.T. Yang, *Anal. Biochem.* **1978**, 91, 13-31.
- M.K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1, 153-160.
- F. Cocchi, A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R.C. Gallo, P. Lusso, *Nat. Med.* **1996**, 11, 1244-1247.
- P.L. Coduti, E.C. Gordon, C.A. Bush, *Anal. Biochem.* **1977**, 78, 9-20.
- M. Coimмер, H. Kunz, *Synlett* **1991**, 593-596.
- T. Cornfield, *Glycoconj. J.* **1992**, 9, 217-221.
- A.G. Dalsleish, P.C. Beverley, P.R. Clapham, M.F. Greaves, R.A. Weiss, *Nature* **1984**, 312, 763-767.
- P.E. Dawson, T.W. Muir, I.C. Lewis, B.H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776.
- J. Dekker, G. Stous, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18116-18122.
- K. Dill, S. Hu, E. Berman, A.A. Pavia, J.M. Lacombe, *J. Protein Chem.* **1990**, Vol. 9, Nr. 2, 129-136.
- J. Dojahn, *Diplomarbeit* **1997**, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- P. Dokurno, P.A. Bates, H.A. Band, L.M.D. Stewart, J.M. Lally, J.M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M.J.E. Sternberg, D. Snary, P.S. Freemont, *Cancer*, im Druck.
- A. Dryland, R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1986**, 1, 125-132.
- T. Feizi, R.A. Childs, *Biochem. J.* **1987**, 245, 1-11.
- B. Ferrari, A.A. Pavia, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, 22, 549-555.
- B. Ferrari, A.A. Pavia, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 41, 1939-1943.
- G.B. Fields, R.N. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, 35, 161-170.

- J.F. Fisher, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3140-3143.
- J.D. Fontenot, J.M. Ball, M.A. Miller, C.M. David, R.C. Montelaro, *Peptide Res.* **1991**, 4, 1, 19-25. J.D. Fontenot, O.J. Finn, N. Dales, P.C. Andrews, R.C. Montelaro, *Peptide Res.* **1993**, 6, 6, 330-336.
- J.D. Fontenot, S.V.S. Mariappan, P. Catasi, N. Domenech, O.J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. And Dynam.* **1995**, 13, 2, 245-260.
- J.D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R.C. Montelaro, O.J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386-5394.
- L.-A. Fransson, in: G.O. Aspinall (Hrsg.) *The Oligosaccharides*, Academic Press, New York **1985**.
- H. Friebolin, G. Schilling, *Chemie In Unserer Zeit* **1994**, 28, 2, 88-101.
- K. Frische, M. Meldal, O. Werdelin, S. Mouritsen, T. Jensen, L. Galli-Stampino, K. Bock, *J. Pept. Sci.* **1996**, 2, 212-222.
- J.S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 817-952.
- M. Fukuda, M. Lauffenburger, H. Sasaki, M.E. Rogers, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 11952-11967.
- H. Furthmayr, *Nature* **1978**, 271, 519-524.
- R.C. Gallo, *Spektrum der Wissenschaft* **1987**, 3, 82-93.
- A.S. Gambaryan, *FEBS Lett.* **1995**, 366, 57-60.
- T.A. Gerken, *Arch. of Biochem. and Biophys.* **1986**, 2, 239-253.
- T.A. Gerken, K.J. Butenhof, R. Shogren, *Biochem.* **1989**, 28, 5536-5543.
- T.A. Gerken, D.G. Dearborn, *Biochemistry* **1984**, 23, 1485-1497.
- T.A. Gerken, R. Gupta, N. Jentoft, *Biochem.* **1992**, 31, 639-648.
- A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillet, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, 43, 1072-1076.
- S. Goletz, B. Thiede, F.-G. Hanisch, M. Schulz, J. Peter-Katalinic, S. Müller, O. Seitz, U. Karsten, *Glycobiology* **1997**, 7, 7, 881-896.
- A. Gottschalk (Hrsg.), *Glycoproteins, 1 & 2*, Elsevier, Amsterdam **1972**.
- M. Granovsky, T. Bielfeldt, S. Peters, *Eur. J. Biochem* **1994**, 221, 1039-1046.
- M. Granowska, L. Biassoni, M.J. Carroll, R. Howell, S.J. Mather, D. Ellison, A. Granowski, K.E. Britton, *Acta Oncologia* **1996**, 35, 319-321.
- N.J. Greenfield, *Anal. Biochem.* **1996**, 235, 1-10, und dortige Zitate.
- C. Griesinger, O.W. Sorenson, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, 474-492.
- G. Grundler, R.R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826-1847.
- H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1992**, 372-376.

- J.R. Gum, J.W. Hicks, N.W. Toribara, B. Siddiki, Y. Kim, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2440-2446
- H. van Halbeek, A.-M. Strang, M. Lhermitte, *Glycobiol.* **1994**, 4, 203-219.
- P. Hallgren, A. Lundblad, J. Svenson, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 5312-5323.
- F. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, J. Dabrowski, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 872-883.
- G.W. Hart, G.D. Holt, R.S. Haltiwanger, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 380-396.
- S. Hase, N. Nishimura, S. Kawabata, S. Iwanaga, T. Ikenaka, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 1858-1865.
- B. Helferich, W.M. Müller, S. Karbach, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 1514-1517.
- L. Herfurth, *Diplomarbeit* **1997**, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1991**.
- R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12550-12568.
- E.F. Hounsell, M.J. Davies, D.V. Renouf, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 19-26.
- E.F. Hounsell, A.M. Lawson, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 148, 367-377.
- H. Ijima, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1989**, 186, 95-99.
- T. Irimura, Y. Imai, K. Yamamoto, S.-I. Iida, T. Sakamaki, K.-H. Chun, *5. Int. Workshop on Carcinoma-Ass. Mucins* **1998**, Cambridge, U.K.
- H. Iwase, I. Ishii, K. Ishihara, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1988**, 151, 422-428.
- G.A. Jamieson, T.J. Greenwalt (Hrsg.), *Glycoproteins of Blood Cells & Plasma*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia & Toronto **1971**.
- K.R. Jerome, L.D. Barud, K.M. Bendt, C.M. Boyer, J. Taylor-Papadimitriou, I.F.C. McKenzie, R.C. Bast, O.J. Finn, *Cancer Res.* **1991**, 51, 2908-2916.
- L.O. Jessen, *Schwerpunktarbeit* **1999**, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
- H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, *Dünnschichtchromatographie*, Band 1a, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim **1990**, 324-353.
- U. Karsten, C. Diotel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz, S. Müller, F.-G. Hanisch, *Cancer Res.* **1998**, 58, 2541-2549.
- H. Kessler, M. Kottenhahn, A. Kling, C. Kolar, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 919-930.
- M.J. Kessler, T. Mise, R.D. Ghai, O.P. Bahl, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 7909-7914.
- Y.S. Kim, J. Gum Jr., I. Brockhausen, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 693-707.
- L. Kisfaludy, I. Schön, *Synthesis Comm.* **1983**, 325-327.
- G. Klich, *Diplomarbeit* **1994**, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- G. Klich, H. Paulsen, B. Meyer, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1997**, 33-48.

R.R. Koganty, M.A. Reddish, B.M. Longenecker, *DDT* **1996**, 1, 5, 190-198.

