

**Peptid-Metall Wechselwirkungen -
Anwendung selektiver Bindung zur Esterhydrolyse
und Bildung von Silber-Nanopartikeln**

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Kirsten Belser
aus Saarbrücken (Deutschland)

Basel 2008

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf
Antrag von:

Prof. Dr. Helma Wennemers

Prof. Dr. Katharina M. Fromm

Prof. Marcel Mayor

Basel, den 19. Februar 2008

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Helma Wennemers in der Zeit von September 2003 bis Februar 2008 am Departement Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

K. Belser, T. Vig-Slenters, K. M. Fromm, H. Wennemers, „Size-Selective Formation of Silver-Nanoparticles induced by Peptides: a Combinatorial Approach”, *in preparation*.

K. Belser, H. Wennemers, „A combinatorial Approach to Peptide-Metal-Interactions and their Application in Phosphate Ester Hydrolysis“, *in preparation*.

M. Nold, K. Koch, Helma Wennemers, “Acid-Rich Peptides are Prone to Damage under Fenton Conditions- Split-and-Mix Libraries for the Detection of Selective Peptide Cleavage”, *Synthesis*, **2005**, 9, 1455-1458

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

- **Poster: “A Combinatorial Approach to Hydrolytically Active Peptide-Metal Complexes”**
> Japanese-Swiss Symposium on Chemical Biology (JSCB), 24.–26. Juni 2007
- **Poster: “Selective Interactions of Silver Ions with Peptides”**
> Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, 12. September 2007
- **Poster: “Selectivity in Peptide-Metal Binding and Cleavage of a Phosphate Ester”**
> Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, 13. Oktober 2006
> 26th Regio-Symposium, International Symposium on Organic and Bioorganic Chemistry, 20.- 22. September 2006
- **Poster: “Towards Peptide-Metal Complexes as Cleaving Agents: A Combinatorial Approach”**
> 25th Regio-Symposium, International Symposium on Organic and Bioorganic Chemistry, 28.- 30. September 2005.

FÜR MEINE ELTERN
UND
THOMAS

„Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.“

*Antoine de Saint-Exupéry,
Der kleine Prinz*

„Die Erfahrung ist wie eine Laterne im Rücken; sie beleuchtet stets nur das Stück Weg, das wir bereits hinter uns haben.“

Konfuzius

Dank

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Helma Wennemers für ihr entgegengebrachtes Interesse, ihre Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft ganz herzlich bedanken. Prof. Dr. Katharina Fromm danke ich für die Übernahme des Co-Referates und für die gute Zusammenarbeit in unserem Nanoprojekt.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre. Ein grosses Dankeschön geht an Dr. Jessica Bernard für Ihre Unterstützung bei Problemen aller Art, Dipl.-Chem. Benjamin Hankeln für das Korrekturlesen des Rezeptorteiles, Dipl.-Chem. Michael Kümin für die Hilfe am Peptid-Synthesizer und Dipl.-Chem. Jana Lubkoll für die Hilfe bei HPLC Messungen. MSc Fabien Monnard danke ich für die Hilfe bei der Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors.

Dipl.-Chem. Tünde Vig -Slenters danke ich für ihre guten Ratschläge, ihr offenes Ohr und ihre Hilfe während unserer Kooperation.

Bei Dr. Karine Heintz, Dr. Klaus Kulicke, Dr. Daniel Häusinger, Dr. Louis-Sebastian Sonntag und Dr. Philipp Krattiger bedanke ich mich für die NMR Messungen.

Dr. Thomas Belser, Dr. Karine Heintz und Dipl.-Chem. Michael Kümin danke ich für die unzähligen Stunden, die sie in die Korrektur dieser Arbeit investiert haben.

Allen Mitarbeitern der Werkstatt danke ich herzlich für ihre stetige Hilfe bei technischen Problemen aller Art, insbesondere Herrn Andres Koller für seine unendliche Hilfe beim Lösen von GC-Problemen aller Art. Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an alle Mitarbeiter des ganzen Hauses, ohne die das chemische Institut nicht so reibungslos laufen würde.

Dem Zentrum für Mikroskopie, insbesondere Marcel Düggelin, Gianni Morson und Daniel Mathys danke ich für die vielen Stunden, die sie geopfert haben, um all diese schönen SEM-Aufnahmen zu machen. Dr. Ueli von Ah und Prof. A. U. Daniels danke ich für die Inhibitionstests mit den Bakterien. Dipl.-Chem. Lucy Kind danke ich für die TEM-Messungen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Jessica Bernard, Dr. Karine Heintz, MSc Catrina Ragetti, Dr. Eugen Stulz und Dr. Sandra Thöni für ihre große Hilfe, Ihre Ratschläge und Unterstützung innerhalb und außerhalb der Universität.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem schweizerischen Nationalfonds, der Universität Basel und der BACHEM AG.

Das wohl größte Dankeschön geht an meine Familie und meinen Mann, ohne deren wertvolle Unterstützung und Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank, Euch ist diese Arbeit gewidmet.

ÜBERSICHT

In der vorliegenden Arbeit wird im ersten Teil die Hydrolyse eines Phosphatesters durch hydrolytisch aktive Tripeptide gezeigt. Diese Histidin-haltigen Peptide wurden mit Hilfe einer kombinatorischen Split-und-Mix Peptidbibliothek identifiziert. Die Bibliothek bestand abwechselnd aus den Aminosäuren der katalytischen Triade (Asp, Ser, His) von Serinproteasen und Linker-Motiven, die sowohl flexibel als auch strukturdirigierend sind. Die Hydrolyse wird mit Histidin-haltigen Peptiden und durch Zugabe von verschiedenen Metallsalz-Lösungen verwirklicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde kombinatorische Chemie zur Identifikation von Peptiden verwendet, die selektiv Ag^+ -Ionen binden. Diese Komplexbildung ermöglichte eine Reduktion von Ag^+ mittels Licht oder Ascorbat und erlaubte somit die Herstellung von Silber-Nanopartikeln auf der Festphasen-Oberfläche. Dabei gelang es Peptidsequenzen zu identifizieren, welche die Bildung unterschiedlich großer Silber-Nanopartikel auf den Festphasen-Oberflächen induzieren. Desweiteren konnte eine Wachstumshemmung des Bakteriums *Staph. epidermidis* durch ein bestimmtes festphasengebundenes Peptid, welches mit Silber-Nanopartikeln bedeckt war, beobachtet werden. Mit diesem Peptid gelang es auch, in Lösung Silber-Nanopartikel herzustellen, die mit Hilfe von UV-Vis Spektroskopie beobachtet werden konnten.

Im letzten Teil der Arbeit werden wasserlösliche Diketopiperazin-Rezeptoren untersucht, die basische Tripeptide selektiv in wässrigen Lösungen binden. Der Farbstoff Dispersrot oder zumindest einzelne in ihm enthaltene Strukturfragmente spielen für die Wechselwirkung eine wichtige Rolle. Um deren Einfluß näher zu untersuchen, wurden neue wasserlösliche Rezeptoren hergestellt, die verschiedene Strukturfragmente des Dispersrot enthalten und deren Bindungseigenschaften untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Dispersrot durch weniger aromatische, jedoch stets hydrophobe Bausteine zu einem erheblichen Bindungsverlust führt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. ALLGEMEINER TEIL	9
1.1 EINLEITUNG	9
1.2 KOMBINATORISCHE CHEMIE	13
1.2.1 <i>Split-and-Mix-Synthese</i>	13
1.2.2 <i>Kodierte Split-and-Mix-Synthese</i>	14
1.2.3 <i>Synthese einer kodierten Split-and-Mix-Bibliothek</i>	16
1.2.4 <i>Screening von kodierten kombinatorischen Bibliotheken</i>	17
1.3 ZIEL DER ARBEIT.....	19
1.4 LITERATURVERZEICHNIS	23
2. PEPTID-METALL-WECHSELWIRKUNGEN UND DEREN ANWENDUNG	29
ZUR ESTER- UND AMID-HYDROLYSE.....	29
2.1 EINLEITUNG	29
2.1.1 <i>Hydrolytisch aktive Enzyme</i>	29
2.1.1.1 Proteasen	29
2.1.1.2 Esterasen.....	32
2.1.1.3 Phosphatasen	33
2.1.2 <i>Metallionen in biologischen Systemen</i>	33
2.1.3 <i>Hydrolase Mimetika</i>	35
2.1.3.1 Metall-freie Spaltung.....	35
2.1.3.2 Metall-katalysierte Spaltung	38
2.2 SPALTUNG VERSCHIEDENER ESTERSUBSTRATE MIT HILFE VON KODIERTEN	42
SPLIT-AND-MIX PEPTIDBIBLIOTHEKEN	42
2.2.1 <i>Design und Synthese der kodierten Penta- und Tripeptidbibliotheken</i>	42
2.2.2 <i>Anwendungen der Peptidbibliotheken</i>	44
2.2.2.1 Spaltungsexperimente mit Essigsäureethylester und Methylrot als Indikator .	44
2.2.2.2 Spaltungsexperimente mit den Pyrenesterderivaten 27 und 28	46
2.2.2.3 Spaltungsexperimente mit <i>p</i> -Nitrophenylacetat 18 und	48
4-Methylumbelliferylacetat 40	48
2.2.2.4 Spaltungsexperimente mit Indolyl Phosphat Dinatriumsalz 31	49
2.2.3 <i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	58
2.3 RADIKALISCHE UND HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON PEPTIDBINDUNGEN.....	60
2.3.1 <i>Radikalische Spaltungsexperimente auf fester Phase</i>	60
2.3.2 <i>Radikalische Spaltungsversuche in Lösung</i>	67
2.3.3 <i>Hydrolytische Spaltungsexperimente auf fester Phase</i>	68
2.3.4 <i>Proteolytische Peptidrezeptoren</i>	69
2.3.5 <i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	74
2.4 LITERATURVERZEICHNIS	76
3. PEPTIDE ZUR HERSTELLUNG VON SILBER-NANOPARTIKELN	83
3.1 EINLEITUNG	83
3.1.1 <i>Silber-Nanopartikel und ihre Wirkung</i>	83
3.1.2 <i>Herstellung von Silber-Nanopartikeln</i>	84
3.1.3 <i>Optische Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln</i>	85
3.1.4 <i>Biologische Aspekte</i>	86
3.2 FESTPHASENEXPERIMENTE ZUR HERSTELLUNG VON SILBER-NANOPARTIKELN	88

3.2.1	<i>Vorversuche</i>	88
3.2.2	<i>Kombinatorische Experimente: Lichtreduktion von Ag⁺</i>	90
3.2.3	<i>Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Lichtreduktion von Ag⁺</i> ...	93
3.2.4	<i>Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Chemische Reduktion von Ag⁺</i>	98
3.2.5	<i>Kombinatorische Experimente: Chemische Reduktion von Ag⁺</i>	101
3.2.6	<i>Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Chemische Reduktion von Ag⁺</i>	102
3.2.7	<i>Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Lichtreduktion von Ag⁺</i> .	105
3.2.8	<i>Isothermische Mikrokolorimetrie Studien zur Inhibition von Bakterien</i>	108
3.3	STUDIEN ZUR HERSTELLUNG VON SILBER NANOPARTIKELN IN LÖSUNG MIT HILFE VON PEPTIDEN	113
3.3.1	<i>UV-Vis-Studien</i>	113
3.3.2	<i>TEM-Studien</i>	114
3.3.3	<i>NMR-Studien</i>	115
3.4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	118
3.5	LITERATURVERZEICHNIS	120
4.	SYNTHESE NEUER WASSERLÖSLICHER DIKETOPIPERAZIN-REZEPTOREN UND DEREN BINDUNGSEIGENSCHAFTEN	127
4.1	EINLEITUNG	127
4.2	DESIGN DER WASSERLÖSLICHEN DIKETOPIPERAZIN-REZEPTOREN	129
4.3	SYNTHESE DER WASSERLÖSLICHEN DIKETOPIPERAZIN-REZEPTOREN	131
4.4	BINDUNGS-AFFINITÄTEN DER REZEPTOR-PEPTID KOMPLEXE.....	134
4.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	138
4.6	LITERATURVERZEICHNIS	139
5.	GERÄTE UND MATERIALIEN	147
5.1	ANALYTISCHE METHODEN.....	147
5.2	CHROMATOGRAPHIE	149
5.3	WEITERE GERÄTE	149
5.4	LÖSUNGSMITTEL UND CHEMIKALIEN	150
5.5	PUFFERHERSTELLUNG	150
5.6	AGAROSEGEL-HERSTELLUNG.....	151
5.7	HERSTELLUNG DES NINHYDRIN-DIP	151
6.	ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	152
6.1	MANUELLE FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE.....	152
6.2	AUTOMATISIERTE FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE.....	153
6.3	SYNTHESE EINER KODIERTEN KOMBINATORISCHEN PENTAPEPTID-BIBLIOTHEK MITTELS POLYCHLORIERTEN AROMATEN ALS TAG-MOLEKÜLE	154
6.4	VORSCHRIFT FÜR DIE KOMBINATORISCHEN LÖSUNG-ASSAYS.....	160
6.4.1	<i>Pyrenester und Pyrenalkohol</i>	160
6.4.2	<i>Indigo</i>	161
6.4.3	<i>Spaltversuche mit der Fluorophor-Quencher Bibliothek</i>	161
6.4.3.1	<i>Kupferkomplexe von JUDITH BURSTYN</i>	161
6.4.4	<i>Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3, dem Lysin-Peptid 72 und der Fluorophor-Quencher-Bibliothek 47 mittels Fenton Reaktion (Fe³⁺)</i>	162
6.4.5	<i>Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3 und der Fluorophor-Quencher Bibliothek 47 mittels Fenton-Reaktion (Fe²⁺)</i>	163
6.4.6	<i>Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3, Lysin-Peptid 72 und Terpyridin-Peptid 70 mittels Fenton Reaktion (Cu²⁺)</i>	163

6.4.7	<i>Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3 und Lysin-Peptid 72 in Lösung.....</i> <i>unter HPLC Kontrolle.....</i>	164
6.5	VORSCHRIFT FÜR DIE KOMBINATORISCHEN AGAROSEGEL-ASSAYS	164
6.6	VORSCHRIFT FÜR DIE KOMBINATORISCHEN METALLBINDUNGS-ASSAYS	164
6.7	VORSCHRIFT FÜR DIE KOMBINATORISCHEN SILBER-ASSAYS.....	165
6.8	VORSCHRIFT FÜR DIE ESI-MESSUNGEN MIT DEN PEPTIDEN UND SILBER	165
6.9	VORSCHRIFT FÜR DIE ISOTHERMISCHEN MIKROKALORIMETRIE STUDIEN (IMC)	166
	ZUR INHIBITION DES BAKTERIUMS	166
6.10	VORSCHRIFT FÜR DIE ITC STUDIEN.....	166
6.10.1	<i>Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 7 und Peptid.....</i> <i>Arg-Arg-ArgNHPr 128.....</i>	166
6.10.2	<i>Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 8 und Peptid.....</i> <i>Arg-Arg-ArgNHPr 128.....</i>	167
6.10.3	<i>Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 9 und Peptid.....</i> <i>Arg-Arg-ArgNHPr 128.....</i>	167
6.10.4	<i>Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 10 und Peptid.....</i> <i>Arg-Arg-ArgNHPr 128.....</i>	167
6.11	VORSCHRIFT FÜR DIE NMR TITRATION	167
6.12	VORSCHRIFT FÜR DIE UV KINETIK MIT INDIGO.....	168
6.12.1	<i>Peptide und Phosphatester in Lösung.....</i>	168
6.12.2	<i>Festphasen-gebundene Peptide und Phosphatester.....</i>	168
6.13	VORSCHRIFT FÜR DIE UV MESSUNGEN MIT SILBER	168
7.	SYNTHESE DER AMINOSÄURE FÜR DIE BIBLIOTHEKEN: FMOC-TRANS-2-AMINOCYCLOHEXANCARBONSÄURE..... (FMOC-ACHC-OH) 36	169
8.	SYNTHESE DER PEPTIDE FÜR DIE PHOSPHATESTERSPALTUNG.....	170
8.1	AC-L-HIS-β-ALA-L-HIS-NH ₂ 42a/b	171
8.2	AC-L-HIS-L-HIS-NH ₂ 43a/b	172
8.3	AC-D-HIS-AHX-L-HIS-NH ₂ 44a/b	173
8.4	AC-L-SER-β-ALA-L-SERNH ₂ 45a/b	174
8.5	AC-L-ASP-PRO-GLY-L-ASP-NH ₂ 46a/b	175
9.	SYNTHESE DES EDTA TEMPLATES.....	176
9.1	2,3-DI(BUTYLOXYCARBONYLAMINO)PROPIONSÄURE 49	176
9.2	2,3-DI(BUTYLOXYCARBONYLAMINO)PROPIONSÄURE BENZYLESTER 50	177
9.3	2,3-DIAMINOPROPIONSÄURE BENZYLESTER HCL-SALZ 51	178
9.4	2,3-BIS[DI(^T BUTYLOXYCARBONYLMETHYL)AMINO)- PROPIONSÄURE BENZYLESTER 52	179
9.5	2,3-BIS[DI(^T BUTYLOXYCARBONYLMETHYL)AMINO) PROPIONSÄURE 53	180
9.6	2,3-BIS[DI(^T BUTYLOXYCARBONYLMETHYL)AMINO)-PROPIONSÄURE PENTAFLUOROPHENYLESTER 54	181
9.7	<i>N</i> -α-FMOC- <i>N</i> -ε-TETRA(<i>tert</i> -BUTYL) EDTA-L-LYSINE 55	182
10.	SYNTHESE DER EDTA-FUNKTIONALISIERTEN BIBLIOTHEK 56.....	183
11.	SYNTHESE DES TERPYRIDIN DERIVATES.....	184
11.1	TERPYRIDIN-ENON 58	184
11.2	TERPYRIDIN METHYLESTER 59	185
11.3	TERPYRIDIN NA-SALZ 60	186
12.	SYNTHESE DES FLUOROPHOR-QUENCHER SYSTEMS.....	187

12.1	BOC-GESCHÜTZTE ANTHRANILSÄURE 62	187
12.2	PENTAFLUOROPHENYLESTER 63	188
12.3	FLUOROPHOR 64	189
12.4	FMOC-SCHÜTZUNG DES QUENCHERS 66	190
13.	SYNTHESE DER FLUOROPHOR-QUENCHER PEPTIDE.....	192
13.1	EDTA-PEPTID 3	193
13.2	LYSIN PEPTID 72	194
13.3	EDTA-PEPTID 69	196
13.4	TERPYRIDIN PEPTID 70	196
13.5	REFERENZ-PEPTID 71	197
14.	SYNTHESE DES PROTEOLYTISCHEN REZEPTORS 4	198
14.1	SYNTHESE DES DIKETOPIPERAZIN TEMPLATES 84	198
14.1.1	<i>N</i> -Boc- <i>trans</i> - γ -hydroxy- <i>L</i> -Prolin Methylester 77	198
14.1.2	<i>N</i> -Boc- <i>trans</i> - γ -azido- <i>L</i> -Prolin Methylester 79	199
14.1.3	<i>TFA</i> - <i>trans</i> - γ -azido- <i>L</i> -Prolin Methylester 80	200
14.1.4	<i>N</i> -Boc- <i>trans</i> - γ -azido- <i>L</i> -Prolin Pentafluorophenylester 81	201
14.1.5	<i>N</i> -Boc-(<i>trans</i> - γ -azido- <i>L</i> -Pro) ₂ OCH ₃ 82	202
14.1.6	Cyclo-(<i>trans</i> - γ -azido- <i>L</i> -Pro) ₂ 83	203
14.1.7	Cyclo-(<i>trans</i> - γ -amino- <i>L</i> -Pro) ₂ HCl 84	204
14.2	SYNTHESE DES TYROSIN-DISPERSROT-FARBSTOFFES 87	205
14.2.1	<i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Tyr(DR)-OCH ₃ 86	205
14.2.2	<i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Tyr(DR)-OH 87	206
14.3	SYNTHESE DES REZEPTORS 4	208
14.3.1	Synthese von 89	208
14.3.2	Kupplung der Rezeptorarme	209
14.3.2.1	Erste Kupplung.....	209
14.3.2.2	Zweite Kupplung.....	210
14.3.2.3	Dritte Kupplung.....	211
14.3.2.4	Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen.....	211
15.	SYNTHESE DER PEPTIDE ZUR NANOPARTIKEL HERSTELLUNG	213
15.1	ISO-NIKOTINSÄURE TENTAGEL 6	214
15.2	AC-D-HIS- <i>RAC</i> -ACHC-L-TYR-NH-TG/H 92a/b	215
15.3	AC-L-HIS- <i>RAC</i> -ACHC-L-TYR-NH-TG/H 93a/b	216
15.4	AC-D-SER- <i>RAC</i> -ACHC-L-TYR-NH-TG/H 94a/b	217
15.5	AC-L-SER- <i>RAC</i> -ACHC-L-TYR-NH-TG/H 95a/b	219
15.6	AC-L-TYR- <i>RAC</i> -ACHC-D-SER-NH-TG/H 96a/b	220
15.7	AC-D-HIS-PRO-AIB-L-TYR-NH-TG/H 97a/b	221
15.8	AC-L-SER-PRO-AIB-L-TYR-NH-TG/H 98a/b	222
15.9	AC-L-SER-PRO-AIB-L-SER-NH-TG/H 99a/b	223
15.10	AC-L-TYR-L-TYR-NH-TG/H 100a/b	224
15.11	AC-L-TYR-GLY-L-TYR-NH-TG/H 101 a/b	225
15.12	AC-D-ASP-B-ALA-D-ASP-NH-TG/H 102a/b	226
15.13	AC-L-TYR-PRO-GLY-L-TYR-PRO-GLY-L-SER-NH-TG/H 103a/b	227
15.14	AC-L-HIS-L-HIS-PRO-GLY-D-HIS-NH-TG/H 104a/b	228
15.15	AC-L-SER-AHX-L-ASP-AHX-D-HIS-NH-TG/H 105a/b	230
15.16	AC-D-HIS-(<i>R,R</i>)-ACHC-L-TYR-NH-TG/H 106a/b	231
15.17	AC-D-HIS-(<i>S,S</i>)-ACHC-L-TYR-NH-TG/H 107a/b	233
15.18	AC-D-SER-(<i>R,R</i>)-ACHC-L-TYR-NH-TG/H 108a/b	234

15.19	AC-D-SER-(<i>S,S</i>)-ACHC-L-TYR-NH-TG/H 109a/b	235
15.20	AC-L-TYR-(<i>R,R</i>)-ACHC-D-SER-NH-TG/H 110a/b	237
15.21	AC-L-TYR-(<i>S,S</i>)-ACHC-D-SER-NH-TG/H 111a/b	238
15.22	AC-L-HIS-GLY-L-HIS-NH-TG/H 112a/b	239
15.23	AC-D-HIS-PRO-AIB-L-ASP-NH-TG/H 113a/b	240
15.24	AC-D-HIS-GLY-D-ASP-NH-TG/H 114a/b	241
15.25	AC-L-HIS-PRO-GLY-D-ASP-NH-TG/H 115a/b	242
15.26	AC-L-ASP- β -ALA-D-HIS-NH-TG/H 116a/b	243
15.27	AC-D-HIS- <i>RAC</i> -ACHC-L-PHE-NH-TG/H 117a/b	244
15.28	AC-D-HIS-GLY-L-TYR-NH-TG/H 118a/b	246
15.29	AC-D-HIS-L-TYR-NH-TG/H 119a/b	247
15.30	AC-D-HIS-L-HIS-NH-TG/H 120a/b	248
15.31	AC-L-CYS-GLY-L-ALA-NH-TG/H 121a/b	249
15.32	AC-L-ASP- <i>RAC</i> -ACHC-L-TYR-NH-TG/H 122a/b	250
16.	REZEPTOREN ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON HYDROPHOBEN BAUSTEINEN	252
16.1	SYNTHESE DES REZEPTORS 7	252
16.1.1	<i>Kupplung von Bernsteinsäure-anhydrid</i>	252
16.1.2	<i>Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen</i>	253
16.2	SYNTHESE DES REZEPTORS 8	254
16.2.1	<i>Synthese des Azo Derivates 124</i>	254
16.2.2	<i>N-Boc-L-Tyr(Azo)-OCH₃ 125</i>	255
16.2.3	<i>N-Boc-L-Tyr(Azo)-OH 126</i>	256
16.2.4	<i>Synthese des Templates 127</i>	257
16.2.5	<i>Kupplungen der Rezeptorarme</i>	258
16.2.5.1	Erste Kupplung	258
16.2.5.2	Zweite Kupplung	259
16.2.5.3	Dritte Kupplung	260
16.2.5.4	Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen	260
16.3	SYNTHESE DES REZEPTORS 9	261
16.3.1	<i>Erste Kupplung</i>	261
16.3.2	<i>Zweite Kupplung</i>	262
16.3.3	<i>Dritte Kupplung</i>	263
16.3.4	<i>Vierte Kupplung</i>	263
16.3.5	<i>Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen</i>	264
16.4	SYNTHESE DES REZEPTORS 10	265
16.4.1	<i>Erste Kupplung</i>	265
16.4.2	<i>Zweite Kupplung</i>	265
16.4.3	<i>Dritte Kupplung</i>	266
16.4.4	<i>Vierte Kupplung</i>	267
16.4.5	<i>Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen</i>	267
16.5	SYNTHESE DES VON AC-ARG-ARG-ARG-NHPR 128	268

1

ALLGEMEINER TEIL

1. Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Von allen Klassen biologisch aktiver Makromoleküle bieten Peptide und Proteine neben Zuckern vermutlich die breiteste funktionelle und strukturelle Variabilität. Aufgrund dieser strukturellen Vielfalt nehmen Peptide und Proteine viele Funktionen in der Natur wahr, jedoch ist ihre Wirkungsweise in vielen Fällen nur ansatzweise verstanden. Es ist bekannt, dass sie biologische Funktionen wie das Altern^[1] und die Fortpflanzung^[2], Blutdruck^[3], Körpertemperatur^[4], Schmerzlosigkeit^[5], Enzym-Hemmung^[6], das Erinnerungsvermögen und das Lernen^[7] regulieren. Trotz ihrer Verschiedenartigkeit sind alle Proteine und Peptide aus demselben Satz von 20 natürlichen L-Aminosäuren mit verschiedenen funktionellen Gruppen in den Seitenketten aufgebaut. Diese Seitenketten unterscheiden sich in Größe, Gestalt, Ladung, Wasserstoffbrückenbindungs-Kapazität und chemischer Reaktivität. Die Möglichkeit, verschiedene Strukturen auszubilden ist somit immens. Die Peptidbindung stellt hierbei das chemische Bindeglied zwischen den einzelnen Aminosäuren dar und bestimmt somit einen großen Teil der chemischen Eigenschaften der Peptide. Die Amidgruppe ist planar gebaut, d.h. alle am Aufbau beteiligten Atome liegen in einer Ebene. Das freie Elektronenpaar am Stickstoffatom kann in Konjugation zur Carbonylgruppe treten, wodurch die Amidbindung stark resonanzstabilisiert ist. Der durch die Mesomerie entstehende Doppelbindungs-Charakter äußert sich z.B. in der Bindungslänge von 0.132 nm der C–N-Bindung (i. Vgl. 0.125 nm für C=N-Doppelbindung und 0.147 nm für C–N-Einfachbindung) (Abb. 1).^[8]

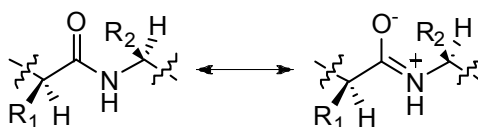


Abb. 1: Resonanzformen der Peptidbindung.

Durch diesen Doppelbindungscharakter ist die Amidbindung relativ starr und nicht frei drehbar. Im Gegensatz dazu ist die Bindung zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Carbonylkohlenstoffatom eine reine Einfachbindung, genau wie jene zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom. Die Bindungen beiderseits der starren Peptideinheit weisen folglich eine große Rotationsfreiheit auf. Der Wasserstoff der Amidgruppe kann in

s-trans- oder *s-cis*-Position zum Sauerstoff der Carbonylgruppe stehen, wobei bei den meisten Peptiden und Proteinen die thermodynamisch stabilere *trans*-Form vorliegt (Abb. 2).

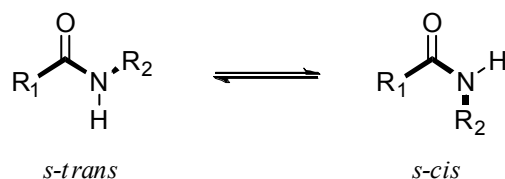


Abb. 2: *s-trans* und *s-cis* Anordnung in einer Peptidbindung.

In der Amidgruppe stehen Sauerstoff und Stickstoff als zwei potentielle Bindungsatome zur Verfügung, um Protonen oder Metallionen zu komplexieren. Über den gesamten wässrigen pH-Bereich gesehen ist die Amidgruppe neutral und macht quantitative Gleichgewichtsmessungen sehr schwierig. Mit einem pK_s -Wert von 15-16 ist die Amidgruppe eine sehr schwache Säure und unter H-Abstraktion resultiert ein negativ geladenes Stickstoffatom (anionische Form). Zudem ist sie eine schwache Base, die in Anwesenheit von Säure protoniert werden kann.^[9] Liegt das Amid in seiner anionischen Form vor, findet sowohl die Protonierung als auch die Metallierung am Stickstoffatom statt. In der neutralen Form hingegen geschieht beides am Carbonylsauerstoff, der jedoch aufgrund seiner schwachen Basizität ($\text{pK}_s = -1$) nur sehr schwach mit dem Metallion wechselwirkt. Die Koordination von Metallionen durch die Amidbindung tritt somit entweder bei stark Lewis-sauren Metallzentren oder bei Zugabe eines Überschusses an Base auf. Das komplexchemische Verhalten von α -Aminosäuren und einfachen Peptiden wird ebenfalls von den freien funktionellen Gruppen bestimmt.

Peptide und α -Aminosäuren sind multifunktionelle, chirale Verbindungen und somit vielseitige Liganden. Zu geeigneten Liganden für Metallionen zählen zum einen die C-terminale Carboxylat-Gruppe und die N-terminale Amino-Gruppe, zum andern die Seitenketten von Histidin, Aspartat, Cystein oder Tyrosin. Peptide und Aminosäuren werden jedoch nicht nur als Liganden verwendet, sondern sind auch als Substrate Gegenstand vieler Untersuchungen. Dabei stellt die Hydrolyse von Peptidbindungen eine enorme Herausforderung für viele Forschungsgruppen dar, da die große Halbwertszeit unter neutralen Bedingungen einen nukleophilen Angriff erschwert.^[10] Von großem Interesse sind Metallkomplexe, die Peptide hydrolytisch spalten können. Solche Metallkomplexe könnten als chemische Alternative zu proteolytischen Enzymen Anwendung finden. Hierbei haben

sich bereits die Pd^{II}- und Pt^{II}-Aqua-Komplexe bewährt, die an Heteroatome (bevorzugt S- und N-Atome) der Peptidseitenketten koordinieren und die benachbarte Amidbindung regioselektiv hydrolysieren (Abb. 3).^[11]

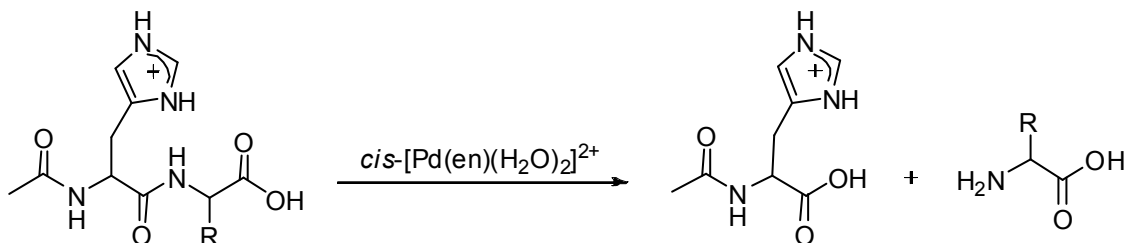


Abb. 3: Regioselektive Hydrolyse von Ac-His-Aminosäure.

Die Peptidbindung fungiert darüber hinaus auch als Donor bzw. Akzeptor von Wasserstoffbrücken-Bindungen und ist daher maßgeblich an der Ausbildung und Stabilisierung von 3D-Strukturen beteiligt. Die Fähigkeit zur Ausbildung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen spielt auch bei der molekularen Erkennung eine große Rolle, da die selektive Bindung von Molekülen von enormer Wichtigkeit für die Entwicklung neuer Wirkstoffe wie auch für das Verständnis zahlreicher natürlicher Prozesse ist. Ein berühmtes Beispiel, welches die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen demonstriert, ist das Antibiotikum Vancomycin.^[12] Vancomycin ist ein tricyclisches Glycoheptapeptid, das den Aufbau der Zellwand gram-positiver Bakterien hemmt. Obwohl es eigentlich ein eher kleines Molekül ist, bindet es sehr stark und mit hoher Selektivität an das Peptid *N*-acyl-Lys-D-Ala-D-Ala, welches eine entscheidende Rolle bei der Vernetzung der Bakterienzellwand spielt (Abb. 4).^[13]

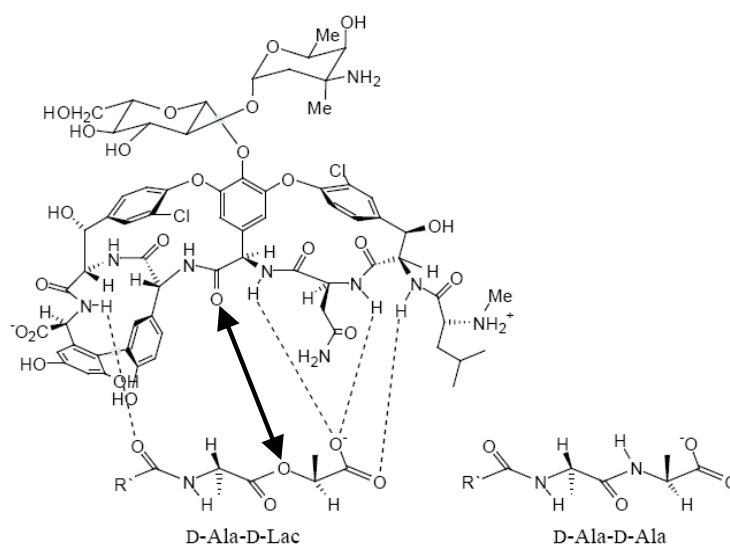


Abb. 4: Repulsive Wechselwirkung mit *N*-acyl-Lys-D-Ala-D-Lac.

In den letzten Jahren haben jedoch einige der Bakterien Resistenz gegenüber Vancomycin entwickelt, indem sie *N*-acyl-Lys-D-Ala-D-Lac in ihre Zellwand einbauen. Mit diesem Peptid ist die Ausbildung einer der Wasserstoffbrücken nicht mehr möglich und daher ist die Bindung 1000 mal schwächer als mit *N*-acyl-Lys-D-Ala-D-Ala.^[14] Die Entwicklung von synthetischen Rezeptoren, die *N*-acyl-Lys-D-Ala-D-Lac mit hoher Selektivität binden, wäre eine gute Methode, um gegen die Vancomycin-Resistenz anzukämpfen.

Sowohl das Design und die Entwicklung neuer synthetischer Peptidasen als auch das Verständnis der Mechanismen von selektiver Spaltung und selektiver Bindung ist immer noch eine der großen Herausforderungen in der organischen Chemie und wird erheblich durch den Einsatz von synthetisch hergestellten Peptiden erleichtert.

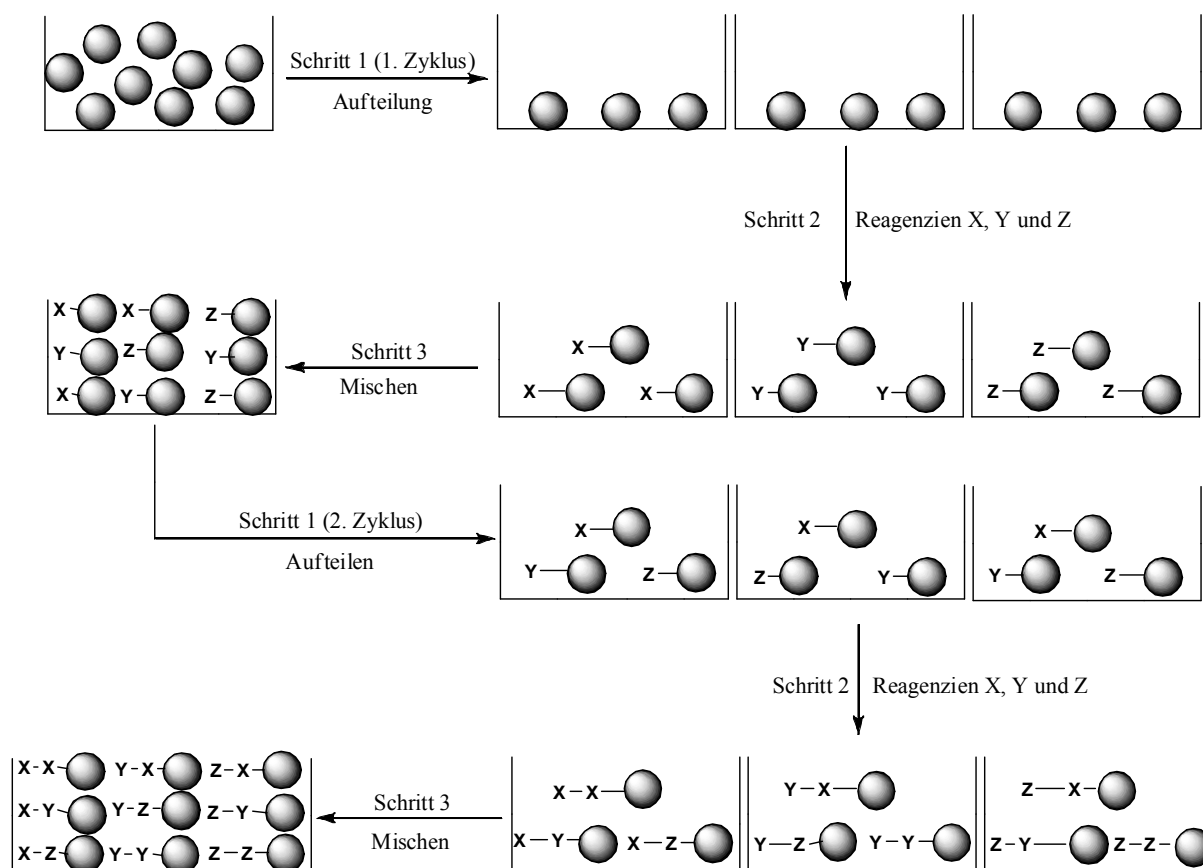
1.2 Kombinatorische Chemie

Mit dem Beginn der kombinatorischen Chemie in den frühen 90er Jahren wurde die Suche nach neuen Wirkstoffen erheblich erleichtert.^[15,16] Nach ersten Anwendungen in der bioorganischen und medizinischen Chemie ebnete sie sich ihren Weg auch in die Materialwissenschaften^[17] und in das Gebiet der Katalysator Entwicklung.^[18,19]

Das Prinzip der kombinatorischen Chemie besteht darin, eine Vielzahl verschiedener Verbindungen („Bibliothek“) zu synthetisieren, sie gleichzeitig auf eine gewünschte Eigenschaft zu testen und die aktiven Komponenten zu selektieren. Das Charakteristische einer kombinatorischen Synthese ist, dass verschiedene Komponenten unter identischen Bedingungen gleichzeitig synthetisiert werden können, so dass am Ende die Produkte aller möglichen Kombinationen die sogenannte „kombinatorische Bibliothek“ bilden. Eine sehr einfache Methode, um molekulare Vielfalt zu generieren ist die von den Gruppen von FURKA und LAM unabhängig voneinander entwickelte „Split-and-Mix-Synthese“.^[20-23] Unter den vielen verschiedenen Strategien zur Generierung molekularer Vielfalt^[24-26] ist sie wohl eine der elegantesten und auch effektivsten („One-bead-one-compound“-Bibliothek).

1.2.1 Split-and-Mix-Synthese

Das Konzept der Split-and-Mix-Synthese basiert auf der simultanen Erzeugung einer großen Anzahl von Molekülen auf einer festen Phase. Die Methode ist in Schema 1 dargestellt: eine bestimmte Menge Harz wird in x gleiche Teile aufgeteilt (Schritt 1) und jede dieser Portionen wird mit verschiedenen Reagenzien X, Y und Z versetzt (Schritt 2). Nach Beendigung der einzelnen Reaktionen und nachfolgenden Waschprozessen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen, werden die Portionen vereint und gemischt (Schritt 3). Danach wird das Harz wieder in x gleiche Teile aufgeteilt und die modifizierte Festphase steht für einen weiteren Zyklus bereit. Die Bibliothekssynthese kann nun hier beendet oder die einzelnen Schritte nochmals wiederholt werden. Die Anzahl der erhaltenen Komponenten ergibt sich aus dem exponentiellen Anstieg der Produkte (x^n). In diesem Beispiel (Schema 1) sind es 2 Zyklen ($n = 2$) mit 3 verschiedenen Reagenzien ($x = 3$), wobei sich eine Bibliothek von 9 Komponenten ($3^2 = 9$) ergibt. Entscheidend ist, dass jedes einzelne Bead (Harzkügelchen) nur eine Komponente trägt („one-bead-one-compound“). Prinzipiell kann jegliche Art von monomeren Bausteinen X, Y und Z verwendet werden. Sind die verwendeten Reagenzien X, Y und Z Aminosäuren, so erhält man Dipeptide als Endprodukte.



Schema 1: Prinzip der Split-and-Mix-Synthese.

Nach der Herstellung der Bibliothek wird diese zur Identifikation aktiver Komponenten getestet.

1.2.2 Kodierte Split-and-Mix-Synthese

Je nach Harz befindet sich auf einem Bead eine Substanzmenge von etwa 100 pmol und daher muß die Methode zur Identifizierung dieser Substanz entsprechend empfindlich sein. Im Falle von Peptiden bzw. Oligonukleotiden lässt sich die Sequenz mit Hilfe des Edman-Abbaus^[27] und PCR-(polymerase chain reactions)-Techniken aufklären. Die Analyse nicht sequenzierbarer Moleküle ist jedoch sehr schwierig. Es existieren Beispiele von Analysen mit Hilfe von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie^[28-30] und Massenspektrometrie,^[31-34] jedoch ist hierbei die Unterscheidung zwischen Stereoisomeren nur sehr schwer möglich. Ein weiteres Problem bei der Synthese von Bibliotheken sind unvollständige Reaktionen.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Kodierungskonzepte entwickelt. Das Konzept des Kodierens besteht aus der Anbringung von „Tags“ auf die Beads. Diese Tags können nach der

Synthese leicht abgespalten und eindeutig analysiert werden.^[35] Jeder Reaktionsschritt wird kodiert und somit erzählen die Tags die Geschichte des entsprechenden Beads durch die Split-and-Mix-Synthese. Tag-Moleküle sollten die folgenden Eigenschaften besitzen: sie sollten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen inert sein, sie sollten schon in kleinen Mengen detektierbar sein und sie sollen leicht auf die Festphase aufgebracht und wieder entfernt werden können. STILL ET AL. entwickelte Tag-Moleküle, die alle erwähnten Eigenschaften besitzen.^[36] Die Tags bestehen aus polyhalogenierten aromatischen Alkoholen (Abb. 5), die leicht mittels Elektronen-Einfang Gas-Chromatographie (EC-GC) detektiert werden können. Durch Variation der Länge der Alkylketten und des Substitutionsmuster am Aromaten, lassen sich 26 tags mit dieser Methode voneinander trennen. Es haben sich zwei Linker-Systeme etabliert, ein photospaltbarer^[36a] und ein oxidativ spaltbarer^[36b] Linker. Beim photolabilen Linker sind die tags über eine Carbonatbindung an 3-Nitro-4-Hydroxymethyl-Benzoessäure verankert, beim oxidativ spaltbaren Linker sind sie über eine Etherbindung an Vanillinsäure gebunden. Bestrahlung mit UV-Licht im Falle der Nitrobenzoessäure oder Oxidation mit Cerammoniumnitrat (CAN) setzt die Tag-Alkohole frei, so dass sie nach Silylieren der OH-Funktion mittels EC-GC analysiert werden können. Beide Linker enthalten eine Carbonsäurefunktion, mit der sie *via* Amid- oder Esterbindung auf die Festphase aufgebracht werden können. Mit den oxidativ spaltbaren Linkern können die Tags alternativ über eine Carben-Insertion direkt an die Festphase gebunden werden, was den Vorteil hat, dass keine funktionellen Gruppen vorhanden sein müssen.^[36b] Die Empfindlichkeit (1 pmol) der EC-Analysemethode ist so hoch, dass nur etwa 2% der Festphase mit den entsprechenden Tag-Molekülen beladen wird.

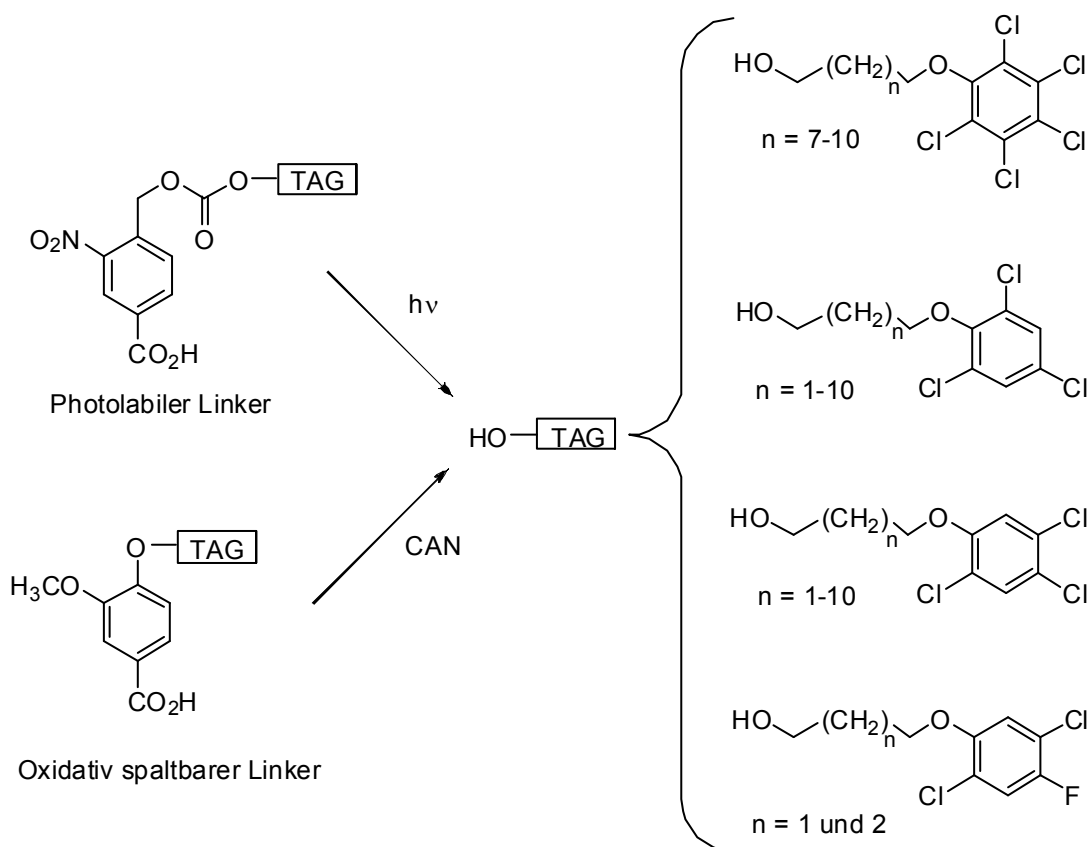
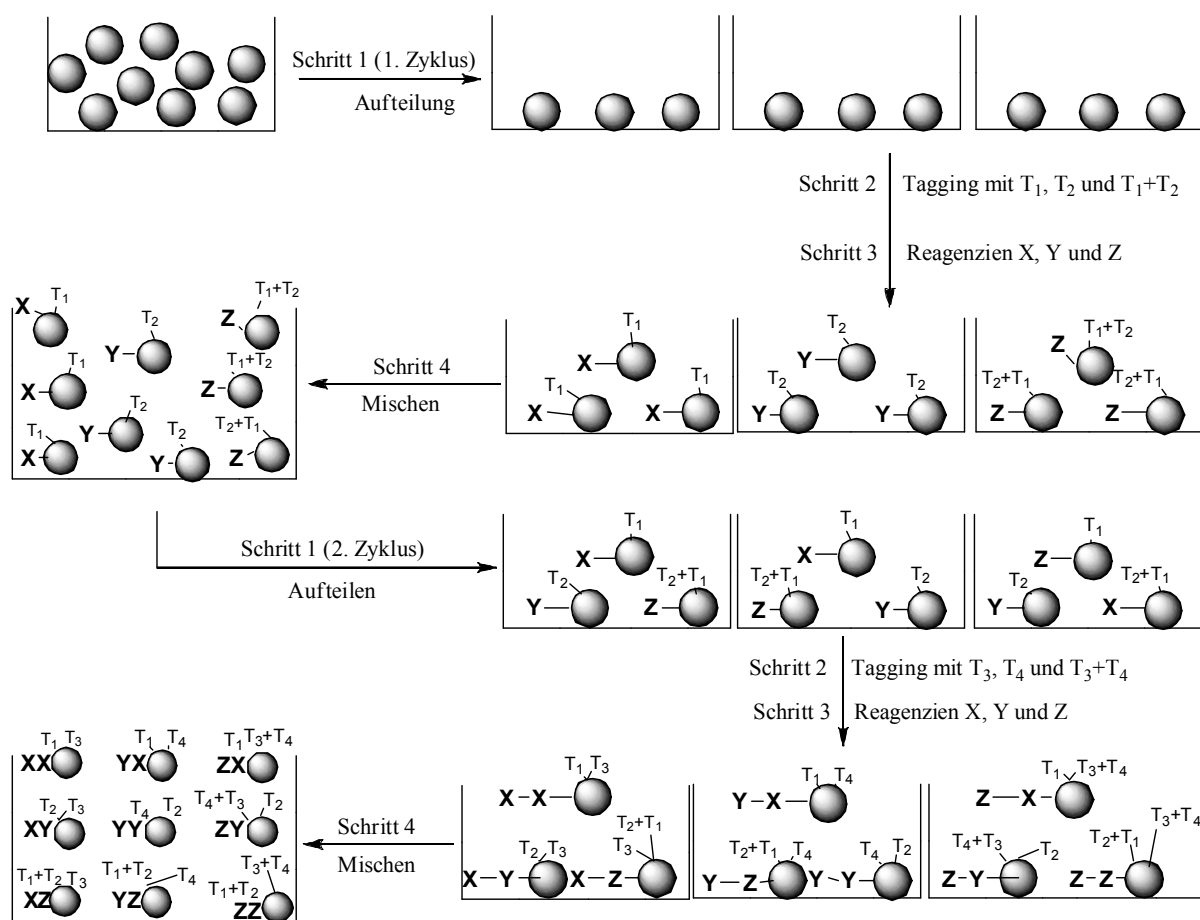


Abb. 5: Photolabile und oxidativ spaltbare Linker und Tag-Alkohole.

1.2.3 Synthese einer kodierten Split-and-Mix-Bibliothek

Um eine Bibliothek zu kodieren, ist ein sogenannter binärer Code nötig:^[36a] jede Reaktion wird durch einen Tag oder eine Kombination aus mehreren Tags kodiert, so dass mit den vorhandenen 26 Tags weitaus mehr als 26 Komponenten kodiert werden können. Im folgenden Beispiel kodieren zwei Tags (T_1 und T_2) drei Reaktionen im ersten Zyklus, die beiden tags T_3 und T_4 die drei Reaktionen im zweiten Zyklus (Schema 2). Zeigt nach der Analyse ein Bead die Tags T_1 , T_3 und T_4 , so bedeutet dies, dass in der ersten Position Reagenz X und in der zweiten Position Reagenz Z verwendet wurden. Mit Hilfe des binären Codes mit N verschiedenen Tags können $2^N - 1$ Reaktionen kodiert werden.^[36a]



Schema 2: *Synthese einer kodierten Split-and-Mix-Bibliothek.*

1.2.4 Screening von kodierten kombinatorischen Bibliotheken

Eine effiziente Methode, um alle Mitglieder einer kombinatorischen Bibliothek bezüglich ihrer Bindungseigenschaften gleichzeitig zu screenen, ist das „on-bead-screening“. Hierbei werden nur die aktiven Komponenten durch einfache visuelle Detektion ausgewählt und analysiert. Die Komponente, die gegen die Bibliothek gescreent werden soll, befindet sich in Lösung und trägt einen visuell detektierbaren Marker, während die Bibliothek-Mitglieder an der festen Phase immobilisiert sind. Kommt es nun zu intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern der Bibliothek und der markierten Komponente, wird diese Bindung durch den entsprechenden Marker angezeigt. Solche Marker können Farbstoffe oder fluoreszierende Moleküle^[37] sein, wobei die Beads mit Hilfe eines Mikroskops untersucht werden. Daneben haben sich auch radioaktive Marker etabliert, die mittels photographischen Techniken oder Mikroradiographie nachgewiesen werden können.^[38-41] In unserer Gruppe haben sich Farbstoffe und fluoreszente Moleküle zum screening in wässrigen und organischen Lösungsmitteln etabliert. Wird zum Beispiel eine Bibliothek mit einem Rezeptor gemischt,

der mit einem Farbstoff funktionalisiert ist, erscheinen die Beads, die mit dem Rezeptor wechselwirken farbig und können mittels Mikroskop detektiert werden. Nachdem die aktiven Komponenten selektiert wurden, werden die Tags abgespalten und mittels EC-GC analysiert (Abb. 6).

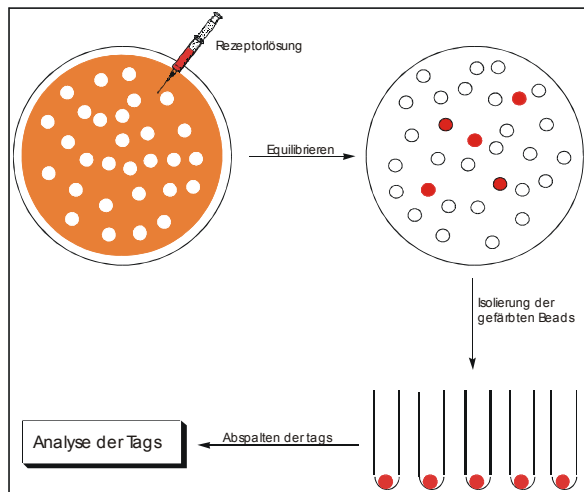


Abb. 6: „on-bead-screening“ für selektive Bindung eines Farbstoff-markierten Rezeptors an einer Bibliothek.

Die Detektion selektiver Peptidspaltung kann mit Hilfe einer Fluoreszenz-Quencher-Bibliothek erreicht werden: ein Fluorophor wird dabei an die Festphase gekuppelt und ein zu dem Fluorophor passender Quencher wird an eine, über kombinatorische Methoden synthetisierte Peptidkette, gebunden (Abb. 7). Wird das Peptid nun gespalten und somit der Quencher entfernt, fluoresziert das jeweilige Bead.^[42]

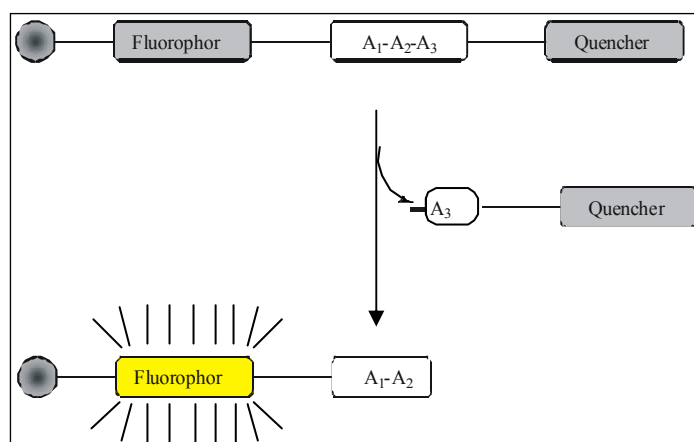


Abb. 7: Screening für Peptidspaltung.

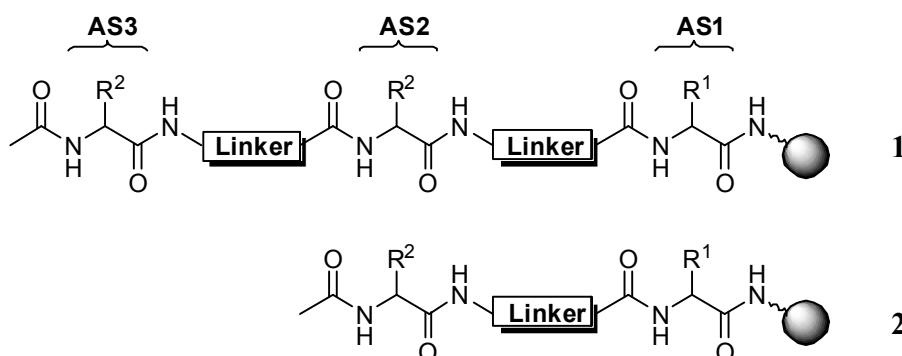
1.3 Ziel der Arbeit

Alle in dieser Arbeit behandelten Teile beschäftigen sich mit Peptiden und ihren Anwendungen zum einen als Spaltwerkzeuge, als Bindungspartner und zur Herstellung von Nanopartikeln.

Peptid-Metall-Wechselwirkungen und deren Anwendung zur Ester- und Amidhydrolyse

Erst kürzlich wurde in unserer Gruppe eine kodierte, Fluorophor-Quencher-markierte Peptidbibliothek zur Untersuchung selektiver Peptidschädigung unter Fenton-Bedingungen (Fe^{3+} , H_2O_2 , Ascorbat) entwickelt. Die kombinatorischen Studien zeigten, dass Carbonsäurehaltige Peptide eher gespalten werden als andere. Das Eisen wird dabei von den Carboxylaten komplexiert und erlaubt somit die Freisetzung der Radikale in nächster Nachbarschaft zum Peptid-Grundgerüst.^[43]

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zum einen die Anwendbarkeit der bereits entwickelten Fluorophor-Quencher-Bibliothek in einigen Spaltreaktionen getestet, zum andern wurde eine neue kodierte Split-and-Mix-Bibliothek synthetisiert, um die Spaltung von aktivierten Estern und Amiden zu erreichen. Diese Bibliothek basiert auf der proteolytischen Aktivität der katalytischen Triade von Serin-Proteasen und enthält daher die Aminosäuren Aspartat, Histidine und Serin, die Aminosäure Tyrosin, flexible Bindungsglieder (z.B. Aminohexansäure) und strukturdirigierende Motive (turn-Motive) wie z.B. die Aminosäure *trans*-Aminocyclohexansäure (ACHC), die durch Erzeugung von Sekundärstrukturen die Aktivität der Bibliothek erhöhen sollten (Abb. 8).



AS1, AS2, AS3: D-His, L-His, D-Asp, L-Asp, D-Ser, L-Ser, L-Tyr

Linker: Pro-Gly, Pro-Aib, Gly, Ahx, kein Linker, β -Ala, *trans*-Aminocyclohexan Carbonsäure (ACHC)

Abb. 8: Kodierte Split-and-Mix Bibliotheken 1 und 2.

Mit Hilfe dieser Bibliotheken wurde die Spaltung von aktivierten Carbonsäure- und Phosphateestern untersucht. Die Versuche zur Spaltung wurden sowohl in Lösung als auch in Agarosegel durchgeführt, da letzteres die Diffusion der Reagenzien verlangsamt, was die Beobachtung hydrolytisch aktiver Verbindungen erleichtert.^[44] Hierbei können nur Substrate zum Einsatz kommen, die nach erfolgreicher Spaltung eine unterschiedliche Farbe oder Fluoreszenz aufweisen. Kommt es dann zur Wechselwirkung zwischen dem abgespaltenen Substrat und der Bibliothek, erscheint das aktive Bead farbig oder fluoreszent. Da die Aktivität der Bibliothek mit und ohne Metallsalz-Zugabe getestet wurde, musste zunächst eine geeignete Nachweismethode für die verwendeten Metallionen auf der Oberfläche gefunden werden.

Desweiteren wurden Peptide und ein Rezeptor synthetisiert, die mit einem proteolytisch aktiven Metallkomplex (z.B. Fe-EDTA) modifiziert sind (Abb. 9, 10).^[45] Während bei den Peptiden mit dieser Methode eine intramolekulare Spaltung erhalten wird, ist die Methode mit dem Rezeptor ein intermolekularer Ansatz. In einem ersten Schritt werden die entsprechenden Peptide vom Rezeptor erkannt und gebunden, und in einem zweiten Schritt gespalten.

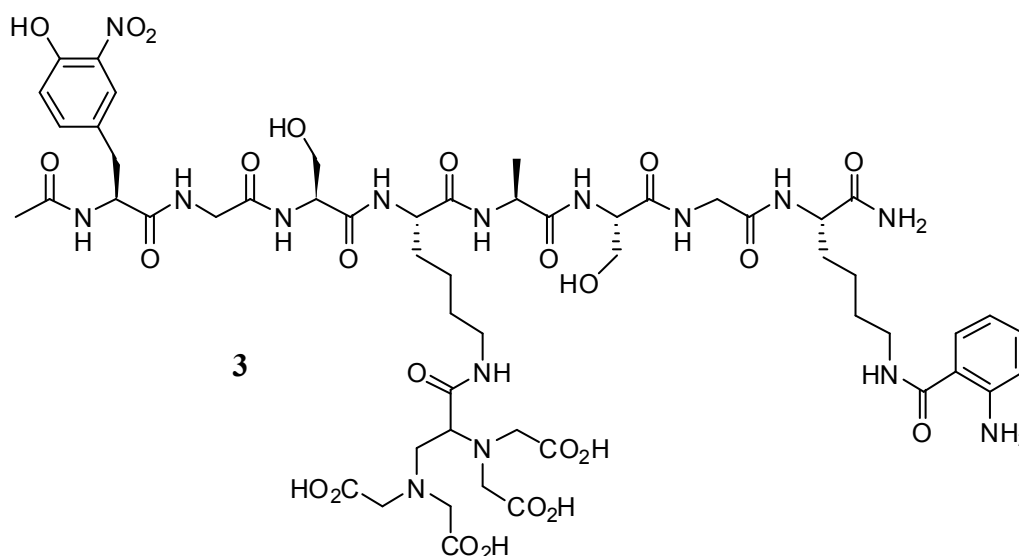


Abb. 9: Modell EDTA-Peptid 3.

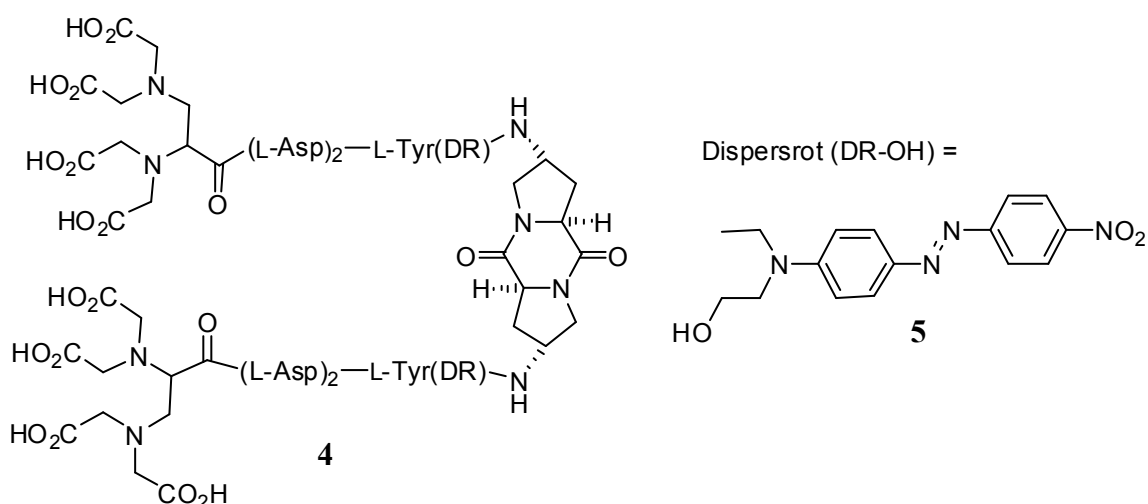


Abb. 10: Proteolytischer Rezeptor 4.

Peptide zur selektiven Herstellung von Silber-Nanopartikeln

Derzeit besteht ein großes Interesse an der Herstellung von Edelmetall-Nanopartikeln, da sie je nach Größe und Form einzigartige optische, elektrische und magnetische Eigenschaften besitzen.^[46] Eine große Rolle spielt dabei die Herstellung von Silbernanopartikeln, da viele Silberverbindungen in der Medizin aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften bekannt sind. Sie werden auch aufgrund ihrer optischen und chemischen Eigenschaften in der Nanoelektronik, bioanalytischen Prozessen und als Katalysatoren eingesetzt.^[47,48,49] Hierbei ist die Kombination von organischen Materialien und Silber ein sehr wichtiger Ansatz bei der Frage nach oberflächen- und supramolekularen Aspekten.

Das Ziel dieses Projektes bestand darin, herauszufinden, ob Peptide selektiv Ag⁺-Ionen binden und ob die Bildung von Silber-Nanopartikeln auf der Bead-Oberfläche verwirklicht werden kann. Alle Versuche wurden in einer Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Katharina M. Fromm durchgeführt. Als Vorversuch wurde zuerst iso-Nikotinsäure, ein sehr guter Silber-Bindungspartner auf einer festen Phase immobilisiert und auf seine Bindungseigenschaften untersucht. Anschließend wurde das System mit einer kombinatorischen Peptidbibliothek untersucht (Abb. 11).

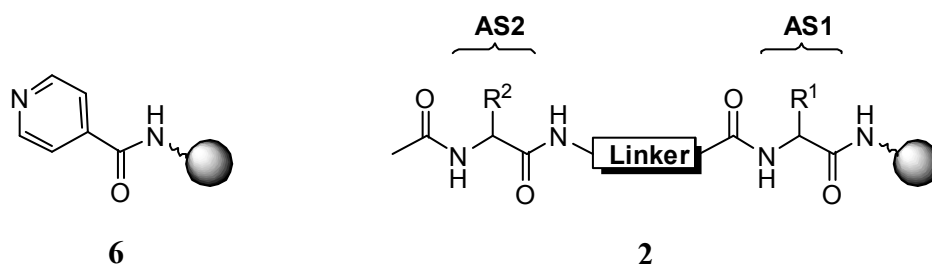


Abb. 11: Potentielle Silber-Bindungspartner auf fester Phase.

Synthese neuer wasserlöslicher Diketopiperazin-Rezeptoren und ihre Bindungseigenschaften

Die WENNEMERS-Gruppe entwickelte kürzlich einen wasserlöslichen Diketopiperazin-Rezeptor, der in der Lage ist, in wässrigem Medium Arginin-reiche Peptide mit hoher Selektivität zu erkennen und mit Affinitäten von $\Delta G = -5.7$ kcal/mol zu binden.^[50] Studien zeigten, dass die Peptide nur in Anwesenheit eines mit Dispersrot funktionalisierten Rezeptors gebunden werden. Um den Einfluß dieses hydrophoben Farbstoffes auf die Bindungseigenschaften näher zu untersuchen, wurden neue wasserlösliche Rezeptoren hergestellt werden, die sich lediglich in der Aminosäure der ersten Position unterscheiden (Abb. 12).

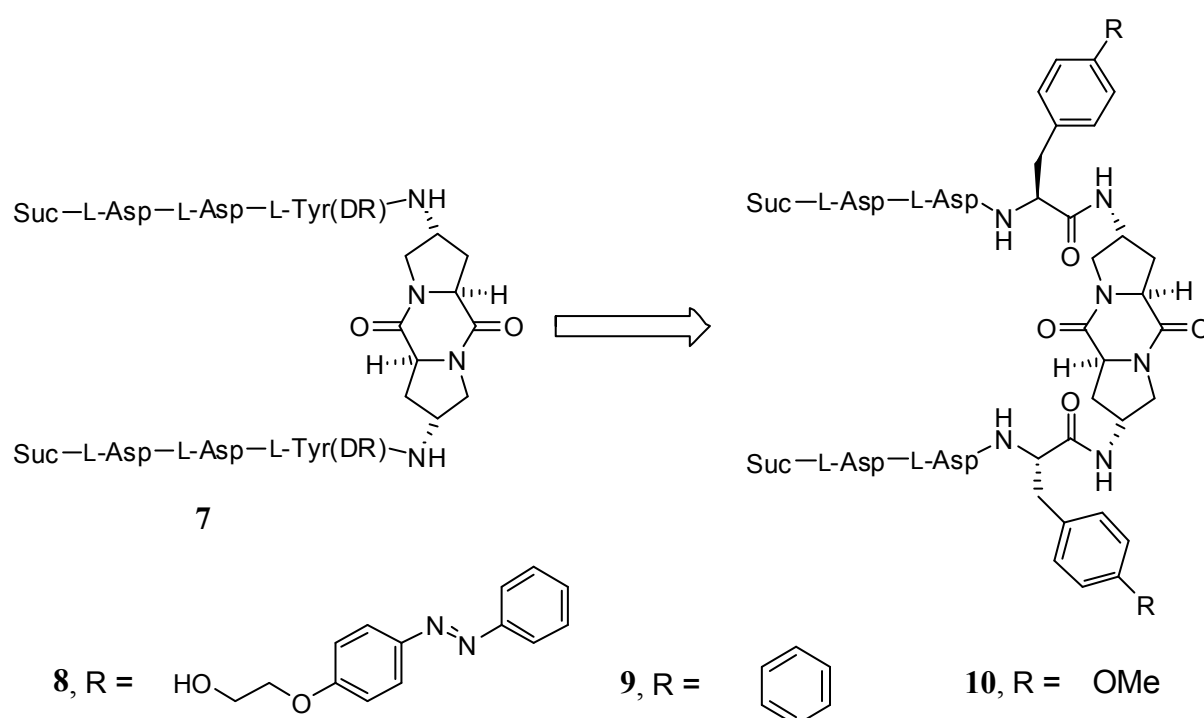


Abb. 12: Wasserlösliche Diketopiperazin-Rezeptoren **8-10** für mikrokalorimetrische Messungen.

Das Ziel dieses Projektes bestand darin herauszufinden, wie sich die Einführung weniger aromatischer, jedoch immer noch hydrophober Bausteine am Rezeptor auf das Bindungsverhalten von Arginin-reichen Peptiden auswirkt. Dazu wurden drei neue wasserlösliche Diketopiperazin-Rezeptoren **8**, **9** und **10** synthetisiert, deren Bindung zu Arg-Arg-Arg-NHPr mittels Mikrokalorimetrie untersucht wurde.

1.4 Literaturverzeichnis

- [1] a) V. K. Khavinson, *Neuroendocrinology Letters* **2002**, 23, 11; b) M. M. Mesulam, *Neuron* **1999**, 24, 521.
- [2] a) H. Alkil, S. J. Watson, E. Young, M. E. Lewis, H. Kharchaturian, J. M. Walker, *Annu. Rev. Neurosc.* **1984**, 7, 223; b) W. R. Martin, *Pharmacol. Rev.* **1983**, 35, 283; c) G. A. Olson, R. D. Olson, A. J. Kastin, *Peptides* **1991**, 12, 1407; d) G. A. Olson, R. D. Olson, A. J. Kastin, *Peptides* **1992**, 13, 1247; e) G. A. Olson, R. D. Olson, A. J. Kastin, *Peptides* **1993**, 14, 1339; f) S. C. Stansfield, F. J. Cunningham, *Endocrinology* **1988**, 123, 787.
- [3] a) J. L. Lavoie, C. D. Sigmund, *Endocrinology* **2003**, 144(6), 2179; b) W. J. Fairbrother, R. S. McDowell, B. C. Cunningham, *Biochemistry* **1994**, 8897.
- [4] M. G. Rosenfeld, J. J. Memod, S. G. Amara, L. W. Swanson, P. E. Sawchenko, J. Rivier, W. W. Vale, R. M. Evans, *Nature* **1983**, 304 (5922), 129.
- [5] a) W. Chen, B. Song, L. Lao, O. A. Perez, W. Kin, J. C. G. Marvizon, *Neuropharmacology* **2007**, 53(5), 664; b) J. Hughes, T. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. Morgan, H. R. Harris, *Nature* **1975**, 258, 577.
- [6] a) J. Gante, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 33, 1699; b) J. Weckesser, C. Martin, C. Jakobi, *Systematic & Applied Microbiology* **1996**, 19 (2), 133.
- [7] a) A. Fischer, *J. Neurosc.* **2002**, 22, 3700; b) L. H. Tsai, *Neuron*, **2005**, 48, 825; c) J. A. Bibb, *J. Cell. Biol.* **2003**, 163, 697.
- [8] D. Lauvergnat, P. C. Hiberty, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9478.
- [9] H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **1982**, 82, 385.
- [10] D. Kahne, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110(22), 7529.
- [11] a) I. E. Burgeson, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 4299; b) T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5946; c) T. N. Parac, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 2141.
- [12] a) J. P. Waltho, J. Cavanagh, W. H. Dudley, *J. Chem. Soc.* **1988**, 11, 707; b) G. E. Hawkes, H. Molinari, S. Singh, L. Y. Lian, *J. Magnet. Res.* **1987**, 74, 188; c) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1172; d) T. D. H. Bugg, G. D. Wright, S. Dutka-Mallen, P. Courvalin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, 30, 10408; e) R. D. Süßmuth, *ChemBioChem* **2002**, 3, 295; f) K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2096.

- [13] a) J. C. J. Barne, D. H. Williams, *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 339; b) D. H. Williams, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 469; c) M. L. Cohen, *Science* **1992**, *257*, 1050; d) H. C. Neu, *Science* **1992**, *257*, 1064.
- [14] C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21.
- [15] a) Y. R. De Miguel, J. K. M. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 417; b) H. P. Nestler, R. Liu, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **1998**, *1*, 113.
- [16] a) G. Jung, 'Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening', WILEY-VCH, **1999**; b) B. Linton, A. D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 307; c) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 321; d) S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 898; e) C. Schmuck, P. Wich, *New. J. Chem.* **2006**, *30*, 1377.
- [17] a) E. W. McFarland, W. H. Weiberg, *Trends in Biotechnology* **1999**, *17*, 107; b) D. Batra, K. J. Shea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 43.
- [18] a) M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284; b) F. L. Tietze, N. Rackelmann, G. Sekar, *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4254; c) A. Berkessel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 409; d) S. J. Miller, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 601; e) G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6496; f) K. S. Griswold, S. J. Miller, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8869; g) M. Hechavarria Fonseca, B. List, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 319; h) M. Meldal, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 238.
- [19] a) J. D. Revell, H. Wennemers, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *277*, 251; b) P. Krattiger, C. Mc. Carthy, A. Pfaltz, H. Wennemers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1722; c) J. D. Revell, D. Gantenbein, P. Krattiger, H. Wennemers, *Biopolymers* **2006**, *84*, 105; d) P. Krattiger, R. Kovasy, J. D. Revell, H. Wennemers, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1158; e) P. Krattiger, R. Kovasy, J. D. Revell, S. Ivan, H. Wennemers, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1101; f) H. Wennemers, *Comb. Chem. & High Throughput Screening* **2001**, *4*, 273.
- [20] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84.
- [21] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487.
- [22] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [23] M. Lebl, V. Krchnak, N. F. Sepetov, B. Seligmann, P. Strop, S. Felder, K. S. Lam, *Biopolymers* **1995**, *7*, 58.
- [24] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3398.

- [25] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767.
- [26] a) J. Wang, M. Uttamchandani, H. Sun, S. Q. Yao, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1009; b) K. S. Lam, M. Renil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 353
- [27] P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*, 80.
- [28] R. C. Anderson, J. P. Stokes, M. J. Shapiro, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311.
- [29] J. K. Chen, S. L. Schreider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *90*, 953.
- [30] a) M. C. Pirrung, K. Park, L. N. Tumey, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 329; b) N. J. Wells, M. Davies, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6430; c) T. Groth, M. Renil, E. Meinjohanns, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2003**, *6*, 589.
- [31] N. F. Sepetov, O. L. Issakova, M. Lebl, K. Swiderek, D. C. Stahl, T. D. Lee, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 58.
- [32] J. Metzger, S. Stevanovic, J. Brünjes, K.-H. Wiesmüller, *Methods* **1994**, *6*, 425.
- [33] B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652.
- [34] a) O. Lorthioir, R. A. E. Carr, M. S. Congreve, M. H. Geysen, C. Kay, P. Marshall, S. C McKeown, N. J. Parr, J. J. Scicinski, S. P. Watson, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 963; b) M. G. Paulick, K. M. Hart, K. M. Brinner, M. Tjandra, D. H. Charych, R. N. Zuckermann, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 417; c) A. Song, J. Zhang, C. B. Lebrilla, K. S. Lam, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6180; d) A. H. Franz, R. Liu, A. Song, K. S. Lam, C. B. Lebrilla, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 125.
- [35] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *89*, 5381.
- [36] a) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922; b) H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723.
- [37] W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155.
- [38] K. S. Lam, J. Wu, *Methods* **1994**, *6*, 401.
- [39] C. W. Turk, *Methods* **1994**, *6*, 396.
- [40] H. P. Nestler, H. Wennemers, R. Sherlock, D. L.-Y. Dong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1327.
- [41] a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfeifferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G. Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954; b) X.-Y. Xiao, Z. Paradoosh, M. P. Nova, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *62*, 6059; c) A. W. Czarnik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 60.
- [42] M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F. Auzanneau, *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **1994**, *91*, 3314.

- [43] a) M. Nold, K. Koch, H. Wennemers, *Synthesis* **2005**, *9*, 1455; b) M. Nold, H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2004**, 1800.
- [44] M. Müller, T. W. Mathers, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3813.
- [45] a) T. M. Rana, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10578; b) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1859; c) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457; d) K. Shah, T. M. Rana, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 2695; e) M. R. Ermacora, J. M. Delfino, B. Cuenoud, A. Schepartz, R. O. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6383; f) I. E. Platis, M. R. Ermacora, R. O. Fox, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12761; g) K. B. Hall, R. O. Fox, *Methods: a companion to methods in enzymology*, **1999**, *18*, 78; h) B. Cuenoud, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3247; i) B. Cuenoud, T. M. Tarasow, A. Schepartz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895.
- [46] a) J. A. Creighton, D. G. Cadon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, *87*, 3881; b) Y. W. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7961.
- [47] F. R. Aussenegg et al. *Eurphys. Lett.* **2002**, *60*, 663.
- [48] R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959.
- [49] M. Sastry, *Langmuir* **2001**, *17*, 1674.
- [50] P. Krattiger, H. Wennemers, *Synlett* **2005**, *4*, 706.

**PEPTID-METALL-WECHSELWIRKUNGEN
UND DEREN ANWENDUNG ZUR ESTER-
UND AMID-HYDROLYSE**

2. Peptid-Metall-Wechselwirkungen und deren Anwendung zur Ester- und Amid-Hydrolyse

2.1 Einleitung

2.1.1 Hydrolytisch aktive Enzyme

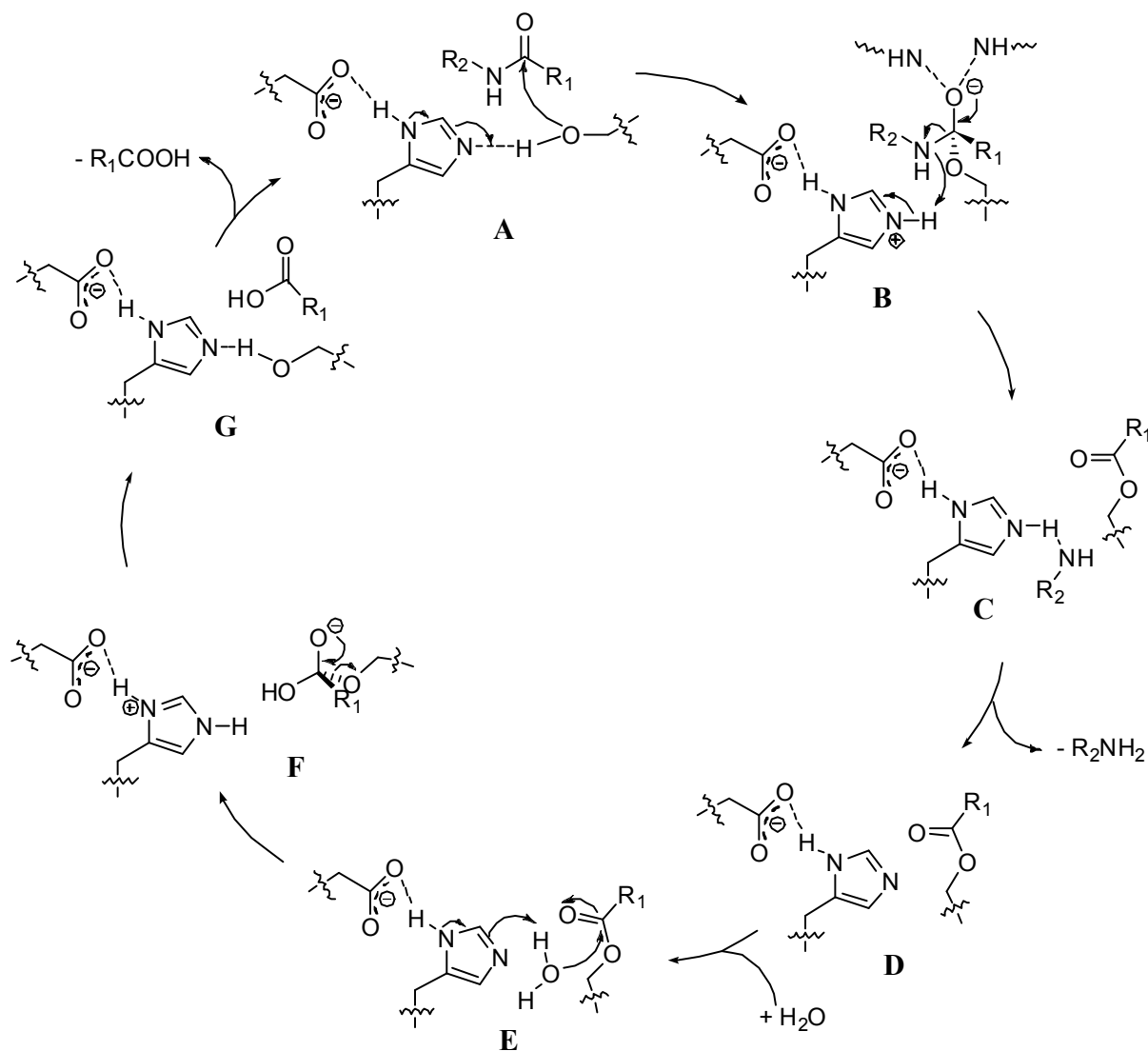
2.1.1.1 Proteasen

Aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt haben Proteine viele Funktionen in der Natur. Eine der wichtigsten Funktionen von Proteinen ist die enzymatische Katalyse chemischer Reaktionen. Fast alle bekannten Enzyme sind Proteine mit enormem katalytischen Potential. Die bis heute am besten untersuchten Enzyme sind die Proteasen. Mehrere hundert Proteasen sind bekannt und alle katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen.^[1] Sie werden entweder auf der Basis ihrer Substratspezifität oder ihrer Katalysemechanismen eingeteilt. Enzyme, die Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptidkette spalten, werden Endopeptidasen genannt. Exopeptidasen hingegen spalten Peptidbindungen am Ende einer solchen Peptidkette; Aminopeptidasen spalten am *N*-Terminus, Carboxypeptidasen am *C*-Terminus. Bezüglich des Katalysemechanismus werden die Proteasen in vier große Klassen eingeteilt: Serin-Proteasen (z.B. Chymotrypsin, Trypsin, Subtilisin), Cystein-Proteasen (z.B. Papain, Caspase), Aspartat-Proteasen (Pepsin, HIV-Protease) und Metallo-Proteasen (z.B. Carboxypeptidase, Thermolysin).^[2]

Fast ein Drittel aller Proteasen sind Serin-Proteasen, deren typisches Merkmal die Asp/His/Ser-Sequenz im aktiven Zentrum ist.^[3] Diese Peptidsequenz, die in Chymotrypsin entdeckt wurde, katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen und wird als „katalytische Triade“ oder „charge relay system“ bezeichnet.^[4]

Beim Chymotrypsin basiert der vorgeschlagene Spaltungsmechanismus auf der Zusammenarbeit von Ser-195, His-57 und Asp-102 (Schema 3): Ser-195 greift die Carbonylgruppe einer Peptidbindung nukleophil an (**A**), wobei His-57 als Base wirkt, so dass ein tetraedrisches Intermediat (**B**) entsteht. His-57-H⁺ wird nun durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu Asp-102 stabilisiert. Das entstandene Oxyanion des tetraedrischen Intermediats stabilisiert sich durch Bindung zu den NH-Gruppen der umliegenden Hauptketten-Aminosäuren um das sogenannte „Oxyanion Loch“. Nun wirkt His-57-H⁺ als Säure und veranlasst das Intermediat zur Freisetzung einer Abgangsgruppe

(R_2NH_2), wobei sich das Serin-Acyl-Intermediat (**D**) bildet. Dieses wird von H_2O mit Unterstützung von His-57 angegriffen, wodurch sich ein weiteres tetraedrisches Intermediat (**E**) ausbildet. Anschließend erhält man Ser-195 und die entsprechende Carbonsäure (**G**).



Schema 3: *Vorgeschlagener Mechanismus der katalytischen Triade.*

Cystein-Proteasen sind ebenfalls weit verbreitet und kommen in lebenden Organismen wie Bakterien und dem Menschen vor. Bei diesem Hydrolyse-Mechanismus wird das aktive Nukleophil, die OH-Gruppe des Serins durch die viel nukleophilere SH-Gruppe des Cysteins ersetzt. Auch hier ist die Stabilisierung des Oxyanion-Intermediates wichtig (Abb. 13).^[5]

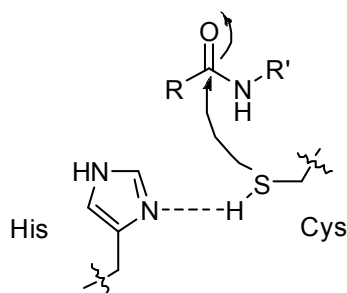


Abb. 13: Ausschnitt aus dem Mechanismus der Cystein-Proteasen.

Aspartyl-Proteasen spielen im Rahmen der Alzheimer- und HIV-Krankheit eine wichtige Rolle. Entscheidend bei ihrem Mechanismus sind zwei Aspartate, wobei ein Aspartat als Nukleophil dient und das zweite als Säure, die das tetraedrische Zwischenprodukt protoniert, um es zu stabilisieren (Abb. 14).^[6]

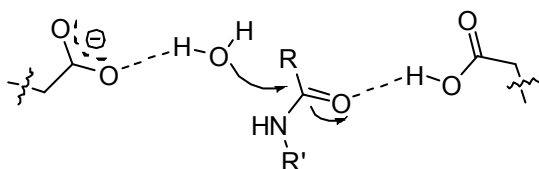


Abb. 14: Mechanismus der Aspartyl-Proteasen.

30% aller Enzyme, vor allem Oxido-Reduktasen und Metallo-Proteasen sind metallabhängig. Die Familie der Metallo-Proteasen sind wichtige Zielproteine in der pharmazeutischen Industrie. Wichtige Vertreter aus dieser Klasse sind Carboxypeptidase A und Thermolysin. Beim Mechanismus der Carboxypeptidase wirkt die Carboxylgruppe eines Glutamats als Nukleophil. Das Metall, meist Zn^{2+} , fungiert als Lewisäure und aktiviert das Amid. Thermolysin unterscheidet sich mechanistisch ein wenig von der Carboxypeptidase, weil hier ein Wassermolekül das Nukleophil darstellt. Wahrscheinlich wird das Wasser durch das Carboxylat deprotoniert und dadurch für den Angriff aktiviert (Abb. 15).^[7]

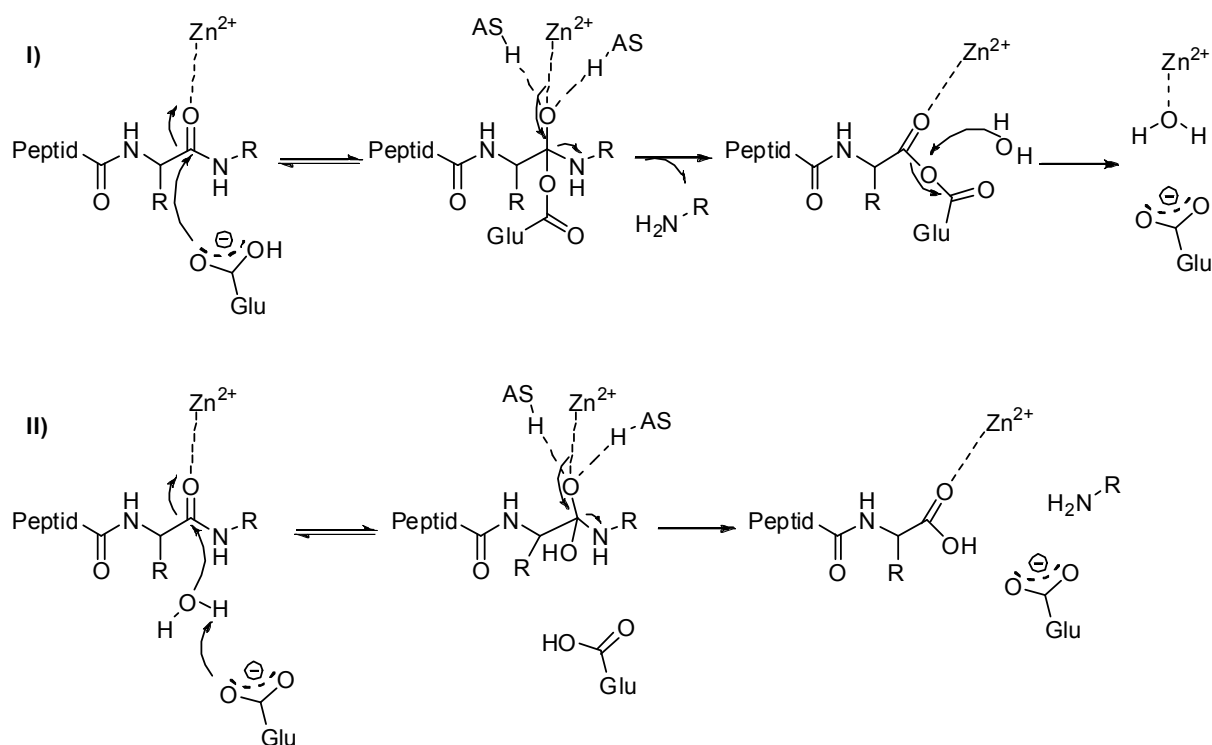


Abb. 15: Mechanismus der Carboxypeptidase A (**I**) und des Thermolysins (**II**).

Alle Proteasen verfügen über solch einen kontrollierten Mechanismus und sind in der Lage, Peptidbindungen zu spalten. Jedoch auch Acylkomponenten, Amide, Anilide, Ester und Thioester werden von Proteasen hydrolysiert.