R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gilessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 15, 1927-1930

H. Kunz, M. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 731-733.

A. Kurosaka, H. Nakajima, I. Funakoshi, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 11594-11598.

D.T.A. Lamport, L. Katona, D. Roerig, *Biochem. J.* **1973**, 133, 125-137.

D.T.A. Lamport, D.H. Miller, *Plant Physiol.* **1971**, 48, 454-467.

M.S. Lan, S.K. Batra, W.-N. Qi, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15294-15299.

R.U. Lemieux, R.M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1257.

W.J. Lennarz, *Biochemistry* **1987**, 26, 7205-7213.

X. Liu, J. Seibal, G. Kotovych, R.R. Koganty, M.A. Reddish, L. Jackson, S.S. Gandhi, A.J. Mendonca, B.M. Longenecker, *Glycoconj. J.* **1995**, 12, 607-617.

K.H. Mayo, D. Parra-Diaz, J.B. McCarthy, M. Chelberg, *Biochemistry* **1991**, 30, 8251-8267.

V.T. Marchesi, *Seminars in Hematology* **1979**, Vol. 16, Nr. 1, 3-20.

V.T. Marchesi, *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1985**, 1, 531-561.

J.D. Marth, *Glycobiology* **1996**, 6, 7, 701-705.

M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 33, 3077-3080.

M. Meldal, K.J. Jensen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 483-496.

M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005-4009.

R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2165.

J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1980**, 37, 157-170.

J. Montreuil, *Pure and Appl. Chem.* **1984**, 56, 859-865.

S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A.M. Lawson, F.G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24780-24793.

P.N. Nehete, R.B. Arlinghaus, K.J. Sastry, *J. Virol.* **1993**, 67, 11, 6841-6846.

I. Nishimori, N.R. Johnson, S.D. Sanderson, R. Perini, K. Mountjoy, R.L. Cernag, M.L. Gross, M.A. Hollingsworth, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 16123-16130.

K. El Ouagari, J. Teissie, H. Benoist, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26970-26975.

A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-982.

H. Paulsen, T. Bielfeldt, S. Peters, M. Meldal, K. Bock, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 369-379

H. Paulsen, C. Kolar, W. Stenzel, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 478.

H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 17-34.

H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell, W. Stenzel, *Carbohydr. Res.* **1978**, 64, 339-343.

H. Paulsen, M. Schulz, J.-D. Klamann, B. Waller, M. Paal, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2028-2041.

- A.A. Pavia, B. Ferrari, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, 22, 539-548.
- Y. Pei, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 7509.
- G. Pépe, D. Siri, Y. Oddon, A.A. Pavia, J.-P. Reboul, *Carbohydr. Res.* **1991**, 209, 67-81.
- S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, H. Paulsen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, I, 1163-1171.
- J. Pieper, K.H. Ott, B. Meyer, *Nat. Struc. Biol.* **1996**, 3, 228-232.
- M.R. Price, *Tumor Biol.* **1997**, 19 (Suppl. 1), 1-20.
- M. Ravenscroft, R.G.M. Roberts, J.G. Tillett, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1982**, II, 1569-1586.
- C.A. Reis, T. Sørensen, U. Mandel, L. David, E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff, J. Kihlberg, J.-E.S. Hansen, H. Clausen, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 51-62.
- H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787-3788.
- Römpf CD Chemielexikon (Version 1.0), Thieme Verlag, Stuttgart/New York **1995**.
- M. Rose, *Am. J. Physiol.* **1992**, 7, 413-429.
- T. Rosen, I.M. Lico, D.T.W. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1580-1583.
- P. Roussel, G. Lamblin, in J. Montreuil, J.F.G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.), *Glycoproteins and disease*, Elsevier, Amsterdam **1996**, 351-393.
- H. Sakaida, T. Murakami, S. Kawamata, T. Hattori, T. Uchiyama, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1998**, 14, 1, 31-38.
- M.J. Scanlon, S.D. Morley, D.E. Jackson, M.R. Price, S.J.B. Tendler, *Biochem. J.* **284**, 137-144.
- H. Schachter, I. Brockhausen, in H.J. Allen, E.C. Kisailus (Hrsg.), *Glycoconjugates*, Marcel Dekker, New York **1992**, 263-332.
- A. Schäfer, G. Klich, M. Schreiber, H. Paulsen, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1998**, 313, 107-116.
- A. Schäffler, S. Schmidt, *Mensch Körper Krankheit*, Jungjohann Verlag, Lübeck **1995**, 223-226.
- A. Schleyer, M. Meldal, R. Manat, H. Paulsen, K. Bock, **1997**.
- T.H. Schulte, V.T. Marchesi, *Biochemistry* **1979**, 18, Nr. 2, 275-279.
- O. Schuster, G. Klich, V. Sinnwell, H. Kränz, H. Paulsen, B. Meyer, *J. Biomolecular NMR*, eingereicht.
- N. Sharon, H. Lis, *Spektrum d. Wiss.* **1993**, 3, 66-74.
- S.B. Shohet, S.E. Lux, *Hosp. Pract.* **1984**, 19, 90.
- R. Shogren, T.A. Gerken, N. Jentoft, *Biochemistry* **1989**, 28, 5525-5536.
- Dr. V. Sinnwell, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung.

P.W. Small, D.C. Sherrington, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1589-1594.

R.F. Speck, K. Wehrly, E.J. Platt R.E. Atchison, I.F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, M.A. Goldsmith, *J. Virol.* **1997**, 71, 9, 7136-7139.

A.P. Spicer, G. Parry, S. Patton, S.J. Gendler, *J. Biol. Chem.* **1991**, 15099-15112.

R.G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 4813-4821.

G. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198-1206.

T. Stadie, W. Chai, A.M. Lawson, P. Byfield, F.G. Hanisch, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, 140-147.

A. Stockell Hartree, A.G.C. Renwick, *Biochem. J.* **1992**, 287, 665-679.

P.F.W. Strengers, *Blut*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg **1996**.

G.J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. in Biochem. and Molec. Biol.* **1992**, 27, 57-76.

L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg **1994**.

M. Summers, L.G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4285-4294

K. Talmadge, N.C. Vamvakopoulos, F.C. Fiddes, *Nature* **1984**, 307, 37-43.

W. Tanner, A. Lehle, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 906, 81-96.

S.J.B. Tendler, *Biochem. J.* **1990**, 267, 733-737.

M. Tomita, H. Furthmayr, V.T. Marchesi, *Biochemistry* **1978**, 17, Nr. 22, 4756-4769.

K. Tytgat, H. Büller, F. Opdam, *Gastroenterology* **1994**, 59, 1352-1366.

A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.

M. Verma, E.A. Davidson, *Glycoconj. J.* **1994**, 172-179.

H.H. Wandall, M. Hassan, E. Mirgorodskaya, A.K. Kristensen, P. Roepstorff, E.P. Bennett, P.A. Nielsen, M.A. Hollingsworth, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23503-23514.

S.S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1335.

G. Wagner, D. Neuhaus, E. Wörgötter, M. Vašák, J.R.H. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1986**, 187, 131-135.

K. Watanabe, T. Matsuda, Y. Sato, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 667, 242-250.

K. Witte, P. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2114-2118.

K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York **1986**.

L. Xerri, M.-J. Payan, R. Choux, *Hum. Pathol.* **1990**, 21, 927-931.

G. Xu, L. Huan, I.A. Khatiri, D. Wang, A. Bennick, R.E.F. Fahim, G.G. Forstner, J.F. Forstner, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 5401-5407.

N. Yahi, J.M. Sabatier, S. Baghdiguian, F. Gonzalez-Scarano, J. Fantini, *J. Virol.* **1995**, 69, 1, 320-325.

G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 63, 1613-1618.

Anhang

Im folgenden werden Auszüge aus drei im Rahmen des Schwepunktpraktikums der Organischen Chemie an der Universität Hamburg durchgeführten Arbeiten vorgestellt. Bei den unter Anleitung durchgeführten Arbeiten handelt es sich um teilweise ergänzende Untersuchungen zu den in der vorangehenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen. Die relevanten Details sind in den entsprechenden Kapiteln vermerkt. Der Vollständigkeit der Daten und Ergebnissen halber sind hier gekürzte Passagen aus den Schwerpunktarbeiten vorgestellt.

Lars-Olaf Jessen (1999):

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zur MUC2 Repeating Unit (27)

Seite: I

Nida Öztürk (1998):

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zu einem Glycopeptidfragment aus dem humanen Chorio Gonadotropin β (10)

Seite: V

Tanja Pieszkalla (1997):

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zu einem Glycopeptidfragment aus dem humanen Chorio Gonadotropin β (28)

Seite: IX

Lars-Olaf Jessen (1999)

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zur MUC2 Repeating Unit 27

1. Reinigung des Peptidfragmentes analog zur MUC2 Repeating Unit

Das Rohprodukt der Peptidsynthese zur MUC2 Repeating Unit wurde zur Chromatographie an der präparativen HPLC-Säule in zwei Fraktionen aufgeteilt und getrennt gereinigt. Um untersuchen zu können, ob eine Membranfiltrierung vergleichbare Resultate liefert, wie eine Vorchromatographie, wurde die erste Fraktion durch eine Teflonfritte gepreßt, bevor die RP-HPLC durchgeführt wurde, die zweite Fraktion wurde über eine Vorsäule gereinigt. Die Chromatogramme der beiden Fraktionen sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Die Resultate gleichen sich im Wesentlichen.

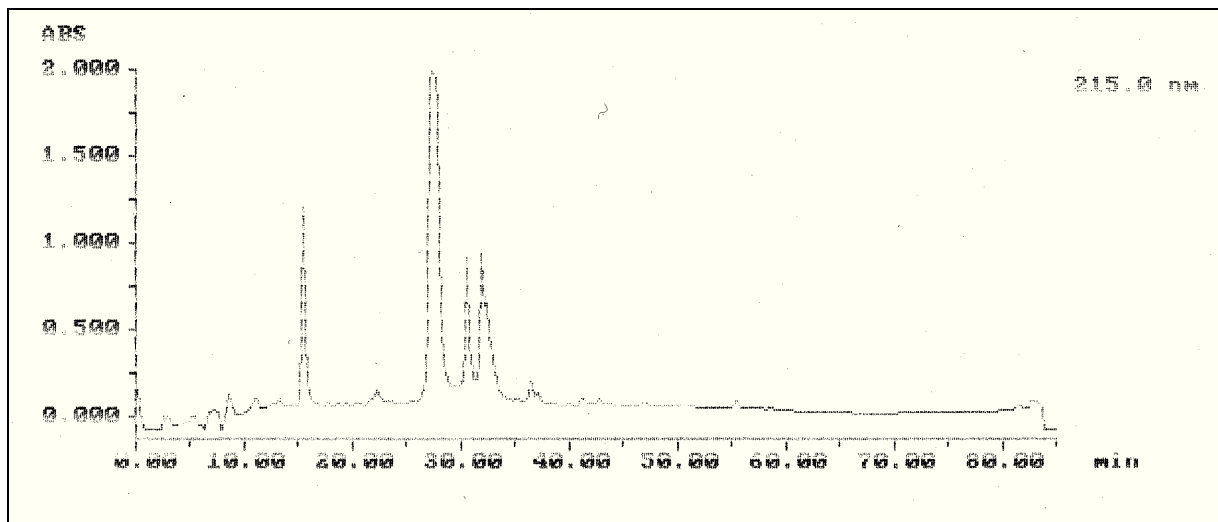


Abb. 1: RP-HPLC-Chromatogramm der ersten Fraktion nach Membranfiltrierung; Eluent A / Eluent B: 100/0 → 50/50(40 Minuten); R_t =27.5 Minuten

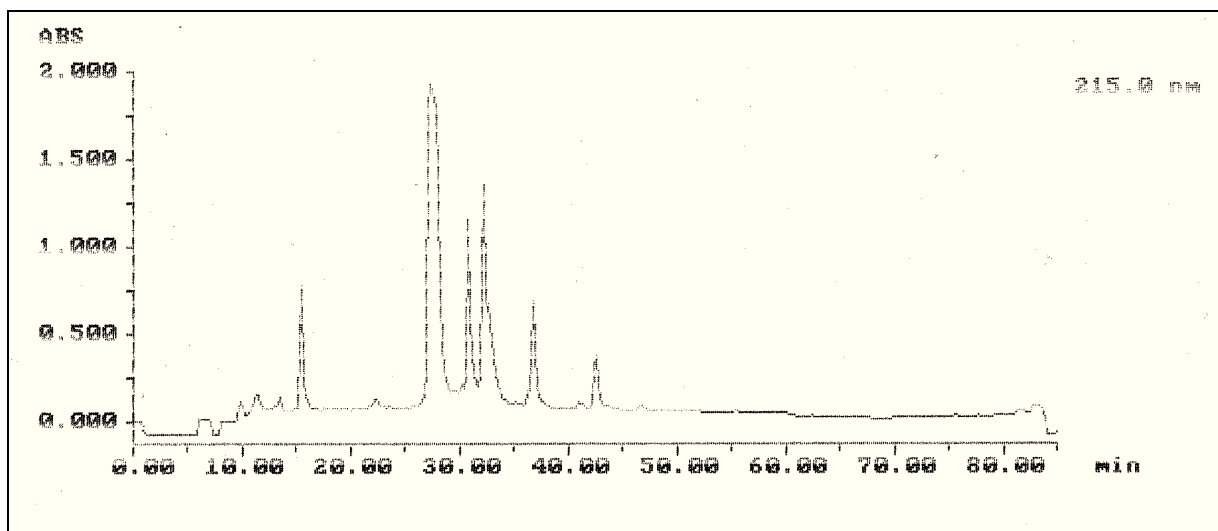


Abb. 2: RP-HPLC-Chromatogramm der zweiten Fraktion nach Vorchromatographie; Eluent A / Eluent B: 100/0 → 50/50(30 Minuten); R_t =27.5 Minuten

Das MUC2 Peptid eluiert bei $R_t=27.5$ Minuten. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden insgesamt 41.7 mg Peptid erhalten.

2. Charakterisierung des Peptidfragmentes

Nach der Gefriertrocknung wird das Peptidfragment über Massenspektrometrie (MALDI-TOF) nachgewiesen. Anschließend werden NMR-Spektren in H_2O und D_2O aufgenommen.