2.1.1.2 Esterasen

Esterasen spalten die Ester von Triglyceriden und ähneln mechanistisch sehr stark den Serin-Proteasen, d.h. sie spalten einen Ester mit Hilfe der katalytischen Triade (Abb. 16). Wichtige Vertreter dieser Enzymklasse haben Einzug in die chemische Synthese gefunden. So werden zum Beispiel zur kinetischen Razematspaltung die Enzyme aus Schweineleber-Esterase und Schweine-Pankreas-Lipase eingesetzt.^[8]

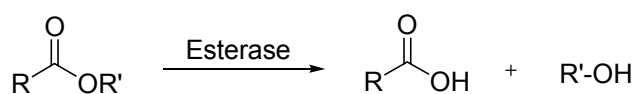


Abb. 16: Esterspaltung durch Esterase.

2.1.1.3 Phosphatasen

Phosphatasen hydrolysieren Phosphorsäuremono- und diester und verwenden dabei einen Mechanismus, der den Serin-Proteasen stark ähnelt. Der Phosphorsäureester wird durch ein basisch aktiviertes Serin angegriffen und die Abgangsgruppe wird durch Protonierung stabilisiert (Abb. 17).^[9]

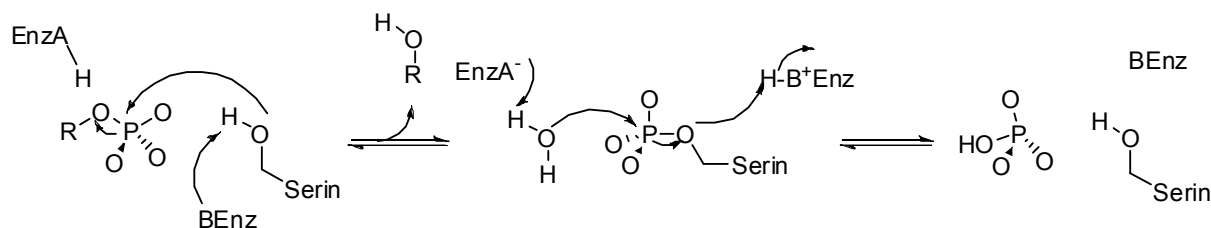


Abb. 17: Phosphatase Mechanismus.

2.1.2 Metallionen in biologischen Systemen

Metallionen spielen sowohl in der organischen Synthese als auch in vielen biologischen Systemen eine große Rolle. Dies gilt für alle Organismen wie Pflanzen, Pilze, Bakterien, tierische Organismen sowie für den menschlichen Organismus. Die verschiedenen Metalle wie Eisen, Kupfer, Kobalt, Zink, Nickel, Mangan, Vanadium, Magnesium, Molybdän, Kalium, Kalzium und viele andere erfüllen in biologischen Systemen Aufgaben wie die Speicherung und den Transport von Elektronen für den Energiehaushalt der Zelle (Nervenleitung) und die Stabilisierung von Proteinen oder DNA.^[1] Proteine fungieren dabei als Koordinationspartner für die Metallionen, die mit bestimmten Aminosäureresten wie z.B. dem Imidazol von Histidin an das Metallion koordinieren. In den meisten Fällen sind die Metalle für katalytische Prozesse des Proteins wie Aktivierung, Transport und Speicherung von Sauerstoff, Hydrolysen oder Redoxprozesse (Photosynthese, Atmungskette, Sauerstoff-Stoffwechsel, Nukleinsäuresynthese) verantwortlich. Die Metalle Eisen, Kupfer, Nickel, Zink und Zirkonium werden im Folgenden näher dargestellt.

Eisen ist ein essentielles Spurenelement, welches im Körper oxidiert als Fe(II) oder Fe(III) vorliegt und vor allem für die Blutbildung (Hämoglobin und Myoglobin) und für den Sauerstofftransport und die Sauerstoffspeicherung wichtig ist. Weiterhin ist Eisen ein Bestandteil von Fe-S-Komplexen in vielen Enzymen wie Hydrogenasen oder Nitrogenasen.

Andere wichtige Eisenenzyme sind die Nicht-Häm-Eisenenzyme wie beispielsweise Hämythrin, Ribonukleotid-Reduktase und die Methan-Monooxygenase. Diese Proteine sind für Redoxreaktionen, Sauerstofftransport und –aktivierung oder Hydrolysen verantwortlich. Ein Enzym, in dem das Eisen als dreiwertiges Ion vorliegt, ist die Katalase, welche Wasserstoffperoxid abbaut. Eisen ist auch sehr flexibel gegenüber der Natur des Liganden, da es Stickstoff (Histidin, Porphyrin) ebenso gut koordiniert wie Carboxylate (Glutamat oder Aspartat).^[10,11]

Kupfer ist ebenso wie Eisen ein essentielles Spurenelement und katalysiert unterschiedliche oxidative Reaktionen. Die Cytochrom-Oxidase stellt den letzten Schritt der zellulären Sauerstoffverwertung dar. Weitere kupferhaltige Enzyme sind die Tyrosinase (Pigmentierung der Haut) oder die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Entgiftung freier Radikale). Typische Liganden für Kupferionen sind die Stickstoffatome der Imidazolgruppe des Histidins, der phenolische Sauerstoff von Tyrosin und das Schwefelatom von Cystein.^[10, 12, 13]

Nickel ist ebenfalls ein Spurenelement und nickelhaltige Enzyme sind z.B. Urease, Hydrogenasen, CO-Dehydrogenasen, Acetyl-Coenzym-A-Synthetasen oder Ni-Superoxiddismutase. Nickel scheint bei Ionenkanälen eine koordinierende Rolle zu spielen. Die Koordination von Nickel erfolgt bevorzugt über Histidin- oder Cysteinseitenketten.^[14]

Zink ist neben Eisen das wichtigste Spurenelement^[15] und durch seine stabile d^{10} -Konfiguration resultieren Eigenschaften wie fehlende Redoxaktivität oder flexible Koordinationsgeometrien und –zahlen, die je nach Enzym unterschiedliche Anwendung finden.^[16-18] Eine der wichtigsten Funktionen liegt in der Stabilisierung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, wobei das Metallion von vier Donoratomen abgesättigt ist.^[15]

In einem katalytisch aktiven Enzym-Zn-Komplex ist es von drei Donoratomen der Aminosäure-Seitenketten (His, Cys, Asp oder Glu) umgeben und einem Wassermolekül. Zu diesen Enzymen zählen die Hydrolasen (Peptidasen, Phosphatasen, Lipasen), die Alkohol-Dehydrogenase, Kollagenasen und einige Aldolasen.^[15-18]

Zirkonium ist ein Schwermetall, dessen biologische Funktion nicht bekannt ist. Es kommt nur in sehr geringen Mengen (4 mg/kg) im menschlichen Organismus vor und ist nicht toxisch. Die nichtenzymatische Hydrolyse von Phosphodiestern ist ein attraktives Forschungsziel, wobei zur Untersuchung künstlicher Nuklease-Aktivität das DNA-Analogon Bis-*p*-Nitrophenylphosphat (BNPP) gerne verwendet wird.^[19] Die Spaltungsgeschwindigkeit des BNPP kann sowohl durch Übergangsmetall-Ionen^[19] als auch durch Lanthanoid-Ionen gesteigert werden.^[20] Erst seit kurzem ist bekannt, dass auch Zirkonium(IV)-Komplexe die Spaltung von BNPP stark beschleunigen.^[21] So wird z.B. mit $ZrCl_4$ bei 20 °C und pH 5.0 die Hydrolyse-Geschwindigkeit um einen Faktor von 5×10^8 gesteigert.^[21d]

2.1.3 Hydrolase Mimetika

2.1.3.1 Metall-freie Spaltung

Obwohl beachtliche Fortschritte in der Entwicklung von synthetischen, aktivierten Ester- und Phosphatester-Hydrolasen erzielt wurden,^[22,23] bleibt jedoch stets die Herausforderung bestehen, inaktive Amidbindungen zu spalten. Für ein gegebenes Substrat müssen die Struktur des Katalysators, Lösungsmittel, Temperatur, relative und absolute Konzentrationen optimiert werden. Aus diesem Grund haben sich die kombinatorischen Methoden für schnelles und effizientes Screening bewährt. Viele Wissenschaftler gehen davon aus, dass Peptide als Enzym-Modelle fungieren können.^[24] Einige Arbeitsgruppen haben durch Imitation der katalytischen Triade versucht, „künstliche Esterase-Aktivität“ zu generieren.^[25] DE CLERCQ und Mitarbeiter haben eine aus zwei Peptidsträngen bestehende Peptidosteroid-Bibliothek **11** synthetisiert, wobei Serin und Histidin in jeweils einem der Stränge enthalten sind.^[26,27] Als Testsubstanz diente mit Dispersrot funktionalisiertes *p*-Nitrophenylacetat **12**. Ist das Peptidosteroid aktiv, sollte der Ester gespalten werden. Es konnte jedoch kein wirkliches Hydrolasesystem entdeckt werden, zum einen wegen der intrinsischen Aktivität, da ja nur ein Teil der Triade im Peptidarm enthalten war. Zum andern kann die Hydroxy-Gruppe des Serins den Ester angreifen, was eine Umesterung und zur Folge hat und somit nur eine vorgetäuschte Katalyse stattfinden würde. Weiterhin vermutete DE CLERCQ, dass der *p*-Nitrophenylester **12** so reaktiv ist, dass die nukleophile Katalyse einzig von Histidin durchgeführt wird (Abb. 18).

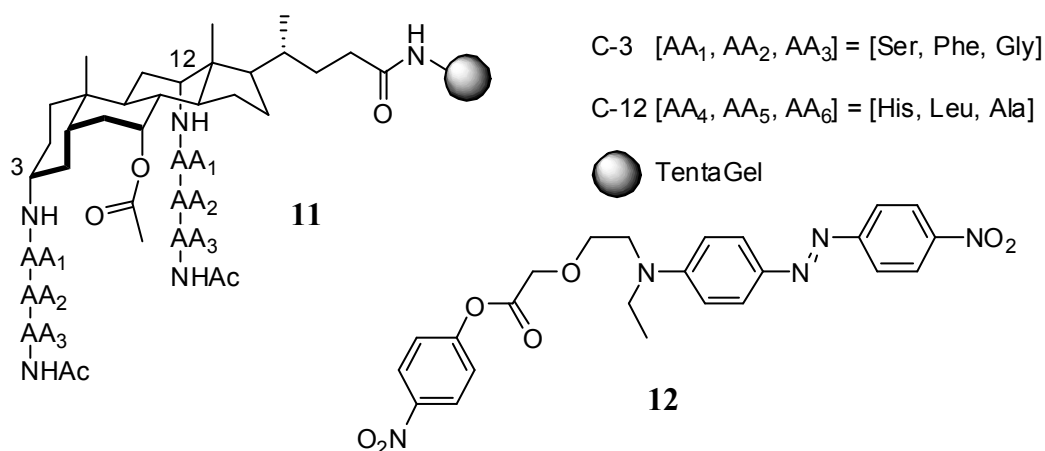


Abb. 18: Peptidosteroid **11** und DR-Nitrophenylester **12**.

DAVIS und Mitarbeiter verwendeten ein Agarose-Gel, welches sich durch Polymerisation um die jeweiligen Beads anordnet und so die Diffusion der Reaktionsprodukte eingeschränkt.^[28] Dieses Konzept wurde zuvor von MILLER und Mitarbeitern entwickelt, die ein mit einem Fluoreszenzmarker funktionalisiertes Gel verwendeten.^[29] Kommt es zwischen den Substraten zur Reaktion, fluoresziert das jeweilige Bead. Die Herstellung eines Gels aus niedrigschmelzender Agarose ist sehr einfach, da das Pulver einfach in heißem Wasser gelöst und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Das Gel kann mehrere Male verwendet werden, wobei die Reaktanden einfach in das noch flüssige Gel eingebettet werden. Diese Methode machte sich DAVIS zu Nutze, indem er ein Enzym auf Oxiran Harz immobilisierte und sowohl die Spaltung von *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid durch Galactosidase als auch die von *p*-Nitrophenylacetat durch Esterase aus Schweineleber. Wird der Ester gespalten erscheint die Bead-Oberfläche durch das entstehende *o*- bzw. *p*-Nitrophenolat gelb (Abb. 19).

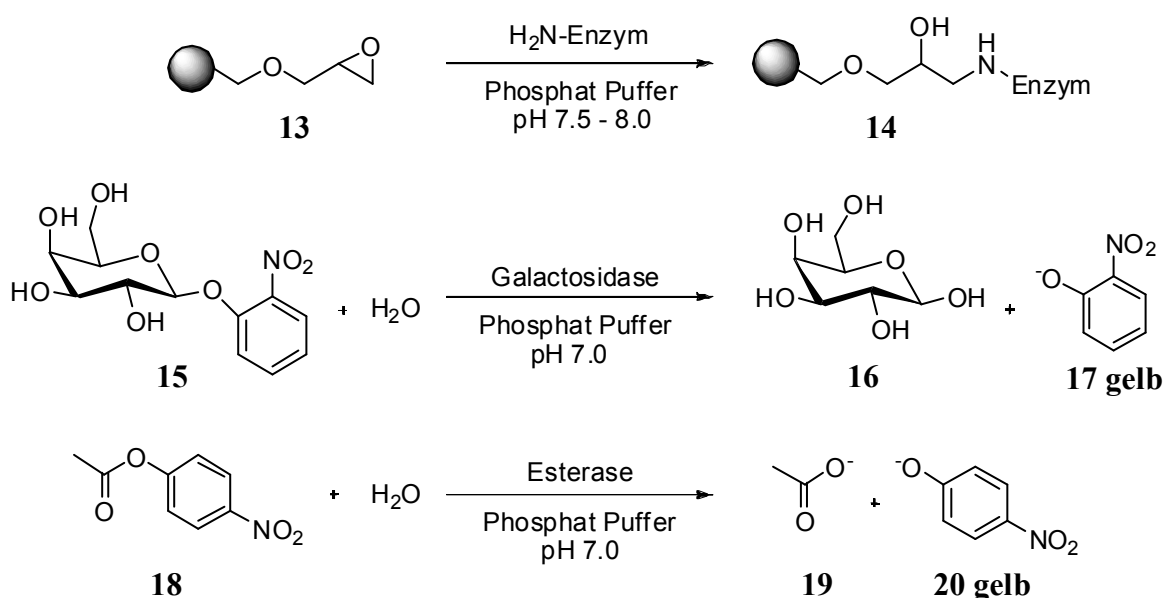


Abb. 19: Spaltung durch Galactosidase und Esterase.

DAVIS konnte auch Esterase-Aktivität mit Hilfe eines pH-Indikators (Methylrot) nachweisen.^[28] Methylrot ist bei pH 6.2 gelb und bei pH 4.2 rot und eignet sich somit sehr gut als Indikator. Für die Experimente wurden die festphasengebundenen Esterase, das zu spaltende Estersubstrat und der Indikator ins Gel eingebettet. Wird der Ester gespalten, so wird der pH Wert durch die entstehenden Protonen um das Bead erniedrigt und die aktiven Beads werden durch den Farbumschlag des Indikators rot (Abb. 20).

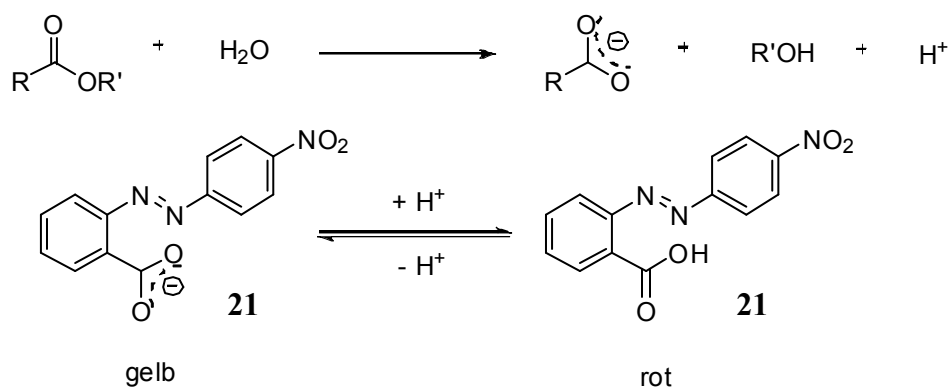


Abb. 20: Methylrot als pH-Indikator für Esterspaltung.

Diese Methode ist jedoch nur auf die Verwendung von einfachen, neutralen Verbindungen ausgerichtet und könnte durch den Gebrauch von z.B. Carbonsäure-haltigen Verbindungen problematisch werden.

Andere Ansätze zur Mimik von Enzymkatalyse mit Hilfe der Triade lieferte REYMOND ET AL., in dem er Dendrimere **22** als Grundgerüst auf Festphasen immobilisierte und Substrate nutzte, die nach erfolgreicher Spaltung auf dem aktiven Bead fluoreszieren. Seine Histidin-haltigen Dendrimere zeigten im wässrigen Medium enzymähnliches, katalytisches Verhalten mit einem K_M von 800 μM und einem k_{cat} von 0.25 min^{-1} (Abb. 21a/b).^[30,31]

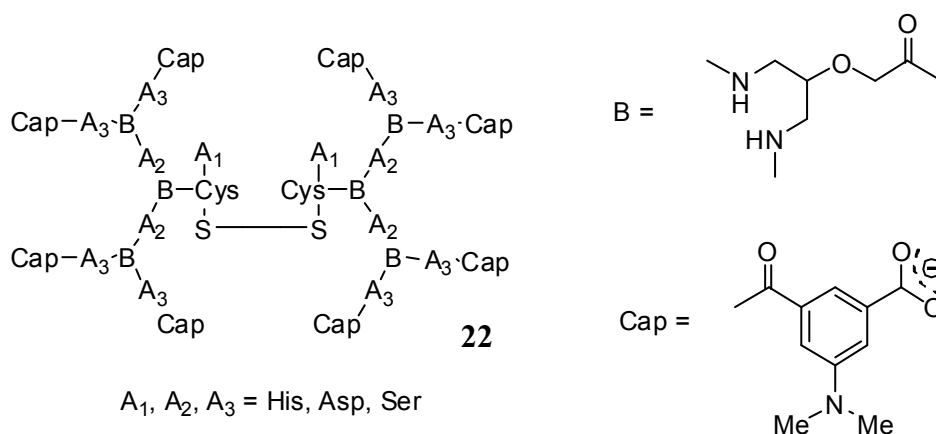


Abb. 21a: Katalytisch aktive Dendrimere und deren Anwendung für Esterhydrolyse.

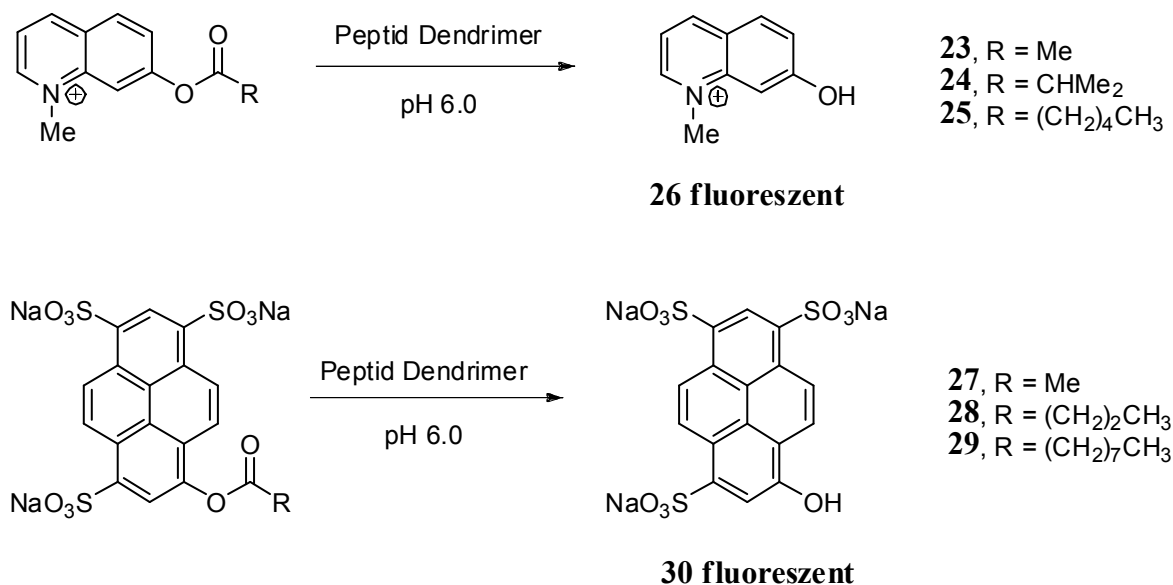


Abb. 21b: Katalytisch aktive Dendrimere und deren Anwendung für Esterhydrolyse.

2.1.3.2 Metall-katalysierte Spaltung

Die Natur benutzt Metallo-Proteasen, um Ester, Peptide und Phosphatester selektiv zu spalten.^[7] Diese Verbindungen besitzen eine große Halbwertszeit und demzufolge Stabilität, so dass der Einsatz von Metallionen die Spaltgeschwindigkeit beschleunigen könnte. Das Metallion hat drei Möglichkeiten, die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse zu beschleunigen: Aktivierung der Abgangsgruppe, Aktivierung des Nucleophils oder Aktivierung des Substrates.^[32] Aus diesem Grund sind Metall-komplexierende Peptide eine der attraktivsten Zielverbindungen und viele Forschungsgruppen untersuchen die Hydrolyse von Ester-, Peptid- und Phosphatesterbindungen mit Hilfe von Peptid-Metall-Komplexen. An dieser Stelle sollen nur einige der wichtigsten Vertreter genannt werden. Einen Ansatz zur Spaltung von Monophosphateestern lieferten BERKESSEL und GOLDBERG, die mit Hilfe einer Split-and-Mix-Peptidbibliothek (bestehend aus 625 Undecapeptiden) das Indolylmonophosphat **31** hydrolysieren konnten.^[33,34] Beide Forschungsgruppen fanden heraus, dass das Substrat sowohl mit Zr(IV)^[33] als auch Zn(II)^[34] gespalten werden kann. Wird der Phosphatester gespalten, entsteht der türkise und wasserunlösliche Indigo Farbstoff, der sich auf den Beads mit hydrolytisch aktiven Verbindungen niederschlägt (Abb. 22).

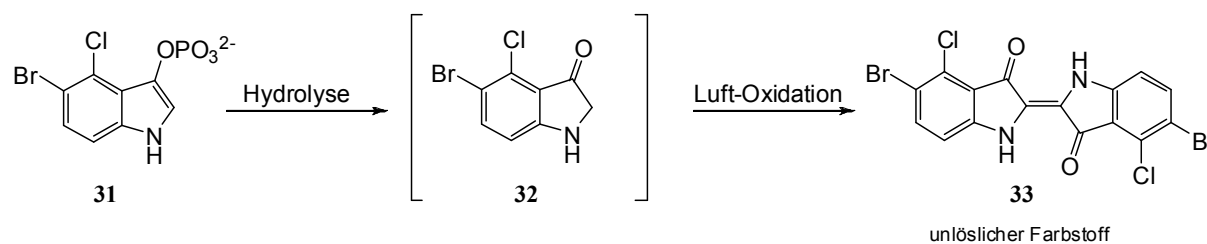


Abb. 22 Hydrolyse des Indolylderivates 31.

Auch auf der Basis von Phosphodiester-Spaltungen generierten einige Forschungsgruppen künstliche Nuklease-Aktivität sowohl mit einfachen Cyclen- und Triazacyclononan-Metallkomplexen als auch mit Peptiden, die diese Komplexe enthalten.^[35-39] Sehr großes Interesse erweckten diese Metallkomplexe zur Hydrolyse von nicht-aktivierten Amid- und Peptidbindungen. BURSTYN und Mitarbeiter fanden heraus, dass Cu(II)-Triazacyclononandichlorid **34** (Abb. 23) nicht nur eine künstliche Nuklease, sondern auch eine künstliche Peptidase darstellt.^[40]

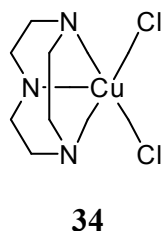


Abb. 23: Cu(II)-Triazacyclononan **34**.

Inkubiert man das z.B. Dipeptid Gly-Gly mit dem Metallkomplex, so entsteht Glycin als einziges Produkt. Die Hydrolyse hängt allerdings stark vom verwendeten Puffer ab.

Obwohl man weiß, dass Peptidbindungen mit Hilfe von Metallen hydrolysiert werden, gibt es nur wenige Beispiele für die Spaltung mit eindeutig definierten Metallkomplexen. KOSTIC und Mitarbeiter beschrieben 1991 zum ersten Mal, dass sowohl Platin-Diamin-Komplexe als auch $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ unter sauren Bedingungen Peptidbindungen spalten können.^[41] In dieser Reaktion bindet das Metall an den Schwefel von Cystein- oder Methioninhaltigen-Peptiden und spaltet so die Peptidbindung (Abb. 24).

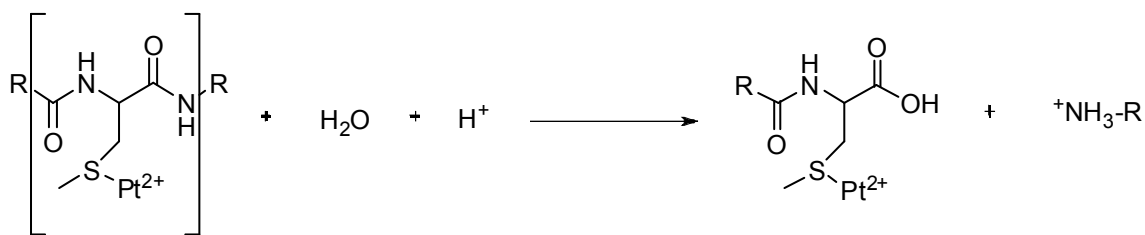


Abb. 24: Hydrolyse von schwefelhaltigen Peptiden mit Pt(II).

Durch diese Wechselwirkung wird der Carbonylkohlenstoff für einen nukleophilen Angriff aktiviert. Da Platin relativ inert ist, wurden auch Palladiumkomplexe auf ihre Aktivität hin getestet.^[42,43] Sie sind ebenfalls in der Lage, schwefelhaltige Peptide zu spalten, jedoch nur unter sauren Bedingungen. Bei diesen Reaktion ist der aktive Katalysator ein Pd(II)-Substrat-Dimer, bei dem die Schwefelatome mit dem Palladium ein viergliedrigen Ring bilden (Abb. 25).

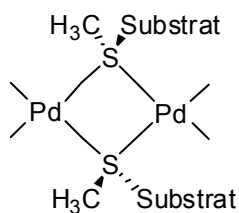


Abb. 25: Aktiver Pd(II)-Katalysator.

Als Hydrolyse-Katalysatoren werden hierbei $[\text{PdCl}_4]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ oder $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})]^{3+}$ eingesetzt. Die aktive Spezies ist, unabhängig vom Katalysator, immer dieselbe. Im Jahre 2002 konnte gezeigt werden, dass eine Spaltung neben Methionin, Histidin und Tryptophan eingeleitet werden kann^[44,45] und auch, dass schwefelhaltige Pd(II)- und Pt(II)-Komplexe Peptidase-Aktivität zeigen.^[46] All diese Hydrolysen erfordern lediglich Wasser als Lösungsmittel.

Etwa zeitgleich zu den Arbeiten von KOSTIC fanden die Gruppen von MEARES^[47], SCHEPARTZ^[48] und FOX^[48] heraus, dass EDTA-Fe(III)-Komplexe in der Lage sind, Peptide zu spalten (Abb. 26).

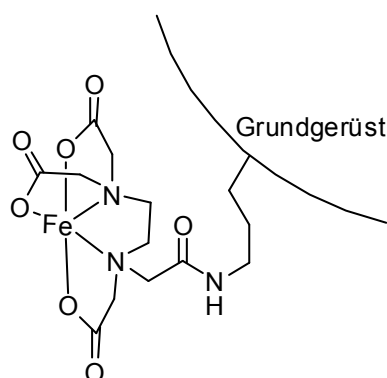


Abb. 26: Kovalente Anbindung des EDTA-Fe-Komplexes an ein Grundgerüst.

Die Spaltung von Peptiden mit Hilfe dieser angebundenen Komplexe erfordert jedoch zusätzliche Reagenzien wie Wasserstoffperoxid und Vitamin C. Diese Kombination von Fe(II/III), H₂O₂ (Fenton-Reaktion, Erzeugung von OH-Radikalen)^[49] und Ascorbat wurde auch in unserer Gruppe verwendet, um Peptide selektiv zu spalten.^[50] Die Grundlage dazu lieferten Arbeiten, die bereits mit Hilfe der Fenton-Reaktion Protein-Grundgerüste oder die darin enthaltenen funktionellen Gruppen der Seitenketten schädigen konnten.^[51-53] Um die selektive Peptidspaltung durch die Fenton-Reaktion zu detektieren, wurde eine kodierte Bibliothek synthetisiert, in der die zu untersuchenden Peptide mit einem Quencher und einem Fluorophor flankiert waren. Die kombinatorischen Studien zeigten, dass säurehaltige Peptide eher gespalten werden als andere.

Basierend auf all diesen Ergebnissen steht auch in dieser Arbeit die Spaltung von Estern, Phosphatestern und Peptidbindungen im Vordergrund und wurde mit Hilfe von kombinatorischen als auch Lösungsstudien untersucht.

2.2 Spaltung verschiedener Estersubstrate mit Hilfe von kodierten Split-and-Mix Peptidbibliotheken

2.2.1 Design und Synthese der kodierten Penta- und Tripeptidbibliotheken

Um möglichst viele Peptide parallel auf ihre Hydrolyse-Aktivität zu testen, wurden zwei kodierte Peptidbibliotheken mit Hilfe der Split-and-Mix-Technik synthetisiert.^[54,55,56] Als Festphase wurde TentaGel gewählt, da es sehr gut in Wasser aufschwillt und unsere Versuche werden in wässrigem Medium durchgeführt. Vor jeder Aminosäurekupplung wurde ein entsprechender „Tag“ gekuppelt, um die Aminosäure zu kodieren (Kap. 2). Anschließend wurden die einzelnen Aminosäuren mittels Standard Fmoc-Strategie und HOBt/DIC als Kopplungsreagenzien auf das Harz aufgebracht (Abb. 27).

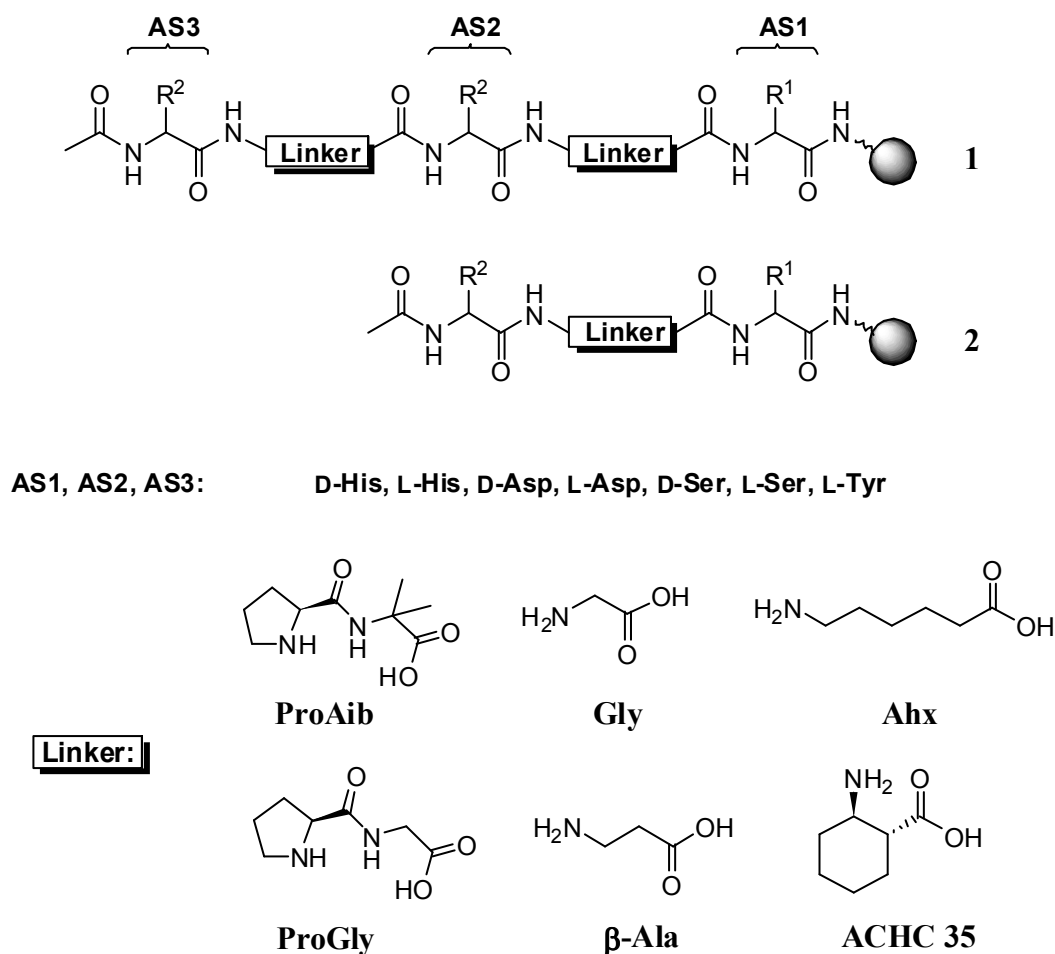
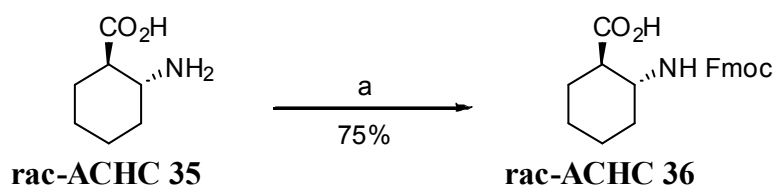


Abb. 27: Kodierte Split-and-Mix-Bibliotheken 1 und 2.

Die Bibliotheken wurden basierend auf der katalytischen Triade der Serin-Proteasen synthetisiert. Durch die spezielle räumliche Anordnung der Aminosäuren Asp/His/Ser im aktiven Zentrum des Enzyms werden die entsprechenden Substrate hydrolysiert. In Anlehnung an diese natürliche Vorgehensweise der Serin-Proteasen wurden unsere Bibliotheken designed und die Aminosäuren der katalytischen Triade in ihrer natürlichen und unnatürlichen Form wie auch L-Tyrosin eingesetzt. Durch den Einbau von strukturdirektierenden Elementen könnte eine bestimmte räumliche Anordnung erreicht werden, welche die Aktivität des Systems erhöhen könnte. Das Substrat könnte vom entsprechenden Peptid eingeschlossen werden, was die Hydrolyse erleichtern würde. Um mehrere verschiedene Konformationen gleichzeitig zu erhalten, wurden Linker zwischen den einzelnen Aminosäuren der Triade eingebaut. Zum einen wurden flexible Bindungsglieder wie Glycin, Aminohexansäure und β -Alanin als auch Sekundärstrukturen-induzierende Motive wie Pro-Gly, Pro-Aib und die racemische Aminosäure *trans*-2-Aminocyclohexan Carbonsäure (**rac-ACHC 35**) verwendet. Es ist bekannt, dass Peptide, die das Motiv Pro-Gly enthalten, turn-Strukturen ausbilden.^[57] Auch der Einbau der achiralen Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib, α -Methylalanin) führt zu Peptiden, die eine Sekundärstruktur, meistens eine 3_{10} -Helix, aufweisen.^[58] Die Kombination aus den Aminosäuren Prolin und α -Aminoisobuttersäure induziert ebenfalls Sekundärstrukturen in Peptiden wie „turns“ oder „ β -bend ribbon“ Spiralen.^[59] Ein weiteres wichtiges Strukturelement ist die zyklische β -Aminosäure *trans*-2-Aminocyclohexan Carbonsäure (**rac-ACHC 35**), die in der Lage ist, in linearen Peptiden 3_{14} -Helices auszubilden.^[60] Alle diese strukturellen Elemente könnten in der Bibliothek dazu beitragen, die aktiven Funktionalitäten in eine optimale Position für die Hydrolyse zu bringen und wurden daher als Linkersysteme gewählt.

Die zyklische Fmoc-geschützte Aminosäure (**rac-ACHC 36**) wurde racemisch in die Bibliothek eingebaut und durch Reaktion mit Fmoc-OSu und *trans*-2-Aminocyclohexansäure (ACHC) **rac-35** in einer Stufe erhalten (Abb. 28).



(a) *trans*-2-Aminocyclohexansäure (1.0 eq), Fmoc-OSu (1.0 eq), NaHCO₃ (1.0 eq), THF, H₂O, 12 h, RT.

Abb. 28: Fmoc-Schützung der cyclischen Aminosäure *rac*-ACHC 35.

Die Pentapeptidbibliothek **1** hat fünf variable Positionen und besteht aus maximal $7^5 = 16807$ verschiedenen Peptiden, die Tripeptidbibliothek **2** hat drei variable Positionen und besteht aus maximal $7^3 = 343$ verschiedenen Peptiden.

Die einzelnen Aminosäuren wurden mittels HOBt/DIC als Kopplungsreagenzien auf das Harz aufgebracht und die Fmoc-Gruppe mit 20 % Piperidin in DMF entschützt. Nach erfolgreicher Bibliothek-Synthese wurden die *N*-Termini acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen mit einer Mischung aus TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) abgespalten. Man erhielt die beiden Bibliotheken **1** und **2**, die nun für in kombinatorischen Experimente gegen verschiedene Substrate getestet wurden.

2.2.2 Anwendungen der Peptidbibliotheken

2.2.2.1 Spaltungsexperimente mit Essigsäureethylester und Methylrot als Indikator

Die von DAVIS und Mitarbeitern entwickelte Methode zum Nachweis von Esterase-Aktivität wurde auf unsere Bibliothek **1** angewendet (Abb. 29).^[28]

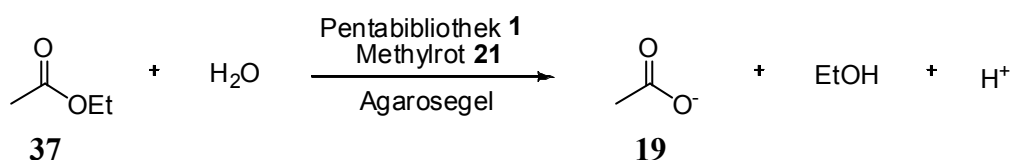


Abb. 29: Essigesterspaltung mit der Pentapeptidbibliothek **1**.

Für die Experimente wurde die Bibliothek **1** in 0.5 mL nicht gepuffertes Agarosegel eingebettet. Anschließend wurde der Indikator Methylrot **21** und Essigsäureethylester **37** zum Gel gegeben. Innerhalb einiger Minuten konnte die Rotfärbung und Orangefärbung einiger Beads beobachtet werden (Abb. 30).



Abb. 30: Lichtmikroskop-Aufnahme von Methylrot **21**, Essigester **37** und der Pentpeptidbibliothek **1** in Agarosegel.

Es wurden die dunkelsten Beads isoliert, gewaschen und mittels EC-GC analysiert (Tab. 1).

AS3	Linker	AS2	Linker	AS1	gefundene Häufigkeit % ^[a]	erwartete Häufigkeit % ^[b]
D-Asp	β -Ala kein Motiv	D-His	Pro-Aib	D-Asp	50	0.012
D-His L-Ser	Pro-Gly Pro-Aib	L-Asp L-Ser	Pro-Aib	L-Asp	50	0.095

[a] Diese Spalte listet auf, wie oft die Sequenz im Versuch gefunden wurde; [b] Diese Spalte listet die Wahrscheinlichkeit der Sequenz auf, wenn man zufällig Beads isolieren würde.

Tab. 1: Ergebnis der GC-Analyse mit Methylrot **21**, Essigester **37** und Bibliothek **1**.

Erwähnenswert bei diesem Ergebnis ist, dass sich in der 1. Position immer ein Aspartat befindet. Da dies eine saure Aminosäure darstellt und die Spaltung ebenfalls eine Säure generiert, kann der Farbumschlag entweder durch Aspartat oder durch die entstehende Essigsäure bewirkt werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Bibliothek alleine in Agarosegel eingebettet und mit einigen Tropfen der Methylrot-Lösung versetzt. Es ließen sich auch hier rote Beads nachweisen, die ebenfalls mittels GC-EC analysiert wurden.

Die Analyse zeigte auch hier eine Selektivität für Aspartat-haltige Peptide. Man kann bei diesen Experimenten nicht sagen, ob die Rotfärbung der Beads durch die entstehende Essigsäure oder die sauren Aminosäuren hervorgerufen wird. Abschließend lässt sich festhalten, dass die Spaltungskontrolle mittels pH-Indikatoren nicht der richtige Ansatz ist, da die Bibliothek alleine schon für einen Farbumschlag verantwortlich sein kann.

2.2.2.2 Spaltungsexperimente mit den Pyrenesterderivaten **27** und **28**

Da eine Detektion der Spaltung mit pH-Indikatoren nicht zum gewünschten Ziel führte, wurden Substrate gewählt, die nach der Spaltung fluoreszieren. Interessante Substrate für diese Experimente sind die, auch schon von REYMOND ET AL. verwendeten Pyrenester **27** und **28**, da der entstehende Alkohol **30** nach erfolgreicher Esterspaltung fluoresziert (Abb. 31).^[30,31,61]

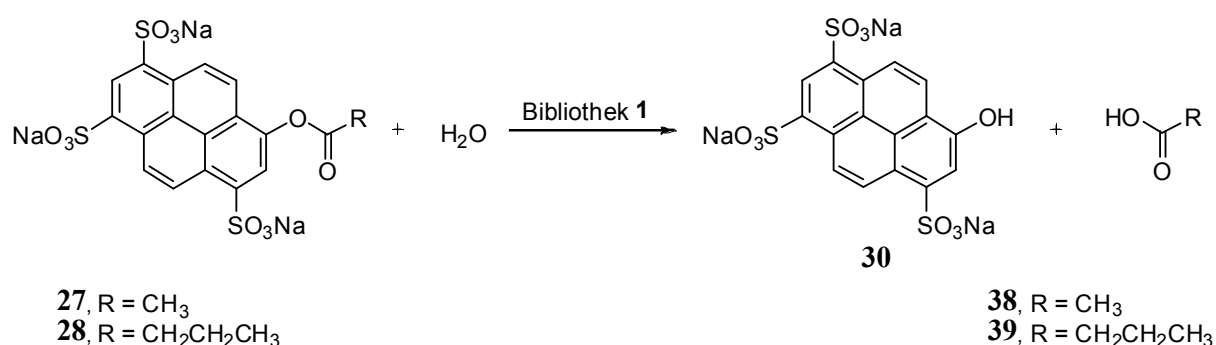


Abb. 31: Hydrolyse der Pyrenester-Derivate.

Die Experimente wurden mit der Pentapeptidbibliothek **1** entweder in Lösung oder in Agarosegel durchgeführt. Zuerst wurde die Spaltung in drei verschiedenen Pufferlösungen (Acetat (pH 4.0), HEPES (pH 7.0) und Carbonat (pH 10.0)) und gepufferten Gelen getestet, um eine eventuelle pH-Abhängigkeit der Substrate auszuschließen. Nach 48 h konnten mit beiden Substraten sowohl aus der Lösung als auch aus dem Gel in Acetat und HEPES fluoreszierende Beads isoliert werden (Abb. 32).

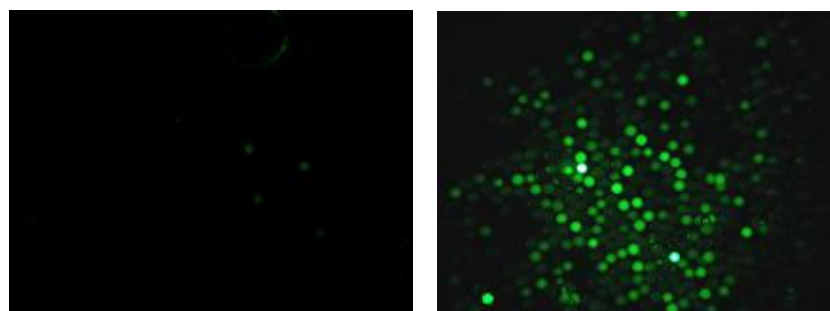


Abb. 32: Lösungsversuch; Links: Pentabibliothek-Referenz in HEPES; Rechts: Acetoxypyreneester **27** in HEPES.

Die am stärksten fluoreszierenden Beads wurden isoliert und die Analyse mittels EC-GC zeigte eine gute Selektivität für Histidin in der ersten und zweiten Position bei beiden Esterderivaten. Hier sei nur ein Beispiel für die Sequenzanalyse mit Butyryloxypyren **28** in Acetat aufgeführt (Tab. 2).

AS3	Linker	AS2	Linker	AS1	Häufigkeit gefunden %	Häufigkeit erwartet %
L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	D-Ser	4	0.006
X	X	D/L-His	X	D/L-His	63	4.3
X	X	D/L-Ser L-Tyr	X	D/L-His	33	4.5

X = zufällige Aminosäure

Tab. 2: Sequenzanalyse (Lösung und Gel) am Beispiel von Substrat **28** in Acetat.

Die Selektivität für Histidin- und Serin/Tyrosin-haltige Peptide wurde bei allen isolierten Beads gefunden (s. Anhang). Diese Resultate sind nicht ungewöhnlich, da sowohl die katalytische Aktivität von Histidin^[62] bekannt ist als auch die Kombination aus Histidin und Serin, die in vielen Enzymen für die Spaltung von Estern, DNA und Proteinen verantwortlich ist.^[63,64]

Zur Verifizierung der erhaltenen Daten sollte auch die Kontrolle mit dem freien Alkoholsubstrat **30** unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Entgegen unseren Erwartungen erhielten wir selektiv fluoreszierende Beads, die nach Analyse mittels EC-GC die gleiche Selektivität wie die Ester zeigten.

Ein weiteres Kontrollexperiment mit nur einem Histidin auf der festen Phase zeigte eine direkte Spaltung des Esters, was darauf hindeutet, dass kein Peptid notwendig ist, um den Ester zu spalten.

Die Kontrollexperimente haben gezeigt, daß der Pyrenalkohol selektiv an Histidin-haltige Peptide bindet, was die Analyse der zuvor erhaltenen Spaltungsdaten mit den Pyrenestern erschwert. Es ist durchaus vorstellbar, dass das hydrolytisch aktive auch gleichzeitig das fluoreszierende Bead ist. Es kann auch möglich sein, dass ein aktives Peptid den Ester spaltet und ein benachbartes Peptid an das Spaltprodukt bindet. Das Pyrensystem ist mit seinen vier annelierten Aromaten ein sehr elektronenreiches System und ist in der Lage, π - π -Wechselwirkungen mit dem Imidazolsystem des Histidins einzugehen. Sind diese Wechselwirkungen so stark, dass aus ihnen eine Bindung resultiert, so sollte das Bead

fluoreszieren. Schlussendlich lässt sich festhalten, dass auch dieses Substrat für unsere Peptidbibliothek nicht geeignet ist.

2.2.2.3 Spaltungsexperimente mit *p*-Nitrophenylacetat **18** und 4-Methylumbelliferylacetat **40**

Da die Versuche mit Methylrot und den Pyrenestern nicht wunschgemäß funktioniert haben, wurden weitere Substrate wie *p*-Nitrophenylacetat **18** (DAVIS ET AL.)^[28] und 4-Methylumbelliferylacetat **40** getestet. Kommt es im Fall des *p*-Nitrophenylacetats zur Spaltung des Esters, sollten sich die Beads der Bibliothek durch die Entstehung des *p*-Nitrophenolats **20** gelb färben (Abb. 33).

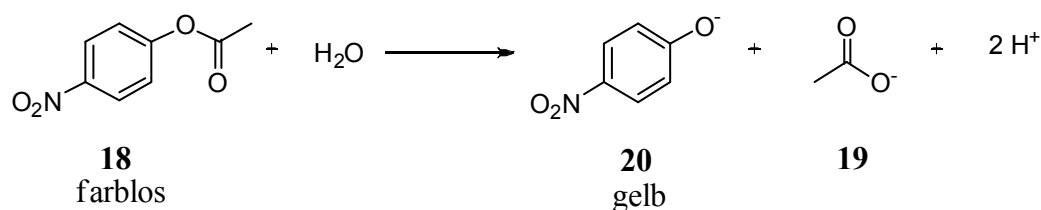


Abb. 33: Entstehung des Anions **20**.

Die Spaltung des Cumarinesters **40** hingegen ergibt ein fluoreszierendes Produkt **41**, das sich auf den aktiven Beads niederschlagen sollte (Abb. 37).

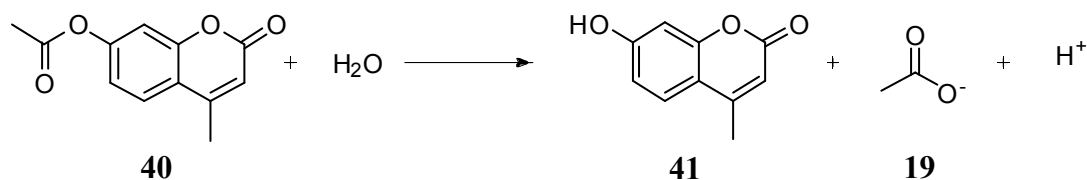


Abb. 34: Entstehung des fluoreszierenden Cumarins **41**.

Um die Diffusion der Reaktionsprodukte einzuschränken, wurde bei diesen Experimenten nur in Agarosegel gearbeitet. Bevor jedoch die Spaltungsexperimente durchgeführt wurden, wurden die entstehenden Spaltprodukte mit der Bibliothek inkubiert, um eine selektive Bindung auszuschließen. Die Penta- und Tripeptidbibliothek wurden in die drei gepufferten

Agarosegele eingebettet und mit den Alkoholen versetzt. Es stellte sich heraus, dass beide Alkohole selektiv an die Bibliotheken binden, was die Anwendung beider Substrate für Spaltexperimente ausschließt.

2.2.2.4 Spaltungsexperimente mit Indolyl Phosphat Dinatriumsalz 31

Ein alternatives Substrat ist 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat **31**, welches auch schon von BERKESSEL und GOLDBERG verwendet wurde. Nach erfolgter Spaltung bildet sich ein türkiser, wasserunlöslicher Indigofarbstoff (Abb. 35).^[33,34]

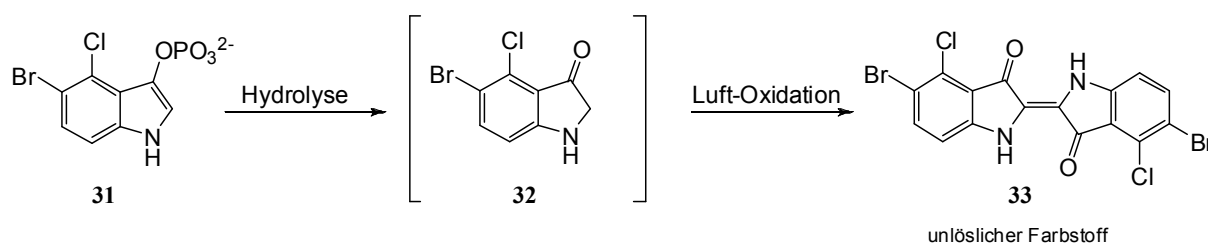


Abb. 35: Hydrolyse des Indolylderivates **31**.

Die Experimente zur Spaltung des Esters wurden mit beiden Bibliotheken in Lösung durchgeführt. Die Experimente wurden mit und ohne Metallsalze durchgeführt. Zuerst wurden beide Bibliotheken auf ihre Metallbindungseigenschaften getestet, indem sie mit ZnCl_2 -, ZrCl_4 -, CuCl_2 -, NiCl_2 - und FeCl_3 -Lösungen inkubiert wurden. Anschließend wurden die Harze mit Wasser gewaschen und mit den entsprechenden Nachweisreagenzien versetzt (Dithizon für Zink, Alizarin S für Zirkonium, Diacetyldioxim für Nickel, Ammoniumrhodanid für Eisen). Für Kupfer war kein Reagenz notwendig, da die Beads schon alleine gefärbt waren.

Im Falle von Zirkonium und Zink konnte keine Aussage über die Bindung getroffen werden, da schon durch deren Nachweis-Reagenzien alleine die Beads der Bibliothek selektiv gefärbt waren.

Die Nachweisreagenzien für Eisen und Nickel zeigten mit der Bibliothek alleine keine Farbe. Nach Inkubation mit den Metallen konnten selektiv rote (Eisen) und rosa (Nickel) Beads isoliert werden, im Falle von Kupfer waren die Beads grünlich gefärbt (Abb. 36).

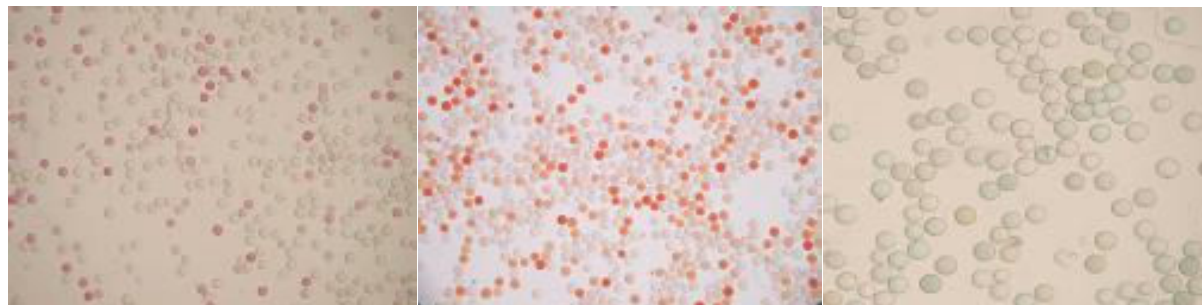


Abb. 36: Bindungsexperiment, Links: Nickel; Mitte: Eisen; Rechts: Kupfer.

Die Analyse der Tri- und Pentapeptide auf den farbigen Beads zeigte für Eisen eine hohe Selektivität für Aspartat und Histidin, bei Nickel für Aspartat und bei Kupfer eine Selektivität für Histidin (Tab. 3). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Tripeptidbibliothek **2** selektiver ist als die Pentapeptidbibliothek **1** (s. Anhang).

Metall	AS3	Linker	AS1	gefundene	erwartete
				Häufigkeit	Häufigkeit
				%	%
Cu²⁺	D/L-His	X	D/L-His	81	7.0
	D/L-Asp	ACHC β-Ala	D/L-His	9.5	2.3
	D-His	Ahx β-Ala	D-Ser	9.5	0.6
Fe³⁺	L-Tyr	β-Ala	D-Asp	7	0.29
	L-His	Ahx β-Ala	D-Asp	29	0.58
	D-His	Pro-Aib Ahx	D-Asp	21	0.58
	D-His	Gly β-Ala	L-Asp	29	0.58
	L-His	Pro-Aib ACHC	L-Asp	14	0.58
Ni²⁺	D/L-Ser	X	D/L-Asp	23	5.8
	D/L-Asp	Ahx ACHC Pro-Gly	D-Asp	32	1.7
	L-Asp	X	L-Asp	41	1.2
	D-Asp	Ahx	L-Asp	4.5	0.29

X = zufällige Aminosäure

Tab. 3: Sequenzen der analysierten Tripeptide für die Metallbindung.

Für die Identifikation von hydrolytisch aktiven Peptiden, wurden die Bibliotheken entweder ohne oder mit vorheriger Inkubation mit ZnCl_2 -, ZrCl_4 -, NiCl_2 -, FeCl_3 - und CuCl_2 -Lösungen verwendet. Alle Experimente wurden in HEPES Puffer (pH 7.0), MES Puffer (pH 5.0) und CHES Puffer (pH 9.2) bei Raumtemperatur durchgeführt. In jedem Versuch konnte die Entstehung des Indigoderivates durch die auftretende türkise Farbe auf den Beads beobachtet werden (Abb. 37). Im Falle von Kupfer sind die Beads eher dunkelgrün.

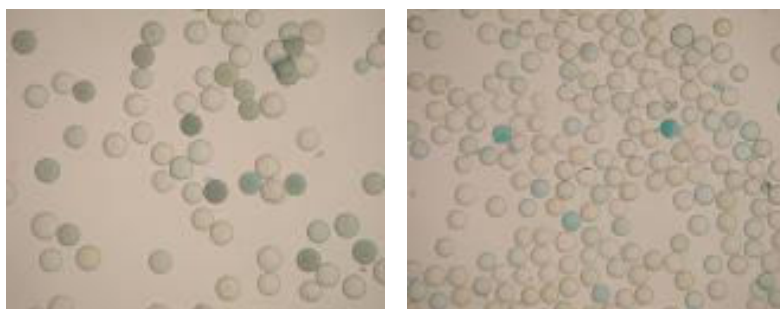


Abb. 37: Spaltungsexperimente, Links: mit CuCl_2 ; Rechts: Bibliotheken alleine oder mit restlichen Metallen.

Aus jedem Versuch konnten türkise Beads isoliert werden und auch bei der Hydrolyse stellte sich heraus, dass die Tripeptidbibliothek **2** selektiver ist im Vergleich zur Pentapeptidbibliothek **1** (s. Anhang). Im Falle von Zink wurden viele Serin- und Tyrosinhaltige Sequenzen gefunden, wohingegen bei allen anderen Metallen viele Histidin-haltige Peptide als hydrolytisch aktiv identifiziert wurden. In der untenstehenden Tabelle 4 sind die am häufigsten gefundenen Sequenzen aufgelistet (weitere s. Anhang) (Tab. 4).

Metall	AS3	Linker	AS1	gefundene	erwartete
				Häufigkeit	Häufigkeit
				%	%
Zr⁴⁺	D/L-His	X	D/L-His	33	7
	L-Tyr	X	D/L-His	14	3.4
	D/L-Ser	X	D/L-His	9	6
	D/L-Asp	X	D/L-His	13	7
Zn²⁺	D/L-His	X	D/L-His	15	3
	D/L-Ser	X	D/L-Ser	11	7
	D/L-His	X	D/L-Ser	16	8
	L-Tyr	X	D/L-Ser	8	3
	D/L-Ser	X	L-Tyr	13	2.3
	D/L-His	X	L-Tyr	10	3
Ni²⁺	D/L-His	X	D/L-His	38	7
	L-Tyr	X	D/L-His	19	3
	D/L-Ser	X	D/L-His	12.5	5
	D/L-His	X	L-Tyr	12.5	6
	D/L-Ser	X	D/L-His	9	5
	D/L-Asp	X	D/L-His	9	5
	D/L-His	Ahx Gly	D/L-Ser	7	2
Fe³⁺	D/L-His	X	D/L-His	36	7
	D/L-Asp	X	D/L-His	17	5
	D/L-Ser	X	D/L-His	11	3
	L-Tyr	X	D/L-His	9	2
	D/L-His	X	L-Tyr	11	2
Cu²⁺	D/L-His	β-Ala	D/L-His	8.7	1.2
	D/L-His	Ahx	D/L-His	53	1.2
	D/L-His	Pro-Aib ACHC	D/L-His	5.4	2.3
	D/L-Ser	X	D/L-His	8.7	5.8
	L-Tyr	X	D/L-His	4.3	1.7
	D-Asp	X	D/L-His	3.3	1.7
ohne Metall	D/L-His	X	D/L-His	37	7
	D/L-Ser	X	D/L-His	19	5
	L-Tyr	X	D/L-His	22	3
	D-Asp	Ahx ACHC	D-His	4	0.6
	D/L-His	ACHC β-Ala	L-Tyr	6	1.2
	D-His	X	D/L-Ser	11	1.7

X = variable Aminosäure

Tab. 4: Häufigste Sequenzen zur Phosphatesterspaltung.

In allen verwendeten Puffern erhielt man die gleichen Sequenzen und bei fast allen Sequenzen spielte die Linkerposition nur eine untergeordnete Rolle, was darauf hindeutet, dass die Peptide nicht unbedingt eine geordnete räumliche Struktur aufweisen müssen. Vergleicht man

jedoch die in den Spaltexperimenten identifizierten aktiven Sequenzen mit den identifizierten Sequenzen aus den Bindungsexperimenten, so erkennt man, dass sich diese bei Eisen und Nickel deutlich unterscheiden, wohingegen die Sequenzen bei Kupfer die Gleichen sind. In den Nickel-Bindungsexperimenten wurden Aspartat-reiche Sequenzen in der ersten und letzten Position gefunden, wohingegen bei Eisen, neben Aspartat in der ersten Position Histidin in der letzten Position gefunden wurde.

Um die erhaltenen Ergebnisse auch im Einzelexperiment zu überprüfen, wurden verschiedene Sequenzen mittels Standard Fmoc-Synthese nachsynthetisiert und die Hydrolyse des Esters mit Hilfe von UV-Vis-Spektroskopie verfolgt. Da die Selektivität nur durch die erste und letzte Position in den Sequenzen bestimmt wird, wurde bei der Nachsynthese eine flexible Linkerposition gewählt und das Peptid Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH-TG/H **42a/b** synthetisiert. Um den Einfluß der Linkerposition zu untersuchen, wurde auch noch Ac-L-His-L-His-NH-TG/H **43a/b** hergestellt. Da in den Experimenten mit Kupfer eine eindeutige Präferenz für Amino-hexansäure in der Linkerposition erkennbar war, wurde zusätzlich noch Ac-D-His-Ahx-L-His-NH-TG/H **44a/b** synthetisiert. Die Sequenzen für Zink zeigten außerdem eine Selektivität für Serin-haltige Peptide, so dass für diese Studien noch Ac-L-Ser- β -Ala-L-Ser-NH-TG/H **45a/b** hergestellt wurde. Die identifizierten aktiven Sequenzen aus den Spaltungsexperimenten mit Nickel und Eisen unterscheiden sich von ihren aktiven Bindungssequenzen. Aus diesem Grund ergaben sich mit den Bindungsexperimenten zugleich negative Kontrollpeptide. Deshalb wurde für die Untersuchungen Ac-L-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NH-TG/H **46a/b** nachsynthetisiert, was weder mit Nickel, Eisen noch Kupfer eine Spaltung des Phosphates einleiten sollte (Abb. 38).

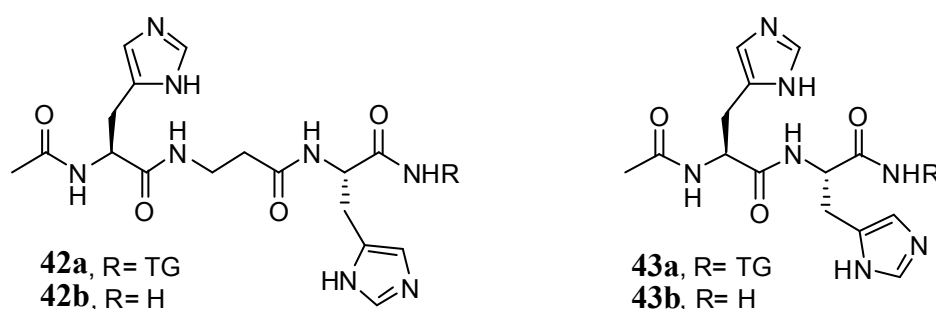


Abb. 38a: Synthetisierte Peptidsequenzen zur Phosphatester-Spaltung.

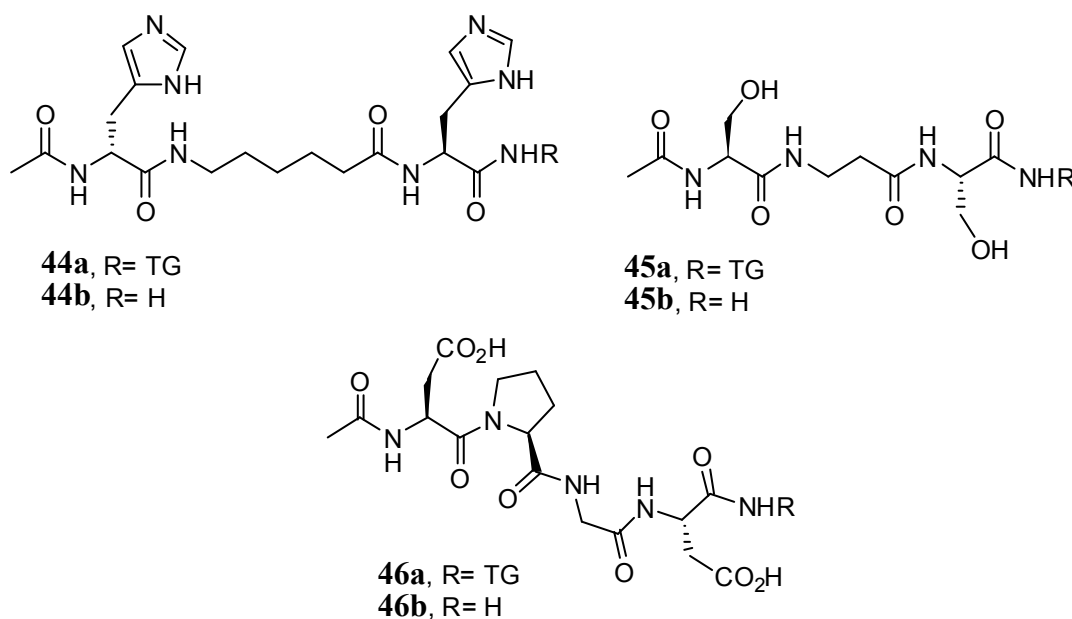


Abb. 38b: Synthetisierte Peptidsequenzen zur Phosphatester-Spaltung.

Die Hydrolyseexperimente wurden mit dem Indolylphosphat **31** durchgeführt, die Peptide wurden sowohl in Lösung als auch gebunden auf fester Phase in den verschiedenen Puffern auf ihre hydrolytische Aktivität untersucht. Für die Experimente in Lösung wurden verschiedene Peptid-Metall-Indigo Verhältnisse getestet, jedoch konnten durch den sich bildenden Indigo-Feststoff keine Resultate erhalten werden. Für die Studien mit den festphasengebundenen Peptiden wurden ca. 5 mg Harz im entsprechenden Puffer suspendiert und mit einer 1 mM Lösung des Indolylphosphates versetzt. Zur Untersuchung in Anwesenheit der Metallsalze wurde die Festphase vor der Zugabe des Indolylderivates mit einer 1 mM Lösung der entsprechenden Metallsalzlösung versetzt. Die Peptide Ac-L-His-β-Ala-L-His-NH-TG **42a** und Ac-L-His-L-His-NH-TG **43a** zeigten nur in Kombination mit Kupfer, Nickel und Zink eine Abnahme des Maximums des Phosphatesters, wobei die Aktivität des Tripeptids in allen Fällen höher war als die des Dipeptids. Auch die Peptide Ac-D-His-Ahx-L-His-NH-TG **44a** in Kombination mit Kupfer und Ac-L-Ser-β-Ala-L-Ser-NH-TG **45a** in Kombination mit Zink hydrolysierten die Spaltung des Esters. Vergleicht man die Histidin-Tripeptide untereinander, so ist Ac-D-His-Ahx-L-His-NH-TG **44a** etwas langsamer im Vergleich zu Ac-L-His-β-Ala-L-His-NH-TG **42a**. Das Peptid alleine hydrolysiert den Ester nur sehr langsam. Das negative Kontrollpeptid Ac-L-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NH-TG **46a** wurde ebenfalls auf mögliche Spaltung getestet und vermittelte in keinem der Fälle die Hydrolyse des Phosphatesters, was die Rolle als Bindungspeptid bestätigte. In der untenstehenden

Abbildung sind die wichtigsten Ergebnisse abgebildet, alle anderen befinden sich im Anhang (Abb. 39).

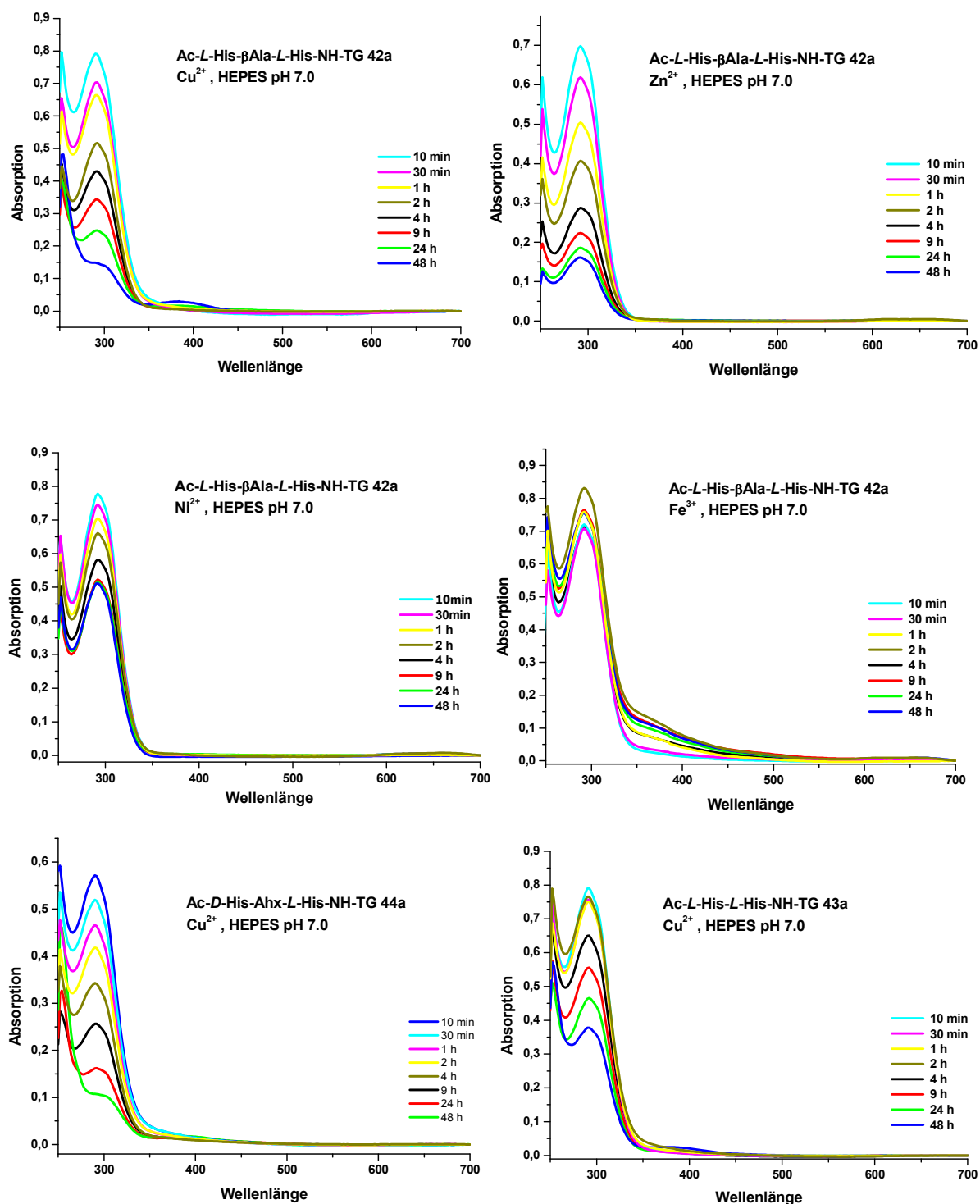


Abb. 39a: UV/vis Messungen mit verschiedenen Metallen zur Phosphatester-Hydrolyse.

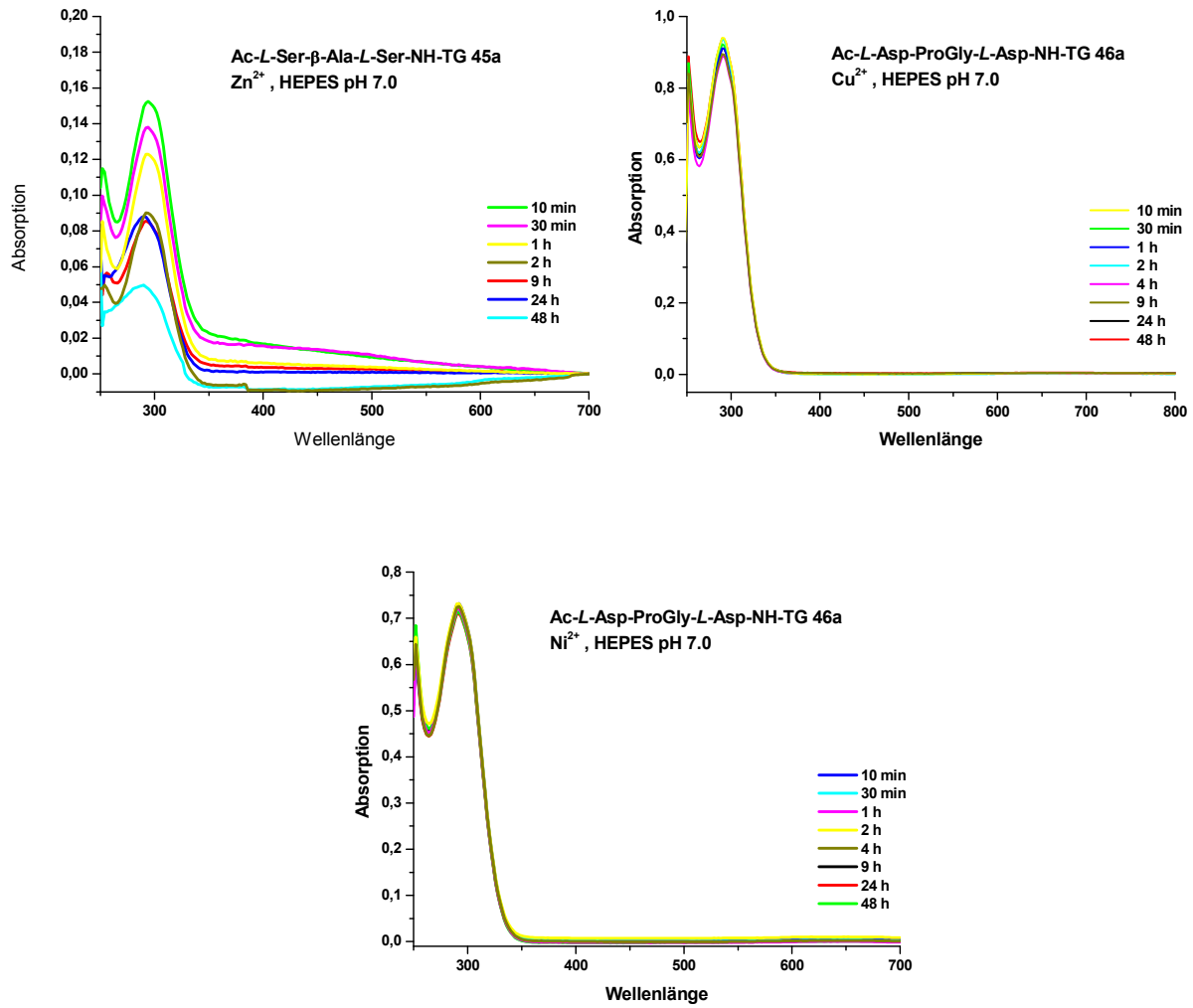


Abb. 39b: UV/vis Messungen mit verschiedenen Metallen zur Phosphatester-Hydrolyse.

Vergleicht man die Halbwertszeiten der Reaktionen (Absorptionsabnahme der Esterhydrolyse gegen Zeit), so kann eine Aussage über die relativen Reaktions-Geschwindigkeiten getroffen werden. In der untenstehenden Abbildung 40 sind drei repräsentative Ergebnisse aufgeführt, alle anderen befinden sich im Anhang.

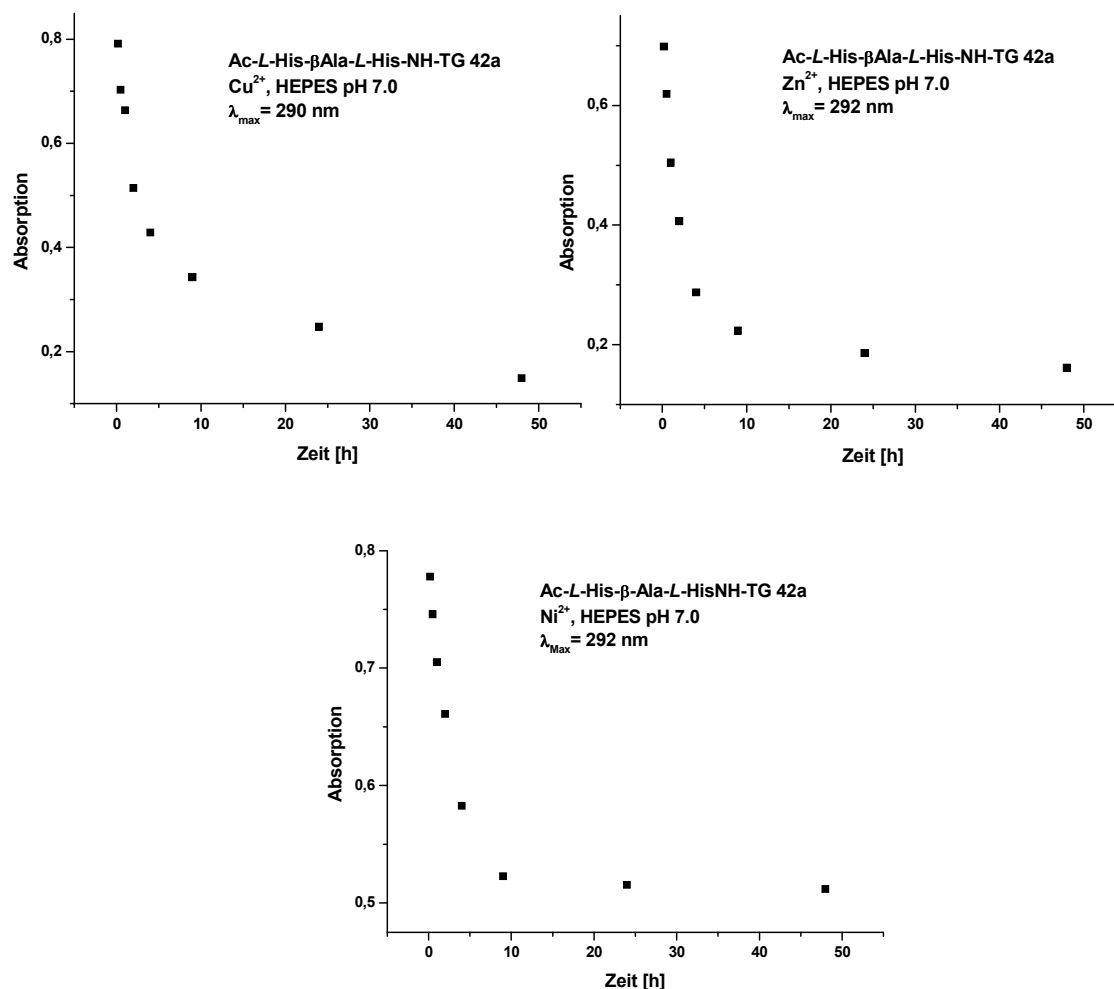


Abb. 40: Auftragung der Absorptionsabnahme gegen die Zeit.

Aus den Diagrammen lässt sich erkennen, dass die Hälfte des Phosphatesters durch das Peptid Ac-L-His-β-Ala-L-His-NHTG **42a** in Kombination mit Zink und Kupfer nach 4 Stunden hydrolysiert ist. Mit Nickel hingegen ist auch nach 48 Stunden noch immer nicht die Hälfte des Esters gespalten. Vergleicht man diese Resultate mit dem Dipeptid **43a**, so wird durch dieses Peptid der Ester wesentlich langsamer gespalten. Mit Zink wird nach 9 Stunden und mit Kupfer nach 48 Stunden die Hälfte des Esters gespalten, wohingegen mit Nickel in dem von uns gesetzten Zeitrahmen nur 1/3 des Esters gespalten werden konnte. Aus dem Vergleich der Tripeptide untereinander ergibt sich, dass durch Ac-L-His-β-Ala-L-His-NHTG **42a** in Kombination mit Kupfer nach 4 Stunden die Hälfte des Esters gespalten wird,

wohingegen durch Ac-D-His-Ahx-L-His-NH-TG **44a** erst innerhalb von 4 bis 9 Stunden die Hälfte gespalten ist.

Der Einfluß des Histidins in den Spaltexperimenten lässt sich anhand seiner hohen katalytischen Aktivität gegenüber Estern erklären.^[62] Es kann möglicherweise als Base wirken und erleichtert so der Hydroxylgruppe den Angriff am Phosphatester. Außerdem kann der Imidazolring zusätzlich π - π -Wechselwirkungen zu dem Indigoderivat ausbilden, was zum einen eine optimale Hydrolyseposition bereitstellen und zum anderen die Freisetzung des Spaltproduktes verhindern könnte.

Betrachtet man die Hydrolyse mit Hilfe von Metallsalzen, so bietet die Imidazoleinheit einen guten Liganden für die Metallionen. Ähnlich wie bei den aktiven Zentren der Enzyme könnte das Metall als Kofaktor die Hydroxygruppe aktivieren und somit die Hydrolyse des Esters unterstützen.

Es ist allerdings interessant, dass sich die Bindungs- und Spaltsequenzen unterscheiden. Im Falle von Eisen und Nickel wurden Aspartat-haltige Peptide für selektive Bindung gefunden werden, jedoch Histidin-haltige für die Spaltung. Um eine genauere Aussage über das Bindungs- und Spaltverhalten zu erhalten, müssten NMR-Studien durchgeführt werden. Durch eine so erhaltene Bindungskonstante könnte eine Korrelation zwischen Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität vermutet werden.

2.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden mit Hilfe der Standard Fmoc-Strategie zwei kodierte Peptidbibliotheken synthetisiert und zur Spaltung verschiedener Estersubstrate eingesetzt. Im Weiteren konnten die Bibliotheken für Spaltungsexperimente erfolgreich in Agarosegel eingebettet werden. Die Verfolgung der Esterspaltung in Agarose mittels pH-Änderung konnte nicht durchgeführt werden, da die aciden Peptid-Seitenketten zu einem Umschlag des pH-Indikators und damit zu roten Beads führten. Auch die Spaltung der Pyrenester stellte sich als schwierig heraus, da hier das Spaltprodukt selektiv an die Bibliothek bindet. Daher kann nicht bestimmt werden, ob das an das Substrat bindende Peptid auch das hydrolytisch aktive Peptid war. Außerdem wurde herausgefunden, dass schon mit nur einem festphasen-gebundenen Histidin die Spaltung des Pyrenesters gelingt, was die Bedeutung von Peptiden zur Spaltung sehr minimiert. Erhöht man die Anzahl der Histidine, so erfolgt die Spaltung der Pyrenester wesentlich schneller. Diese erhaltenen Resultate stellen die Anwendbarkeit der Assay-Methode und somit der literaturbekannten Substrate in Frage.^[28,30,31,65]

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für jedes weitere Estersubstrat zuerst die entsprechenden Kontrollexperimente auf mögliche Bindung durchgeführt, wobei herausgefunden wurde, dass auch *p*-Nitrophenol und der Cumarinalkohol selektiv an die Bibliothek binden, was die Spaltexperimente auch hier erschweren würde.

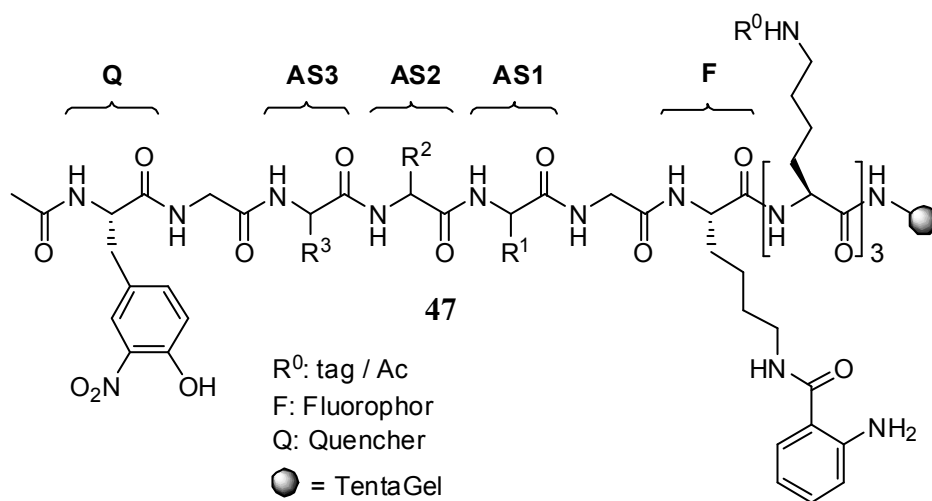
Das einzige literaturbekannte Substrat, was für unsere Zwecke genutzt werden konnte, war das Indolylderivat **31**, dessen Hydrolyse zu einem türkisen, wasserunlöslichen Produkt führte und sich auf den Beads mit hydrolytisch aktiven Peptiden niederschlug. Diese Experimente wurden mit und ohne Metallzugabe durchgeführt. Die selektive Metallkomplexierung durch einige Bibliothek-Mitglieder wurde bei beiden Bibliotheken beobachtet, jedoch war die Selektivität in allen Fällen bei der Tripeptidbibliothek höher als bei der Pentapeptidbibliothek. Bei Eisen konnte für die erste Position der Bibliothek eine Aspartat-Selektivität und für die dritte Position eine Histidin-Selektivität gefunden werden. Bei Nickel hingegen dominierte in beiden Positionen die Präferenz für Aspartat und bei Kupfer in beiden Positionen die Selektivität für Histidin. Für die Spaltung des Phosphatesters wurden genau diese Sequenzen erwartet, jedoch wurde in allen Experimenten Histidin-haltige Peptide selektiert. Zur Bestätigung der kombinatorischen Experimente wurden verschiedene Peptide nachsynthetisiert und die Hydrolyse des Phosphatesters mittels UV-Vis-Spektroskopie verfolgt. Die Abnahme konnte jedoch nur mit den festphasen-gebundenen Peptiden untersucht werden, da die Messungen in Lösung durch den entstehenden unlöslichen Indigo-Farbstoff gestört wurden. Im Fall von Kupfer sind die bindenden auch gleichzeitig die spaltenden Peptide, was durch die UV-Messungen bestätigt wurde. Auch in Anwesenheit von Nickel und Zink spalten die Peptide den Phosphatester. Das Aspartat-haltige Kontrollpeptid, welches im Bindungsexperiment von Nickel gefunden wurde, war nicht in der Lage, in Anwesenheit von Zink, Kupfer, Eisen und Nickel den Ester zu spalten, wodurch das kombinatorische Experiment bestätigt wurde. Die Peptide, welche Nickel und Eisen am stärksten binden, sind nicht notwendigerweise die aktivsten Peptide zur Hydrolyse des Phosphatesters, wohingegen sich im Fall von Kupfer genau dieses Bindungs-Spalt-Konzept bestätigt. Vergleicht man die relativen Reaktions-Geschwindigkeiten der Hydrolyse, so lässt sich festhalten, dass die Tripeptide mit Zink und Kupfer den Ester schneller spalten als mit Nickel.

Weiterhin wäre es interessant, wenn man die Reaktionsordnung der Spaltung in Bezug auf das verwendete Peptid-Metall-System bestimmen könnte, was durch die Variation der Konzentration der eingesetzten Edukte erreicht werden kann.

2.3 Radikalische und hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen

2.3.1 Radikalische Spaltungsexperimente auf fester Phase

Vor kurzem wurde in unserer Gruppe eine kodierte, Fluorophor-Quencher markierte Peptidbibliothek entwickelt, die zur Untersuchung selektiver Peptidschädigung unter Fenton Bedingungen benutzt wurde (Abb. 41).^[50]



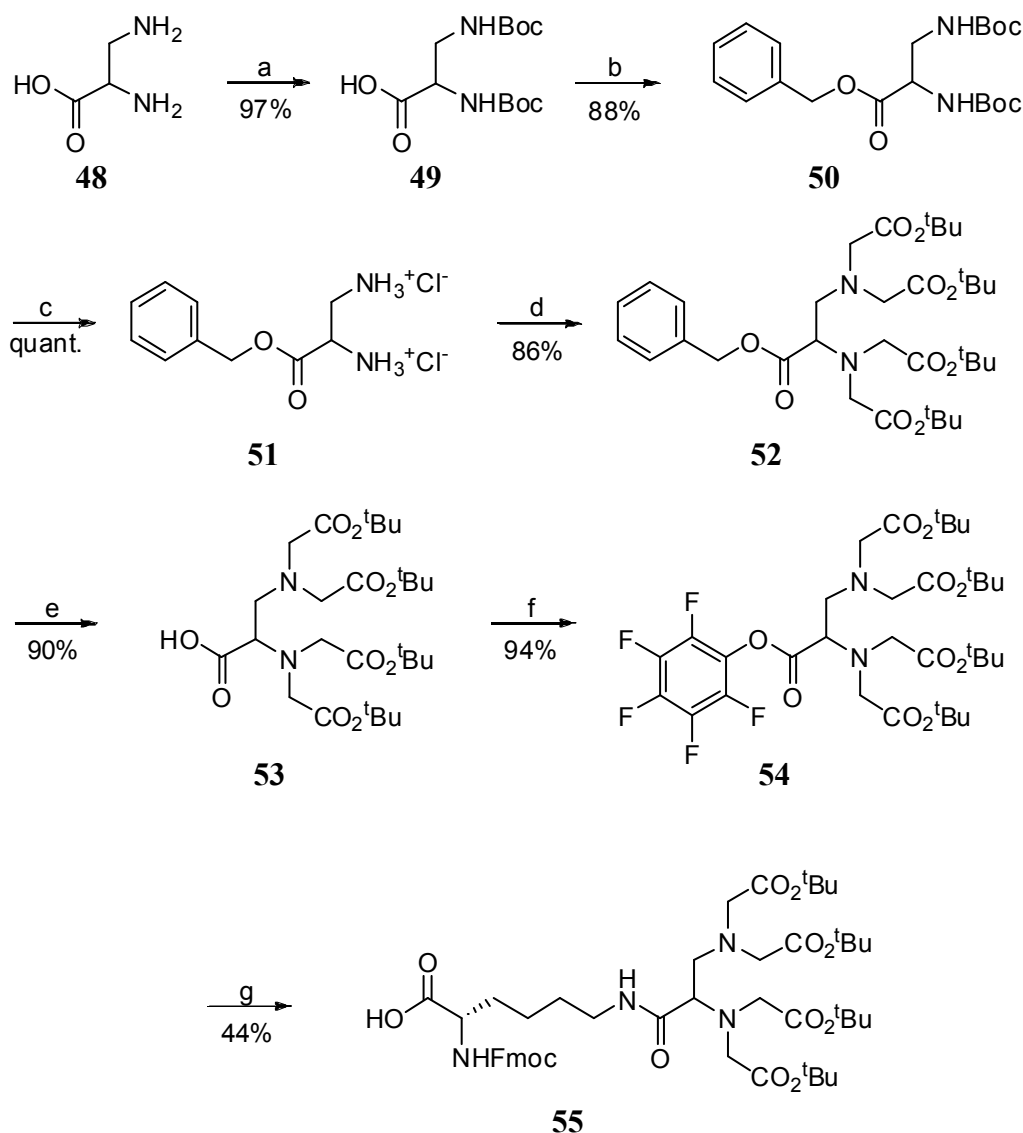
(AS1, AS2, AS3 = Gly, D/L-Ala, D/L-Leu, D/L-Val, D/L-Pro, D/L-Phe, D/L-Ser, D/L-Thr, D/L-Asn, D/L-Gln, D/L-His, D/L-Asp, D/L-Glu, D/L-Lys, D/L-Arg, D/L-Cys).

Abb. 41: Allgemeine Struktur der Fluorophor-Quencher-Bibliothek 47.

Die kombinatorischen Studien zeigten, dass säurehaltige Peptide unter Fenton Bedingungen eher gespalten werden als andere. Dies liegt daran, dass das Eisen-Ion dabei von den Carboxylaten komplexiert wird und somit die Freisetzung der Radikale in nächster Nachbarschaft zum Peptid-Grundgerüst erlaubt.^[50]

Auf Grund der Tatsache, dass die Säuregruppen für die Spaltung ausschlaggebend sind, entstand die Frage nach mehr Säurefunktionalitäten. Dazu wurde die Bibliothek anlehnend an die Arbeiten von MEARES^[47], SCHEPARTZ^[48] und FOX^[48a-c] mit dem Fmoc-Lysin-EDTA Derivat **55** funktionalisiert, welches leicht mittels Festphasenpeptidsynthese zugänglich ist (Schema 4).^[47] Die zweifach geschützte Boc-Diaminopropionsäure **49** wurde ausgehend von 2,3-Diaminopropionsäure **48** erhalten. Anschließende Veresterung mit Benzylalkohol lieferte

den Benzylester **50**, der dann mit Hilfe von HCl in Dioxan in das entsprechende HCl-Salz **51** überführt wurde. Nukleophile Substitution mit Bromessigsäureethylester lieferte Verbindung **52**, die dann mit Palladium auf Aktivkohle in die entsprechende Säure **53** überführt wurde. Der Aktivester **54** wurde mit Pentafluorphenol hergestellt und anschließend mit Fmoc-Lys-OH zum gewünschten EDTA-Derivat **55** umgesetzt (Schema 4).



(a) Boc_2O (3.9 eq), KHCO_3 (1.7 eq), *tert*-BuOH, RT, 12 h; (b) Benzylalkohol (1.05 eq), EDC (1.0 eq), DMAP (kat.), CH_2Cl_2 , RT, 12 h; (c) 4M HCl/Dioxan (10 eq), RT, 2 h; (d) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^t\text{Bu}$ (6.0 eq), $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (10 eq), MeCN, Rückfluß, 12 h; (e) Pd/C (10%), EtOAc/MeOH, 3 d, 3.5 bar H_2 ; (f) Pentafluorphenol (1.1 eq), EDC (1.5 eq), DMAP (kat.), CH_2Cl_2 , RT, 4 h; (g) Fmoc-Lysin-OH (1.0 eq), NMM (5.0 eq), DMF, RT, 5 h.

Schema. 4: Synthese des FmocLysin-EDTA Derivates **55**.

Die Bibliothek wurde anschließend mit Aminohexansäure und dem modifizierten Lysin funktionalisiert (Abb. 42).

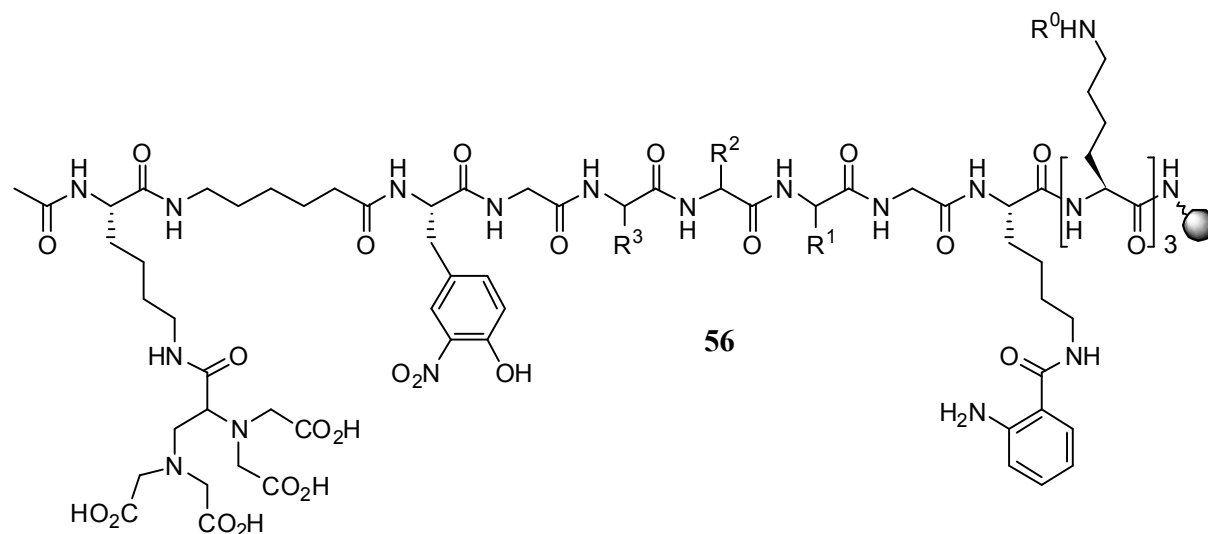
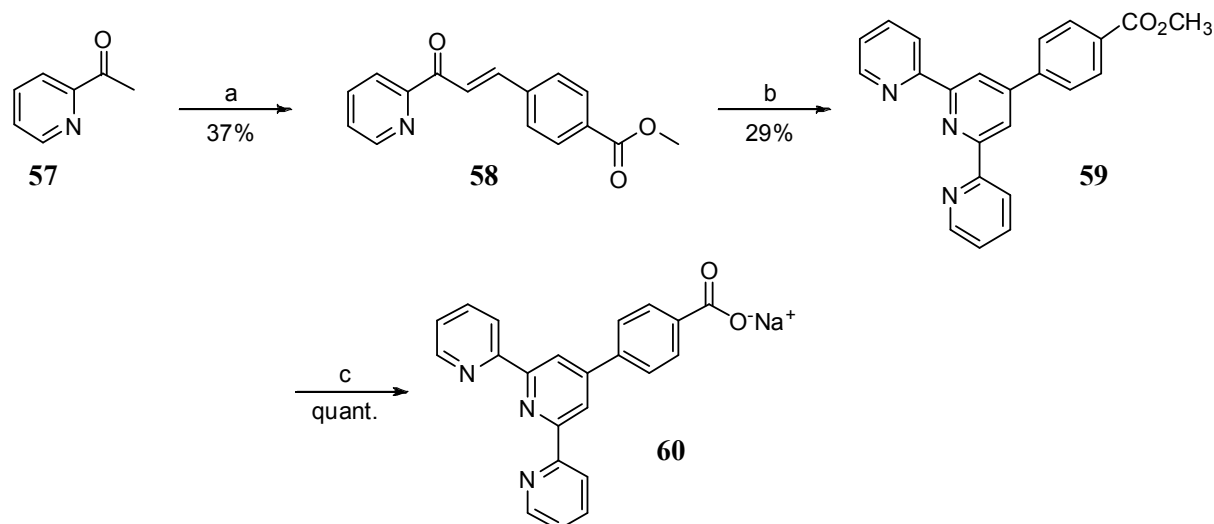


Abb. 42: Modifizierte Fluorophor-Quencher Bibliothek **56**.

Zuerst wurden Komplexierungsstudien mit FeCl_3 und NH_4SCN durchgeführt, wobei alle Beads rot gefärbt waren, was für die Komplexierung des Eisen-Ions durch das EDTA spricht. Im Gegensatz dazu waren bei der unfunktionalisierten Bibliothek die Beads selektiv rot gefärbt, da hier nur Aspartathaltige Peptide das Eisen-Ion komplexieren können. Nach erfolgreicher Eisenkomplexierung wurde nun der Überschuss gewaschen. Die Fentonreaktion wurde mit Ascorbat und H_2O_2 in MES Puffer (pH 5.0) für 15 min eingeleitet.^[50] Nach der Reaktion wurde die Bibliothek basisch gewaschen, da dabei der Kontrast zwischen fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Beads am besten zur Geltung kommt, jedoch konnten bei diesen Experimenten keine fluoreszierenden Beads beobachtet werden. Die Reaktion wurde auch mit Kupfer versucht, jedoch konnten auch hier keine fluoreszierenden Beads beobachtet werden.

Daraufhin wurden die Experimente mit der unfunktionalisierten Bibliothek und EDTA bzw. Terpyridin **60** in Lösung durchgeführt. Terpyridin ist wie EDTA ein vielfach verwendeter Chelatligand, der mit vielen Übergangsmetallen stabile Komplexe bildet^[66] und sollte daher ebenfalls getestet werden. Die Synthese von Terpyridin beginnt mit Acetylpyridin **57**, welches mit Methyl-4-formylbenzoat zur α,β -ungesättigten Carbonylverbindung **58** umgesetzt wird. Reaktion mit PPI liefert den Terpyridin Methylester **59**, der anschließend mit NaOH gespalten wird, um das Terpyridin-Natriumsalz **61** zu erhalten (Schema 5).

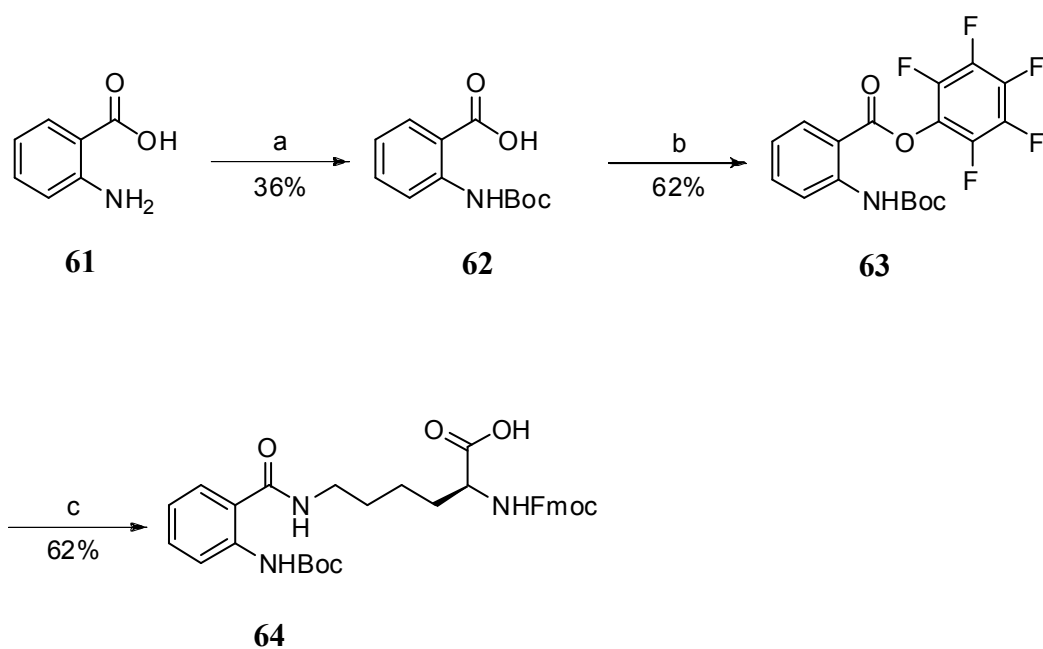


(a) Methyl-4-formylbenzoat (1.0 eq), HNEt₂ (2.4 eq), EtOH, RT, 7 h; (b) PPI (1.0 eq), NH₄OAc (42 eq), EtOH, Rückfluß, 3 h; (c) NaOH (1.0 eq), Aceton, RT, 16 h.

Schema 5: Synthese von Terpyridin **60**.

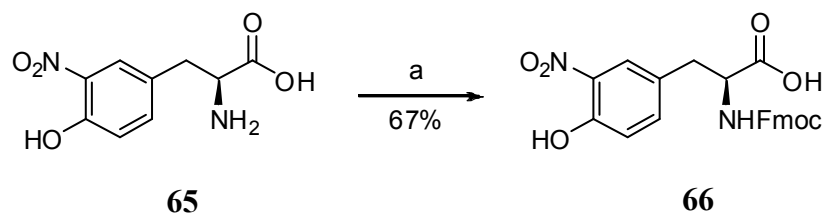
EDTA und Terpyridin wurden für die Experimente sowohl mit Fe³⁺ als auch mit Cu²⁺ in MES- und HEPES-Puffer (1:1) gemischt. Die Bibliothek wurde in MES- und HEPES-Puffer suspendiert, dann jeweils mit den Mischungen versetzt und anschließend die Fenton-Reaktion eingeleitet. Aber auch hier konnten keine fluoreszierenden Beads erhalten werden.

Da die Versuche mit der Bibliothek nicht zum gewünschten Ergebnis führten, wurde nur ein einziges Peptid auf fester Phase synthetisiert, was ebenfalls mit einem Fluorophor-Quencher-System und Fmoc-Lysin-EDTA **55** oder Terpyridin **60** funktionalisiert ist. Das Peptid sollte auch nicht aus säurereichen Seitenketten bestehen, so dass die Eisenkomplexierung nur durch EDTA gegeben ist. Als Referenzpeptid wurde die gleiche Peptidsequenz synthetisiert, um zu zeigen, dass ohne EDTA bzw. Terpyridin keine Komplexierung und somit auch keine Spaltung erfolgen kann. Bevor die Peptide synthetisiert werden konnten, wurden zuerst Fluorophor **64** (Schema 6) und Quencher **66** synthetisiert (Schema 7).



(a) NEt_3 (1.5 eq), Boc_2O (1.25 eq), DMF, RT, 24 h; (b) Pentafluorophenol (1.05 eq), EDC (1.5 eq), CH_2Cl_2 , RT, 24 h; (c) *i*: Fmoc-Lysin(Boc)-OH, TFA/DCM, RT, 1 h, *ii*: NMM (10 eq), RT, 2 h.

Schema 6: Synthese des Fluorophors **64**.



(a) FmocCl (1.1 eq), Dioxan, RT, 4 h.

Schema 7: Synthese des Quenchers **66**.

Die Peptide **67-70** wurden mittels Standard Fmoc-Synthese auf TentaGel-Harz synthetisiert (Abb. 43).

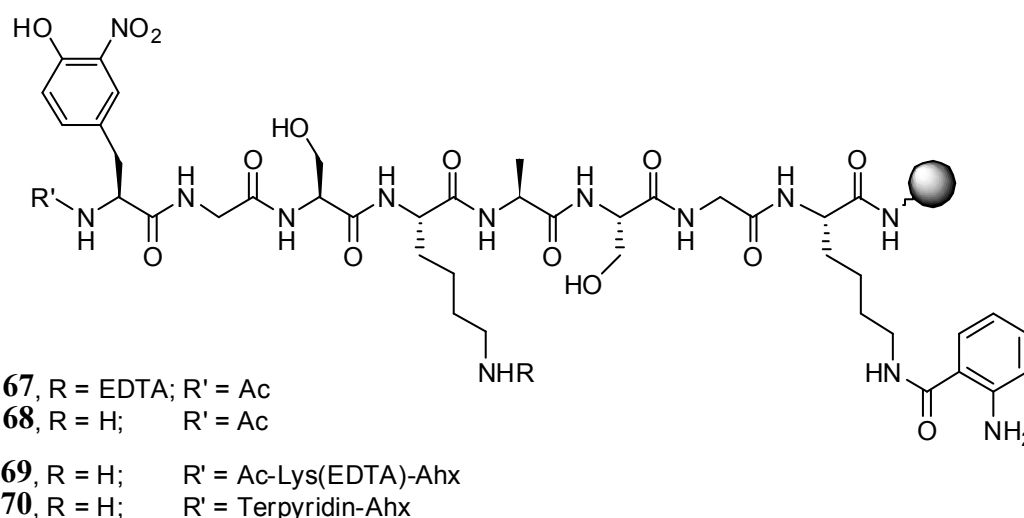


Abb. 43: Fluorophor-Quencher-Peptide **67-70** auf TentaGel.

Die Peptide wurden mit verschiedenen FeCl_3 und CuCl_2 Konzentrationen versetzt. Der Überschub wurde gewaschen und die Komplexbildung des Eisens mittels NH_4SCN überprüft. Alle Beads waren rot gefärbt, was auf die erfolgreiche Komplexbildung des Eisens hindeutet. Mit Kupfer waren die Beads auch ohne Zugabe eines Nachweisreagenzes grünlich gefärbt, was als erfolgreiche Komplexbildung gedeutet wurde. Das Terpyridin-Peptid **70** ist vor der Eisenkomplexbildung leicht violett gefärbt und wird durch dessen Zugabe intensiver violett. Anschließend wurde die Fenton-Reaktion in verschiedenen Puffern und mit verschiedenen Konzentrationen an Ascorbat und H_2O_2 eingeleitet (s. Protokolle). Bedauerlicherweise konnten mit allen Peptiden keine fluoreszierenden Beads isoliert werden. Auch Variationen in der Zeit und verschiedene Temperaturen führten nicht zum gewünschten Ergebnis.

Sowohl die Versuche mit der Bibliothek als auch mit den Einzelpeptiden auf fester Phase führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Ein Grund dafür könnte in der hohen Affinität der Chelatliganden zu den Metallen liegen ($\text{pK} = 25.1$ (EDTA-Fe^{3+}), $\text{pK} = 16.5$ (EDTA-Fe^{2+}), $\text{pK} = 20.4$ ($\text{Terpyridin-Fe}^{2+}$)).^[67,68] Wenn die Liganden das Metall zu fest binden, könnte die Generierung der freien Radikale durch Ascorbat und H_2O_2 verhindert werden, was somit auch eine Spaltung verhindern würde. Außerdem wäre es möglich, dass die Reaktion so heftig ist, dass das komplette Peptid (inklusive Fluorophor) vom Harz abgespalten wird. Um zu

überprüfen, ob der Fluorophor zerstört wird, wurde ein Kontrollpeptid synthetisiert, das nur einen Fluorophor und Lysin-EDTA trägt (Abb. 44).

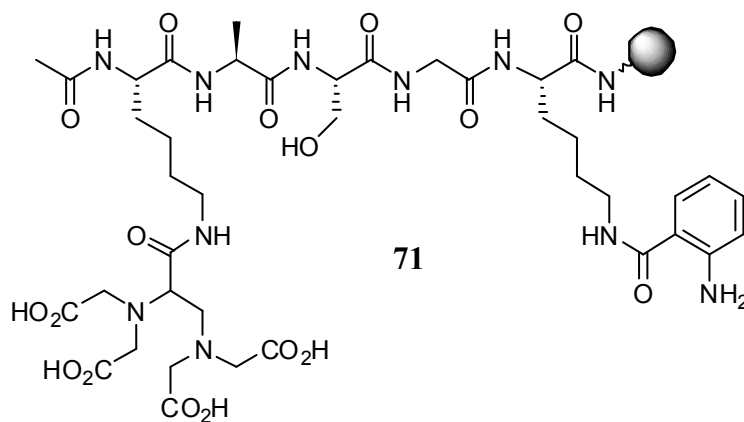


Abb. 44: Referenzpeptid 71.

Dieses Peptid wurde unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Peptide behandelt und zeigte auch nach 15 minütiger Behandlung mit Ascorbat und H_2O_2 immer noch fluoreszierende Beads. Damit hat sich unsere Vermutung der vollständigen Spaltung des Peptids nicht bestätigt und es liegt wohl eher an der hohen Stabilitätskonstante der Metallionen zu den Liganden.

2.3.2 Radikalische Spaltungsversuche in Lösung

Da alle Versuche auf fester Phase keine Peptidspaltung anzeigten, wurden die Peptide in Lösungsexperimenten getestet. Dazu wurden sowohl das EDTA-Peptid **3** als auch das Lysin-Referenz-Peptid **72** auf Rink Amid Harz synthetisiert und mit Hilfe von TFA in CH_2Cl_2 vom jeweiligen Harz abgespalten (Abb 45).

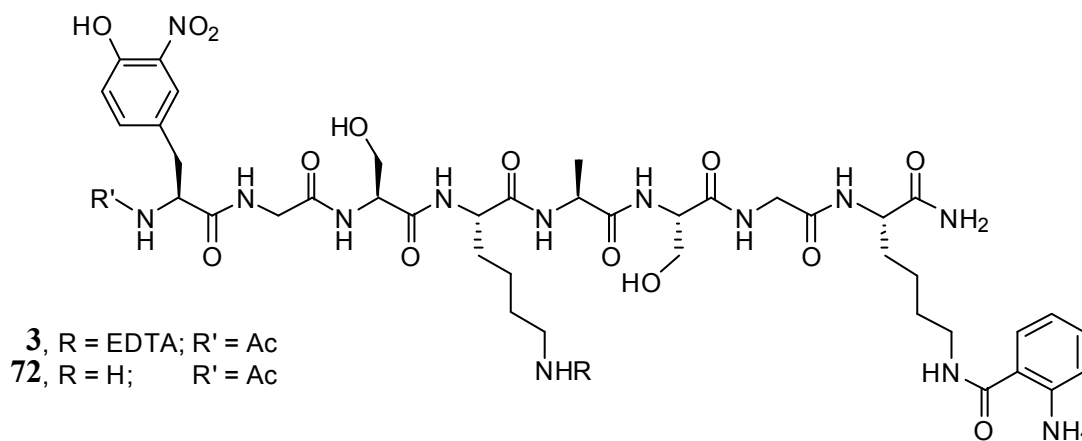


Abb. 45: EDTA- und Lysin-Peptid.

Peptid-Lösungen wurden mit einer equimolaren Lösung an FeSO_4 versetzt und mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 gemischt (s. Protokolle). Nach 15 min wurde die Reaktion mit MnO_2 gequencht, so dass die Mischung problemlos in die HPLC injiziert werden konnte. Ab einer Konzentration von 2 mM H_2O_2 erkennt man, dass beide Peptide gespalten werden. Jedoch entstehen bei dieser Spaltung keine definierten Peaks, die isoliert werden konnten, um die Spaltprodukte zu identifizieren. Daß in diesem Fall auch das Referenz-Peptid gespalten wird, ist nicht verwunderlich, da das freie Fe^{2+} mit H_2O_2 in jedem Fall Radikale erzeugt und so das Peptid spaltet (s. Anhang).

Da die Versuche mit Fe^{2+} nicht die gewünschten Ergebnisse lieferten, wurden die Experimente mit FeCl_3 durchgeführt. EDTA hat eine höhere Affinität zu Fe^{3+} im Vergleich zu Fe^{2+} , was demzufolge durch das verlagerte Gleichgewicht in Richtung des Metallkomplexes die Reaktion erleichtern könnte. Zur Reduktion von Eisen wurde Ascorbat benutzt, was allerdings nach beendeter Reaktion nicht gequencht werden kann und somit ein Problem für die HPLC-Säule darstellen könnte. Nach der Fenton-Reaktion mit 10 mM Ascorbat und 10 mM H_2O_2 erkennt man mit dem EDTA-Peptid **3** noch ein Rest-Peptid. Die Spaltung ist im Vergleich zu Fe^{2+} nicht ganz so stark, aber es entstehen keine neuen Verbindungen, die

isoliert werden können. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Fe^{2+} wird das Referenzpeptid nur leicht angegriffen. Dies bedeutet zum einen, dass die Komplexierung des Eisen-Ions durch EDTA bei Fe^{3+} eine Rolle spielt und zum anderen, dass die Reaktion mit zusätzlichem Ascorbat etwas milder verläuft (s. Anhang).

2.3.3 Hydrolytische Spaltungsexperimente auf fester Phase

Da die radikalische Spaltung nur mit der Bibliothek alleine und nicht mit zusätzlichem Chelatliganden funktionierte, wurde eine mildere Methode zur Peptidspaltung untersucht. BURSTYN und Mitarbeiter zeigten, dass Cu(II)-Triazacyclononan-Komplexe als künstliche Peptidasen wirken, ohne dass zusätzliche Reagenzien wie H_2O_2 oder Ascorbat zum Einsatz kommen.^[40] Die Hydrolyse basiert hierbei auf der Aktivierung von H_2O durch den Metallkomplex, der dann eine aktive Hydroxygruppe generiert, die die Carbonylgruppe nukleophil angreift und somit die Amidbindung spaltet. In einer Zusammenarbeit mit JUDITH BURSTYN wurden ihre Komplexe mit unserer Peptidbibliothek getestet (Abb. 46). Desweiteren wurde auch Cyclen **73** auf seine Spaltaktivität getestet, das bisher in erster Linie zur Spaltung von Phosphatestern eingesetzt wurde.^[35-39]

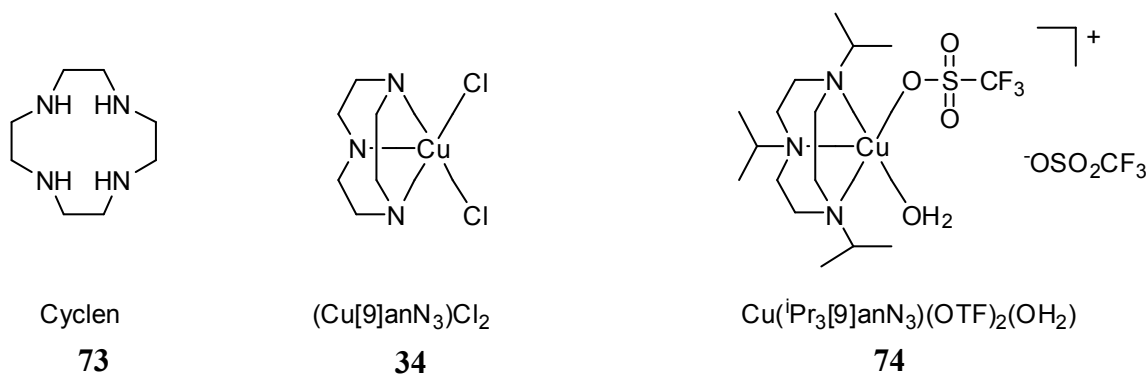


Abb. 46a: Kupferkomplexe zur Ester- und Amidhydrolyse.

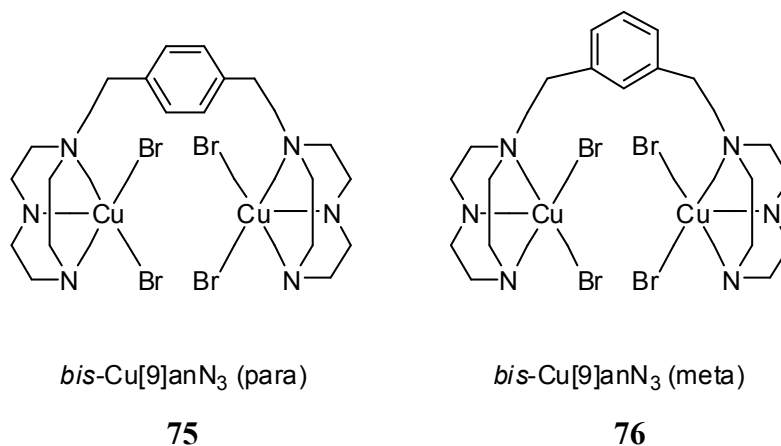


Abb. 46b: Kupferkomplexe zur Ester- und Amidhydrolyse.

Alle Experimente wurden in verschiedenen Puffern und bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, jedoch führte keiner der Versuche zum gewünschten Ergebnis (s. allgemeine Vorschrift im Exp. Teil).

2.3.4 Proteolytische Peptidrezeptoren

Die in der Wennemers-Gruppe entwickelte Klasse der zweiarmigen Diketopiperazin-Rezeptoren^[69] wurde verwendet, um Tripeptide in wässrigen Lösungen selektiv zu erkennen. Aufgrund ihrer Eigenschaft könnten sie als „Peptid-erkennende“ Modell-Proteasen verwendet werden. Zur Untersuchung dieser Idee wurde ein Chelatligand kovalent an die peptidischen Rezeptorarme gebunden, der nach Komplexierung mit einem Metall die proteolytische Einheit darstellen sollte. Der Rezeptor an sich sollte derart aufgebaut sein, dass sein Bindungsverhalten gegenüber bestimmten Peptiden schon bekannt ist, wie z.B. beim wasserlöslichen Diketopiperazin-Rezeptor **7**, der eine hohe Selektivität für Arg-reiche Peptide zeigte (Abb. 47).^[70]

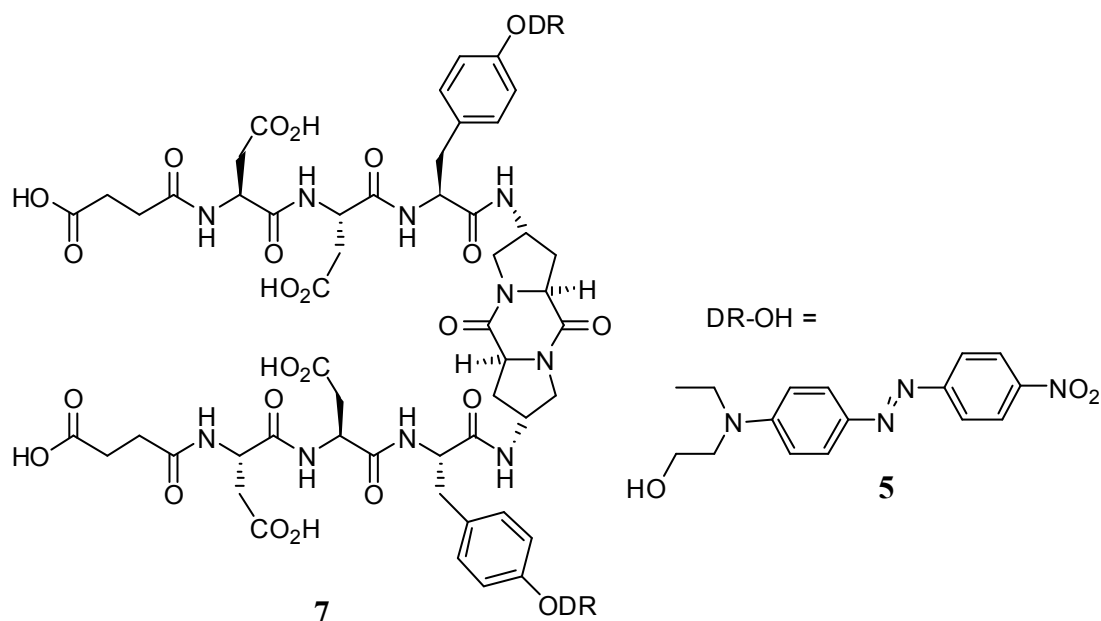


Abb. 47: Struktur des wasserlöslichen Rezeptors 7.

Dieser Rezeptor ist mit Bernsteinsäure funktionalisiert, die jedoch keinen guten Chelatliganden darstellt. Für unsere Experimente wurde daher ein Rezeptor synthetisiert, der am Ende EDTA **53** als Chelatliganden trägt und somit in der Lage ist, sowohl Fe^{3+} , Fe^{2+} als auch Cu^{2+} mit hoher Affinität zu binden (Abb. 48).

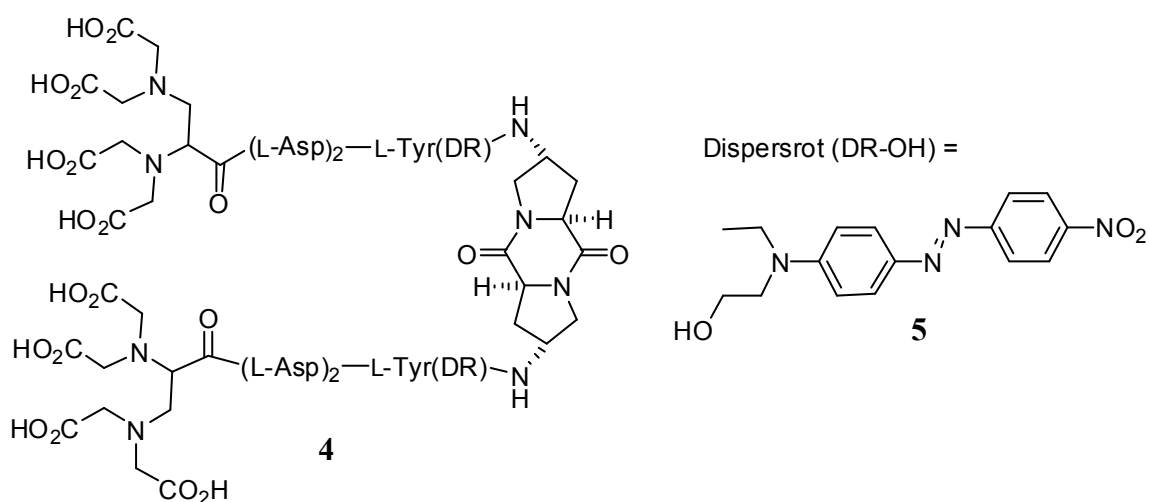
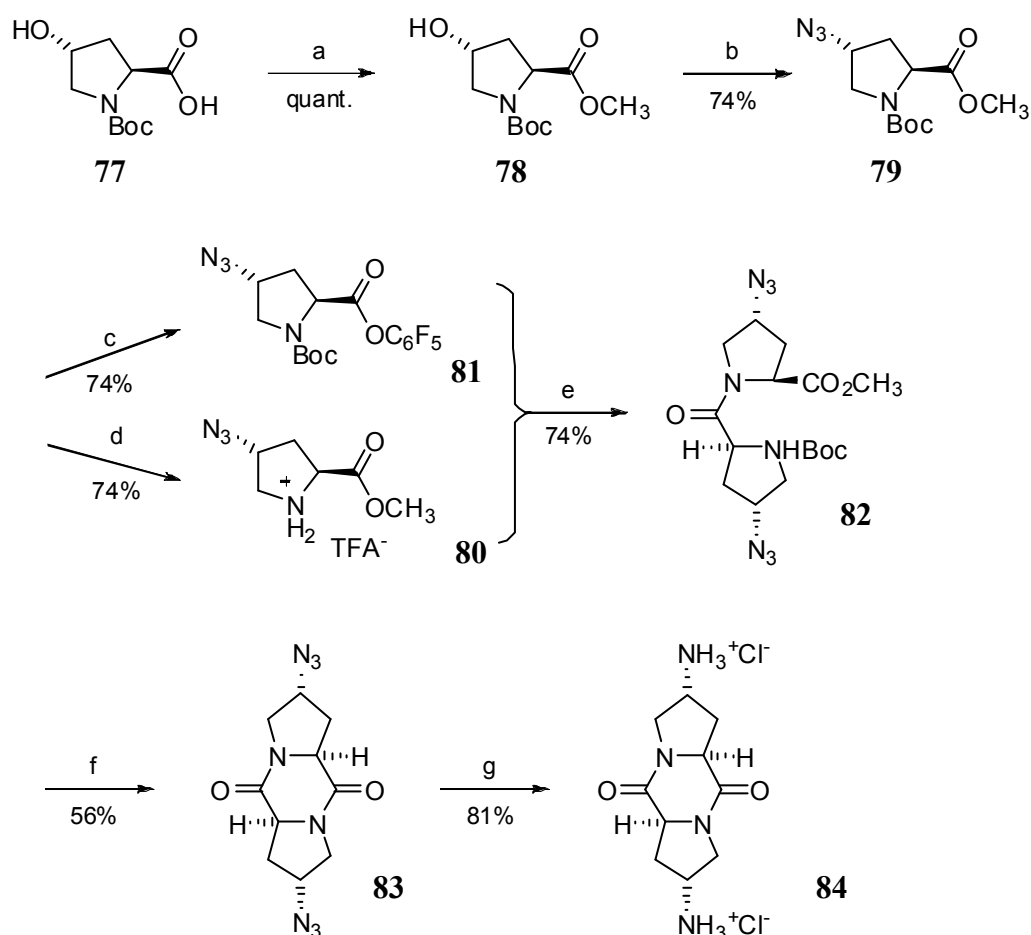


Abb. 48: Proteolytischer Rezeptor 4.

Würde man nun ein Argininreiches Peptid binden, könnte man mit Hilfe des Metallkomplexes das Peptid gleichzeitig spalten. Die Synthese des Rezeptors geht von *N*-Boc-Hydroxyprolin **77** aus, das zum Methylester **78** und anschließend die γ -Position mit einer Mitsunobu-

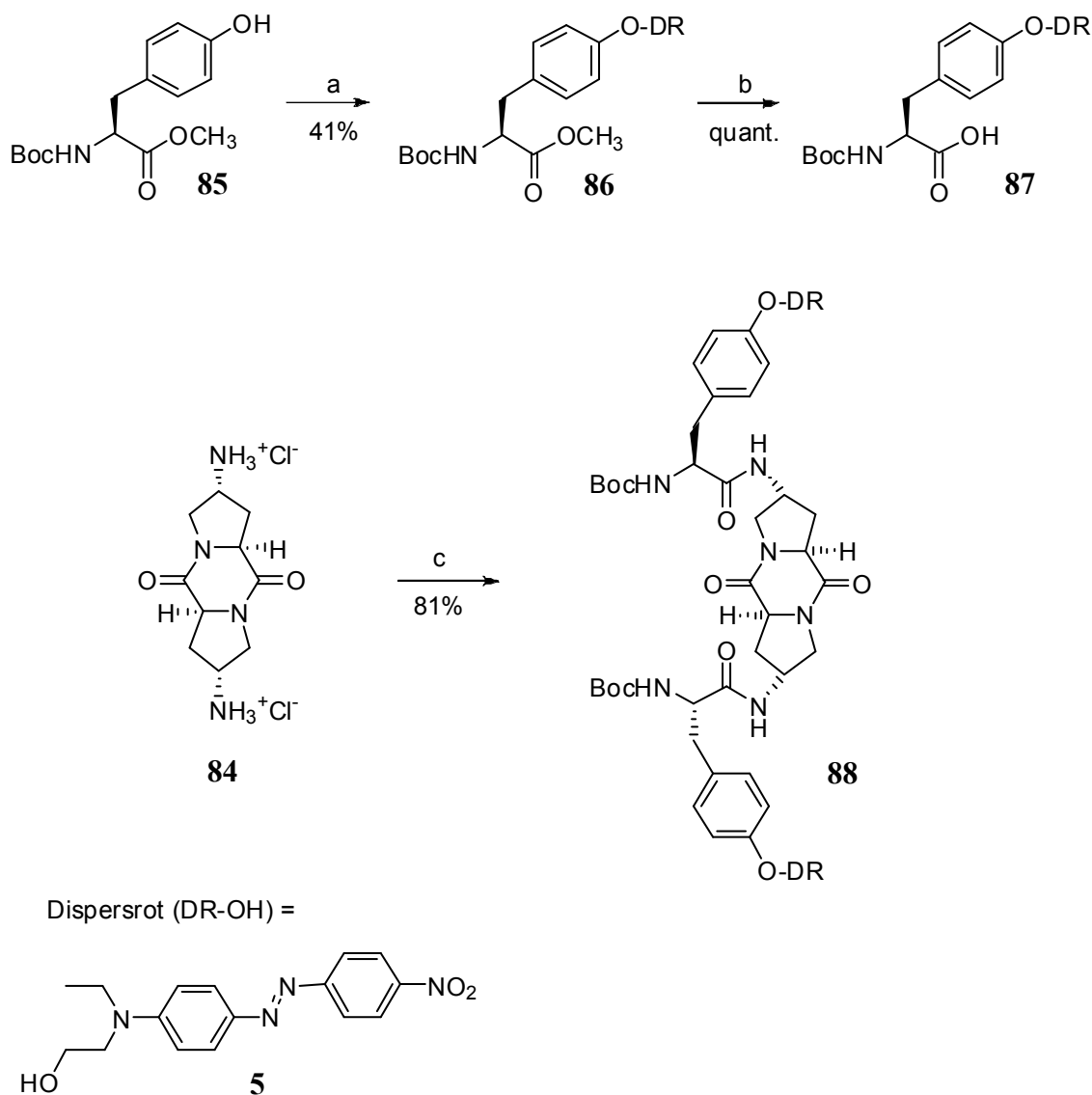
Reaktion unter Retention der Konfiguration zum Azid **79** umgesetzt wurde. Von einer Hälfte des Azids wurde die Aminogruppe mittels TFA entschützt **80**, von der anderen wurde der Methylester verseift und nachfolgend die Carbonsäure mit Pentafluorphenol zum Aktivester **81** umgesetzt. Die Kupplung beider Verbindungen lieferte das Dipeptid **82**, das anschließend mit TFA *N*-Terminal entschützt wurde und in Gegenwart von Hünig-Base zum Diketopiperazin **83** zyklisiert wurde. Die Reduktion der Azide mit Palladium auf Aktivkohle in Gegenwart von 12 M HCl lieferte das gewünschte Diketopiperazin-HCl-Salz **84** (Schema 8).



(a) *i*: Cs₂CO₃ (0.55 eq), MeOH, H₂O, RT, 1 h; *ii*: MeI (2.0 eq), DMF, RT, 1.5 h; (b) *i*: Methansulfonsäure (1.2 eq), Et₃N (0.4 eq), PPh₃ (1.8 eq), DIAD (1.0 eq), Toluol, 70 °C, 3 h; *ii*: NaN₃ (4.8 eq), DMF, 80 °C, 16 h; (c) C₆F₅OH (1.0 eq), EDC (1.5 eq), CH₂Cl₂, RT, 2 h; (d) TFA/CH₂Cl₂ (1:3), RT, 2 h; (e) ⁱPr₂NEt (3.5 eq), CH₂Cl₂, RT, 24 h; (f) *i*: TFA/CH₂Cl₂ (1:3), RT, 1.5 h; *ii*: ⁱPr₂NEt (2.0 eq), CH₂Cl₂, RT, 48 h; (g) Pd/C (10%), HCl (1.0 eq), H₂, MeOH, RT, 18 h.

Schema 8: Syntheschema des Diketopiperazin Grundgerüsts **84**.

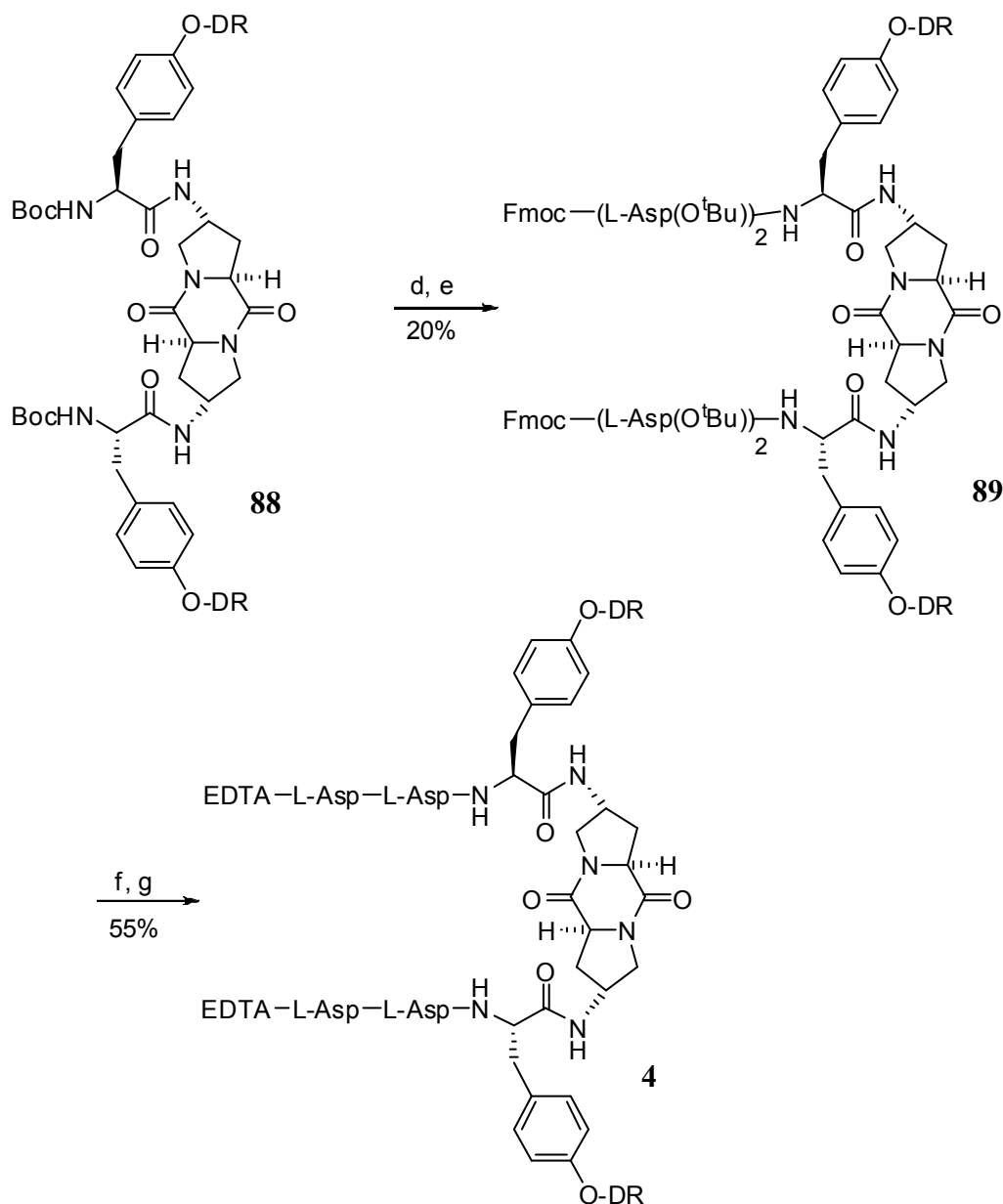
Zum Aufbau der Rezeptorarme wurden die Amine **84** zuerst mit Boc-L-Tyr(DR)-OH **87** funktionalisiert, das durch Mitsunobu-Reaktion von Verbindung **85** mit Dispersrot **5** und anschließender Verseifung des Methylesters **86** erhalten wurde (Schema 9).



(a) Dispersrot **5** (1.0 eq), PPh₃ (1.0 eq), DIAD (1.3 eq), Toluol, RT, 12 h; (b) **87**, NaOH (1.8 eq), MeOH, H₂O, RT, 12 h; (c) *N*-Boc-L-Tyr(DR)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ⁱPr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1h.

Schema 9: Synthese des funktionalisierten Amins **88**.

Die beiden weiteren Kupplungen von Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH erfolgten mit HCTU als Kupplungsreagenz und Tris-(2-aminoethyl) Amin (TAEA) bzw. Et₂NH für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurden beide *N*-Termini mit EDTA **53** mittels HCTU als Kupplungsreagenz funktionalisiert. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit TFA in CH₂Cl₂ und lieferte den gewünschten Rezeptor **4** (Schema 10).



(**d**) *i*: 4 M HCl/Dioxan, MeOH, RT, 1h; *ii*: Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ⁱPr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1h; (**e**) *i*: DEA (30 eq), DMF, RT, 1h; *ii*: Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ⁱPr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1h; (**f**) EDTA **54** (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ⁱPr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1.5 h; (**g**) TFA/ CH₂Cl₂ (1:1), RT, 1 h.

Schema 10: Synthese des proteolytischen Rezeptors **4**.

Kombinatorische Bindungsstudien des farbstoffmarkierten wasserlöslichen Rezeptors **7** zeigten eine hohe Selektivität für Arginin-reiche Peptide.^[70] Nun wurde der EDTA-Rezeptor **4** bei pH 5.0 (MES), pH 7.2 (TRIS) und pH 8.5 (TRIS) equimolar mit Fe^{3+} inkubiert und ebenfalls gegen die Fluorophor-Quencher-Bibliothek getestet, wobei auch hier in den Experimenten bei pH 7.2 und pH 8.5 selektiv rote Beads gefunden wurden. Wie schon bei Philipp Krattiger^[70], konnte auch bei diesen Versuchen festgestellt werden, dass die rote Farbe bei höherem pH-Wert intensiver ist. Aus dem Versuch bei pH 8.5 mit Fe^{3+} wurden einige Beads isoliert und die Analyse zeigte auch hier eine gewisse Selektivität für Arginine. Nach waschen der Beads mit TRIS-Puffer wurde die Fenton-Reaktion mit Ascorbat und H_2O_2 eingeleitet, um zu testen, ob die gebundenen Peptide auch diejenigen sind, die gespalten werden. Bedauerlicherweise konnten keine fluoreszierenden Beads beobachtet werden.

2.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In unserer Gruppe wurde eine kodierte Fluorophor-Quencher-Bibliothek entwickelt, welche zur Untersuchung selektiver Peptidschädigung durch die Fenton-Reaktion benutzt wurde.^[50] Die Funktionalisierung der Bibliothek mit einem literaturbekannten hydrolytisch aktiven Metallkomplex Fmoc-Lysin(EDTA)-OH erfolgte problemlos. Die Anwendung der Fenton-Reaktion zeigte jedoch unter verschiedenen Bedingungen keine Peptidspaltung. Auch Versuche mit der Bibliothek und EDTA oder Terpyridin in Lösung führten nicht zum gewünschten Ergebnis.

Die Übertragung auf ein einzelnes festphasengebundenes Peptid führte mit den hydrolytisch aktiven Metallkomplexen (EDTA, Cyclen, Triazacyclononan und Derivate) weder unter radikalischen noch hydrolytischen Bedingungen zum gewünschten Ergebnis. Einzig in Lösung konnte eine Spaltung beobachtet werden, bei der jedoch keine definierten Verbindungen identifiziert werden konnten.

Weiterhin wurde ein, mit einem proteolytisch aktiven Metallkomplex funktionalisierter Rezeptor erfolgreich synthetisiert, der Arginin-haltige Peptide in wässrigem Medium erkennt. Dieser wurde mit der erwähnten Fluorophor-Quencher-Bibliothek getestet und mit den Fenton-Bedingungen behandelt. Jedoch konnten die gebundenen Peptide nicht gespalten werden.

Als Ausblick könnte der Rezeptor mit Peptiden in Lösung getestet werden, indem man Peptide synthetisiert, die auf jeden Fall gebunden werden. Leitet man die Spaltung ein, so sollte im Idealfall nur das gebundene Peptid auch gespalten werden. Ein weiterer Ansatz wäre

auch die Funktionalisierung des Rezeptors mit einem hydrolytisch aktiven Liganden, wie Cyclen oder Triazacyclononan, so dass die Spaltung unter milderer Bedingungen durchgeführt werden kann.

2.4 Literaturverzeichnis

- [1] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Auflage, 1999, Spektrum Verlag Heidelberg.
- [2] Overview of actual research on peptidases, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4430.
- [3] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.
- [4] D. M. Blow, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 145.
- [5] F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459.
- [6] B. M. Dunn, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4431.
- [7] J. Woessner, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2145.
- [8] S. Benjamin, A. Pandey, *Yeast* **1998**, *14(12)*, 1069.
- [9] T. Hunter, *Cell* **1995**, *80*, 225.
- [10] R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239.
- [11] E. C. Niederhoffer, J. H. Timmons, A. E. Martell, *Chem. Rev.* **1984**, *84*, 137.
- [12] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563.
- [13] H.-C. Liang, M. Dahan, K. D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 168.
- [14] a) R. K. Thauer, *Science* **2001**, *293*, 1264-1265; b) B. Zerner, *Bioorg. Chem.* **1991**, *19*, 116; c) U. Ermler, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 749.
- [15] B. L. Vallee, D. S. Auld, *Biochemistry* **1990**, *29(24)*, 5647.
- [16] W. N. Lipscomb, N. Sträter, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2375.
- [17] B. L. Vallee, D. S. Auld, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 543.
- [18] J. Coleman, *Curr. Op. Chem. Bio.* **1998**, *2*, 222.
- [19] a) J. H. Kim, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9792; b) J. Suh, N. Kim, H. S. Cho, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1889; c) M. Yashiro, A. Ishikubo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1793; d) K. G. Raganathan, H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1314; *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1219; e) N. H. Williams, J. Chin, *Chem. Commun.* **1996**, 131; f) N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158; *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2024; g) M. Komiyama, Y. Matsumoto, H. Zakahashi, T. Shiiba, H. Tsuzuki, H. Yajima, M. Yashiro, J. Sumaoka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 691.
- [20] a) J. R. Morrow, L. A. Buttrey, V. M. Shelton, K. A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1903; b) Y. Matsumoto, M. Komiyama, *Nucleic Acid Symp. Ser.* **1992**, *27*, 33; c) J. Sumaoka, S. Miyama, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **1994**, *15*, 1755; d) R. A. Moss, B. D. Park, P. Scrimin, G. Ghirlanda, *Chem. Commun.* **1995**, *16*, 1627; e) J. Rammo, R. Hettich, A. Roigk, H.-J. Schneider, *Chem. Commun.* **1996**, *1*, 105; f) J.

- Sumaoka, Y. Azuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 205; g) J. Kamitani, J. Sumaoka, H. Asanuma, M. Komiyami, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1998**, 523.
- [21] a) E. Stulz, C. Leumann, *Chem. Commun.* **1999**, 239; b) E. Stulz, H. B. Bürgi, C. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 523; c) R. A. Moss, J. Zhang, K. G. Ragnathan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1529; d) R. Ott, R. Krämer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2064.
- [22] Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hiseada, O. Hayashida, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721.
- [23] K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, *Science* **1990**, *248*, 1544.
- [24] E. R. Jarvo, S. J. Miller, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2481.
- [25] A. Berkessel, *Curr. Opp. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 409.
- [26] H. De Muynck, A. Madder, N. Farcy, P. J. De Clercq, M. N. Perez-Payan, L. M. Öhberg, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 145.
- [27] A. Madder, L. Li, H. De Muynck, N. Farcy, D. Van Haver, F. Fant, G. Vanhoenacker, P. Sandra, A. P. Davis, P. J. De Clercq, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 552.
- [28] M. Müller, T. W. Mathers, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3813.
- [29] R. F. Harris, A. J. Nation, G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11270.
- [30] A. Esposito, E. Delort, D. Lagnoux, F. Djojo, J.-L. Reymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1381.
- [31] a) C. Ducoat-Casassus, T. Darbre, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(25), 7817; b) S. Javor, E. Delort, T. Darbre, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(43), 13239.
- [32] P. Hendry, A. M. Sargeson, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, *38*, 201.
- [33] A. Berkessel, D. A. Herault, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 102.
- [34] F. Namuswe, D. P. Goldberg, *Chem. Commun.* **2006**, 2326.
- [35] C. Sissi, P. Rossi, F. Felluga, F. Formaggio, M. Palumbo, P. Tecilla, C. Toniolo, P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3169.
- [36] A. Scarso, U. Scheffer, M. Göbel, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, F. Formaggio, C. Toniolo, P. Scrimin, *PNAS* **2002**, *99*, 5145.
- [37] O. Iranzo, T. Elmer, J. P. Richard, J. R. Morrow, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7737.
- [38] N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485.
- [39] K. Michaelis, M. Kalesse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2243.
- [40] E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7015.
- [41] I. E. Burgeson, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4299.
- [42] L. Zhu, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4566.

- [43] L. Zhu, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1992**, 3994.
- [44] a) T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5946; b) T. N. Parac, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2141.
- [45] a) N. M. Milovic, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4759; b) N. M. Milovic, L. M. Dutca, N. M. Kostic, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5097; c) N. V. Kaminskaya, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2368.
- [46] a) N. M. Milovic, J. D. Badjic, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 696; b) S. A. Stoffregen, A. K. K. Griffin, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8899.
- [47] a) T. M. Rana, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10578; b) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1859; c) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457; d) K. Shah, T. M. Rana, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 2695.
- [48] a) M. R. Ermacora, J. M. Delfino, B. Cuenoud, A. Schepartz, R. O. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6383; b) I. E. Platis, M. R. Ermacora, R. O. Fox, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12761; c) K. B. Hall, R. O. Fox, *Methods: a companion to methods in enzymology*, **1999**, *18*, 78; d) B. Cuenoud, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3247; e) B. Cuenoud, T. M. Tarasow, A. Schepartz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895.
- [49] a) H. J. H. Fenton, *Chem. News* **1876**, *33*, 190; b) H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc. Proc.* **1894**, *10*, 157.
- [50] a) M. Nold, K. Koch, H. Wennemers, *Synthesis* **2005**, *9*, 1455; b) M. Nold, H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2004**, 1800.
- [51] a) M. J. Davies, R. T. Dean, *Radical-Mediated Protein Oxidation*; Oxford University Press: Oxford, **1998**; b) E. R. Stadtman, *Science* **1992**, *257*, 1220.
- [52] For a recent review, see: M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 93.
- [53] a) H. A. Headlam, M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1175; b) C. L. Hawkins, M. J. Davies, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504*, 197; c) E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros, *Internatl. Microbiol.* **2000**, *3*, 3.
- [54] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487.
- [55] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [56] a) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922; b) H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723.

- [57] a) M. H. V. Ramana, S. Kiran Kumar, A. C. Kunwar, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7369-7372; b) J. Venkatraman, S. C. Shankaramma, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131; c) H. E. Stanger, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4236.
- [58] C. Toniolo, *Macromolecules* **1991**, *24*, 4004.
- [59] a) D. R. Wilson, B. B. Finlay, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 519; b) J. T. Blank, D. J. Guerin, S. J. Miller, *Org. Lett.* **2000**, *2* (9), 1247; c) B. Di Blasio, V. Pavone, M. Saviano, A. Lombardi, F. Natri, C. Pedone, E. Benedetti, M. Crisma, M. Anzolin, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6273.
- [60] a) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219; b) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071; c) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206; d) D. H. Appella, J. J. Barchi, S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309.
- [61] J. E. Whitaker, R. P. Haugland, P. L. Moore, P. C. Hewitt, M. Reese, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 119.
- [62] J. Suh, S. Oh, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7534.
- [63] B. Baumeister, N. Sakai, S. Matile, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4229.
- [64] a) Y. Li, S. Hatfield, J. Li, M. McMills, Y. Zhao, X. Chen, *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 667; b) Y. Li, Y. Zhao, S. Hatfield, R. Wang, Q. Zhu, X. Li, M. McMills, Y. Ma, J. Li, K. L. Brown, C. He, F. Liu, X. Chen, *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *8*, 2675.
- [65] J. dudaczek, C. Schmuck, *Org. Lett.* **2007**, *9*(26), 5389.
- [66] U. S. Schubert, C. Eschbaumer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2892.
- [67] R. M. Hutcheson, M. D. Engelmann, I. F. Cheng, *BioMetals* **2005**, *18*, 43.
- [68] R. B. Martin, J. A. Lissfelt, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 938.
- [69] a) H. Wennemers, M. Conza, M. Nold, P. Krattiger, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3342; b) M. Conza, H. Wennemers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696; c) H. Wennemers, M. Nold, K. J. Kulicke, M. Neuburger, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 442; d) H. Wennemers, *Chimia* **2003**, *57*, 237; e) M. Conza, H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2003**, *7*, 866.
- [70] P. Krattiger, H. Wennemers, *Synlett* **2005**, *4*, 706.

**PEPTIDE ZUR HERSTELLUNG VON
SILBER-NANOPARTIKELN**

3. Peptide zur Herstellung von Silber-Nanopartikeln

3.1 Einleitung

3.1.1 Silber-Nanopartikel und ihre Wirkung

Seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Herstellung von Metall-Nanopartikeln mit verschiedenen Größen, Formen und auch Zusammensetzungen zur Entwicklung neuer Materialien. Diese Materialien im Nanometer-Bereich besitzen einzigartige physikalische und chemische Eigenschaften mit einer Vielzahl von möglichen Anwendungen im Bereich der Katalyse,^[1] der pharmazeutischen Industrie^[2] und biologischen Diagnose,^[3] der „Green-Chemistry“,^[4] der Elektronik^[5] und zur Entwicklung von Materialien mit bestimmten magnetischen und optischen Eigenschaften.^[6] Die Nanopartikel können auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden, wie z.B. mit dem „Bottom-up“ (Chemical Vapor Deposition CVD, chemische Keimbildung) oder „Top-down“ (mechanische Zerkleinerung von Festkörpern) Prozeß,^[6] wobei die „Bottom-up“ Methode häufiger gebraucht wird, da sie eher die chemischen Zugänge zu den Nanopartikeln liefert. Innerhalb der chemischen Synthese sind sowohl die physikalische-Aerosol-Route, wie z.B. Dampf-Abscheidung^[7] und thermische Zersetzung^[8] als auch die Naß-chemische-Route, wie Sol-Gel-Prozeß^[9], Mikroemulsion^[10] und Kristallisation^[11] die am weitest verbreitetsten Herstellungsmethoden von Metall-Nanopartikeln. Eine Schwierigkeit in der Synthese besteht in der geeigneten Methodenwahl zur Kontrolle von Größe und Form der Nanopartikel,^[12] die maßgeblich zu den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nanopartikel beitragen.

Es sind die Edelmetall-Nanopartikel, vor allem Gold- und Silber-Nanopartikel, die das Interesse vieler Wissenschaftler geweckt haben, da sie interessante opto-elektronische Eigenschaften besitzen.^[13] Zur Zeit besteht ein großes Interesse an Silber-Nanopartikeln, da Silber in der Medizin sehr oft angewendet wird. So ist seine keimtötende Wirkung schon seit Jahrhunderten bekannt (Trinkwasser bleibt im Silberbehälter viel länger frisch als in anderen Behältern). Ende des 19. Jahrhunderts wurden Silberverbindungen von Ärzten zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen und Brandwunden eingesetzt. Das alte Heilmittel geriet jedoch aufgrund der Entwicklung von anderen Antibiotika wie dem Penicillin nahezu in Vergessenheit. Da aber die Anzahl an antibiotikaresistenten Bakterienstämmen in den letzten Jahren zugenommen hat, feiert das Silber sein Comeback als Antibiotikum. Es wird wieder medizinisch eingesetzt z.B. in Venen- oder urologischen Kathetern, in Gefäßprothesen und

auch in vielen medizinischen Werkzeugen. Die bakterizide Wirkung geht von den Silber-Ionen aus, die ein breites Wirkungsspektrum gegen anaerobe und aerobe gram-negative und gram-positive Bakterien, gegen Pilze und resistente Bakterien besitzen.^[14] Es ist noch kein genauer Wirkungsmechanismus bekannt, jedoch weiß man, dass die Ag^+ -Ionen in das Innere der Mikroorganismen eindringen, sich fest an die Enzyme lagern und deren lebensnotwendige Transportfunktion blockieren.^[14,15] Außerdem beeinträchtigen sie die Strukturfestigkeit der Zelle, was zum Zelltod führt. Sie destabilisieren auch die Membranstruktur der Zelle, und verhindern somit die Freisetzung von essentiellen Ionen wie Natrium und Kalium, wodurch das so hervorgerufene Ungleichgewicht der Zelle den Zelltod hervorruft.^[14,16,17] Die Bakterienzellwand bildet eine schützende Schicht um die Zellmembran und wird durch die Silber-Ionen in ihrer Strukturebene so verändert, dass die lebenswichtige Widerstandsfähigkeit und Funktionsfähigkeit beeinträchtigt wird. Ferner wird die Zellteilung und -vermehrung durch die Interaktion der Silber-Ionen und den DNA/RNA Basen gestört.^[14,17] Nimmt man all diese Wirkungsweisen des Silbers zusammen, kann davon ausgegangen werden, dass Bakterien nur schwer eine Resistenz gegenüber Silber ausbilden können.

Silber-Ionen sind in einer hohen Dosis jedoch zytotoxisch und man hat sich daher auf die Verwendung von Silbrenanopartikeln spezialisiert. In den Nanopartikeln ist die Oberfläche größer und die benötigte Menge an Silber für den gleichen antiseptischen Effekt kleiner. Die Nanopartikel dienen zudem als Silberdepot, da sie kontinuierlich Silber-Ionen freisetzen, so dass die Dosis an Silber erniedrigt und gleichzeitig die Wirkung verlängert werden kann.

3.1.2 Herstellung von Silber-Nanopartikeln

Es gibt viele Methoden, um Silber-Nanopartikel in Lösung herzustellen wie z.B. elektrochemisch,^[18] mit Mikrowellen,^[19] mit Ultraschall^[20] oder durch gamma-Strahlung.^[21] Die wohl gängigsten und am häufigsten verwendeten Methoden sind die chemische^[22,23] und photochemische Reduktion,^[24] ausgehend von einem löslichen Silbersalz und unter Zusatz eines Stabilisators, der das weitere Wachstum und die Aggregation der sich bildenden Silber-Nanopartikel verhindern soll. Gängige Reduktionsmittel sind z.B. Wasserstoff und Kohlenmonoxid, Hydride wie NaBH_4 oder KBH_4 , Natriumcitrat oder Hydrazin.^[22,25] Auf dem Vormarsch ist auch die biologische Synthese von Silber-Nanopartikeln z.B. durch die Pilze *Fusarium oxysporum* und *Aspergillus flavus*, welche nach Behandlung mit Silbernitrat Nanopartikel auf der Oberfläche ihrer Zellwand bilden.^[26,27] Die biologischen Synthesen sind

jedoch im Vergleich zu den chemischen Methoden eher langsam, da sie zur Reduktion des Silberions zwischen einem und fünf Tagen benötigen. Die Arbeitsgruppe von NOHI war jedoch in der Lage mit einer Bakterienkultur innerhalb von 5 min Silber-Nanopartikel herzustellen.^[28] Ein sehr interessanter Ansatz zur Herstellung von Silber Nanopartikeln ist der Gebrauch von Peptiden. Kürzlich wurde ein kleines Peptid entdeckt, das Ag^0 -Nanokristalle mit einer Größe von 60-150 nm bildet.^[29] Auch Tryptophan^[30] oder Tyrosin^[31]-haltige Peptide erlangen ein großes Interesse, da diese Aminosäuren bzw. ihre radikalischen Zwischenstufen in biologischen Systemen beim Elektronen- und Wasserstoff-Transport eine entscheidende Rolle spielen.^[32] Auch bei der Herstellung der Nanopartikel transferieren sie ihre Elektronen auf das Metall-Ion und reduzieren es so zum neutralen Metallatom. Bei all diesen Methoden spielt der richtige pH-Wert eine entscheidende Rolle.^[33]

Diese erwähnten Oligopeptide dienen jedoch nicht nur als Reduktionsmittel, sondern haben auch einen stabilisierenden Effekt. Als Organogele schränken sie die Bewegung der Nanopartikel ein und steuern zugleich deren Form und Struktur. Die Gruppen von HANABUSA^[34] und STUPP^[35] entwickelten „Übergangsmetall-Nanotubes“ mit Organogelen als Template. Erst kürzlich benutzte HANABUSA Aminosäuren als Struktur-dirigierendes Reagenz zur Herstellung von Silica-Nanopartikeln.^[36] Es gibt jedoch nur wenige Berichte über die Verwendung von Organogelen zur Herstellung von Gold- und Silber-Nanopartikeln.^[37-40] BANERJEE und Mitarbeiter verwirklichte die Herstellung von Gold- und Silber-Nanopartikeln, indem er Tyrosinhaltige, in organischen Lösungsmitteln Gel-bildende Peptide, als Organogel-Netzwerk entwickelte.^[41]

3.1.3 Optische Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln

Wie farbiges Glas für Kirchenfenster und Trinkgefäße erzeugt wird, ist seit Jahrhunderten bekannt. Wird Gold oder Silber zur Schmelze zugefügt, wird rotes bzw. gelblich gefärbtes Glas erhalten. Inzwischen weiß man auch, dass die Farbwirkung durch nanoskopisch, kleine Partikel hervorgerufen wird, welche im Vergleich zu ausgedehnten Metallkörpern andere optische Eigenschaften aufweisen. Das Interesse an diesen Teilchen fand einen bedeutenden Höhepunkt in der wissenschaftlichen Arbeit von MIE.^[42] Es wurden aber nicht nur die Teilchen in Gläsern betrachtet, sondern später auch kolloidale Lösungen von Metallteilchen, mit denen sich bereits MICHAEL FARADAY beschäftigte.^[43] Durch die Wechselwirkung der Metalle mit elektromagnetischer Strahlung werden kollektive Elektronenbewegungen auf der Oberfläche der Metallpartikel angeregt, welche als Plasmonen bezeichnet werden und eine Extinktionsbande im sichtbaren Spektralbereich erzeugen. Es konnte gezeigt werden, dass die

Lichtstreuung dieser Nanopartikel viel intensiver ist als das Fluoreszenzsignal von gängigen Fluorophoren.^[44] Das Lichtsignal kann mit handelsüblichen Lichtmikroskopen betrachtet werden und wird stark von der chemischen Umgebung der Partikel beeinflusst.^[45] Einen wichtigen Einfluß auf die Plasmonenenergie hat die Partikelgröße, da sie sowohl die Farbe als auch die Halbwertsbreite der Signale im UV-Vis Spektrum beeinflusst. Bei großen Partikeln sind die Banden breit, im Falle von monodispersen Teilchen liegen die Banden eng beieinander.^[13]

3.1.4 Biologische Aspekte

Im Jahre 1929 beobachtete ALEXANDER FLEMING nach einer Laborkontamination die Wachstumshemmung von Staphylokokken durch einen Penicillin-bildenden Schimmelpilz *Penicilium notatum*. Bei jener als Antibiotikum bezeichneten Verbindung handelt es sich um einen niedermolekularen Sekundärmetaboliten eines Mikroorganismus, welcher die Fähigkeit besaß, das Wachstum anderer Mikroorganismen zu hemmen. Mit der Einführung von Penicillin konnten erstmals kaum beherrschbare Infektionen behandelt werden und im Laufe der Jahre wurden neue Antibiotika entwickelt.

Durch den verbreiteten Einsatz von Antibiotika entstanden immer mehr resistente Bakterien-Keime, wie z.B. die Methicillin-resistenten Stämme des *Staphylococcus aureus* (MRSA) und die des *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Diese Keime können heute nur noch mit hochpotenten Antibiotika wie Vancomycin bekämpft werden. Ein besonderes Problem ist die Infektion nach chirurgischen Eingriffen, vor allem dann, wenn Biomaterialien verwendet werden. Diese bakteriellen Infektionen sind in Orthopädie und Gefäßchirurgie sehr gefürchtet, da sie nicht selten zu lebensbedrohlichen Sepsen führen.^[46] KILGUS und Mitarbeiter zeigten, dass es in den letzten 10 Jahren zu einer Zunahme von Infektionen mit multiresistenten Krankheitserregern nach Implantationen kam.^[47] Bei Implantationen von Totalendoprothesen (TEP) werden bei über 1% aller Eingriffe Infektionen registriert, bei Knie- und Ellbogenprothesen sind es 5-7%.^[48] Für viele Patienten ist der Austausch bzw. die Entnahme des Implantates oder sogar die Amputation der einzige Weg, eine chronische Infektion zu verhindern.^[49] Es können sich auch Gefäßprothesen infizieren, was zur Sepsis führt, an der zwischen 10 bis 25% der Patienten sterben. Der Grund für diese Entzündungen ist die Oberflächenbeschaffenheit der Implantate, auf denen kleinste Unebenheiten Nischen für die Adhäsion von Bakterien bieten. Werden diese Nischen von körpereigenen Zellen besiedelt, so wird es den Bakterien erschwert, auf der Oberfläche zu haften und das Implantat wird zugleich geschützt. Gewinnen jedoch die Bakterien, so können sie sich ebenso wie die Zellen

auf der Oberfläche ansiedeln und bilden einen Schleim aus, den sog. Biofilm,^[50] der die Bakterien zum einen vor der körpereigenen Immunabwehr, zum andern vor Antibiotika schützt. Die häufigsten Biofilm-produzierenden Keime, die bei der mikrobiologischen Untersuchung infizierter Prothesen und Implantate nachgewiesen wurden, sind *Staphylococcus aureus*, *E. Coli* und *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind gram-positive Bakterien, wobei Infektionen durch *Staph. aureus* schneller fortschreiten. Die Ansteckungsgefahr ist jedoch bei *Staph. epidermidis* größer, da diese Bakterien die menschliche Haut und Schleimhaut besiedeln und so bei abwehrgeschwächten Menschen zu schweren Erkrankungen führen. Besonders anfällig für solche Biofilme durch die genannten Bakterien sind Katheter, künstliche Herzklappen, Gelenkprothesen, Herzschrittmacher etc.

Da die Behandlung dieser Infektionen den Patienten sehr belastet, ist es wichtig neue Möglichkeiten zur Bakterienbekämpfung zu entwickeln. Eine Möglichkeit ist die antiseptische Beschichtung der Implantat-Oberflächen mit Antibiotika. Zur Vermeidung des Biofilms wurden Oberflächen mit z.B. Polyethylenglykol^[51] oder Polyurethan^[52] beschichtet. Eine Alternative ist die kontrollierte Freisetzung von Antibiotika, wobei das Antibiotikum über Wochen oder Monate freigesetzt wird.^[53]

Auch Silber fand in diesem Gebiet seine Anwendung. Es wurde z.B. schon Plastik mit Silber gemischt, um das Material vor Bakterien zu schützen.^[54]

Ferner wurden auch Katheter^[55] und orthopädische Nägel^[56] mit metallischem Silber beschichtet. SHEEHAN und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass Silber auf orthopädischen Implantaten die Adhäsion des *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* nicht verringert.^[57] Der Grund dafür ist, dass nicht das metallische Silber, sondern Ag^+ -Ionen antibakteriell sind. Deswegen wurden Polymere entwickelt, die in der Lage sind, kontinuierlich Ag^+ für ca. drei Monate freizusetzen.^[58]

Erst kürzlich entwickelten FURNO und Mitarbeiter Polymer-Beschichtungen, welche Silberpartikel mit einem Durchmesser von 10-100 nm freisetzen und die Bakterien inhibieren.^[59]

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken Peptide zu identifizieren, die Ag^+ -Ionen selektiv binden, um anschließend durch Reduktion des Ag^+ die Bildung von Silber-Nanopartikeln zu generieren. Dadurch, dass Ag^+ in der Medizin sehr bedeutend ist, sollte auch hier bei erfolgreicher Nanopartikel-Bildung die Wirkungsweise auf das Bakterienwachstum des *Staphylococcus epidermidis* getestet werden. Alle beschriebenen Versuche wurden in einer Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Katharina M. Fromm und ihrer Mitarbeiterin Tünde Vig-Slenters (Universität Fribourg) durchgeführt.

3.2 Festphasenexperimente zur Herstellung von Silber-Nanopartikeln

3.2.1 Vorversuche

Zunächst galt es herauszufinden, ob Silber auf einer festen Phase (TentaGel =TG) visualisiert werden kann. Um dies zu testen, wurde TentaGel-Harz mit dem bekannten Ag-Komplexligand iso-Nikotinsäure funktionalisiert.^[60] Acetyliertes TentaGel **90** diente als negative Kontrolle (Abb. 49).

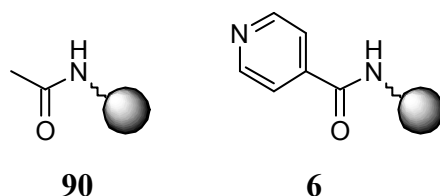


Abb. 49: Modellsysteme zur Fixierung von Silber.

Die beiden Harze **6** und **90** wurden mit einer 0.05 M wässrigen AgNO_3 -Lösung inkubiert. Nach waschen der Harze mit Wasser zur Entfernung von ungebundenen Ag^+ -Ionen wurden die Proben für 8 h mit einer 15 Watt Lampe bestrahlt.

Erste Tests mit den gängigen Nachweisreagenzien für Ag^+ wie Cl^- , Br^- und I^- zeigten keine Bindung, da die entstehenden Komplexe nicht visualisiert werden konnten. Aus diesem Grund wurden die zuvor mit Ag^+ -Ionen behandelten Beads mit Licht bestrahlt (15 Watt Lampe, Philips). Ist das entstehende metallische Silber gefärbt, sollte dies unter dem Lichtmikroskop erkennbar sein. Als Referenz diente acetyliertes TentaGel **90**, welches Silber nicht binden sollte.

Analyse der Proben unter dem Lichtmikroskop zeigte rot-getupfte Beads im Falle der iso-Nikotinsäure **6** und farblose Beads im Falle des acetylierten TentaGels **90**, was zeigt, dass Ag-Komplexe durch diese Methode nachgewiesen werden konnten. Um zu überprüfen, ob die Farbe in der Tat auf gebildetes elementares Silber zurückzuführen ist, wurden die beiden funktionalisierten Harze **6** und **90** mit „Scanning Elektron Microscopy (SEM)“ untersucht. Bei dieser Messmethode wird ein Elektronenstrahl über das zu analysierende Objekt geführt, wobei die Elektronen mit dem Objekt wechselwirken und so ein entsprechendes Bild erzeugen. Im günstigen Fall können Objekte bis zu einer Million Mal vergrößert werden. Um die Elektronen ableiten zu können, werden die Proben vorher mit einer Schicht aus Gold oder Platin überschichtet (Sputtern).

Die Oberfläche, der mit iso-Nikotinsäure funktionalisierten Beads **6** zeigte das Vorhandensein von Silber-Nanopartikeln in einer Größe von 500 nm, während bei der negativen Kontrolle **90** kein Silber nachgewiesen werden konnte (Abb. 50).

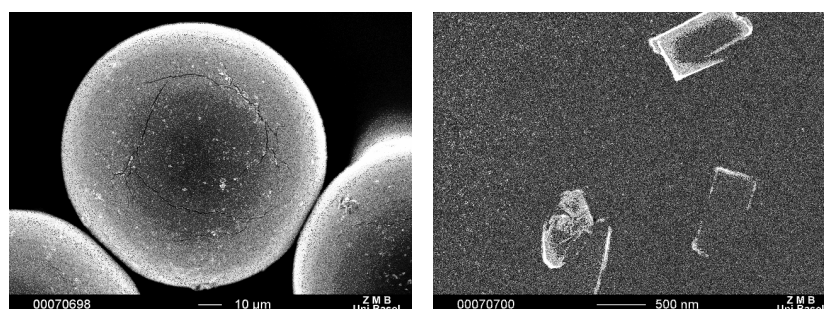


Abb. 50: SEM-Aufnahme von Silber auf Iso-Nikotinsäure funktionalisiertem TentaGel **6**.

3.2.2 Kombinatorische Experimente: Lichtreduktion von Ag^+

Mit dieser Visualisierungsmethode von Silber wurde als nächstes untersucht, ob bestimmte Peptide die Bildung von Silber-Nanopartikeln induzieren können. Dazu wurden drei, durch Split-und-Mix-Technik synthetisierte Peptidbibliotheken verwendet (Abb. 51).

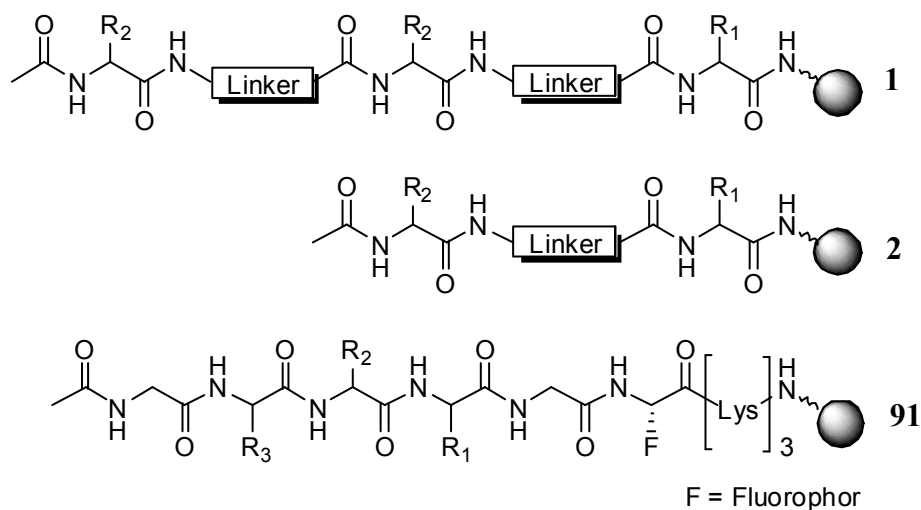


Abb. 51: *Verwendete Peptidbibliotheken.*

Die Penta- und Tripeptidbibliotheken **1** und **2** bestehen im Gegensatz zur Bibliothek **91** aus einer geringen Anzahl von Peptiden, die aber strukturdirigierende Motive enthalten (s. Kapitel 2.2.1). Es konnte für die Silber Experimente nicht die „Fluorophor-Quencher-Bibliothek“ **47** (Kapitel 2.3.1) verwendet werden, da der Quencher die Beads gelb erscheinen lässt und so eine mögliche Farbänderung durch die Silber-Nanopartikel-Bildung erschwert ist.

Die Bibliotheken wurden wiederum während 15 min mit einer 0.05 M AgNO_3 -Lösung inkubiert und anschließend zur Entfernung von ungebundenen Ag^+ -Ionen mit Wasser gewaschen. Nach Bestrahlung der Proben mit der 15 W Lampe für 8 h waren zahlreiche Beads in der Tri- und Pentapeptidbibliothek farbig (Abb. 52). Dies zeigt, dass manche Peptide innerhalb der Bibliotheken die Bildung von Silber-Nanopartikeln induzieren können. Mit der Pentapeptidbibliothek **1** wurden zahlreiche Farbabstufungen von rot nach gelb beobachtet, während bei der Tripeptidbibliothek **2** nur rote Beads auftraten (Abb. 52). Im Falle der Fluorophor-Bibliothek traten keine farbigen Beads auf.

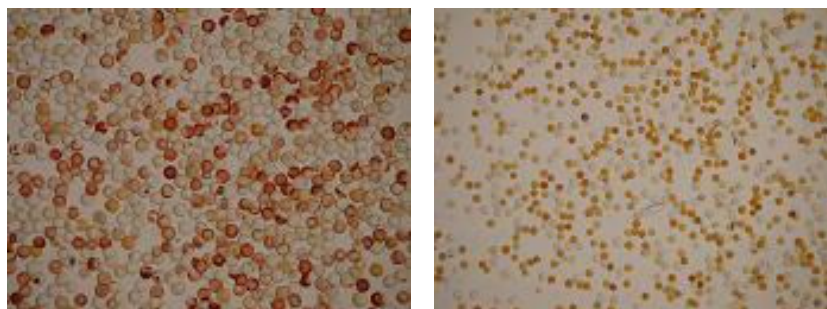


Abb. 52: *Tripeptid (links)- und Pentapeptidbibliothek (rechts) nach Silber-Inkubation und Lichtreduktion.*

Die in Abbildung 52 sichtbare inhomogene Färbung der Beads ist darauf zurückzuführen, dass die Proben nicht geschüttelt werden konnten.

Isolierung der am intensivsten gefärbten Beads und Analyse der Peptidsequenzen mittels EC-GC zeigte im Falle der Pentapeptidbibliothek **1** keine eindeutige Selektivität für eine bestimmte Peptidsequenz (s. Anhang).

Die Analyse von ca. 60 roten Beads der Tripeptidbibliothek zeigte folgende Selektivitäten auf: fast jedes Peptid enthielt ein turn-induzierendes Motiv wie *trans*-Aminocyclohexansäure **35** oder Pro-Aib und in der ersten und dritten Position Histidin, Serin oder Tyrosin. In der untenstehenden Tabelle sind nur die häufigsten Sequenzen aufgeführt (Tab. 5).

AS2	Linker	AS1	gefundene Häufigkeit %	erwartete Häufigkeit %
D/L-His	ACHC Pro-Aib Pro-Gly	L-Tyr	25	1.7
D/L-Ser L-Tyr	ACHC Pro-Aib Pro-Gly	L-Tyr	22	2.6
L-Tyr	ACHC	D-Ser	8.3	0.29
D/L-Ser L-Tyr D/L-His	X	D/L-Ser	20	14.6

X = variable Aminosäure

Tab. 5: *Analysierte Tripeptide mit EC-GC.*

Kontrollexperimente bei denen die Beads nach der AgNO₃-Inkubation nicht mit Licht bestrahlt wurden, zeigten farblose Beads. Anschließend wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) der Gehalt an noch freiem Silber in der Lösung nach Inkubation mit den

Bibliotheken bestimmt. Bei der Pentapeptidbibliothek wurden 0.007 mg Silber pro mg Bibliothek, mit der Tripeptidbibliothek 0.009 mg pro mg Bibliothek aufgenommen. Dies bedeutet, dass beide Bibliotheken ähnlich starke Komplexbildner darstellen, wobei jedoch keine Aussage über einzelne Peptide innerhalb der Bibliotheken getroffen werden kann. Daher wurde für alle weiteren Versuche die Tripeptidbibliothek **2** verwendet.

Im Weiteren untersuchten wir, ob auf den Oberflächen der farbigen Beads Silber nachgewiesen werden kann und analysierten die Oberfläche mit Elektronen-Mikroskopie. Bei beiden Bibliotheken sind Silber-Partikel auf der Oberfläche erkennbar. Im direkten Vergleich von roten mit farblosen Beads aus der Tripeptidbibliothek (Abb. 53, Mitte und Rechts) sieht man Partikel mit einer Größe von etwa 500 nm, während auf den farblosen Beads keine Nanopartikel nachgewiesen werden konnten. Abbildung 53 zeigt die Tripeptidbibliothek vor (Abb. 53, Links) und nach Silber-Inkubation mit anschließender Lichtreduktion (Abb. 53, Mitte und Rechts), Abbildung 54 zeigt die Pentapeptidbibliothek vor und nach Inkubation.

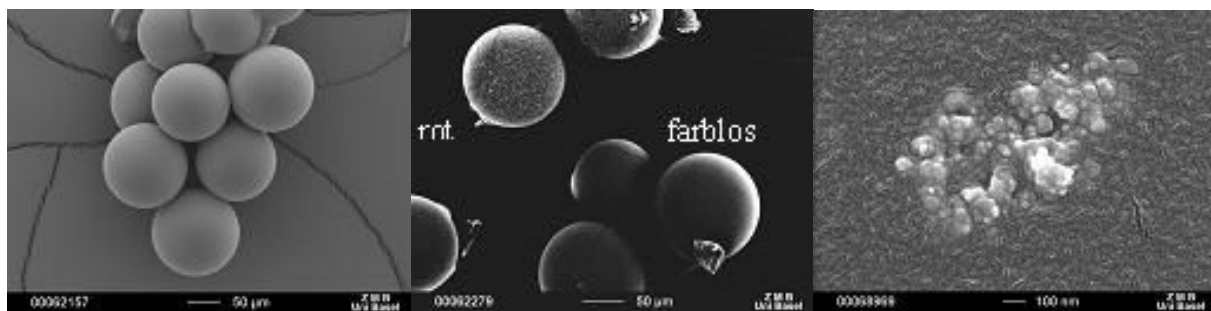


Abb. 53: SEM-Aufnahmen von Links: Tripeptid ohne Silber; Mitte: rotes und farbloses Bead im Vergleich nach Silber-Inkubation und Lichtreduktion; Rechts: zoom auf das rote Bead.

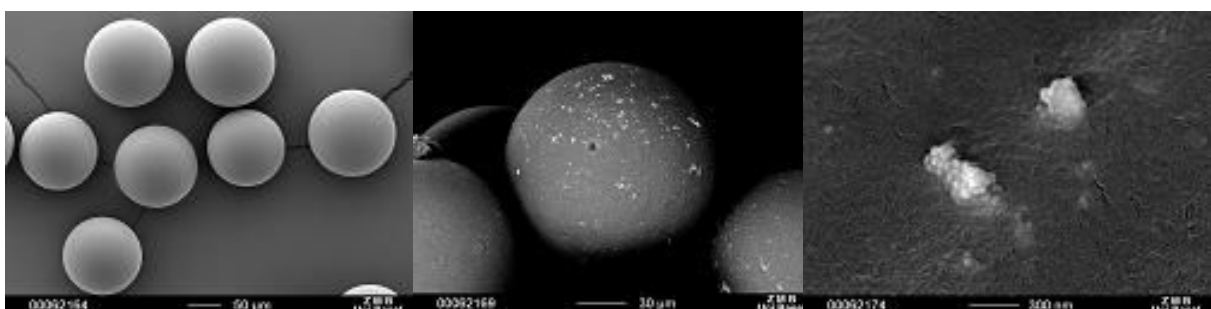


Abb. 54: SEM-Aufnahmen von Links: Pentapeptid ohne Silber; Mitte: farbiges Bead nach Silber-Inkubation und Lichtreduktion; Rechts: zoom auf das farbiges Bead.

Während der Messungen wurden Energie-Dispersive-Röntgenanalyse-Spektren (EDAX) aufgenommen, die bei beiden Bibliotheken Silber auf der Oberfläche zeigten. Daneben erkennt man das „Sputter-Metall“ Platin sowie Chlor, da die Bibliotheken mit polychlorierten Tags versehen sind, die man bei dieser Messung auch erkennt (Abb. 55).

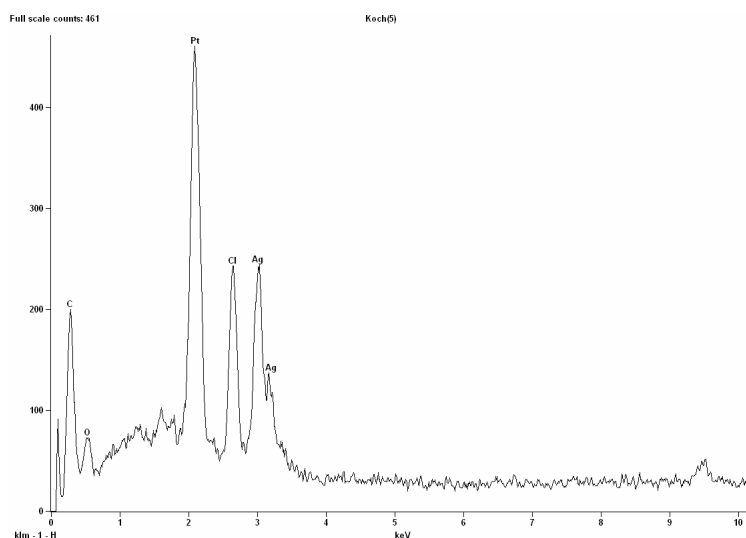


Abb. 55: EDAX-Spektrum der Bibliothek.

Diese Daten zeigen, dass die kodierte Peptidbibliotheken zur Detektion von Peptiden genutzt werden können, die selektiv Ag^+ -Ionen binden. Das metallische Silber auf der Oberfläche der Beads lässt sich mittels SEM nachweisen. Die unterschiedlich gefärbten Beads deuten darauf hin, dass mit verschiedenen Peptiden gezielt unterschiedlich große Silber-Nanopartikel generiert werden können.

3.2.3 Experimente mit festphasengebundenen Peptiden:

Lichtreduktion von Ag^+

Um die Eigenschaften der in den kombinatorischen Experimenten indentifizierten Silber-Nanopartikel bildenden Peptide näher zu untersuchen, wurden verschiedene Peptide auf TentaGel und Rink-Amid-Harz unter Fmoc-Standard-Bedingungen nachsynthetisiert. Der Fokus der folgenden Arbeiten basiert auf den Tripeptiden, da bei der Pentapeptidbibliothek keine Hauptsequenz gefunden wurde.

Es wurden die in Abbildung 56a, 56b, 56c und 57 gezeigten positiven und negativen Kontrollpeptide **92a/b-102a/b** hergestellt. Die positiven Kontrollpeptide **92a/b-99a/b** wurden im kombinatorischen Screening gefunden. Die negativen Kontrollen sind Sequenzen, die nicht im kombinatorischen Screening auftraten (Abb. 57).