Es wurde deutlich, daß starke Überlagerungen die eindeutige Zuordnung in den aufgenommenen 1H -TOCSY-, 1H -NOESY- und 1H -ECOSY-Spektren verhindern. Gleiches gilt auch für die 1H - ^{13}C -HBMC- und 1H - ^{13}C -HMQC-Spektren.

Erst hochaufgelöste 1H -TOCSY- und 1H -NOESY- Spektren mit 32K-Datenpunkten in F2-Dimension führten zu einer eindeutigen Sequenzbestimmung. In Abbildung 3 ist das 1H -TOCSY-Spektrum dargestellt.

Anhand der 1H - ^{13}C -HBMC- und 1H - ^{13}C -HMQC-Spektren werden die ^{13}C -Verschiebungen so weit wie möglich bestimmt. Aus dem 1H -ECOSY-Spektrum werden die Kopplungskonstanten entnommen, soweit dieses durch die Überlagerung der Signale möglich ist.

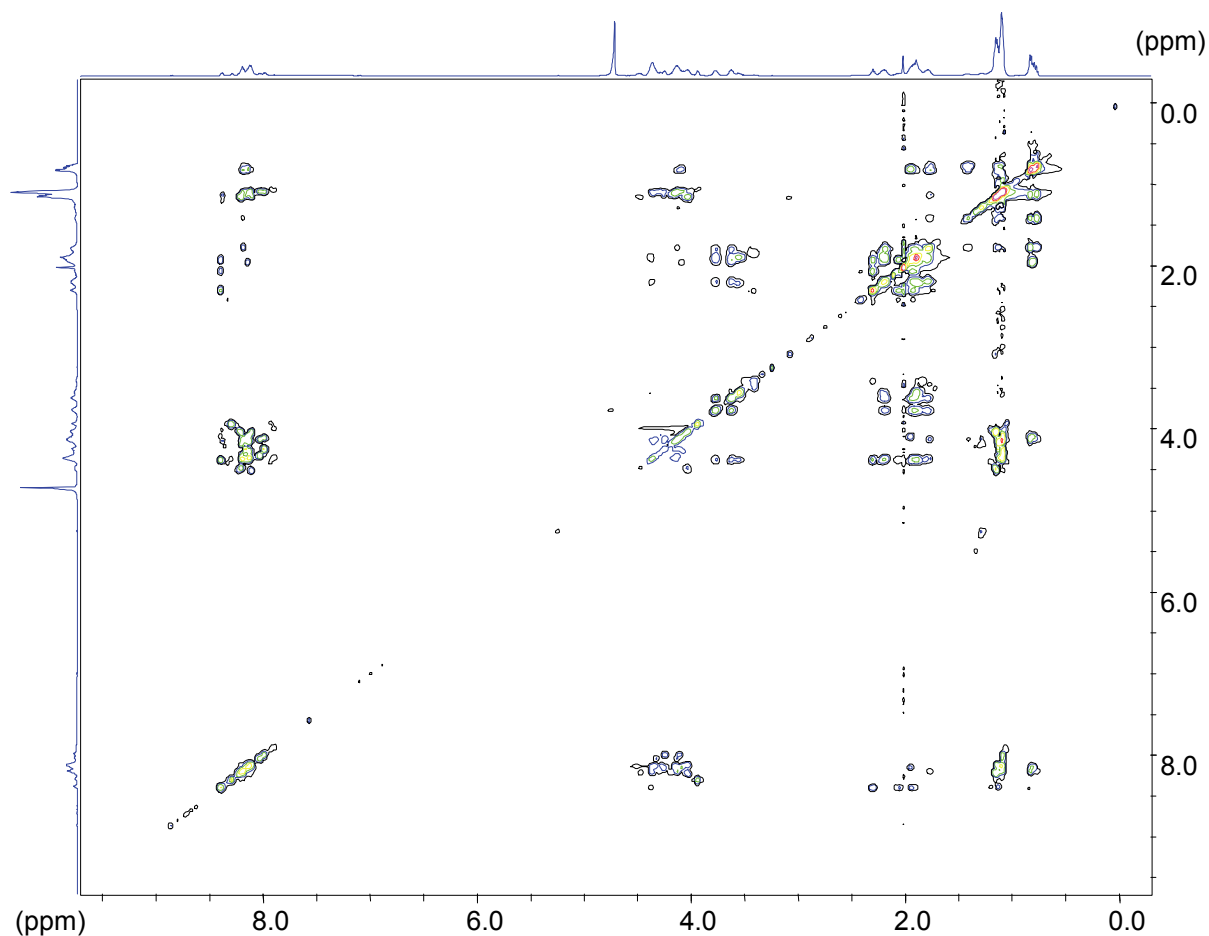


Abb. 3: 1H -TOCSY-Spektrum mit 32k Datenpunkte in F2 (H_2O).

3. Experimentelles

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{101}H_{168}N_{24}O_{40}$ (2358.6 $\frac{g}{mol}$): $M = 2357.2$; gefunden ($>10\%$): $(M+H)^+$, 2361.6 (100 %); $(M+Na)^+$, 2383.7 (10 %).

NMR Aufnahme und Prozessierungsparameter:

Spektrum: NOESY, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	32768	512
	NS	80	
Processing Parameter	SW	9.997354	9.997354
	WDW	GM	QSINE
	SSB		2.0000
	LB	-1.0000	0
	GB	0.3000	0
	SI	16384	2048

Spektrum: TOCSY, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	32768	512
	NS	16	
Processing Parameter	SW	9.997354	9.997354
	WDW	GM	QSINE
	SSB		2.0000
	LB	-1.0000	0
	GB	0.3000	0
	SI	16384	2048

1H NMR (500 MHz) δ in ppm:

Aminosäure	αH	βH	γCH_3	γCH_2	δCH_3	δCH_2	NH
Prolin	4.381	2.305/2.063				3.775/3.555	
Threonin	4.246	4.108	1.092				7.988
Threonin	4.328	4.128	1.088				8.034
Threonin	4.500	4.021	1.149				8.226
Prolin	4.395	2.224/1.949				3.770/3.625	
Isoleucin	4.126	1.772	0.909	1.416	0.823		8.189
Threonin	4.512	4.042	1.149				8.106
Threonin	4.478	4.041	1.158				8.202
Threonin	4.250	4.141	1.138				8.155
Threonin	4.362	4.187	1.104				8.201
Threonin	4.355	4.072	1.105				8.122
Valin	4.095	1.960	0.811				8.140
Threonin	4.371	4.094	1.097				8.140
Prolin	4.361	2.187/1.903				3.772/3.617	
Threonin	4.276	4.067	1.087				8.118
Prolin	4.381	2.305/2.063				3.775/3.555	
Threonin	4.299	4.124	1.089				8.191
Prolin	4.381	2.305/2.063				3.775/3.555	
Threonin	4.356	4.141	1.104				8.132
Glycin	3.935						8.295
Threonin	4.356	4.141	1.104				8.132
Glutamin	4.379	2.067/1.930					8.391
Threonin	4.362	4.124	1.150				8.188

^{13}C -NMR (125 MHz):