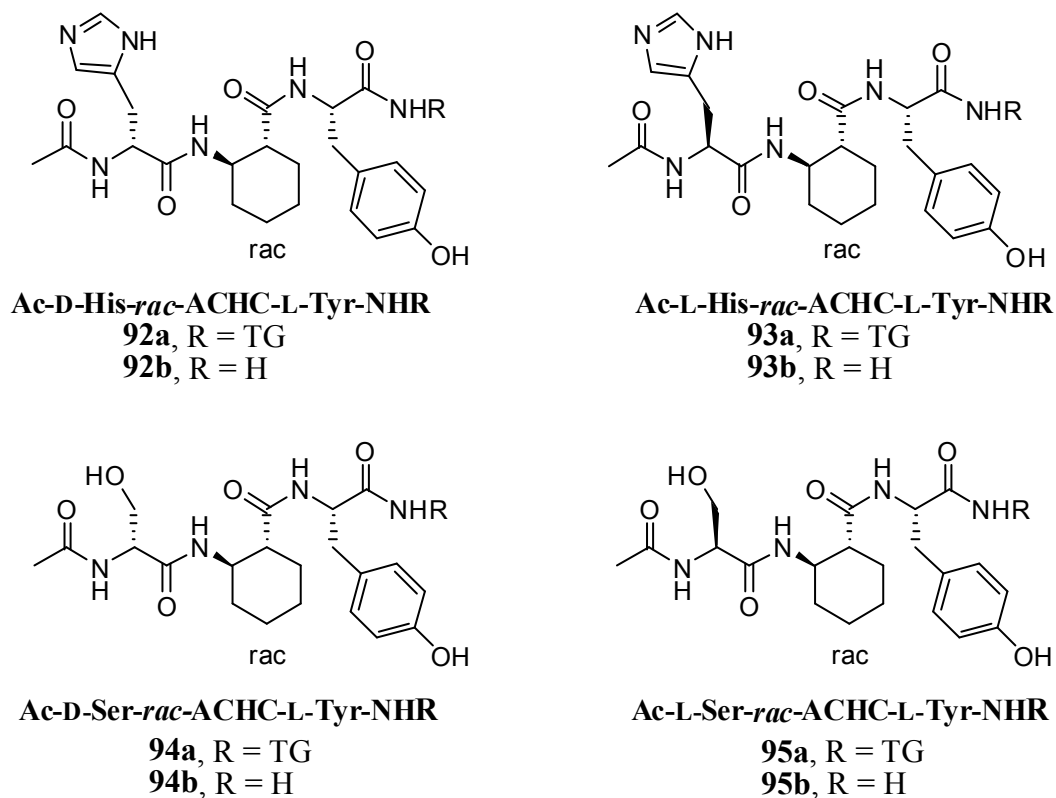


Abb. 56a: Positive Kontrollsequenzen **92a/b-95a/b**.

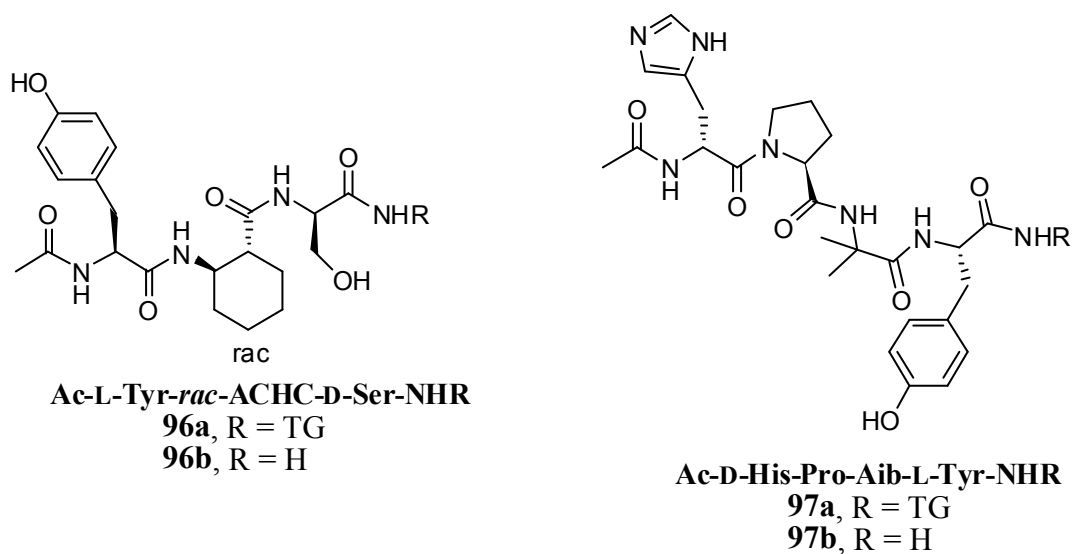


Abb. 56b: Positive Kontrollsequenzen **96a/b** und **97a/b**.

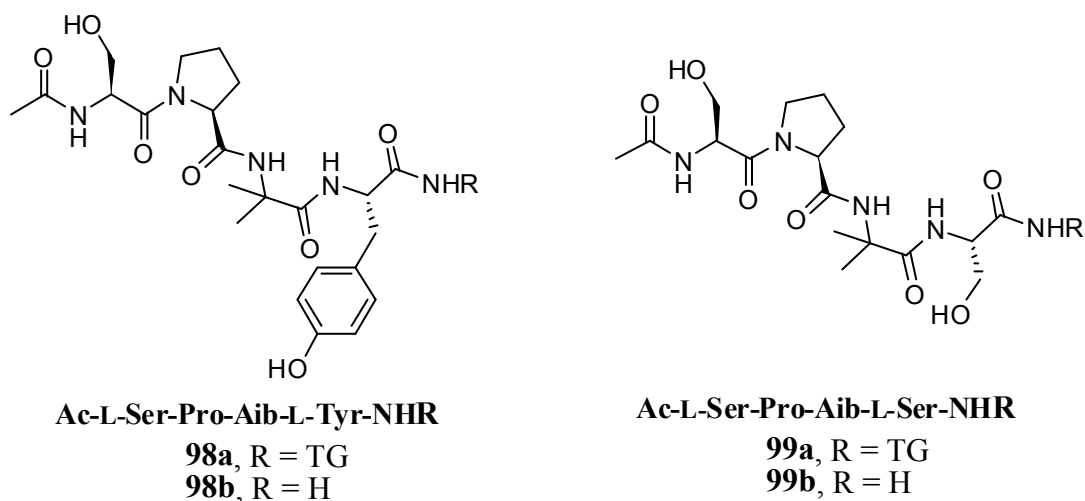


Abb. 56c: Positive Kontrollsequenzen **98a/b** und **99a/b**.

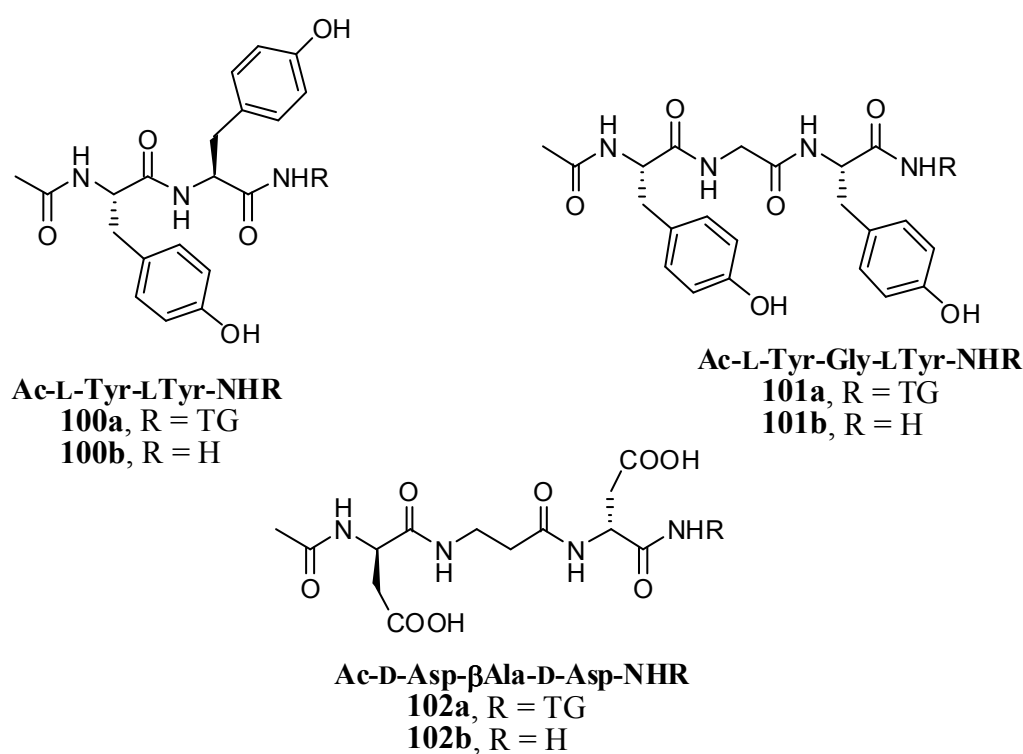


Abb. 57: Negative Kontrollsequenzen **100a/b-102a/b**.

Alle Peptide wurden unter den gleichen Bedingungen wie im kombinatorischen Experiment mit einer wässrigen Lösung von AgNO_3 behandelt und 8 h mit der 15 W Lampe bestrahlt. Die negativen Kontrollsequenzen blieben nach Lichtbehandlung farblos. Die Peptide, welche die racemische Aminosäure ACHC **35** enthalten, zeigten wie schon beim kombinatorischen Experiment rote Beads im Falle von Ac-L-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **93a**, Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a** und orange beads im Falle von Ac-L-Ser-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG

95a, Ac-D-Ser-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **94a**, Ac-L-Tyr-*rac*-ACHC-D-Ser-NH-TG **96a** (Abb. 58).

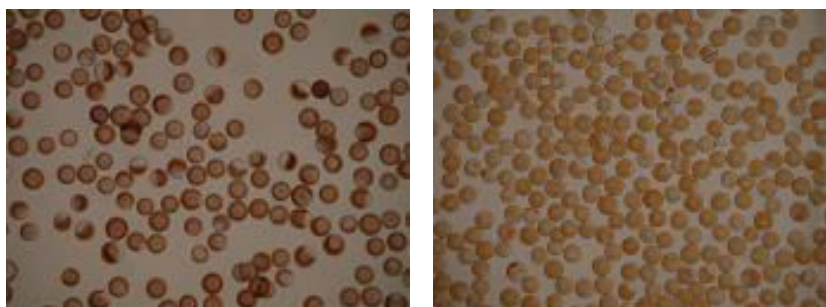


Abb. 58: Lichtmikroskop Bilder von Links: Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a**, Rechts: Ac-L-Ser-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **95a** nach Lichtreduktion.

Die Pro-Aib haltigen Peptide zeigten jedoch keine farbigen Beads, obwohl diese Sequenzen auch im kombinatorischen Experiment gefunden wurden. Anschließend wurden mit AAS die Silber-Aufnahmen durch die einzelnen Peptide bestimmt. Vor allem die Histidin-haltigen Peptide zeigten eine hohe Aufnahme. Im Gegensatz dazu zeigten die negativen Kontrollpeptide wie auch die Serin- und Tyrosin-haltigen Peptide eine sehr geringe Silber-Aufnahme. Auffallend war, dass auch die Aspartat-haltigen Kontrollpeptide eine gewisse Affinität zu Silber aufweisen, obwohl mit ihnen keine Silber-Nanopartikel-Bildung beobachtet werden konnte (Tab. 6).

Peptid auf TentaGel	Farbe nach Lichtreduktion	Silber Aufnahme mmol Ag/mmol Peptid
AcD-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 92a	Rot	0.67
AcL-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 93a	Rot	0.60
AcL-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 95a	Orange	0.32
AcD-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 94a	Orange	0.21
AcL-Tyr- <i>rac</i> -ACHC-D-Ser-NHTG 96a	Orange	0.42
AcD-His-Pro-Aib-L-Tyr-NHTG 97a	Farblos	0.68
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Tyr-NHTG 98a	Farblos	0.18
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Ser-NHTG 99a	Farblos	0.23
AcL-Tyr-L-Tyr-NHTG 100a	Farblos	0.23
AcL-Tyr-Gly-L-Tyr-NHTG 101a	Farblos	0.31
AcD-Asp- β -Ala-D-Asp-NHTG 102a	Farblos	0.37
AcL-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NHTG 46a	Farblos	0.57

Tab. 6: Farben der Peptide nach Silber-Inkubation und Lichtreduktion.

Die hohe Silberaufnahme der Histidin-haltigen Peptide **92a**, **93a**, **97a** und Aspartat-haltigen Peptide **102a** und **46a** könnte daran liegen, dass Histidin wie auch Aspartat gute Liganden für Ag^+ darstellen.^[61] Auch hier wurden die Oberflächen der einzelnen Beads auf Silber mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht. Man fand bei Ac-L-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **93a** und Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a** Silber-Partikel mit einer Größe zwischen 300 und 500 nm. Die Anwesenheit von Silber auf der Oberfläche konnte mit Hilfe eines EDAX-Spektrums bestätigt werden (Abb. 59).

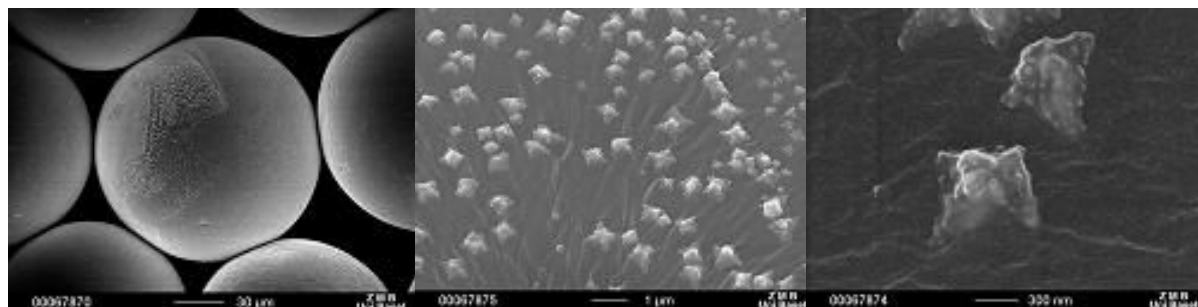


Abb. 59: SEM-Aufnahmen mit Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a**.

Im Falle der orange gefärbten Serin- und Tyrosin-haltigen Peptide konnten jedoch nur ganz wenige μm -große, isolierte Kristalle gefunden werden, welche Silber enthielten (EDAX-Analyse). Da die Beads jedoch gefärbt sind, sind wohlmöglich Partikel vorhanden, die aber unter Umständen so klein sind, dass eine Detektion mittels SEM nicht möglich ist.

Bei den negativen, farblosen Kontrollpeptiden konnten ebenfalls diese isolierten Silberkristalle auf der Oberfläche erkannt werden.

Eine Erklärung für die farblosen Beads im Falle der Pro-Aib- und Aspartat-haltigen Peptide könnte die starke Ag^+ -Komplexbildung sein, welche die Lichtreduktion nicht ermöglicht. Daher wurde bei diesen Peptiden die Reduktion mit einem chemischen Reduktionsmittel durchgeführt. Unsere Wahl fiel dabei auf Vitamin C (Ascorbat), da es im Vergleich zu NaBH_4 ein milderes Reduktionsmittel ist (Kapitel 3.2.4).^[23d]

Dadurch, dass mit bestimmten Tripeptiden Silber-Nanopartikel generiert werden konnten, wurden auch Sequenzen aus dem kombinatorischen Experiment mit der Pentapeptidbibliothek Ac-L-Tyr-Pro-Gly-L-Tyr-Pro-Gly-L-Ser-NH-TG **103a**, Ac-L-His-L-His-Pro-Gly-D-His-NH-TG **104a** und Ac-L-Ser-Ahx-D-Asp-Ahx-D-His-NH-TG **105a** synthetisiert, mit Silber inkubiert und mit Licht bestrahlt.

Einzig die Beads von Peptid **104a** färbten sich rotviolett, die anderen blieben farblos. Die Bead-Analyse gestaltete sich jedoch schwierig, da diese stark untereinander aggregierten und komplexe Strukturen auf der Oberfläche ausbildeten (s. Anhang).

3.2.4 Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Chemische Reduktion von Ag^+

Zur Untersuchung, ob sich in Gegenwart von Vitamin C als Reduktionsmittel andere der bereits synthetisierten Peptide als aktiv bei der Bildung von Nanopartikeln erweisen, wurden die Tripeptide mit einer 0.05 M AgNO_3 -Lösung inkubiert, gewaschen und mit einer 0.05 M Natrium-Ascorbatlösung versetzt (chemische Reduktion). Bei den mit Histidin- und Aspartat-haltigen Peptiden funktionalisierten Beads, trat nach Zugabe des Reduktionsmittels bereits nach ca. 20 Sekunden ein Farbumschlag ins Dunkelrote und Graue auf. Die Serin- und Tyrosin-haltigen Peptide zeigten hingegen erst nach 24 h gelb gefärbte Beads, im Falle von Pro-Aib und den negativen Tyrosin-Sequenzen blieben die Beads auch nach mehreren Tagen farblos (Tab. 7).

Peptid auf TentaGel	Farbe nach chem. Reduktion	Silber Aufnahme mmol Ag/mmol Peptid
AcD-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 92a	Dunkelrot	0.67
AcL-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 93a	Dunkelrot	0.60
AcL-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 95a	Gelb	0.32
AcD-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NHTG 94a	Gelb	0.21
AcL-Tyr- <i>rac</i> -ACHC-D-Ser-NHTG 96a	Gelb	0.42
AcD-His-Pro-Aib-L-Tyr-NHTG 97a	Dunkelrot	0.68
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Tyr-NHTG 98a	Farblos	0.18
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Ser-NHTG 99a	Farblos	0.23
AcL-Tyr-L-Tyr-NHTG 100a	Farblos	0.23
AcL-Tyr-Gly-L-Tyr-NHTG 101a	Farblos	0.31
AcD-Asp- β -Ala-D-Asp-NHTG 102a	Grau	0.37
AcL-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NHTG 46a	Dunkelgrau	0.57

Tab. 7: Farben der Peptide nach Silber-Inkubation und chemischer Reduktion.

Auch hier wurden die Oberflächen der einzelnen Peptide untersucht. Auf den mit Histidin-haltigen-Peptiden funktionalisierten Beads **92a**, **93a** und **97a** wurden Silber-Nanopartikel mit einer Größe zwischen 100 und 300 nm beobachtet, wobei das ganze Bead von ihnen bedeckt war (Abb. 60). Untersuchung der gelben Beads lieferte Nanopartikel im Bereich von 50-200 nm, die grauen Beads zeigten Partikel im Bereich von 250-1000 nm, wobei die Partikel stark untereinander aggregierten (Abb. 61).

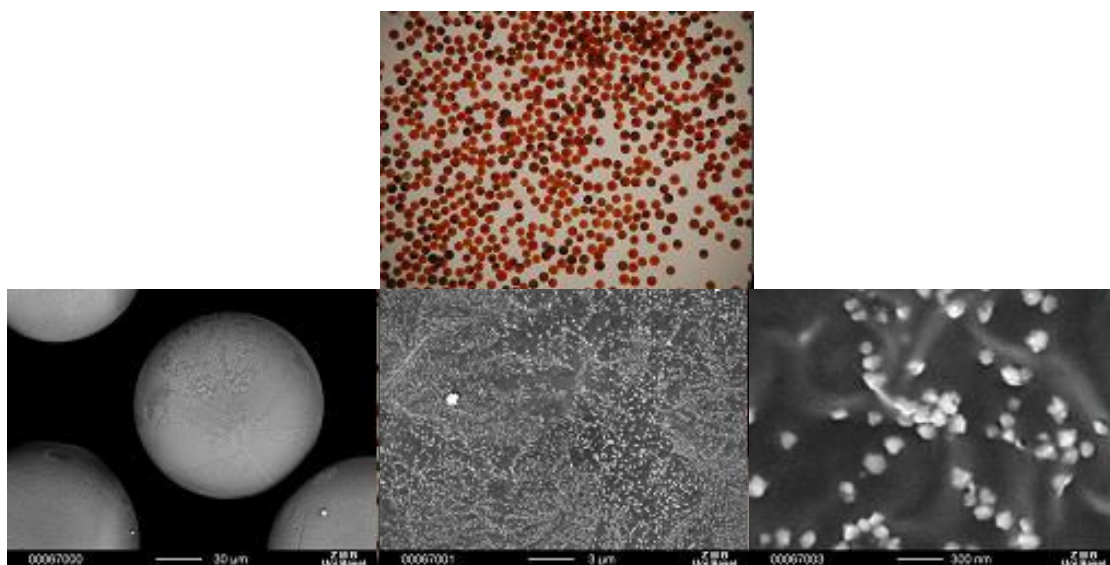


Abb. 60: Lichtmikroskop- und Elektronenmikroskop-Aufnahmen von *Ac-D-His-rac-ACHC-L-Tyr-NH-TG 92a* nach chemischer Reduktion mit Vitamin C.

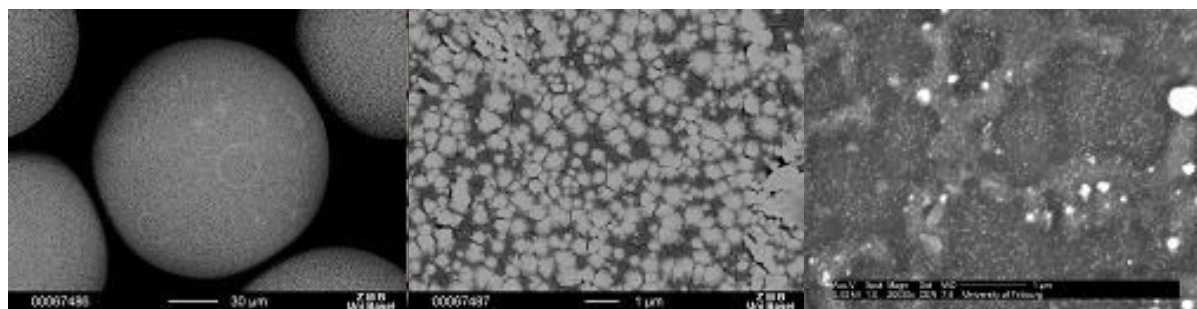
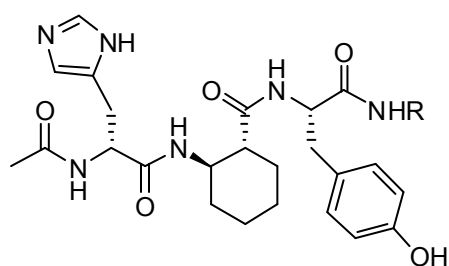


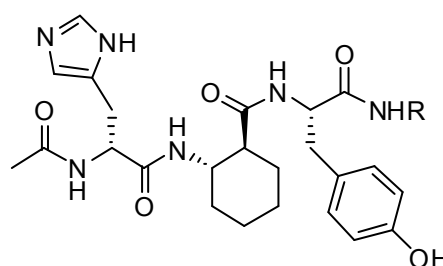
Abb. 61: Elektronenmikroskop-Aufnahmen von Links, Mitte: *Ac-L-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NH-TG 46a* und Rechts: *Ac-L-Tyr-rac-ACHC-D-Ser-NH-TG 96a*.

Durch die erhaltenen Resultate konnte die erfolgreiche Ag^+ -Komplexierung durch Histidin-haltige, Serin- und Tyrosin-haltige und Aspartat-haltige Peptide bestätigt werden. Dadurch, dass nun Ag^+ auch auf *Ac-D-His-Pro-Aib-L-Tyr-NH-TG 97a* und *Ac-L-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NH-TG 46a* reduziert werden konnte, bestätigt sich die Annahme eines lichtstabilen Peptid- Ag^+ -Komplex.

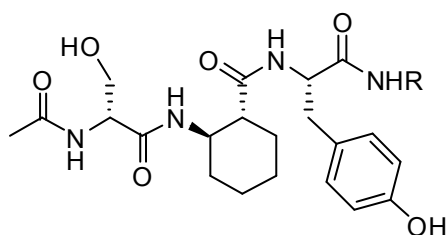
Da bei den ACHC-haltigen Peptiden die Linker-Aminosäure in ihrer racemischen Form eingesetzt wurde, wurden auch die enantiomerenreinen Peptide synthetisiert und ihre Affinität zu Silber getestet. Es wurden Ac-D-His-(*R,R*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H **106a/b**, Ac-D-His-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H **107a/b**, Ac-D-Ser-(*R,R*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H **108a/b**, Ac-D-Ser-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H **109a/b**, Ac-L-Tyr-(*R,R*)-ACHC-D-Ser-NH-TG/H **110a/b** und Ac-L-Tyr-(*S,S*)-ACHC-D-Ser-NH-TG/H **111a/b** hergestellt (Abb. 62).



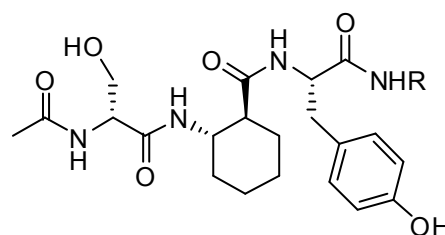
Ac-D-His-(*R,R*)-ACHC-L-Tyr-NHR
106a, R = TG
106b, R = H



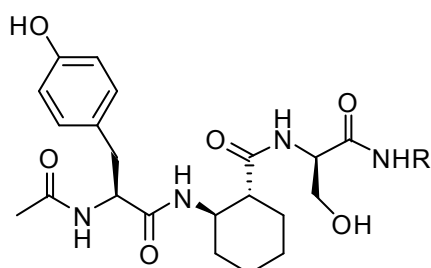
Ac-D-His-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NHR
107a, R = TG
107b, R = H



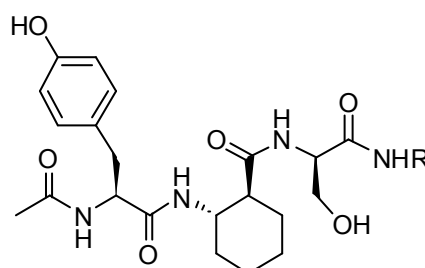
Ac-D-Ser-(*R,R*)-ACHC-L-Tyr-NHR
108a, R = TG
108b, R = H



Ac-D-Ser-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NHR
109a, R = TG
109b, R = H



Ac-L-Tyr-(*R,R*)-ACHC-L-Tyr-NHR
110a, R = TG
110b, R = H



Ac-L-Tyr-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NHR
111a, R = TG
111b, R = H

Abb. 62: Enantiomerenreine Peptide **106a/b-111a/b**.

Die Peptide zeigten bei Licht- wie auch bei chemischer Reduktion die gleichen Resultate verglichen mit den diastereomeren Peptiden **92a**, **94a** und **96a**. Im Falle der Histidin-haltigen Peptide **106a** und **107a** wurden rote (Lichtreduktion) und dunkelrote (chemische Reduktion) Beads und im Falle der Serin- und Tyrosin-haltigen Peptide **108a-111a** orange (Lichtreduktion) und gelbe (chemische Reduktion) Beads beobachtet. Auch hier wurden die Oberflächen der einzelnen Peptide untersucht und die Resultate stimmen mit denen der diastereomeren Peptiden überein.

3.2.5 Kombinatorische Experimente: Chemische Reduktion von Ag^+

Um zu untersuchen, ob nach Wechseln des Reduktionsmittels andere aktive Peptide gefunden werden im Vergleich zur Lichtreduktion, wurde die chemische Reduktion auch für die kombinatorische Bibliothek **2** angewendet. Auch hier wurden die Beads mit einer 0.05 M AgNO_3 -Lösung inkubiert, gewaschen und anschließend mit einer 0.05 M Ascorbat Lösung versetzt. Die chemische Reduktion ist im Vergleich zur Lichtreduktion viel schneller (da die Energie des Lichtes nicht in die ganze Lösung eindringen kann) und liefert eine höhere Farbvariation (Abb. 63). Auch die Oberflächenanalyse zeigt eine unterschiedliche Partikelverteilung auf einzelnen Beads (Abb. 63).

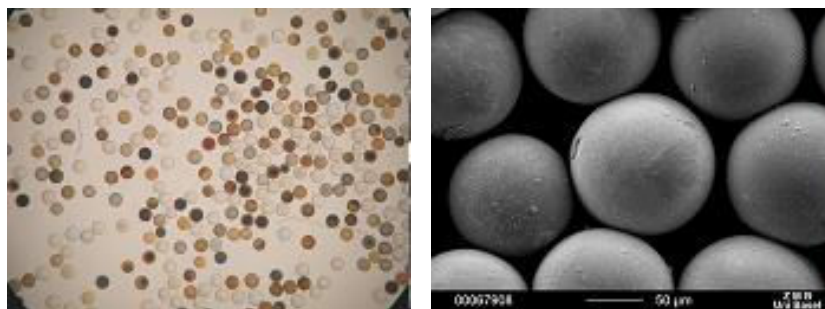


Abb. 63: Licht- und Elektronenmikroskop-Aufnahmen der Tripeptidbibliothek **2** nach chemischer Reduktion.

Isolierung der grau-schwarzen, orangen und roten Beads und Analyse der Peptidsequenz mittels EC-GC zeigte eine Selektivität für Histidin und Aspartat in der ersten und zweiten Position. Im Gegensatz zu der Lichtreduktion ist die Linker-Position mehr oder weniger variabel (Tab. 8).

Farbe	AS2	Linker	AS1	gefundene Häufigkeit %	erwartete Häufigkeit %
Grau Schwarz	D/L-His	X	D/L-Asp L-His	87	3.5
Orange	D/L-His	X	D/L-His	55	4.7
	D/L-His	Pro-Gly	D/L-Asp	29	1.2
Rot	D/L-His	Gly	D/L-Asp	25	1.2
	D/L-His	β -Ala	D/L-Asp	16	1.2
	D/L-Asp	β -Ala	D/L-His	21	1.2

X = variable Aminosäure

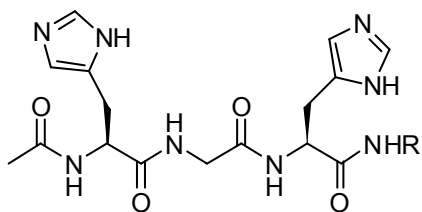
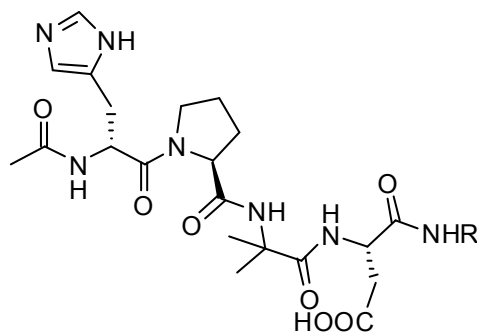
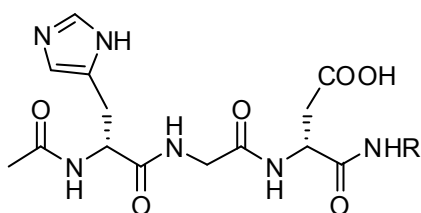
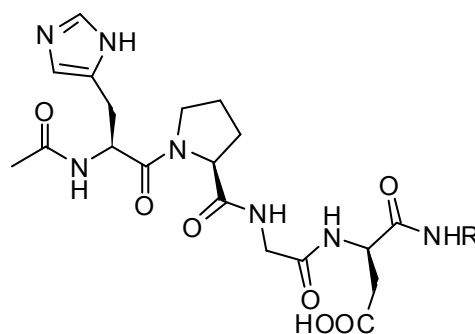
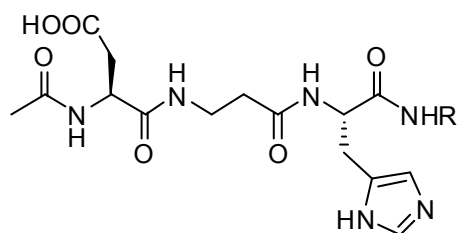
Tab. 8: *Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek 2 nach chemischer Reduktion.*

Die gefundenen Peptide unterscheiden sich von den aktiven Peptiden, die bei der Lichtreduktion identifiziert wurden, da hier vorwiegend Histidin- und Aspartat-haltigen Peptide detektiert wurden.

Die Reduktion mit Ascorbat wurde auch mit der Fluorophor-Bibliothek **91** durchgeführt und man erhielt orange Beads, welche nach Analyse mittels EC-GC ebenfalls eine Selektivität für Histidin zeigten (s. Anhang). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konzentrierten wir uns auf die im Screening der in Bibliothek **2** gefundenen aktiven Peptide.

3.2.6 Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Chemische Reduktion von Ag^+

Um die Eigenschaften der in den kombinatorischen Experimenten identifizierten Silber-Nanopartikel bildenden Peptide näher zu untersuchen, wurden verschiedene Peptide auf TentaGel und Rink-Amid-Harz unter Fmoc-Standard-Bedingungen nachsynthetisiert. Es wurden Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG/H **112a/b**, Ac-D-His-Pro-Aib-L-Asp-NH-TG/H **113a/b**, Ac-D-His-Gly-D-Asp-NH-TG/H **114a/b**, Ac-L-His-Pro-Gly-D-Asp-NH-TG/H **115a/b** und Ac-L-Asp- β -Ala-D-His-NH-TG/H **116a/b** in Anlehnung an die kombinatorischen Experimente synthetisiert (Abb. 64)

**Ac-L-His-Gly-L-His-NHR****112a**, R = TG**112b**, R = H**Ac-D-His-Pro-Aib-L-Asp-NHR****113a**, R = TG**113b**, R = H**Ac-D-His-Gly-D-Asp-NHR****114a**, R = TG**114b**, R = H**Ac-L-His-Pro-Gly-D-Asp-NHR****115a**, R = TG**115b**, R = H**Ac-L-Asp-β-Ala-D-His-NHR****116a**, R = TG**116b**, R = H**Abb. 64:** Synthetisierte Peptide 112a/b-116a/b.

Alle Peptide wurden unter den gleichen Bedingungen wie im kombinatorischen Screening behandelt und zeigten direkt nach der Zugabe von Ascorbat eine Farbänderung. Die Farben variieren von dunkelgelb über orange nach dunkelrot (Tab. 9).

Peptide auf TentaGel	Farbe nach chem. Reduktion	Silber Aufnahme mmol Ag/mmol Peptid
AcL-His-Gly-L-His-NHTG 113a	Dunkelrot	0.71
AcD-His-Pro-Aib-L-Asp-NHTG 114a	Dunkelgelb	0.44
AcD-His-Gly-D-Asp-NHTG 115a	Dunkelrot	0.58
AcL-His-Pro-Gly-D-Asp-NHTG 116a	Orange	0.64
AcL-Asp- β -Ala-D-His-NHTG 117a	Orange	0.59

Tab. 9: Farben der Peptide nach chemischer Reduktion.

Die relativ hohe Silber-Aufnahme durch die Peptide zeigt erneut die hohe Ag^+ -Affinität von Histidin und Aspartat. Anschließend wurde die Oberfläche der Beads untersucht. Im Fall der dunkelroten und orangen Beads wurden Silber-Partikel mit einer Größe zwischen 100-200 nm und im Fall der dunkelgelben Beads Partikel zwischen 50-100 nm gefunden (Abb. 65).

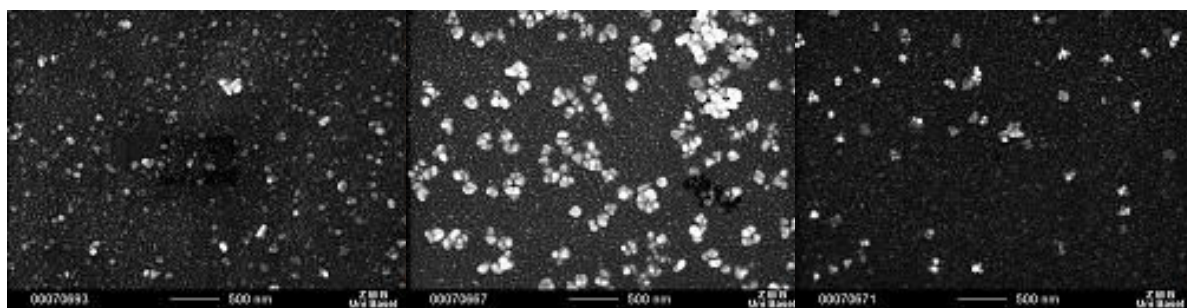


Abb. 65: Elektronenmikroskop-Aufnahmen von Links: Ac-L-Asp- β -Ala-D-His-NH-TG **116a**, Mitte: Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG **112a** und Rechts: Ac-D-His-Pro-Aib-L-Asp-NH-TG **113a**.

Aus diesen Experimenten erhielt man ähnliche Peptidsequenzen wie bei der Lichtreduktion. Um zu untersuchen, ob diese Peptide auch unter Licht Silber-Nanopartikel bilden können, wurden sie mit Ag^+ -Ionen inkubiert und anschließend mit Licht bestrahlt.

3.2.7 Experimente mit festphasengebundenen Peptiden: Lichtreduktion von Ag^+

Die Peptide **112a-116a** wurden mit den Bedingungen der Lichtreduktion behandelt und einzig im Fall von Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG **112a** wurde die Bildung von roten Beads beobachtet. Die Aspartat-haltigen Peptide zeigen farblose Beads, was dadurch erklärt werden kann, dass Aspartate stärkere Ag^+ -Komplexe bilden, die lichtstabil sind (Tab. 10). Dies zeigt, dass Histidin in Kombination mit Aspartat nicht durch Lichtreduktion, sondern nur durch chemische Reduktion Nanopartikel bilden.

Peptide auf TentaGel	Farbe nach Licht-Reduktion	Silber Aufnahme mmol Ag/mmol Peptid
AcL-His-Gly-L-His-NHTG 112a	Rot	0.71
AcD-His-Pro-Aib-L-Asp-NHTG 113a	Farblos	0.44
AcD-His-Gly-D-Asp-NHTG 114a	Farblos	0.58
AcL-His-Pro-Gly-D-Asp-NHTG 115a	Farblos	0.64
AcL-Asp- β -Ala-D-His-NHTG 116a	Farblos	0.59

Tab. 10: Farben der Peptide **112a-116a** nach Licht-Reduktion.

Die Oberflächen-Analyse von Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG **112a** mittels SEM zeigte Partikel mit einer Größe von 500 nm (Abb. 66).

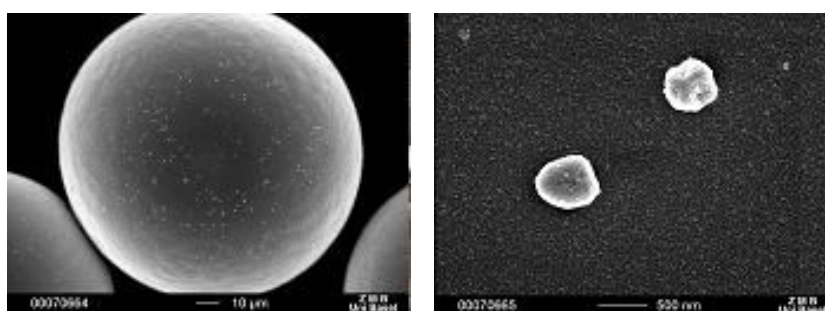


Abb. 66: Elektronenmikroskop-Aufnahmen von Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG **112a** nach Inkubation mit Ag^+ und Reduktion mit Licht.

Bei den farblosen Peptiden waren in wenigen Fällen isolierte Partikel auf vereinzelt Beads mit einer Größe von 500 nm erkennbar.

Bei den kombinatorischen Experimenten mit Licht wurden vorwiegend Peptide mit turn-dirigierenden Elementen und den Aminosäuren Histidin und Tyrosin gefunden (Tab. 5, S.91). Im Gegensatz dazu wurden mit der chemischen Reduktion eher Peptide mit einer willkürlichen Linkerposition und den Aminosäuren Histidin und Aspartat gefunden (Tab. 8, S.102).

Um den Einfluß der einzelnen Aminosäuren und Linker auf die Bildung der Silber-Nanopartikel zu untersuchen, wurden Sequenzen synthetisiert, bei denen z.B. Tyrosin durch Phenylalanin oder Histidin ersetzt ist und ACHC z.B. durch Glycin. Dazu wurden Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Phe-NH-TG/H **117a/b**, Ac-D-His-Gly-L-Tyr-NH-TG/H **118a/b**, Ac-D-His-L-Tyr-NH-TG/H **119a/b**, Ac-D-His-L-His-NH-TG/H **120a/b**, Ac-L-Cys-Gly-L-Ala-NH-TG/H **121a/b** und Ac-L-Asp-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H **122a/b** hergestellt und unter den gleichen Bedingungen (Reduktion mit Licht bzw. Vitamin C) behandelt (Abb. 67).

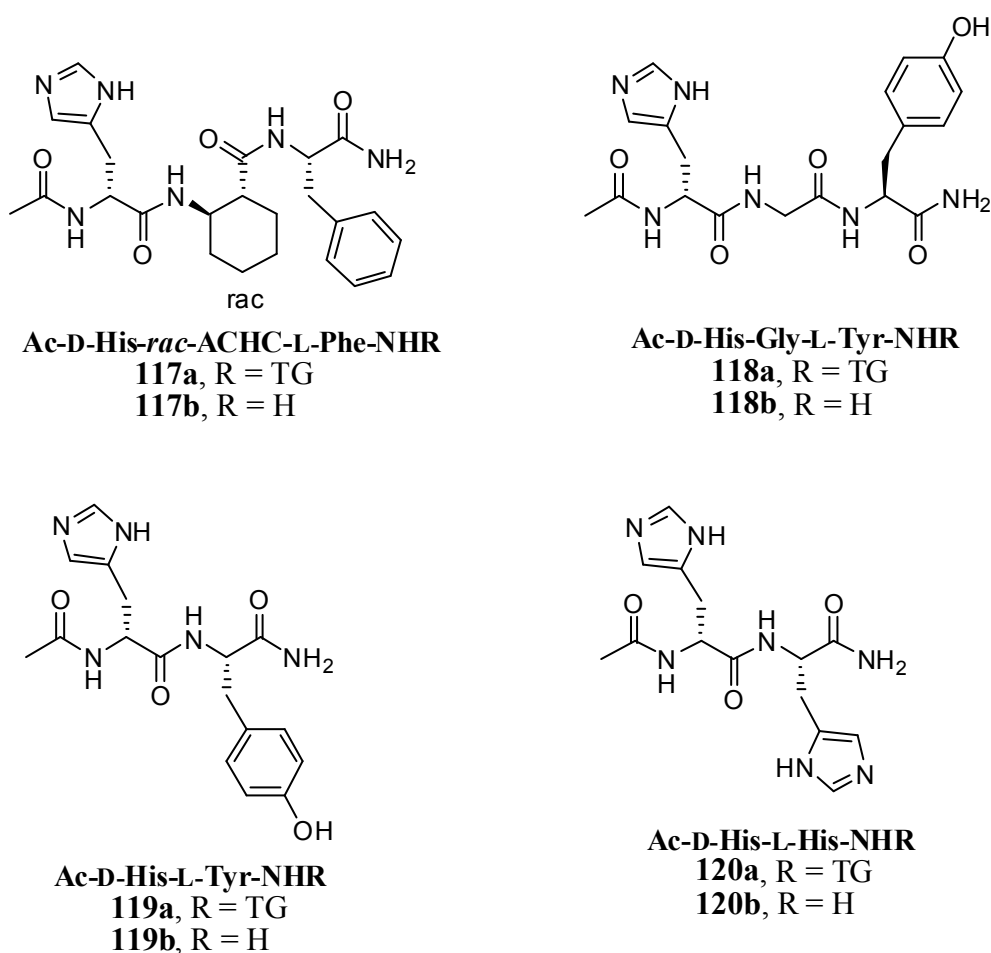


Abb. 67a: Synthetisierte Peptidsequenzen 117a/b-120a/b.

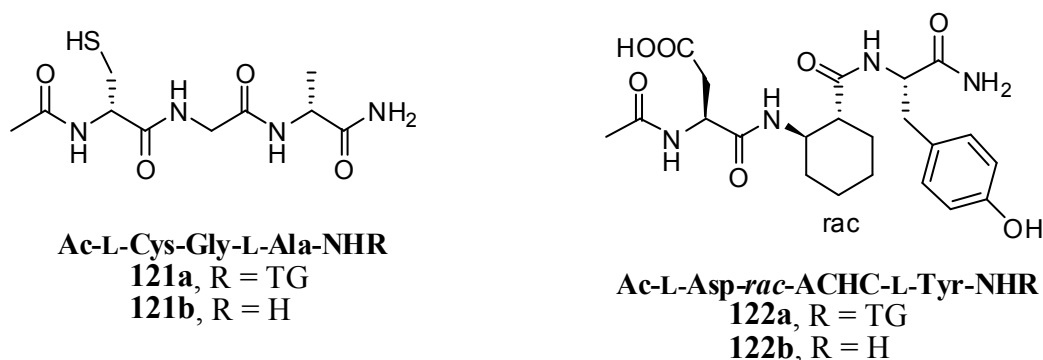


Abb. 67b: Synthetisierte Peptidsequenzen **121a/b-122a/b**.

Die festphasengebundenen Histidin-haltigen Peptide **117a-122a** zeigten nach Licht-Reduktion rote oder rotviolette Beads und nach chemischer Reduktion dunkelrote Beads. Das festphasengebundene Cystein-haltige Peptid **121a** wurde aus Vergleichsgründen synthetisiert, da Silber sowie Gold zu Schwefelliganden eine hohe Selektivität aufweisen. Die Beads der Peptide mit Cystein **121a** und Aspartat **122a** zeigten nach Lichtreduktion keine Farbänderung und nach chemischer Reduktion waren die Beads des Cystein-haltige Peptids orange und die des Aspartat-haltigen grau, was typisch für Aspartat-Sequenzen ist. Analyse der Oberflächen der Beads der Histidin-haltigen Peptide mit Licht-Reduktion zeigte Partikel zwischen 200-500 nm, mit chemischer Reduktion zwischen 100-200 nm. Im Falle des Cystein-haltigen Peptids **121a** konnten in keinem Fall Partikel gefunden werden, mit dem Aspartat-haltigen Peptid **122a** jedoch nach chemischer Reduktion aggregierte Partikel von ca. 400 nm.

Diese Ergebnisse zeigten auf, dass die Aminosäure Histidin für die Bildung der Nanopartikel ausschlaggebend ist und dass die Linkerposition nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Austausch von Histidin durch Aspartat liefert nur im Falle der chemischen Reduktion Nanopartikel, was die Lichtstabilität Aspartat-haltiger Peptide bestätigt.

Anschließend wurden Pulverdiffraktometrische Messungen durchgeführt, um etwas über den Zustand des auf der Oberfläche vorhandenen Silbers zu erfahren.

Wir untersuchten zum einen festphasengebundene Peptide, bei denen Ag^+ mit Licht reduziert wurde, wie z.B. Ac-D-His-*rac*-AHC-L-Tyr-NH-TG **92a** und Ac-L-His-*rac*-AHC-L-Tyr-NH-TG **93a**, konnten aber keine Silbersignale erkennen. Auch die mit Vitamin C behandelten festphasengebundenen Peptide Ac-D-Ser-*rac*-AHC-L-Tyr-NH-TG **94a**, Ac-L-Ser-*rac*-AHC-L-Tyr-NH-TG **95a** und Ac-L-Tyr-*rac*-AHC-D-Ser-NH-TG **96a** zeigten keine Signale.

Mit vielen festphasengebundenen Peptiden wie z.B. Ac-D-His-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG **107a** konnten nach chemischer Reduktion des Ag⁺ charakteristische Signale gefunden werden, die typisch für das Pulverdiffraktogramm des Silbers sind (Abb. 68).^[62]

Mit den so erhaltenen Daten aus den SEM-Aufnahmen in Kombination mit EDAX-Spektren und den Pulverdiffraktogrammen kann geschlossen werden, dass Silber in kristalliner Form auf den Oberflächen der Beads vorhanden ist.

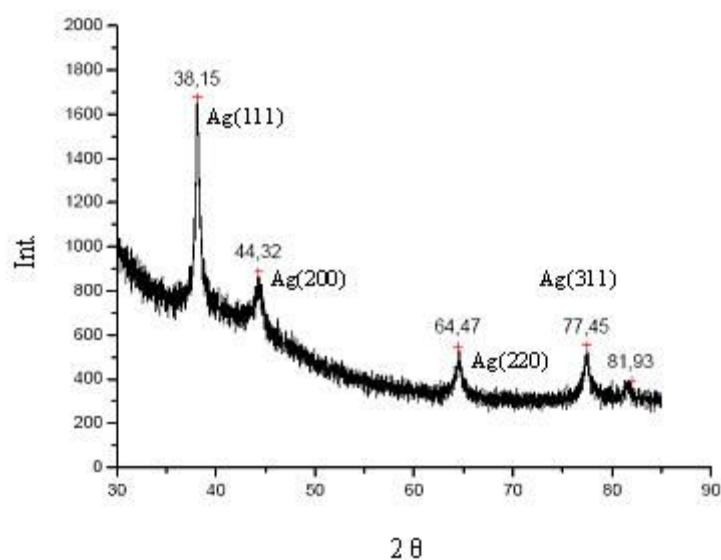


Abb. 68: Pulverdiffraktogramm von Ac-D-His-(*S,S*)-ACHC-L-Tyr-NH-TG **107a**.

3.2.8 Isothermische Mikrokolorimetrie Studien zur Inhibition von Bakterien

Dadurch, dass Silber-Nanopartikel auf Bead-Oberflächen durch bestimmte Peptide gebildet werden können, wurde ein Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a** ausgewählt und auf seine antibakteriellen Eigenschaften untersucht. In Zusammenarbeit mit Prof. A. U. Daniels und Dr. Ueli von Ah (Orthopädische Biomechanik, Biozentrum, Universität Basel) wurde zur Untersuchung die Methode der isothermischen Mikrokolorimetrie verwendet, mit der die Inhibition von Mikroorganismen evaluiert werden kann (*EMI-IMC = Evaluation of Microorganism Inhibition by Isothermal Microcalorimetry*). Die Methode liefert schnelle, sehr gut reproduzierbare Ergebnisse und die Inhibition kann mit antibakteriellen Lösungen und Feststoffen durchgeführt werden. Mit dieser Methode lässt sich bestimmen, inwiefern das Bakterienwachstum (Replikation) durch eine Substanz bei einer bestimmten Temperatur

inhibiert wird. Die Inhibition wird anhand der Wärmeproduktion bestimmt, denn sobald ein Bakterium gehemmt wird, nimmt die Replikation und somit die Wärmeproduktion ab.

Für die Experimente wurden ca. 10 mg des Peptids Ac-D-His-ACHCrac-L-Tyr-NH-TG **92a** mit einer 0.05 M AgNO₃-Lösung inkubiert, gewaschen und entweder 8 h bestrahlt (**LR92a**) oder mit einer Ascorbatlösung behandelt (**CR92a**). Desweiteren wurde auch das mit Iso-Nicotinsäure funktionalisierte Harz (**Isonic 6**) mit Silber behandelt und sollte neben acetyliertem TentaGel (**Acet 90**) und dem festphasengebundenen Peptid allein (**92a**) auf eventuelle Inhibition getestet. Als Bakterium wurde *Staphylococcus epidermidis* verwendet, welches in der Medizin als sehr gefährlich eingestuft wird und der häufigste Keim bei abwehrgeschwächten Personen darstellt.

Für die Messungen wurden die einzelnen Substrate zusammen mit den Bakterien, kultiviert in „brain-heart infusion serum“ (BHI), in die Messampullen eingeschlossen und die freiwerdende Wärme über einen Zeitraum von 24 h oder 48 h gemessen.

In Abbildung 69 sind die Ergebnisse mit dem festphasengebundenen Peptid **92a**, acetyliertem TentaGel **90** und dem mit Licht behandelten Peptid **LR92a** dargestellt. Die orange Kurve zeigt die Wärmeabgabe des Bakteriums ohne jegliche Substanzzugabe. Die anschließenden Versuche zeigten, dass das Bakterienwachstum durch das lichtreduzierte Peptid (**LR92a**) gehemmt wird, was an der fehlenden Wärmefreisetzung erkennbar ist (untersten Kurven). Erst ab etwa 28 h ist das Bakterium in der Lage sich zu replizieren. Mit acetyliertem TentaGel (**Acet 90**) und dem Peptid allein (**92a**) als Referenzen lässt sich keine nennenswerte Hemmung des Wachstums erkennen (mittlere Kurven) (Abb. 69).

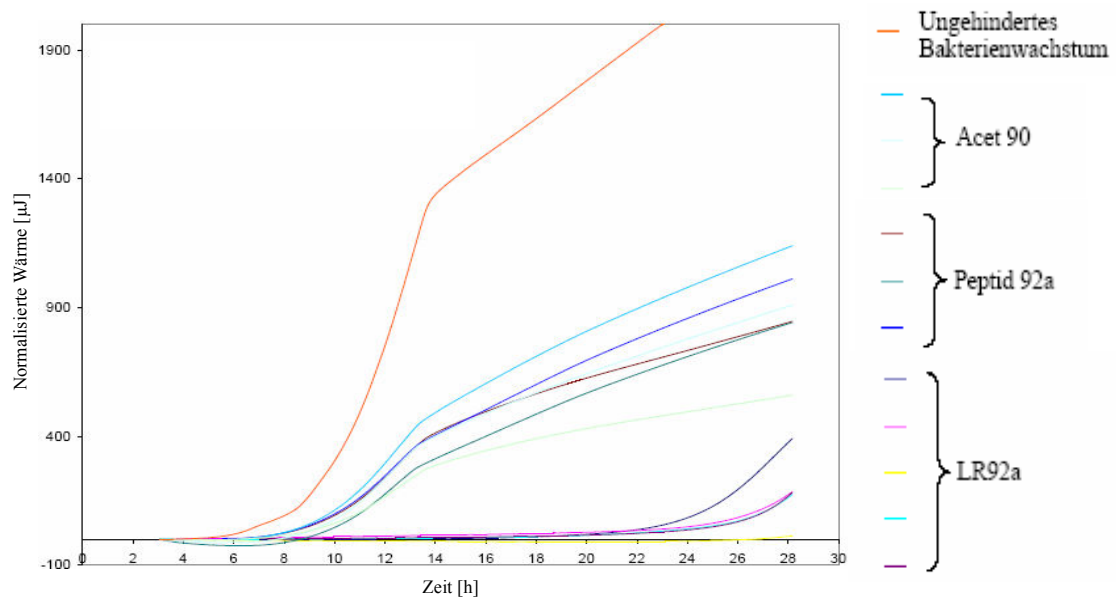


Abb. 69: Hemmung des Bakterienwachstums durch **LR92a** im Vergleich zu Acet-TG **90** und dem Peptid **92a**.

Die untenstehende Abbildung 70 zeigt die Hemmung des Bakterienwachstums mit dem festphasengebundenen Peptid **LR92a** im Vergleich zur festphasengebundenen iso-Nikotinsäure (**Isonic 6**). Iso-Nikotinsäure **Isonic 6** (mittlere Kurven) hemmt das Bakterienwachstum jedoch weniger stark im Vergleich zum Peptid **LR92a** (untere Kurven).

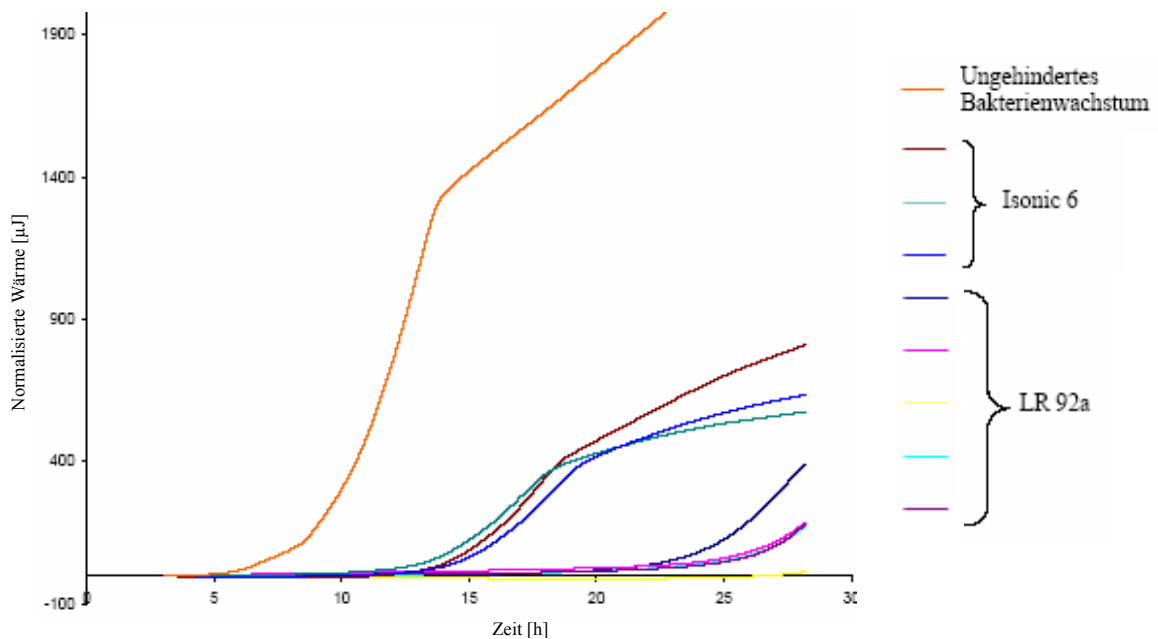


Abb. 70: Hemmung des Bakterienwachstums durch **LR92a** im Vergleich zu iso-Nikotinsäure **Isonic 6**.

In einem weiteren Experiment wurden die Peptide, bei denen Silber mit Licht (**LR92a**) oder chemisch reduziert (**CR92a**) wurde, miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 71 abgebildet und zeigt die Hemmung des Bakterien-Wachstums durch beide Peptide. Die Effizienz ist beim lichtreduzierten festphasengebundenen Peptid **LR92a** höher. In diesem Fall wird erst nach etwa 42 h wieder freiwerdende Wärme gemessen, wohingegen beim chemisch reduzierten festphasengebundenen Peptid **CR92a** die Hemmung schon nach 27 h erlischt (Abb. 71).

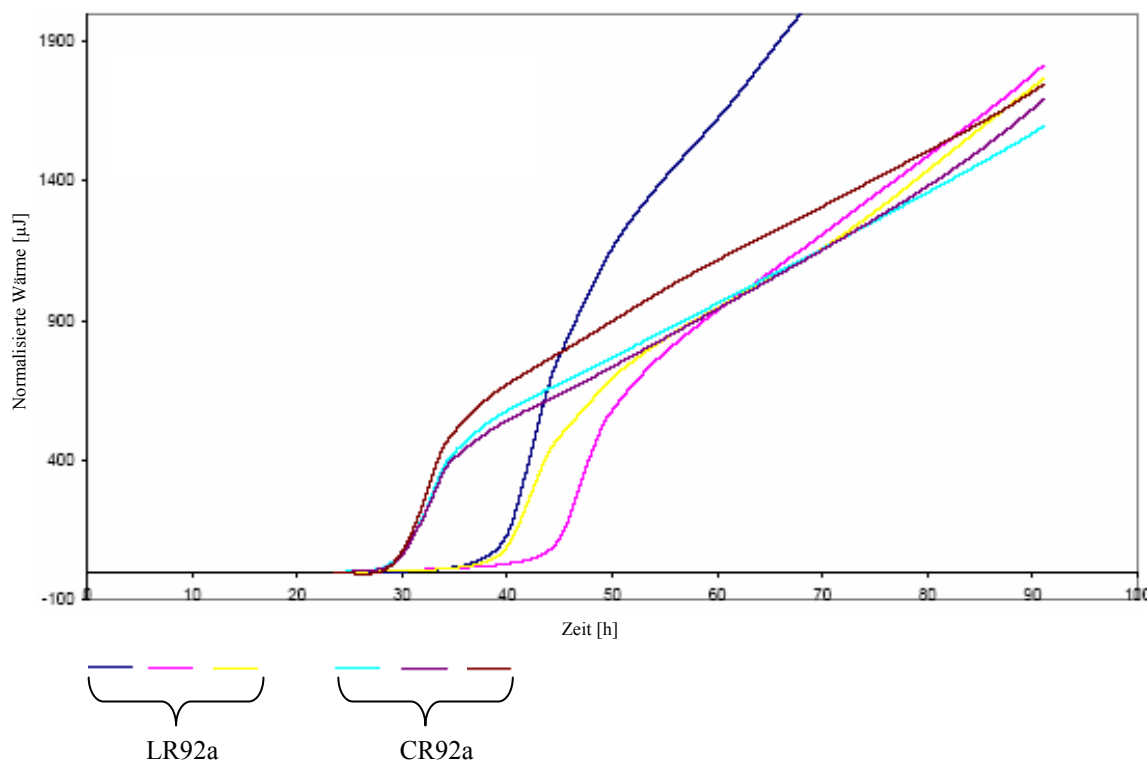


Abb. 71: Hemmung des Bakterienwachstums durch **LR92a** im Vergleich zu **CR92a**.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen licht- und chemisch reduzierter Probe könnte an der Oberflächenbeschaffenheit der Beads liegen. Im Falle des chemisch reduzierten Peptids **CR92a** sind die Beads homogen mit kleinen Silberpartikeln bedeckt, die während des Experimentes in der Lage sein können, viel Ag^+ freizusetzen. Wie schon in Kapitel 3.1.4 beschrieben, ist dies die antibakteriell aktive Form des Silbers. Da nun aber das „brain-heart-infusion serum“ (BHI)-Medium sehr viele Zusätze wie Chloridionen, Sulfhydrylgruppen und viele weitere funktionelle Gruppen enthält, kann das freigesetzte Silber damit reagieren und wird durch die resultierende Komplexbildung inaktiviert. Da bei der chemischen reduzierten Probe sehr viele Silberionen freigesetzt werden können, tritt

zusätzlich zur Hemmung des Bakteriums eine Reaktion mit dem Medium in Konkurrenz, was die kürzere Inhibitionszeit durch **CR92a** erklären würde.

Im Gegensatz dazu sind bei der lichtreduzierten Probe **LR92a** deutlich weniger Silberpartikel auf der Oberfläche vorhanden, was die Zahl an freizusetzenden Ionen einschränkt. Diese Ionen scheinen direkt mit dem Bakterium zu wechselwirken und die Reaktion mit dem Medium stellt keine Konkurrenz zur Inhibition dar, was die längere Hemmung des Wachstums erklären würde.

Tests in der Arbeitsgruppe von Prof. A. U. Daniels (Labor für orthopädische Biomechanik, Biozentrum Universität Basel) mit hohen Konzentrationen an AgNO_3 zur Bakterienhemmung zeigten auch Wechselwirkung von Ag^+ mit den Anionen aus dem verwendeten BHI-Medium.

Eine zweite mögliche Erklärung wäre, dass im Falle der Licht-Reduktion nicht alles Ag^+ zu Ag^0 reduziert wurde und daher noch vom Peptid komplexiertes Ag^+ vorhanden ist. Da Ag^+ die aktive Spezies ist, würde dies die längere Inhibition des Bakterien-Wachstums erklären. Im chemisch reduzierten Fall hingegen wurde wahrscheinlich der größte Teil an Ag^+ zu elementarem Silber reduziert, so dass die Bakterien-Replikation weniger lang gehemmt wird.

Diese ersten Experimente zeigten, dass das festphasengebundene Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG **92a** in Kombination mit Silberpartikeln ein potentieller Kandidat zur Hemmung des Bakterienwachstums darstellt. Vergleicht man die Versuche mit den festphasengebundenen Peptiden mit iso-Nikotinsäure funktionalisiertem TentaGel, so sind beide Peptide aktiver.

3.3 Studien zur Herstellung von Silber Nanopartikeln in Lösung mit Hilfe von Peptiden

Da mit verschiedenen festphasengebundenen Peptiden Silber-Nanopartikel auf den Bead-Oberflächen generiert werden konnten, wurde für die folgenden Untersuchungen in Lösung das Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH₂ **92b** näher untersucht. Es wurden auch ESI-Studien mit den restlichen Peptiden durchgeführt und Peptid-Silber-Komplexe in der Gasphase beobachtet (s. Vorschrift Exp. Teil)

3.3.1 UV-Vis-Studien

Da Silber-Nanopartikel durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich charakteristische Farben zeigen, wurde auch in dieser Arbeit untersucht, ob das identifizierte Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH₂ **92b** (TFA-Salz) in Lösung Nanopartikel bilden kann. Das Peptid wurde mit einer fünffachen Menge an AgNO₃-Lösung versetzt und mit der 15 W Lampe bestrahlt. Nach gewissen Zeitintervallen wurden UV-Vis-Spektren aufgenommen, wobei sich nach 4 h eine rötliche Verfärbung der Lösung zeigte mit gleichzeitigem Auftreten eines Maximums im Bereich zwischen 400 und 500 nm (Abb. 72).

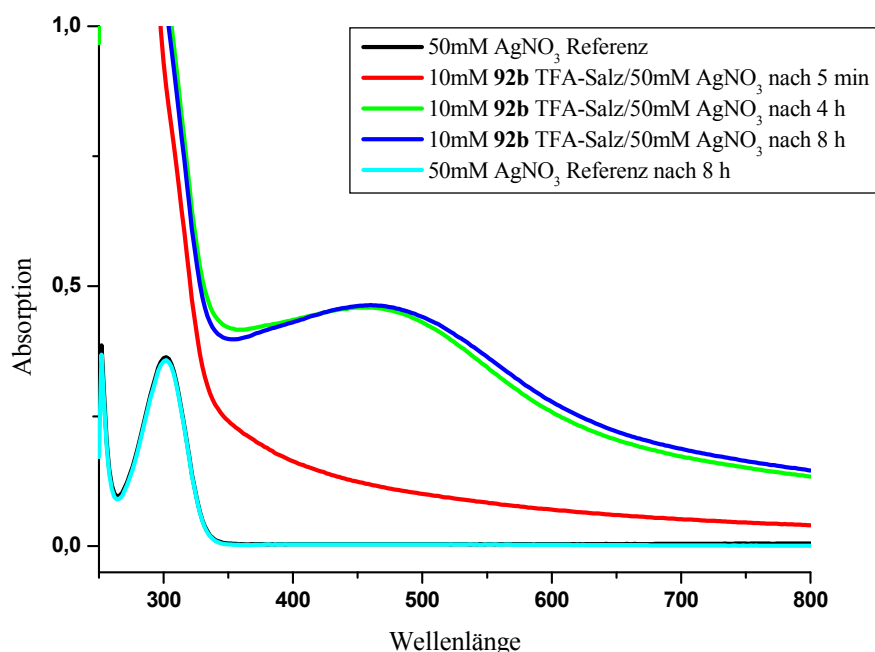


Abb. 72: UV-Vis-Messung mit Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH₂ **92b** (TFA Salz) und AgNO₃.

Anschließend wurde auch das entsalzte Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH₂ **92b** mit AgNO₃ inkubiert. Nach Reduktion des Ag⁺ mit Licht war die Lösung intensiver rot im Vergleich zum TFA-Salz Experiment. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das protonierte Imidazol des Histidin keinen guten Bindungspartner für Ag⁺ darstellt. Auch das Vorhandensein des TFA-Anions steht in Konkurrenz zum Imidazol als potentieller Ag⁺-Bindungspartner.^[63] Bei Experimenten mit anderen Peptiden, welche im Lichtexperiment farblos waren, wurde auch bei den UV-Vis-Messungen kein Maximum beobachtet, was die kombinatorischen Experimente bestätigt. Die Serin- und Tyrosin-haltigen Peptide waren in den meisten Fällen schlecht wasserlöslich, so dass die Experimente nicht durchgeführt werden konnten.

Andere Peptide-TFA-Salze, die im Lichtexperiment farbig waren, zeigten wenn überhaupt nur eine sehr schwache Färbung. Dieses Ergebnis erfordert daher die Verwendung der entsalzten Peptide.

Wird die chemische Reduktion unter den gleichen Bedingungen durchgeführt (5-facher Überschuß von Ag⁺ im Vergleich zum Peptid), so wird das überschüssige Silber so schnell reduziert, dass die komplette Küvette mit einem Silberspiegel überzogen ist und die Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden können. Zukünftige Versuche sollen mit einem Unterschuß an Silber durchgeführt werden.

3.3.2 TEM-Studien

Die Lösung aus 10 mM Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH₂ **92b** (TFA-Salz) und 50 mM AgNO₃ wurde mit Licht bestrahlt und die entstehende rote Lösung und mit Hilfe des Transmissions-Elektronenmikroskopes (TEM) untersucht. AgNO₃ liegt im Überschuß vor und kann auch nicht entfernt werden. Daher war es nicht verwunderlich, dass auch AgNO₃-Kristalle beobachtet wurden. Um später einen direkten Vergleich zu haben, wurde auch AgNO₃ alleine als Referenz vermessen. Die Untersuchungen mit der Referenz ergaben pflanzenartige Kristalle von AgNO₃, welche auch zum Teil in den Peptid-Silber-Proben gefunden wurden. In der Messlösung wurden auch Strukturen gefunden, die auf die gebildeten Partikel zurückzuführen sind. Analyse der TEM-Lösungen unter dem Rasterelektronen-Mikroskop zeigten auch kleine, untereinander aggregierte Partikel (Abb. 73).

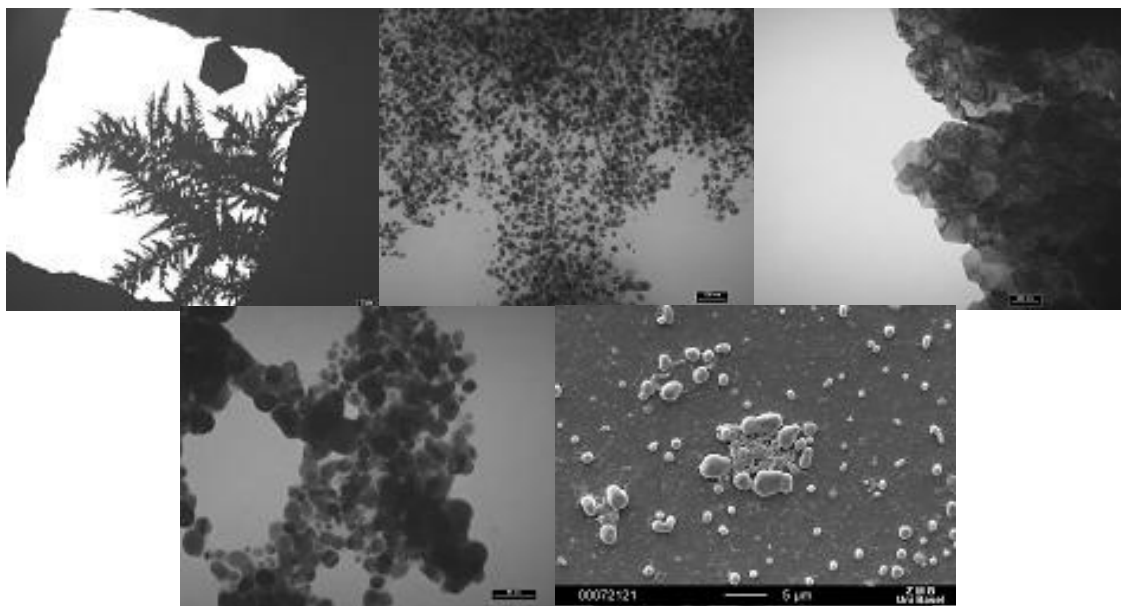


Abb. 73: TEM-Aufnahmen von Links oben: AgNO_3 ; Mitte, Rechts, Links unten: Peptid **92b** und Silber; Rechts unten: SEM Peptid **92b** und Silber.

3.3.3 NMR-Studien

Mit dem Peptid $\text{Ac-D-His-rac-ACHC-L-Tyr-NH}_2$ **92b** (TFA-Salz) wurde eine Ag^+ -Bindungskonstante in Wasser bestimmt. Dafür wurde das Peptid (2.2 mM) in $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ vorgelegt und mit unterschiedlichen Äquivalenten an Ag^+ in H_2O bei 600 MHz gemessen (s. Vorschriften Exp. Teil). Da die racemische Aminosäure ACHC **35** als Linker benutzt wurde, befinden sich in der Messlösung die beiden diastereomeren Peptide. Anhand der Experimente mit verschiedenen Äquivalenten an Silber, konnten Verschiebungen beobachtet werden, welche auf eine Silber-Bindung hindeuten. Die wichtigsten Signale sind an der untenstehenden Abbildung 74 aufgezeigt und die Signalverschiebungen sind in der dazugehörigen Tabelle 11 aufgeführt. Auch andere Protonen zeigen eine Verschiebung im ppb Bereich auf und sind zusammen mit den übereinandergelegten Spektren im Anhang zu finden.

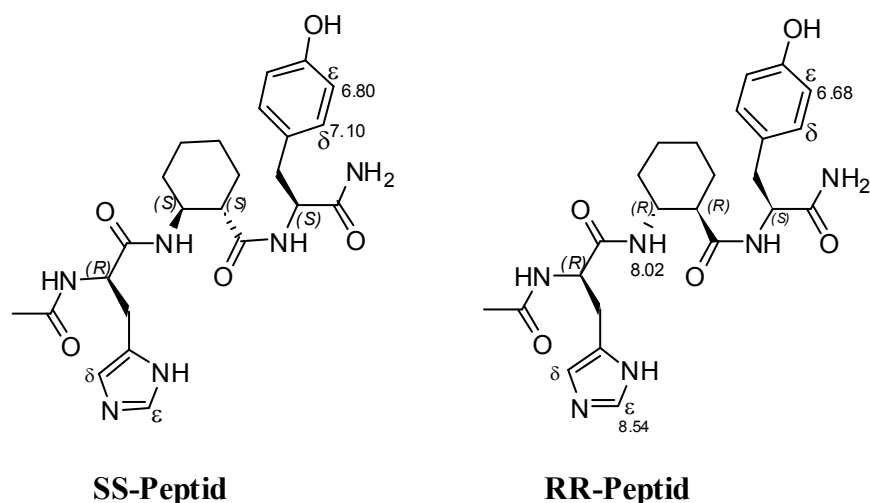


Abb. 74: Wichtigsten Signale im Diastereomergemisch.

	Equi. Ag ⁺	H ϵ -Tyr _{SS}	H ϵ -Tyr _{RR}	NH-turn _{RR}	H δ -Tyr _{SS}	NH ϵ -His _{RR}
Referenzpeak [ppm]	0	6.80	6.68	8.02	7.10	8.54
Verschiebung [Hz]	4.91	2.83	2.43	1.41	2.43	2.94
	24.6	4.99	4.86	7.17	5.38	18.2
	98.0	13.7	12.3	20.9	14.3	48.6
	250.8	31.2	28.7	35.5	32.0	77.6
	490.6	59.0	56.6	52.1	59.8	99.9
702.4	70.9	69.4	57.2	71.2	108.3	

Tab. 11: Signalverschiebungen definierter Signale.

Anhand der erhaltenen Daten ist eine Wechselwirkung zwischen den aromatischen Tyrosinprotonen und Silber zu erkennen, was auf eine Kation- π -Wechselwirkung hindeutet. Im Weiteren sind aber auch Amidprotonen der AHC-Aminosäure und das Imidazolproton des Histidins an der Bindung beteiligt.

Aus den Verschiebungen ergibt sich eine Ag⁺-Bindungskonstante von 2.13 M, was eine sehr schwache Bindung darstellt (Abb. 75).

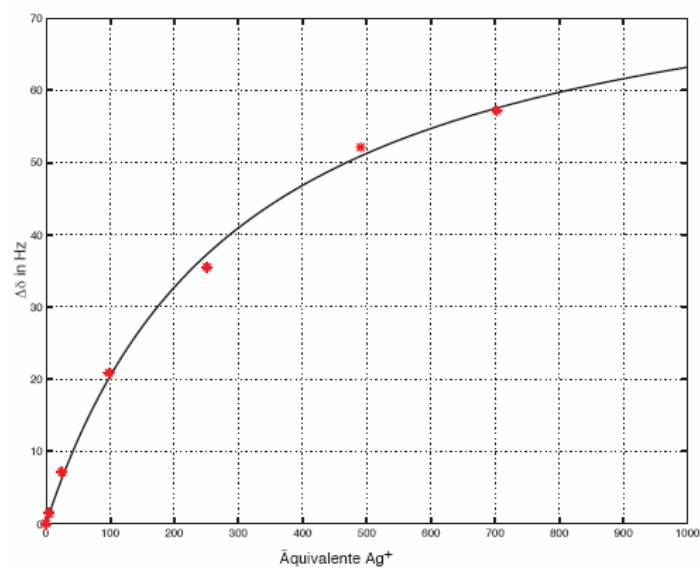


Abb. 75: Auftragung der Verschiebung gegen die Äquivalente an Silber.

Die schwache Bindung kann auch hier durch die Verwendung des TFA-Salzes erklärt werden. Zur genauen Untersuchung des Einflusses von TFA auf die Titration sollen die Experimente mit dem entsalzten Peptid durchgeführt werden.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein kombinatorischer Ansatz zur Identifizierung von Peptiden verwendet, die selektiv Ag^+ -Ionen binden. Durch Reduktion mit Licht bzw. Vitamin C konnten auf den Oberflächen der Harzkügelchen Silber-Nanopartikel generiert werden. Die Peptide, die Silber-Nanopartikel durch Lichtreduktion bilden, enthalten eine Kombination aus Histidin, *trans*-2-Aminocyclohexansäure und Tyrosin oder aus Serin, *trans*-2-Aminocyclohexansäure und Tyrosin. Alle durch Histidin-haltige Peptide und Licht gebildeten Nanopartikel färben die Oberflächen der Harzkügelchen rot, die durch Serin- und Tyrosin-haltige Peptide und Licht gebildeten Partikel färben sie orange. Mit Hilfe unterschiedlicher Peptidsequenzen wurden unterschiedlich große Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe zwischen 300 und 500 nm erhalten.

Die Herstellung der Nanopartikel durch Vitamin C erfolgt schneller als durch Licht und ist unabhängig von der Linkerposition. Nach chemischer Reduktion der Ag^+ -Ionen wurden Peptide erhalten, welche im Gegensatz zu den mit Licht reduzierten, eine Kombination aus Histidin und Aspartat enthielten. Es sind deutliche Farbabstufungen von rot nach gelb zu beobachten, mit Nanopartikeln kleiner 100nm bis zu einer Größe von 200 nm. Je heller die Oberflächen der Harzkügelchen bei der chemischen Reduktion gefärbt sind, desto kleiner sind die darauf vorhandenen Silber-Nanopartikel.

Nähere Untersuchungen mit dem Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H sowohl auf Festphase als auch in Lösung zeigten die Entstehung der Silber-Nanopartikel, was durch die auftretende rote Lösung und mittels UV-Vis-Studien, TEM und SEM bestätigt werden konnte.

Erste antibakterielle Studien zeigten, dass eine Wachstumshemmung des Bakteriums *Staph. epidermidis* durch das festphasengebundene Peptid in Kombination mit Silberpartikeln stattfindet. Die Bildung von Silber-Nanopartikeln durch definierte Peptide eröffnet somit die Möglichkeit zur Anwendung als Antibiotika.

Zur Entwicklung weiterer Peptide können neue Peptidbibliotheken mit verschiedenen Linkersystemen hergestellt werden, um noch gezielter den Einfluß bestimmter Peptidkonformationen zu studieren. Im Weiteren kann der Einfluß verschiedener Reduktionsmittel untersucht werden. Exakte Studien zu definierten Größen der Nanopartikel könnten mittels dynamischer Lichtstreuung durchgeführt werden.

Da viele der synthetisierten Peptide wasserunlöslich sind und somit für viele Studien (UV, NMR) nicht zugänglich sind, könnte man diese mit Polyethylenglykolketten (PEG) modifizieren und dadurch ihre Löslichkeit erhöhen.^[64]

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Struktur- und Bindungsaufklärung wäre eine geeignete Kristallisationsmethode der Peptide mit Silber.

Auch Untersuchungen mit dem Peptid Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG und Silber ohne anschließende Reduktion des Silbers sollen durchgeführt werden, um die Wichtigkeit der Nanopartikel zu bestimmen.

Es sollen auch Änderungen der Oberfläche von TentaGel zu Gold durchgeführt werden, was die Herstellung Cystein-modifizierter Peptide erfordert.

Neben der Anwendung als Antibiotika in der antibakteriellen Implantatforschung eröffnen sich auch Anwendungsbereiche in der Katalysatorforschung.

3.5 Literaturverzeichnis

- [1] a) K. J. Klabunde, *Nanoscale Materials in Chemistry* **2001**, Wiley and sons, New York; b) R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 12663.
- [2] a) J. Zhou, C. Leuschner, C. Kumar, J. Hormes, W. O. Soboyejo, *Materials Science and Engineering* **2006**, 26(8), 1451; b) Y. C. Cao, J. Rongchao, C. S. Thaxton and C. A. Mirkin, *Talanta* **2005**, 67(3), 449; c) R. Herrero-Vanrell, A. C. Rincon, M. Alonso, V. Reboto, I. T. Molina-Martinez, J. C. Rodriguez-Cabello, *Journal of Controlles Released* **2005**, 102(1), 113.
- [3] a) S. P. Mulvaney, M. D. Musick, C. D. Keating, M. J. Natan, *Langmuir* **2003**, 19, 4784; b) M. G. Cerruti, M. Sauthier, D. Leonard, D. Liu, G. Duscher, D. L. Feldheim, S. Franzen, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3282; c) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, 277, 1078; d) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607; e) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849; f) N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547.
- [4] a) M. A. Abu-Daibes, N. G. Pinto, *Chemical Engineering Science* **2005**, 60(7), 1901; b) F. E. Kruis, A. Goosens, H. Fissan, *Journal of Aerosol Science* **1996**, 27(1), 165; c) X. Peng, Z. Luan, J. Ding, Z. Di, Y. Li, B. Tian, *Materials Letters* **2005**, 59(4), 399.
- [5] a) J. T. Son, *Electrochemistry Coummunications* **2004**, 6(10), 990; b) H. Zheng, J. Huang, W. Wang, C. Ma, *Electrochemistry Coummunications* **2005**, 7, 990; c) L. Zhao, M. Steinhart, M. Yosef, S. K. Lee, S. Schlecht, *Sensors and Actuators* **2005**, 109(86), 86.
- [6] a) R. Kelsall, I. Hamley, M. Geoghegan, *Nanoscale Science and Technology* **2005**, Wiley and sons, Weinheim; b) W. L. Barnes, A. Dereux, T. W. Ebbesen, *Nature* **2003**, 424, 824; c) S. Eustis, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 209.
- [7] D. W. Lee, J. H. Yu, T. S. Jang, B. K. Kim, *Materials Letters* **2005**, 59(17), 2124.
- [8] G. Skandan, Y. J. Chen, N. Glumac, B. H. Kear, *Nanostructrued Materials* **1999**, 11(2), 149.
- [9] W. Hintz, V. Jordanova, T. Nikolov, J. Tomas, *Chemie Ingenieur Technik* **2003**, 75, 1132.
- [10] D. Adityawarman, A. Voigt, P. Veit, K. Sundmacher, *Chemical Engineering Science* **2005**, 60, 3373.
- [11] a) G. Chen, G. Luo, J. Xu, J. Wang, *Powder Technology* **2005**, 153(2), 90.

- [12] a) U. Schubert, *Chemie in unserer Zeit* **2005**, *39*, 3; b) C. Xue, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2036; c) S. Pal, Y. K. Tak, M. Song, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712; d) Z. S. Pillai, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B.* **2004**, *108*, 945; K. A. Bogle, S. D. Dhole, V. N. Bhorakar, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3204.
- [13] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters* **1995**, Springer Verlag, Berlin.
- [14] A. D. Russel, W. B. Hugo, *Progress in Medicinal Chemistry* **1994**, *31*, 351.
- [15] a) Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, T. Tsuchido, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4278; b) A. Gupta, M. Maynes, S. Silver, T. Tsuchido, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 5042.
- [16] L. Nover, K. D. Scharf, D. Neumann, *Mol. Cell. Biol.* **1983**, *3*, 1648.
- [17] a) Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. Q. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 662; b) Z. Hossain, F. Huq, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 398.
- [18] J. J. Zhu, S. W. Lin, O. Palchik, Y. Koltypin, A. Gedanken, *Langmuir* **2000**, *16*, 6396.
- [19] W. Tu, H. Liu, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 564.
- [20] Y. Nagata, Y. Watanananabe, S. Fujita, T. Dohmaru, S. Taniguchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *21*, 1620.
- [21] a) A. Henglein, *Langmuir* **2001**, *17*, 2329; b) X. Xu, Y. Yin, X. Ge, H. Wu, Z. Zhang, *Mater. Lett.* **1998**, *37*, 354.
- [22] A. Roucoux, J. Schulz, H. Patin, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3757.
- [23] a) I. Pastoriza, L. M. Liz-Marzan, *Langmuir* **1999**, *15*, 948; b) U. Nickel, A. Z. Castell, K. Poppel, S. Schneider, *Langmuir* **2000**, *16*, 9087; c) N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5723; d) L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, R. Novotny, J. Hrbac, R. Zboril, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 1099; e) Y. Saito, J. J. Wang, D. N. Batchelder, D. A. Smith, *Langmuir* **2003**, *19*, 6857.
- [24] a) A. Pal, T. Pal, *J. Raman.Spectrosc.* **1999**, *30*, 199; b) H. H. Huang, X. P. Ni, G. L. Loy, C. H. Chew, K. L. Tan, F. C. Loh, J. F. Deng, G. O. Xu, *Langmuir* **1996**, *12*, 909; c) F. Mafune, J. Y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8333; d) A. Henglein, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 444; e) R. C. Jin, Y. C. Cao, E. Hao, G. S. Metraux, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Nature* **2003**, *425*, 487.
- [25] Z. S. Pillai, P.V. Kamat, *J.Phys.Chem. B* **2004**, *108*, 945.
- [26] a) A. Ahmad, P. Mukherjee, P. Senapati, D. Mandal, M. Islam Khan, R. Kumar, *Colloid Surf B* **2003**, *28*, 313; b) N. Duran, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. Souza, *J Nanotechnol* **2005**, *3*, 8; c) P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati,

- S. R. Sainkar, M. I. Khan, *Nano Lett* **2001**, *1*, 515; d) R. Joerger, T. Klaus, C. G. Granqvist, *Adv Mater* **2000**, *12*, 407.
- [27] N. Vigneshwaran, N. M. Ashtaputre, P. V. Varadarajan, R. P. Nachane, K. M. Paralikar, R. H. Balasubramanya, *Materials Letters* **2007**, *61*, 1413.
- [28] A. R. Shahverdi, S. Minaeian, H. R. Shahverdi, H. Jamalifar, A.-A. Nohi, *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 919.
- [29] R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, M. O. Stone, *Nature Mater.* **2002**, *1*, 169.
- [30] S. Satyabrata, T. K. Mandal, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3160.
- [31] R. Selvakannan, A. Swami, D. Srisathiyanarayanan, P. S. Shirude, R. Pasricha, A. B. Mandale, M. Sastry, *Langmuir* **2004**, *20*, 7825.
- [32] a) R. C. Prince, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 286; b) B. M. Hoffman, J. E. Roberts, C. H. Kang, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6556; c) M. Sivaraja, D. B. Goodin, M. Smith, B. M. Hoffman, *Science* **1989**, *245*, 738; d) M. Sahlin, G. Lassmann, S. Potsch, A. Slaby, B.-M. Sjoberg, A. Graslund, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11699; e) F. Lenzian, M. Sahlin, F. MacMillan, R. Bittl, R. Fiege, S. Potsch, B.-M. Sjoberg, A. Graslund, W. Lubitz, G. Lassmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8111; f) C. Essenmacher, S. T. Kim, M. Atamian, G. T. Babcock, A. Sancar, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1602; g) P. F. Heelis, T. Okamura, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5694.
- [33] S. Satyabrata, R. R. Bhattacharjee, A. Banerjee, T. K. Mandal, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1256.
- [34] S. Kobayashi, N. Hamasaki, M. Suzuki, M. Kimura, H. Shirai and K. Hanabusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6550.
- [35] E. D. Sone, E. R. Zubarev and S. I. Stupp, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1705.
- [36] Y. Yang, M. Suzuki, S. Owa, H. Shirai and K. Hanabusa, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1644.
- [37] C. L. Chan, J. B. Wang, J. Yuan, H. Gong, Y. H. Liu and M. H. Liu, *Langmuir* **2003**, *19*, 9440.
- [38] M. Kimura, S. Kobayashi, T. Kuroda, K. Hanabusa and H. Shirai, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 335.
- [39] C. S. Love, V. Chechik, D. K. Smith, K. Wilson, I. Ashworth and C. Brennan, *Chem. Commun.*, **2005**, 1971.
- [40] P. K. Vemula and G. John, *Chem. Commun.* **2006**, 2218.
- [41] S. Ray, A. K. Das, A. Banerjee, *Chem. Commun.* **2006**, 2816.

- [42] a) G. Mie, *Annalen der Physik* **1908**, 25, 377; b) H. Siedentopf, R. Zsigmondy, *Annalen der Physik* **1903**, 10, 1.
- [43] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, 147, 145.
- [44] S. Schulz, D. R. Smith, J. J. Mock, D. A. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 996.
- [45] a) A. J. Haes, C. L. Haynes, A. D. McFarland, S. Zou, G. C. Schatz, R. P. V. Duyne, *MRS Bull.* **2005**, 30, 368; b) C. Sönnichsen, *Dissertation 2001*, LMU, München; c) C. Sönnichsen, B. M. Reinhardt, J. Liphardt, P. Alivisatos, *Nature Biomater.* **2002**, 23, 741.
- [46] J. R. Benger, A. J. Kelly, I. G. Winson, *J R Coll Surg Edinb* **1998**, 43(1), 43.
- [47] D. J. Kilgus, D. J. Howe, A. Strang, *Clin. Orthop.* **2002**, 404, 116.
- [48] A. G. Gristina, P. T. Naylor, Q. N. Myrvik, *The Orthopedic Clinics of North America* **1991**, 22, 363.
- [49] M. Kramthoft, S. Bodtker, A. Carlsen, *Journal of Arthroplasty* **1994**, 9, 617.
- [50] A. G. Gristina, C. D. Hobgood, L. X. Webb, Q. N. Myrvik, *Biomaterials* **1987**, 8, 423.
- [51] P. Kingshott, J. Wie, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, L. Gram, *Langmuir* **2003**, 19, 6912.
- [52] J. A. Nagel, R. B. Dickenson, S. L. Cooper, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1996**, 7, 769.
- [53] P. Wu, D. W. Grainger, *Biomaterials* **2006**, 27, 2450.
- [54] A. Gupta, S. Silver, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 888.
- [55] R. A. Bologna, L. M. Tu, M. Polansky, H. D. Fraimow, D. A. Gordon, K. E. Whitmore, *Urology* **1999**, 54, 982.
- [56] A. Masse, A. Bruno, M. Bosetti, A. Biasibetti, M. Lamas, P. Gallinaro, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 53, 600.
- [57] E. Sheehan, J. McKenna, K. J. Mulhall, P. Marks, D. McGormack, *J. Orthop. Res.* **2004**, 22, 39.
- [58] R. Kumar, H. Munstedt, *Biomaterials* **2005**, 26, 2081.
- [59] F. Furno, K. S. Morley, B. Wong, B. L. Sharp, P. L. Arnold, S. M. Howdle, R. Bayston, P. D. Broun, P. D. Winship, H. J. Reid, *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54, 1019.
- [60] Adeline Robin, *Dissertation 2005*, Universität Basel.
- [61] a) K. Nomiya, H. Yokoyama, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 2483; b) K. Nomiya, S. Takahashi, R. Noguchi, S. Nemoto, T. Takayama, M. Oda, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 3301.
- [62] R. W. G. Wyckoff, *Crystal Structures* 1963, 1, 7.

- [63] X. L. Lu, W. K. Leong, L. Y. Goh, A. T. S. Hor, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2504.
- [64] J. Grun, J. D. Revell, M. Conza, H. Wennemers, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6197.

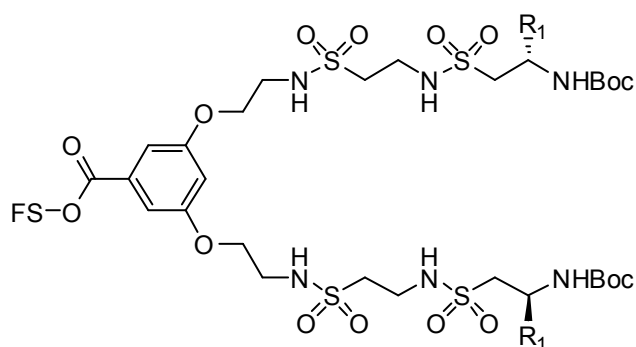
**SYNTHESE NEUER WASSERLÖSLICHER
DIKETOPIPERAZIN-REZEPTOREN UND
DEREN BINDUNGSEIGENSCHAFTEN**

4. Synthese neuer wasserlöslicher Diketopiperazin-Rezeptoren und deren Bindungseigenschaften

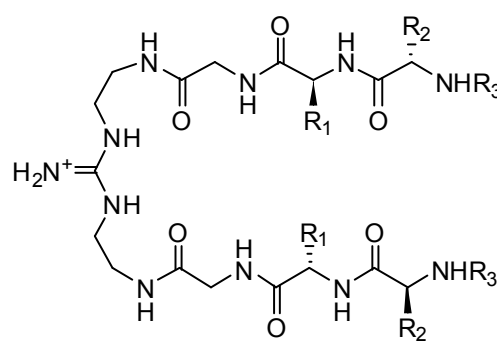
4.1 Einleitung

Da der Bedarf an Therapeutika, die auf selektiver Erkennung basieren, ständig steigt, wurden in den letzten Jahren viele synthetische Rezeptoren mit spezifischen Bindungseigenschaften entwickelt.^[1-4] Da die Erkennung zwischen großen Biomolekülen ein sehr komplexer Prozeß ist, hat man sich auf die Erkennung kleinerer Moleküle, insbesondere Peptide, konzentriert. Die Peptid-Rezeptoren könnten dabei nicht nur als neue Wirkstoffe, sondern auch für die Trennung von Peptidmischungen,^[5] als Modell für natürliche Peptid-Peptid-Wechselwirkungen oder für die Entwicklung spezifischer Sensoren dienen.^[1,6] Die Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen ist ein sehr empfindlicher Prozeß, wobei kleine strukturelle Modifikationen zu erheblichen Änderungen in den Bindungseigenschaften führen können. Um Peptide zu erkennen und Bindungseigenschaften untersuchen zu können, sind spezielle Rezeptoren notwendig. Diese bestehen aus einem Templat, welches mit Erkennungselementen funktionalisiert ist.^[1,7] Während die Elemente für die Selektivität verantwortlich sind, bildet das Templat das Grundgerüst und dirigiert die Elemente in eine für intermolekulare Wechselwirkung geeignete Position. Die Wahl des Templates ist also ausschlaggebend für die Bindungseigenschaften eines Rezeptors.

Im Lauf der letzten Jahre wurden vor allem zweiarmige Rezeptoren entwickelt, die selektiv peptidische Gastmoleküle erkennen.^[8-13] Ihre Strukturmerkmale variieren dabei von peptidischen und sulfono-peptidischen Strukturen,^[8,9] über zweiarmige makrobizyklische Rezeptoren^[10-12] hin zu guanidinbasierten Rezeptoren für die Erkennung von Carboxyl-Funktionen (Abb. 76).^[13]



Liskamp et al. 1996



Kilburn / Bradley 1998

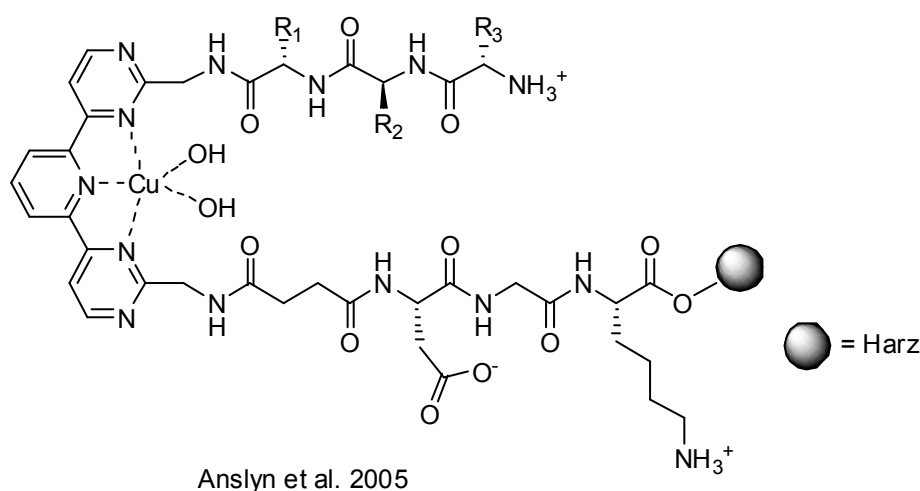


Abb. 76: Beispiele zweiarmiger Rezeptoren.

Zu dieser Rezeptoren-Klasse zählen auch die in der WENNEMERS-Gruppe entwickelten Diketopiperazin-Rezeptoren, die auf Cyclodi- γ -aminoprolin basieren, welches mit zwei peptidischen Armen funktionalisiert ist (Abb. 77).^[14]

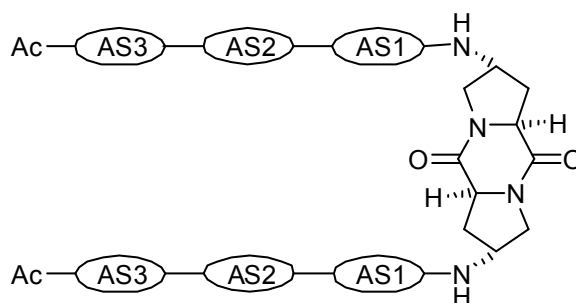


Abb. 77: Struktur eines zweiarmigen Diketopiperazin-Rezeptors.

Dabei dient das Templat als rigides, strukturdirigierendes Grundgerüst und bringt beide Arme in eine Position, aus der eine Bindung möglich ist.^[14c] Zum Aufbau der Rezeptorarme können sowohl *L*- als auch *D*-Aminosäuren verwendet werden, welche mittels Standard-Peptidsynthese an das Templat gekuppelt werden. Sie ermöglichen nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen. Konventionelle und kombinatorische Bindungsstudien zeigten, dass Diketopiperazin-Rezeptoren in organischen und wässrigen Lösungsmitteln kurzkettige Peptide mit hoher Sequenzselektivität und Bindungsaffinitäten von $\Delta G = -5$ bis -6 kcal/mol binden.^[14e,15] Strukturelle Modifikationen, wie z.B. der Austausch des Templates gegen andere Diamine,

führen zu weniger selektiven Rezeptoren oder dem vollständigen Verlust der Bindungseigenschaften.^[14c]

4.2 Design der wasserlöslichen Diketopiperazin-Rezeptoren

Die WENNEMERS-Gruppe entwickelte kürzlich einen wasserlöslichen Diketopiperazin-Rezeptor **7**, welcher in kombinatorischen Experimenten mit einer Peptidbibliothek hohe Selektivität für Arginin-reiche Peptide zeigte.^[15] Dispersrot **5** markiertes Tyrosin in der ersten Position der Rezeptorarme ermöglichte hierbei ein „on-bead Screening“. Die Aminosäure Aspartat und Bernsteinsäure wurden verwendet, um den Rezeptor zum einen wasserlöslich zu machen und zum anderen, um eine Affinität für basische Aminosäurereste zu erzielen (Abb. 78).

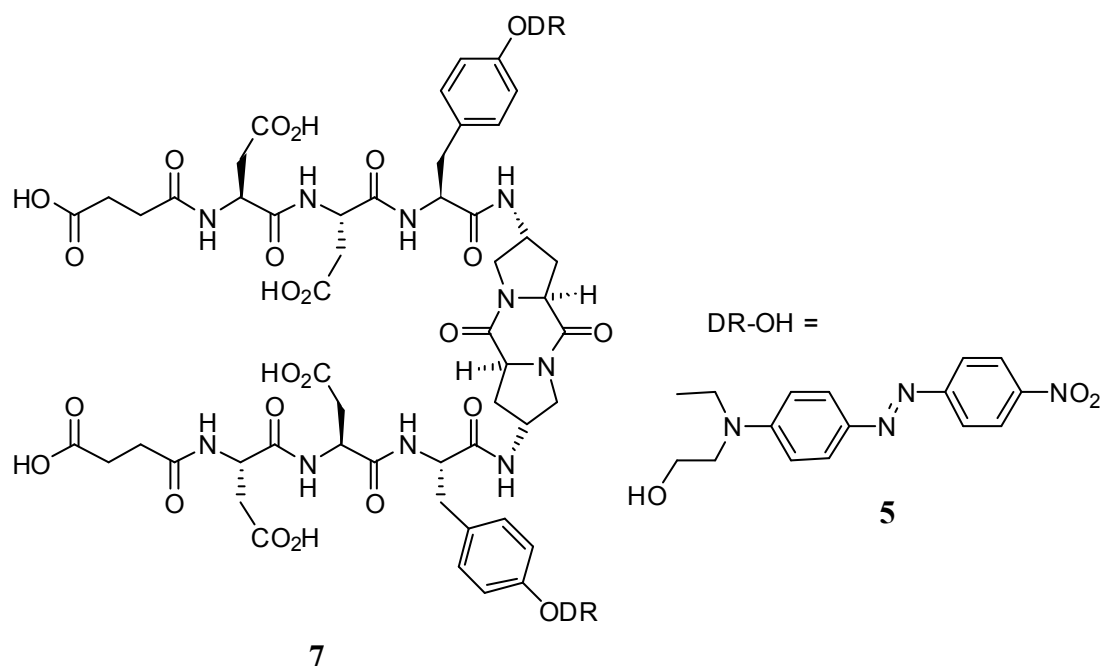


Abb. 78: Struktur des wasserlöslichen Rezeptors **7**.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Dispersrot **5** an sich keine Bindung zu Peptiden eingehen kann und, dass die Rezeptoren ohne den Farbstoff keine Peptide binden können.^[16] Folglich spielt der Farbstoff oder zumindest einzelne in ihm enthaltene Strukturelemente für die Wechselwirkung eine wichtige Rolle. Um den Einfluß dieser aromatischen Elemente näher zu untersuchen, wurden zusätzlich zum mit Dispersrot markierten Rezeptor neue wasserlösliche Rezeptoren entwickelt, die verschiedene Fragmente des Farbstoffes enthalten.

Dazu wurden zwei Tyrosin-Rezeptoren **8**, **10** und ein Phenylalanin-Rezeptor **9** synthetisiert und an das Diketopiperazin Templat **84** gekuppelt (Abb. 79).

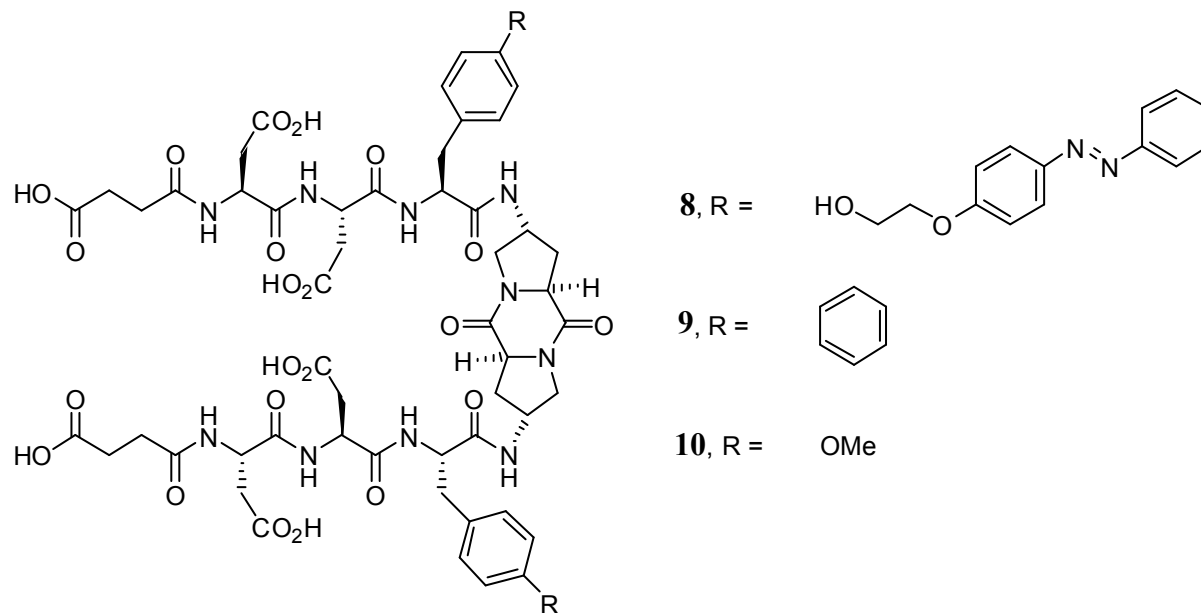
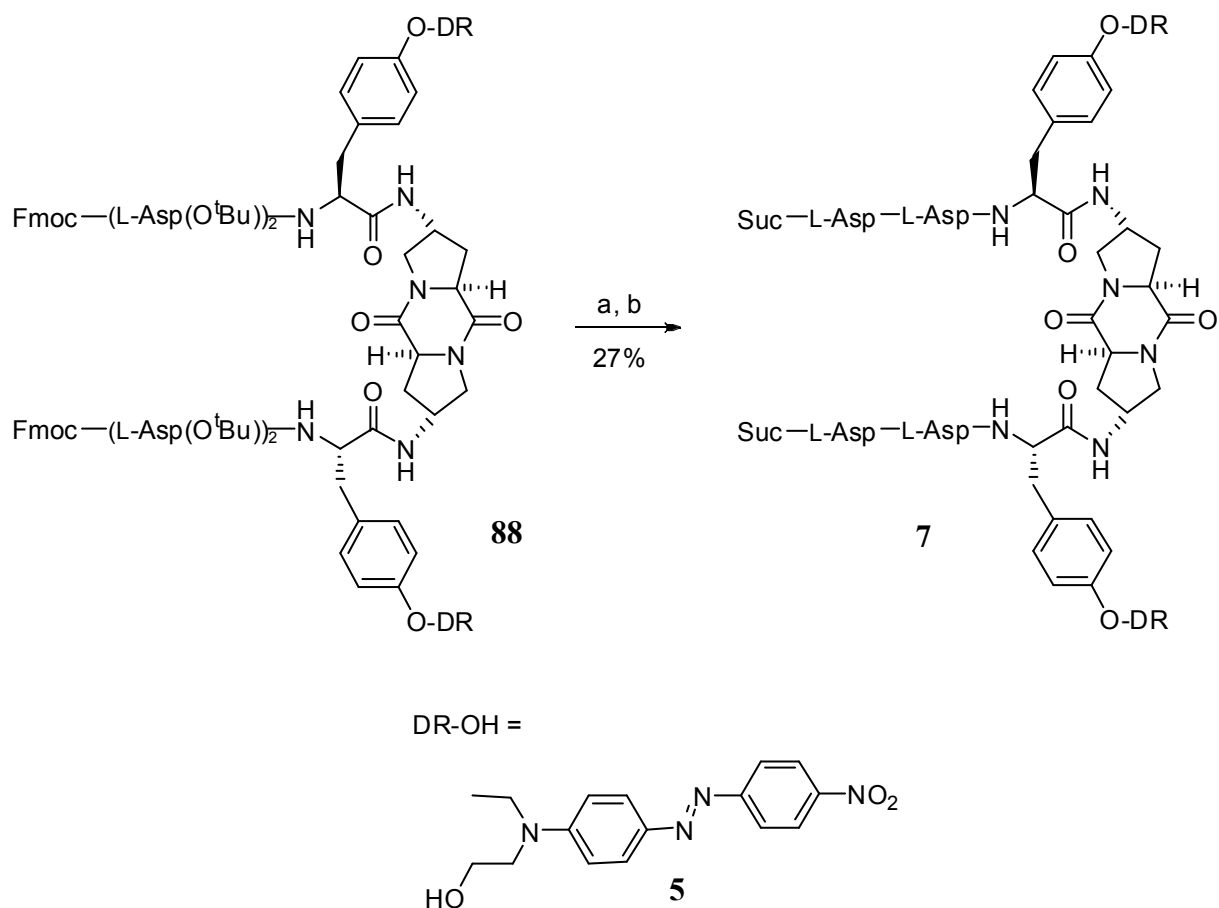


Abb. 79: Wasserlösliche Diketopiperazin Derivate.

4.3 Synthese der wasserlöslichen Diketopiperazin-Rezeptoren

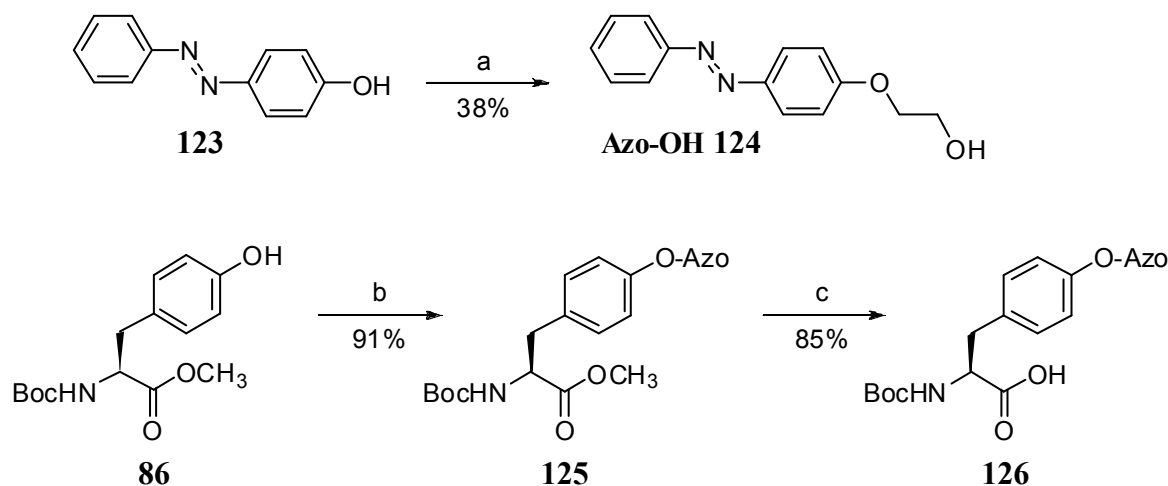
Der Dispersrot markierte Rezeptor **7** wurde ausgehend von Verbindung **88** (Kap. 2) durch Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid und anschließender Abspaltung der *tert*-Butyl Schutzgruppen mit TFA in CH_2Cl_2 hergestellt. (Schema 11).



- (a) *i*: TAEA (30 eq), CH_2Cl_2 , DMF, RT, 1 h; *ii*: Bernsteinsäureanhydrid (20 eq), CH_2Cl_2 , RT, 1.5 h;
(b) TFA/ CH_2Cl_2 (2:1), RT, 1 h.

Schema 11: Synthese des Dispersrot markierten Rezeptors **7**.

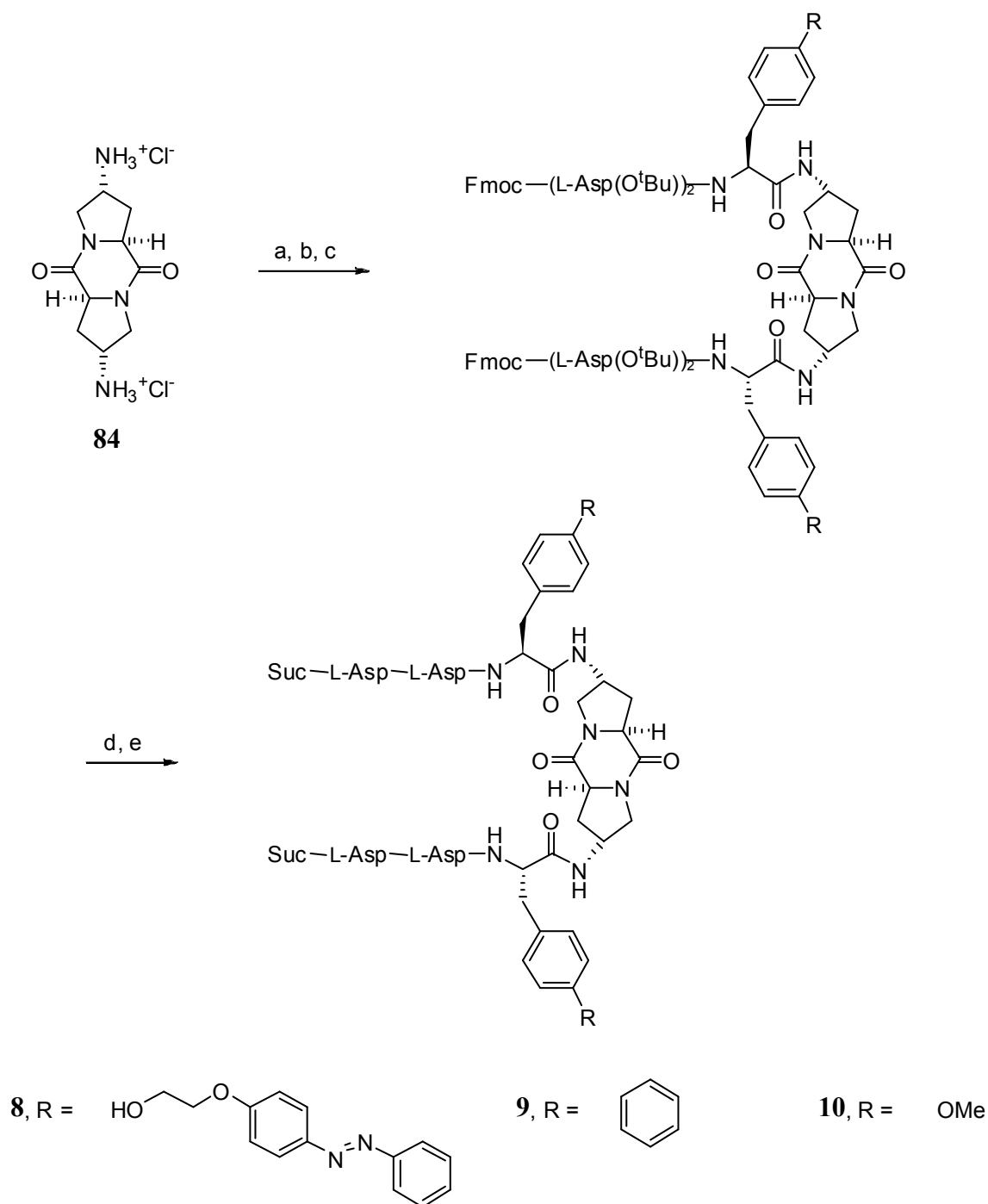
Zur Synthese der verschiedenen Rezeptoren wurde das Azo-Derivat **124**, das mit Hilfe einer S_N -Reaktion aus **123** hergestellt wurde, durch eine Mitsunobu Reaktion an die Phenolgruppe des *N*-Boc-*L*-Tyrosin Methylester **86** gekuppelt. Anschließend wurde der Methylester **125** verseift und man erhielt das Azo markierte Tyrosin **126** (Schema 12).



(a) 2-Bromethanol (1.8 eq), K_2CO_3 (3.8 eq), DMF, 80 °C, 16 h; (b) Azo-OH (1.0 eq), PPh_3 (1.0 eq), DIAD (1.3 eq), Toluol, RT, 20 h; (c) TFA/MeOH (1:1), NaOH (2.7 eq), H_2O , RT, 12 h.

Schema 12: Synthese des *N*-Boc-*L*-Tyr(Azo)-OH Bausteins **126**.

Ausgangsverbindung für die Synthesen der Rezeptoren **8**, **9** und **10** war das Diketopiperazin-Templat **84**. Zum Aufbau der Seitenarme wurde das Diamin **84** mit Azo-, Phenyl- und OMe-funktionalisiertem *N*-Boc-*L*-Tyr-OH unter Verwendung von HCTU als Kupplungsreagenz verknüpft. Die Boc-Gruppen wurden mit HCl in Dioxan abgespalten und die beiden weiteren Kupplungen von Fmoc-*L*-Asp(O^tBu)-OH erfolgten ebenfalls mit HCTU als Kupplungsreagenz und TAEA oder Et_2NH für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Gruppe wurden die *N*-Termini der Rezeptorarme mit Bernsteinsäureanhydrid acyliert. Abspaltung des *tert*-Butylesters der Aspartate unter sauren Bedingungen führte zu den Rezeptoren **8**, **9** und **10** (Schema 13).

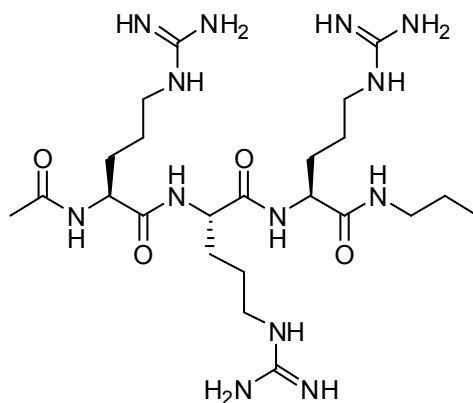


(a) *N*-Boc/Fmoc-L-Tyr(R)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ¹Pr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 42 % (Azo) **127**, 59 % (Bip), 75 % (OMe); (b) *i*: 4 M HCl/Dioxan, MeOH, RT, 1 h oder DEA (30 eq), DMF, RT, 1 h; *ii*: Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ¹Pr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 76 % (Azo), 75 % (OMe), 67 % (Bip) (c) *i*: DEA (30 eq), DMF, RT, 1 h; *ii*: Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH (4.0 eq), HCTU (4.0 eq), ¹Pr₂NEt (4.0 eq), DMF, CH₂Cl₂, RT, 1 h, quant. (Azo), 78 % (OMe), 84 % (Bip); (d) Bernsteinsäureanhydrid (20 eq), CH₂Cl₂, RT, 1.5 h, 85 % (Azo), 76 % (OMe), 71 % (Bip); (e) TFA/CH₂Cl₂ (1:1), RT, 1 h, 96 % (Azo), quant. (OMe), 98 % (Bip).

Schema 13: Synthese der Rezeptoren **8**, **9** und **10**.

4.4 Bindungsaffinitäten der Rezeptor-Peptid Komplexe

Zur Untersuchung des Einflusses der neuen Bausteine wurden die Bindungseigenschaften der Rezeptoren **8-10** gegenüber dem Tripeptid Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr **128** untersucht (Abb. 80). Dieses Peptid wird von dem Dispersrot markierten Rezeptor 7 mit einer Affinität von $\Delta G = -5.7$ kcal/mol gebunden. Das Peptid wurde mittels Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese auf Wang-Harz hergestellt.^[17]



128

Abb. 80: Arginin-reiches Gastpeptid.

Die Bindungsaffinitäten der Rezeptoren wurden mit Hilfe von isothermischer Kalorimetrie (ITC) bestimmt. Diese Methode ist sehr empfindlich und wurde z.B. von HAMILTON und Mitarbeitern zur Bestimmung von Wirt-Gast Stöchiometrien zwischen Guanidin und Carboxylaten benutzt.^[18] ITC beruht auf dem Prinzip, dass ein Bindungspartner zum anderen titriert wird und die dabei aufgenommene oder abgegebene Wärme ΔH gemessen wird. Die Messapparatur besteht aus zwei thermostatisierten und isolierten Zellen zu je 1-1.5 mL Volumen, wobei die Temperatur der Zellmütel konstant gehalten wird (isotherme Bedingungen). Durch die schwach geheizte Referenzzelle fließt ein konstanter Strom und die Probenzelle wird Feedback-kontrolliert aufgeheizt, so dass sie dieselbe Temperatur aufweist wie die Referenzzelle. Läuft in der Probenzelle nun eine Reaktion ab, bei der Wärme frei wird, so wird der Strom durch den Feedback Mechanismus gedrosselt. Wird bei der Reaktion Wärme aufgenommen, muß der Heizstrom verstärkt werden. Die Veränderung der Stromstärke wird als positives oder negatives Signal registriert. Das Kalorimeter misst die Stromstärke in der Probenzelle und berechnet daraus die Aufnahme oder Abgabe von Wärme pro Zeiteinheit ($\mu\text{cal}/\text{sec}$). Die Probenzelle ist an eine motorgetriebene Spritze angeschlossen, über die kleine Aliquots des Titranden zugesetzt werden. Über die Wärmemenge wird die Enthalpie ΔH und die Gleichgewichtskonstante K der Reaktion bestimmt. Aus der

Gleichgewichtskonstanten K ergibt sich mit Hilfe von $\Delta G = -RT \ln K$ die freie Energie und mit $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ schlussendlich die Entropieänderung des Systems. Die Stöchiometrie der Bindung kann durch einen „kleinste Fehlerquadrate“-Fit der theoretischen Funktion an die gemessene Kurve bestimmt werden. Die Beiträge von ΔS und ΔH zu ΔG erlauben Aussagen über die bei der Bindung stattfindenden Prozesse. Kommt es bei einer Bindung z.B. zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken, zur Wechselwirkung zwischen einzelnen Dipolen oder Coulomb-Kräften, so ist die Reaktion Enthalpie-gesteuert. Ändert sich in einem System der Ordnungsgrad wie z.B. bei Hydratationen oder Dehydratationen, so spricht man von einer Entropie-gesteuerten Reaktion.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und Triebkraft der Bindung wurde das Peptid Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr **128** zu den jeweiligen Rezeptoren in 100 mM Tris HCl Puffer (pH 8.0) titriert und die dabei auftretende Reaktionswärme gemessen. Alle Titrations wurden bei 26 °C, einer Anfangskonzentration der Rezeptoren von 200 μ M und durch 5 μ L-Zugaben einer 8 mM-Stocklösung des Peptides durchgeführt, was einem Peptid:Rezeptor-Verhältnis von 1:7 bis 10:1 entspricht. Die erhaltenen Daten wurden unter Annahme einer 1:1-Stöchiometrie gefittet und sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr 128	
Rezeptor 7	$\Delta G = -5.77 \pm 0.2$ kcal/mol $\Delta H = -1.75 \pm 0.15$ kcal/mol $T\Delta S = 4.04$ kcal/mol (1:1)
Rezeptor 8	$\Delta G = -4.51 \pm 0.07$ kcal/mol $\Delta H = -4.53 \pm 0.22$ kcal/mol $T\Delta S = -0.018$ kcal/mol (1:1)
Rezeptor 9	Keine Auswertung möglich
Rezeptor 10	Keine Auswertung möglich

Tab. 12: Zusammenstellung der Bindungsenergien [kcal/mol].

Wie schon in der Dissertation von Philipp Krattiger^[19] beschrieben, deutet die Bindung zwischen Rezeptor **7** und dem Peptid auf einen 1:1-Komplex mit einer Bindungsaffinität von

$\Delta G = -5.77$ kcal/mol hin. Die Reaktion ist exotherm und läuft unter Zunahme der Entropie exergonisch, also spontan ab. Eigentlich würde man vermuten, dass durch die Titration des Peptides zum Rezeptor ein geordnetes System entsteht, was zu einer Entropieabnahme führen sollte. In unserem System hingegen kommt es zu einer Entropiezunahme, was auf eine höhere Unordnung des Systems hindeutet. Der Rezeptor ist wahrscheinlich aufgrund der Dispersrot-Reste und die dadurch entstehenden hydrophoben Wechselwirkungen schon vorgeordnet. Wird nun der Gast zutitriert, so verdrängt dieser Wassermoleküle aus der Bindungstasche des Rezeptors, welche das System so Unordnung bringen, so dass die Entropie zunimmt. Wird Dispersrot durch das Azo-Derivat **124** ausgetauscht, deutet der erhaltene Fit immer noch auf eine 1:1-Stöchiometrie hin. Auch hier läuft die Reaktion spontan und exotherm ab ($\Delta G = -4.51$ kcal/mol), jedoch nimmt die Bindungsaffinität um 1.2 kcal/mol ab, was auf eine schwächere „Wirt-Gast-Wechselwirkung“ hindeutet. Im Gegensatz zu Rezeptor **7** ist die treibende Kraft der Reaktion nicht die Entropie ($T\Delta S = -0.018$ kcal/mol), sondern die Enthalpie ($\Delta H = -4.53$ kcal/mol). Dies könnte bedeuten, dass der Rezeptor von Anfang an ungeordnet vorliegt, d.h. die Arme mit den entsprechenden Seitenketten sind im Lösungsmittel sehr flexibel. Wird nun das Peptid zugesetzt und vom Rezeptor gebunden, so werden die Peptidarme in ihrer Flexibilität eingeschränkt, was zu einem geordneten System und einer negativen Entropie führt (Abb. 81).

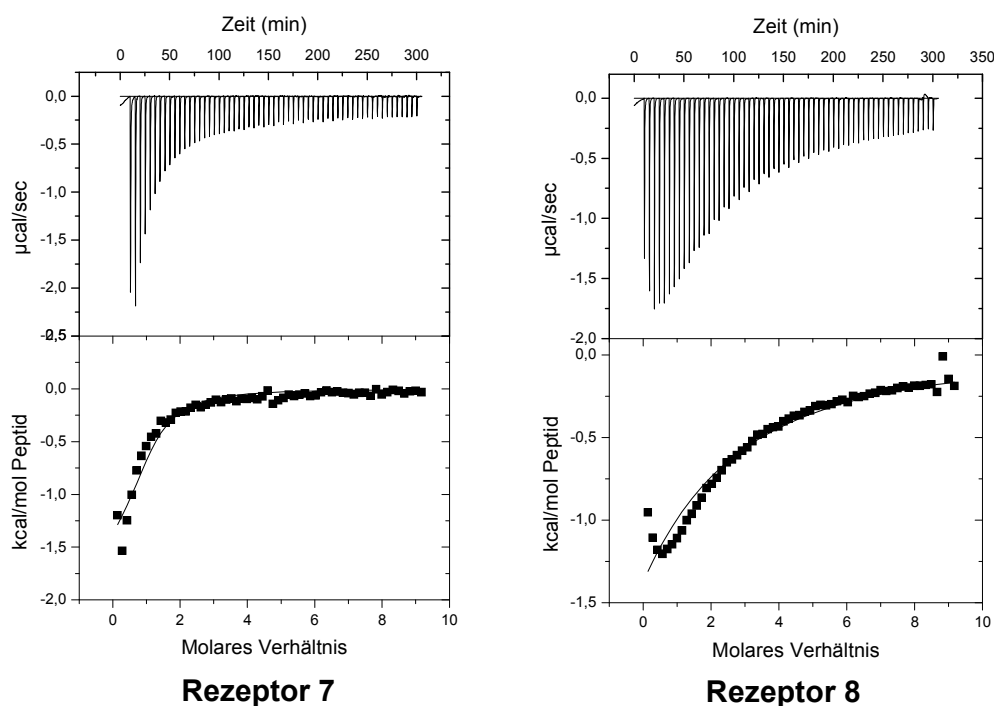


Abb. 81: Mikrokolorimetrische Titrations der Rezeptoren **7** und **8** gegen *Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr 128*.

Mit den beiden anderen Rezeptoren **9** und **10** war keine Auswertung der Daten möglich, da nach Subtraktion der Referenz (Peptid allein) keine Kurve erhalten wurde, aus welcher der Reaktionswärme-Verlauf hätte bestimmt werden können (Abb. 82). Der Grund dafür ist die geringe Wärmetönung des Prozesses. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den beiden anderen Rezeptoren, so erkennt man, dass sich die Werte der freigesetzten Reaktionswärmen deutlich unterscheiden. Wird bei Rezeptor **7** und **8** die Anfangswärme von etwa $-2,5 \mu\text{cal}/\text{sec}$ freigesetzt, so liegen die Werte für die beiden anderen Rezeptoren bei $-0,35 \mu\text{cal}/\text{sec}$, was auf eine schwache Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren und dem Peptid hindeutet.

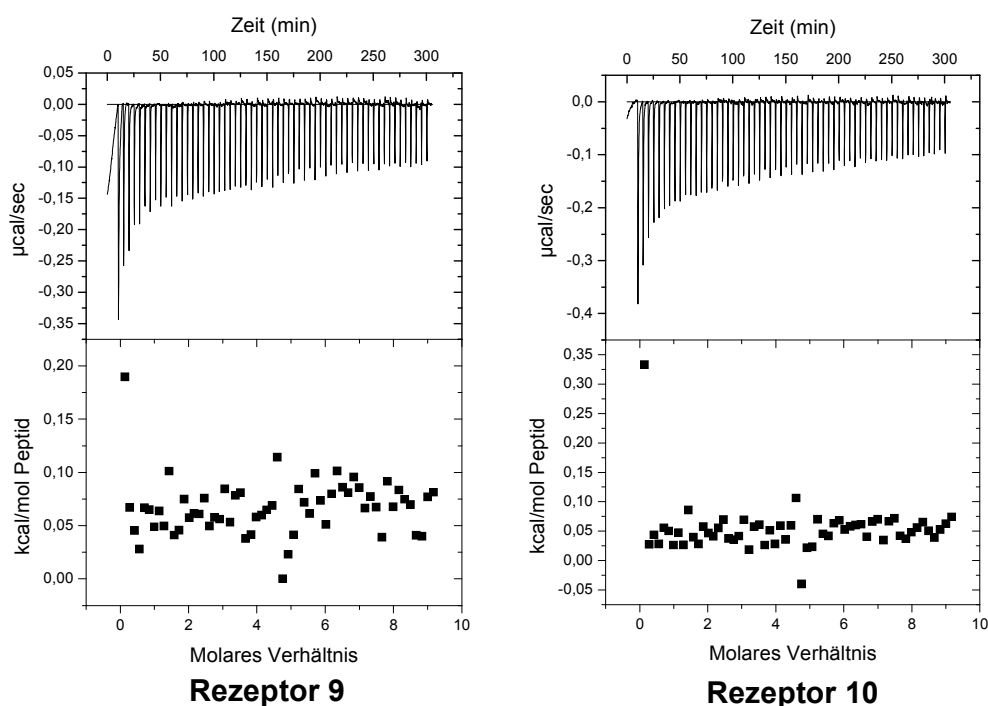


Abb. 82: Mikrokalorimetrische Titrationsen der Rezeptoren gegen *Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr*.

Eine Erklärung für die fehlende Bindung bei beiden Rezeptoren könnte die Stellung der Rezeptorarme in den einzelnen Verbindungen liefern. Möglicherweise stehen die Peptidarme nur bei den Rezeptoren **7** und **8** in geeigneter Position. Auffällig ist auch, dass nur bei diesen Rezeptoren die Azogruppe vorhanden ist, die in einer *Z*- und *E*-Konfiguration stehen kann, was eine Auswirkung auf die Stabilität des Rezeptors haben kann.

4.5 Zusammenfassung

Es wurden drei Rezeptoren synthetisiert, die Teile des Farbstoffes Dispersrot enthalten. Anschließend wurden deren Bindungseigenschaften gegenüber dem Tripeptid Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr untersucht. Entfernt man die Nitrogruppe und tauscht das tertiäre Amin gegen einen Sauerstoff, so ist die Reaktion Enthalpie-gesteuert und die Bindung um etwa 1 kcal/mol schwächer im Vergleich zum Farbstoff-markierten Rezeptor. Reduziert man das System auf zwei Aromaten oder Methoxy-Tyrosin, so ist keine Bindung mehr zum Peptid zu erkennen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinitäten von Rezeptoren durch den Austausch von nur einer Position zu einem erheblichen Bindungsverlust führen kann. Da bei den Experimenten die Werte von „guter“ Bindung zu „keiner“ Bindung sehr offensichtlich sind, wäre es interessant, Rezeptoren zu synthetisieren, bei denen der Farbstoff um kleinere Einheiten reduziert wird (Abb. 83).

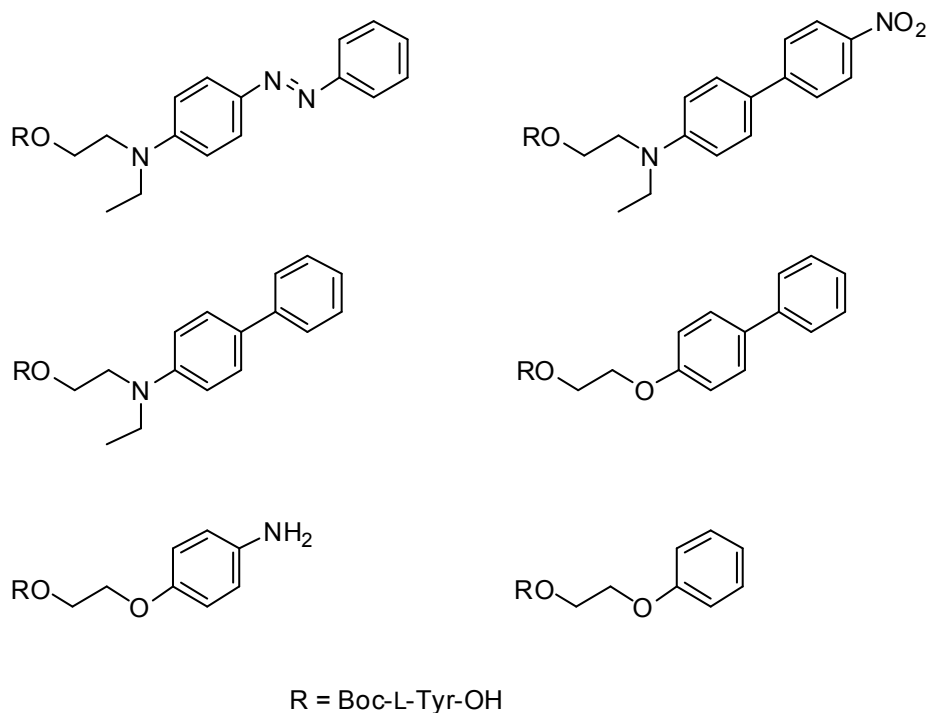


Abb. 83: Mögliche Tyrosin-Derivate.

4.6 Literaturverzeichnis

- [1] a) J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3118; b) M. W. Peczu, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479; c) N. Srinivasan, J. D. Kilburn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 305.
- [2] a) O. Middel, W. Reinhoudt, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *15*, 2587; b) S. Rensing, T. Schrader, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2161; c) O. Rusin, K. Lang, V. Kral, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 655; d) S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5814; e) G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Tozzi, C. Baggiani, L. Anfossi, *Chem. Commun.* **2000**, *13*, 1135.
- [3] a) J. Kehler, B. Ebert, O. Dahl, Povl. Krogsgaard-Larsen, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 771; b) S. Patterson, S. Bradley, R. E. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3111; c) H. Shinmori, M. Takeuchi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Transaction 2* **1998**, *4*, 847; d) H. Fenniri, M. W. Hosseini, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 786; e) M. Mazik, W. Sicking, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 664.
- [4] a) B. Hinzen, P. Seiler, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 942; b) C. L. Neslony, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5836; c) M. W. Peczu, A. D. Hamilton, J. Sanchez-Quesada, J. de Mendoza, T. Haack, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9327; d) M. Torneiro, W. C. Still, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8739; e) M. A. Hossain, H. J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3536; f) R. Breslow, Z. Yang, R. Ching, G. Trojandt, F. Odobel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3536; g) R. Xu, G. Greiveldinger, L. E. Marenus, A. Cooper, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4898.
- [5] a) F. Gasparrini, D. Misiti, W. C. Still, C. Villani, H. Wennemers, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8221; b) F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, A. Borchardt, M. T. Burger, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4314.
- [6] J. W. Lörger, C. Kreutz, P. Krattiger, H. Wennemers, J. Bargon, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **2005**, *107*, 366.
- [7] R. J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 841.
- [8] a) R. C. Boyce, G. Li, H. P. Nestler, T. Suenaga, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7955; b) Y. Cheng, T. Suenaga, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1813; c) H. Hioki, T. Yamada, C. Fujioka, M. Kodama, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6821; d) H. De Muynck, A. Madder, N. Farcy, P.J. De Clercq, M.N. Pérez-Payán, L. M. Öhberg, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 145.

- [9] a) C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1765; b) D. W. P. M. Löwik, M. D. Weingarten, M. Broekema, A. J. Brouwet, W. C. Still, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1846; c) D. W. P. M. Löwik, S. J. E. Mulders, Y. Cheng, Y. Shao, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8253.
- [10] a) W. C. Still, *Acc Chem. Res.* **1996**, *29*, 155; b) C. Gennari, H. P. Nestler, U. Piarulli, B. Slalom, *Liebigs Ann. / Recueil* **1997**, 637.
- [11] a) H. Wennemers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1108; b) M. Torneiro, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5887; c) Y. Shao, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6086; d) Z. Pan, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8699.
- [12] a) A. T. Wright, E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 14; b) A. T. Wright, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17405.
- [13] a) M. Bonnat, M. Bradley, J. D. Kilburn, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5409; b) M. Davies, M. Bonnat, F. Guillier, J. D. Kilburn, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8696; c) T. Fessmann, J. D. Kilburn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1993; d) T. Braxmeier, M. Demarcus, T. Fessmann, S. McAteer, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1889; e) E. Botana, S. Ongeri, R. Arienzo, M. Demarcus, J. G. Frey, U. Piarulli, D. Potenza, J. D. Kilburn, C. Giennari, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4625; f) R. Arienzo, J. D. Kilburn, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 711; g) E. Botana, S. Ongeri, M. Demarcus, J. G. Frey, U. Piarulli, D. Potenza, C. Gennari, J. D. Kilburn, *Chem. Commun.* **2001**, 1358; h) K. B. Jensen, T. M. Braxmeier, M. Demarcus, J. G. Frey, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1300; i) J. Shepherd, T. Gale, K.B. Jensen, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 713.
- [14] a) H. Wennemers, M. Conza, M. Nold, P. Krattiger, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3342; b) M. Conza, H Wennemers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696; c) H. Wennemers, M. Nold, K. J. Kulicke, M. Neuburger, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 442; d) H. Wennemers, *Chimia* **2003**, *57*, 237; e) M. Conza, H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2003**, *7*, 866.
- [15] P. Krattiger, H. Wennemers, *Synlett* **2005**, *4*, 706.
- [16] P. Krattiger, unpublizierte Resultate.
- [17] M. Bodansky, A. Bodansky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd Ed.; Springer-Verlag: New York, **1994**.
- [18] A. D. Hamilton, B. Linton, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6027.
- [19] Philip Krattiger, Dissertation 2005.

EXPERIMENTELLER TEIL

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ACHC	<i>trans</i> -2-Aminocyclohexan Carbonsäure
AcOH	Essigsäure
Ahx	Aminohexansäure
Aib	Aminoisobuttersäure, α -Methylalanin
Ala	Alanin
β -Ala	β -Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asc	Ascorbat (Vitamin C)
Asp	Aspartat
Bead	Harzkügelchen
BHI	brain-heart-infusion Serum
BNPP	Bis- <i>p</i> -Nitrophenylphosphat
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl anhydrid
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
CAN	Cer-Ammoniumnitrat
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
COSY	Correlated Spectroscopy
CR	chemisch reduziert
CVD	Chemical Vapor Deposition
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DEA	Diethylamin
DEPT	Distortionless enhancement by Polarization Transfer
DIAD	Diisopropyldicarboxylat
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Dispersrot
EC-GC	Electroneneinfang Gaschromatographie
EDAX	Energiedispersive Röntgenanalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMI-IMC	Evaluation of Microorganism Inhibition by Isothermal Microcalorimetry
ESI	Electronen Spray Ionisation
eq	Equivalent
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
Et ₃ N	Triethylamin
Et ₂ O	Diethylether
F	Fluorophor
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	Fmoc-Succinimid
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl) <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-chlorobenzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfon Säure
His	Histidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HV	Hochvakuum
ITC	Isothermische Kalorimetrie
i. V.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hertz
kcal	Kilokalorie
kcat	Wechselzahl (turnover)
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Lac	Lactat
Leu	Leucin
LR	licht reduziert
Lys	Lysin
nm	Nanometer
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -morpholin)ethanesulfonsäure
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MRSA	Methicilin-resistenter <i>Staphylococcus Aureus</i>
MRSE	Methicilin-resistenter <i>Staphylococcus Epidermidis</i>
MS	Massenspektrometrie
MSA	Methansulfonsäure
m/z	Masse/Ladung
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Pfp	Pentafluorphenyl
Phe	Phenylalanin
pmol	Picomol
ppb	parts per billion
PPh_3	Triphenylphosphin
PPI	Pyridyl-pyridinium Iodid
ppm	parts per million
Pro	Prolin
ψ	pseudo
Q	Quencher (Fmoc-Nitro-L-Tyrosin)

quant.	quantitative
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
Suc	Bernsteinsäure
^t Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TAEA	Tris-(2-aminoethyl) Amine
Tag	polychlorierte Kohlenwasserstoffe als Code für einzelne Aminosäuren
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
TEP	Totalendoprothesen
TFA	2,2,2- Trifluoressigsäure
TG	TentaGel-Harz
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TRIS HCl	Tris(hydroxymethyl)amionmethan Hydrochlorid
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
turn	strukturdirigierendes Element
Tyr	Tyrosin
SEM	Scanning Electron Microscope (Raster-Elektronen-Mikroskop)
UV-Vis	Ultraviolett
Val	Valin
W	Watt

5. Geräte und Materialien

5.1 Analytische Methoden

¹H-NMR *Bruker Avance 400 (400 MHz), Bruker 500 DRX (500 MHz)*

Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, bezogen auf Tetramethylsilan als internen Standard ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm) oder auf die Lösungsmittelsignale von CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), d_6 -DMSO ($\delta = 2.50$ ppm) oder CD_3OD ($\delta = 3.31$ ppm). Alle Spektren wurden mit Hilfe von 1D oder 2D Experimenten zugeordnet (COSY, NOESY, TOCSY) und die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz (Hz) angegeben. Die Signale wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, brs = breites Singulett, d = Dublett, brd = breites Dublett, t = Triplett, brt = breites Triplett, q = Quartet, quin = Quintet, m = Multiplet, ψ = pseudo. Alle Lösungsmittel wurden von *Cambridge Isotope Laboratories* bezogen.

¹³C-NMR *Bruker Avance 400 (101.1 MHz), Bruker 500 DRX (125.6 MHz)*

Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm und beziehen sich auf die Lösungsmittelsignale von CDCl_3 ($\delta = 77.1$ ppm), d_6 -DMSO ($\delta = 39.5$ ppm) oder CD_3OD ($\delta = 49.3$ ppm). Die Spektren sind ¹H-breitbandenkoppelt und wurden mit Hilfe von 1D oder 2D Experimenten zugeordnet (DEPT, HMBC, HMQC). Quarternäre C-Atome wurden wie folgt abgekürzt: Cq.

Massenspektrometrie *Bruker Esquire 3000 plus, Finnigan MAT LCQ (oktapol)*

Die Proben wurden als 0.01 mg/mL oder 0.1 mg/mL Lösungen in MeOH, CH_2Cl_2 oder H_2O direkt injiziert. Die Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronensprayionisation (ESI). Die Werte wurden jeweils in atomaren Masseneinheiten pro Ladung (m/z) angegeben.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie *Voyager-DE PRO BioSpectrometry Workstation from Applied Biosystems*

Als Matrices wurden Nitroanilin oder Sinapinsäure verwendet. Die Werte wurden jeweils in atomaren Masseneinheiten pro Ladung (m/z) angegeben.

UV-Vis-Spektroskopie *Perkin Elmer Lambda Bio UV/vis spectrometer*

Die Spektren wurden entweder in Quarzküvetten von SUPRASIL[®] (Hellma, Typ 114-QS, $d = 10$ mm) oder Acrylküvetten von Semadeni ($d = 10$ mm) aufgenommen.

Fluoreszenz-Spektroskopie *FluoroMax-2*

Die Spektren wurden entweder in Quarzküvetten (*Hellma*) oder Acrylküvetten von *Semadeni* ($d = 10 \text{ mm}$) aufgenommen.

Electroneneinfang Gas-Chromatographie (EC-GC) *Hewlett Packard HP 6890*

Die Analyse der Tag-Alkohole wurde durch on-column Injektion und einem μEC -Detektor auf einer HP Ultra 1 (Methylsiloxan) Kapillare (25 m, 0.2 mm, 0.33 μm) durchgeführt. Die Alkohole wurden mit BSA silyliert.

Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM) *Philips EM 400*

Die TEM Versuche wurden im Zentrum für Mikroskopie im Pharmazentrum der Universität Basel von Dipl.-Chem. Lucy Kind durchgeführt. Die Proben wurden zuerst auf einen Grid aufgebracht. Die Analyse wurde bei 80 kV durchgeführt und die Aufnahmen der Bilder wurden mit einer *Megaview II* charge coupled-device camera (CCD) gemacht.

Atom Absorptions Spektroskopie (AAS) *Shimadzu AA-6300*

Die Ag^+ -Konzentration auf den TentaGel Beads wurde durch die freie Konzentration an Ag^+ -Ionen in der Reaktionslösung bestimmt. Die Versuche wurden mit Hilfe von Ag^+ -Standard-Lösungen von 1-8 ppm durchgeführt.

Scanning-Electron-Microscopy (SEM) *ESEM XL 30 FEG, Hitachi S 4800*

Alle Studien wurden von Gianni Morson, Marcel Düggelin oder Daniel Mathys im Zentrum für Mikroskopie im Pharmazentrum durchgeführt. Die Proben wurden für die Untersuchung mit 5 nm Platin gespottet und mit 5 kV beschleunigt. Die Bilder wurden entweder ohne Kontrast oder im Back-Scatter Modus gemessen. Die dazugehörigen EDAX Spektren wurden mit den gleichen Geräten aufgenommen.

Pulverdiffraktometrie *STOE STADI P automatisches Diffraktometer*

Die Experimente wurden von Tünde Vig Slenters an der Universität Fribourg durchgeführt. Dafür wurden zwischen 10 und 25 mg Probe in Quarz Halterungen fixiert und mit Hilfe einer CuK Quelle und einem Graphit Monochromator vermessen. Zur Auswertung der Röntgenmuster diente das Programm PowderCell 2.2[23d].

5.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen und quantitativen Verfolgung des Reaktionsverlaufes sowie zur Reinheitskontrolle von kommerziell erhältlichen bzw. synthetisierten Substanzen wurden Kieselgel-beschichtete DC-Fertigplatten von *Merck* verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄). Die Substanzen wurden mittels UV (254 nm) oder durch Anfärben mit Ninhydrin visualisiert. Die Retentionsfaktoren (R_f) sind mit dem jeweiligen Lösungsmittelgemisch angegeben. Die Lösungsmittel für die einzelnen Laufmittelgemische wurden vor dem Gebrauch destilliert.

Säulenchromatographie

Die Reinigung synthetisierter Verbindungen wurde mit Hilfe einer Säulenchromatographie unter erhöhtem Druck (Flashchromatographie) an Kieselgel 60 (40-63 μm) der Firma *Merck* durchgeführt. Die einzelnen Elutionsmittel wurden auch hier vor Gebrauch destilliert.

High Performance Liquid Chromatography *Shimadzu Class-VP (UV-Vis Detection)*

Reversed-phase HPLC Analysen wurden auf LiChrospher 100 RP-18e 5 μm (250 mm x 4.6 mm) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Acetonitril der Firma Fisher Scientific und nanopures Wasser verwendet.

Größenausschluss Chromatographie

Die Trennungen der Produkte anhand ihrer unterschiedlichen Molekülgröße wurden auf Sephadex LH20 Harz von *Sigma* durchgeführt.

5.3 Weitere Geräte

Thermomixer	<i>Eppendorf Thermomixer comfort</i>
Mikroskop	<i>Olympus Microscope SXZ12</i>
Mikroskop-Kamera	<i>Olympus Camedia C-3000 Zoom</i>
pH-Meter	<i>Metrohm</i>
Peptid Synthesizer	<i>Syro I MultiTech GmbH</i>
Mikrokalorimeter	<i>VP-ITC MicroCal, [kcal/mol]</i>
Isothermische Mikrokalorimetrie	<i>TAM III-48, Waters-TA Instruments, New Castle DE, USA, 48 parallel geschaltete Messkanäle</i>

5.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen hoher Qualität und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lösungsmittel für Extraktionen, Säulen- und Dünnschichtchromatographie wurden vor Gebrauch destilliert. Für Reaktionen in wasserfreier Umgebung oder für analytische Experimente wurden absolute Lösungsmittel der Firma *Fluka* verwendet. Wasser, welches für Reaktionen oder HPLC Untersuchungen benutzt wurde, wurde über ein *Barnstead* Ultrapure Water System filtriert. TentaGel-NH₂-Harz wurden von *RAPP Polymere GmbH* Tübingen (Deutschland) und Rink-Amid-Polystyrolharze von *Novabiochem* (Schweiz) bezogen. Geschützte Aminosäuren wurden von *Bachem AG* (Schweiz) und *Novabiochem* (Schweiz) bezogen. Kopplungsreagenzien wurden bei *Fluka*, *Iris Biotech*, *Bachem AG* oder *Senn Chemicals* gekauft.

5.5 Pufferherstellung

0.5 M HEPES, pH 7.0

59.6 g HEPES, 500 mL H₂O

0.01 M HEPES, pH 7.0

1.2 g HEPES, 500 mL H₂O

0.035 M HEPES, pH 7.8

4.2 g HEPES, 500 mL H₂O

0.1 M TRIS HCl, pH 7.2

7.45 g TRIS HCl, 500 mL H₂O

0.01 M TRIS HCl, pH 7.2

0.745 g TRIS HCl, 500 mL H₂O

0.05 M TRIS HCl, pH 8.5

3.72 g TRIS HCl, 500 mL H₂O

0.5 M TRIS HCl, pH 8.0 für ITC

37.2 g TRIS HCl, 500 mL H₂O

0.1 M KH₂PO₄, pH 2.0

6.8 g KH₂PO₄, 500 mL H₂O

0.5 M Acetat, pH 4.0

41 g NaOAc in 500 mL H₂O (1 M), 286 mL AcOH in 500 mL H₂O (1 M)

Mischung: 41 mL AcOH, 9 mL NaOAc in 100 mL H₂O

0.05 M NaHCO₃, pH 8.1

0.42 g NaHCO₃, 100 mL H₂O

0.3 M CHES, pH 8.2

31.1 g CHES, 500 mL H₂O

0.01 M CHES, pH 9.21.04 g CHES, 500 mL H₂O**0.2 M MES, pH 5.0**8.52 g MES, 200 mL H₂O**0.01 M MES, pH 5.0**0.85 g MES, 400 mL H₂O**0.5 M Carbonat, pH 10.0**53 g Na₂CO₃ in 500 mL H₂O (1M), 42 g NaHCO₃ in 500 mL H₂O (1M)Mischung: 27.5 mL Na₂CO₃, 22.5 mL NaHCO₃ in 100 mL H₂O**0.1M NH₄OAc für ITC**3.85 g NH₄OAc in 500 mL H₂O**0.01 M Carbonat, pH 10.0**10 mL der 0.5 M Stocklösung in 500 mL H₂O

5.6 Agarosegel-Herstellung

Zur Herstellung der Agarosegele wurden jeweils 0.5 g Agarose (Molecular Biology Grade, Eurogentech) in 100 mL der jeweiligen Pufferlösungen unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur entstanden die einzelnen Gele. Folgende Gele wurden präpariert:

0.5 % Agarose in H₂O nanopur

0.5 % Agarose in 10 mM MES pH 5.0

0.5 % Agarose in 10 mM/ 0.5 M Carbonat pH 10.0

0.5 % Agarose in 10 mM/ 0.5 M Acetat pH 4.0

0.5 % Agarose in 0.5 M HEPES pH 7.0

0.5 % Agarose in 10 mM HEPES pH 7.0

5.7 Herstellung des Ninhydrin-Dip

Ninhydrin-Dip

0.6 g Ninhydrin, 200 mL Butanol

6 mL AcOH (99 %)

6. Allgemeine Arbeitsmethoden

6.1 Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Prozedur A1: Fmoc-Aminosäurekupplung auf aminofunktionalisiertes Rink- bzw. TentaGel-Harz mit Hilfe von HOBt

Eine Suspension aus aminofunktionalisiertem Harz in CH_2Cl_2 wurde mit einer Lösung aus der Aminosäure (1.5–3.0 eq) und HOBt (3.0 eq) in 1 mL DMF, versetzt und 2 min in einem Merryfield-Kolben geschüttelt. Danach wurde DIC (3.0–6.0 eq) zugegeben und die Mischung wurde erneut für 2 h geschüttelt. Nach Entfernen aller Reagenzien i. V. wurde das Harz dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen und die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test^[1] oder TNBS-Test^[2] überprüft.

Prozedur A2: Fmoc-Aminosäurekupplung auf aminofunktionalisiertes Rink- bzw. TentaGel-Harz mit Hilfe von HCTU

Eine Suspension aus aminofunktionalisiertem Harz in CH_2Cl_2 wurde mit einer Lösung aus der Aminosäure (1.5–3 eq) und HCTU (3.0 eq) in 1 mL DMF versetzt und 2 min in einem Merryfield-Kolben geschüttelt. Danach wurde Pr_2NEt (3.0–6.0 eq) zugegeben und die Mischung wurde erneut für 2 h geschüttelt. Nach Entfernen aller Reagenzien wurde das Harz dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen und die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test^[1] oder TNBS-Test^[2] überprüft.

Prozedur B: Fmoc-Entschützung

Das Harz wurde mit 20 % (v/v) Piperidin in DMF versetzt und für 2 min geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde erneut Piperidin zum Harz gegeben und weitere 10 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit DMF und fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen und auch hier wurde die Vollständigkeit der Entschützung mit Hilfe des Kaiser-Testes^[1] und TNBS-Testes^[2] überprüft.

Prozedur C: Acetylierung der freien Amine

Das Harz wurde mit 5 mL CH_2Cl_2 suspendiert, mit NEt_3 (100 eq) versetzt und 2 min geschüttelt. Danach wurde Ac_2O (50 eq) zugegeben und die Mischung wurde erneut für 1 h geschüttelt. Nach Entfernen aller Reagenzien wurde das Harz dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen

und die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test^[1] oder TNBS-Test^[2] überprüft.

Prozedur D: Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen von TentaGel-Harz

Das Harz wurde mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % H₂O versetzt und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit CH₂Cl₂, fünfmal mit 10 % Et₃N in CH₂Cl₂ und zehnmal mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Prozedur E: Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen und Peptide von Rink-Harz

Das Harz wurde mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % H₂O versetzt und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der ölige Rückstand mit Et₂O versetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit Et₂O wurde der weiße Feststoff i. V. getrocknet.

6.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Fmoc-Aminosäurekupplung

Die Aminosäure (4 eq) und HCTU (4 eq) wurden in DMF gelöst (ca. 5 mL / g Aminosäure) und mit einer Lösung aus ^tPr₂NEt (12 eq) in *N*-Methylpyrrolidon (3 M) versetzt. Die Mischung wurde für 1.5 h geschüttelt und der Reagenzien-Überschuss anschliessend mit DMF vom Harz gewegewaschen.

Fmoc-Entschützung

Das Harz wurde mit 40 % (v/v) Piperidin in DMF versetzt und 2 min geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde 20 % (v/v) Piperidin in DMF zugegeben und die Mischung für weitere 10 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

Acetylierung der freien Amine

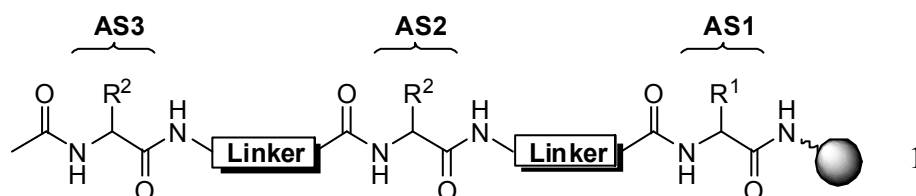
Das Harz wurde mit 2 mL CH₂Cl₂ suspendiert, mit NEt₃ (100 eq), gefolgt von Ac₂O (50 eq) versetzt und die Mischung wurde für 1 h geschüttelt. Nach Entfernen aller Reagenzien wurde das Harz fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen.

[1] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.

[2] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261.

6.3 Synthese einer kodierten kombinatorischen Pentapeptidbibliothek mittels polychlorierten Aromaten als Tag-Moleküle

Synthese der Pentapeptidbibliothek



Aufteilen und Kodieren

5.6 g aminofunktionalisiertes TentaGel (2.46 mmol, Belegung 0.44 mmol/g) wurden in sieben gleiche Portionen von 800 mg (0.35 mmol) aufgeteilt, in sieben 25 mL Merrifield Schüttelkolben überführt und dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Danach wurde das Harz in 5 mL trockenem CH_2Cl_2 suspendiert und mit 2 mol% der jeweiligen Tags, gelöst in 1 mL trockenem DMF, versetzt. Nach Zugabe von 53.9 mg HOBt (0.35 mmol, 1 eq), gelöst in 0.5 mL DMF, zu jedem Kolben, wurde die Mischung 5 min geschüttelt. Danach wurde das Harz mit 84 μL DIC (0.53 mmol, 1.5 eq) versetzt und die Mischung über Nacht geschüttelt. Die sieben Kolben wurden einmal mit DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen.

Überprüfung des erfolgreichen Kodierens

Aus jedem der sieben Kolben wurden jeweils 3 beads isoliert und jedes in eine 25 μL Mikrokapillare überführt. Die beads wurden dreimal mit DMF gewaschen, am Ende mit 2.5 μL DMF versetzt und die Kapillare verschlossen. Anschließend wurden die Kapillaren 2 h mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt, um die entsprechenden Tag-Alkohole freizusetzen. Diese wurden silyliert und mittels EC-GC analysiert. War die Kupplung der einzelnen Tags nicht erfolgreich, wurde die Prozedur wiederholt.

Aminosäure Kupplung und Fmoc-Entschützung (nach Prozedur A1)

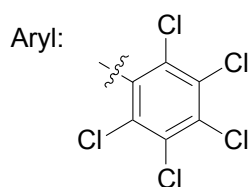
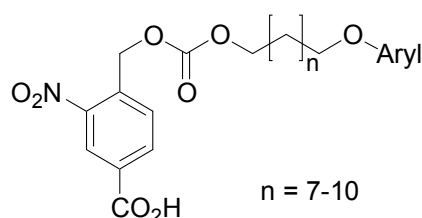
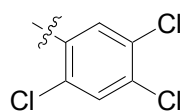
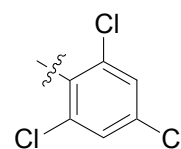
Nach dem erfolgreichen Kodieren wurde das Harz mit 3 eq der Aminosäuren (s. Kodierungsschema), 0.16 g HOBt (1.06 mmol, 3 eq) in 0.5 ml DMF und 164 μl DIC (1.06 mmol, 3 eq) versetzt (die Mengen der einzelnen Aminosäuren s. Kodierungsschema). Danach wurden die Beads dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen und die Kupplung wurde wiederholt. Nach dreimaligem Waschen mit CH_2Cl_2 wurden die einzelnen Portionen in einem 150 mL

Merrifield-Schüttelkolben vereint, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und anschließend wurde das Harz erneut in sieben gleiche Portionen aufgeteilt. Das Aufteilen, Kodieren und die Kupplung der Aminosäuren wurde solange wiederholt bis die gewünschte Länge der Bibliothek erreicht war.

Acetylierung und Entschützung der Seitenketten Schutzgruppen (Prozedur C und D)

Nach Entschützung der Fmoc-Gruppe (**Prozedur B**) wurden 1.6 g Harz (0.70 mmol) mit 9.8 mL Et₃N (71.23 mmol, 100 eq) und 3.3 mL Ac₂O (35.20 mmol, 50 eq) versetzt und 1 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend mit 10 mL der Abspaltungslösung gemäß **Prozedur D** versetzt.

Verwendete Tags für die Bibliothek

Cl₅2,4,5-Cl₃2,4,6-Cl₃

1. Schritt: (CH₂)₁₀-Cl₅ (646.74 g/mol, 7.05 μmol, 4.56 mg) = tag Nr. 1 (**T**₁)

(CH₂)₁₁-Cl₅ (660.77 g/mol, 7.05 μmol, 4.66 mg) = tag Nr. 2 (**T**₂)

(CH₂)₁₂-Cl₅ (674.80 g/mol, 7.05 μmol, 4.76 mg) = tag Nr. 3 (**T**₃)

2. Schritt: (CH₂)₁₂-2,4,6-Cl₃ (604.90 g/mol, 7.05 μmol, 21.3 mg) = tag Nr. 1 (**T**₄)

(CH₂)₁₂-2,4,5-Cl₃ (604.90 g/mol, 7.05 μmol, 21.3 mg) = tag Nr. 2 (**T**₅)

(CH₂)₉-Cl₅ (632.72 g/mol, 7.05 μmol, 22.3 mg) = tag Nr. 3 (**T**₆)

3. Schritt: (CH₂)₁₀-2,4,5-Cl₃ (576.85 g/mol, 7.05 μmol, 20.3 mg) = tag Nr. 1 (**T**₇)

(CH₂)₁₁-2,4,6-Cl₃ (590.88 g/mol, 7.05 μmol, 20.8 mg) = tag Nr. 2 (**T**₈)

(CH₂)₁₁-2,4,5-Cl₃ (590.88 g/mol, 7.05 μmol, 20.8 mg) = tag Nr. 3 (**T**₉)

- 4. Schritt:** $(\text{CH}_2)_9\text{-2,4,6-Cl}_3$ (562.82 g/mol, 7.05 μmol , 20.3 mg) = tag Nr. 1 (**T₁₀**)
 $(\text{CH}_2)_9\text{-2,4,5-Cl}_3$ (562.82 g/mol, 7.05 μmol , 19.8 mg) = tag Nr. 2 (**T₁₁**)
 $(\text{CH}_2)_{10}\text{-2,4,6-Cl}_3$ (576.85 g/mol, 7.05 μmol , 19.8 mg) = tag Nr. 3 (**T₁₂**)

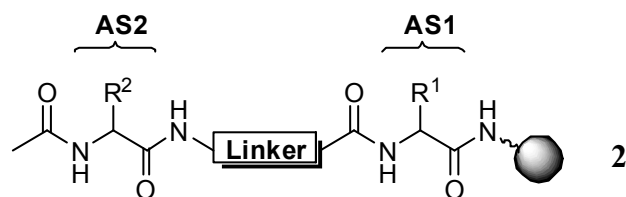
- 5. Schritt:** $(\text{CH}_2)_7\text{-2,4,5-Cl}_3$ (534.77 g/mol, 7.05 μmol , 18.8 mg) = tag Nr. 1 (**T₁₃**)
 $(\text{CH}_2)_8\text{-2,4,6-Cl}_3$ (548.80 g/mol, 7.05 μmol , 19.3 mg) = tag Nr. 2 (**T₁₄**)
 $(\text{CH}_2)_8\text{-2,4,5-Cl}_3$ (548.80 g/mol, 7.05 μmol , 19.3 mg) = tag Nr. 3 (**T₁₅**)

Kodierungsschema und Mengen der verwendeten Aminosäuren

Schritt 1	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₁	T ₂	T ₃
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₃	0	0	1
Fmoc-D-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₂	0	1	0
Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₂ + T ₃	0	1	1
Fmoc-D-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₁	1	0	0
Fmoc-L-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₁ + T ₃	1	0	1
Fmoc-D-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₁ + T ₂	1	1	0
Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH	459.54	485	T ₁ + T ₂ + T ₃	1	1	1
Schritt 2	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₄	T ₅	T ₆
1) Fmoc-Aib-OH (Pro-Aib)	325.36	344	T ₆	0	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH (Pro-Aib)	337.37	356				
Fmoc- ϵ -Ahx-OH	353.40	373	T ₅	0	1	0
Fmoc-Cl (kein Motif)	258.70	273	T ₅ + T ₆	0	1	1
Fmoc-Gly-OH	297.31	314	T ₄	1	0	0
1) Fmoc-Gly-OH (Pro-Gly)	297.31	314	T ₄ + T ₆	1	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH (Pro-Gly)	337.37	356				
Fmoc- β -Alanin-OH	311.30	329	T ₄ + T ₅	1	1	0
Fmoc-racACHC-OH	365.00	385	T ₄ + T ₅ + T ₆	1	1	1
Schritt 3	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₇	T ₈	T ₉
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₉	0	0	1
Fmoc-D-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₈	0	1	0

Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₈ + T ₉	0	1	1
Fmoc-D-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₇	1	0	0
Fmoc-L-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₇ + T ₉	1	0	1
Fmoc-D-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₇ + T ₈	1	1	0
Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH	459.54	485	T ₇ + T ₈ + T ₉	1	1	1
Schritt 4	M [g mol⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T₁₀	T₁₁	T₁₂
1) Fmoc-Aib-OH	325.36	344	T ₁₂	0	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH	337.37	356				
Fmoc-ε-Ahx-OH	353.40	373	T ₁₁	0	1	0
Fmoc-Cl (kein Motif)	258.70	273	T ₁₁ + T ₁₂	0	1	1
Fmoc-Gly-OH	297.31	314	T ₁₀	1	0	0
1) Fmoc-Gly-OH	297.31	314	T ₁₀ + T ₁₂	1	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH	337.37	356				
Fmoc-β-Alanin-OH	311.30	329	T ₁₀ + T ₁₁	1	1	0
Fmoc-rac-ACHC-OH	365.00	385	T ₁₀ + T ₁₁ + T ₁₂	1	1	1
Schritt 5	M [g mol⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T₁₃	T₁₄	T₁₅
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₁₅	0	0	1
Fmoc-D-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	434	T ₁₄	0	1	0
Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₁₄ + T ₁₅	0	1	1
Fmoc-D-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	405	T ₁₃	1	0	0
Fmoc-L-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₁₃ + T ₁₅	1	0	1
Fmoc-D-His(Trt)-OH	619.72	654	T ₁₃ + T ₁₄	1	1	0
Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH	459.54	485	T ₁₃ + T ₁₄ + T ₁₅	1	1	1

Synthese der Tripeptidbibliothek



Aufteilen und Kodieren

2.1 g aminofunktionalisiertes TentaGel (0.92 mmol, Belegung 0.44 mmol/g) wurden in sieben gleiche Portionen von 300 mg (0.13 mmol) aufgeteilt, in sieben 25 mL Merrifield Schüttelkolben überführt und dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Danach wurde das Harz in 5 mL trockenem CH_2Cl_2 suspendiert und mit 2 mol% der jeweiligen Tags, gelöst in 1 mL trockenem DMF, versetzt. Nach Zugabe von 0.02 g HOBt (0.132 mmol, 1 eq), gelöst in 0.5 mL DMF zu jedem Kolben, wurde die Mischung 5 min geschüttelt. Danach wurde das Harz mit 20 μL DIC (0.20 mmol, 1.5 eq) versetzt und die Mischung über Nacht geschüttelt. Die sieben Kolben wurden einmal mit DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen.

Überprüfung des erfolgreichen Kodierens

Aus jedem der sieben Kolben wurden jeweils 3 Beads isoliert und jedes in eine 25 μL Mikrokapillare überführt. Die Beads wurden dreimal mit DMF gewaschen, am Ende mit 2.5 μL DMF versetzt und die Kapillare verschlossen. Anschließend wurden die Kapillaren 2 h mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt, um die entsprechenden Tag-Alkohole freizusetzen. Diese wurden silyliert und mittels EC-GC analysiert. War die Kupplung der einzelnen Tags nicht erfolgreich, wurde die Prozedur wiederholt.

Aminosäure Kupplung und Fmoc-Entschützung (nach Prozedur A1)

Nach dem erfolgreichen Kodieren wurde das Harz mit 3 eq der Aminosäuren (s. Kodierungsschema), 0.06 g HOBt (0.40 mmol, 3 eq) in 0.5 ml DMF und 60 μl DIC (0.40 mmol, 3 eq) versetzt (die Mengen der einzelnen Aminosäuren s. Kodierungsschema). Danach wurden die Beads dreimal mit CH_2Cl_2 gewaschen und die Kupplung wurde wiederholt. Nach dreimaligem Waschen mit CH_2Cl_2 wurden die einzelnen Portionen in einem 150 mL Merrifield-Schüttelkolben vereint, die Fmoc-Gruppe nach Prozedur B entschützt und anschließend wurde das Harz erneut in sieben gleiche Portionen aufgeteilt. Das Aufteilen,

Kodieren und die Kupplung der Aminosäuren wurde solange wiederholt bis die gewünschte Länge der Bibliothek erreicht war.

Acetylierung und Entschützung der Seitenketten Schutzgruppen (Prozedur C und D)

Nach Entschützung der Fmoc-Gruppe (Prozedur B) wurden 1.0 g Harz (0.44 mmol) mit 6.1 mL Et₃N (44.00 mmol, 100 eq) und 2.1 mL Ac₂O (22.00 mmol, 50 eq), nach Prozedur C acetyliert und anschließend mit 10 mL der Abspaltungslösung gemäß Prozedur D versetzt.

Verwendete Tags für die Bibliothek (s. Abb.)

1. Schritt: (CH₂)₁₀-Cl₅ (646.74 g/mol, 2.64 μmol, 8.5 mg) = tag Nr. 1 (**T₁**)

(CH₂)₁₁-Cl₅ (660.77 g/mol, 2.64 μmol, 8.7 mg) = tag Nr. 2 (**T₂**)

(CH₂)₁₂-Cl₅ (674.80 g/mol, 2.64 μmol, 9.0 mg) = tag Nr. 3 (**T₃**)

2. Schritt: (CH₂)₁₂-2,4,6-Cl₃ (604.90 g/mol, 2.64 μmol, 8.0 mg) = tag Nr. 1 (**T₄**)

(CH₂)₁₂-2,4,5-Cl₃ (604.90 g/mol, 2.64 μmol, 8.0 mg) = tag Nr. 2 (**T₅**)

(CH₂)₉-Cl₅ (632.72 g/mol, 2.64 μmol, 8.4 mg) = tag Nr. 3 (**T₆**)

3. Schritt: (CH₂)₁₀-2,4,5-Cl₃ (576.85 g/mol, 2.64 μmol, 7.6 mg) = tag Nr. 1 (**T₇**)

(CH₂)₁₁-2,4,6-Cl₃ (590.88 g/mol, 2.64 μmol, 7.8 mg) = tag Nr. 2 (**T₈**)

(CH₂)₁₁-2,4,5-Cl₃ (590.88 g/mol, 2.64 μmol, 7.8 mg) = tag Nr. 3 (**T₉**)

Kodierungsschema und Mengen der verwendeten Aminosäuren

Schritt 1	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₁	T ₂	T ₃
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	163	T ₃	0	0	1
Fmoc-D-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	163	T ₂	0	1	0
Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	152	T ₂ + T ₃	0	1	1
Fmoc-D-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	152	T ₁	1	0	0
Fmoc-L-His(Trt)-OH	619.72	245	T ₁ + T ₃	1	0	1
Fmoc-D-His(Trt)-OH	619.72	245	T ₁ + T ₂	1	1	0
Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH	459.54	182	T ₁ + T ₂ + T ₃	1	1	1

Schritt 2	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₄	T ₅	T ₆
1) Fmoc-Aib-OH (Pro-Aib)	325.36	129	T ₆	0	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH (Pro-Aib)	337.37	134				
Fmoc-ε-Ahx-OH	353.40	140	T ₅	0	1	0
Fmoc-Cl (kein Motif)	258.70	102	T ₅ + T ₆	0	1	1
Fmoc-Gly-OH	297.31	118	T ₄	1	0	0
1) Fmoc-Gly-OH	297.31	118	T ₄ + T ₆	1	0	1
2) Fmoc-L-Pro-OH	337.37	134				
Fmoc-β-Alanin-OH	311.30	123	T ₄ + T ₅	1	1	0
Fmoc-rac-ACHC-OH	365.00	145	T ₄ + T ₅ + T ₆	1	1	1
Schritt 3	M [g mol ⁻¹]	m [mg]	Tag	Code		
				T ₇	T ₈	T ₉
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	163	T ₉	0	0	1
Fmoc-D-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	163	T ₈	0	1	0
Fmoc-L-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	152	T ₈ + T ₉	0	1	1
Fmoc-D-Ser(O ^t Bu)-OH	383.44	152	T ₇	1	0	0
Fmoc-L-His(Trt)-OH	619.72	245	T ₇ + T ₉	1	0	1
Fmoc-D-His(Trt)-OH	619.72	245	T ₇ + T ₈	1	1	0
Fmoc-L-Tyr(O ^t Bu)-OH	459.54	182	T ₇ + T ₈ + T ₉	1	1	1

6.4 Vorschrift für die kombinatorischen Lösung-Assays

6.4.1 Pyrenester und Pyrenalkohol

Ca. 8 mg der Bibliotheken wurden im entsprechenden Puffer suspendiert und anschließend mit den Pyrenestern oder dem Pyrenalkohol versetzt und im Thermoshaker geschüttelt. Die fluoreszierenden Beads wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop isoliert und die abgespaltenen Tag-Alkohole mittels EC-GC analysiert.

Acetoxypyrene 80 μM: die Beads wurden in 0.5 M Acetat pH 4.0 suspendiert und mit 45.2 μL einer 1.77mM Stocklösung versetzt.

Acetoxypyrene 0.8 μM: die Beads wurden in 0.5 M HEPES pH 7.0 suspendiert und mit 0.5 μL einer 1.77 mM Stocklösung versetzt.

Acetoxypyrene 0.08 μM : die Beads wurden in 0.5 M Carbonat pH 10.0 suspendiert und mit 20 μL einer 4 μM Stocklösung versetzt.

Butyroxypyrene 80 μM : die Beads wurden in 0.5 M Acetat pH 4.0 suspendiert und mit 47.6 μL einer 1.68 mM Stocklösung versetzt.

Butyroxypyrene 0.8 μM : die Beads wurden in 0.5 M HEPES pH 7.0 suspendiert und mit 0.5 μL einer 1.68 mM Stocklösung versetzt.

Butyroxypyrene 0.08 μM : die Beads wurden in 0.5 M Carbonat pH 10.0 suspendiert und mit 20 μL einer 4 μM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 80 μM : die Beads wurden in 0.5 M Acetat pH 4.0 suspendiert und mit 42.1 μL einer 1.9 mM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 0.8 μM : die Beads wurden in 0.5 M HEPES pH 7.0 suspendiert und mit 0.5 μL einer 1.9 mM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 0.08 μM : die Beads wurden in 0.5 M Carbonat pH 10.0 suspendiert und mit 20 μL einer 4 μM Stocklösung versetzt.

6.4.2 Indigo

Ca. 8 mg der Bibliotheken **1** und **2** wurden in 10 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM MES (pH 5.0) oder 10 mM CHES (pH 9.2) suspendiert, anschließend mit 1 mM des Indigo-Derivates versetzt und im Thermoshaker geschüttelt. Türkise Beads wurden isoliert und die abgespaltenen Tag-Alkohole mittels EC-GC analysiert.

Für die Assays mit Metallen, wurden die Beads entweder vor der Reaktion mit den entsprechenden Metallsalzlösungen inkubiert und der Überschuss gewaschen oder das Metall wurde der Reaktion zugesetzt. Auch hier wurden die türkisen Beads isoliert und die Alkohole mittels EC-GC analysiert.

6.4.3 Spaltversuche mit der Fluorophor-Quencher Bibliothek

6.4.3.1 Kupferkomplexe von JUDITH BURSTYN^[3]

Ca. 10 mg der Fluorophor-Quencher-Bibliothek **47** wurden in HEPES pH 7.8, Na_2CO_3 pH 8.1 und CHES pH 9.2 suspendiert und mit 1 mM Lösungen oder direkte Zugabe in fester Form der Kupferkomplexe versetzt und im Thermoshaker geschüttelt. Außerdem wurde auch die Temperatur von 25°C bis 50°C variiert. Nachdem auch nach 3 Tagen in keinem der

Experimente etwas passierte, wurden die Konzentration auf 5 mM erhöht, aber auch hier konnten keine fluoreszierenden Beads beobachtet werden.

[3] E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7015.

6.4.4 Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3, dem Lysin-Peptid 72 und der Fluorophor-Quencher-Bibliothek 47 mittels Fenton Reaktion (Fe^{3+})

Ca. 2 mg des EDTA-Peptid 3 und Lysin Peptid 72 und ca. 10 mg der modifizierten Bibliothek wurden mit verschiedenen Konzentrationen einer FeCl_3 Lösung für 10 min inkubiert, mit Wasser gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen einer Ascorbat und H_2O_2 Lösung in verschiedenen Puffern versetzt. Die untenstehende Tabelle zeigt die verschiedenen Versuche auf. Nur die Reaktion mit der F-Q-Bibliothek und 80mM H_2O_2 und 40 mM Ascorbat führte zum gewünschten Ergebnis.

(+ = wurde getestet, - = wurde nicht getestet).

KH_2PO_4 (100 mM) pH 2.0	TRIS (10 mM) pH 7.2	TRIS (10 mM) pH 5.0	EDTA-Peptid		Lysin-Peptid 72		Bibliothek 47	
			c(H_2O_2)	c(Asc)	c(H_2O_2)	c(Asc)	c(H_2O_2)	c(Asc)
-	+	+	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM
+	+	+	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
-	+	+	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
+	+	+	20 μM	10 μM	20 μM	10 μM	20 μM	10 μM
-	+	+	200 μM	100 μM	200 μM	100 μM	200 μM	100 μM
+	+	+	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM
-	+	+	80 mM	40 mM	80 mM	40 mM	80 mM	40 mM
+	+	+	2.5 μM	10 μM	2.5 μM	10 μM		
-	+	+	25 μM	100 μM	25 μM	100 μM		
+	+	+	250 μM	1 mM	250 μM	1 mM		
-	+	+	2.5 mM	10 mM	2.5 mM	10 mM		
+	+	+	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM		

6.4.5 Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3 und der Fluorophor-Quencher-Bibliothek 47 mittels Fenton-Reaktion (Fe^{2+})

Ca. 2 mg des EDTA-Peptids 3 und ca. 10 mg der modifizierten Bibliothek 47 wurden mit verschiedenen Konzentrationen einer FeCl_2 Lösung für 10 min inkubiert, mit Wasser gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen einer H_2O_2 Lösung in MES Puffer pH 5.0 versetzt. Die untenstehende Tabelle zeigt die verschiedenen Versuche auf (+ = getestet).

MES Puffer pH 5.0	EDTA-Peptide 3 $c(\text{H}_2\text{O}_2)$	Bibliothek 47 $c(\text{H}_2\text{O}_2)$
+	10 μM	10 μM
+	100 μM	100 μM
+	1 mM	1 mM
+	10 mM	10 mM
+	160 mM	160 mM

6.4.6 Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3, Lysin-Peptid 72 und Terpyridin-Peptid 70 mittels Fenton Reaktion (Cu^{2+})

Ca. 2 mg des EDTA-Peptids 3, Lysin-Peptids 72 und Terpyridin-Peptids 70 wurden mit verschiedenen Konzentrationen einer CuCl_2 Lösung für 10 min inkubiert, mit Wasser gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen einer Ascorbat und H_2O_2 Lösung in verschiedenen Puffern versetzt. Die untenstehende Tabelle zeigt die verschiedenen Versuche auf (+ = getestet).

TRIS Puffer pH 7.2	MES Puffer pH 5.0	KH_2PO_4 Puffer pH 2.0	EDTA-Peptid 3		Lysin-Peptid 72		Terpy-Peptid 70	
			$c(\text{H}_2\text{O}_2)$	$c(\text{Asc})$	$c(\text{H}_2\text{O}_2)$	$c(\text{Asc})$	$c(\text{H}_2\text{O}_2)$	$c(\text{Asc})$
+	+	+	80 mM	40 mM	80 mM	40 mM	80 mM	40 mM
+	+	+	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
+	+	+	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
+	+	+	20 μM	10 μM	20 μM	10 μM	20 μM	10 μM
+	+	+	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM
+	+	+	2.5 μM	10 μM	2.5 μM	10 μM	2.5 μM	10 μM
+	+	+	250 μM	1 mM	250 μM	1 mM	250 μM	1 mM

6.4.7 Spaltversuche mit dem EDTA-Peptid 3 und Lysin-Peptid 72 in Lösung unter HPLC Kontrolle

1 mM Lösungen der Peptide wurden mit 10 μL einer 100 mM $\text{FeSO}_4/\text{FeCl}_3$ Lösung versetzt (1:1) und für ca. 10 min bei RT belassen. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an H_2O_2 (im Fall von Fe^{3+} auch Ascorbat) zugegeben und das Verhalten der Peptide mit HPLC kontrolliert ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ Gradient von 100:0 bis 2:98 (v/v), Detektion bei 210 und 254 nm).

6.5 Vorschrift für die kombinatorischen Agarosegel-Assays

Die entsprechenden Agarose-Gele wurden erwärmt, die Beads darin eingebettet und die Mischung auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die Substrate in definierten Konzentrationen auf die Gele gegeben.

Methylrot: die Beads wurden in 0.5 % Agarose in H_2O nanopur eingebettet und mit einigen Tropfen einer 1 mg/mL konzentrierten Methylrotlösung versetzt.

Pyrene 80 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M Acetat pH 4.0 eingebettet und mit 200 μL einer 0.4 mM Stocklösung versetzt.

Pyrene 0.8 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M HEPES pH 7.0 eingebettet und mit 200 μL einer 4 μM Stocklösung versetzt.

Pyrene 0.08 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M Carbonat pH 10.0 eingebettet und mit 200 μL einer 0.4 μM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 80 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M Acetat pH 4.0 eingebettet und mit 200 μL einer 0.4 mM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 0.8 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M HEPES pH 7.0 eingebettet und mit 200 μL einer 4 μM Stocklösung versetzt.

Pyrenalkohol 0.08 μM : die Beads wurden in 0.5 % Agarose in 0.5 M Carbonat pH 10.0 eingebettet und mit 200 μL einer 0.4 μM Stocklösung versetzt.

6.6 Vorschrift für die kombinatorischen Metallbindungs-Assays

Ca. 8 mg der Bibliotheken 1 und 2 wurden mit 0.5 mM Nickel(II)chlorid- bzw. 0.5 mM Eisenchlorid(III)lösung versetzt, 30 min inkubiert und danach mit nanopurem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Nachweisreagenzien zugegeben, die colorierten Beads isoliert und die abgespaltenen Tag-Alkohole mittels EC-GC analysiert.

6.7 Vorschrift für die kombinatorischen Silber-Assays

Ca. 10 mg der Bibliotheken **1** und **2** wurden mit einer 0.05 M Silbernitrat-Lösung versetzt und 15 min abgedunkelt im Ultraschallbad belassen. Danach wurde die Lösung abdekantiert und die Beads 5 mal mit nanopurem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Beads entweder mit einer 15 W Lampe für 8 h bestrahlt oder mit einer 0.05 M Ascorbat Lösung versetzt und unter dem Mikroskop analysiert. Die colorierten Beads wurden isoliert und mittels EC-GC analysiert. Für die Einzelerperimente wurden die Beads unter den gleichen Bedingungen behandelt.

6.8 Vorschrift für die ESI-Studien mit den Peptiden und Silber

Für die Experimente wurden die Peptide in Konzentrationen von 0.1 mg/mL (zwischen 0.34 μmol und 0.13 μmol) eingesetzt, mit der fünffachen Konzentration an AgNO_3 gemischt und mit Hilfe von ESI vermessen.