Aminosäure	CO	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	C $_{\gamma 1}$	C $_{\gamma 2}$	C $_{\delta 1}$
Ac	173.393					
Prolin				24.860		
Prolin				24.860		
Isoleucin	174.313	59.640	36.325		24.847	18.032
Valin	173.544					
Prolin				24.860		
Prolin				24.860		
Prolin				24.860		
Glutamin	172.015	53.541		27.072		178.339

^1H -Kopplungskonstanten J [Hz]:

Aminosäure	CH $_{\alpha}$ - CH $_{\alpha 2}$	CH $_{\alpha}$ - CH $_{\beta}$	CH $_{\alpha}$ - CH $_{\beta 2}$	CH $_{\beta}$ - CH $_{\gamma}$	CH $_{\beta}$ - CH $_{\beta 2}$	CH- CH $_{\gamma}$	CH $_{\beta}$ - CH $_{\delta}$	CH $_{\alpha}$ - NH
Isoleucin		6.5		7.2		19.9	3.4	8.0
Valin		6.3		7.5				
Glycin	22.0							
Threonin								
Glutamin		7.8	7.2	7.6	7.4			6.9

Nida Öztürk (1998)

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zu einem Glycopeptidfragment aus dem humanen Chorio Gonadotropin β 10

1. Reinigung des Peptidfragments

Es wurden für die HPLC 57,3 mg und 42,0 mg mit 95 % TFA vom Harz abgespaltenes Rohprodukt eingesetzt und getrennt nach Lösen in Wasser/Acetonitril 1:1 gereinigt. Hierbei erwies es sich als notwendig, je zwei Trennungen durchzuführen.

2. Charakterisierung des Peptidfragmentes

Von den nach der HPLC erhaltenen Fraktionen wurden ^1H -NMR-Spektren in D_2O aufgenommen, die zeigten, daß das Produkt bei R_f 25:23 eluiert ist. Bei den hier angezeigten Nebenprodukten handelt es sich um unterschiedlich weit gekuppelte Peptidfragmente. Die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) bestätigte die Struktur.

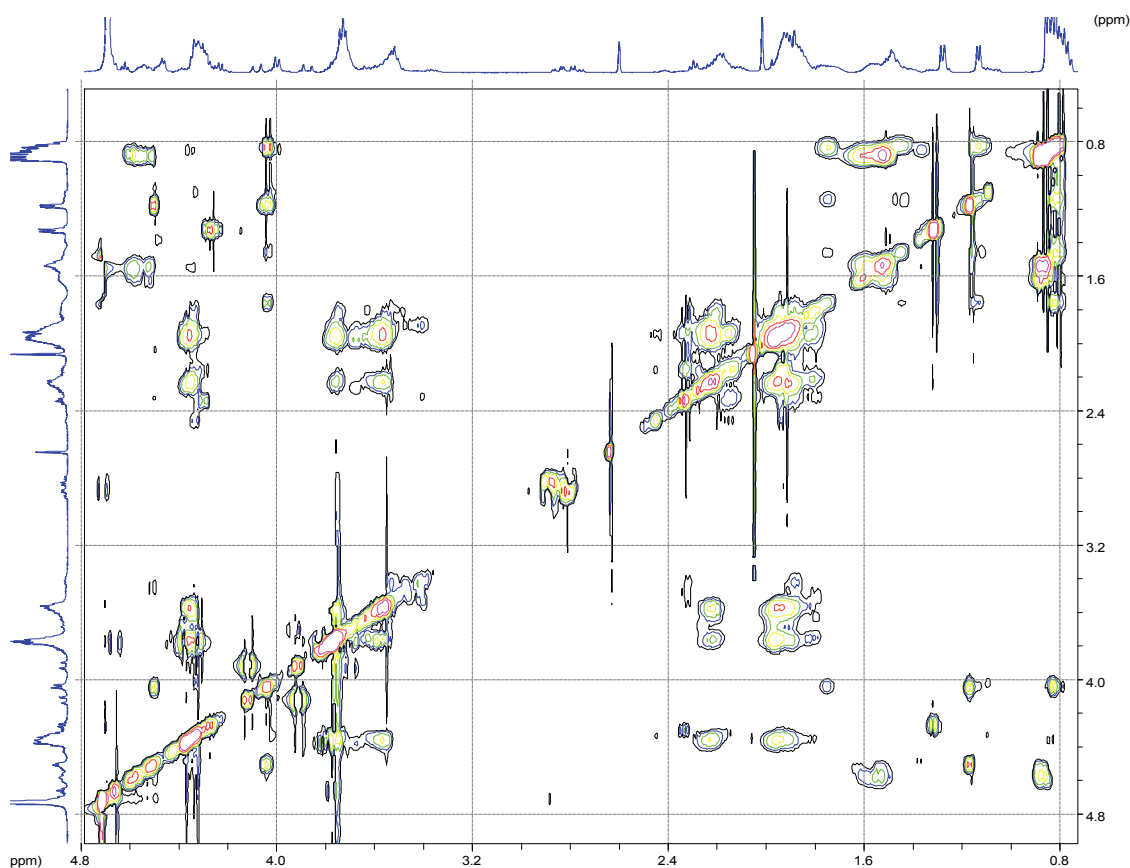


Abb. 1: ^1H -TOCSY, aufgenommen in D_2O , 500 MHz.

Durch die Aufnahme von ^1H -COSY bzw. ^1H TOCSY-Spektren in H_2O konnten die Protonenverschiebungen in den Seitenketten der einfach vorkommenden Aminosäuren Gly, Asp, Thr und Gln leicht bestimmt werden. Bei den mehrfach vorkommenden Aminosäuren Ser und Pro sind die Signale überlagert, insbesondere bei den α -Protonen von Pro und Ser im

Bereich von 4,22-4,43 ppm. Es konnten jedoch die NH-Protonen-Verschiebungen ermittelt werden. Ausgehend von diesen Daten ist dann mit Hilfe von Spektren in D₂O die Signalzuordnung gelungen. Mit Hilfe der ¹H¹³C-HMBC- und ¹H¹H-NOESY-Spektren konnte schließlich die sequentielle Zuordnung der Signale durchgeführt werden.

Die in aufgeführten ¹³C-Verschiebungen wurden hauptsächlich aus dem ¹H¹³C-HMBC ermittelt, aus dem ¹H¹³C-HMQC bestimmten Verschiebungen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Kopplungskonstanten wurden aus einem ¹H¹H-ECOSY-Spektrum bestimmt. Die Kopplungskonstanten der Protonen in den Seitenketten der Aminosäuren konnten teilweise nicht bestimmt werden, da die Signale stark überlagert waren.

2. Experimentelles

MALDI-TOF-MS kalkuliert für C₉₄H₁₅₂N₂₄O₃₀ (2011.04 g/mol): $M = 2010.12$; gefunden (>10 %): $(M+H)^+$, 2015.9 (100 %); $(M+Na)^+$, 2036.9 (10 %).