Peptide	ESI-MS	
	Peptid allein M [g/mol]	Peptid:Ag 1:1- Komplex
AcD-His-Pro-Aib-L-Tyr-NH ₂ 97b	541.6	649.5 (schwach)
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Tyr-NH ₂ 98b	491.5	598.2 (stark)
AcL-Ser-Pro-Aib-L-Ser-NH ₂ 99b	415.4	523.3 (mittel)
AcL-Tyr-L-Tyr-NH ₂ 100b	385.4	494.0 (schwach)
AcL-Tyr-Gly-L-Tyr-NH ₂ 101b	442.5	550.4 (mittel)
AcD-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NH ₂ 92b	484.5	592.5 (stark)
AcL-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NH ₂ 93b	484.5	592.5 (mittel)
AcL-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NH ₂ 95b	434.5	543.3 (mittel)
AcD-Ser- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NH ₂ 94b	434.5	543.3 (mittel)
AcL-Tyr- <i>rac</i> -ACHC-D-Ser-NH ₂ 96b	434.5	543.3 (mittel)
AcD-Asp- β -Ala-D-Asp-NH ₂ 102b	360.3	-----
AcL-Asp-Pro-Gly-L-Asp-NH ₂ 46b	443.3	550.7 (schwach)
AcD-His-L-His-NH ₂ 120b	333.5	550.8 (1:2 Komplex)
AcL-His-Gly-L-His-NH ₂ 112b	390.4	498.3 (stark)
AcD-His-(<i>S,S</i>)ACHC-L-Tyr-NH ₂ 107b	484.5	592.5 (schwach)
AcD-His-(<i>R,R</i>)ACHC-L-Tyr-NH ₂ 106b	484.5	592.5 (schwach)
AcD-Ser-(<i>R,R</i>)ACHC-L-Tyr-NH ₂ 108b	434.5	543.3 (stark)
AcD-Ser-(<i>S,S</i>)ACHC-L-Tyr-NH ₂ 109b	434.5	543.3 (stark)
AcL-Tyr-(<i>R,R</i>)ACHC-D-Ser-NH ₂ 110b	434.5	543.3 (stark)
AcL-Tyr-(<i>S,S</i>)ACHC-D-Ser-NH ₂ 111b	434.5	543.3 (stark)
AcD-His- <i>rac</i> -ACHC-L-Phe-NH ₂ 117b	468.0	575.9 (schwach)
AcD-His-L-Tyr-NH ₂ 119b	359.4	467.0 (mittel)
AcD-His-Gly-L-Tyr-NH ₂ 118b	416.4	524.4 (mittel)

Peptide	ESI-MS	
	Peptid allein M [g/mol]	Peptid:Ag 1:1- Komplex
AcD-His-Gly-D-Asp-NH ₂ 116b	368.4	476.3 (schwach)
AcL-His-Pro-Gly-D-Asp-NH ₂ 115b	465.5	573.5 (schwach)
AcL-Asp-β-Ala-D-His-NH ₂ 116b	382.4	490.4 (schwach)
AcL-Cys-Gly-L-Ala-NH ₂ 121b	290.3	-----
AcL-Asp- <i>rac</i> -ACHC-L-Tyr-NH ₂ 122b	463.5	571.4 (stark)
AcLTyr-ProGly-LTyr-ProGly-LSer-NH ₂ 103b	780.8	889.3 (stark)
AcLHis-LHis-ProGly-DHis-NH ₂ 104b	624.8	731.2 (stark)
AcLSer-Ahx-DAsp-Ahx-DHis-NH ₂ 105b	624.7	731.3 (schwach)

6.9 Vorschrift für die Isothermischen Mikrokolorimetrie Studien (IMC) zur Inhibition des Bakteriums

Die Versuche wurden von Dr. Ueli von Ah in der Gruppe von Prof. Dr. U. A. Daniels im Laboratorium für orthopädische Biomechanik an der Universität Basel (Biozentrum) in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Tünde Vig-Slenters durchgeführt. Das festphasengebundene Peptid wurde mit 0.05 M AgNO₃ Lösung behandelt, gewaschen und entweder 8 h mit Licht bestrahlt oder mit einer 0.05 M Ascorbat-Lösung versetzt. Die Proben wurden anschließend über Phosphorpentoxid getrocknet und genau abgewogene Mengen der festphasengebundenen Peptide wurden in 4 mL Ampullen gegeben. Das verwendete Bakterium *Staph. epidermidis* wurden in sog. „brain-heart infusion serum (BHI)“ kultiviert, anschließend direkt in die Ampulle mit dem vorhandenen Peptid eingeschlossen und geschüttelt. Die freigesetzte Wärme die durch das Bakterienwachstum erzeugt wird, wurde über einen Zeitraum von 24 oder 48 h gemessen.

6.10 Vorschrift für die ITC Studien

6.10.1 Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 7 und Peptid Arg-Arg-ArgNHPr 128

Die Messzelle des Mikrokolorimeters wurde mit 1.42 mL einer 200 μM Lösung von Rezeptor 7 (720 μg) in 1.9 mL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) befüllt. Die Messzelle wurde auf 26 °C equilibriert und anschließend wurden unter Rühren alle 5 min 5 μL einer 8 mM Lösung von Peptid **128** in 500 μL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) zutitriert. Die entstehenden Wärme Flüsse wurden gemessen und aufgezeichnet und mit Hilfe von least square fitting analysiert welches auf Origin basiert.

6.10.2 Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 8 und Peptid Arg-Arg-ArgNHPr 128

Der Versuch und anschließende Auswertung wurde analog zu Punkt 1 durchgeführt. Für die Messung wurden 200 μM Rezeptor **8** (631 μg) in 1.9 mL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) gelöst und mit 5 μL einer 8 mM Lösung von Peptid **128** in 500 μL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) zutitriert.

6.10.3 Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 9 und Peptid Arg-Arg-ArgNHPr 128

Der Versuch und anschließende Auswertung wurde analog zu Punkt 1 durchgeführt. Für die Messung wurden 200 μM Rezeptor **9** (506 μg) in 1.9 mL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) gelöst und mit 5 μL einer 8 mM Lösung von Peptid **128** in 500 μL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) zutitriert.

6.10.4 Bindungsaffinität zwischen Rezeptor 10 und Peptid Arg-Arg-ArgNHPr 128

Der Versuch und anschließende Auswertung wurde analog zu Punkt 1 durchgeführt. Für die Messung wurden 200 μM Rezeptor **10** (470 μg) in 1.9 mL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) gelöst und mit 5 μL einer 8 mM Lösung von Peptid **128** in 500 μL TRIS HCl Puffer (100 mM, pH 8.0) zutitriert.

Bemerkung: für alle Versuche wurde zuerst eine Peptidstocklösung aus 5.73 mg Peptid **128** in 500 μL NH_4OAc hergestellt. Anschließend wurden 228 μL dieser Peptid-Lösung in 100 μL 0.5M TRIS HCl Puffer und 172 μL Wasser gelöst.

6.11 Vorschrift für die NMR Titration

Für die Untersuchungen wurde zuerst eine Stocklösung aus 4.85 mg Peptid **92b** in einer Mischung aus 750 μL H_2O und 250 μL D_2O hergestellt. Für jede Titrationsmessung wurden 100 μL Peptid **92b** (2.22mM) verwendet und mit 350 μL H_2O oder den entsprechenden

Äquivalenten an AgNO_3 Lösung versetzt. Die Titration wurde mit 4.90 eq, 24.60 eq, 98.01 eq, 250.82 eq, 490.59 eq und 702.37 eq an Silbernitrat durchgeführt.

6.12 Vorschrift für die UV Kinetik mit Indigo

6.12.1 Peptide und Phosphatester in Lösung

Die Untersuchungen wurden in MES pH 5.0, HEPES pH 7.0 und CHES pH 9.2 durchgeführt und die Peptide **42b**, **43b**, **44b**, **45b** und **46b** wurden in Konzentrationen von 2 mM eingesetzt. Der Ester wurde in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt. Die Absorption des Phosphatesters wurde auch in Gegenwart von 2 mM der Metallsalzlösungen verfolgt. Die Spektren wurden von 250 bis 700 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 240 nm/min aufgenommen.

6.12.2 Festphasen-gebundene Peptide und Phosphatester

5 mg der Festphasen-gebundenen Peptide **42a**, **43a**, **44a**, **45a** und **46a** wurden im entsprechenden Puffer suspendiert, mit 1 mM Metallsalzlösung versetzt, gefolgt von 1 mM des Phosphatesters.

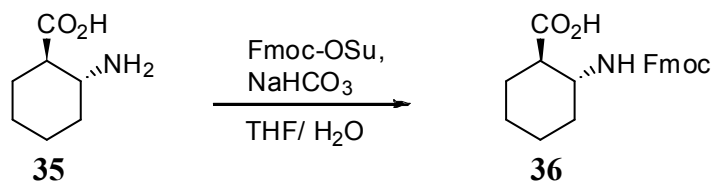
Die Absorptionen der jeweiligen Messungen wurden nach 10, 30, 60, 120, 160, 540, 1440 und 2880 Minuten gemessen und mit Origin ausgewertet.

Alle Versuche wurden in 2.7 mL Gefäßen durchgeführt und für die Zeitmessungen wurde immer soviel entfernt, dass die Konzentration des Indolylphosphats 0.2 mM betrug. Die Spektren wurden von 250 bis 700 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 240 nm/min aufgenommen.

6.13 Vorschrift für die UV Studien mit Silber

10 mM Konzentrationen des Peptids **92a** wurden mit einer 50 mM AgNO_3 -Lösung gemischt und unter einer 15 W Lampe belassen. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Absorption gemessen. Die Spektren wurden von 250 bis 700 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 240 nm/min aufgenommen.

7. Synthese der Aminosäure für die Bibliotheken: Fmoc-*trans*-2-aminocyclohexancarbonsäure (Fmoc-ACHC-OH) 36



1.93 g (13.45 mmol, 1.0 eq) *trans*-2-Aminocyclohexansäure wurden in 125 ml THF suspendiert. Nach Zugabe von 4.54 g (13.45 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Succinimid, gefolgt von 62 ml H₂O und 62 ml THF sowie 1.34 g (16.14 mmol, 1.2 eq) NaHCO₃ und 62 ml THF wurde über Nacht bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde dann 1.5 N HCl gegeben und das THF am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Dabei bildete sich ein weißer Niederschlag, der abfiltriert und mehrmals mit EtOAc gewaschen wurde. Die Mutterlauge wurde erneut eingengt, der Niederschlag abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Nach Umkristallisation des erhaltenen Niederschlages aus EtOAc/Hexan (1:1) wurden 3.67 g (10.09 mmol, 75%) eines weißen Feststoffs isoliert.

C₂₂H₂₃NO₄ 365.42 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (92.5:7.5); R_f: 0.36 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 12.05 (br, 1H, OH), 7.89 (d, *J* = 7.44 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.68 (t, *J* = 7.14 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.41 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.33 (m, 3H, ArH_{Fmoc}, NH), 4.22 (m, 3H, FmocCH, FmocCH₂), 3.5 (m, 1H, CH_{ACHC}), 2.26 (m, 1H, CH_{ACHC}), 1.87 (brd, 1H, CH_{ACHC}), 1.76 (brd, 1H, CH_{ACHC}), 1.65 (brt, 2H, CH_{ACHC}), 1.42-1.11 (m, 4H, CH_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 175.3 (CO), 155.2 (CO), 143.9 (CH_{Ar}), 143.7 (CH_{Ar}), 140.6 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 125.3 (CH_{Ar}), 125.2 (CH_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 65.1 (FmocCH), 50.7 (FmocCH₂), 48.3 (CH_{ACHC}), 46.6 (CH_{ACHC}), 32.1 (CH_{ACHC}), 28.8 (CH_{ACHC}), 24.3 (CH_{ACHC}), 24.2 (CH_{ACHC});

ESI-MS *m/z*: berechnet: 365.42; gefunden: 366.1 [M+H]⁺.

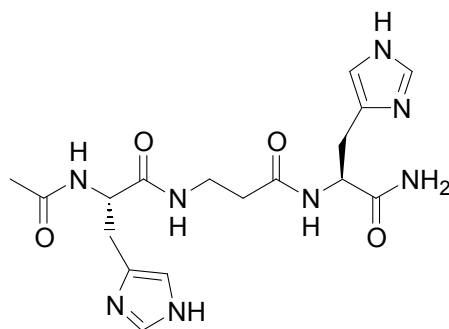
8. Synthese der Peptide für die Phosphatesterspaltung

In diesen Tabellen sind die verwendeten Mengen der einzelnen Aminosäuren und Kopplungsreagenzien für alle in diesem Abschnitt 9 beschriebenen Peptide aufgeführt. Alle Peptide wurden mit dem Peptidsynthesizer hergestellt.

TentaGel	Substanz	Eq	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
	Fmoc-β-Ala-OH	4	0.34	107.1	
	Fmoc-L-His(Trt)-OH	4	0.34	213.2	
	Fmoc-D-His(Trt)-OH	4	0.34	213.2	
	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	4	0.34	131.9	
	Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	4	0.34	141.6	
	Fmoc-L-Pro-OH	4	0.34	116.1	
	Fmoc-Gly-OH	4	0.34	102.3	
	Fmoc-Ahx-OH	4	0.34	121.6	
	HCTU	4	0.34	107.0	
	¹ Pr ₂ NEt	12	1.0		0.14
	NEt ₃	100	8.6		1.20
Ac ₂ O	50	4.3		0.41	

Rink	Substanz	Eq	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
	Fmoc-β-Ala-OH	4	0.57	176.8	
	Fmoc-L-His(Trt)-OH	4	0.57	351.9	
	Fmoc-D-His(Trt)-OH	4	0.57	351.9	
	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	4	0.57	217.8	
	Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	4	0.57	234.0	
	Fmoc-L-Pro-OH	4	0.57	191.6	
	Fmoc-Gly-OH	4	0.57	168.8	
	Fmoc-Ahx-OH	4	0.57	200.7	
	HCTU	4	0.57	234.90	
	¹ Pr ₂ NEt	12	1.7		0.29
	NEt ₃	100	14.2		2.0
Ac ₂ O	50	7.1		0.67	

8.1 Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ 42a/b



Synthese auf TentaGel 42a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 42b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 60.0 mg (quant.).

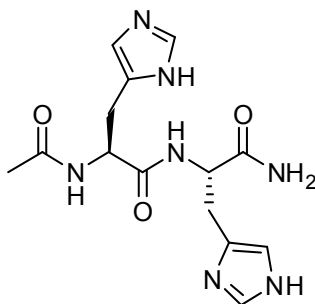
C₁₇H₂₄N₈O₄ 404.42 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 7.34 (d, J = 7.6 Hz, 4H, CH_{Imi}), 4.71 (dd, J = 8.1 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH α _{His}), 4.62 (dd, J = 8.6 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH α _{His}), 3.42 (m, 2H, CH₂ _{β -Ala}), 3.25 (m, 2H, CH₂ β _{His}), 3.06 (m, 2H, CH₂ β _{His}), 2.43 (m, 2H, CH₂ _{β -Ala}), 1.96 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 174.7/174.0/173.5 (CO), 135.0 (C_{qImi}), 131.3 (CH_{Imi}), 118.4 (CH_{Imi}), 53.8 (CH α _{His}), 53.3 (CH α _{His}), 37.7 (CH₂ _{β -Ala}), 36.4 (CH₂ _{β -Ala}), 28.1 (CH₂ β _{His}), 28.0 (CH₂ β _{His}), 22.6 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 404.42; gefunden: 517.2 [M+TFA-H]⁻.

8.2 Ac-L-His-L-His-NH₂ 43a/b



Synthese auf TentaGel 43a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 43b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 50.0 mg (quant.).

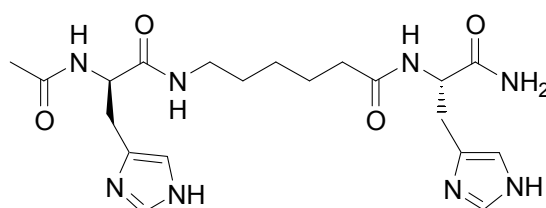
C₁₄H₁₉N₇O₃ 333.35 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.80 (d, J = 5.6 Hz, 1.5 Hz, 2H, CH_{Imi}), 7.34 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Imi}), 4.70 (dd, J = 8.1 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH α _{His}), 4.63 (dd, J = 7.6 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH α _{His}), 3.25 (m, 2H, CH₂ β _{His}), 3.10 (dq, J = 8.1 Hz, 7.6 Hz, 2H, CH₂ β _{His}), 1.95 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 174.3/173.5/172.4 (CO), 135.1/135.0 (C q _{Imi}), 130.9/130.9 (CH_{Imi}), 118.5/118.4 (CH_{Imi}), 53.9 (CH α _{His}), 53.3 (CH α _{His}), 28.7 (CH₂ β _{His}), 27.7 (CH₂ β _{His}), 22.4 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 333.35; gefunden: 334.2 [M+H]⁺.

8.3 Ac-D-His-Ahx-L-His-NH₂ 44a/b



Synthese auf TentaGel 44a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 44 b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 63.0 mg (quant.).

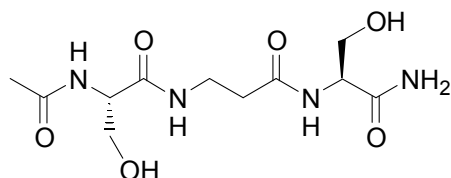
C₂₀H₃₀N₈O₄ 446.24 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.81 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, CH_{Imi}), 7.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH_{Imi}), 4.73 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH_α His), 4.66 (dd, *J* = 8.1 Hz, 5.8 Hz, 1H, CH_α His), 3.23 (dd, *J* = 13.6 Hz, 5.3 Hz, 2H, CH₂β His), 3.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂β His), 3.07 (m, 2H, NHCH₂ Ahx), 2.23 (m, 2H, CH₂CO Ahx), 1.96 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.50 (m, 4H, CH₂ Ahx), 1.21 (m, 2H, CH₂ Ahx);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 176.1/174.8/173.4/172.1 (CO), 135.0/134.7 (C_qImi), 131.4/131.4 (CH_{Imi}), 118.4/118.3 (CH_{Imi}), 53.8 (CH_α His), 53.1 (CH_α His), 40.4 (NHCH₂ Ahx), 36.6 (CH₂CO Ahx), 29.9 (CH₂β His), 28.2 (CH₂β His), 27.3 (CH₂ Ahx), 26.3 (CH₂ Ahx), 22.6 (CH₂ Ahx), 22.6 (CH₃ Ac);

ESI-MS m/z: berechnet: 446.24; gefunden: 447.2 [M+H]⁺.

8.4 Ac-L-Ser-β-Ala-L-SerNH₂ 45a/b



Synthese auf TentaGel 45a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 45b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 44.0 mg (quant.).

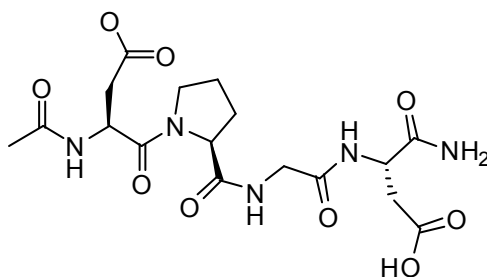
C₁₁H₂₀N₄O₆: 304.30 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 4.41 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, CHα_{Ser}), 4.35 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, CHα_{Ser}), 3.79 (m, 2H, CH₂β_{Ser}), 3.74 (dd, *J* = 11.1 Hz, 5.1 Hz, 2H, CH₂β_{Ser}), 3.50 (m, 2H, CH₂β-Ala), 2.47 (dd, *J* = 13.1 Hz, 7.1 Hz, 2H, CH₂β-Ala), 2.02 (s, 3H, CH₃ Ac).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 174.3/173.7/173.1/172.7 (CO), 63.1/63.1 (CH₂β_{Ser}), 57.1 (CHα_{Ser}), 56.86 (CHα_{Ser}), 37.1 (CH₂β-Ala), 36.7 (CH₂β-Ala), 22.7 (CH₃ Ac).

ESI-MS m/z: berechnet: 304.30; gefunden: 304.8 [M]⁺ (100), 327.6 [M+Na]⁺ (70)

8.5 Ac-L-Asp-ProGly-L-Asp-NH₂ 46a/b



Synthese auf TentaGel 46a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 46b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 72.7 mg (quant.).

C₁₇H₂₅N₅O₉ 443.17 g/mol

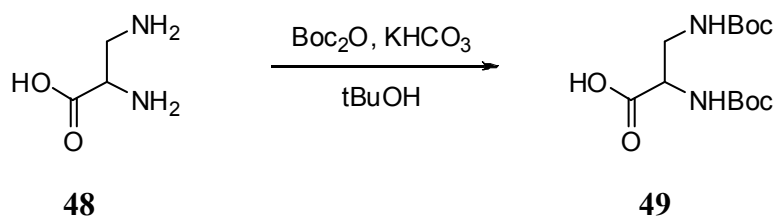
¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 5.01 (dd, *J* = 7.8 Hz, 6.3 Hz, 1H, CHα_{Asp}), 4.75 (dd, *J* = 8.1 Hz, 5.3 Hz, 1H, CHα_{Asp}), 4.37 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.3 Hz, 1H, CHα_{Pro}), 3.96 (m, 1H, CH₂_{Gly}), 3.83 (m, 3H, CH₂_{Gly}, CH₂δ_{Pro}), 3.0 (d, *J* = 16.9 Hz, 8.1 Hz, 1H, CH₂β_{Asp}), 2.89 (dd, *J* = 16.9 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH₂β_{Asp}), 2.81 (dd, *J* = 16.7 Hz, 7.8 Hz, 1H, CH₂β_{Asp}), 2.69 (dd, *J* = 16.6 Hz, 8.1 Hz, 1H, CH₂β_{Asp}), 2.27 (m, 1H, CH₂β_{Pro}), 2.07 (m, 3H, CH₂β_{Pro}, CH₂γ_{Pro}), 1.96 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 175.4/174.9/174.1/172.9/172.6/171.7 (CO), 62.6 (CHα_{Pro}), 51.2 (CHα_{Asp}), 50.5 (CHα_{Asp}), 44.1 (CH₂_{Gly}), 36.8 (CH₂β_{Asp}), 36.7 (CH₂β_{Asp}), 30.5 (CH₂δ_{Pro}), 27.6 (CH₂β_{Pro}), 25.9 (CH₂γ_{Pro}), 22.3 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 443.17; gefunden: 466.2 [M+Na]⁺.

9. Synthese des EDTA Templates

9.1 2,3-Di(butyloxycarbonylamino)propionsäure 49



Zu einer Lösung aus 2.5g (0.02 mmol) 2,3-Diaminopropionsäure in 30 mL 1 M KHCO₃-Lösung und 35 mL *tert*-BuOH wurden unter Rühren 15.5 g (0.07 mol) Boc₂O zugegeben. Der pH-Wert der Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Na₂CO₃ zwischen 8 und 9 gehalten und die Lösung wurde 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Alkohol i. V. entfernt und der Rückstand dreimal mit H₂O und Pentan extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit wässriger KHSO₄ angesäuert (pH 2-3) und dreimal mit Essigester rückextrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der ölige Rückstand aus Petrolether kristallisiert. Man erhielt 5.24 g (0.02 mol, 97%) eines weißen Feststoffes.

C₁₃H₂₄N₂O₆ 304.34 g/mol

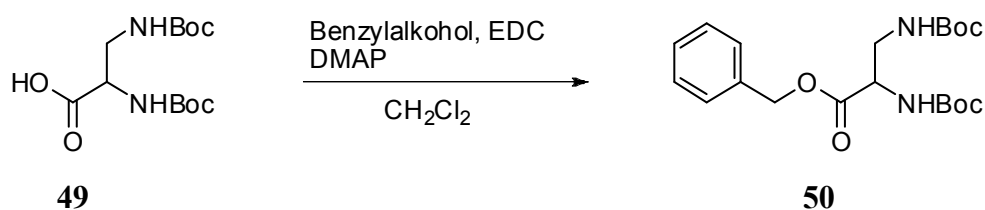
DC MeOH/EtOAc (1:2); R_f = 0.3 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 4.22 (brt, 1H, CH), 3.47 (dd, *J* = 14.2 Hz, 4.5 Hz, 1H, CH₂), 3.35 (m, 1H, CH₂), 1.44 (s, 18H, ^tBu);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 80.42 (C(CH₃)₃), 55.45 (CH), 42.71 (CH₂), 28.73 (C(CH₃)₃);

ESI-MS *m/z*: berechnet: 304.34; gefunden: 327.2 [M + Na]⁺.

9.2 2,3-Di(butyloxycarbonylamino)propionsäure benzylester 50



1.12 g (3.70 mmol, 1.0 eq) der Carbonsäure wurden in 23 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 0.41 mL Benzylalkohol (3.90 mmol, 1.05 eq), gefolgt von 0.72 g EDC (3.70 mmol, 1.0 eq) und kat. Mengen DMAP versetzt. Die Mischung wurde 12 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde mit H_2O extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 99.9:0.1 bis 95:5 (v/v)) erhielt man 1.29 g (3.30 mmol, 88%) des Produktes.

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ 394.46 g/mol

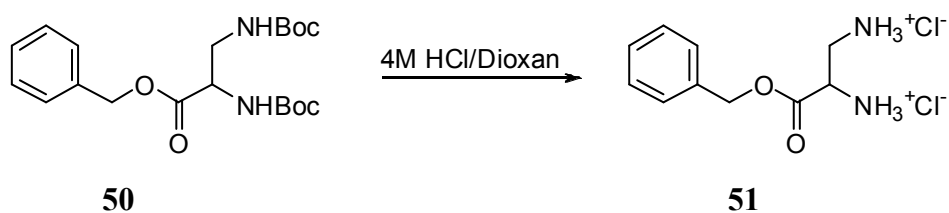
DC $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1); $R_f = 0.7$

$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 7.34 (m, 5H, ArH), 5.53 (brd, $J = 6.58$ Hz, 1H, CH), 5.16 (s, 2H, BnCH₂), 4.88 (br, 1H, CH₂), 4.38 (br, 1H, CH₂), 1.41 (s, 18 H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 170.7 (BnCOOR), 156.1 (COO^tBu), 155.4 (COO^tBu), 135.2 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 79.9 (C(CH₃)₃), 67.3 (BnCH₂), 54.3 (CH), 42.3 (CH₂), 28.2 (C(CH₃)₃);

ESI-MS m/z : berechnet: 394.46; gefunden: 417.1 [M+Na]⁺.

9.3 2,3-Diaminopropionsäure benzylester HCl-Salz 51



1.63 g Benzylester (4.10 mmol, 1.0 eq) wurden mit 10.3 mL 4 M HCl/Dioxan (10 eq) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Danach wurde Dioxan am Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand mit Diethylether ausgefällt. Der Ether wurde abdekantiert und der Rückstand noch mehrere Male dieser Prozedur unterworfen. Man erhielt einen weißen Feststoff (4.10 mmol, quant.), der ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde.

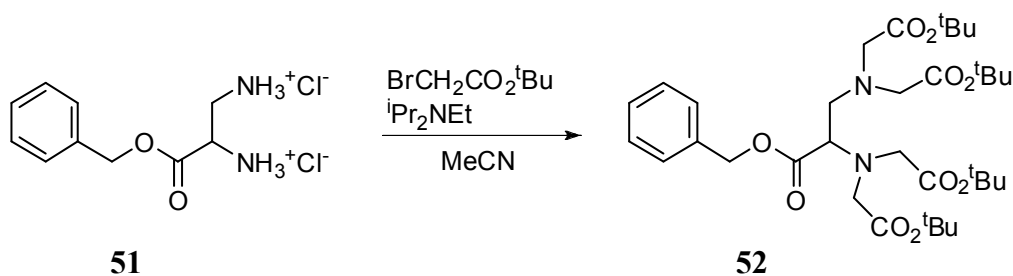
$C_{10}H_{16}N_2O_2Cl_2$ 267.15 g/mol

1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 7.46 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, ArH), 7.41 (m, 3H, ArH), 5.43 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, BnCH₂), 5.32 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, BnCH₂), 4.47 (dd, $J = 7.67$ Hz, 5.68 Hz, 1H, CH), 3.46 (m, 2H, CH₂);

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 167.4 (BnCOOR), 135.7 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 70.2 (BnCH₂), 51.2 (CH), 39.5 (CH₂);

ESI-MS m/z : berechnet: 267.15; gefunden: 195.1 [M-H-2Cl]⁺.

9.4 2,3-Bis[di(^tbutyloxycarbonylmethyl)amino]-propionsäurebenzylester **52**



1.10 g HCl-Salz (4.10 mmol, 1.0 eq) wurden in 30 mL Acetonitril suspendiert und mit 3.65 mL Bromessigsäure-*tert*-Butylester (0.03 mol, 6.0 eq) gefolgt von 7.0 mL DIPEA (0.04 mol, 10.0 eq) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 12 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde solange mit NH₄Cl/EtOAc extrahiert bis die wässrige Phase farblos ist, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/EtOAc (7:1)) erhielt man 2.70 g (4.10 mmol, quant.) eines gelblichen Öls.

C₃₂H₅₄N₂O₁₀ 650.8 g/mol

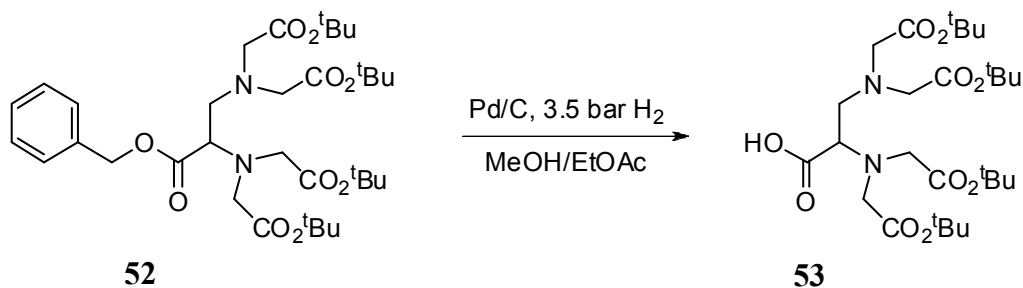
DC CH₂Cl₂/MeOH (9.5:5); R_f = 0.7

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 7.34 (m, 5H, ArH), 5.12 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, BnCH₂), 3.65 (dd, *J* = 9.05 Hz, 5.62 Hz, 1H, CH), 3.53 (dd, *J* = 7.02 Hz, 3.6 Hz, 4H, NCH₂COO^tBu), 3.45 (s, 4H, NCH₂COO^tBu), 3.13 (dd, *J* = 13.63 Hz, 5.58 Hz, 1H, CH₂), 3.05 (dd, *J* = 13.63 Hz, 9.09 Hz, 1H, CH₂), 1.41 (s, 36H, ^tBu);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 171.8 (BnCOOR), 170.7 (COO^tBu), 170.6 (COO^tBu), 136.1 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 80.7 (C(CH₃)₃), 66.2 (BnCH₂), 64.1 (CH), 56.3 (CH₂), 55.4 (NCH₂COO^tBu), 53.5 (NCH₂COO^tBu), 28.0 (C(CH₃)₃);

ESI-MS *m/z*: berechnet: 650.8; gefunden: 673.1 [M+Na]⁺ (100), 651.1 [M+H]⁺ (63).

9.5 2,3-Bis[di(^tbutyloxycarbonylmethyl)amino] propionsäure **53**



2.7 g alkylierte Verbindung (4.1 mmol, 1.0 eq) wurden in 10 mL EtOAc/10 mL MeOH gelöst und mit 0.27 g Pd/C (10% Pd) versetzt und 3 d bei 3.5 bar mit hydriert. Danach wurde das Pd über Celite abfiltriert, der Rückstand mit EtOAc/MeOH gewaschen und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Man erhielt 2.2 g (3.8 mmol, 92%) eines gelben Öls.

C₂₇H₄₈N₂O₁₀ 560.0 g/mol

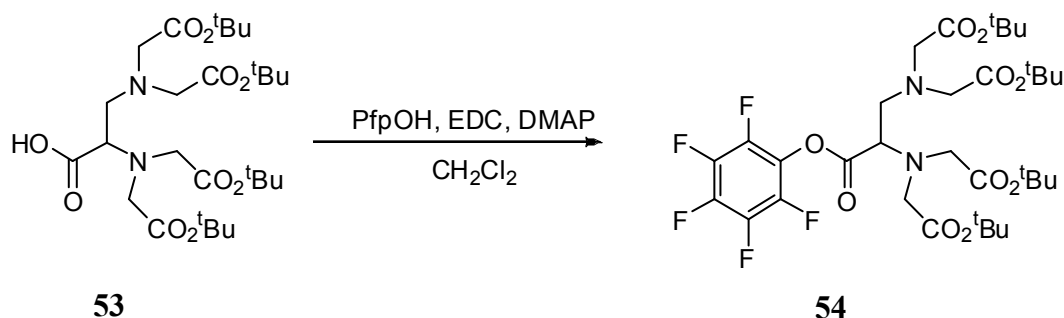
DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f = 0.26 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 3.68 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH), 3.48 (m, 8H, NCH₂COO^tBu), 3.09 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.42 (s, 36H, ^tBu);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 173.2 (COOH), 171.5 (COO^tBu), 170.1 (COO^tBu), 81.7 (C(CH₃)₃), 63.0 (CH), 56.6 (NCH₂COO^tBu), 54.8 (NCH₂COO^tBu), 54.6 (CH₂), 28.1 (C(CH₃)₃);

ESI-MS *m/z*: berechnet: 560.0; gefunden: 583.1 [M+Na]⁺.

9.6 2,3-Bis[di(^tbutyloxycarbonylmethyl)amino]-propionsäure Pentafluorophenylester 54



2.2 g EDTA-Säure (3.8 mmol, 1.0 eq) wurden in 50 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 0.8 g Pentafluorophenol (4.2 mmol, 1.1 eq), gefolgt von 1.1 g EDC (5.80 mmol, 1.5 eq) und einer Spatelspitze DMAP versetzt. Nach 4 h wurde die Mischung mit H_2O extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Man erhielt 2.6 g (3.50 mmol, 94 %) eines gelben Öls.

$\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_{10}$ 726.0 g/mol

DC EtOAc/Hexan (1:1); $R_f = 0.7$

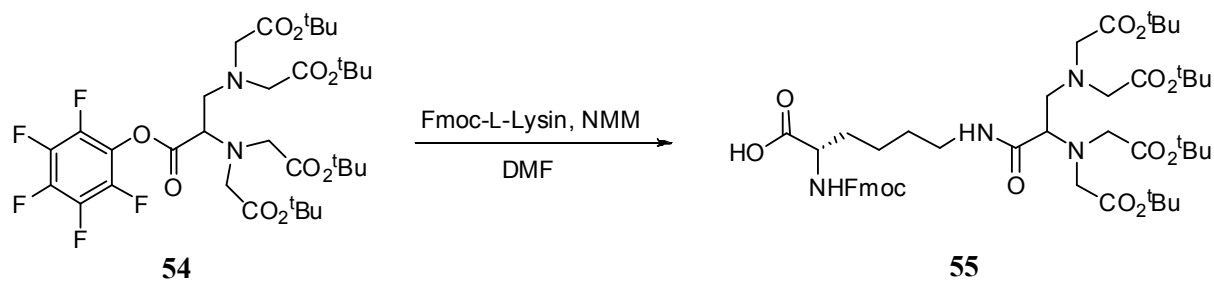
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 4.09 (dd, $J = 8.7$ Hz, 5.7 Hz, 1H, CH), 3.55 (dd, $J = 26.5$ Hz, 17.4 Hz, 4H, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 3.52 (s, 4H, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 3.32 (dd, 14.2 Hz, 6.3 Hz, 1H, CH_2), 3.14 (dd, $J = 13.8$ Hz, 8.8 Hz, 1 H, CH_2), 1.44 (s, 36 H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 170.6 (COO^tBu), 170.9 (COO^tBu), 167.8 (COOPfp), 81.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 64.5 (CH), 56.6 ($\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 55.9 ($\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 53.6 (CH_2), 28.1 (CH_3 ; ^tBu), 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = -151.6 (d, $J = 17.2$ Hz, 2F, CF_{Ar}), -159.4 (t, $J = 21.8$ Hz, 1F, CF_{Ar}), -163.8 (dd, $J = 21.8$ Hz, 18.54 Hz, 2F, CF_{Ar});

ESI-MS m/z : berechnet für: 726.0; gefunden: 749.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

9.7 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Tetra(*tert*-butyl) EDTA-L-Lysine 55



2.6 g EDTA-Pfp (3.6 mmol, 1.0 eq) wurden in 15 mL DMF gelöst und mit 1.7 g Fmoc-Lysin-OH (3.6 mmol, 1.0 eq), gefolgt von 2.0 mL NMM (0.02 mol, 5.0 eq) versetzt und 5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 90:10 (v/v)) erhielt man 1.45 g (1.60 mmol, 44%) eines weißen Feststoffes.

C₃₄H₅₆N₄O₉S₂ 911.1 g/mol

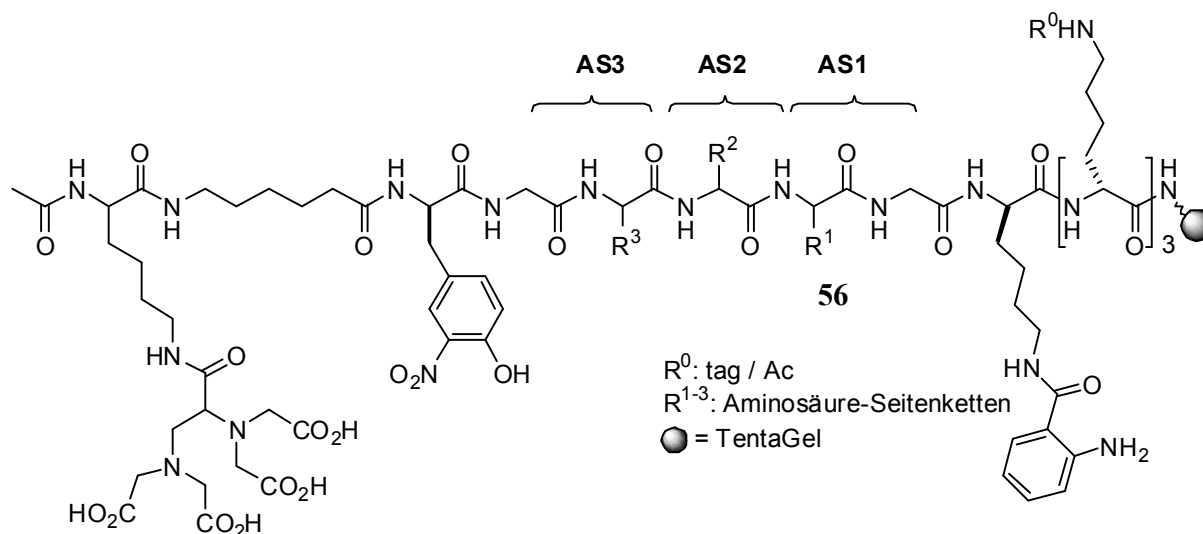
DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f = 0.3 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 8.16 (brs, 1H, NH), 7.88 (d, J = 7.6 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.69 (d, J = 7.6 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 4.23 (m, 3H, FmocCH₂, FmocCH), 3.69 (brs, 1H, Lys-H α), 3.40 (m, 11H, CH, NCH₂COO^tBu, CH₂), 3.02 (m, 3H, Lys-H β , Lys-H ϵ), 2.81 (dd, J = 13.6 Hz, 7.1 Hz, 1H, Lys-H β), 1.63 (m, 2H, Lys-H δ), 1.28 (m, 2H, Lys-H γ), 1.40 (s, 36H, ^tBu);

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 170.97 (COO^tBu), 170.95 (COO^tBu), 170.8 (COOH), 170.1 (NHCOEDTA), 155.7 (CONHLys), 143.8 (CH_{Ar}), 140.6 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 125.2 (CH_{Ar}), 119.9 (CH_{Ar}), 80.07 (C(CH₃)₃), 80.05 (C(CH₃)₃), 65.4 (CH₂Fmoc), 63.3 (CH), 55.3 (NCH₂COO^tBu), 53.9 (NCH₂COO^tBu), 53.6 (CH α), 46.6 (CH₂), 38.3 (CHFmoc), 28.9 (CH ϵ), 27.6 (C(CH₃)₃), 26.7 (CH β), 22.8 (CH γ), 20.5 (CH δ).

ESI-MS m/z : berechnet: 911.1; gefunden: 933.4 [M+Na]⁺.

10. Synthese der EDTA-funktionalisierten Bibliothek 56



(AS1-AS3 = Gly, D/L-Ala, D/L-Leu, D/L-Val, D/L-Pro, D/L-Phe, D/L-Ser, D/L-Thr, D/L-Asn, D/L-Gln, D/L-His, D/L-Asp, D/L-Glu, D/L-Lys, D/L-Arg, D/L-Cys).

Synthese auf TentaGel

Für die Synthese wurden 200.00 mg TentaGel Harz (0.05 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

46.0 mg Fmoc-Gly-OH (0.16 mmol, 3.0 eq)

70.0 mg Fmoc-Quencher-OH (0.16 mmol, 3.0 eq)

95.0 mg (N- α -Fmoc-N- ϵ -Tetra(tert-butyl) EDTA-L-Lysine-OH (0.10 mmol, 2.0 eq)

55.0 mg Fmoc-Ahx-OH (0.16 mmol, 3.0 eq)

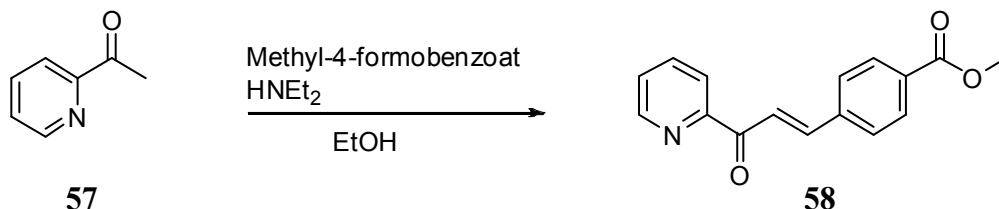
65.0 mg HCTU (0.16 mmol, 3.0 eq)

27.0 μ L i Pr₂NEt (0.16 mmol, 3.0 eq)

0.7 mL NEt₃ (5.2 mmol, 100.0 eq), 0.3 mL Ac₂O (2.6 mmol, 50.0 eq)

11. Synthese des Terpyridin Derivates

11.1 Terpyridin-Enon 58



9.20 mL Acetylpyridin (0.08 mol, 1.0 eq) wurden zu einer Lösung aus 13.60 g Methyl-4-formobenzoat (0.08 mol, 1.0 eq) in 136 mL EtOH getropft. Anschließend wurde innerhalb von 30 min 20.60 mL Diethylamin (0.19 mol, 2.4 eq) zugetropft und die Mischung wurde 7 h bei RT unter N₂-Strom gerührt. Es entstand ein gelber Feststoff, der aus EtOH umkristallisiert wurde und man erhielt 8.10 g (0.03 mol, 37 %) gelbe Kristalle.

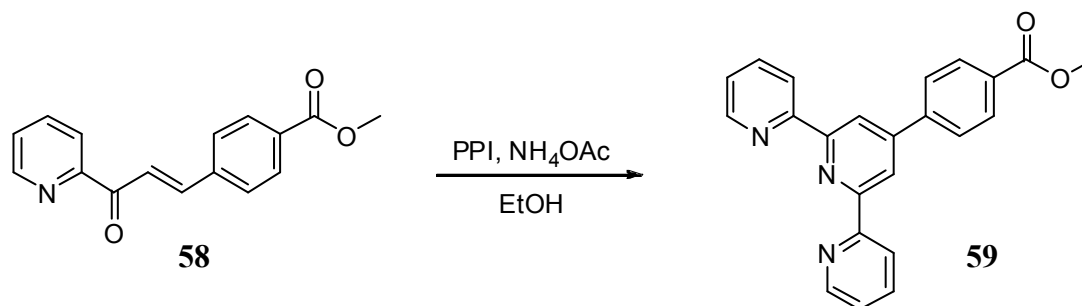
C₁₆H₁₃NO₃ 267.28 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 8.76 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, ArH_{PyR}), 8.39 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, C=C), 8.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH_{PyR}), 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.94 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, C=C), 7.90 (ddd, *J* = 9.3 Hz, 7.5 Hz, 1.8 Hz, 1H, ArH_{PyR}), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.51 (ddd, *J* = 5.7 Hz, 4.6 Hz, 1.0 Hz, 1H, ArH_{PyR}), 3.80 (s, 3H, CH₃);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 189.9 (C=O), 166.5 (CO₂Me), 153.8 (C_q_{PyR}), 148.8 (CH_{PyR}), 143.1 (C_q_{Ar}), 139.3 (C_q_{Ar}), 137.2 (CH_{PyR}), 131.5 (CH_{Ar}), 128.6 (C=C), 127.1 (C=C), 123.0 (CH_{Ar}), 122.9 (CH_{Ar}), 52.3 (CH₃);

ESI-MS *m/z*: berechnet: 267.28; gefunden: 290.0 [M+Na]⁺ (100), 556.9 [2M+Na]⁺ (60).

11.2 Terpyridin Methylester 59



4.53 g Enon (0.02 mol, 1.0 eq) wurden mit 5.62 g PPI (0.02 mol, 1.0 eq), gefolgt von 55 g NH_4OAc (0.71 mol, 42 eq) und 272 mL EtOH versetzt und 3 h refluxiert. Es bildete sich ein gelber Feststoff, der abfiltriert wurde und man erhielt 1.8 g (5.0 mmol, 29%) gelbe Kristalle.

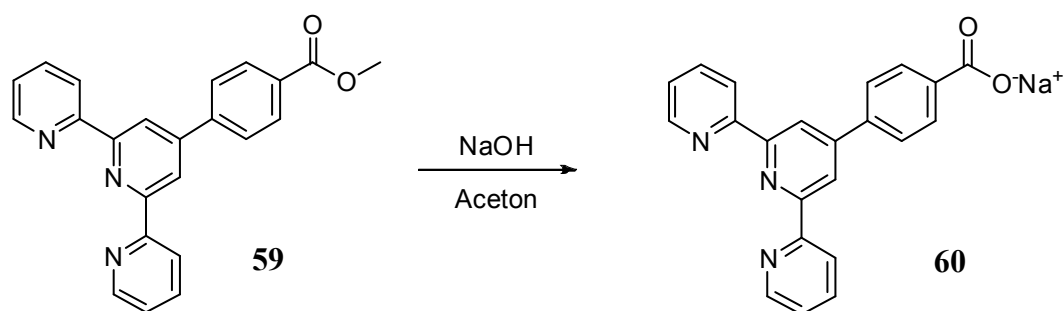
$\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ 367.4 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 8.76 (s, 2H, ArH_{Pyr}), 8.73 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, ArH_{Pyr}), 8.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, ArH_{Pyr}), 8.18 (dd, $J = 6.8$ Hz, 1.9 Hz, 2H, ArH), 7.97 (dd, $J = 6.6$ Hz, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.89 (ddd, $J = 9.4$ Hz, 7.6 Hz, 1.8 Hz, 2H, ArH_{Pyr}), 7.36 (m, 2H, ArH_{Pyr}), 3.96 (s, 3H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 166.8 ($\text{C}=\text{O}$), 156.1 (Cq), 155.9 (Cq_{Pyr}), 149.2 (CH_{Pyr}), 142.9 (Cq_{Ar}), 136.9 (CH_{Pyr}), 130.5 (Cq_{Pyr}), 130.2 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Pyr}), 123.9 (CH_{Pyr}), 121.4 (CH_{Pyr}), 118.9 (CH_{Pyr}), 52.2 (CH_3);

ESI-MS m/z : berechnet: 367.4; gefunden: 390.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 756.9 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ (78).

11.3 Terpyridin Na-Salz 60



0.8 g Methyl ester (2.0 mmol, 1.0 eq) wurden in 220 mL Aceton gelöst und mit 2.0 mL NaOH (2.0 mmol, 1.0 eq) versetzt. Nach 16 h rühren bei RT wurde der weisse Niederschlag über Celite abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Der Feststoff wurde anschliessend mit MeOH gelöst, das Lösungsmittel i. V. entfernt und man erhielt 0.8 g (2.0 mmol, quant.) eines gelblichen Feststoffes.

C₂₂H₁₄NaN₃O₂ 375.36 g/mol

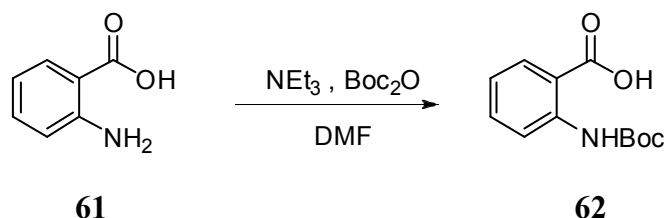
¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 8.68 (dd, *J* = 15.6 Hz, 6.2 Hz, 3H, ArH_{PyR}), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 8.01 (ddd, *J* = 9.3 Hz, 7.8 Hz, 1.6 Hz, 1 H, ArH_{PyR}), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.48 (ddd, *J* = 7.4 Hz, 6.3 Hz, 1.6 Hz, 1H, ArH_{PyR});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 185.3 (COONa), 174.8 (C_{qAr}), 157.3 (C_{qPyR}), 151.5 (C_{qPyR}), 150.2 (C_{qAr}), 141.1 (C_{qPyR}), 140.2 (CH_{PyR}), 138.9 (CH_{PyR}), 131.2 (CH_{PyR}), 127.6 (CH_{PyR}), 125.6 (CH_{PyR}), 123.0 (CH_{PyR}), 119.9 (CH_{PyR});

ESI-MS *m/z*: berechnet: 375.36; gefunden: 352.2 [M-Na]⁺ (100), 727.0 [2M-Na]⁺ (20),

12. Synthese des Fluorophor-Quencher Systems

12.1 Boc-geschützte Anthranilsäure **62**



10 g (73.0 mmol, 1.0 eq) Anthranilsäure **61** wurde in 20 mL DMF gelöst und mit 15.2 mL (109.5 mmol, 1.5 eq) NEt₃, gefolgt von 19.9 g (91.2 mmol, 1.25 eq) Boc₂O versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde DMF i. V. entfernt und der Rückstand mit CH₂Cl₂ und einer 10%-igen Na₂CO₃-Lösung extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit H₂O extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden danach mit HCl angesäuert und mit Et₂O extrahiert. Die vereinten Ether-Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. V. entfernt. Der Rückstand wurde mit *n*-Pentan gefällt und man erhielt 6.2 g (26.3 mmol, 36%) des gewünschten Produktes **62**.

C₁₂H₁₄NO₄ 237.25 g/mol

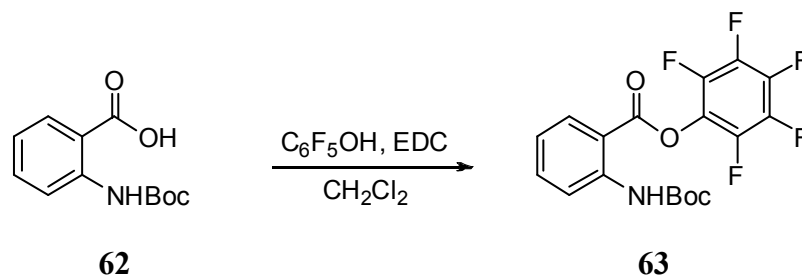
DC EtOAc; R_f = 0.5

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 10.05 (s, 1H, NH), 8.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 8.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.57 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.04 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 1.55 (s, 9H, ^tBu);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 170.8 (CO₂H), 153.3 (NHCOOCH₃), 142.8 (C_{qAr}), 134.7 (CH_{Ar}), 131.9 (CH_{Ar}), 121.3 (CH_{Ar}), 118.8 (C_{qAr}), 80.6 (C(CH₃)₃), 28.6 (C(CH₃)₃);

ESI-MS *m/z*: berechnet: 237.25; gefunden: 260.3 [M+Na]⁺.

12.2 Pentafluorophenylester **63**



6.2 g (26.3 mmol, 1.0 eq) der Anthranilsäure **62** wurden in 60 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 5.1 g (27.6 mmol, 1.05 eq) Pentafluorophenol, gefolgt von 7.5 g (39.5 mmol, 1.5 eq) EDC versetzt und 24 h bei RT gerührt. Danach wurde die Mischung mit 80 mL H_2O versetzt und mit Et_2O extrahiert. Nach der Reinigung über Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 99.9:0.1 bis 95:5 (v/v)) wurden 6.5 g (16.3 mmol, 62 %) des gewünschten Aktivesters **63** erhalten.

$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_5\text{NO}_4$ 403.3 g/mol

DC EtOAc/Hexan (1:1); $R_f = 0.8$

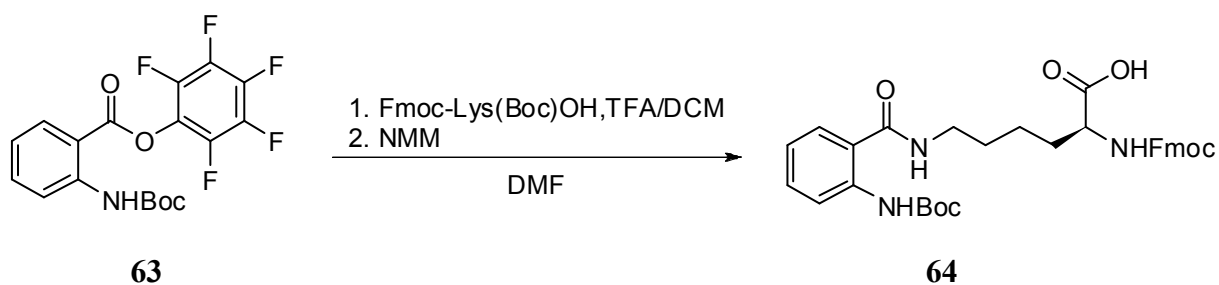
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 9.7 (s, 1H, NH), 8.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.65 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 1.51 (s, 9H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 164.1 (COOPfp), 152.4 (NHCOO^tBu), 143.7 (C_{qAr}), 136.5 (CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 110.9 (C_{qAr}), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = -153.6 (d, $J = 19.4$ Hz, 2F, CF_{Ar}), -158.7 (t, $J = 22$ Hz, 1F, CF_{Ar}), -163.4 (t, $J = 20$ Hz, 2F, CF_{Ar});

ESI-MS m/z : berechnet: 403.3; gefunden: 426.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

12.3 Fluorophor **64**



7.50 g Fmoc-Lys(Boc)-OH (15.9 mmol, 1.0 eq) wurde in einer 1:1-Mischung aus TFA/CH₂Cl₂ gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit Et₂O ausgefällt und gewaschen. Der farblose Feststoff wurde in 30 mL DMF gelöst und mit 6.50 g (15.9 mmol, 1.0 eq) des Esters **63**, gefolgt von 18 mL (159.0 mmol, 100 eq) NMM versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Mischung mit EtOAc versetzt und mit H₂O extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. V. wurde der Rückstand in EtOH gelöst und mit *n*-Pentan ausgefällt. Nach Filtration wurden 5.79 g (9.9 mmol, 62 %) eines farblosen Feststoffes **64** erhalten.

C₃₃H₃₇N₃O₇ 587.66 g/mol

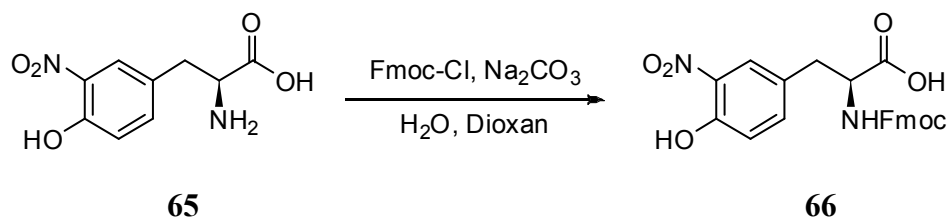
DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f = 0.3 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 10.8 (s, 1H, NHBoc), 8.8 (brs, 1H, OH), 8.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH, *o*-Carbonyl), 7.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.68 (dd, *J* = 20 Hz, 7.7 Hz, 3H, ArH_{Fmoc}), 7.40-7.36 (m, 3H, ArH_{Fmoc}), 7.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH), 6.9 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.7 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 4.4 (brs, 3H, FmocCH, FmocCH₂), 3.93 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H, Lys-Hα), 3.23 (m, 2H, Lys-Hε), 1.74 (m, 1H, Lys-Hβ), 1.69 (m, 1H, Lys-Hβ), 1.59 (m, 2H, Lys-Hδ), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.38 (m, 2H, Lys-Hγ);

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 173.9 (CO), 168.1 (CO), 156.1 (CO), 152.0 (CH_{Ar}), 151.9 (C_{qAr}), 151.3 (CH_{Ar}), 150.9 (CH_{Ar}), 150.1 (CH_{Ar}), 146.1 (C_{qAr}), 143.8 (C_{qAr}), 143.7 (C_{qAr}), 140.6 (C_{qAr}), 139.5 (C_{qAr}), 127.5 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 125.2 (CH_{Ar}), 121.2 (CH_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 119.4 (CH_{Ar}), 81.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 73.5 (Fmoc- CH_2), 54.8 (CH_α), 46.5 (FmocCH), 31.8 (CH_δ), 30.8 (CH_β), 28.5 (CH_γ), 28.3 (CH_ϵ), 27.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

ESI-MS m/z : berechnet: 587.66; gefunden: 610.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 626.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

12.4 Fmoc-Schützung des Quenchers 66



4.0 g (17.7 mmol, 1.0 eq) 3-Nitro-L-Tyrosin **65** wurde in 30 mL Dioxan und 60 mL einer 10%-igen Na_2CO_3 -Lösung gelöst und mit einer Lösung, bestehend aus 5.0 g (19.5 mmol, 1.1 eq) Fmoc-Cl in 50 mL Dioxan versetzt. Nach 4 h Rühren bei RT wurde die Mischung mit EtOAc versetzt und gegen eine 0.1 M HCl-Lösung extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. V. wurde der Rückstand in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) gelöst und mit *n*-Pentan ausgefällt. Es wurden 5.31 g (11.8 mmol, 67 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ 448.42 g/mol

DC $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1); $R_f = 0.3$

^1H -NMR (400.0 MHz, d_6 -DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 7.86 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.85 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 7.62 (dd, $J = 7.3$ Hz, 3.3 Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.45 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2.0 Hz, 1H, ArH_{Fmoc}), 7.40 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.27 (ψq , $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH_{Fmoc}), 7.06 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 4.22 (m, 4H, CH_α , Fmoc CH_2 ,

FmocCH), 3.09 (dd, $J = 14.1$ Hz, 4.6 Hz, 1H, CH β), 2.85 (dd, $J = 13.6$ Hz, 10.6 Hz, 1H, CH β);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 173.0 (COOH), 155.9 (NHCO), 150.9 (CH_{Ar}-OH), 143.7 (C_{qAr}), 143.6 (C_{qAr}), 140.6 (C_{qAr}), 140.5 (C_{qAr}), 136.2 (CH_{Ar}), 136.1 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 125.4 (CH_{Ar}), 125.1 (CH_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 188.9 (CH_{Ar}), 65.6 (FmocCH₂), 55.3 (CH α), 46.5 (FmocCH), 34.9 (CH β);

ESI-MS

m/z : berechnet: 448.42; gefunden: 471.0 [M+Na]⁺.

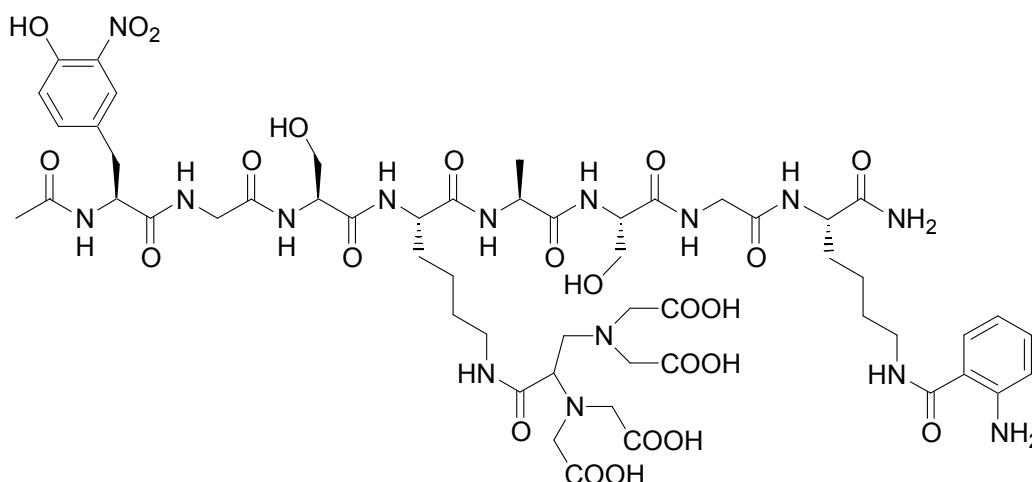
13. Synthese der Fluorophor-Quencher Peptide

In diesen Tabellen sind die verwendeten Mengen der einzelnen Aminosäuren und Kopplungsreagenzien für alle in diesem Abschnitt 14 beschriebenen Peptide aufgeführt. Die Abkürzung **F** steht für Fluorophor, **Q** für Quencher. Für die Synthese des EDTA-Peptid, des Lysin-Peptids, des Terpyridin-Peptids und des Referenzpeptides wurden 1.5 eq verwendet, für die Synthese des Peptids **69** (EDTA am Ende) wurden 3.0 eq verwendet.

	Substanz	Eq	n	m	V
			[mmol]	[mg]	[mL]
TentaGel	Fmoc-Fluorophor-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	76.0 151.0	
	<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -Tetra(<i>tert</i> -butyl) EDTA-L-Lysine-OH	1.5 2.0	0.13 0.17	118.0 157.0	
	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	49.0 99.0	
	Fmoc-Gly-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	38.0 77.0	
	Fmoc-L-Ala-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	60.0 120.0	
	Fmoc-Quencher-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	58.0 120.0	
	Fmoc-L-Lysine(Boc)-OH	1.5 3.0	0.13 0.26	60.0 121.0	
	Fmoc-Ahx-OH	3.0	0.26	91.0	
	Terpyridin Na-Salz	1.5	0.13	48.0	
	HCTU	1.5	0.13	53.0	
	HCTU	3.0	0.26	107.0	
	^t Pr ₂ NEt	3	0.26		0.04
	NEt ₃	100	8.6		1.2
	Ac ₂ O	50	4.3		0.41

	Substanz	Eq	n	m	V
			[mmol]	[mg]	[mL]
Rink	Fmoc-Fluorophor-OH	1.5	0.21	125.0	
	<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -Tetra(<i>tert</i> -butyl) EDTA-L-Lysine-OH	1.5	0.21	194.0	
	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	1.5	0.21	82.0	
	Fmoc-Gly-OH	1.5	0.21	63.0	
	Fmoc-L-Ala-OH	1.5	0.21	70.0	
	Fmoc-Quencher-OH	1.5	0.21	95.0	
	Fmoc-L-Lysine(Boc)-OH	1.5	0.21	99.0	
	HCTU	1.5	0.21	88.0	
	^t Pr ₂ NEt	3	0.43		0.07
	NEt ₃	100	14.2		2.0
	Ac ₂ O	50	7.1		0.67

13.1 EDTA-Peptid 3



Synthese auf TentaGel 67

Für die Synthese wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 3

Für die Synthese wurden 200.0 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 200.0 mg (quant.).

C₅₄H₇₇N₁₅O₂₄

1319.53 g/mol

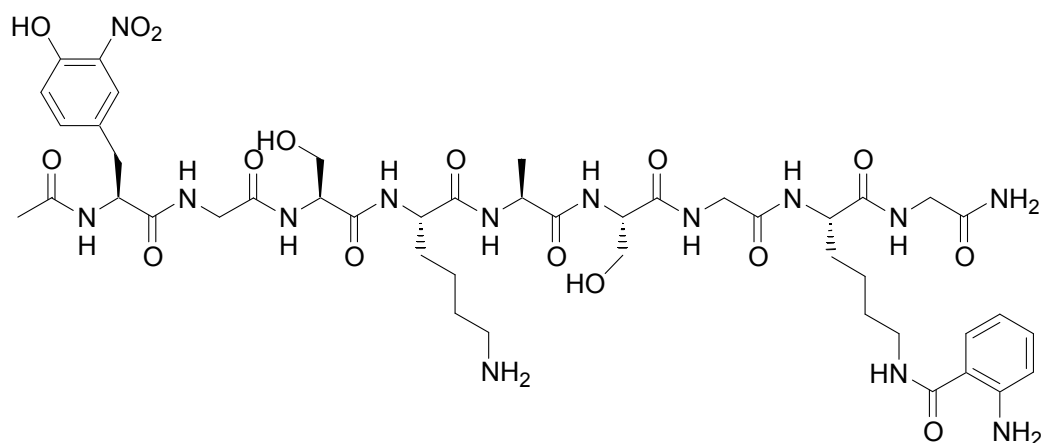
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 8.37 (m, 1H, NH_{Lys}), 8.24 (m, 1H, NH_{Tyr}), 8.07 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH_F), 7.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH_{Ala}), 7.93 (m, 1H, NH_{Ser}), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Lys}), 7.68 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H, ArH_F), 7.48 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, ArH_Q), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH_F), 7.16 (m, 1H, ArH_Q), 7.04 (s, 1H, ArH_F), 6.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH_Q), 4.56 (m, 1H, CH_α Q), 4.35 (m, 1H, CH_α Ser), 4.30 (m, 1H, CH_α Ala), 4.22 (m, 1H, CH_α Ser), 4.14 (m, 2H, CH_α Lys), 4.11 (s, 2H, CH₂), 3.80 (m, 2H, CH, NCH₂COOH), 3.75 (m, 2H, NCH₂COOH), 3.61 (m, 2H, CH₂β Ser), 3.57 (m, 2H, CH₂β Ser), 3.54 (m, 2H,

NCH_2COOH), 3.51 (m, 2H, NCH_2COOH), 3.45 (m, 1H, NCH_2COOH), 3.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\epsilon_{\text{Lys}}$), 3.12 (dd, $J = 13.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Q}}$), 3.03 (m, 4H, $\text{CH}_2\epsilon_{\text{Lys}}$, CH_2_{Gly}), 2.85 (dd, $J = 14.0$ Hz, 10.0 Hz, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Q}}$), 2.30 (s, 3H, CH_3_{Ac}), 1.69 (m, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Lys}}$), 1.50 (m, 4H, $\text{CH}\beta_{\text{Lys}}$, $\text{CH}\delta_{\text{Lys}}$), 1.41 (m, 2H, $\text{CH}\delta_{\text{Lys}}$), 1.29 (m, 4H, $\text{CH}\gamma_{\text{Lys}}$), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3_{Ala});

^{13}C -NMR (150 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 176.6/176.3/173.6/173.4/172.5/172.2/171.3/171.2/170.4/170.1/169.6/168.8/168.7/168.5/168.3 (CO), 141.6/140.9 (C_{qAr}), 135.2 (CH_{Ar}), 132.5 (C_{qAr}), 131.5 (CH_{Ar}), 128.8 (C_{qAr}), 128.0 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 116.8 (CH_{Ar}), 116.6 (C_{qAr}), 114.5 (CH_{Ar}), 61.7/61.6 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 59.3 (CH), 55.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 54.8 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 53.5 (NCH_2COOH), 52.4 ($\text{CH}\alpha_{\text{Q}}$), 51.7/51.6 ($\text{CH}\alpha_{\text{Lys}}$), 50.4 (NCH_2COOH), 48.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ala}}$), 42.2 (CH_2), 38.8/38.5 ($\text{CH}_2\epsilon_{\text{Lys}}$), 37.4 (CH_2_{Gly}), 36.5 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Q}}$), 31.5/31.1 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Lys}}$), 28.7/28.5 ($\text{CH}_2\delta_{\text{Lys}}$), 22.9/22.8 ($\text{CH}_2\gamma_{\text{Lys}}$), 20.4 (CH_3_{Ac}), 17.8 (CH_3_{Ala});

ESI-MS: m/z : berechnet: 1319.53; gefunden: 1319.77 $[\text{M}]^+$.

13.2 Lysin Peptid 72



Reihenfolge: Ac-Q-Gly-Ser-Lys-Ala-Ser-Gly-F-Gly-NH₂

Synthese auf TentaGel 68

Für die Synthese wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B**

entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 72

Für die Synthese wurden 200.00 mg Rink Amid Harz (0.142 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert.

Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 162.0 mg (quant.).

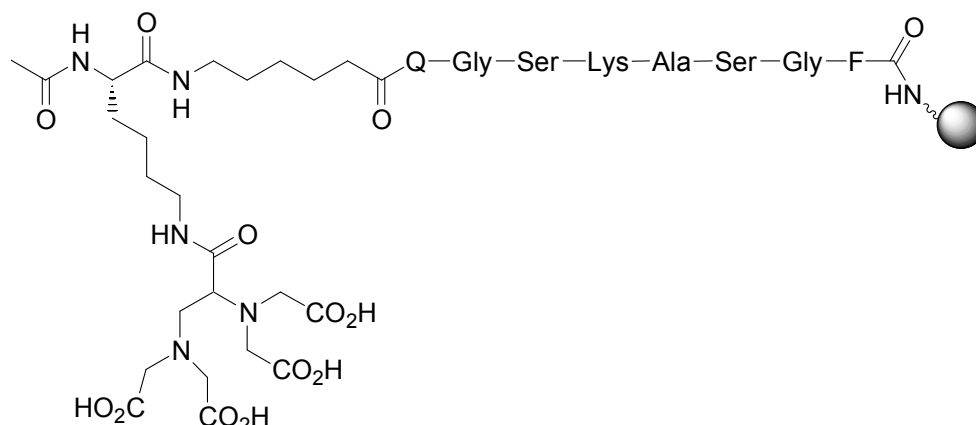
C₄₅H₆₆N₁₄O₁₆Ac 1058.48 g/mol

¹H-NMR (500.1 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 8.39 (m, 1H, NH_{Lys}), 8.28 (m, 1H, NH_{Tyr}), 8.23 (m, 1H, NH_{Ala}), 8.15 (m, 1H, NH_{Ser}), 8.10 (m, 1H, NH_{Lys}), 8.07 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH_F), 7.68 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H, ArH_F), 7.48 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, ArH_Q), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH_F), 7.16 (m, 1H, ArH_Q), 7.04 (s, 1H, ArH_F), 6.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH_Q), 4.56 (m, 1H, CH_α Q), 4.31 (m, 2H, CH_α Ser, CH_α Ala), 4.24 (m, 3H, CH_α Ser, CH_α Lys), 3.80-3.60 (m, 8H, CH₂β Ser, CH₂ Gly), 3.16 (m, 2H, CH₂ε Lys), 3.12 (m, 1H, CH₂β Q), 2.98 (m, 1H, CH₂β Q) 2.75 (m, 2H, CH₂ε Lys), 2.30 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.69 (m, 2H, CHβ Lys), 1.50 (m, 6H, CHβ Lys, CHδ Lys), 1.32 (m, 4H, CHγ Lys), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃ Ala);

¹³C-NMR (125.8 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 172.6/172.2/171.7/171.1/170.8/170.3/170.0/168.9/168.5/168.4 (CO), 141.6/140.9 (C_{qAr}), 137.6 (CH_{Ar}), 136.2 (C_{qAr}), 131.5 (CH_{Ar}), 130.7 (C_{qAr}), 128.0 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 117.0 (C_{qAr}), 114.7 (CH_{Ar}), 61.7/61.6 (CH₂β Ser), 55.1 (CH_α Ser), 53.6 (CH_α Ser), 52.8 (CH_α Q), 52.2/52.1 (CH_α Lys), 48.1 (CH_α Ala), 42.0/41.7 (CH₂ε Lys), 38.7 (CH₂ Gly), 35.7 (CH₂β Q), 31.5/30.7 (CH₂β Lys), 28.7/28.3 (CH₂δ Lys), 22.9/22.3 (CH₂γ Lys), 20.5 (CH₃ Ac), 17.8 (CH₃ Ala);

ESI-MS: *m/z*: berechnet: 1058.48; gefunden: 1101.0 [M+Ac]⁺ (Quencher ebenfalls acetyliert).

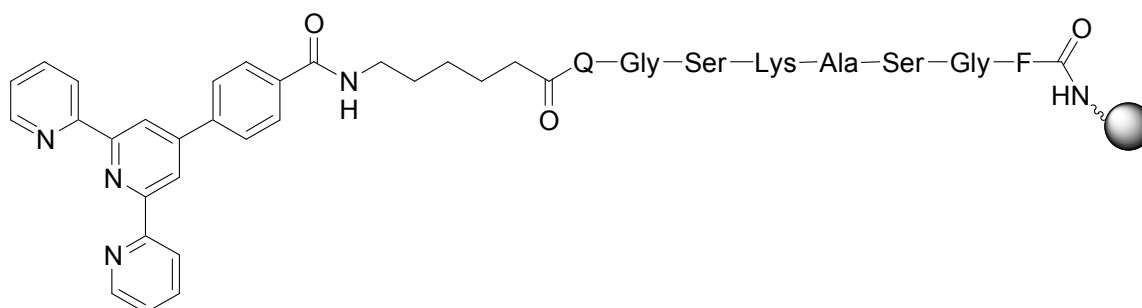
13.3 EDTA-Peptid 69



Synthese auf TentaGel

Für die Synthese wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

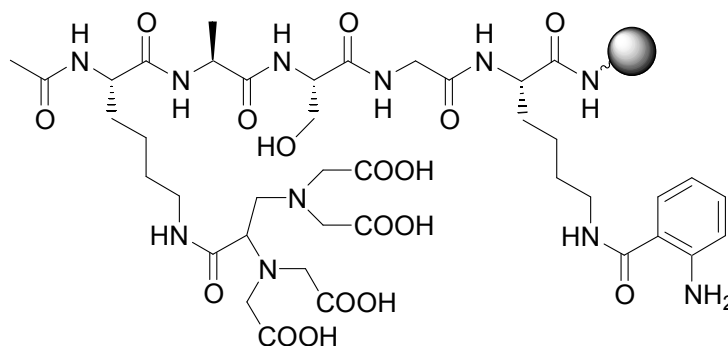
13.4 Terpyridin Peptid 70



Synthese auf TentaGel

Für die Synthese wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

13.5 Referenz-Peptid 71



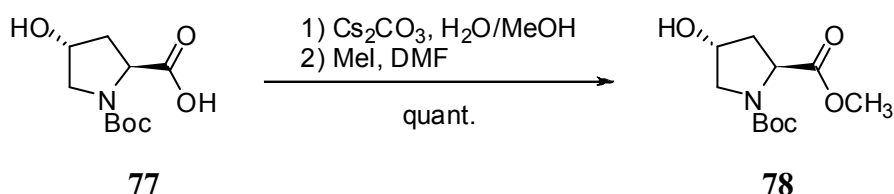
Synthese auf TentaGel

Für die Synthese wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

14. Synthese des proteolytischen Rezeptors 4

14.1 Synthese des Diketopiperazin Templates 84

14.1.1 *N*-Boc-*trans*- γ -hydroxy-L-Prolin Methylester 77



20.00 g (86.54 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-*trans*- γ -hydroxy-L-Prolin **77** wurden in 100 ml MeOH gelöst und mit einer Lösung aus 15.50 g (47.58 mmol, 0.55 eq) Cs₂CO₃ in 20 ml Wasser versetzt. Nach 60 min. wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt und der ölige Rückstand mit Toluol (5 x 100 mL) coevaporiert. Anschließend wurde der weiße Festkörper in 60 ml DMF gelöst und mit 11.00 ml (172.93 mmol, 2.0 eq) Methyljodid versetzt. Nach einstündigem Rühren bei RT wurden 100 ml Diethylether und 150 ml H₂O zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung und Et₂O extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Man erhielt den Methylester **78** quantitativ als farblosen Feststoff. Die NMR-Spektren zeigten eine *s-cis* / *s-trans* Isomerie im Verhältnis 1:2 bezüglich des tertiären Amids und des Carbamats.

C₁₁H₁₉NO₅ 245.13 g/mol

DC Pentan / EtOAc (1:1); R_f: 0.36 (Ninhydrin)

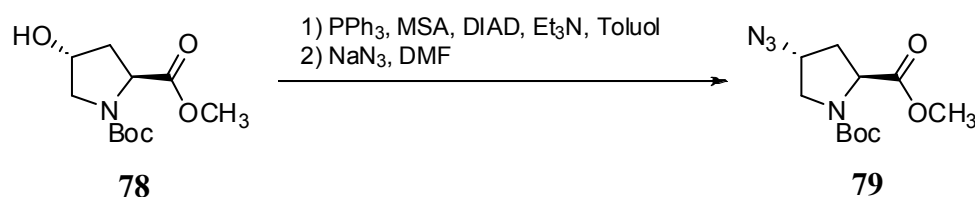
¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 8.0 (s, 1H, OH), 4.43 (m, 2H, CH α _{major+minor}, CH γ _{major+minor}), 3.71 (s, 3H, OCH₃_{major+minor}), 3.53 (m, 2H, CH δ _{major+minor}, CH δ' _{major+minor}), 2.29 (m, 1H, CH β _{major+minor}), 2.05 (m, 1H, CH β' _{major+minor}), 1.44 (s, 9H, ^tBu_{minor}), 1.39 (s, 9H, ^tBu_{major});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): **Major:** δ (ppm) = 173.6 (CO₂CH₃), 153.9 (CO_{Boc}), 80.3 (C(CH₃)₃), 69.3 (CH γ), 57.9 (CH α), 54.6 (CH δ), 52.0 (CO₂CH₃), 39.0 (CH β), 28.2 (C(CH₃)₃);

Minor: δ (ppm) = 173.4 (COCH₃), 154.5 (CO_{Boc}), 80.2 (C(CH₃)), 70.0 (CH γ), 57.4 (CH α), 54.7 (CH₂ δ), 52.2 (CO₂CH₃), 38.4 (CH₂ β), 28.3 (C(CH₃));

ESI-MS m/z : berechnet: 245.13; gefunden: 268.1 [M+Na]⁺.

14.1.2 *N*-Boc-*trans*- γ -azido-L-Prolin Methylester **79**



28.98 g (114.35 mmol, 1.8 eq) PPh₃ wurden in absolutem Toluol gelöst und mit 4.94 mL (76.20 mmol, 1.2 eq) Methansulfonsäure und 3.53 mL (25.41 mmol, 0.4 eq) Et₃N versetzt, gefolgt von 15.58 g (63.56 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-*trans*- γ -hydroxy-L-Prolinmethylester. Nachdem eine klare Lösung entstanden war, wurden 24.60 mL (127.06 mmol, 1.0 eq) DIAD zugegeben und die Mischung wurde 3 h bei 70°C gerührt. Anschließend wurde die Mischung einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (3 x 250 mL) gewaschen und die wässrigen Phasen mit CH₂Cl₂ (3 x 300 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Das gelbe Öl wurde in 150 mL DMF gelöst, mit 19.86 g (304.95 mmol, 4.8 eq) NaN₃ versetzt und 16 h bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand in 200 mL Et₂O gelöst und mit 200 mL ges. NaHCO₃ Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Et₂O extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde mit Pentan versetzt und das entstandene O=PPh₃ wurde abfiltriert. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (Pentan: EtOAc (4:1)) und man erhielt 17.56 g (64.96 mmol, 74%) von Verbindung **79**. Die NMR-Spektren zeigten eine *s-cis* / *s-trans* Isomerie im Verhältnis 2:3 bezüglich des tertiären Amids und des Carbamats.

C₁₁H₁₈N₄O₄ 270.13 g/mol

DC Pentan / EtOAc (4:1); R_f: 0.65 (Ninhydrin)

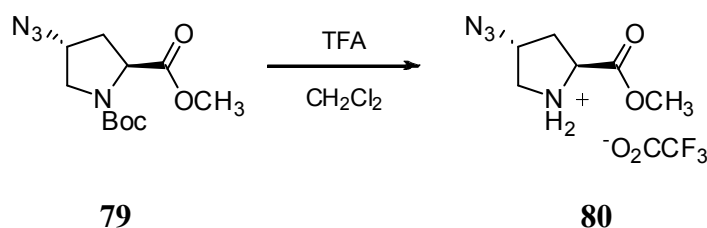
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta(\text{ppm}) = 4.38$ (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{minor}}$), 4.29 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{major}}$), 4.17 (m, 1H, $\text{CH}\gamma_{\text{major+minor}}$), 3.71 (s, 3H, $\text{OCH}_3_{\text{major+minor}}$), 3.66 (m, 1H, $\text{CH}\delta_{\text{major+minor}}$), 3.50 (m, 1 H, $\text{CH}\delta'_{\text{major+minor}}$), 2.29 (m, 1H, $\text{CH}\beta_{\text{major+minor}}$), 2.15 (m, 1H, $\text{CH}\beta'_{\text{major+minor}}$), 1.44 (s, 9H, $^t\text{Bu}_{\text{minor}}$), 1.39 (s, 9H, $^t\text{Bu}_{\text{major}}$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): **Major:** δ (ppm) = 172.9 (CO_2CH_3), 153.0 (CO_{Boc}), 80.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.5 ($\text{CH}\gamma$), 57.4 ($\text{CH}\alpha$), 51.8 ($\text{CH}_2\delta$), 50.9 (CO_2CH_3), 35.9 ($\text{CH}_2\beta$), 27.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

Minor: δ (ppm) = 172.4 (COCH_3), 153.7 (CO_{Boc}), 80.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.0 ($\text{CH}\gamma$), 57.1 ($\text{CH}\alpha$), 52.0 ($\text{CH}_2\delta$), 51.1 (CO_2CH_3), 35.0 ($\text{CH}_2\beta$), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

ESI-MS m/z : berechnet: 270.13; gefunden: 293.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

14.1.3 TFA-*trans*- γ -azido-L-Prolin Methylester **80**



8.53 g (31.56 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-*trans*- γ -azido-L-Prolin Methylester wurden in einer 1:3 Mischung aus TFA/ CH_2Cl_2 (v/v) gelöst und die Mischung wurde 2 h bei RT gerührt. Danach wurden TFA und CH_2Cl_2 i. V. entfernt und der Rückstand mit Et_2O gewaschen. 8.96 g (31.56 mmol, quant.) von Verbindung **80** wurden erhalten.

$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4$ 284.01 g/mol

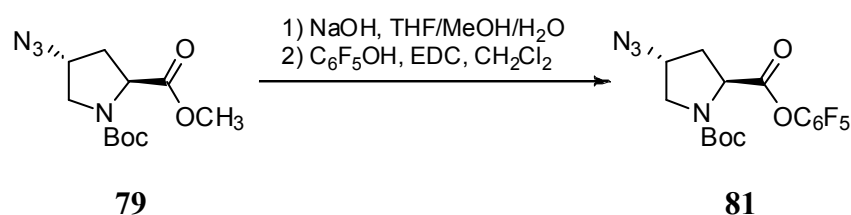
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta(\text{ppm}) = 4.56$ (dd, $J = 10.6$ Hz, 7.6 Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$), 4.51 (m, 1H, $\text{CH}\gamma$), 3.82 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.76 (dd, $J = 12.6$ Hz, 5.6 Hz, 1H, $\text{CH}\delta$), 3.47 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, $\text{CH}\delta'$), 2.49 (m, 1H, $\text{CH}\beta$), 2.38 (m, 1H, $\text{CH}\beta'$);

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 168.4 (CO_2CH_3), 59.4 (CH_γ), 53.7 (CH_α), 50.7 ($\text{CH}_2\delta$), 34.6 ($\text{CH}_2\beta$);

ESI-MS

m/z : berechnet: 284.01; gefunden: 171.0 $[\text{M-TFA}]^+$.

14.1.4 *N*-Boc-*trans*- γ -azido-L-Prolin Pentafluorophenylester 81



8.78 g (32.50 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-*trans*- γ -azido-L-Prolin Methylester wurden in 200 mL einer 1:1 Mischung aus THF / MeOH (v/v) gelöst, mit 1.90 g (48.72 mmol, 1.5 eq) NaOH in 10 mL H_2O versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 1 M HCl auf pH 3.0 angesäuert und mit EtOAc (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Das gelbliche Öl wurde in 50 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 5.97 g (32.48 mmol, 1.0 eq) Pentafluorophenol und 9.33 g (48.72 mmol, 1.5 eq) EDC versetzt. Die Mischung wurde 2 h gerührt, mit 200 mL H_2O versetzt und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Man erhielt 10.10 g (24.04 mmol, 74%) des Pentafluorophenylesters als weißen Feststoff. Die NMR-Spektren zeigten eine *s-cis* / *s-trans* Isomerie im Verhältnis 1:2 bezüglich des tertiären Amids und des Carbamats.

$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_5\text{N}_4\text{O}_4$

422.31 g/mol

DC

Pentan / EtOAc (5:1); R_f : 0.7 (Ninhydrin)

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 4.72 (m, 1H, CH α _{minor+minor}), 4.26 (m, 1H, CH γ _{major+minor}), 3.72 (m, 1H, CH δ _{major+minor}, CH δ' _{major}), 3.56 (m, 1H, CH δ' _{minor}), 2.55 (m, 1H, CH β _{major+minor}), 2.38 (m, 1H, CH β' _{major+minor}), 1.48 (s, 9H, ^tBu_{minor}), 1.46 (s, 9H, ^tBu_{major});

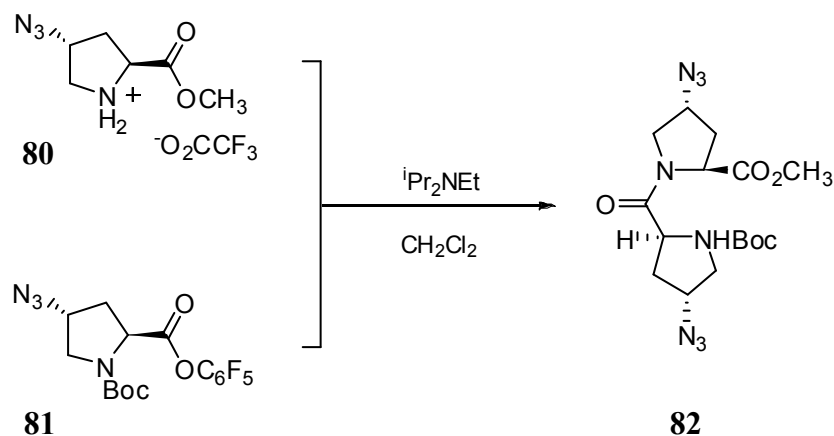
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): **Major:** δ (ppm) = 168.5 (CO₂C₆F₅), 153.3 (CO_{Boc}), 82.0 (C(CH₃)₃), 58.6 (CH γ), 57.3 (CH α), 51.3 (CH₂ δ), 36.7 (CH₂ β), 28.0 (C(CH₃)₃);

Minor: δ (ppm) = 168.3 (CO₂C₆F₅), 153.9 (CO_{Boc}), 81.5 (C(CH₃)₃), 59.3 (CH γ), 57.2 (CH α), 51.4 (CH₂ δ), 35.4 (CH₂ β), 28.2 (C(CH₃)₃);

ESI-MS

m/z: berechnet: 422.31; gefunden: 445.0 [M+Na]⁺.

14.1.5 *N*-Boc-(*trans*- γ -azido-*L*-Pro)₂ OCH₃ **82**



7.30 g (25.69 mmol, 1.0 eq) des TFA-Salzes **80** wurden in 30 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit 14.79 mL (89.55 mmol, 3.5 eq) ⁱPr₂NEt, gefolgt von 10.85 g (25.69 mmol, 1.0 eq) Pfp-Ester **81** in 30 mL CH₂Cl₂ versetzt. Die Lösung wurde mit Hilfe eines N₂-Stromes eingeeengt und der Rückstand 24 h gerührt. Anschließend wurde der Rückstand mit 1 M HCl auf pH 3.0 angesäuert und mit 250 mL H₂O versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (4 x 100 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 95:5 (v/v)) und man erhielt 7.74 g (18.96 mmol, 74%) von Verbindung **82** als weißen Feststoff.

$C_{16}H_{24}N_8O_5$

408.41 g/mol

DC

 $CH_2Cl_2/MeOH$ (9:1); R_f : 0.6 (Ninhydrin)

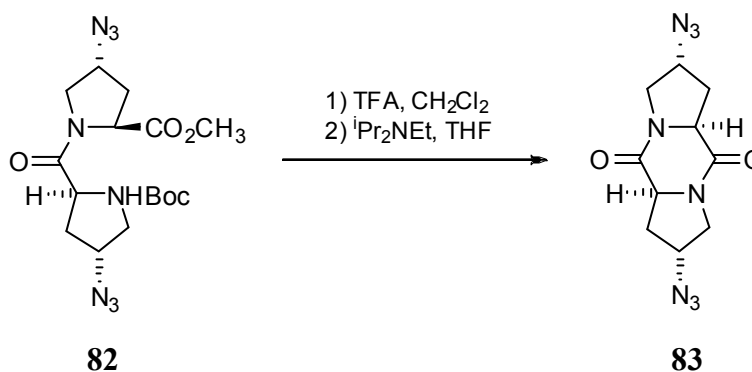
1H -NMR (400.0 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 4.98 (dt, $J = 12.6$ Hz, 6.1 Hz, 1H, $CH\gamma_{major}$), 4.59 (m, 2H, $CH\alpha_{major}$), 4.48 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, $CH\alpha_{minor}$), 4.37 (m, 1H, $CH\alpha_{minor}$), 4.28 (m, 2H, $CH\gamma_{major+minor}$), 4.24 (m, 1H, $CH\gamma_{minor}$), 3.83 (m, 2H, $CH\delta_{major+minor}$), 3.75 (s, 3H, CO_2CH_3 minor), 3.74 (s, 3H, CO_2CH_3 major), 3.63 (m, 2H, $CH\delta'_{major+minor}$), 2.24 (m, 4H, $CH\beta'_{major+minor}$, $CH\beta_{major+minor}$), 1.45 (s, 9H, tBu_{major}), 1.42 (s, 9H, tBu_{minor});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ (ppm) = 171.9/171.8/170.9/170.8 (CO_2CH_3 minor+major, $C\epsilon$ major+minor), 153.9/153.1 (CO_{Boc} major+minor), 80.8 ($C(CH_3)_3$ minor), 80.7 ($C(CH_3)_3$ major), 59.7/ 59.5/59.3/58.9 ($CH\alpha$ major+minor), 57.7/57.6/56.3/56.0 ($CH\gamma$ major+minor), 52.6/52.5 ($CH_2\delta$ major+minor, $CH_2\delta'$ major+minor), 51.6/51.5/51.3 ($COCH_3$), 35.6/34.8/34.1 ($CH_2\beta$ major+minor), 28.3 ($C(CH_3)_3$ major), 28.2 ($C(CH_3)_3$ minor);

ESI-MS

 m/z : berechnet: 408.41; gefunden: 431.0 $[M+Na]^+$.

14.1.6 Cyclo-(*trans*- γ -azido-L-Pro) $_2$ **83**



7.74 g (18.95 mmol, 1.0 eq) von Verbindung **82** wurden in 80 mL einer 1:3 Mischung aus TFA/ CH_2Cl_2 (v/v) gelöst und 1.5 h bei RT gerührt. Danach wurden TFA und CH_2Cl_2 i. V. entfernt und der Rückstand mit Et_2O gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand in THF gelöst, mit 6.73 mL (37.86 mmol, 2.0 eq) iPr_2NEt versetzt und 48 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde mit 150 mL H_2O versetzt und CH_2Cl_2 (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinten

$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta(\text{ppm}) = 8.52$ (s, 6H, NH_3^+Cl^-), 3.84 (s, 2H, $\text{CH}\alpha$), 3.67 (m, 4H, $\text{CH}\delta$), 3.47 (d, $J = 12.8$ Hz, 2H, $\text{CH}\gamma$), 2.41 (s, 4H, $\text{CH}\beta$, $\text{CH}\beta'$);

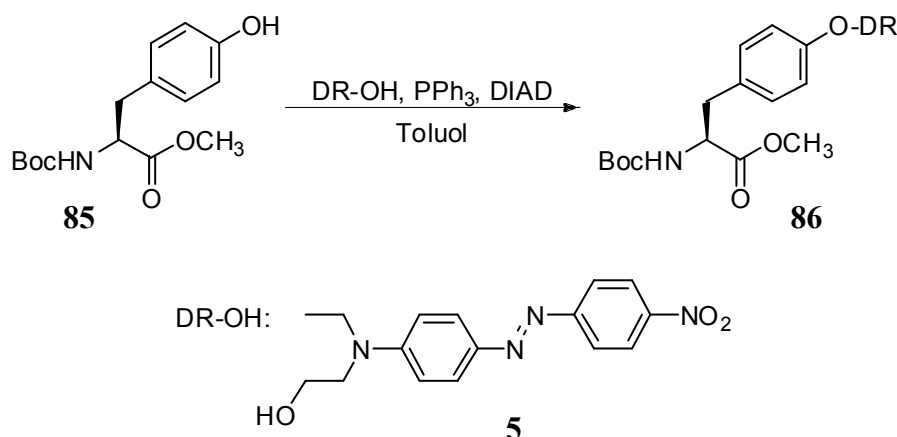
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 165.2 (CO; $\text{C}\epsilon$), 57.8 ($\text{CH}\alpha$), 48.5 ($\text{CH}\gamma$) 47.9 ($\text{CH}_2\delta$), 31.1 ($\text{CH}_2\beta$);

ESI-MS

m/z : berechnet: 297.18; gefunden: 225.0 $[\text{M}-2\text{HCl}]^+$.

14.2 Synthese des Tyrosin-Dispersrot-Farbstoffes 87

14.2.1 *N*-Boc-L-Tyr(DR)-OCH₃ 86



10.00 g (33.97 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr-OCH₃, 10.68 g (33.97 mmol, 1.0 eq) Dispersrot **5** (DR-OH) und 8.91 g (33.97 mmol, 1.0 eq) PPh₃ wurden in 680 mL Toluol gelöst und mit 8.50 mL (43.88 mmol, 1.3 eq) DIAD versetzt. Die Mischung wurde 12 h bei RT gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ (98:2)) und man erhielt 8.11 g (13.07 mmol, 41%) von Verbindung **86** als roten Feststoff.

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_5$

591.65 g/mol

DC

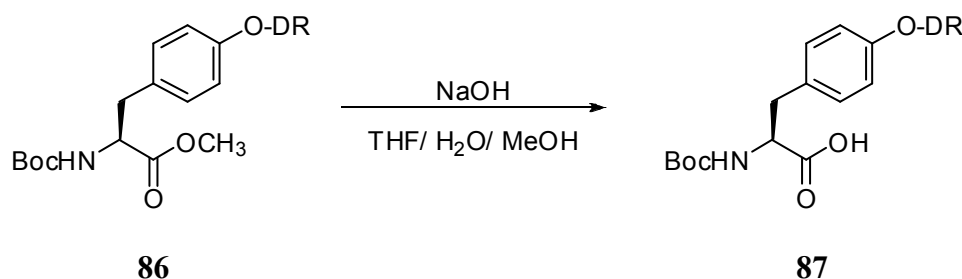
Aceton/ CH_2Cl_2 (98:2); R_f : 0.65

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 8.32 (dt, J = 8.8 Hz, 2.8 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.92 (d, J = 9.1 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.90 (d, J = 9.0 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.81 (m, 4H, ArH_{DR}, ArH_{Tyr}), 4.95 (brd, J = 8.0 Hz, 1H, NH_{Boc}), 4.53 (dd, J = 13.7 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH α), 4.16 (t, J = 6.1 Hz, 2H, N-CH₂CH₂-O-DR), 3.84 (t, J = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂CH₂-O-DR), 3.70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.61 (q, J = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂CH₃ DR), 3.05 (dd, J = 14.2 Hz, 6.2 Hz, 1H, CH β), 3.02 (dd, J = 14.0 Hz, 6.0 Hz, 1H, CH β '), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.29 (t, J = 7.0 Hz, 3H, N-CH₂CH₃ DR);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 172.3 (CO₂CH₃), 156.8/151.2/147.4/143.7/128.6 (Cq_{Ar} DR/Tyr), 130.4/126.3/124.7/122.6/114.5/111.4 (CH_{Ar} DR/Tyr), 79.9 (C(CH₃)₃), 65.3 (N-CH₂CH₂-O-DR), 54.5 (CH α), 52.2 (CO₂CH₃), 49.9 (N-CH₂CH₂-O-DR), 46.2 (N-CH₂CH₃ DR), 37.5 (CH₂ β), 28.3 (C(CH₃)₃), 12.3 (N-CH₂CH₃ DR);

ESI-MS m/z : berechnet: 591.65; gefunden: 592.0 [M+H]⁺.

14.2.2 *N*-Boc-L-Tyr(DR)-OH 87



7.95 g (13.44 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr(dye)-Methylester wurden in 50 mL einer 1:1 Mischung aus THF/MeOH (v/v) gelöst, mit 0.96 g (24.20 mmol, 1.8 eq) NaOH gelöst in 6 mL H₂O versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit 1 M HCl auf pH 3.0 angesäuert und mit CH₂Cl₂ (3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. V. erhielt man 7.54 g (13.05 mmol, quant.) eines roten Feststoffes.

C₁₆H₂₄N₈O₅

577.63 g/mol

DC

CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.39

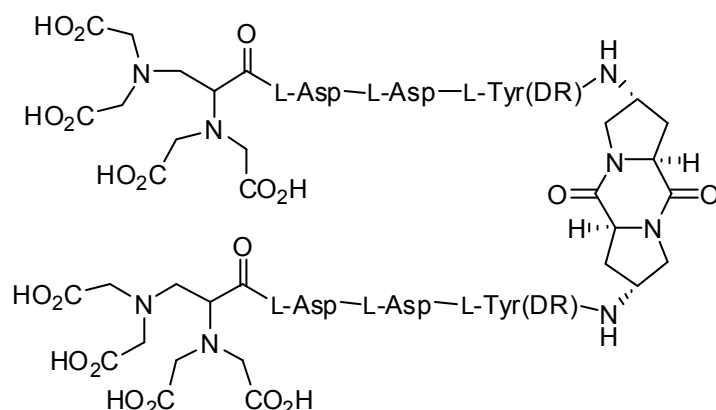
¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ(ppm) = 8.32 (dt, *J* = 8.8 Hz, 2.0 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH_{DR}), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.81 (m, 4H, ArH_{DR}, ArH_{Tyr}), 4.90 (brd, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Boc}), 4.53 (m, 1H, CH_α), 4.16 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, N-CH₂CH₂-O-_{DR}), 3.84 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, N-CH₂CH₂-O-_{DR}), 3.60 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂CH₃ _{DR}), 3.11 (dd, *J* = 14.1 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH_β), 3.02 (dd, *J* = 14.1 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH_β'), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, N-CH₂CH₃ _{DR});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 167.1 (CO₂H), 157.6 (CO_{Boc}), 156.8/151.2/147.4/143.7 (C_{qAr} _{DR/Tyr}), 130.5/126.3/124.7/122.6/114.5/111.4 (CH_{Ar} _{DR/Tyr}), 80.3 (C(CH₃)₃), 65.3 (N-CH₂CH₂-O-_{DR}), 54.5 (CH_α), 49.8 (N-CH₂CH₂-O-_{DR}), 46.1 (N-CH₂CH₃ _{DR}), 37.0 (CH₂β), 28.3 (C(CH₃)₃), 12.3 (N-CH₂CH₃ _{DR});

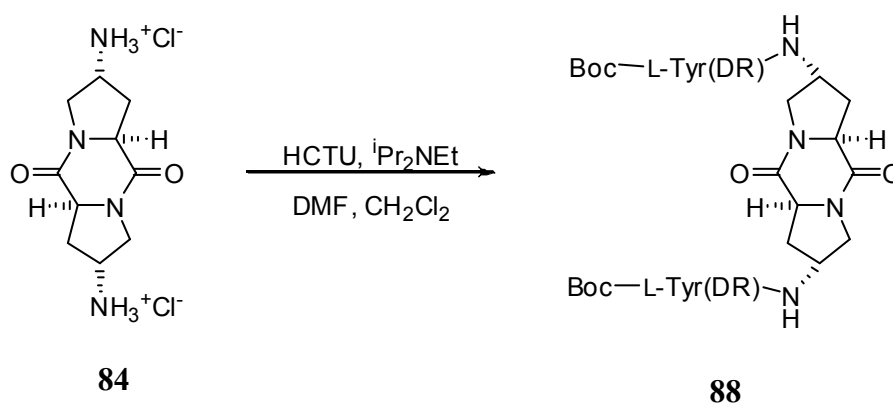
ESI-MS

m/z: berechnet: 577.63; gefunden: 578.0 [M+H]⁺.

14.3 Synthese des Rezeptors 4



14.3.1 Synthese von 89



0.30 g (1.33 mmol, 1.0 eq) von Verbindung **84** wurden in 7 mL einer 5:2 Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (v/v) gelöst und mit einer Lösung aus 3.07 g (5.32 mmol, 4.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr(dye)-OH, 2.20 g (5.32 mmol, 4.0 eq) HCTU und 0.91 mL (5.32 mmol, 4.0 eq) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ in 7 mL einer 5:2 Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (v/v) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde mit 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 5.5) (3 x 100 mL) und CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 0.5 M NaOH extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 99.5:0.5 bis 98:2 (v/v)) und man erhielt 1.45 g (1.07 mmol, 81%) eines roten Feststoffes.

$\text{C}_{70}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$

1343.49 g/mol

DC

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1); R_f : 0.54

¹H-NMR (400.0 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 8.30 (d, J = 9.1 Hz, 4H, ArH_{DR}), 7.90 (m, 8H, ArH_{DR}), 7.11 (d, J = 8.3 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.81 (m, 8H, ArH_{DR}, ArH_{Tyr}), 5.49 (br s, 2H, NH_{Boc}), 4.32 (m, 2H, CH α _{Tyr}), 4.16 (m, 8H, N-CH₂CH₂-O-DR, CH α , CH γ), 3.82 (t, J = 5.3 Hz, 4H, N-CH₂CH₂-O-DR), 3.76 (m, 2H, CH δ), 3.60 (q, J = 7.0 Hz, 4H, N-CH₂CH₃ DR), 3.40 (dd, J = 12.7, 1.9 Hz, 2H, CH δ'), 2.92 (m, 4H, CH β _{Tyr}, CH β' _{Tyr}), 2.26/2.02 (m, 4H, CH β , CH β'), 1.38 (s, 18H, ^tBu), 1.27 (t, J = 7.0 Hz, 9H, N-CH₂CH₃ DR);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ (ppm) = 171.3 (CO_{Tyr}), 165.9 (CO), 157.4 (CO_{Boc}), 156.7/151.3/147.3/143.6/128.1 (Cq_{Ar DR/Tyr}), 130.4/124.6/122.5/114.4/111.4 (CH_{Ar DR/Tyr}), 65.3 (N-CH₂CH₂-O-DR), 58.4 (CH α , CH α _{Tyr}), 50.9 (CH₂ δ , CH₂ δ'), 49.7 (N-CH₂CH₂-O-DR), 47.2 (CH γ), 46.0 (N-CH₂CH₃ DR), 37.9 (CH₂ β _{Tyr}, CH₂ β' _{Tyr}), 33.5 (CH₂ β , CH₂ β'), 28.1 (^tBu), 12.4 (N-CH₂CH₃ DR);

ESI-MS m/z : berechnet: 1343.49; gefunden: 1343.0 [M]⁺.

14.3.2 Kupplung der Rezeptorarme

14.3.2.1 Erste Kupplung

1.00 g (0.74 mmol, 1.0 eq) von Verbindung **88** wurden in 5 mL MeOH gelöst und mit 20 mL 4 M HCl in Dioxan versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend wurden alle Reagenzien i. V. entfernt. Der Rückstand wurde mit Et₂O gefällt, mit Et₂O gewaschen und man erhielt das HCl-Salz von Verbindung **88** als roten Feststoff. Das Salz wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 1.22 g (2.96 mmol, 4.0 eq) HCTU, 1.22 g (1.63 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu) und 0.26 mL (1.48 mmol, 2.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 97:3 (v/v)) und man erhielt 432 mg (0.22 mmol, 30%) vom DKP-Precursor versehen mit Fmoc geschütztem L-Asp.

C₁₀₆H₁₁₂N₁₆O₂₀	1930.12 g/mol
DC	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5); R _f : 0.62
MALDI-ToF	<i>m/z</i> : berechnet: 1930.12; gefunden: 1930.0 [M] ⁺ .

14.3.2.2 Zweite Kupplung

432.00 mg (0.22 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.77 mL (11.85 mmol, 50 eq) TAEA versetzt. Die Mischung wurde 1.5 h bei RT gerührt und anschließend mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH₂Cl₂ extrahiert und die organischen Phasen wurden mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Alle wässrigen Phasen wurden erneut mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit einer Lösung aus 0.42 g (0.94 mmol, 4.0 eq) HCTU, 0.35 g (0.84 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu) und 0.16 mL (0.94 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt in einer 3:2-Mischung aus CH₂Cl₂/DMF (v/v) versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 97:3 (v/v)) und man erhielt 263.40 mg (0.11 mmol, 51%) vom DKP-Precursor versehen mit zwei Aspartaten.

C₁₂₂H₁₃₈N₁₈O₂₆	2272.51 g/mol
DC	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9:1); R _f : 0.77
MALDI-ToF	<i>m/z</i> : berechnet: 2272.51; gefunden: 2297.0 [M+Na] ⁺ .

14.3.2.3 Dritte Kupplung

57.90 mg (0.03 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 0.08 mL (0.75 mmol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 42.00 mg (0.10 mmol, 4.0 eq) HCTU in 1 mL DMF, 57.20 mg (0.10 mmol, 4.0 eq) EDTA(O^tBu)₄ **53** in 2 mL CH₂Cl₂ und 0.02 mL (0.10 mmol, 4.0 eq) ¹Pr₂NEt versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Reinigung mit präparativer DC (CH₂Cl₂/ MeOH (9:1), (v/v)) erhielt man 40.00 mg (0.01 mmol, 55%) des geschützten Rezeptors.

C₁₄₆H₂₁₀N₂₂O₄₀ 2913.55 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.53

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 2913.55; gefunden: 2916.1 [M+3H]⁺, 2939.4 [M+3H+Na]⁺.

14.3.2.4 Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen

40.00 mg (0.01 mmol, 1.0 eq) wurden in 5 mL einer 1:1 Mischung aus CH₂Cl₂/ TFA (v/v) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mit Et₂O gewaschen. Man erhielt 33.6 mg (0.01 mmol, quant.) des gewünschten EDTA-Rezeptors.

C₉₈H₁₁₄N₂₂O₄₀ 2240.08 g/mol

¹H NMR (500.1 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 8.76 (m, 2H, NH_{Asp}), 8.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, ArH_{DR}), 8.26 (m, 2H, NH_{Asp}), 8.15 (m, 2H, NH_{Pro}), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{DR}), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, ArH_{DR}), 7.71 (m, 2H, NH_{Tyr}), 7.08 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.94 (d, *J* =

8.8 Hz, 4H, ArH_{DR}), 6.83 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.58 (m, 2H, $CH\alpha_{Asp}$), 4.49 (m, 2H, $CH\alpha_{Asp}$), 4.32 (m, 4H, $CH\alpha_{Tyr}$, $CH\alpha_{Pro}$), 4.14 (s, 6H, NCH_2CH_2O , $CH\gamma_{Pro}$), 3.84 (s, 4H, NCH_2CH_2O), 3.52 (m, 30H, $CH_2\delta_{Pro}$, CH_{EDTA} , CH_2_{EDTA} , NCH_2COOH , NCH_2CH_3), 3.17 (m, 2H, $CH\delta'_{Pro}$), 2.88 (m, 2H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.77 (m, 2H, $CH_2\beta'_{Tyr}$), 2.66 (m, 4H, $CH_2\beta_{Asp}$), 2.44 (m, 4H, $CH_2\beta_{Asp}$), 2.11 (m, 2H, $CH_2\beta_{Pro}$), 1.84 (m, 2H, $CH_2\beta'_{Pro}$), 1.18 (m, 6H, NCH_2CH_3);

^{13}C NMR (125.8 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 176.9/174.1/173.9/173.4/172.6/171.7/170.5/170.1/169.9/169.6/165.9 (CO), 156.8 (CH_{Ar-ODR}), 156.2/151.6/146.7/142.7 ($Cq_{Ar DR}$), 130.2 ($Cq_{Ar Tyr}$), 130.1 ($CH_{Ar Tyr}$), 126.1 ($CH_{Ar DR}$), 124.9 ($CH_{Ar DR}$), 122.4 ($CH_{Ar DR}$), 113.9 ($CH_{Ar Tyr}$), 111.6 ($CH_{Ar Tyr}$), 69.7 (CH_{EDTA}), 65.1 (NCH_2CH_2O), 64.9 (CH_2_{EDTA}), 58.0 ($CH\alpha_{Pro}$), 54.2 (NCH_2COOH), 54.1 ($CH\alpha_{Tyr}$), 50.5 ($CH\delta_{Pro}$), 49.8 ($CH\alpha_{Asp}$), 48.8 (NCH_2CH_2O), 47.0 ($CH\gamma_{Pro}$), 46.5 (NCH_2CH_3), 37.0 ($CH_2\beta_{Tyr}$), 35.8 ($CH_2\beta_{Asp}$), 33.3 ($CH\beta_{Pro}$), 11.7 (NCH_2CH_3);

MALDI-ToF

m/z : berechnet: 2240.08; gefunden: 2275.09 $[M+TFA+Na]^+$.

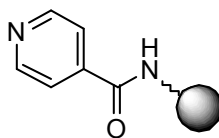
15. Synthese der Peptide zur Nanopartikel Herstellung

In diesen Tabellen sind die verwendeten Mengen der einzelnen Aminosäuren und Kopplungsreagenzien für alle in diesem Abschnitt 16 beschriebenen Peptide aufgeführt. Für die automatisierte Synthese wurden 4.0 eq der Substanzen eingesetzt, für die manuelle 3.0 eq.

	Substanz	Eq	n	m	V
			[mmol]	[mg]	[mL]
TentaGel	Fmoc-D/L-His(Trt)-OH	3.0	0.26	159.9	
		4.0	0.34	213.3	
	Fmoc- <i>trans</i> -2-Aminocyclohexansäure <i>rac</i>	3.0	0.26	100.0	
	Fmoc- <i>trans</i> -(<i>R,R</i>)-Aminocyclohexansäure	3.0	0.26	100.0	
	Fmoc- <i>trans</i> -(<i>S,S</i>)-Aminocyclohexansäure	3.0	0.26	100.0	
	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	3.0	0.26	120.0	
		4.0	0.34	158.3	
	Fmoc-D/L-Ser(^t Bu)-OH	3.0	0.26	99.9	
		4.0	0.34	131.9	
	Fmoc-L-Pro-OH	4.0	0.34	116.1	
	Fmoc-Aib-OH	4.0	0.34	111.9	
	Fmoc-Gly-OH	4.0	0.34	102.3	
	Fmoc-D/L-Asp(OtBu)-OH	3.0	0.26	111.0	
		4.0	0.34	141.6	
	Fmoc-β-Ala-OH	3.0	0.26	80.0	
		4.0	0.34	107.1	
	Fmoc-Ahx-OH	4.0	0.34	121.6	
	Fmoc-L-Phe-OH	3.0	0.26	110.0	
	Fmoc-L-Cys-OH	4.0	0.34	201.5	
	Fmoc-L-Ala-OH	4.0	0.34	107.1	
	Iso-Nikotinsäure	3.0	0.34	31.8	
	HCTU	3.0	0.26	107.0	
		4.0	0.34	142.3	
	ⁱ Pr ₂ NEt	6.0	0.52		0.09
		12.0	1.03		0.18
	NEt ₃	100	8.6		1.20
	Ac ₂ O	50	4.3		0.41

	Substanz	Eq	n	m	V
			[mmol]	[mg]	[mL]
Rink	Fmoc-D/L-His(Trt)-OH	3.0	0.43	264.0	
		4.0	0.57	353.2	
	Fmoc- <i>trans</i> -2-Aminocyclohexansäure <i>rac</i>	3.0	0.43	155.5	
	Fmoc- <i>trans</i> -(<i>R,R</i>)-Aminocyclohexansäure	4.0	0.43	155.5	
	Fmoc- <i>trans</i> -(<i>S,S</i>)-Aminocyclohexansäure	4.0	0.43	155.5	
	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	3.0	0.43	196.0	
		4.0	0.57	261.9	
	Fmoc-D/L-Ser(^t Bu)-OH	3.0	0.43	163.0	
		4.0	0.57	218.6	
	Fmoc-L-Pro-OH	4.0	0.57	192.3	
	Fmoc-Aib-OH	4.0	0.57	185.5	
	Fmoc-Gly-OH	4.0	0.57	168.9	
	Fmoc-D/L-Asp(OtBu)-OH	3.0	0.43	175.0	
		4.0	0.57	233.7	
	Fmoc-β-Ala-OH	3.0	0.43	133.0	
		4.0	0.57	176.8	
	Fmoc-Ahx-OH	4.0	0.57	200.7	
	Fmoc-L-Phe-OH	3.0	0.43	170.0	
	Fmoc-L-Cys-OH	4.0	0.57	337.2	
	Fmoc-L-Ala-OH	4.0	0.57	176.8	
	HCTU	3.0	0.43	176.0	
		4.0	0.57	235.8	
	^t Pr ₂ NEt	6.0	0.43		0.15
		12.0	1.70		0.29
NEt ₃	100	14.2		2.0	
Ac ₂ O	50	7.1		0.67	

15.1 Iso-Nikotinsäure TentaGel 6

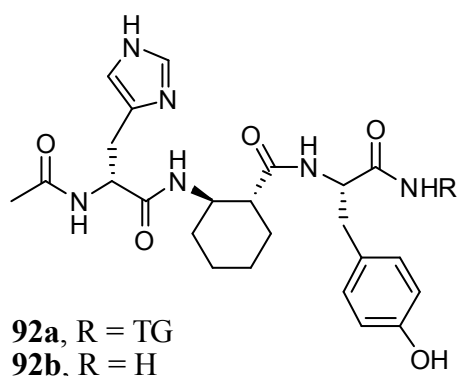


6

Synthese auf TentaGel

Für die Synthese wurden 100.0 mg TentaGel Harz (0.04 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Iso-Nikotinsäure wurde nach **Prozedur A2** gekuppelt. Anschließend wurde das Harz mit CH₂Cl₂ gewaschen und für die weiteren Versuch i. V. getrocknet.

15.2 Ac-D-His-rac-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 92a/b



Synthese auf TentaGel 92a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 92b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 79.0 mg (quant) eines Diastereomeren Gemisches.

C₂₄H₃₂N₆O₅

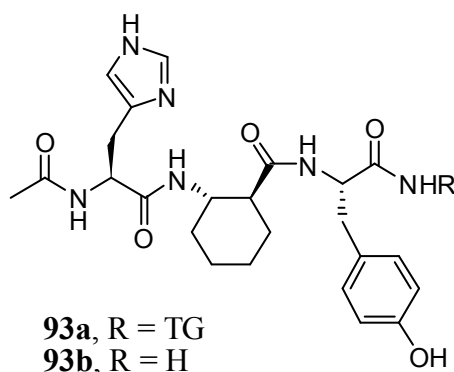
484.24 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.76 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.3 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.2 (s, 2H, CH_{Imi}), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 7.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.66 (dd, *J* = 8.1 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH_α_{His}), 4.55 (dd, *J* = 8.8 Hz, 5.6 Hz, 2H, CH_α_{His}, CH_α_{Tyr}), 4.49 (dd, *J* = 9.8 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH_α_{Tyr}), 3.99 (dt, *J* = 11.2 Hz, 4.3 Hz, 1H, CH_β_{ACHC}), 3.85 (dt, *J* = 11.6 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH_β_{ACHC}), 3.19 (dd, *J* = 15.4 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH_{2β}_{His}), 3.06 (m, 3H, CH_{2β}_{His}), 2.96 (dd, *J* = 15.2 Hz, 7.8 Hz, 1H, CH_{2β}_{Tyr}), 2.78 (m, 2H, CH_{2β}_{Tyr}), 2.69 (dd, *J* = 15.1 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH_{2β}_{Tyr}), 2.26 (m, 2H, CH_α_{ACHC}), 1.99 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.96 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.88 (m, 3H, CH₂_{ACHC}), 1.71 (m, 5H, CH₂_{ACHC}), 1.33 (m, 8H, CH₂_{ACHC});

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 177.1/176.2/173.4/171.1/170.9/168.5/165.7 (CO), 157.4 ($\text{C}_{\text{Ar-OH}}$), 134.8 (CH_{Imi}), 134.7 (CH_{Imi}), 131.3 (Cq_{Imi}), 131.4 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 131.2 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 130.5 (Cq_{Imi}), 129.6 (Cq_{Tyr}), 128.9 (Cq_{Tyr}), 118.7 (CH_{Imi}), 118.6 (CH_{Imi}), 116.2 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 55.5 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 53.7 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 53.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{His}}$), 51.9 ($\text{CH}\alpha_{\text{His}}$), 50.9 ($\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$), 50.5 ($\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 38.5 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 38.2 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 33.5 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 31.3 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 30.5 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 28.7 ($\text{CH}_2\beta_{\text{His}}$), 28.2 ($\text{CH}_2\beta_{\text{His}}$), 26.0 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 26.0 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 25.9 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 25.8 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 22.7 (CH_3_{Ac}), 22.5 (CH_3_{Ac});

ESI-MS m/z : berechnet: 484.24; gefunden: 485.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15.3 Ac-L-His-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 93a/b



Synthese auf TentaGel 93a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt. die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 93b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 53.0 mg (77%) eines Diastereomeren Gemisches.

$C_{24}H_{32}N_6O_5$

484.24 g/mol

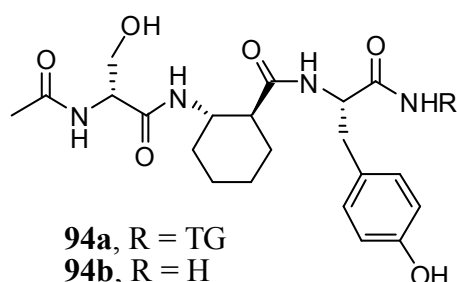
1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 8.76 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.30 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.08 (dd, $J = 8.3$ Hz, 4.8 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.70 (dd, $J = 8.3$ Hz, 4.5 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.60 (m, 2H, $CH\alpha_{His}$) 4.55 (dd, $J = 9.3$ Hz, 5.3 Hz, 1H, $CH\alpha_{Tyr}$), 4.45 (dd, $J = 8.1$ Hz, 6.6 Hz, 1H, $CH\alpha_{Tyr}$), 3.95 (dt, $J = 11.3$ Hz, 3.5 Hz, 1H, $CH\beta_{ACHC}$), 3.82 (dt, $J = 11.6$ Hz, 4.3 Hz, 1H, $CH\beta_{ACHC}$), 3.14 (dd, $J = 15.2$ Hz, 6.3 Hz, 1H, $CH_2\beta_{His}$), 2.99 (m, 4H, $CH_2\beta_{His}$, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.81 (m, 2H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.32 (m, 1H, $CH\alpha_{ACHC}$), 2.23 (m, 1H, $CH\alpha_{ACHC}$), 1.96 (s, 3H, CH_3_{Ac}), 1.88 (s, 3H, CH_3_{Ac}), 1.72 (m, 6H, CH_2_{ACHC}), 1.29 (m, 8H, CH_2_{ACHC});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $DMSO$, $25^\circ C$): δ (ppm) = 173.5/173.4/172.9/172.6/169.2/169.1/168.9/168.7 (CO), 155.6 (C_{Ar-OH}), 133.7 (CH_{Imi}), 133.5 (CH_{Imi}), 132.7 (Cq_{Imi}), 129.9 ($CH_{Ar_{Tyr}}$), 129.8 ($CH_{Ar_{Tyr}}$), 129.1 (Cq_{Imi}), 127.9 (Cq_{Tyr}), 127.8 (Cq_{Tyr}), 116.7 (CH_{Imi}), 114.7 ($CH_{Ar_{Tyr}}$), 54.8 ($CH\alpha_{Tyr}$), 54.2 ($CH\alpha_{Tyr}$), 53.6 ($CH\alpha_{His}$), 51.9 ($CH\alpha_{His}$), 48.8 ($CH\alpha_{ACHC}$), 48.5 ($CH\beta_{ACHC}$), 36.9 ($CH_2\beta_{Tyr}$), 36.6 ($CH_2\beta_{Tyr}$), 32.2 (CH_2_{ACHC}), 32.1 (CH_2_{ACHC}), 30.6 (CH_2_{ACHC}), 29.4, (CH_2_{ACHC}), 28.7 ($CH_2\beta_{His}$), 28.0 ($CH_2\beta_{His}$), 27.9 (CH_2_{ACHC}), 27.7 (CH_2_{ACHC}), 24.3 (CH_2_{ACHC}), 22.4 (CH_3_{Ac}), 22.3 (CH_3_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 484.24; gefunden: 485.2 $[M+H]^+$.

15.4 Ac-D-Ser-rac-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 94a/b



Synthese auf TentaGel 94a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 94b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 38.0 mg (62%) eines Diastereomeren Gemisches.

C₂₁H₃₀N₄O₆

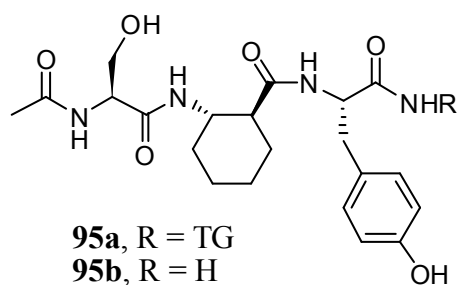
434.49 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 7.05 (d, J = 7.1 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.67 (dd, J = 8.6 Hz, 2.5 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.39 (s, 2H, CH α _{Tyr}) 4.35 (dd, J = 9.1 Hz, 5.1 Hz, 1H, CH α _{Ser}), 4.24 (m, 3H, CH α _{Ser}, CH β _{ACHC}, CH β _{ACHC}), 3.51 (m, 4H, CH₂ β _{Ser}), 2.92 (ddd, J = 13.3 Hz, 7.1 Hz, 5.3 Hz, 2H, CH₂ β _{Tyr}), 2.71 (m, 2H, CH₂ β _{Tyr}), 2.26 (dt, J = 11.1 Hz, 3.6 Hz, 1H, CH α _{ACHC}), 2.17 (dt, J = 12.1 Hz, 3.6 Hz, 1H, CH α _{ACHC}), 1.97 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.89 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.80 (m, 2H, CH₂_{ACHC}), 1.61 (m, 6H, CH₂_{ACHC}), 1.20 (m, 8H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 174.4/173.9/173.8/173.7/170.8/170.6/169.8/169.5 (CO), 155.9 (C_{Ar}-OH), 130.6 (CH_{Ar}_{Tyr}), 130.4 (CH_{Ar}_{Tyr}), 128.3 (C_q_{Tyr}), 115.2 (CH_{Ar}_{Tyr}), 62.2 (CH₂ β _{Ser}), 62.0 (CH₂ β _{Ser}), 55.7 (CH α _{Ser}), 55.1 (CH α _{Ser}), 54.8 (CH α _{Tyr}), 54.1 (CH α _{Tyr}), 50.1 (CH α _{ACHC}), 49.8 (CH α _{ACHC}), 49.3 (CH β _{ACHC}), 48.6 (CH β _{ACHC}), 37.0 (CH₂ β _{Tyr}), 36.9 (CH₂ β _{Tyr}), 32.7 (CH₂_{ACHC}), 32.5 (CH₂_{ACHC}), 29.3 (CH₂_{ACHC}), 24.8 (CH₂_{ACHC}), 24.7 (CH₂_{ACHC}), 23.0 (CH₃_{Ac}), 22.8 (CH₃_{Ac});

ESI-MSm/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 [M+Na]⁺.

15.5 Ac-L-Ser-rac-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 95a/b



Synthese auf TentaGel 95a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 95b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 38.0 mg (62%) eines Diastereomeren Gemisches.

C₂₁H₃₀N₄O₆

434.49 g/mol

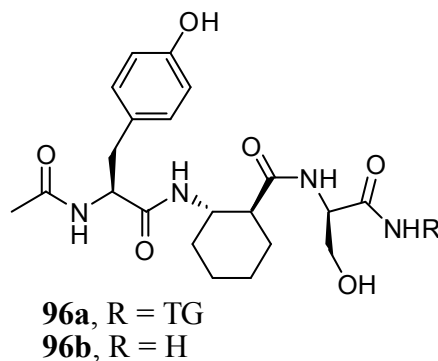
¹H-NMR (400.0 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 7.12 (dd, *J* = 8.3 Hz, 3.8 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.80 (dd, *J* = 8.1 Hz, 6.1 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.57 (dd, *J* = 8.8 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH_α Tyr), 4.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH_α Tyr), 4.29 (m, 2H, CH_α Ser), 3.88 (m, 1H, CH_β ACHC), 3.71 (m, 5H, CH_β ACHC, CH₂β Ser), 2.85 (m, 2H, CH₂β Tyr), 2.28 (m, 2H, CH_α ACHC), 2.03 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.98 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.85 (m, 2H, CH₂ ACHC), 1.74 (m, 5H, CH₂ ACHC), 1.29 (m, 9H, CH₂ ACHC);

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.3/172.8/172.7/169.7/169.2/169.1/169.0/168.9 (CO), 155.6 (C_{Ar}-OH), 155.5 (C_{Ar}-OH), 129.97 (CH_{Ar} Tyr), 129.93 (CH_{Ar} Tyr), 127.9 (C_qTyr), 127.8 (C_qTyr), 114.7 (CH_{Ar} Tyr), 114.6 (CH_{Ar} Tyr), 64.8 (CH₂β Ser), 61.8 (CH_α Ser), 54.8 (CH_α Tyr), 49.1 (CH_β ACHC), 48.8 (CH_β ACHC), 36.9 (CH₂β Tyr), 36.9 (CH₂β Tyr), 36.9 (CH₂β Tyr), 33.6 (CH₂ ACHC), 32.6 (CH₂ ACHC), 32.5 (CH₂ ACHC), 28.5 (CH₂ ACHC), 28.5 (CH₂ ACHC), 24.32 (CH₂ ACHC), 24.31 (CH₂ ACHC), 22.5 (CH₃ Ac), 22.4 (CH₃ Ac);

ESI-MS

m/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.9 [M+Na]⁺.

15.6 Ac-L-Tyr-*rac*-ACHC-D-Ser-NH-TG/H 96a/b



Synthese auf TentaGel 96a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 96b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 51.2 mg (83%) eines Diastereomeren Gemisches.

C₂₁H₃₀N₄O₅

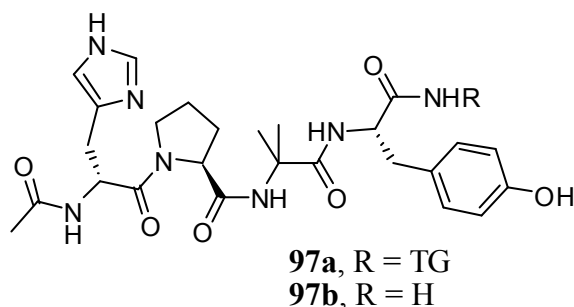
434.49 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 7.04 (dd, *J* = 8.6 Hz, 6.3 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.68 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.2 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.30 (s, 3H, CH_α_{Tyr}, CH_α_{Ser}), 4.14 (m, 1H, CH_α_{Ser}), 3.66 (m, 2H, CH_β_{ACHC}), 3.60 (m, 4H, CH₂β_{Ser}), 2.87 (dd, *J* = 13.6 Hz, 5.8 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.78 (dd, *J* = 14.1 Hz, 3.5 Hz 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.51 (m, 2H, CH₂β_{Tyr}), 2.30 (m, 2H, CH_α_{ACHC}), 1.79 (2 s, 9H, CH₃_{Ac}, CH₃_{Ac}, CH₂_{ACHC}) 1.67 (m, 5H, CH₂_{ACHC}), 1.41 (m, 2H, CH₂_{ACHC}), 1.20 (m, 6H, CH₂_{ACHC});

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 174.9/174.9/173.8/173.6/171.8/171.4 (CO), 155.9 ($C_{\text{Ar-OH}}$), 130.9 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 128.9 (C_{qTyr}), 115.7 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 62.2 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 62.1 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 55.7 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 55.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 54.8 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 54.5 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 50.0 ($\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$), 49.9 ($\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$), 49.9 ($\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 49.6 ($\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 37.8 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 37.6 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 33.0 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 29.7 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 27.5 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 25.1 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 24.9 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 24.4 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 24.1 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 23.9 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 23.1 (CH_3_{Ac}), 22.9 (CH_3_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (100), 435.74 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (50).

15.7 Ac-D-His-ProAib-L-Tyr-NH-TG/H 97a/b



Synthese auf TentaGel 97a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 97b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 76.1 mg (quant.).

$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_6$ 541.60 g/mol

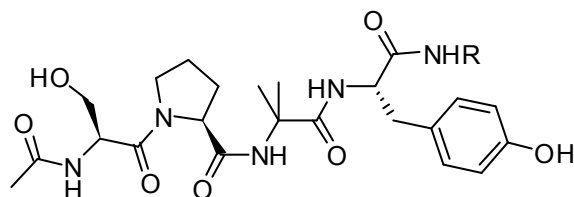
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 8.56 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.28 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.80 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H,

$CH\alpha_{\text{Pro}}$, 4.41 (dd, $J = 9.6$ Hz, 4.8 Hz, 1H, $CH\alpha_{\text{His}}$), 4.24 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $CH\alpha_{\text{Tyr}}$), 3.49 (m, 2H, $CH_2\delta_{\text{Pro}}$), 3.18 (dd, $J = 14.1$ Hz, 4.5 Hz, 2H, $CH_2\beta_{\text{His}}$), 2.95 (m, 2H, $CH_2\beta_{\text{Tyr}}$), 2.17 (m, 1H, $CH_2\beta_{\text{Pro}}$), 1.99 (m, 1H, $CH_2\beta_{\text{Pro}}$), 1.91 (m, 5H, CH_3_{Ac} , $CH_2\gamma_{\text{Pro}}$), 1.38 (s, CH_3_{Aib}), 1.27 (s, CH_3_{Aib});

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 176.8/174.6/173.2/171.6 (CO), 157.3 ($C_{\text{Ar-OH}}$), 135.3 (CH_{Imi}), 131.8 (C_{qImi}), 131.3 (C_{qTyr}), 129.8 (CH_{Ar}), 118.6 (CH_{Imi}), 116.2 ($CH_{\text{Ar-Tyr}}$), 62.9 ($CH\alpha_{\text{Tyr}}$), 58.2 ($CH\alpha_{\text{Pro}}$), 56.6 ($CH\alpha_{\text{His}}$), 52.8 (C_{qAib}), 37.2 ($CH_2\beta_{\text{Tyr}}$), 30.3 ($CH_2\delta_{\text{Pro}}$), 28.1 ($CH_2\beta_{\text{His}}$), 26.2 ($CH_2\beta_{\text{Pro}}$), 25.9 ($CH_2\gamma_{\text{Pro}}$), 24.9 (CH_3_{Aib}), 24.6 (CH_3_{Aib}), 22.5 (CH_3_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 541.60; gefunden: 542.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15.8 Ac-L-Ser-ProAib-L-Tyr-NH-TG/H 98a/b



98a, R = TG

98b, R = H

Synthese auf TentaGel 98a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 98b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 77.1 mg (quant.).

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7$

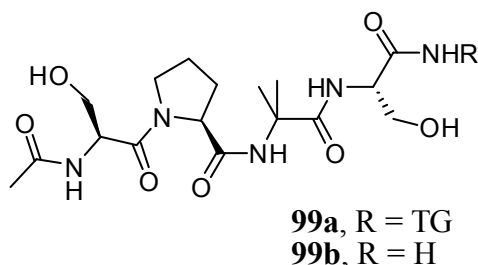
491.24 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 7.10 (d, J = 6.8 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.70 (d, J = 6.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.77 (t, J = 6.3 Hz, 1H, CH α _{Pro}), 4.42 (m, 1H, CH α _{Ser}), 4.24 (t, J = 6.1 Hz, 1H, CH α _{Tyr}), 3.85 (m, 2H, CH₂ β _{Ser}), 3.72 (t, J = 8.1 Hz, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.48 (m, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.25 (d, J = 14.1 Hz, 1H, CH₂ β _{Tyr}), 2.93 (t, J = 12.0 Hz, 1H, CH₂ β _{Tyr}), 2.24 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 1.99 (s, 5H, CH₃_{Ac}, CH₂ γ _{Pro}), 1.88 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 1.35 (s, CH₃_{Aib}), 1.17 (s, CH₃_{Aib});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 176.9/176.8/174.5/173.4/172.7 (CO), 157.3 (C_{Ar}-OH), 131.3 (C_q_{Tyr}), 129.9 (CH_{Ar}), 116.2 (CH_{Ar}_{Tyr}), 63.0 (CH₂ β _{Ser}), 62.8 (CH α _{Ser}), 58.0 (CH α _{Pro}), 56.5 (CH α _{Tyr}), 54.5 (C_q_{Aib}), 36.9 (CH₂ β _{Tyr}), 30.4 (CH₂ δ _{Pro}), 26.3 (CH₂ β _{Pro}), 25.9 (CH₂ γ _{Pro}), 24.5 (CH₃_{Aib}), 22.3 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 491.24; gefunden: 514.2 [M+Na]⁺.

15.9 Ac-L-Ser-ProAib-L-Ser-NH-TG/H 99a/b



Synthese auf TentaGel 99a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200.0 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 99b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200.0 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 63.1 mg (quant.).

$C_{17}H_{29}N_5O_7$

415.21 g/mol

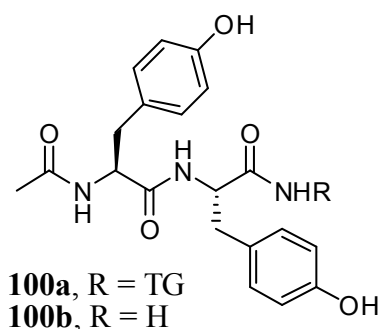
1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 4.78 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, $CH\alpha_{Pro}$), 4.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, $CH\alpha_{Ser}$), 4.29 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H, $CH\alpha_{Ser}$), 3.83 (m, 6H, $CH_2\beta_{Ser}$, $CH_2\beta_{Ser}$, $CH_2\delta_{Pro}$), 2.29 (m, 1H, $CH_2\beta_{Pro}$), 2.10 (m, 2H, $CH_2\beta_{Pro}$, $CH_2\gamma_{Pro}$), 2.00 (brs, 4H, CH_3_{Ac} , $CH_2\gamma_{Pro}$), 1.48 (s, CH_3_{Aib}), 1.44 (s, CH_3_{Aib});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 176.9/175.3/174.7/173.4/172.6 (CO), 63.1 ($CH_2\beta_{Ser}$), 62.9 ($CH_2\beta_{Ser}$), 62.8 ($CH\alpha_{Ser}$), 58.2 ($CH\alpha_{Ser}$), 57.7 ($CH\alpha_{Pro}$), 54.6 (Cq_{Aib}), 30.4 ($CH_2\delta_{Pro}$), 26.2 ($CH_2\beta_{Pro}$), 26.0 ($CH_2\gamma_{Pro}$), 25.1 (CH_3_{Aib}), 22.3 (CH_3_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 415.21; gefunden: 438.9 $[M+Na]^+$.

15.10 Ac-L-Tyr-L-Tyr-NH-TG/H 100a/b



Synthese auf TentaGel 100a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 100b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200.0 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 61.0 mg (quant.).

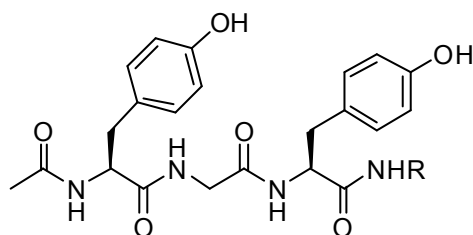
$C_{20}H_{23}N_3O_5$ 385.16 g/mol

1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 7.00 (dd, $J = 11.3$ Hz, 8.6 Hz, 4 H, ArH_{Tyr}), 6.67 (dd, $J = 8.3$ Hz, 2.2 Hz, 4 H, ArH_{Tyr}), 4.48 (m, 2H, $CH\alpha_{Tyr}$), 3.03 (dd, $J = 14.1$ Hz, 5.8 Hz, 1H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.92 (dd, $J = 13.8$ Hz, 6.0 Hz, 1H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.79 (dd, $J = 14.1$ Hz, 8.6 Hz, 1H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.70 (dd, $J = 14.1$ Hz, 8.8 Hz, 1H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 1.88 (s, CH_3_{Ac});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 175.9/173.5/173.3 (CO), 157.4 (C_{Ar-OH}), 157.3 (C_{Ar-OH}), 131.5/131.3/129.1/129.0/116.2 ($CH_{Ar_{Tyr}}$), 56.6/55.8 ($CH\alpha_{Tyr}$) 38.0/37.8 ($CH_2\beta_{Tyr}$), 22.4 (CH_3_{Ac}).

ESI-MS m/z: berechnet: 385.16; gefunden: 408.2 $[M+Na]^+$.

15.11 Ac-L-Tyr-Gly-L-Tyr-NH-TG/H 101a/b



101a, R = TG

101b, R = H

Synthese auf TentaGel 101a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 100b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 53.0 mg (84%).

$C_{22}H_{26}N_4O_6$

442.19 g/mol

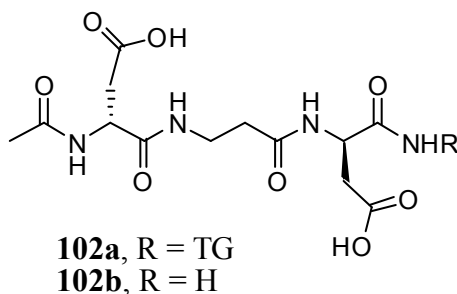
1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 7.08 (dd, $J = 8.3$ Hz, 3.8 Hz, 4 H, ArH_{Tyr}), 6.75 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2.2 Hz, 4 H, ArH_{Tyr}), 4.50 (dd, $J = 8.6$ Hz, 5.1 Hz, 1H, $CH\alpha_{Tyr}$), 4.43 (dd, $J = 8.6$ Hz, 6.6 Hz, 1H, $CH\alpha_{Tyr}$), 3.89 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H, CH_2_{Gly}), 3.66 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H, CH_2_{Gly}), 3.03 (m, 2H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 2.83 (dd, $J = 13.8$ Hz, 6.0 Hz, 2H, $CH_2\beta_{Tyr}$), 1.93 (s, CH_3_{Ac});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 176.5/174.9/174.3/171.6 (CO), 156.4 (C_{Ar-OH}), 156.3 (C_{Ar-OH}), 131.4/131.3/129.3/129.1/116.3 ($CH_{Ar_{Tyr}}$), 56.9/56.1 ($CH\alpha_{Tyr}$) 43.4 (CH_2_{Gly}), 37.6/37.4 ($CH_2\beta_{Tyr}$), 22.6 (CH_3_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 442.19; gefunden: 465.2 $[M+Na]^+$.

15.12 Ac-D-Asp- β -Ala-D-Asp-NH-TG/H 102a/b



Synthese auf TentaGel 102a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 102b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 61.1 mg (quant.).

$C_{13}H_{20}N_4O_8$

360.32 g/mol

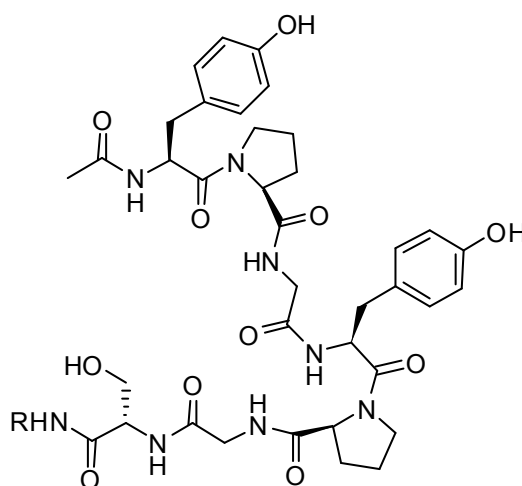
1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 4.73 (dd, $J = 7.8$ Hz, 5.6 Hz, 1H, $CH\alpha_{Asp}$), 4.66 (dd, $J = 7.1$ Hz, 5.8 Hz, 1H, $CH\alpha_{Asp}$), 3.50 (m, 1H, $CH_2_{\beta-Ala}$), 3.40 (m, 1H, $CH_2_{\beta-Ala}$), 2.78 (m, 4H, $CH_2\beta_{Asp}$), 2.43 (m, 1H, $CH_2_{\beta-Ala}$), 1.99 (s, 3H, CH_3_{Ac});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , 25°C): δ (ppm) = 174.1/174.1/173.3 (CO), 51.4 ($CH\alpha_{Asp}$), 51.1 ($CH\alpha_{Asp}$), 37.1 ($CH_2\beta_{Asp}$), 36.8 ($CH_2_{\beta-Ala}$), 36.6 ($CH_2_{\beta-Ala}$), 22.7 (CH_3_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 360.32; gefunden: 383.1 $[M+Na]^+$.

15.13 Ac-L-Tyr-Pro-Gly-L-Tyr-Pro-Gly-L-Ser-NH-TG/H 103a/b

**103a**, R = TG**103b**, R = H

Synthese auf TentaGel 103a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 103b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C**

acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 112.0 mg (quant.).

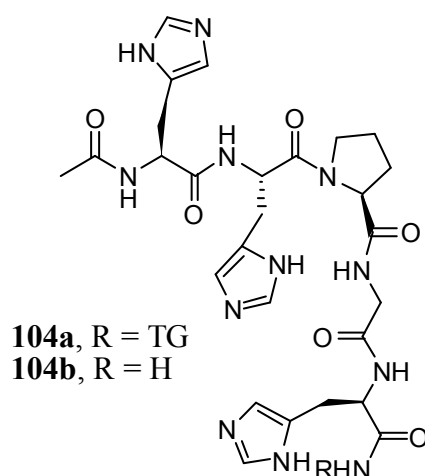
C₃₇H₄₈N₈O₁₁ 780.34 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 7.07 (m, 4H, ArH_{Tyr}), 6.72 (m, 4H, ArH_{Tyr}), 4.80 (m, 2H, CH_α Pro), 4.36 (m, 3H, CH_α Tyr, CH_α Tyr, CH_α Ser), 3.84 (m, 8H, CH₂ Gly, CH₂ Gly, CH₂δ Pro, CH₂δ Pro), 3.41 (m, 2H, CH₂β Ser), 3.03 (m, 4H, CH₂β Tyr, CH₂β Tyr), 2.19 (m, 2H, CH₂β Pro), 2.03 (m, 6H, CH₂β Pro, CH₂γ Pro), 1.87 (s, 3H, CH₃ Ac);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 177.3/175.1/174.8/173.0/172.9/172.8/171.9/171.5 (CO), 131.8 (CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 128.9 (C_qAr), 128.8 (C_qAr), 116.6 (CH_{Ar}), 116.3 (CH_{Ar}), 63.3 (CH₂β Ser), 62.8 (CH_α Pro), 62.4 (CH_α Pro), 57.2 (CH_α Ser), 54.7 (CH_α Tyr), 54.3 (CH_α Tyr), 44.1 (CH₂ Gly), 43.4 (CH₂ Gly), 37.5 (CH₂β Tyr), 37.2 (CH₂β Tyr), 30.3 (CH₂δ Pro), 26.3 (CH₂β Pro), 26.2 (CH₂γ Pro), 22.3 (CH₃ Ac);

ESI-MS m/z: berechnet: 780.34; gefunden: 781.3 [M+H]⁺ (100), 803.2 [M+Na]⁺ (73).

15.14 Ac-L-His-L-His-Pro-Gly-D-His-NH-TG/H 104a/b



Synthese auf TentaGel 104a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 104b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 88.0 mg (quant.).

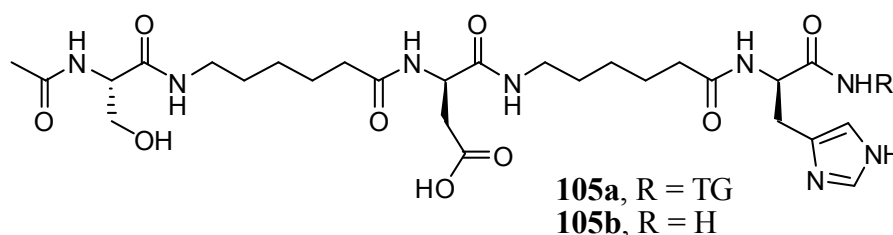
C₂₇H₃₆N₁₂O₆ 624.29 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.80 (s, 3H, CH_Imi), 7.40 (s, 1H, CH_Imi), 7.32 (s, 1H, CH_Imi), 7.21 (s, 1H, CH_Imi), 4.89 (m, 1H, CHα_{Pro}), 4.70 (dd, *J* = 9.1 Hz, 4.8 Hz, 1H, CHα_{His}), 4.66 (dd, *J* = 8.3 Hz, 5.8 Hz, 1H, CHα_{His}), 4.38(t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CHα_{His}), 3.9 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, CH₂_{Gly}), 3.78 (d, *J* = 17.1 Hz, 2H, CH₂_{Gly}, CH₂δ_{Pro}), 3.60 (m, 1H, CH₂δ_{Pro}), 3.30-3.13 (m, 6H, CH₂β_{His}), 2.28 (m, 1H, CH₂β_{Pro}), 2.09 (m, 1H, CH₂β_{Pro}), 1.97 (m, 2H, CH₂γ_{Pro}), 1.94 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 175.5/174.5/173.6/172.1/171.7/170.9 (CO), 135.14/135.12/135.01 (C_qmi), 131.3/131.1/130.3 (CH_Imi), 118.6/118.5/118.4 (CH_Imi), 62.6 (CHα_{Pro}), 53.6 (CHα_{His}), 53.3 (CHα_{His}), 51.9 (CHα_{His}), 43.8 (CH₂_{Gly}), 30.5 (CH₂δ_{Pro}), 28.0 (CH₂β_{His}), 27.7 (CH₂β_{His}), 27.4 (CH₂β_{His}), 26.3 (CH₂β_{Pro}), 26.1 (CH₂γ_{Pro}), 22.5 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 624.29; gefunden: 625.2 [M+H]⁺.

15.15 Ac-L-Ser-Ahx-L-Asp-Ahx-D-His-NH-TG/H 105a/b



Synthese auf TentaGel 105a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 105b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 113.0 mg (quant.).

C₂₇H₄₄N₈O₉

624.32 g/mol

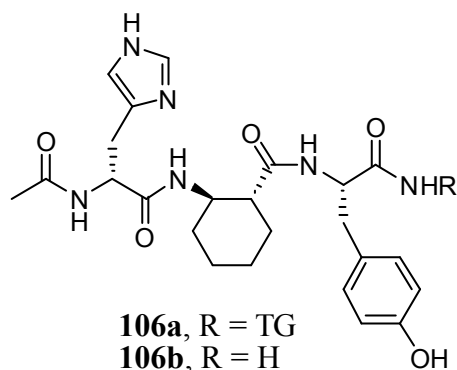
¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.83 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.34 (s, 1H, CH_{Imi}), 4.75 (dd, *J* = 8.8 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH_α_{His}), 4.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH_α_{Asp}), 4.37 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH_α_{Ser}), 3.76 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH_{2β}_{Ser}), 3.19 (m, 5H, NHCH₂_{Ahx}, NHCH₂_{Ahx}, CH_{2β}_{Asp}), 3.05 (dd, *J* = 15.4 Hz, 9.1 Hz, 1H, CH_{2β}_{Asp}), 2.85 (dd, *J* = 16.6 Hz, 5.8 Hz, 1H, CH_{2β}_{His}), 2.69 (dd, *J* = 16.4 Hz, 7.8 Hz, 1H, CH_{2β}_{His}), 2.23 (m, 4H, CH₂CO_{Ahx}), 2.02 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.62 (m, 2H, CH₂_{Ahx}), 1.50 (m, 6H, CH₂_{Ahx}), 1.34 (m, 2H, CH₂_{Ahx}), 1.23 (m, 2H, CH₂_{Ahx});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 176.2/176.1/174.8/173.6/169.0 (CO), 135.0 (C_q_{Imi}), 131.5 (CH_{Imi}), 118.5 (CH_{Imi}), 63.1 (CH_{2β}_{Ser}), 57.1 (CH_α_{Ser}), 52.9 (CH_α_{His}), 51.8 (CH_α_{Asp}), 43.8 (CH₂_{Gly}), 40.3 (NHCH₂_{Ahx}), 36.7 (CH_{2β}_{Asp}), 36.6 (CH₂CO_{Ahx}), 29.9 (CH_{2β}_{His}), 28.4/28.1 (CH_{2β}_{Ahx}), 27.6/27.5 (CH₂_{Ahx}), 26.6/26.5 (CH₂_{Ahx}), 22.7 (CH₃_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 624.32; gefunden: 625.2 [M+H]⁺.

15.16 Ac-D-His-(R,R)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 106a/b

**Synthese auf TentaGel 106a**

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 106b

Für die Synthese wurden 200.0 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 49.6 mg (72%).

C₂₄H₃₂N₆O₅

484.24 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.74 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.2 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.55 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_α His), 4.49 (dd, *J* = 9.8 Hz, 5.0 Hz, 1H, CH_α Tyr), 3.99 (dt, *J* = 11.4 Hz, 4.3 Hz, 1H, CH_β ACHC), 3.09 (dd, *J* = 15.1 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH_{2β} His), 3.03 (dd, *J* = 14.1 Hz, 5.1 Hz, 1H, CH_{2β} His), 2.75 (ddd, *J* = 13.9 Hz, 9.8 Hz, 6.3 Hz, 2H, CH_{2β} Tyr), 2.24 (dt, *J* = 11.6 Hz, 3.0 Hz, 1H, CH_α ACHC), 1.96 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.88 (m, 2H, CH₂ ACHC), 1.75 (m, 2H, CH₂ ACHC), 1.33 (m, 4H, CH₂ ACHC);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 177.1/175.7/173.1/170.9/167.8 (CO), 157.4 (C_{Ar}-OH), 134.7 (CH_{Imi}), 131.3 (CH_{Ar} Tyr), 130.5 (C_q Imi), 129.6 (C_q Tyr), 118.7 (CH_{Imi}), 116.2 (CH_{Ar} Tyr), 53.1 (CH_α Tyr), 51.9 (CH_α His), 51.1 (CH_α ACHC), 50.5 (CH_β ACHC), 38.2

(CH₂β_{Tyr}), 33.5 (CH₂_{ACHC}), 31.3 (CH₂_{ACHC}), 28.7 (CH₂β_{His}), 26.08 (CH₂_{ACHC}), 26.02 (CH₂_{ACHC}), 22.5 (CH₃_{Ac});

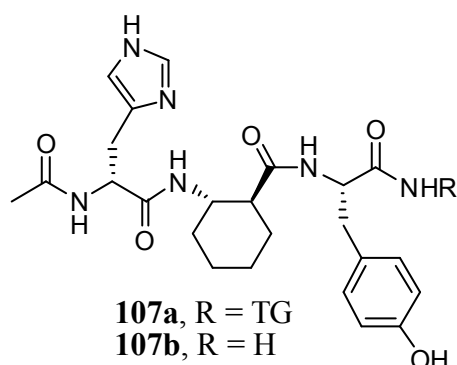
ESI-MS m/z: berechnet: 484.24; gefunden: 485.3 [M+H]⁺.

Für die NMR Titration des Peptids mit AgNO₃ wurde das Peptid in D₂O vermessen:

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 8.54 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, CH_{Imi}), 8.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 8.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH_{His}), 8.01 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH_{ACHC}), 7.48 (s, 1H, NH₂_{Amid}), 7.08 (s, 2H, ArH_{Tyr}), 7.07 (s, 1H, NH₂_{Amid}), 7.04 (s, 1H, CH_{Imi}), 6.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.43 (dq, *J* = 7.9 Hz, 5.6 Hz, 1H, CHα_{His}), 4.35 (ddd, *J* = 10.1 Hz, 7.6 Hz, 5.1 Hz, 1H, CHα_{Tyr}), 3.86 (m, 1H, CHβ_{ACHC}), 2.99 (dd, *J* = 14.7 Hz, 5.1 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.86 (dd, *J* = 16.2 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH₂β_{His}), 2.79 (dd, *J* = 14.7 Hz, 10.1 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.66 (dd, *J* = 16.2 Hz, 7.9 Hz, 1H, CH₂β_{His}), 2.31 (dt, *J* = 8.7 Hz, 3.7 Hz, 1H, CHα_{ACHC}), 1.92 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.83 (m, 1H, CH₂ζ_{ACHC}), 1.80 (m, 1H, CH₂γ_{ACHC}), 1.73 (m, 1H, CH₂δ_{ACHC}), 1.69 (m, 2H, CH₂ε_{ACHC}), 1.35 (m, 1H, CH₂ζ_{ACHC}), 1.28 (m, 1H, CH₂δ_{ACHC}), 1.24 (m, 1H, CH₂ε_{ACHC}), 1.22 (m, 1H, CH₂γ_{ACHC});

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 177.4 (CO_{Tyr}), 176.4 (CO_{Amid}), 174.1 (CO_{Ac}), 171.2 (CO_{ACHC}), 154.7 (C_{Ar}-OH), 134.4 (CH_{Imi}), 130.6 (CH_{Ar}_{Tyr}), 129.7 (C_{qImi}), 128.8 (C_{qTyr}), 117.4 (CH_{Imi}), 115.6 (CH_{Ar}_{Tyr}), 55.9 (CHα_{Tyr}), 52.7 (CHα_{His}), 50.1 (CHα_{ACHC}), 49.8 (CHβ_{ACHC}), 36.5 (CH₂β_{Tyr}), 31.9 (CH₂γ_{ACHC}), 29.7 (CH₂ζ_{ACHC}), 27.8 (CH₂β_{His}), 24.4 (CH₂δ_{ACHC}), 21.9 (CH₃_{Ac});

15.17 Ac-D-His-(S,S)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 107a/b

**Synthese auf TentaGel 107a**

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 107b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 49.6 mg (72%).

C₂₄H₃₂N₆O₅

484.24 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.71 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.3 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.66 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH_α His), 4.55 (dd, *J* = 8.6 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH_α Tyr), 3.85 (m, 1H, CH_β ACHC), 3.19 (dd, *J* = 14.9 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH_{2β} His), 3.04 (dd, *J* = 14.1 Hz, 5.8 Hz, 1H, CH_{2β} Tyr), 2.96 (dd, *J* = 14.9 Hz, 7.8 Hz, 1H, CH_{2β} His), 2.80 (dd, *J* = 13.9 Hz, 9.1 Hz, 1H, CH_{2β} Tyr), 2.26 (m, 1H, CH_α ACHC), 1.99 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.88 (m, 1H, CH₂ ACHC), 1.68 (m, 3H, CH₂ ACHC), 1.30 (m, 4H, CH₂ ACHC);

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 177.1/176.2/173.5/171.2/ (CO), 157.5 (C_{Ar}-OH), 134.8 (CH_{Imi}), 131.5 (C_{qImi}), 131.3 (CH_{Ar} Tyr), 128.9 (C_{qTyr}), 118.6 (CH_{Imi}), 116.2 (CH_{Ar} Tyr), 55.5 (CH_α Tyr), 53.7 (CH_α His), 51.6 (CH_α ACHC), 50.9 (CH_β ACHC), 38.5 (CH_{2β} Tyr), 33.2 (CH₂ ACHC), 30.5 (CH₂ ACHC), 28.3 (CH_{2β} His), 25.9 (CH₂ ACHC), 25.8 (CH₂ ACHC), 22.8 (CH₃ Ac);

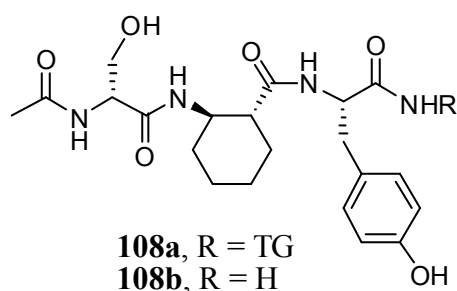
ESI-MS m/z: berechnet: 484.24; gefunden: 485.2 [M+H]⁺.

Aus der NMR Titration in D₂O konnten die Signale des SS Diastereomers aus dem Diastereomeren-Gemisch wie folgt entnommen werden:

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 8.56 (s, 1H, CH_{Imi}), 8.24 (m, 1H, NH_{Tyr}), 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH_{His}), 7.97 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH_{ACHC}), 7.60 (s, 1H, NH₂ Amid), 7.22 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.10 (s, 2H, ArH_{Tyr}), 6.98 (s, 1H, NH₂ Amid), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.57 (m, 1H, CH_α Tyr), 4.48 (m, 1H, CH_α Tyr), 3.75 (m, 1H, CH_β ACHC), 3.08 (m, 1H, CH_{2β} Tyr), 3.06 (m, 1H, CH_{2β} His), 2.96 (m, 1H, CH_{2β} His), 2.82 (m, 1H, CH_{2β} Tyr), 2.24 (m, 1H, CH_α ACHC), 1.93 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.73 (m, 1H, CH_{2ε} ACHC), 1.68 (m, 2H, CH_{2γ} ACHC, CH_{2δ} ACHC), 1.53 (m, 1H, CH_{2ζ} ACHC), 1.24 (m, 1H, CH_{2δ} ACHC), 1.18 (m, 1H, CH_{2ζ} ACHC), 1.13 (m, 1H, CH_{2ε} ACHC), 1.09 (m, 1H, CH_{2γ} ACHC).

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 176.5 (CO_{Tyr}), 176.1 (CO_{Amid}), 174.1 (CO_{Ac}), 171.2 (CO_{ACHC}), 154.6 (C_{Ar}-OH), 134.4 (CH_{Imi}), 130.9 (CH_{Ar} Tyr), 130.0 (C_{qImi}), 128.6 (C_{qTyr}), 117.5 (CH_{Imi}), 115.6 (CH_{Ar} Tyr), 54.3 (CH_α Tyr), 53.5 (CH_α His), 49.9 (CH_β ACHC), 49.8 (CH_α ACHC), 37.1 (CH_{2β} Tyr), 31.7 (CH_{2γ} ACHC), 29.4 (CH_{2ζ} ACHC), 27.8 (CH_{2β} His), 24.4 (CH_{2δ} ACHC, CH_{2ε} ACHC), 21.9 (CH₃ Ac);

15.18 Ac-D-Ser-(R,R)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 108a/b

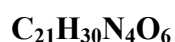


Synthese auf TentaGel 108a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 108b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 42.7 mg (69%).

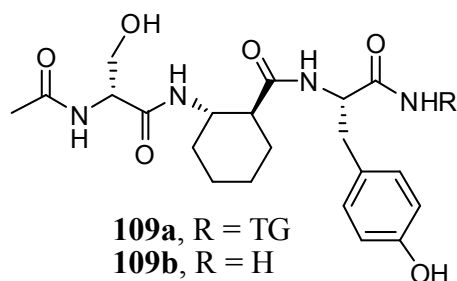


434.49 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 9.10 (s, 1H, OH), 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, NH), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.61 (m, 1H, CHα_{Tyr}) 4.24 (m, 2H, CHα_{Ser}, CHβ_{ACHC}), 3.76 (m, 1H, CH₂β_{Ser}), 3.45 (m, 1H, CH₂β_{Ser}), 2.81 (m, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.68 (m, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.20 (m, 1H, CHα_{ACHC}), 1.86 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.78 (m, 1H, CH₂_{ACHC}), 1.62 (m, 3H, CH₂_{ACHC}), 1.20 (m, 4H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 172.9/172.8/169.5/169.1 (CO), 155.5 (C_{Ar}-OH), 129.9 (CH_{Ar}_{Tyr}), 127.9 (C_q_{Tyr}), 114.7 (CH_{Ar}_{Tyr}), 62.2 (CH₂β_{Ser}), 55.2 (CHα_{Ser}), 54.8 (CHα_{Tyr}), 49.5 (CHα_{ACHC}), 48.8 (CHβ_{ACHC}), 36.8 (CH₂β_{Tyr}), 32.3 (CH₂_{ACHC}), 31.5 (CH₂_{ACHC}), 28.7 (CH₂_{ACHC}), 24.4 (CH₂_{ACHC}), 22.3 (CH₃_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 [M+Na]⁺.**15.19 Ac-D-Ser-(S,S)-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 109a/b****Synthese auf TentaGel 109a**

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B**

entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 109b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 37.6 mg (61%).

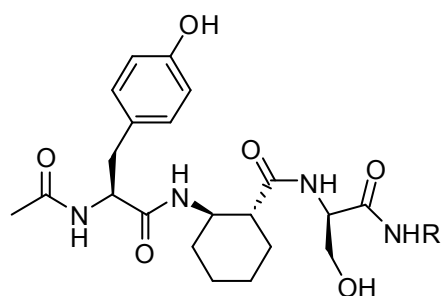
C₂₁H₃₀N₄O₆ 434.49 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 9.10 (s, 1H, OH), 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, NH), 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.61 (m, 1H, CHα_{Tyr}) 4.32 (m, 1H, CHα_{Ser}), 4.24 (m, 1H, CHβ_{ACHC}), 3.56 (m, 1H, CH₂β_{Ser}), 3.45 (m, 1H, CH₂β_{Ser}), 2.88 (dd, *J* = 13.9 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.65 (dd, *J* = 13.6 Hz, 8.8 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.26 (m, 1H, CHα_{ACHC}), 1.88 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.82 (m, 1H, CH₂_{ACHC}), 1.58 (m, 2H, CH₂_{ACHC}), 1.20 (m, 4H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.4/173.1/169.3/169.1 (CO), 155.6 (C_{Ar}-OH), 129.8 (CH_{Ar}_{Tyr}), 127.6 (C_q_{Tyr}), 114.7 (CH_{Ar}_{Tyr}), 61.8 (CH₂β_{Ser}), 54.5 (CHα_{Ser}), 53.6 (CHα_{Tyr}), 49.5 (CHα_{ACHC}), 47.8 (CHβ_{ACHC}), 36.6 (CH₂β_{Tyr}), 32.0 (CH₂_{ACHC}), 30.5 (CH₂_{ACHC}), 28.5 (CH₂_{ACHC}), 24.1 (CH₂_{ACHC}), 22.7 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 [M+Na]⁺.

15.20 Ac-L-Tyr-(R,R)-ACHC-D-Ser-NH-TG/H 110a/b



110a, R = TG

110b, R = H

Synthese auf TentaGel 110a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 110b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 46.7 mg (75%).

C₂₁H₃₀N₄O₅

434.49 g/mol

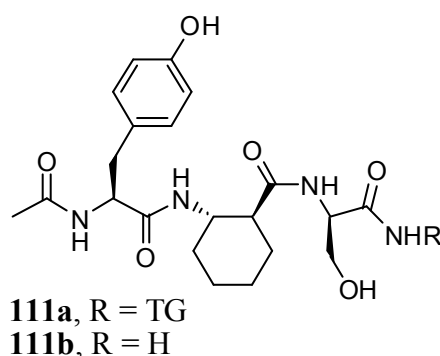
¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.22 (s, 1H, NH), 6.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.30 (m, 1H, CHα_{Tyr}), 4.14 (m, 1H, CHα_{Ser}), 3.70 (m, 1H, CHβ_{ACHC}), 3.60 (dd, *J* = 10.8 Hz, 5.1 Hz, 1H, CH₂β_{Ser}), 3.55 (dd, *J* = 10.8 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH₂β_{Ser}), 2.87 (dt, *J* = 8.6 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.54 (m, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.29 (m, 1H, CHα_{ACHC}), 1.77 (s, 5H, CH₃_{Ac}, CH₂_{ACHC}) 1.62 (m, 2H, CH₂_{ACHC}), 1.41 (m, 1H, CH₂_{ACHC}), 1.15 (m, 3H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 172.8/172.3/170.0/168.9 (CO), 155.5 (C_{Ar}-OH), 129.9 (CH_{Ar}_{Tyr}), 127.9 (C_q_{Tyr}), 114.7 (CH_{Ar}_{Tyr}), 61.5 (CH₂β_{Ser}), 55.7 (CHα_{Ser}),

54.8 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 53.9 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 49.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$), 48.5 ($\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 37.3 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 31.8 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 29.3 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 28.7 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 24.3 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 22.5 (CH_3_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

15.21 Ac-L-Tyr-(*S,S*)-ACHC-D-Ser-NH-TG/H 111a/b



Synthese auf TentaGel 111a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 111b

Für die Synthese wurden 202 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 42.6 mg (69%).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ 434.49 g/mol

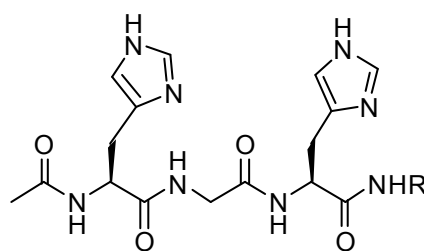
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 25°C): δ (ppm) = 7.89 (dd, $J = 8.6$ Hz, 5.1 Hz, 1H, NH), 7.76 (dd, $J = 12.1$ Hz, 8.6 Hz, 1H, NH), 7.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH), 7.24 (s, 1H, NH), 6.99 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.30 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 4.17 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 3.72 (m, 1H, $\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 3.60 (dd, $J = 10.6$ Hz, 5.1 Hz, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 3.46 (dd, $J = 10.6$ Hz, 5.6 Hz, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 2.71 (m, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 2.51 (m, 1H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 2.29 (m,

^1H , $\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$, 1.81 (m, 2H, $\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 1.72 (s, 3H, CH_3_{Ac}), 1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 1.43 (m, 1H, $\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 1.20 (m, 3H, $\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$);

^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.4/172.8/172.0 (CO), 155.5 ($\text{C}_{\text{Ar-OH}}$), 129.9 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 128.0 (C_{qTyr}), 114.6 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 64.8 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Ser}}$), 55.2 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 54.2 ($\text{CH}\alpha_{\text{Ser}}$), 54.1 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 49.2 ($\text{CH}\alpha_{\text{ACHC}}$), 47.9 ($\text{CH}\beta_{\text{ACHC}}$), 36.8 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 33.2 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 28.7 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 27.4 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 24.3 ($\text{CH}_2_{\text{ACHC}}$), 22.3 (CH_3_{Ac});

ESI-MS m/z : berechnet: 434.49; gefunden: 457.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

15.22 Ac-L-His-Gly-L-His-NH-TG/H 112a/b



112a, R = TG
112b, R = H

Synthese auf TentaGel 112a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 112b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 55.0 mg (quant.).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_4$

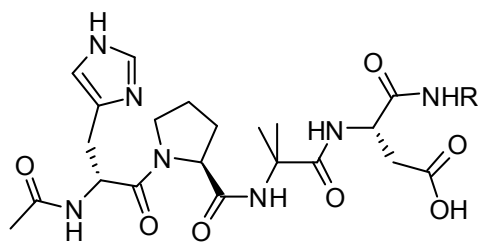
390.40 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.81 (s, 2H, CH_{Imi}), 7.37 (d, J = 10.8 Hz, 2H, CH_{Imi}), 4.72 (dd, J = 8.5 Hz, 4.7 Hz, 1H, CH α _{His}), 4.61 (t, J = 6.9 Hz, 1H, CH α _{His}), 3.89 (q, J = 16.7 Hz, 2H, CH₂_{Gly}), 3.31 (m, 2H, CH₂ β _{His}), 3.14 (dq, J = 15.4 Hz, 8.5 Hz, 2H, CH₂ β _{His}), 1.98 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 174.4/173.8/171.8 (CO), 135.0/134.9 (C_{qImi}), 131.1/131.0 (CH_{Imi}), 118.6/118.5 (CH_{Imi}), 53.9 (CH α _{His}), 53.4 (CH α _{His}), 43.7 (CH₂_{Gly}), 27.9 (CH₂ β _{His}), 27.7 (CH₂ β _{His}), 22.6 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 390.40; gefunden: 391.3 [M+H]⁺.

15.23 Ac-D-His-Pro-Aib-L-Asp-NH-TG/H 113a/b



113a, R = TG

113b, R = H

Synthese auf TentaGel 113a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 113b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 70.0 mg (quant.).

C₂₁H₃₁N₇O₇

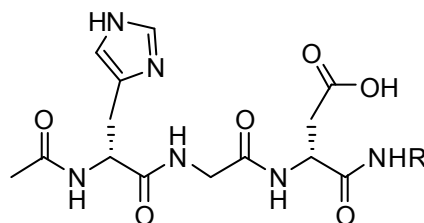
493.51 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.80 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.39 (s, 1H, CH_{Imi}), 4.67 (m, 2H, CH α _{Asp}, CH α _{His}), 4.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H, CH α _{Pro}), 3.72 (m, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.62 (m, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.21 (dd, J = 15.1 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH₂ β _{His}), 3.06 (dd, J = 15.4 Hz, 8.2 Hz, 1H, CH₂ β _{His}), 2.95 (dd, J = 16.7 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH₂ β _{Asp}), 2.81 (dd, J = 16.7 Hz, 7.6 Hz, 1H, CH₂ β _{Asp}), 2.26 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 2.10 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 1.97 (m, 5H, CH₃_{Ac}, CH₂ γ _{Pro}), 1.48 (s, CH₃_{Aib}), 1.45 (s, CH₃_{Aib});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 176.8/175.8/174.7/174.6/173.1/170.9 (CO), 134.9 (CH_{Imi}), 131.1 (C_{qImi}), 118.8 (CH_{Imi}), 62.9 (CH α _{Pro}), 58.2 (CH α _{His}), 57.9 (CH α _{Asp}), 51.9 (C_{qAib}), 36.4 (CH₂ β _{Asp}), 30.6 (CH₂ δ _{Pro}), 27.8 (CH₂ β _{His}), 26.2 (CH₂ β _{Pro}), 25.6 (CH₂ γ _{Pro}), 25.6 (CH₃_{Aib}), 25.4 (CH₃_{Aib}), 22.4 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 493.51; gefunden: 494.2 [M+H]⁺.

15.24 Ac-D-His-Gly-D-Asp-NH-TG/H 114a/b



114a, R = TG

114b, R = H

Synthese auf TentaGel 114a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 114b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 63.7 mg (quant.).

$C_{14}H_{20}N_6O_6$

368.35 g/mol

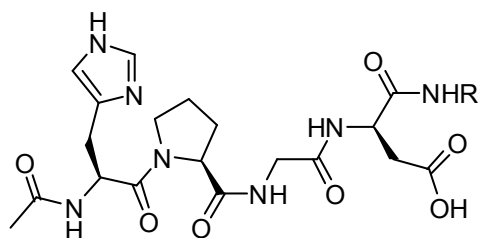
1H -NMR (400.0 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 8.78 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.38 (s, 1H, CH_{Imi}), 4.76 (dd, $J = 7.3$ Hz, 5.6 Hz, 1H, $CH\alpha_{His}$), 4.70 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, $CH\alpha_{Asp}$), 3.92 (s, 2H, CH_2_{Gly}), 3.24 (dd, $J = 16.6$ Hz, 5.8 Hz, 1H, $CH_2\beta_{His}$), 3.15 (dd, $J = 14.9$ Hz, 6.6 Hz, 1H, $CH_2\beta_{His}$), 2.87 (dd, $J = 16.9$ Hz, 5.3 Hz, 2H, $CH_2\beta_{His}$, $CH_2\beta_{Asp}$), 2.76 (dd, $J = 16.9$ Hz, 7.6 Hz, 1H, $CH_2\beta_{Asp}$), 1.98 (s, 3H, CH_3_{Ac});

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3OD , $25^\circ C$): δ (ppm) = 174.0/173.6/172.9/171.8 (CO), 135.1 (CH_{Imi}), 130.8 (C_{qImi}), 118.8 (CH_{Imi}), 53.7 ($CH\alpha_{His}$), 51.2 ($CH\alpha_{Asp}$), 43.6 (CH_2_{Gly}), 36.7 ($CH_2\beta_{Asp}$), 28.0 ($CH_2\beta_{His}$), 22.6 (CH_3_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 368.35; gefunden: 369.1 [$M+H$] $^+$.

15.25 Ac-L-His-Pro-Gly-D-Asp-NH-TG/H 115a/b



115a, R = TG

115b, R = H

Synthese auf TentaGel 115a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid 115b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten und mit Hilfe von Et_2O gefällt und man erhielt 67.2 mg (quant.).

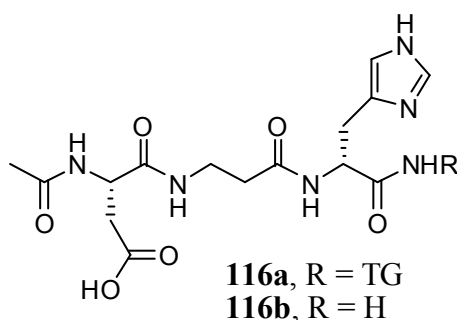
C₁₉H₂₇N₇O₇: 465.46 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.79 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.43 (s, 1H, CH_{Imi}), 4.97 (t, J = 6.8 Hz, 1H, CH α _{His}), 4.80 (dd, J = 8.3 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH α _{Asp}), 4.35 (t, J = 7.1 Hz, 1H, CH α _{Pro}), 4.05 (d, J = 16.6 Hz, 1H, CH₂_{Gly}), 3.83 (m, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.77 (d, J = 16.6 Hz, 1H, CH₂_{Gly}), 3.50 (m, 1H, CH₂ δ _{Pro}), 3.20 (dd, J = 15.1 Hz, 6.8 Hz, 1H, CH₂ β _{His}), 3.07 (dd, J = 15.1 Hz, 6.8 Hz, 1H, CH₂ β _{His}), 2.94 (dd, J = 16.9 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH₂ β _{Asp}), 2.83 (dd, J = 16.7 Hz, 8.3 Hz, 1H, CH₂ β _{Asp}), 2.25 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 2.08 (m, 1H, CH₂ β _{Pro}), 1.97 (m, 5H, CH₃_{Ac}, CH₂ γ _{Pro});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 175.7/174.1/173.1/171.6/170.9 (CO), 135.2 (CH_{Imi}), 130.4 (Cq_{Imi}), 119.1 (CH_{Imi}), 62.4 (CH α _{Pro}), 51.7 (CH α _{His}), 51.1 (CH α _{Asp}), 43.9 (CH₂_{Gly}), 36.7 (CH₂ β _{Asp}), 30.7 (CH₂ δ _{Pro}), 27.6 (CH₂ β _{His}), 26.3 (CH₂ β _{Pro}), 25.0 (CH₂ γ _{Pro}), 22.3 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 465.46; gefunden: 466.2 [M+H]⁺.

15.26 Ac-L-Asp- β -Ala-D-His-NH-TG/H 116a/b



Synthese auf TentaGel 116a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 116b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C**

acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 54.0 mg (quant.).

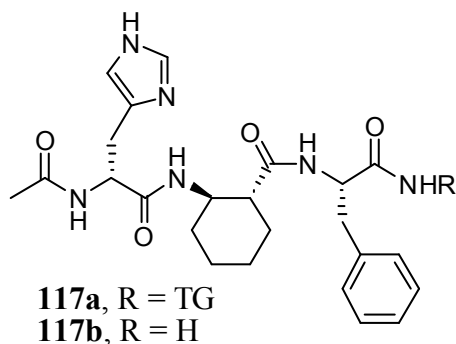
C₁₅H₂₂N₆O₆ 382.37 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.81 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.34 (s, 1H, CH_{Imi}), 4.71 (dd, *J* = 8.1 Hz, 5.8 Hz, 1H, CH_α_{His}), 4.61 (dd, *J* = 7.8 Hz, 6.3 Hz, 1H, CH_α_{Asp}), 3.44 (m, 2H, CH₂_{β-Ala}), 3.28 (dd, *J* = 15.4 Hz, 5.6 Hz, 2H, CH₂β_{Asp}), 3.07 (dd, *J* = 15.4 Hz, 8.1 Hz, 2H, CH₂β_{Asp}), 2.80 (dd, *J* = 16.6 Hz, 5.6 Hz, 2H, CH₂β_{His}), 2.68 (dd, *J* = 16.9 Hz, 7.8 Hz, 2H, CH₂β_{His}), 2.41 (dt, *J* = 6.8 Hz, 2.2 Hz, 2H, CH₂_{β-Ala}), 1.99 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 174.0/173.9/173.5/173.3 (CO), 134.9 (C_q_{Imi}), 131.4 (CH_{Imi}), 118.5 (CH_{Imi}), 53.2 (CH_α_{His}), 51.6 (CH_α_{Asp}), 36.9 (CH₂_{β-Ala}), 36.5 (CH₂_{β-Ala}), 28.0 (CH₂β_{Ser}), 22.6 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 382.37; gefunden: 383.2 [M+H]⁺.

15.27 Ac-D-His-*rac*-ACHC-L-Phe-NH-TG/H 117a/b



Synthese auf TentaGel 117a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 117b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 50.4 mg (76%) eines Diastereomeren Gemisches.



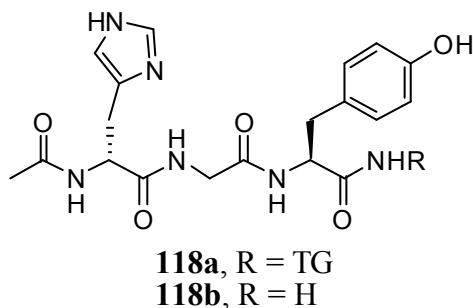
468.55 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.75 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.21 (m, 7H, CH_{Imi}, ArH_{Phe}), 4.63 (m, 2H, CH α _{His}) 4.52 (m, 2H, CH α _{Phe}), 3.97 (dt, J = 11.1 Hz, 3.8 Hz, 1H, CH β _{ACHC}), 3.83 (dt, J = 11.6 Hz, 3.8 Hz, 1H, CH β _{ACHC}), 3.19 (m, 4H, CH₂ β _{His}), 2.96 (m, 3H, CH₂ β _{Tyr}), 2.70 (dd, J = 15.4 Hz, 6.3 Hz, 1H, CH₂ β _{Tyr}), 2.26 (m, 2H, CH α _{ACHC}), 1.99 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.95 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.87 (m, 2H, CH₂_{ACHC}), 1.77 (m, 5H, CH₂_{ACHC}), 1.58 (m, 1H, CH₂_{ACHC}), 1.30 (m, 8H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 171.0 (CO), 138.8 (C_{qPhe}), 138.3 (C_{qPhe}), 134.8 (C_{qImi}), 130.3 (CH_{Imi}), 129.5 (CH_{Ar Phe}), 127.9 (CH_{Ar Phe}), 123.4 (CH_{Ar Phe}), 118.8 (CH_{Imi}), 55.2 (CH α _{Phe}), 55.0 (CH α _{Phe}), 53.1 (CH α _{His}), 52.9 (CH α _{His}), 50.9 (CH α _{ACHC}), 50.5 (CH β _{ACHC}), 38.9 (CH₂ β _{Phe}), 38.3 (CH₂ β _{Phe}), 33.5 (CH₂_{ACHC}), 33.1 (CH₂_{ACHC}), 31.2 (CH₂_{ACHC}), 30.5 (CH₂_{ACHC}), 28.7 (CH₂ β _{His}), 28.2 (CH₂ β _{His}), 26.0 (CH₂_{ACHC}), 25.9 (CH₂_{ACHC}), 22.8 (CH₃_{Ac}), 22.5 (CH₃_{Ac});

ESI-MSm/z: berechnet: 468.55; gefunden: 469.3 [M+H]⁺.

15.28 Ac-D-His-Gly-L-Tyr-NH-TG/H 118a/b



Synthese auf TentaGel 118a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 118b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 63.7 mg (quant.).

C₁₉**H**₂₄**N**₆**O**₅ 416.43 g/mol

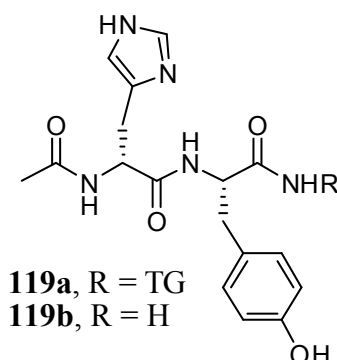
¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.78 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.36 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH_α_{His}), 4.53 (dd, *J* = 9.6 Hz, 5.1 Hz, 1H, CH_α_{Tyr}), 3.90 (d, *J* = 16.6 Hz, 2H, CH₂_{Gly}), 3.74 (d, *J* = 16.6 Hz, 2H, CH₂_{Gly}), 3.24 (dd, *J* = 14.9 Hz, 6.1 Hz, 1H, CH₂β_{His}), 3.11 (dd, *J* = 15.4 Hz, 6.6 Hz, 2H, CH₂β_{His}, CH₂β_{Tyr}), 2.81 (dd, *J* = 14.2 Hz, 9.6 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 1.98 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 178.3/173.5/171.9 (CO), 153.9 (CH_{Ar}-OH), 135.0 (CH_{Imi}), 131.3 (C_{qImi}), 131.0 (C_{qTyr}), 130.8 (CH_{Ar}_{Tyr}), 118.8 (CH_{Imi}), 116.3 (CH_{Ar}_{Tyr}), 56.4 (CH_α_{Tyr}), 53.7 (CH_α_{His}), 45.6 (CH₂_{Gly}), 38.7 (CH₂β_{Tyr}), 28.0 (CH₂β_{His}), 22.6 (CH₃_{Ac});

ESI-MS

m/z: berechnet: 416.43; gefunden: 417.2 [M+H]⁺.

15.29 Ac-D-His-L-Tyr-NH-TG/H 119a/b

**Synthese auf TentaGel 119a**

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 119b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 50.0 mg (quant.).

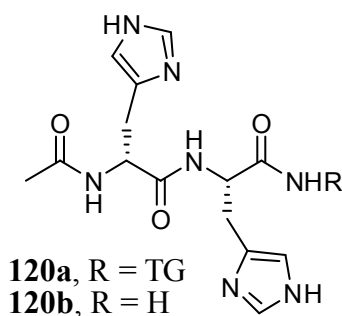
C₁₇H₂₁N₅O₄ 359.35 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.71 (s, 1H, CH_{Imi}), 7.05 (d, J = 8.6 Hz, 3H, ArH_{Tyr}, CH_{Imi}), 6.68 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.60 (t, J = 6.3 Hz, 1H, CH_α_{His}), 4.54 (dd, J = 9.6 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH_α_{Tyr}), 3.10 (m, 2H, CH_{2β}_{His}), 2.89 (dd, J = 15.6 Hz, 7.3 Hz, 2H, CH_{2β}_{Tyr}), 2.76 (dd, J = 14.1 Hz, 9.8 Hz, 2H, CH_{2β}_{Tyr}), 1.94 (s, 3H, CH₃_{Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 173.5/171.9 (CO), 157.4 (CH_{Ar}-OH), 134.8 (CH_{Imi}), 131.3 (Cq_{Imi}), 129.3 (Cq_{Tyr}), 128.3 (CH_{Ar}_{Tyr}), 118.3 (CH_{Imi}), 116.3 (CH_{Ar}_{Tyr}), 56.0 (CH_α_{Tyr}), 53.7 (CH_α_{His}), 38.7 (CH_{2β}_{Tyr}), 28.1 (CH_{2β}_{His}), 22.5 (CH₃_{Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 359.35; gefunden: 360.2 [M+H]⁺.

15.30 Ac-D-His-L-His-NH-TG/H 120a/b



Synthese auf TentaGel 120a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 120b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 50.0 mg (quant.).

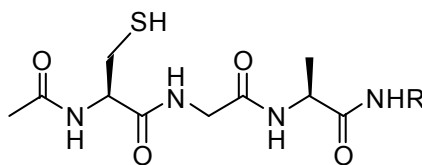
C₁₄H₁₉N₇O₃ 333.35 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 8.80 (s, 2H, CH_{Imi}), 7.34 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH_{Imi}), 4.70 (dd, *J* = 8.8 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH_{α His}), 4.59 (dd, *J* = 8.5 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH_{α His}), 3.25 (m, 2H, CH_{2β His}), 3.10 (dq, *J* = 8.8 Hz, 6.3 Hz, 2H, CH_{2β His}), 1.96 (s, 3H, CH_{3 Ac});

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 25°C): δ (ppm) = 174.4/173.9/172.5 (CO), 135.1/135.0 (C_{qImi}), 131.3/131.2 (CH_{Imi}), 118.4/118.3 (CH_{Imi}), 54.0 (CH_{α His}), 53.4 (CH_{α His}), 27.9 (CH_{2β His}), 27.5 (CH_{2β His}), 22.5 (CH_{3 Ac});

ESI-MS m/z: berechnet: 333.35; gefunden: 334.2 [M+H]⁺.