NMR Aufnahme und Prozessierungsparameter:

Spektrum: COSY, D ₂ O, 400 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	2048	256
	NS	32	
	SW	4,881147	4,881147
Processing Parameter	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	0	0
	TD _{eff}	4096	512

Spektrum: TOCSY, D ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	8	
	SW	7,934413	7,934400
Processing Parameter	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2
	TD _{eff}	4096	256

Spektrum: NOESY, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	512
	NS	72	
	SW	9,997354	9,997354
Processing Parameter	WDW	SINE	SINE
	SSB	2 (4)	2 (4)
	TD _{eff}	4096	512

Spektrum: TOCSY, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	512
	NS	32	
	SW	9,997354	9,997354
Processing Parameter	WDW	SINE	SINE
	SSB	2	2
	TD _{eff}	4096	512

Spektrum: ECOSY, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	8192	512
	NS	48	
	SW	9,997354	9,997354
Processing Parameter	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2
	TD _{eff}	8192	512

Spektrum: HMBC, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	128	
	SW	9,997354	222,095143
Processing Parameter	WDW	QSINE	SINE
	SSB	0	2
	TD _{eff}	4096	512

Spektrum: HMQC, H ₂ O, 500 MHz		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	64	
	SW	9,997354	222,095143
Processing Parameter	WDW	SINE	SINE
	SSB	4	6
	TD _{eff}	4096	512

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm:

	NH	H _α	H _β	H _β '	H _γ	H _γ '	H _γ CH ₃	H _δ	H _δ '
Ac	-	1,988	-	-	-	-	-	-	-
Pro	-	4,447*	#	#	#	#	#	3,826* ^{cc}	3,824*
Ser	8,228	4,412	3,827	3,827	-	-	-	-	-
Leu	8,186	4,623	1,630	1,630	1,554	-	-	0,895	-
Pro	-	4,436*	#	#	#	#	#	3,861* ^{cc}	3,861* ^{cc}
Ser	8,420	4,451*	3,860*	3,860*	-	-	-	-	-
Pro	-	4,419*	2,283*	#	#	#	#	3,832* ^{cc}	3,832* ^{cc}
Ser	8,372	4,490*	3,832*	3,832*	-	-	-	-	-
Ala	8,170	4,332	1,338	-	-	-	-	-	-
Leu	8,140	4,585	1,658	1,658	1,559	-	-	0,904	-
Pro	-	4,320*	#	#	#	#	#	3,980*	3,830*
Gly	8,161	3,979	-	-	-	-	-	-	-
Pro	-	4,444*	2,298	1,839	1,610	1,610		3,721	3,721
Ser	8,334	4,770	3,863	3,863	-	-	-	-	-
Asp	8,425	4,709	2,901	2,850	-	-	-	-	-
Thr	8,018	4,566	4,108	-	1,028	-	-	-	-
Pro	-	4,402*	2,256	1,797	1,568	1,568	-	3,679 ^{cc}	3,679 ^{cc}
Ile	8,205	4,095	1,797	-	1,570	1,171	#	0,854	-
Leu	8,280	4,658	1,621	1,621	1,558	-	-	0,894	-
Pro	-	4,407*	2,382	#	#	#	-	#	#
Gln	8,448	4,353	2,197	1,978	2,386	2,386	-	-	-
NH ₂	7,915	-	-	-	-	-	-	-	-

* Daten aus dem NOESY übernommen

" Signale liegen nicht dispergiert vor

Verschiebungen konnten nicht ermittelt werden wegen Überlagerung der Signale.

¹³C-NMR (125 MHz):

	CO	C _α	C _β	C _γ	C _δ
Pro	#	61,454* ^{cc}	29,651*	24,774*	48,116*
Ser	173,318	55,858	60,820*	-	-
Leu	#	52,377*	39,426	24,533	20,935
Pro	#	61,454* ^{cc}	29,651	24,790*	52,394
Ser	171,640	55,735	61,026*	-	-
Pro	174,977	55,611	29,639*	24,790* ^{cc}	48,116* ^{cc}
Ser	174,186	53,851	60,997	-	-
Ala	174,835	50,676	17,013*	-	-
Leu	#	52,300*	39,390*	24,497	22,734
Pro	174,602	61,454* ^{cc}	29,639* ^{cc}	24,790* ^{cc}	48,116* ^{cc}
Gly	#	42,191*	-	-	-
Pro	174,883	56,035	29,639* ^{cc}	24,790* ^{cc}	48,116* ^{cc}
Ser	172,248	50,851	#	-	-
Asp	172,338	57,488	35,659*	-	-
Thr	#	57,461*	67,439	-	-
Pro	174,041	58,706	29,640	24,622*	48,116* ^{cc}
Ile	171,959	58,562	36,261	-	-
Leu	#	52,357	39,537*	24,737	22,842
Pro	173,588	61,454* ^{cc}	30,168	24,790* ^{cc}	48,116* ^{cc}
Gln	#	54,336	16,860	-	-
OCH ₃	173,357	24,753			

* Daten aus dem HMQC übernommen

" Signale liegen nicht dispergiert vor

Verschiebungen konnten nicht ermittelt werden.

¹H¹H-Kopplungskonstanten J [Hz]:

	NH- CH _α	NH- CH _{α2}	CH _α - CH _{α2}	CH _α - CH _β	CH _β - CH _γ	CH _β - CH _{γ2}	CH _γ - CH _δ	CH _γ - CH _{δ2}	CH _γ - CH _{δ3}
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	7,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	7,3	-	-	-	-	-	4,1	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	7,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala	7,2	-	-	5,9	-	-	-	-	-
Leu	7,4	-	-	-	-	-	6,2	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gly	5,7	6,1	18,4	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	7,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Asp	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	8,1	-	-	-	5,6	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	7,7	-	-	-	-	-	10,7	3,8	6,6
Leu	7,8	-	-	-	-	-	6,3	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gln	7,6	-	-	-	7,0	8,1	-	-	-

Tanja Pieszkalla (1997)

Reinigung und Charakterisierung eines Peptidfragmentes analog zu einem Glycopeptidfragment aus dem humanen Chorio Gonadotropin β 10

1. Reinigung des Peptidfragments

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt über HPLC mit einer reversed phase Säule (polares Lösungsmittel, unpolares Trägermaterial). Hierbei wird ein Konzentrationsgradient benutzt (Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit), um eine Trennung der verschiedenen polaren Komponenten zu erreichen. Als Laufmittel haben sich H_2O und MeCN bewährt. Beide Lösungsmittel sind mit TFA versetzt ($\text{pH} \sim 2$), damit alle NH-Gruppen in den gelösten Peptiden protoniert sind. Bei $\text{pH} 7$ wäre nur ein Teil protoniert und es würde sich ein Gleichgewicht verschieden protonierter Moleküle einstellen. Die Folge wäre eine schlechte Trennung der Komponenten (erkennbar an einem stark verbreiterten Signal im Chromatogramm). Das Peptid wird in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ im Verhältnis 70:30 gelöst. Aus den Chromatogrammen der präparativen HPLC ist nicht ersichtlich, ob hier eine Überlagerung vorliegt. Aus diesem Grund wird nur eine Fraktion nach einer Durchlaufzeit von 22,40-23,20 min genommen. Beim zweiten Durchlauf wird ein flacherer Konzentrationsgradient gewählt. Hierbei wird eine erkennbare Trennung der Komponenten erzielt. Es wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, mit 1 ml Toluol codestilliert, um die TFA auszutreiben und mit 0,5 ml deuteriertem Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

2. Charakterisierung des Peptidfragmentes

Zunächst wurden die chemischen Verschiebungen aus dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY (aufgenommen in D_2O) mit denen der freien Aminosäuren verglichen, wodurch eine Zuordnung der HPLC-Fractionen möglich war. Überwiegend wurden die chemischen Verschiebungen aus dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum für ^1H -Kerne und dem $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum für ^{13}C -Kerne ermittelt (beide aufgenommen in H_2O).

In der zu bestimmenden Sequenz des HCG β treten sieben vicinale Serineinheiten und fünf vicinale Prolineinheiten auf, von denen drei ebenfalls hintereinander liegen. Weiterhin gibt es eine Abfolge Pro-Ser-Pro-Ser. Aufgrund dieser Fülle an gleichen Aminosäuren liegen die Signale z.T. nicht separiert vor. So können für diese beiden Gruppen von Aminosäuren nur Durchschnittswerte angegeben werden. Die Durchschnittswerte für die δH der Prolinfragmente wurden aus dem in D_2O gemessenem HMBC übernommen (in der Tabelle kursiv geschrieben). Die chemischen Verschiebungen der αH - und βH -Protonen der Serineinheiten liegen in einem Bereich von 4,344 bis 4,439 ppm (αH) und 3,731 bis 3,870 ppm (βH). Die Werte der NH-Ser-Protonen liegen im Bereich 8,227-8,394 ppm.

Die Sequenz konnte mit Hilfe dieser Spektren nicht vollständig bestimmt werden. Allerdings konnten die wesentlichen Konnektivitäten zwischen direkt benachbarten Aminosäuren im $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC (Abb.4.3.3) beobachtet werden:

1. CO-Phe/NH-Gln, CO-Gln/NH-Asp und CO-Asp/NH-Ser(118)
2. CO-Ser(121)/NH-Lys und CO-Lys/NH-Ala
3. CO-Ser(127)/NH-Leu(128)
4. CO-Arg/NH-Leu(134)

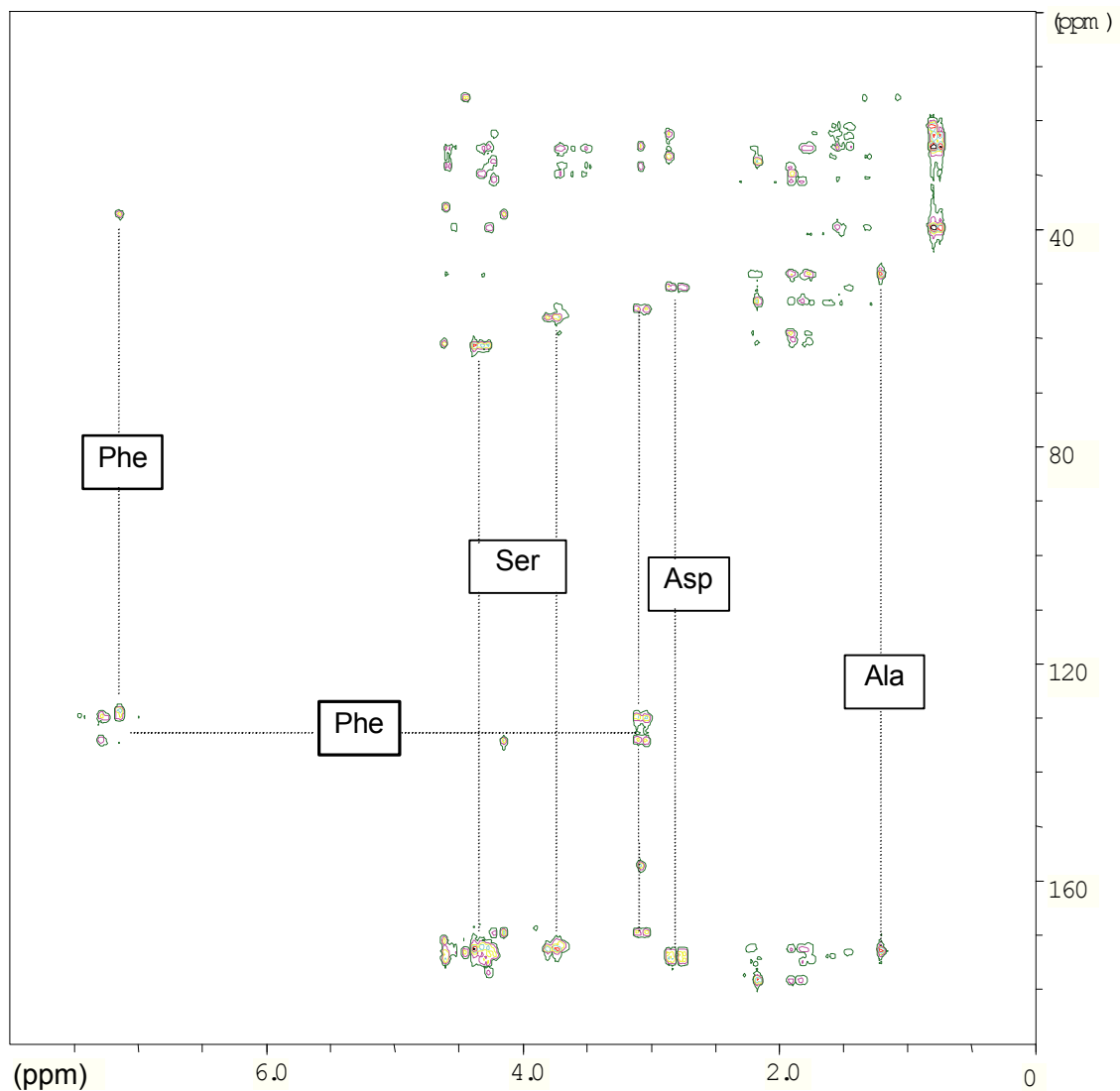


Abb.1 Übersicht über das $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum in H_2O

Es konnten wenige NOE-Effekte beobachtet werden, lediglich zwischen $\alpha\text{H-Phe/NH-Gln}$, $\alpha\text{H-Gln/NH-Asp}$ sowie $\beta\text{H-}$ und $\gamma\text{H-Gln}$ zu NH-Asp in der Anfangssequenz des Peptides.

Die Sequenz des synthetisch hergestellten Peptides analog einem Glycoproteinfragment aus dem Human β -Chorionic Gonadotropin konnte nicht vollständig bestimmt werden. Die Identität des vorliegenden Moleküls mit der erzielten Verbindung ist jedoch gesichert.

2. Experimentelles

Für die HPLC-Chromatographie wurden insgesamt 50,4 mg (27,6 mg und 22,8 mg) Rohsubstanz eingesetzt und in H₂O:MeCN im Verhältnis 3:2 ($\cong$ 950 μ l) gelöst. Nach dem Lyophilisieren wurden 15,3 mg reines Peptid erhalten.

Konzentrationsgradient des ersten Durchlaufs :

Eluent H₂O/Eluent MeCN: 100/0 $\rightarrow$ 85/15 (5 min) $\rightarrow$ 60/40 (30 min) $\rightarrow$ 2/98 (5 min) $\rightarrow$ 25/75 (10 min) $\rightarrow$ 25/75 (5 min)

Konzentrationsgradient des zweiten Durchlaufs :

Eluent H₂O/Eluent MeCN: 100/0 $\rightarrow$ 85/15 (5 min) $\rightarrow$ 70/30 (45 min) $\rightarrow$ 2/98 (10 min) $\rightarrow$ 25/75 (10 min) $\rightarrow$ 25/75 (5 min)

MALDI-TOF-MS kalkuliert für C₉₄H₁₅₂N₂₄O₃₀ (2011.04 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$): $M = 2010.12$; gefunden ($>10\%$): $(M+H)^+$, 2015.9 (100 %); $(M+Na)^+$, 2036.9 (10 %).

Standard-Lösungen zum Kalibrieren:

Angiotensin II	1,047 kDa/mol
Insulin	5,730 kDa/mol
Konzentration der Probe:	10 pmol/ml
Matrix: DHB in EtOH/H ₂ O (1:1)	10 mg/ml

NMR Aufnahme und Prozessierungsparameter:

Es werden zwei Serien von Spektren in zwei verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen. Zunächst eine in deuteriertem Wasser (99,96%) und dann eine in einer TFA-sauren Lösung aus H₂O und D₂O (9:1). Die D₂O-Probe wird vorher zwei Mal aus D₂O 99,9% lyophilisiert.

Molmasse des Peptids	2085,328 g/mol
Einwaage :	15,3 mg $\cong$ 7,337 μ mol
Konzentration :	$10,48 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Lösung :	D ₂ O (99,96%) oder D ₂ O/H ₂ O (1:9) mit TFA (pH = 3,5)
Peptid gelöst in :	700 μ l angesetzter Lösung

COSY, D ₂ O, 400		F2	F1
Aquisition	TD	4096	256
Parameter	NS	8	
	SW	8,990432	8,990418
Processing	SI	4096	2048
Parameter	WDW	SINE	SINE
	SSB	0	0

TOCSY, D ₂ O, 500		F2	F1
Aquisition	TD	4096	256
Parameter	NS	16	
	SW	8,990432	8,990400
Processing	SI	4096	1024
Parameter	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2

HMQC, D ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	16	
	SW	8,990432	222,095143
Processing Parameter	SI	4096	2048
	WDW	SINE	SINE
	SSB	4	6
HMBC, D ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	88	
	SW	8,990432	222,095143
Processing Parameter	SI	4096	2048
	WDW	SINE	SINE
	SSB	8	8
COSY, H ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	8192	512
	NS	48	
	SW	11,059020	11,059020
Processing Parameter	SI	8192	2048
	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2
TOCSY, H ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	512
	NS	16	
	SW	11,059020	11,059020
Processing Parameter	SI	4096	2048
	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2
HMBC, H ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	4096	256
	NS	16	
	SW	11,059020	222,095143
Processing Parameter	SI	4096	2048
	WDW	SINE	SINE
	SSB	8	8
NOESY, H ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	2048	512
	NS	32	
	SW	11,059020	11,059021
Processing Parameter	SI	2048	2048
	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2
E-COSY, H ₂ O, 50 ^o		F2	F1
Aquisition Parameter	TD	8192	512
	NS	36	
	SW	11,059020	11,059020
Processing Parameter	SI	8192	2048
	WDW	QSINE	QSINE
	SSB	2	2

¹H NMR (500 MHz) δ in ppm:

δ [ppm]	NH	αH	β ¹ H	β ² H	γH	δ ¹ H	δ ² H	εH	2,6-H	3,5-H	4-H	NH	NH
Phe-115	#	4,203	3,154	3,098					7,198	7,330	7,310		
Gln-116	8,552	4,285	1,967	1,879	2,230							7,452	6,817
Asp-117	8,624	4,650	2,891	2,794									
Ser-118	8,397	4,670	3,796	3,771									
Ser-119	8,266	4,439	3,856	3,797									
Ser-120	8,237	4,386	3,824	3,786									
Ser-121	8,365	4,434	3,812	3,866									
Lys-122	8,223	4,273	1,778	1,643	1,358	1,604		2,926				7,452	
Ala-123	8,209	4,503	1,270										
Pro-124		#	1,957*	2,243*	1,838*	3,755*	3,556*						
Pro-125		#	1,957*	2,243*	1,838*	3,755*	3,556*						
Pro-126		#	1,957*	2,243*	1,838*	3,755*	3,556*						
Ser-127	8,295	4,364	3,777	3,731									
Leu-128	8,248	4,586	1,511		1,597	0,854	0,803						
Pro-129		#	1,957*	2,243*	1,838*	3,755*	3,556*						
Ser-130	8,295	4,344	#	#									
Pro-131		#	1,957*	2,243*	1,838*	3,755*	3,556*						
Ser-132	8,394	4,425	3,790	3,866									
Arg-133	8,272	4,311	1,823	1,695	1,572	3,132						7,130	6,592
Leu-134	8,262	4,298	1,506		1,585	0,879	0,854						

* Durchschnittswerte; # keine Verschiebung ermittelt

¹H¹H-Kopplungskonstanten J [Hz]:

J [Hz]	Phe-115	Gln-116	Asp-117	Ser-118	Lys-122	Ala-123	Arg-133	Leu-134
NH-αH		7,2	6,9	6,6	7,2	6,2		
αH-β ¹ H	7,1	7,9	6,3			6,8		
αH-β ² H	7,4	7,8	7,2		7,9			
β ¹ H-β ² H	14,5		17,3					
β ¹ H-γH		7,8					7,8	6,8
β ² H-γH		7,6			7,9		7,8	6,8
γH-γH		15,1			15,7			
2,6H-3,5H	7,6							
3,5H-4H	7,1							
γH-δ ¹ H							7,9	6,5
γH-δ ² H								6,4
δH-εH					7,0			

¹³C-NMR (125 MHz):

δ [ppm]	CO	Cα	Cβ	Cγ	Cδ ¹	Cδ ²	Cε	2,6-C	3,5-C	4-C	COOH
Phe-115	169,20	54,53	37,12	129,71				133,93	129,49	128,35	
Gln-116	172,18	53,09	27,43	31,10	178,05						
Asp-117	172,82	50,52	35,81								174,62
Ser-118	#	55,97*	61,28*								
Ser-119	#	55,97*	61,28*								
Ser-120	#	55,97*	61,28*								
Ser-121	171,98	56,03	61,32								
Lys-122	173,41	53,44	30,66	22,27	26,49		39,51				
Ala-123	172,42	47,94	15,61								
Pro-124	#	60,54	24,95*	29,69*	48,02*						
Pro-125	#	60,56	24,95*	29,69*	48,02*						
Pro-126	#	60,87	24,95*	29,72	48,02*						
Ser-127	171,91	55,51	61,21								
Leu-128	170,70	50,56	39,55	24,72	20,74	22,52					
Pro-129	#	58,97	24,95	28,27	48,18						
Ser-130	#	56,11	61,28								
Pro-131	#	58,97	24,89	28,34	48,43						
Ser-132	174,45	53,94	61,21								
Arg-133	173,54	61,04	24,59	28,38	40,80		157,00				
Leu-134	#	51,78	39,51	24,68	20,96	22,74					

keine Verschiebung ermittelt; * Durchschnittswerte