15.31 Ac-L-Cys-Gly-L-Ala-NH-TG/H 121a/b



121a, R = TG

121b, R = H

Synthese auf TentaGel 121a

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 121b

Das Peptid wurde mit Hilfe des Peptidsynthesizers hergestellt und dabei wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet. Die freien Amine wurden nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 40.0 mg (quant.).

C₁₀H₁₈N₄O₄S

290.34 g/mol

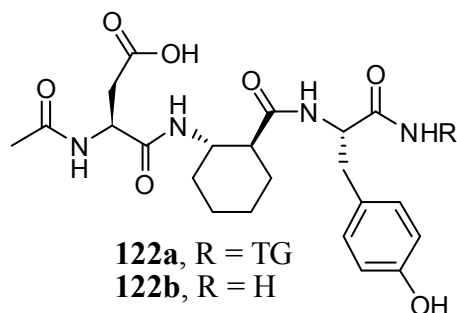
¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 4.32 (dd, *J* = 7.3 Hz, 5.6 Hz, 1H, CHα_{Cys}), 4.17 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CHα_{Ala}), 3.71 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂_{Gly}), 2.77 (dd, *J* = 13.6 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH₂β_{Cys}), 2.66 (dd, *J* = 13.6 Hz, 7.6 Hz, 1H, CH₂β_{Cys}), 1.88 (s, 3H, CH₃_{Ac}), 1.20 (2s, 3H, CH₃_{Ala});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 174.0/170.3/169.7/168.1 (CO), 55.2 (CHα_{Cys}), 47.7 (CHα_{Ala}), 41.9 (CH₂_{Gly}), 25.7 (CH₂β_{Cys}), 22.4 (CH₃_{Ac}), 18.1 (CH₃_{Ala});

ESI-MS

m/z: berechnet: 290.34; gefunden: 313.3 [M+Na]⁺.

15.32 Ac-L-Asp-*rac*-ACHC-L-Tyr-NH-TG/H 122a/b



Synthese auf TentaGel 122a

Für die Synthese wurden 200 mg TentaGel Harz (0.09 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt, die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen nach **Prozedur D** entschützt.

Synthese auf Rink Amid Harz 122b

Für die Synthese wurden 200 mg Rink Amid Harz (0.14 mmol, 1.0 eq) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert. Anschließend wurde das Peptid laut **Prozedur E** abgespalten, mit Hilfe von Et₂O gefällt und man erhielt 47.3 mg (76%) eines Diastereomeren Gemisches.

C₂₂H₃₀N₄O₇

462.50 g/mol

¹H-NMR (400.0 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 6.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.50 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CHα_{Tyr}), 4.44 (dd, *J* = 9.5 Hz, 3.8 Hz, 1H, CHα_{Tyr}), 4.32 (dd, *J* = 8.5 Hz, 4.7 Hz, 1H, CHα_{Asp}), 4.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CHα_{Asp}), 3.72 (dt, *J* = 11.0 Hz, 3.8 Hz, 1H, CHβ_{ACHC}), 3.55 (dt, *J* = 11.0 Hz, 3.8 Hz, 1H, CHβ_{ACHC}), 2.92 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.7 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.77 (dd, *J* = 13.2 Hz, 7.6 Hz, 1H, CH₂β_{Tyr}), 2.64 (m, 4H, CH₂β_{Tyr}, CH₂β_{Asp}), 2.36 (m, 2H, CH₂β_{Asp}), 2.20 (m, 2H, CHα_{ACHC}), 1.75 (brs, 7H, CH₂_{ACHC}, CH₃_{Ac}), 1.55 (m, 6H, CH₂_{ACHC}), 1.37 (m, 1H, CH₂_{ACHC}), 1.13 (m, 8H, CH₂_{ACHC});

¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 172.6/172.5/171.6/171.5/169.6/169.0 (CO), 155.5 (C_{Ar}-OH), 130.0 (CH_{Ar}_{Tyr}), 129.9 (CH_{Ar}_{Tyr}), 128.0 (C_q_{Tyr}), 127.9 (C_q_{Tyr}), 114.8 (CH_{Ar}_{Tyr}), 114.6 (CH_{Ar}_{Tyr}), 54.1 (CHα_{Tyr}), 54.0 (CHα_{Tyr}), 53.5 (CHα_{Asp}), 53.4 (CHα_{Asp}), 49.4 (CHα_{ACHC}), 48.9 (CHβ_{ACHC}), 36.9 (CH₂β_{Tyr}), 36.7 (CH₂β_{Tyr}), 36.6 (CH₂β_{Asp}), 36.3

(CH₂β_{Asp}), 32.1 (CH₂_{ACHC}), 32.0 (CH₂_{ACHC}), 28.9 (CH₂_{ACHC}), 28.6 (CH₂_{ACHC}), 24.4 (CH₂_{ACHC}), 24.3 (CH₂_{ACHC}), 24.3 (CH₂_{ACHC}), 24.2 (CH₂_{ACHC}), 22.4 (CH₃_{Ac}), 22.3 (CH₃_{Ac});

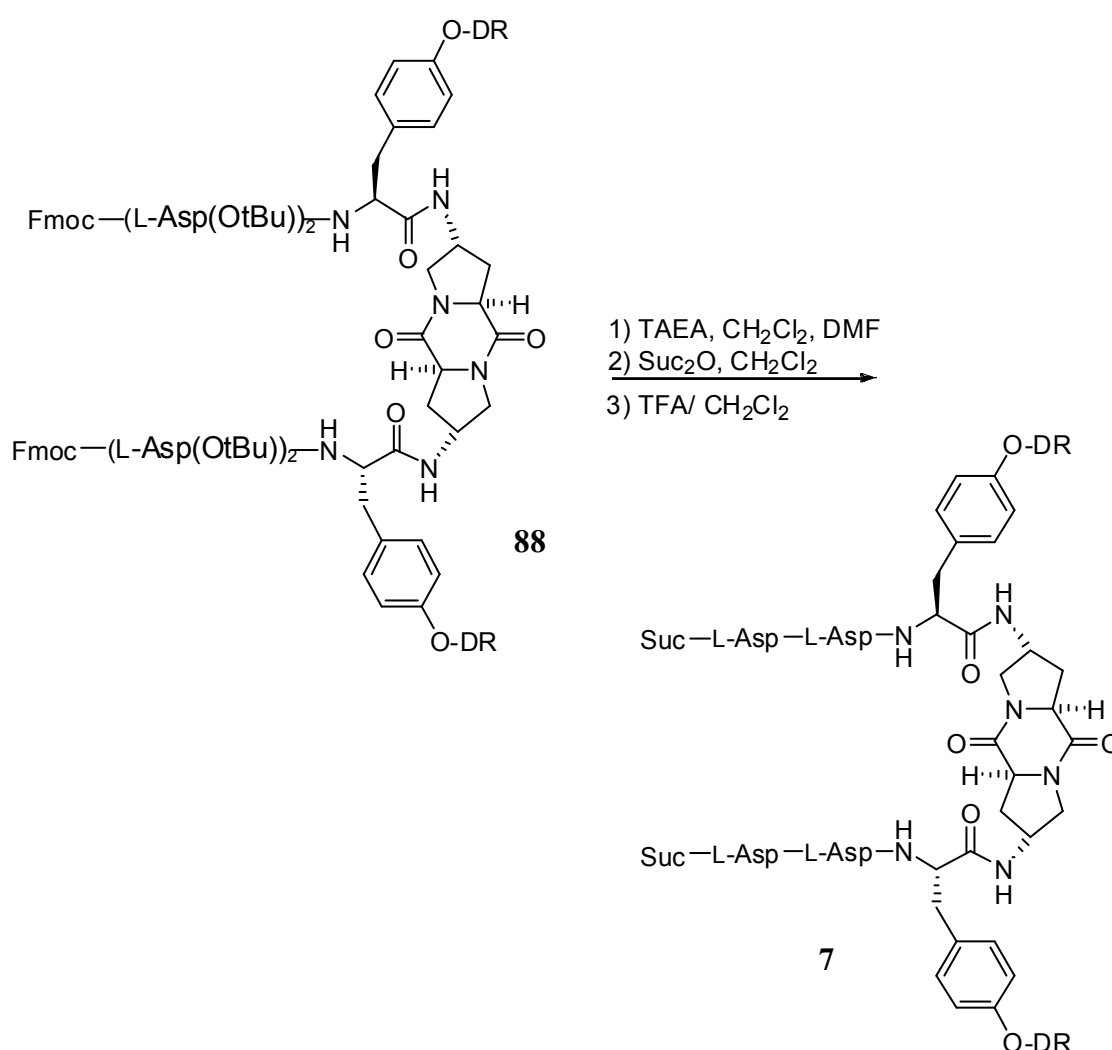
ESI-MS

m/z: berechnet: 462.50; gefunden: 575.7 [M+TFA]⁻.

16. Rezeptoren zur Untersuchung des Einflusses von hydrophoben Bausteinen

16.1 Synthese des Rezeptors 7

16.1.1 Kupplung von Bernsteinsäure-anhydrid



100.00 mg (0.04 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors **88** wurden in 5 mL einer Mischung aus 5:2 CH₂Cl₂/DMF (v/v) gelöst und mit 0.21 mL (1.44 mmol, 30 eq) TAEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 96.00 mg (0.96 mmol, 20.0 eq) Bernsteinsäure-Anhydrid versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die

Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 96:4 (v/v)) mit 0.5% AcOH), alle Fraktionen mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) extrahiert und man erhielt 27.50 mg (0.01 mmol, 27%) des Bernsteinsäure-funktionalisierten Rezeptors.

C₁₀₀H₁₂₆N₁₈O₂₈

2026.27 g/mol

DCCH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.60**MALDI-ToF***m/z*: berechnet: 2026.27; gefunden: 2027.0 [M]⁺.

16.1.2 Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen

27.50 mg (0.01 mmol, 1.0 eq) des Bernsteinsäure-funktionalisierten Rezeptors wurden in 6 mL einer 1:2 Mischung aus CH₂Cl₂/ TFA (v/v) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mit Et₂O gewaschen. Man erhielt 25.80 mg (0.01 mmol, quant.) des gewünschten Suc-Rezeptors 7.

C₈₄H₉₄N₁₈O₂₈

1802.65 g/mol

DCCH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.14

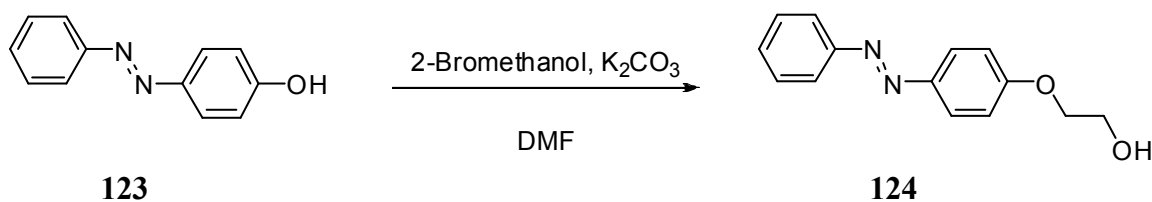
¹H NMR (500.1 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 8.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{DR}), 8.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H; NH_{Asp}), 8.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H; NH_{Asp}), 8.06 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H; NH_{Pro}), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{DR}), 7.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{DR}), 7.67 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H; NH_{Tyr}), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{DR}), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.54 (ψd, *J* = 6.0 Hz, 2H, CHα_{Asp}), 4.46 (ψd, *J* = 6.3 Hz, 2H, CHα_{Asp}), 4.30 (m, 4H, CHα_{Tyr}, CHα_{Pro}), 4.14 (s, 6H, NCH₂CH₂O, CHγ_{Pro}), 3.84 (s, 4H, NCH₂CH₂O), 3.60 (m, 4H, CHδ_{Pro}), 3.49 (m, 4H, NCH₂CH₃), 3.17 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, CHδ'_{Pro}), 2.88 (m, 2H, CH₂β_{Tyr}), 2.77 (m, 2H, CH₂β'_{Tyr}), 2.66 (dt, *J* = 11.7 Hz, 5.1 Hz, 4H, CH₂β_{Asp}), 2.40 (m, 8H, COCH₂CH₂CO, CH₂β'_{Asp}, CH₂β'_{Asp}), 2.36 (m, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.14 (m, 2H, CH₂β_{Pro}), 1.86 (m, 2H, CH₂β'_{Pro}), 1.18 (m, 6H, NCH₂CH₃);

^{13}C NMR (125.8 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.8/171.8/171.5/170.9/170.2/169.9/169.4/167.1/166.8 (CO), 156.8 ($\text{CH}_{\text{Ar-OH}}$), 156.2/151.6/146.7/142.7 ($\text{C}_{\text{Ar DR}}$), 130.2 ($\text{C}_{\text{Ar Tyr}}$), 130.1 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 126.1 ($\text{CH}_{\text{Ar DR}}$), 124.9 ($\text{CH}_{\text{Ar DR}}$), 122.4 ($\text{CH}_{\text{Ar DR}}$), 113.9 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 111.6 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 65.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 58.0 ($\text{CH}\alpha_{\text{Pro}}$), 54.2 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 50.3 ($\text{CH}\delta_{\text{Pro}}$), 49.6/49.5 ($\text{CH}\alpha_{\text{Asp}}$), 49.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 47.5 ($\text{CH}\gamma_{\text{Pro}}$), 46.7 (NCH_2CH_3), 37.3 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 35.9/35.4 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Asp}}$), 33.0 ($\text{CH}\beta_{\text{Pro}}$), 29.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 28.9 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 12.0 (NCH_2CH_3);

MALDI-ToF m/z : berechnet: 1802.65; gefunden: 1803.0 $[\text{M}]^+$, 1827.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

16.2 Synthese des Rezeptors 8

16.2.1 Synthese des Azo Derivates 124



5.00 g (25.22 mmol, 1.0 eq) 4-Phenylazophenol wurden in 25 mL DMF gelöst und mit 3.22 mL (45.84 mmol, 1.8 eq) 2-Bromethanol und 10.43 g (97.68 mmol, 3.8 eq) K_2CO_3 versetzt. Die Mischung wurde 16 h bei 80°C gerührt und anschließend mit 120 mL einer 0.5 M NaOH Lösung versetzt und mit Et_2O (3 x 150 mL) extrahiert. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (Et_2O) und man erhielt 2.30 g (9.49 mmol, 38%) von Verbindung **124**.

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ 242.11 g/mol

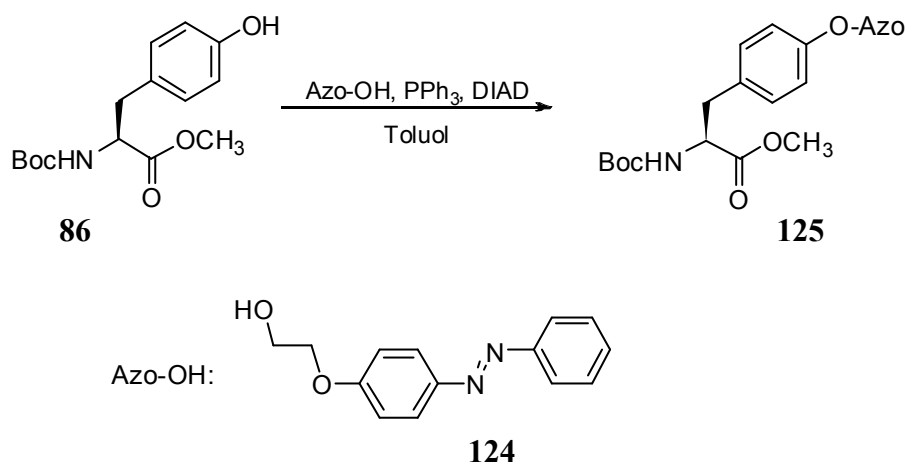
DC Et_2O ; R_f : 0.71

^1H -NMR (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.88 (d, J = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 6.8 Hz, 1H, ArH), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ArH), 4.17 (m, 2H, CH_2), 4.01 (m, 2H, CH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta(\text{ppm}) = 161.1/152.7/147.2$ (Cq_{Ar}), $130.4/129.0/124.8/122.6/114.8$ (CH_{Ar}), 65.4 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 61.5 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$);

MALDI-ToF m/z : berechnet: 242.11; gefunden: 243.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

16.2.2 *N*-Boc-L-Tyr(Azo)-OCH₃ **125**



2.69 g (9.04 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr-OCH₃, 2.19 g (9.04 mmol, 1.0 eq) Azo-OH und 2.37 g (33.97 mmol, 1.0 eq) PPh₃ wurden in 100 mL Toluol gelöst und mit 2.27 mL (11.76 mmol, 1.3 eq) DIAD versetzt. Die Mischung wurde 20 h bei RT gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (Et_2O) und man erhielt 4.31 g (8.30 mmol, 91%) von Verbindung **125** als orangen Feststoff.

$\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$ 519.24 g/mol

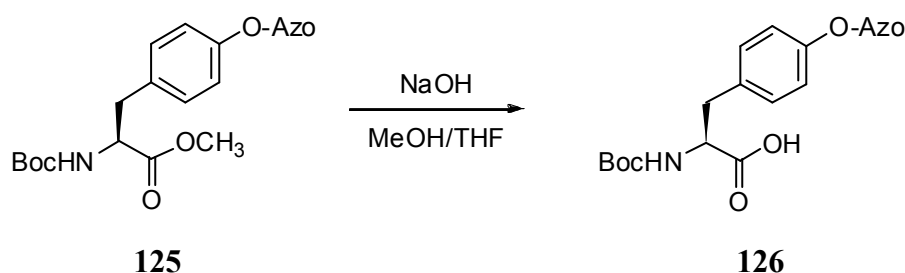
DC Et_2O ; R_f : 0.82

$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta(\text{ppm}) = 7.92$ (m, 2H, ArH_{Azo}), 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH_{Azo}), 7.50 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, ArH_{Azo}), 7.43 (m, 1H, ArH_{Azo}), 7.06 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, ArH_{Azo}), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.75 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 4.53 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH_α), 4.40 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) 4.33 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.01 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$), 1.41 (s, 9H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 172.3 (CO_2CH_3), 161.0 (CO_{Boc}), 159.3/156.3/155.1/152.7/147.2 (C_{qAr}), 130.4/130.3/129.0/124.7/122.6/114.8/114.7 (CH_{Ar}), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.7 (O- CH_2 - CH_2 -OH), 66.4 (O- CH_2 - CH_2 -OH), 54.5 ($\text{CH}\alpha$), 52.2 (CO_2CH_3), 37.5 ($\text{CH}_2\beta$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

ESI-MS m/z : berechnet: 519.24; gefunden: 542.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

16.2.3 *N*-Boc-L-Tyr(Azo)-OH **126**



4.31 g (8.30 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr(azo)-Methylester **125** wurden in 40 mL einer 1:1 Mischung aus THF/ MeOH (v/v) gelöst, mit 0.90 g (22.50 mmol, 2.7 eq) NaOH gelöst in 4 mL H_2O versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit 1 M HCl auf pH 3.0 angesäuert und mit CH_2Cl_2 (3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. V. erhielt man 3.55 g (7.02 mmol, 85%) eines orangen Feststoffes.

$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_6$ 505.56 g/mol

DC Et_2O ; R_f : 0.42

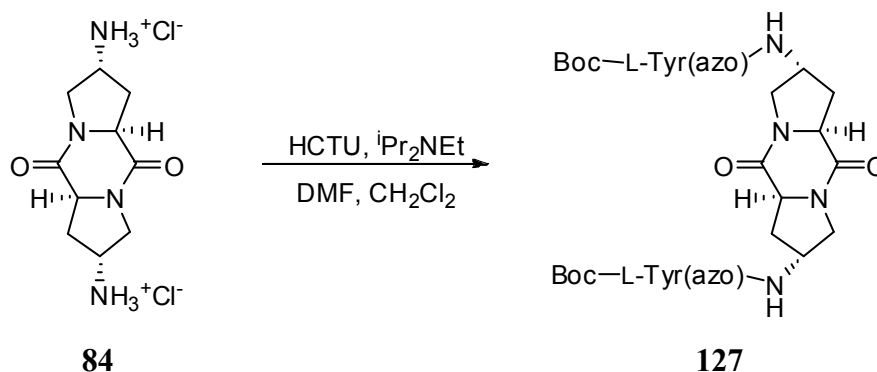
$^1\text{H-NMR}$ (400.0 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 7.91 (m, 2H, ArH_{Azo}), 7.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH_{Azo}), 7.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, ArH_{Azo}), 7.42 (tt, $J = 7.6$ Hz, 2.4 Hz, 1H, ArH_{Azo}), 7.04 (dt, $J = 8.8$ Hz, 2.4 Hz, 2H, ArH_{Azo}), 6.99 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH_{Tyr}), 5.04 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$), 4.38 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, O- CH_2 - CH_2 -OH) 4.31 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, O- CH_2 - CH_2 -OH), 3.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$), 1.40 (s, 9H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 175.6 (CO_2H), 161.0 (CO_{Boc}), 157.6/155.6/152.7/147.2 (C_{qAr}), 130.5/130.4/129.0/124.7/122.6/114.8/114.7 (CH_{Ar}), 80.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.7 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 66.3 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 54.5 ($\text{CH}\alpha$), 37.5 ($\text{CH}_2\beta$), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

ESI-MS

 m/z : berechnet: 505.56; gefunden: 504.4 $[\text{M-H}]^+$.

16.2.4 Synthese des Templates 127



0.20 g (0.89 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **84** wurden in 2 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit einer Lösung aus 1.80 g (3.37 mmol, 4.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr(azo)-OH in 9 mL CH_2Cl_2 , 1.54 g (3.37 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF und 0.61 mL (3.37 mmol, 4.0 eq) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt und 1 h gerührt. Die Mischung wurde mit 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 5.5) (3 x 100 mL) gewaschen und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 0.5 M NaOH extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 99.5:0.5 bis 97:3 (v/v)) und man erhielt 0.34 g (0.37 mmol, 42 %) eines orangen Feststoffes.

 $\text{C}_{66}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$

1199.35 g/mol

DC

 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1); R_f : 0.45

$^1\text{H-NMR}$ (500.1 MHz, $d_6\text{-DMSO}$, 25°C): δ (ppm) = 8.26 (s, 2H, NH_{Pro}), 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.57 (m, 4H, ArH_{Azo}), 7.52 (m, 4H, ArH_{Azo}), 7.18 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.84 (m, 2H, NH_{Tyr}), 4.41 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}_{\text{Azo}}$), 4.31 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$);

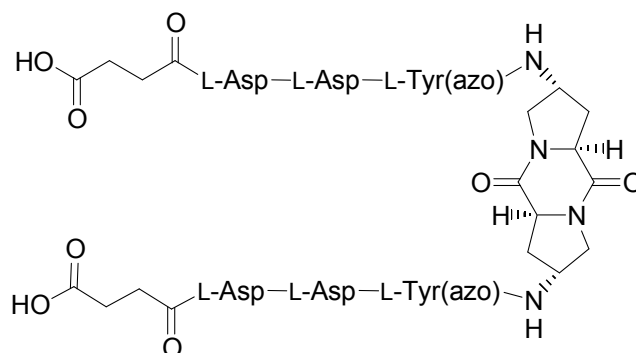
$_{\text{Azo}}$), 4.30 (m, 2H, $\text{CH}\alpha$), 4.21 (m, 2H, $\text{CH}\gamma$), 4.06 (dd, $J = 14.2, 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 3.64 (dd, $J = 11.3, 5.4$ Hz, 2H, $\text{CH}\delta_{\text{Pro}}$), 3.22 (m, 2H, $\text{CH}\delta'_{\text{Pro}}$), 2.83 (dd, $J = 13.2, 5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Tyr}}$), 2.73 (m, 2H, $\text{CH}\beta'_{\text{Tyr}}$), 2.13 (m, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Pro}}$), 1.93 (m, 2H, $\text{CH}\beta'_{\text{Pro}}$), 1.31 (s, 18H, ^tBu);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 25°C): δ (ppm) = 171.5 (CO), 165.7 ($\text{C}\epsilon_{\text{Pro}}$), 161.1 ($\text{Cq}_{\text{Ar Azo}}$), 156.9 ($\text{Cq}_{\text{Ar Tyr}}$), 152.0/146.3 ($\text{Cq}_{\text{Ar Azo}}$), 130.9 ($\text{CH}_{\text{Ar Azo}}$), 130.3 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 130.1 ($\text{Cq}_{\text{Ar Tyr}}$), 129.4/124.6/122.3/115.2 ($\text{CH}_{\text{Ar Azo}}$), 114.1 ($\text{CH}_{\text{Ar Tyr}}$), 77.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.9 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-_{\text{Azo}}$), 66.1 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-_{\text{Azo}}$), 58.2 ($\text{CH}\alpha_{\text{Pro}}$), 55.8 ($\text{CH}\alpha_{\text{Tyr}}$), 50.5 ($\text{CH}_2\delta_{\text{Pro}}$), 46.9 ($\text{CH}\gamma_{\text{Pro}}$), 36.9 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Tyr}}$), 33.3 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Pro}}$), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

ESI-MS

m/z : berechnet: 1199.35; gefunden: 1221.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

16.2.5 Kupplungen der Rezeptorarme



16.2.5.1 Erste Kupplung

300 mg (0.25 mmol, 1.0 eq) von Verbindung **159** wurden in 8 mL MeOH gelöst und mit 15.3 mL 4 M HCl in Dioxan versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend wurden alle Reagenzien i. V. entfernt. Der Rückstand wurde mit Et_2O gefällt, mit Et_2O gewaschen und man erhielt das HCl-Salz von **159** als orangen Feststoff. Das Salz wurde in 5 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst, mit 1.22 g (2.96 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 1.22 g (1.63 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH in 5 mL CH_2Cl_2 und 0.26 mL (1.48 mmol, 2.0 eq) $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Naphosphat-Puffer (pH 5.5) und CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden

mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 96:4 (v/v)) und man erhielt 337.3 mg (0.19 mmol, 76%) von der Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₁₀₂H₁₀₄N₁₂O₁₈ 1785.99 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.44

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 1785.99; gefunden: 1787.0 [M+H]⁺,
1787.0 [M+Na]⁺

16.2.5.2 Zweite Kupplung

337.30 mg (0.19 mmol, 1.0 eq) der Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung wurden in 10 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.40 mL (9.45 mmol, 50 eq) TAEA versetzt. Die Mischung wurde 1.5 h bei RT gerührt und anschließend mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH₂Cl₂ extrahiert und die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Alle wässrigen Phasen wurden erneut mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden erneut vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 312.70 mg (0.76 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 311.00 mg (0.76 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu) in 5 mL CH₂Cl₂ und 0.13 mL (0.76 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 97:3 (v/v)) und man erhielt 496.50 mg (0.19 mmol, quant.) der zweifach Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₁₁₈H₁₃₀N₁₄O₂₄ 2128.37 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.60

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 2128.37; gefunden: 2297.0 [M+2H+Na]⁺.

16.2.5.3 Dritte Kupplung

496.50 mg (0.19 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 10 mL einer Mischung aus CH_2Cl_2 gelöst und mit 1.40 mL (9.45 mmol, 50.0 eq) TAEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) (2 x 100 mL) und CH_2Cl_2 extrahiert, die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst, mit 378.30 mg (3.78 mmol, 20.0 eq) Bernsteinsäure-Anhydrid versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 99.5:0.5 bis 94:6 (v/v) mit 1% AcOH), alle Fraktionen mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) extrahiert und man erhielt 285.10 mg (0.15 mmol, 85%) die mit Bernsteinsäure funktionalisierte Verbindung.

$\text{C}_{96}\text{H}_{118}\text{N}_{14}\text{O}_{26}$ 1882.83 g/mol

DC $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1); R_f : 0.51

MALDI-ToF m/z : berechnet: 1882.83; gefunden: 1883.34 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

16.2.5.4 Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen

285.10 mg (0.15 mmol, 1.0eq) der Bernsteinsäure-Verbindung wurden in 20 mL einer 1:1 Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (v/v) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mit Et_2O gewaschen. Man erhielt 242.40 mg (0.14 mmol, 96%) des gewünschten Suc-Rezeptors **8**.

$\text{C}_{80}\text{H}_{86}\text{N}_{14}\text{O}_{26}$ 1658.58 g/mol

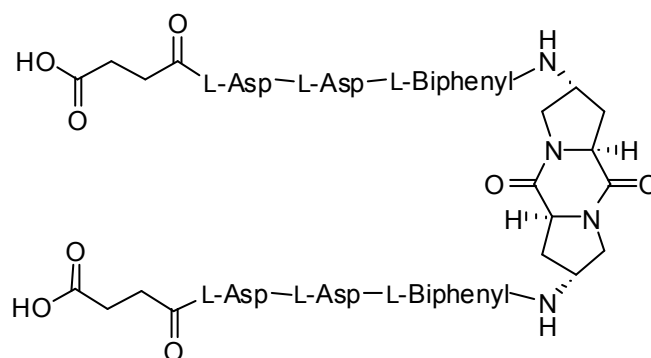
$^1\text{H-NMR}$ (500.1 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 12.3 (brs, 6H, CO_2H), 8.27 (m, 2H, NH_{Asp}), 8.18 (m, 2H, NH_{Asp}), 8.06 (s, 2H, NH_{Pro}), 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.69 (m, 2H, NH_{Tyr}), 7.57 (m, 4H, ArH_{Azo}), 7.52 (m, 4H, ArH_{Azo}),

7.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, ArH_{Azo}), 7.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.55 (dd, $J = 13.2$ Hz, 7.3 Hz, 2H, $CH\alpha_{Asp}$), 4.48 (dd, $J = 13.6$ Hz, 6.9 Hz, 2H, $CH\alpha_{Asp}$), 4.42 (m, 4H, O- $CH_2-CH_2-O_{Azo}$), 4.32 (m, 8H, O- $CH_2-CH_2-O_{Azo}$, $CH\alpha$, $CH\alpha_{Tyr}$), 4.18 (m, 2H, $CH\gamma_{Pro}$), 3.66 (m, 2H, $CH\delta_{Pro}$), 3.19 (m, 2H, $CH\delta'_{Pro}$), 2.91 (m, 2H, $CH\beta_{Tyr}$), 2.79 (m, 2H, $CH\beta'_{Tyr}$), 2.67 (m, 4H, $CH\beta_{Asp}$, $CH\beta'_{Asp}$), 2.47-2.37 (m, 12H, $CH\beta'_{Asp}$, $CH\beta'_{Asp}$, CO- $CH_2-CH_2-CO_{Suc}$), 2.17 (m, 2H, $CH\beta_{Pro}$), 1.91 (m, 2H, $CH\beta'_{Pro}$);

^{13}C -NMR (125.8 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.9/171.9/171.6/171.1/170.3/170.0 (CO), 165.8 (C ϵ), 161.1 (C $q_{Ar_{Azo}}$), 156.9 (C $q_{Ar_{Tyr}}$), 152.0/146.3 (C $q_{Ar_{Azo}}$), 130.9 (CH $_{Ar_{Azo}}$), 130.3 (CH $_{Ar_{Tyr}}$), 129.7 (C $q_{Ar_{Tyr}}$), 129.4/124.6/122.3/115.2 (CH $_{Ar_{Azo}}$), 114.1 (CH $_{Ar_{Tyr}}$), 66.9 (-O- $CH_2-CH_2-O_{Azo}$), 66.1 (-O- $CH_2-CH_2-O_{Azo}$), 57.8 (CH α_{Pro}), 54.3 (CH α_{Tyr}), 50.5 (CH $_{2\delta_{Pro}}$), 49.7 (CH α_{Asp}), 49.6 (CH α_{Asp}), 46.9 (CH γ_{Pro}), 36.0 (CH $_{2\beta_{Tyr}}$), 35.3 (CH $_{2\beta_{Asp}}$, CH $_{2\beta_{Asp}}$), 33.1 (CH $_{2\beta_{Pro}}$), 29.9 (-CO- $CH_2-CH_2-CO_{Suc}$), 29.1 (-CO- $CH_2-CH_2-CO_{Suc}$);

MALDI-ToF m/z : berechnet: 1658.58; gefunden: 1660.0 [M+H] $^+$, 1657.2 [M-H] $^+$, 1682.5 [M+Na] $^+$.

16.3 Synthese des Rezeptors 9



16.3.1 Erste Kupplung

160.00 mg (0.54 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **84** wurden in 5 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit einer Lösung aus 1.00 g (2.16 mmol, 4.0 eq) Fmoc-Bip-OH in 2 mL CH_2Cl_2 , 0.89 g (2.16 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF und 0.37 mL (2.16 mmol, 4.0 eq) iPr_2NEt versetzt und 1 h gerührt. Die Mischung wurde mit 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH_2Cl_2 (3 x 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über

Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, danach wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 94:6 (v/v)) und man erhielt nach präparativer DC (CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) 0.37 g (0.32 mmol, 59%) der Bip-funktionalisierten Verbindung.

C₇₀H₆₂N₆O₈ 1114.28 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.48

ESI-MS: *m/z*: berechnet: 1114.28; gefunden: 1137.0 [M+Na]⁺.

16.3.2 Zweite Kupplung

315.50 mg (0.29 mmol, 1.0 eq) der Bip-funktionalisierten Verbindung wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 0.88 mL (8.47 mmol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 468.1 mg (1.13 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 465.6 mg (1.13 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu) in 5 mL CH₂Cl₂ und 0.19 mL (1.13 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Reinigung über Kieselgel (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 95:5 (v/v)) und Gelfiltration (LH 20, CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) erhielt man 278.20 mg (0.19 mmol, 67%) Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₈₆H₈₈N₈O₁₄ 1457.0 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.36

ESI-MS *m/z*: berechnet: 1457.0; gefunden: 1480.0 [M+Na]⁺.

16.3.3 Dritte Kupplung

287.20 mg (0.19 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 0.59 mL (5.73 mmol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 316.0 mg (0.76 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 314.0 mg (0.76 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu) in 5 mL CH₂Cl₂ und 0.13 mL (0.76 mmol, 4.0 eq) ¹Pr₂NEt versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Reinigung über Kieselgel (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 95:5 (v/v)) und präparativer DC (CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) erhielt man 287.90 mg (0.16 mmol, 84%) der zweifach Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₁₀₂H₁₁₄N₁₀O₂₀ 1800.05 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.50

ESI-MS *m/z*: berechnet: 1800.05; gefunden: 1822.8 [M+Na]⁺.

16.3.4 Vierte Kupplung

287.90 mg (0.16 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 0.50 mL (4.80 mmol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 7 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 320.00 mg (3.20 mmol, 20.0 eq) Bernsteinsäure-Anhydrid versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 96:4 (v/v) mit 1% AcOH), alle Fraktionen mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) extrahiert und man erhielt 176.8 mg (0.11 mmol, 71%) der Bernsteinsäure-funktionalisierten Verbindung.

C₈₀H₁₀₂N₁₀O₂₂ 1554.72 g/mol

DC $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1 + 1% AcOH); R_f : 0.58

ESI-MS: m/z : berechnet: 1554.7; gefunden: 1554.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1578.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

16.3.5 Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen

176.80 mg (0.11 mmol, 1.0eq) wurden in 16 mL einer 1:1 Mischung aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (v/v) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mit Et_2O gewaschen. Man erhielt 148.9 mg (0.11 mmol, 98%) des gewünschten Suc-Rezeptors **9**.

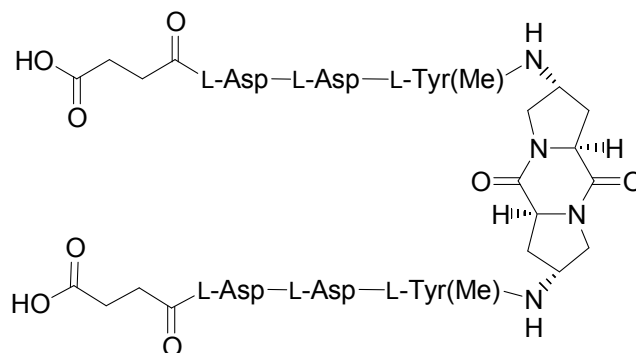
C₆₄H₇₀N₁₀O₂₂ 1330.47 g/mol

¹H-NMR (500.1 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 12.25 (brs, 6H, CO_2H), 8.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, NH_{Asp}), 8.19 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{NH}_{\text{Asp}'}$), 8.08 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, NH_{Pro}), 7.84 (brs, 2H, NH_{Bip}), 7.63 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH_{Bip}), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH_{Bip}), 7.43 (m, 4H, ArH_{Bip}), 7.33 (m, 2H, ArH_{Bip}), 7.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, ArH_{Bip}), 4.56 (dd, $J = 13.6, 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}\alpha_{\text{Asp}}$), 4.49 (dd, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}\alpha_{\text{Asp}'}$), 4.32 (dd, $J = 14.5, 7.9$ Hz, 2H, $\text{CH}\alpha_{\text{Bip}}$), 4.24 (m, 2H, $\text{CH}\alpha_{\text{Pro}}$), 4.17 (m, 2H, $\text{CH}\gamma_{\text{Pro}}$), 3.62 (dd, $J = 12.0, 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}\delta_{\text{Pro}}$), 3.13 (m, 2H, $\text{CH}\delta'_{\text{Pro}}$), 3.01 (m, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Bip}}$), 2.90 (m, 2H, $\text{CH}\beta'_{\text{Bip}}$), 2.68 (m, 4H, $\text{CH}\beta_{\text{Asp}}$, $\text{CH}\beta_{\text{Asp}'}$), 2.48-2.36 (m, 12H, $\text{CH}\beta'_{\text{Asp}}$, $\text{CH}\beta'_{\text{Asp}'}$, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-Suc}$), 2.13 (m, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Pro}}$), 1.90 (m, 2H, $\text{CH}\beta'_{\text{Pro}}$);

¹³C-NMR (125.8 MHz, d_6 -DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.9/172.0/171.6/171.1/170.3/170.1 (CO), 165.7 (C ϵ_{Pro}), 140.0/138.3/136.8 (C $q_{\text{Ar Bip}}$), 139.8/128.9/127.3/126.5/126.4 (CH $_{\text{Ar Bip}}$), 58.0 (CH α_{Pro}), 54.1 (CH α_{Bip}), 50.3 (CH $2\delta_{\text{Pro}}$), 49.8 (CH $\alpha_{\text{Asp}'}$), 49.7 (CH α_{Asp}), 47.0 (CH γ_{Pro}), 37.1 (CH $2\beta_{\text{Bip}}$), 36.2 (CH $2\beta_{\text{Asp}}$), 35.7 (CH $2\beta_{\text{Asp}'}$), 33.1 (CH $2\beta_{\text{Pro}}$), 29.9 (-CO-CH 2 -CH 2 -CO-Suc), 29.1 (-CO-CH 2 -CH 2 -CO-Suc);

ESI-MS m/z : berechnet: 1330.47 $[\text{M}-\text{H}]^+$; gefunden: 1353.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

16.4 Synthese des Rezeptors 10



16.4.1 Erste Kupplung

200.00 mg (0.67 mmol, 1.0 eq) der Verbindung **84** wurden in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit einer Lösung aus 0.79 g (2.70 mmol, 4.0 eq) Boc-Tyr(Me)-OH in 2 mL CH₂Cl₂, 1.17 g (2.70 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF und 0.46 mL (2.70 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 1 h gerührt. Die Mischung wurde 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, danach wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 94:6 (v/v)) und man erhielt nach präparativer DC (CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) 0.39 g (0.32 mmol, 75%) der TyrOMe-funktionalisierten Verbindung.

C₄₀H₅₄N₆O₁₀ 778.89 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.5 (Ninhydrin)

ESI-MS: *m/z*: berechnet: 778.89; gefunden: 801.5 [M+Na]⁺.

16.4.2 Zweite Kupplung

376.10 mg (0.48 mmol, 1.0 eq) der Tyr-OMe Verbindung wurden mit 29.5 mL 4 M HCl in Dioxan versetzt und 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel i. V. entfernt und der Rückstand mit Et₂O gewaschen. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 799.0 mg (1.93 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 795.0 mg (1.93 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH in 5 mL CH₂Cl₂ und 0.33 mL (1.93 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 1 h bei RT gerührt.

Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Reinigung über Kieselgel (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 94:6 (v/v)) und Gelfiltration (LH 20, CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) erhielt man 485.20 mg (0.36 mmol, 75%) der Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₇₆H₈₄N₈O₁₆ 1365.52 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.56

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 1365.52; gefunden: 1388.3 [M+Na]⁺.

16.4.3 Dritte Kupplung

485.20 mg (0.36 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 1.1 mL (0.01 mol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 588.0 mg (1.42 mmol, 4.0 eq) HCTU in 2 mL DMF, 584.0 mg (1.42 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH in 5 mL CH₂Cl₂ und 0.24 mL (1.42 mmol, 4.0 eq) ⁱPr₂NEt versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Nach Reinigung über Kieselgel (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 95:5 (v/v)) und präparativer DC (CH₂Cl₂/MeOH (9:1)) erhielt man 472.60 mg (0.28 mmol, 78%) der zweifach Fmoc-L-Asp geschützten Verbindung.

C₉₂H₁₁₀N₁₀O₂₂ 1707.91 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH (9:1); R_f: 0.56

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 1707.91; gefunden: 1731.6 [M+Na]⁺.

16.4.4 Vierte Kupplung

472.60 mg (0.28 mmol, 1.0 eq) des Fmoc geschützten Precursors wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 0.86 mL (8.30 mmol, 30 eq) DEA versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, das Lösemittel i. V. entfernt und der Rückstand mit *n*-Heptan coevaporiert. Der Rückstand wurde in 7 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 550.00 mg (5.50 mmol, 20.0 eq) Bernsteinsäure-Anhydrid versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) und CH₂Cl₂ (2 x 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Zur Reinigung wurde über Kieselgel gesäult (CH₂Cl₂/ MeOH Gradient von 99.5:0.5 bis 93:7 (v/v) mit 1% AcOH), alle Fraktionen mit 0.1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 5.5) extrahiert und man erhielt 307.4 mg (0.21 mmol, 76%) der Suc-funktionalisierten Verbindung.

C₇₀H₉₈N₁₀O₂₄ 1463.58 g/mol

DC CH₂Cl₂/MeOH ((9:1) 0.1% AcOH); R_f: 0.34 (I₂)

MALDI-ToF *m/z*: berechnet: 1463.58; gefunden: 1462.0 [M-H]⁺.

16.4.5 Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen

307.40 mg (0.21 mmol, 1.0 eq) der Bernsteinsäure-funktionalisierten Verbindung wurden in 28 mL einer 1:1 Mischung aus CH₂Cl₂/ TFA (v/v) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mit Et₂O gewaschen. Man erhielt 264.4 mg (0.21 mmol, quant.) des gewünschten Suc-Rezeptors **10**.

C₅₄H₆₆N₁₀O₂₄ 1239.15 g/mol

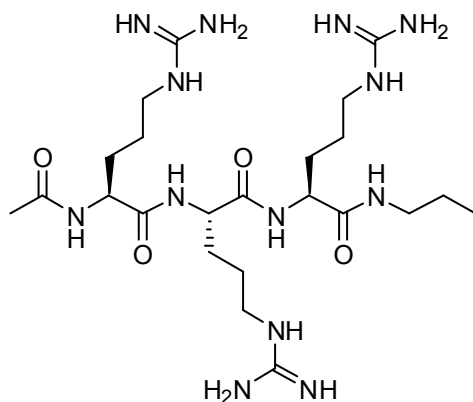
¹H-NMR (500.1 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 12.27 (brs, 6H, CO₂H), 8.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, NH_{Asp}), 8.17 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, NH_{Asp'}), 8.05 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, NH_{Pro}), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, NH_{Tyr}), 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, ArH_{Tyr}), 4.54 (dd, *J* = 13.2 Hz, 7.6 Hz, 2H, CHα_{Asp}), 4.48 (dd, *J* = 13.9 Hz, 7.2 Hz, 2H, CHα_{Asp'}), 4.31 (dd, *J* = 14.8 Hz, 7.9 Hz, 2H, CHα_{Tyr}), 4.18 (m, 2H, CHα_{Pro}), 4.16 (m, 2H, CHγ_{Pro}), 3.69 (s, 6H,

OCH₃), 3.61 (dd, $J = 12.3$ Hz, 6.3 Hz, 2H, CH δ '_{Pro}), 3.17 (m, 2H, CH δ '_{Pro}), 2.87 (dd, $J = 13.9$ Hz, 6.3 Hz, 2H, CH β '_{Tyr}), 2.78 (dd, $J = 13.4$ Hz, 7.9 Hz, 2H, CH β '_{Tyr}), 2.67 (m, 4H, CH β '_{Asp}, CH β '_{Asp'}), 2.48-2.34 (m, 12H, CH β '_{Asp}, CH β '_{Asp'}, CO-CH₂-CH₂-CO-Suc), 2.10 (m, 2H, CH β '_{Pro}), 1.85 (m, 2H, CH β '_{Pro});

¹³C-NMR (125.8 MHz, d₆-DMSO, 25°C): δ (ppm) = 173.9/171.9/171.6/171.1/170.3/170.0 (CO), 165.7 (C ϵ '_{Pro}), 157.9 (Cq_{Tyr}), 130.2 (CH α '_{Tyr}), 129.2 (Cq_{Tyr}), 113.5 (CH α '_{Tyr}), 58.1 (CH α '_{Pro}), 54.9 (-OCH₃), 54.3 (CH α '_{Tyr}), 50.3 (CH 2δ '_{Pro}), 49.7 (CH α '_{Asp'}), 49.6 (CH α '_{Asp}), 46.9 (CH γ '_{Pro}), 36.8 (CH 2β '_{Tyr}), 36.0 (CH 2β '_{Asp}), 35.5 (CH 2β '_{Asp'}), 33.1 (CH 2β '_{Pro}), 29.9 (-CO-CH₂-CH₂-CO-Suc), 29.1 (-CO-CH₂-CH₂-CO-Suc)

MALDI-ToF m/z : berechnet: 1239.15; gefunden: 1240.3 [M+H]⁺, 1237.2 [M-H]⁺.

16.5 Synthese des von Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr 128



128

Synthese auf Wang Harz

Das Wang Harz war bereits mit Fmoc-Arg(Pbf) beladen. Für die Synthese wurden 1.0 g Wang Harz (0.56 mmol) verwendet und die Aminosäuren wurden nach **Prozedur A2** gekuppelt, die Fmoc-Gruppe nach **Prozedur B** entschützt und die freien Amine nach **Prozedur C** acetyliert.

1.1 g Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (1.68 mmol, 3.0 eq)

0.69 g HCTU (1.68 mmol, 3.0 eq)

0.28 mL ⁱPr₂NEt (0.86 mmol, 6.0 eq)

7.8 mL NEt_3 (56 mmol, 100.0 eq), 2.6 mL Ac_2O (28 mmol, 50.0 eq)

Anschließend wurde das Peptid mit einer 1:1-Mischung aus Propylamin/DCM (v/v) vom Harz abgespalten, über Kieselgel gesäult ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradient von 97:3 bis 90:10 (v/v)) und man erhielt 685.5 mg (92%) des geschützten Peptids. Abspaltung der Seitenketten erfolgte mit TFA in CH_2Cl_2 und man erhielt 366.4 mg (0.44 mmol, 78%) des gewünschten Peptids **128**.

$\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{N}_{13}\text{O}_4$

569.70 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500.1 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 25°C): δ (ppm) = 8.83 (brs, 1H, NH_{Arg}), 8.25 (m, 1H, NH_{Arg}), 8.18 (m, 3H, $\text{NH-C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$), 7.86 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH_{Arg}), 7.47 (brs, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7.19 (m, 9H, $\text{NH-C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$), 4.25 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Arg}}$), 4.10 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Arg}}$), 4.02 (m, 1H, $\text{CH}\alpha_{\text{Arg}}$), 3.16-2.91 (m, 8H, $\text{CH}\delta_{\text{Arg}}$, $\text{CH}\delta'_{\text{Arg}}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.92 (m, 2H, $\text{CH}\beta_{\text{Arg}}$), 1.87 (s, 3H, COCH_3), 1.79-1.42 (m, 11H, $\text{CH}\beta_{\text{Arg}}$, $\text{CH}\beta'_{\text{Arg}}$, $\text{CH}\gamma_{\text{Arg}}$, $\text{CH}\gamma'_{\text{Arg}}$), 1.38 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.81 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 25°C): δ (ppm) = 172.8/172.1/171.0/169.8 (CO), 156.9/156.8 (Cq_{Arg}), 54.0/52.4/52.0 ($\text{CH}\alpha_{\text{Arg}}$), 40.5/40.4 ($\text{CH}_2\delta_{\text{Arg}}$), 40.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.9/27.9/27.7 ($\text{CH}_2\beta_{\text{Arg}}$), 24.6/24.4 ($\text{CH}_2\gamma_{\text{Arg}}$), 22.4 (COCH_3), 22.2 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 11.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$);

ESI-MS

m/z : berechnet: 569.70; gefunden: 684.0 $[\text{M}+\text{H}+\text{TFA}]^+$.

Anhang

Spaltung der Pyrenester

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Acetoxypyrenesters in Lösung (HEPES) und im Gel (HEPES). (Abkürzung ACHC= *trans*-2-aminocyclohexancarbonsäure (rac))

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Ser	Gly	L-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	Ahx	D-Ser
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-His	----	D-His	----	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-Ser	Ahx	L-Tyr	β -Ala	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	β -Ala	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-Ser	Gly	D-Ser	ACHC	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-Ser	Gly	L-His
Ac	L-His	ACHC	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser	Gly	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	ACHC	L-His
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	Gly	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	ACHC	L-His
Ac	L-Asp	Gly	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	Gly	L-His	Pro-Aib	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	Gly	D-His
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	Pro-Gly	L-His

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Acetoxypyrenesters in Lösung (Acetat) und im Gel (Acetat).

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Ser	ACHC	L-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-His	ACHC	L-Asp	----	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-Asp	----	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-Asp	β -Ala	L-His
Ac	L-Ser	ACHC	L-Asp	----	D-His
Ac	L-His	----	L-Ser	----	D-His
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-Ser	----	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Ser	Gly	D-His
Ac	D-His	ACHC	D-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Tyr	----	L-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	----	D-Ser	β -Ala	D-His

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Ser	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Tyr	β -Ala	L-His
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Asp	Gly	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Asp	Gly	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	ACHC	D-His
Ac	D-Asp	β -Ala	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Ahx	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	β -Ala	D-His
Ac	L-His	β -Ala	D-His	β -Ala	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Gly	D-His	Pro-Aib	D-Ser

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Butyryloxypyrenesters in Lösung (HEPES) und im Gel (HEPES).

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Asp	β -Ala	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	β -Ala	D-His	ACHC	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	ACHC	L-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	Ahx	D-Asp	ACHC	L-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-Asp	β -Ala	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	D-Ser	Ahx	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-Ser	ACHC	L-His	ACHC	L-Tyr
Ac	D-His	β -Ala	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-Asp	Gly	D-Asp	----	L-Tyr
Ac	D-Ser	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-Ser

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Butyryloxypyrenesters in Lösung (Acetat) und im Gel (Acetat).

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	β -Ala	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Ahx	L-His	ProGly	L-His
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	----	D-His
Ac	L-His	Ahx	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Gly	D-His	Pro-Aib	L-His
Ac	D-His	Ahx	D-His	----	D-His
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	Gly	L-His	β -Ala	D-His

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-His	β -Ala	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	β -Ala	D-His	Ahx	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-His	Ahx	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-Asp	B-Ala	L-His	Ahx	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	L-His	Ahx	D-His
Ac	L-His	Ahx	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-Ser	Gly	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	----	L-Ser	Ahx	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Ser	ACHC	D-His
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	----	D-His
Ac	D-His	ACHC	D-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	----	L-His

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Pyrenalkohol in Lösung (HEPES) und im Gel (HEPES).

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	D-His	β -Ala	L-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Asp	Gly	L-His	----	L-Tyr
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-Ser	----	D-His	Gly	L-Ser
Ac	L-Ser	Gly	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-Ser	----	L-His
Ac	D-His	Gly	L-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	L-His

Analysierte Sequenzen für die Spaltung des Pyrenalkohol in Lösung (Acetat) und im Gel (Acetat).

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Tyr	Gly	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	Gly	L-His
Ac	D-His	----	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	D-Ser	Ahx	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	β -Ala	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	Gly	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-His	Ahx	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-His	ACHC	D-His	ACHC	L-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-His	Pro-Gly	D-Ser

Metallinkubation

Analysierte Sequenzen mit der Pentapeptidbibliothek und Nickel

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	Gly	D-Asp	ACHC	L-Asp
Ac	L-Ser	----	D-Asp	Gly	L-Asp
Ac	L-Asp	-----	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	L-Asp	ACHC	D-Asp	β -Ala	D-Asp
Ac	L-Asp	ACHC	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	D-Asp	ACHC	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp
Ac	L-His	ACHC	L-Asp	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-His	ACHC	L-Asp	ACHC	D-Asp
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	-----	D-Asp
Ac	D-His	ACHC	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp
Ac	L-Asp	Pro-Aib	L-Tyr	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	D-Ser	Gly	L-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	Ahx	D-Asp
Ac	L-Asp	Gly	L-His	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-His	Ahx	D-Asp
Ac	L-His	Ahx	D-His	ACHC	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-His	Gly	L-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	-----	D-His
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	Gly	L-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-His	Ahx	D-Ser

Analysierte Sequenzen mit der Tripeptidbibliothek und Nickel

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-Ser	Ahx	D-Asp	
Ac	L-Ser	Ahx	L-Asp	
Ac	L-Ser	Gly	D-Asp	
Ac	D-Ser	ACHC	D-Asp	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-Asp	
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp	
Ac	D-Asp	Ahx	D-Asp	
Ac	L-Asp	ACHC	D-Asp	3x
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	
Ac	L-Asp	ACHC	D-Asp	
Ac	D-Asp	Ahx	L-Asp	
Ac	L-Asp	Ahx	L-Asp	2x
Ac	L-Asp	----	L-Asp	
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp	4x
Ac	L-Asp	ACHC	L-Asp	
Ac	L-Asp	Gly	L-Asp	

Analysierte Sequenzen mit der Pentapeptidbibliothek und Eisen

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Ser	Gly	L-Asp
Ac	D-Asp	Ahx	D-Ser	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Asp	----	L-Ser	Gly	L-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser	β -Ala	D-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	β -Ala	L-Asp
Ac	D-Asp	β -Ala	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	D-Asp	β -Ala	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Asp	β -Ala	D-Asp	ACHC	L-Asp
Ac	D-Asp	Ahx	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Asp	Gly	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp
Ac	L-Asp	ACHC	L-Asp	ACHC	L-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp	β -Ala	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Ser	----	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Asp	β -Ala	D-Asp
Ac	L-Ser	Gly	L-Asp	Pro-Aib	L-Asp
Ac	D-Ser	Ahx	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	β -Ala	L-Asp
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	β -Ala	D-Asp
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	Gly	D-Asp
Ac	L-His	Ahx	L-Asp	ACHC	D-Asp
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	D-Asp	β -Ala	L-Tyr	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-His	Ahx	L-His
Ac	D-Ser	----	D-Ser	----	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Aib	D-His

Analysierte Sequenzen mit der Tripeptidbibliothek und Eisen

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Asp	
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	3x
Ac	L-His	β -Ala	D-Asp	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	2x
Ac	D-His	Gly	L-Asp	
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	2x
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	
Ac	L-His	ACHC	L-Asp	

Analysierte Sequenzen mit der Pentapeptidbibliothek und Kupfer

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Asp	Gly	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Ser	ACHC	D-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	D-His	ACHC	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	ACHC	L-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	ACHC	L-Tyr	Gly	D-His
Ac	L-Tyr	----	L-Tyr	Gly	D-His
Ac	L-Ser	----	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	Gly	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	Ahx	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	----	D-His	Ahx	D-His
Ac	D-His	β -Ala	D-His	ACHC	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-Tyr	----	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	----	L-His	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-His	Ahx	L-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-His	ACHC	L-His	----	D-Asp
Ac	L-Ser	----	D-His	Gly	L-Tyr
Ac	L-His	----	D-His	----	L-Ser

Analysierte Sequenzen mit der Tripeptidbibliothek und Kupfer

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	ACHC	D-His	2x
Ac	D-His	ACHC	L-His	2x
Ac	L-His	ACHC	D-His	
Ac	D-His	Ahx	L-His	2x
Ac	D-His	Ahx	D-His	2x
Ac	L-His	Gly	D-His	
Ac	L-His	Gly	L-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	D-His	2x
Ac	L-His	β -Ala	D-His	
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	Ahx	D-Ser	
Ac	D-His	β -Ala	D-Ser	

Spaltung des Phosphatesters

Analysierte Sequenzen mit der Tripeptidbibliothek ohne Metallzugabe (Ergebnisse aus allen Puffern zusammengefasst)

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	Ahx	D-His	2x
Ac	D-Asp	Ahx	D-His	
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	D-His	ACHC	D-His	4x
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	
Ac	D-His	ACHC	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	2x
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	
Ac	D-Asp	ACHC	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	2x
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	3x
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-His	β -Ala	D-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	Gly	D-His	
Ac	L-Ser	Gly	D-His	
Ac	D-His	Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Gly	D-His	
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	D-His	ACHC	D-Ser	
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	
Ac	D-His	----	D-Ser	
Ac	D-His	-----	D-Ser	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	

Analysierte Sequenzen mit der Pentapeptidbibliothek ohne Metallzugabe (Ergebnisse aus allen Puffern zusammengefasst)

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	Gly	L-His	Pro-Aib	L-His
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	ACHC	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Ser	----	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	Ahx	D-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Asp	Gly	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Ser	β -Ala	L-His
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	β -Ala	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	β -Ala	L-His
Ac	D-His	----	L-Ser	β -Ala	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-His	----	D-Ser	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-Tyr	----	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-Ser	β -Ala	D-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Tyr	----	L-His
Ac	L-Ser	Gly	D-His	Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-His	-----	L-Tyr	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-Ser	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	β -Ala	L-Ser
Ac	L-Asp	ACHC	D-Ser	β -Ala	D-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Asp	----	L-Ser
Ac	D-Ser	Gly	L-Ser	Ahx	D-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Asp	Gly	L-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	L-His	----	L-His	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	Gly	L-Tyr
Ac	D-Ser	Gly	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Asp	Ahx	L-Asp	ACHC	D-Asp
Ac	D-His	Ahx	D-His	ACHC	D-Asp
Ac	L-His	β -Ala	D-Asp	----	D-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-Ser	Gly	L-His	Pro-Gly	L-Asp
Ac	L-Tyr	----	L-His	Pro-Gly	L-Asp

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-His	Ahx	L-Asp
Ac	L-Asp	Gly	L-His	β -Ala	D-Asp

Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM Konzentrationen an Zink-Lösung

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	Ahx	L-Ser	2x
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Ser	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-Ser	
Ac	L-His	Ahx	D-Ser	
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	3x
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	
Ac	D-His	Ahx	D-Ser	
Ac	L-His	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-Ser	β -Ala	D-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Ser	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Ser	
Ac	D-Ser	β -Ala	D-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-Asp	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Ser	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Ser	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Ser	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-Ser	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Ser	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Ser	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Ser	2x
Ac	D-His	----	D-Ser	
Ac	D-His	----	L-Ser	2x
Ac	L-Ser	----	L-Ser	
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Ser	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Ser	
Ac	L-His	ACHC	L-Ser	
Ac	L-His	ACHC	D-Ser	
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Ser	
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	
Ac	L-His	Gly	L-Ser	
Ac	D-His	Gly	D-Ser	2x
Ac	D-Ser	Gly	D-Ser	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-Ser	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	2x
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	2x
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	3x
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	4x
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr	2x
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Tyr	
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	-----	L-Tyr	
Ac	L-His	----	L-Tyr	
Ac	D-His	----	L-Tyr	
Ac	D-Asp	----	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	----	L-Tyr	
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	3x
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Tyr	
Ac	D-His	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-His	Gly	L-Tyr	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Asp	
Ac	L-His	Gly	L-Asp	
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	2x
Ac	D-His	ACHC	L-His	
Ac	L-His	ACHC	L-His	
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	
Ac	L-Asp	ACHC	L-His	
Ac	D-His	ACHC	D-His	
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	
Ac	L-His	ACHC	D-His	2x
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	
Ac	L-His	β -Ala	D-His	2x
Ac	L-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-His	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	
Ac	D-Asp	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	
Ac	L-His	Gly	L-His	
Ac	D-His	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	2x
Ac	D-His	Ahx	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	D-His	
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	

Analysierte Sequenzen der Pentapeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM Konzentrationen an Zink-Lösung

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	L-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	----	D-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	----	D-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	L-His	Ahx	D-His	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-Asp	Gly	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-Ser	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr	----	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	----	D-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-His	β -Ala	L-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Asp	----	L-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Ser	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-Asp	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Asp	Gly	D-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Gly	L-Tyr
Ac	L-His	ACHC	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Ser	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Ser	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Ser	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-His	Ahx	D-Ser	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	ACHC	L-Ser
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	ACHC	D-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	ACHC	D-Ser
Ac	D-His	Gly	L-Tyr	Ahx	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	L-Ser
Ac	D-Asp	----	L-Tyr	Ahx	D-Ser
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	Ahx	D-Ser
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	Ahx	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp	Ahx	L-Ser
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-Ser
Ac	L-His	ACHC	D-Ser	Ahx	D-Ser

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	β -Ala	D-Ser
Ac	L-Ser	----	D-Ser	β -Ala	D-Ser
Ac	D-His	Gly	L-Tyr	----	D-Ser
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	----	L-Ser
Ac	D-His	Gly	L-Ser	Gly	D-Ser
Ac	L-Asp	ACHC	L-Tyr	Gly	D-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Ser	ACHC	L-His	ACHC	D-Asp
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	ACHC	D-His
Ac	D-His	Gly	D-Ser	ACHC	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	ACHC	D-His
Ac	D-His	----	D-His	ACHC	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	----	D-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	Pro-Aib	L-His
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	----	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Ser	β -Ala	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-His	β -Ala	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Asp	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	β -Ala	L-His
Ac	D-His	ACHC	D-His	β -Ala	L-His
Ac	D-His	ACHC	D-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-Asp	ACHC	D-Ser	β -Ala	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	Gly	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Gly	L-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	L-Asp	Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	Gly	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	Ahx	D-His
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	D-Asp	Ahx	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	L-Asp	Gly	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-Ser	β -Ala	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-His	Gly	L-His	-----	L-His
Ac	L-His	β -Ala	D-Asp	----	L-His

Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek und 100 mM, 1 mM und 0.5 mM Konzentrationen an Nickel-Lösung

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-Asp	ACHC	D-His	
Ac	D-His	ACHC	L-His	5x
Ac	L-Ser	ACHC	D-His	
Ac	L-His	ACHC	L-His	5x
Ac	L-His	ACHC	D-His	
Ac	D-His	ACHC	D-His	2x
Ac	L-His	ACHC	D-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	2x
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	3x
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	2x
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	2x
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His	
Ac	D-His	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-His	β -Ala	D-His	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-His	3x
Ac	D-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	5x
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	D-His	4x
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	2x
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	2x
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	L-Asp	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	D-His	Ahx	D-His	4x
Ac	D-Ser	Ahx	D-His	
Ac	D-His	Ahx	L-His	3x
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Ahx	L-His	
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	
Ac	D-Asp	Gly	D-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	
Ac	L-His	Gly	D-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	
Ac	L-Asp	Gly	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	2x
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	Ahx	L-Tyr	2x
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	3x
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-His	Gly	L-Tyr	
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	
Ac	D-His	Ahx	L-Ser	
Ac	L-His	Ahx	D-Ser	
Ac	D-His	Ahx	D-Ser	
Ac	D-His	Gly	L-Ser	2x
Ac	L-His	Gly	L-Ser	
Ac	L-His	----	L-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Ser	
Ac	L-His	----	D-Asp	

Analysierte Sequenzen der Pentapeptidbibliothek und 100 mM, 1 mM und 0.5 mM Konzentrationen an Nickel-Lösung

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	----	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	----	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Gly	D-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	β -Ala	D-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Asp	----	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	----	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Ser	Gly	L-His	β -Ala	L-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	β -Ala	D-His
Ac	D-His	Gly	D-Asp	β -Ala	D-His
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	β -Ala	L-His
Ac	D-His	Gly	D-Ser	β -Ala	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-His	β -Ala	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-Ser	β -Ala	D-His
Ac	D-Ser	Gly	L-Asp	β -Ala	D-His
Ac	D-His	Gly	L-His	β -Ala	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	β -Ala	L-His
Ac	D-His	Ahx	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-His	Ahx	D-His

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Asp	Gly	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Ser	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp	Ahx	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-Asp	Gly	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-Tyr	Gly	L-Ser	Gly	L-His
Ac	D-His	----	D-Asp	Gly	D-His
Ac	D-Ser	Ahx	D-Asp	Gly	L-His
Ac	D-Ser	----	L-His	Gly	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	ACHC	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	ACHC	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	ACHC	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-Ser	ACHC	L-His
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	ACHC	L-His
Ac	D-Ser	Ahx	D-Asp	----	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-His	----	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-Asp	----	L-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Asp	ACHC	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	Gly	L-Tyr
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Asp	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	D-His	Gly	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	L-Tyr	----	L-Tyr
Ac	D-His	β -Ala	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Ser	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-Ser	Ahx	D-Asp	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-His	----	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	ACHC	D-Asp	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	L-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	Ahx	D-Ser	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-His	β -Ala	D-His	----	D-Ser
Ac	L-Tyr	----	L-His	----	D-Ser
Ac	D-Asp	Ahx	L-His	----	L-Ser
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	β -Ala	L-Ser
Ac	L-His	β -Ala	D-His	β -Ala	L-Ser
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	ACHC	D-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	L-Ser	ACHC	D-Ser
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Gly	L-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	Ahx	L-Tyr	Ahx	L-Ser
Ac	L-Tyr	Ahx	D-Ser	Ahx	D-Ser

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	----	L-Ser	Ahx	D-Ser
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	Pro-Aib	D-Asp
Ac	D-His	ACHC	D-Ser	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	ACHC	L-Asp
Ac	D-His	Ahx	L-His	β -Ala	D-Asp
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	β -Ala	D-Asp
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	β -Ala	L-Asp
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-Ser	β -Ala	L-Asp

Analysierte Sequenzen der Pentapeptidbibliothek und 100 mM, 1 mM und 0.5 mM Konzentrationen an Eisen-Lösung

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Tyr	Gly	D-Ser	Ahx	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-Ser	----	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	D-Ser	----	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Asp	ACHC	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	Gly	L-His	ACHC	D-His
Ac	L-His	Gly	L-Asp	ACHC	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp	β -Ala	L-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser	β -Ala	D-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	β -Ala	L-His
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	Gly	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Gly	D-His
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	Gly	L-His
Ac	L-Asp	Ahx	D-Ser	----	D-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Asp	----	L-His
Ac	L-Asp	Ahx	L-Tyr	----	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Asp	----	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-Ser	Ahx	L-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	Ahx	D-Ser
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Ser	Gly	L-Ser
Ac	D-Ser	β -Ala	D-Ser	ACHC	D-Ser
Ac	D-His	ACHC	D-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-His	ACHC	D-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-His	Ahx	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Asp	Gly	L-Tyr	Ahx	L-Tyr
Ac	Nd	ACHC	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Asp	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Asp	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	D-His	ACHC	D-His	β -Ala	D-Asp
Ac	D-His	Gly	D-Ser	β -Ala	D-Asp
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	-----	D-Asp

Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek und 100 mM, 1 mM und 0.5 mM Konzentrationen an Eisen-Lösung

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	ACHC	D-His	3x
Ac	L-His	ACHC	L-His	4x
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	D-His	
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	L-His	β -Ala	L-His	3x
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	2x
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	2x
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-His	Ahx	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	D-His	2x
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	D-Ser	Ahx	D-His	
Ac	D-Ser	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	
Ac	D-Asp	Gly	L-His	
Ac	D-His	Gly	L-His	
Ac	L-His	Gly	L-His	
Ac	D-Asp	Gly	D-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	-----	L-Tyr	
Ac	L-Ser	-----	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	
Ac	L-His	β -Ala	D-Ser	
Ac	L-His	ACHC	L-Ser	
Ac	L-His	Gly	D-Asp	

Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM Konzentrationen an Kupfer-Lösung

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-His	β -Ala	L-His	5x
Ac	D-His	β -Ala	D-His	3x
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	D-His	Ahx	L-His	9x
Ac	L-His	Ahx	L-His	11x
Ac	L-His	Ahx	D-His	11x
Ac	D-His	Ahx	D-His	18x
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	2x
Ac	L-His	ACHC	D-His	
Ac	D-His	ACHC	L-His	
Ac	D-Ser	Ahx	L-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	
Ac	D-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	D-Ser	ACHC	L-His	
Ac	D-Ser	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	2x
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	L-His	β -Ala	L-Ser	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Ser	
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	
Ac	D-His	Gly	D-Ser	
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Ser	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Gly	L-Tyr	2x
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	

**Analysierte Sequenzen der Pentapeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM
Konzentrationen an Kupfer-Lösung**

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	Ahx	D-His	
Ac	L-His	β-Ala	L-His	Ahx	L-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	Ahx	D-His	
Ac	D-His	Ahx	D-His	Ahx	L-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	ACHC	L-His	
Ac	D-His	ACHC	D-His	ACHC	D-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	Ahx	L-His	Ahx	D-His	2x
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	β-Ala	L-His	
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	Ahx	L-His	
Ac	L-Ser	ACHC	L-His	Ahx	D-His	
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	Ahx	D-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	Ahx	D-His	
Ac	D-Asp	β-Ala	L-His	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	β-Ala	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	L-His	β-Ala	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	Ahx	L-His	
Ac	L-His	Gly	D-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	Ahx	L-His	
Ac	L-His	ACHC	L-Asp	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Ahx	L-Asp	Ahx	D-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Asp	β-Ala	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	β-Ala	L-His	

Analysierte Sequenzen der Tripeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM Konzentrationen an Zirkonium-Lösung

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	2x
Ac	D-His	Pro-Gly	D-His	3x
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	2x
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-His	3x
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	5x
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	3x
Ac	D-His	ACHC	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	
Ac	L-His	ACHC	D-His	2x
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	3x
Ac	L-Ser	ACHC	D-His	
Ac	L-His	ACHC	L-His	4x
Ac	D-His	ACHC	D-His	3x
Ac	L-His	ACHC	L-His	
Ac	D-Asp	ACHC	D-His	2x
Ac	D-Ser	ACHC	L-His	
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	
Ac	L-His	β -Ala	D-His	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-His	4x
Ac	L-His	β -Ala	L-His	3x
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	3x
Ac	D-His	β -Ala	L-His	7x
Ac	D-His	β -Ala	D-His	2x
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	2x
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	2x
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	L-His	Gly	D-His	3x
Ac	D-His	Gly	D-His	4x
Ac	L-Asp	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	2x
Ac	L-Asp	Gly	D-His	
Ac	L-Asp	Gly	D-His	

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	
Ac	D-Asp	Gly	D-His	2x
Ac	D-Ser	Gly	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	L-His	
Ac	L-His	Ahx	D-His	2x
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	
Ac	D-His	Ahx	L-His	3x
Ac	L-His	Ahx	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	L-His	
Ac	D-Asp	Ahx	D-His	
Ac	L-Asp	Ahx	D-His	2x
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	
Ac	L-Asp	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	D-His	Ahx	D-His	2x
Ac	L-His	ACHC	D-Asp	2x
Ac	L-Asp	ACHC	L-Asp	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Asp	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-Asp	
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Asp	
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-Asp	
Ac	D-His	----	L-Asp	
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	3x
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	2x
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	2x
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	2x
Ac	D-His	β -Ala	L-Tyr	
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr	
Ac	L-His	Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	Gly	L-Tyr	
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Tyr	2x
Ac	L-Asp	Ahx	L-Tyr	2x
Ac	L-His	----	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-Ser	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	D-Ser	ACHC	L-Ser	
Ac	L-His	----	D-Ser	
Ac	L-Tyr	Gly	L-Ser	
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	
Ac	D-His	Ahx	D-Ser	
Ac	L-Ser	β -Ala	D-Ser	

	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser
Ac	D-His	β -Ala	D-Ser
Ac	L-His	β -Ala	D-Ser

Analysierte Sequenzen der Pentapeptidbibliothek und 100 mM und 1 mM Konzentrationen an Zirkonium Lösung

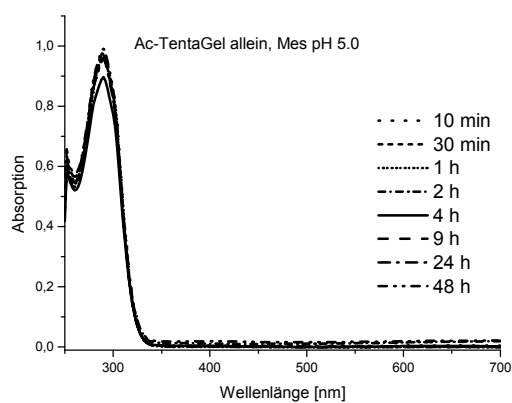
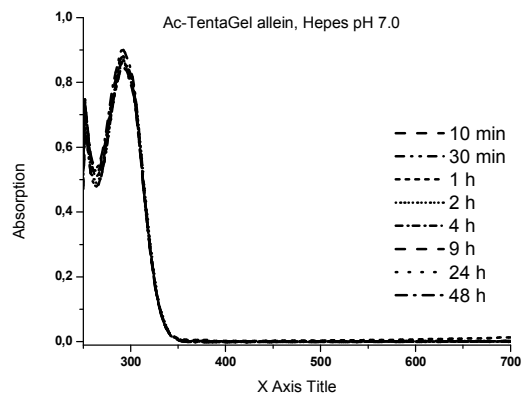
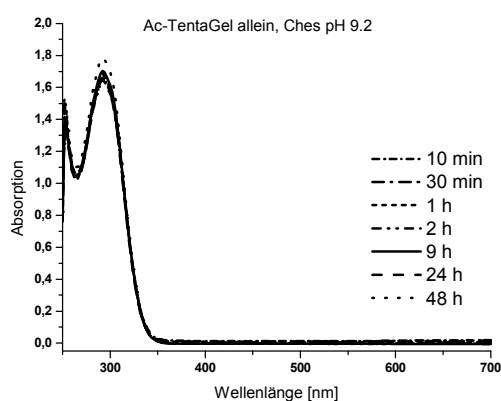
	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Asp	Gly	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	ACHC	D-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Ser	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	β -Ala	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	β -Ala	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	β -Ala	D-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	D-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	Gly	D-His	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	L-His	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Asp	ACHC	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	Ahx	L-Ser	Pro-Aib	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Ahx	D-His
Ac	L-Ser	Gly	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	L-His	Ahx	D-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Ser	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	Ahx	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	Ahx	D-His
Ac	D-Asp	ACHC	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	D-His	Ahx	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	L-His	Ahx	L-Ser	Ahx	D-His
Ac	D-His	ACHC	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Tyr	Ahx	D-His
Ac	D-Asp	β -Ala	D-Asp	ACHC	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	D-His
Ac	L-Ser	Gly	L-His	ACHC	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-Ser	ACHC	L-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Asp	----	L-His
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	β -Ala	L-His
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-Asp	β -Ala	D-Asp	β -Ala	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-His	β -Ala	D-His
Ac	L-His	ACHC	D-Asp	β -Ala	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	β -Ala	D-His
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-His	Gly	L-Ser	Gly	D-His
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Asp	Gly	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-Asp	Gly	D-His

Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	Gly	D-His
Ac	L-His	β -Ala	L-His	Gly	L-His
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Ser	Gly	D-His
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp	Gly	L-His
Ac	L-Asp	----	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-His	β -Ala	D-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-His	Gly	L-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Asp	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-Ser	β -Ala	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-His	Gly	L-Asp	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Asp	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Gly	n. def.	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	----	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	----	D-Ser	ACHC	L-Tyr
Ac	D-His	β -Ala	D-Asp	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Gly	D-His	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His	Ahx	L-Tyr
Ac	D-Ser	Ahx	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-Ser	----	D-Ser	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Ser	Gly	L-Tyr
Ac	L-Asp	Pro-Aib	L-Ser	Gly	L-Tyr
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	----	L-Tyr
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Asp	----	L-Tyr
Ac	D-Asp	ACHC	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	L-Asp	----	L-Ser	----	L-Tyr
Ac	D-Ser	Ahx	L-His	----	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Aib	D-Asp	----	L-Tyr
Ac	D-Asp	----	L-Tyr	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-His	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-Asp	ACHC	L-His	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	D-His	Gly	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Tyr	----	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	----	L-Asp	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	D-Ser
Ac	D-Ser	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-His	ACHC	L-Ser	ACHC	L-Ser
Ac	L-Ser	Ahx	L-Ser	ACHC	D-Ser
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	Ahx	L-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	Ahx	L-Ser
Ac	D-Ser	Gly	L-His	Ahx	L-Ser
Ac	D-His	----	L-Asp	Ahx	D-Ser
Ac	D-Asp	L-Tyr	D-His	Ahx	D-Ser
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	β -Ala	L-Ser
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Asp	β -Ala	D-Ser
Ac	L-Asp	β -Ala	L-Tyr	β -Ala	L-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Gly	D-Ser
Ac	D-His	ACHC	D-Ser	----	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-Ser	Pro-Gly	D-Asp

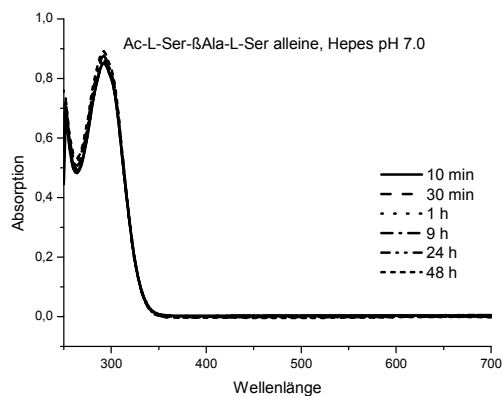
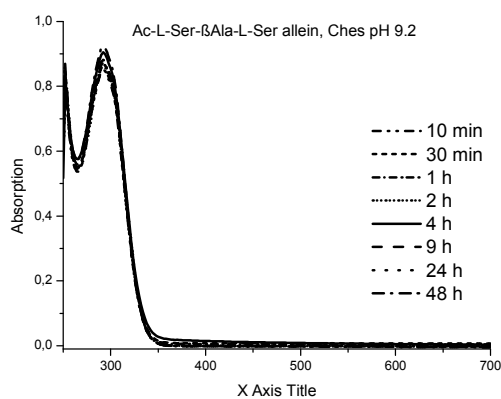
Ac	L-Asp	ACHC	L-Asp	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Asp	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-Asp	β -Ala	D-Asp	Pro-Gly	L-Asp
Ac	L-Ser	ACHC	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	D-Asp	Ahx	L-His	Pro-Aib	D-Asp
Ac	D-Ser	β -Ala	L-His	Pro-Aib	D-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	L-Asp
Ac	L-Ser	Ahx	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Ser	Gly	L-Ser	Pro-Gly	L-Asp
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	Pro-Gly	L-Asp
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	β -Ala	D-Asp
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His	β -Ala	L-Asp
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Ser	β -Ala	L-Asp
Ac	D-His	Pro-Gly	L-His	β -Ala	D-Asp
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-Ser	β -Ala	D-Asp
Ac	L-Tyr	----	D-His	Ahx	D-Asp
Ac	D-Ser	ACHC	L-Asp	Ahx	D-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	L-Asp
Ac	D-His	β -Ala	L-Asp	Ahx	L-Asp
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His	Gly	L-Asp
Ac	D-His	ACHC	D-His	Gly	L-Asp
Ac	L-Asp	Ahx	D-Asp	Gly	L-Asp
Ac	L-Tyr	Gly	L-His	Gly	D-Asp
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	----	D-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	----	L-Asp
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	----	L-Asp
Ac	L-Asp	Gly	L-Tyr	----	D-Asp
Ac	L-Asp	β -Ala	L-Tyr	----	L-Asp
Ac	L-Asp	Ahx	L-Tyr	----	D-Asp
Ac	L-Asp	Ahx	D-His	----	L-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	----	D-Asp
Ac	L-Tyr	Ahx	L-Asp	Pro-Gly	D-Asp
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-His	ACHC	L-Asp
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	ACHC	D-Asp
Ac	L-Asp	Gly	D-His	ACHC	D-Asp
Ac	L-Ser	----	D-Ser	ACHC	D-Asp

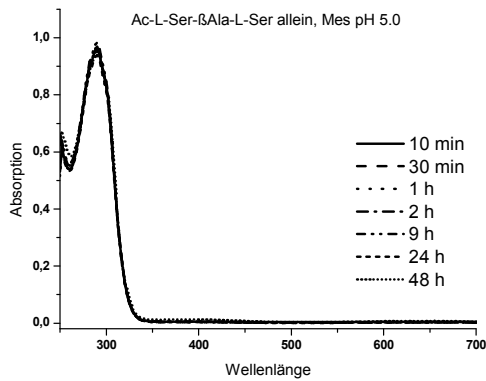
UV-Vis-Studien

Acetyliertes TentaGel und Indigo in HEPES pH 7.0, CHES pH 9.2 und MES pH 5.0

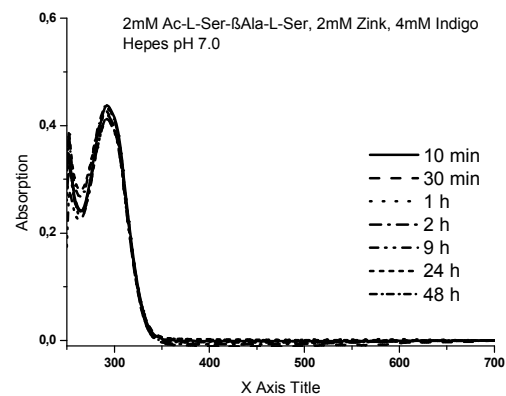
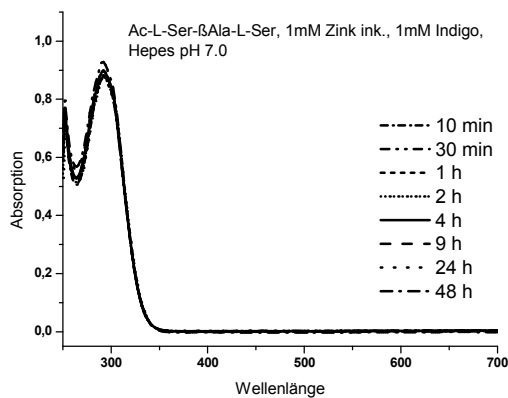


Ac-L-Ser- β Ala-L-Ser-NH₂ und Indigo in HEPES pH 7.0, CHES pH 9.2 und MES pH 5.0 (Peptid auf TentaGel)

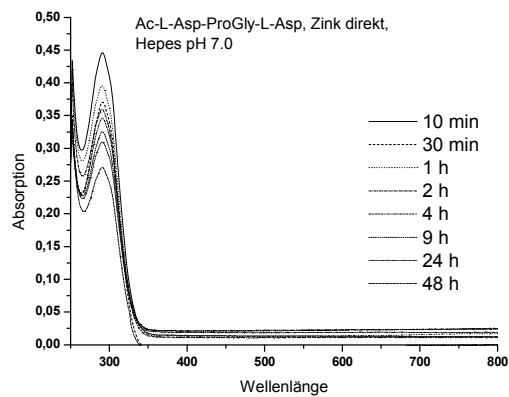
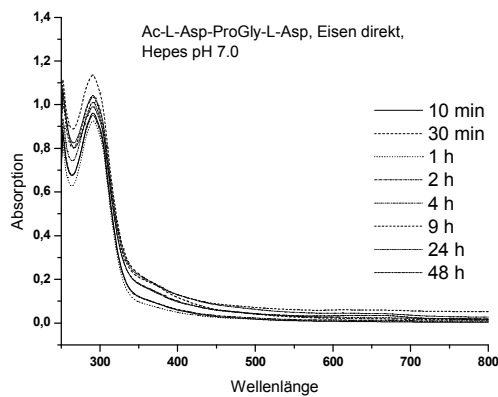




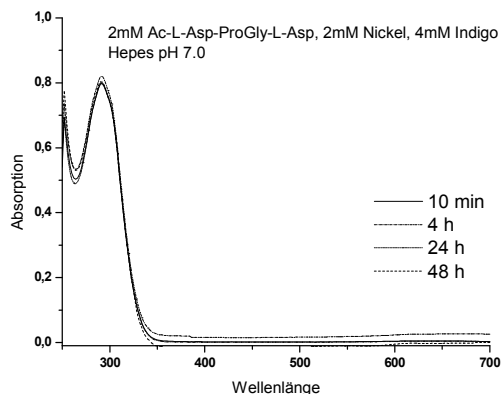
Ac-L-Ser-βAla-L-Ser-NH₂ auf Festphase mit Zink inkubiert (links) und Ac-L-Ser-βAla-L-Ser-NH₂ und Zink in Lösung mit Indigo in HEPES pH 7.0, CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



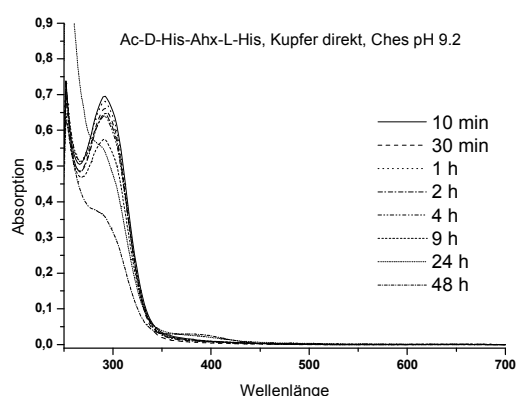
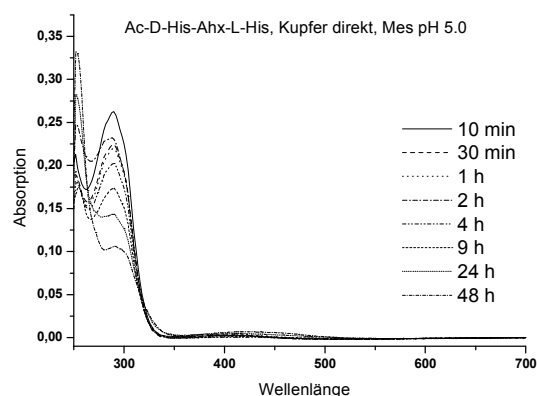
Ac-L-Asp-ProGly-L-Asp-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Eisen und Zink und Indigo in HEPES pH 7.0



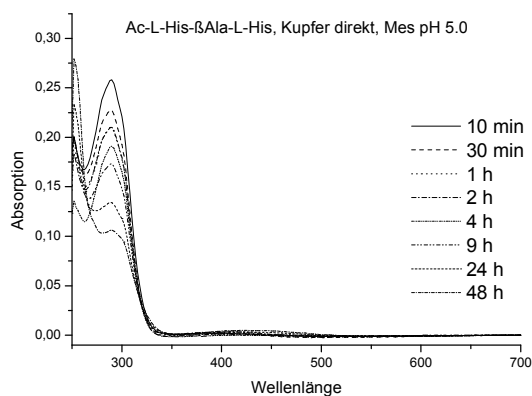
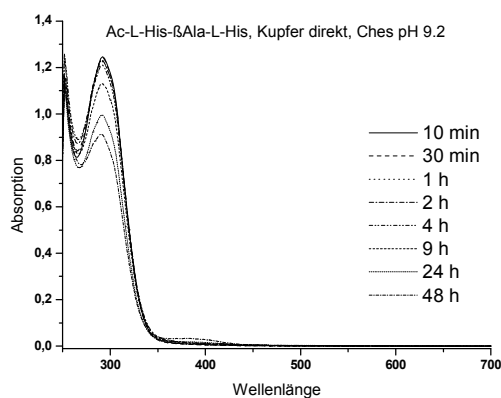
Ac-L-Asp-ProGly-L-Asp-NH₂ und Nickel in Lösung mit Indigo in HEPES pH 7.0



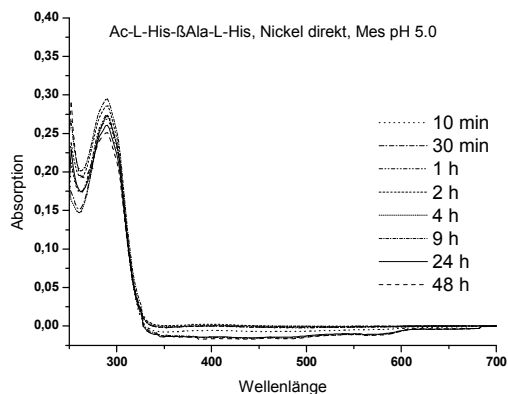
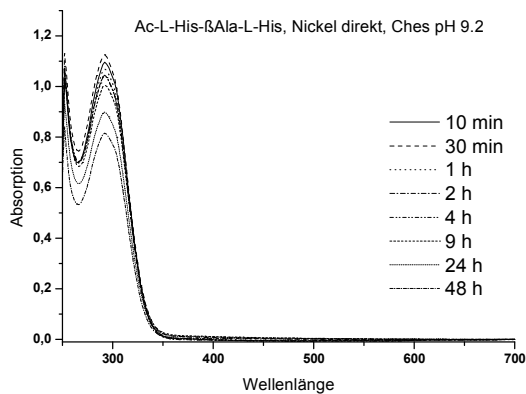
Ac-D-His-Ahx-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Kupfer und Indigo in CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



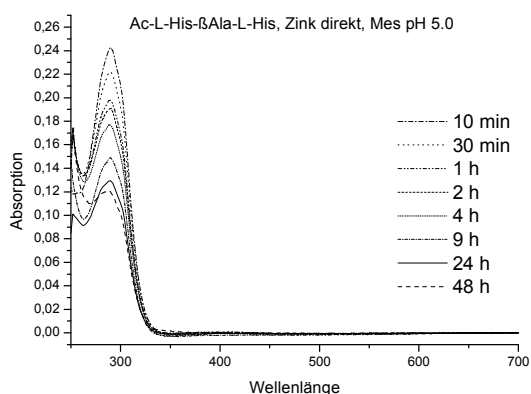
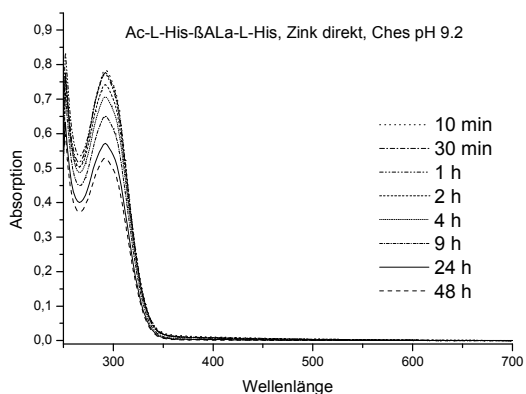
Ac-L-His-βAla-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Kupfer und Indigo in CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



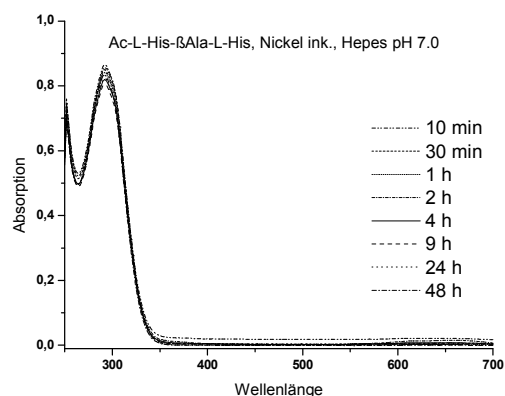
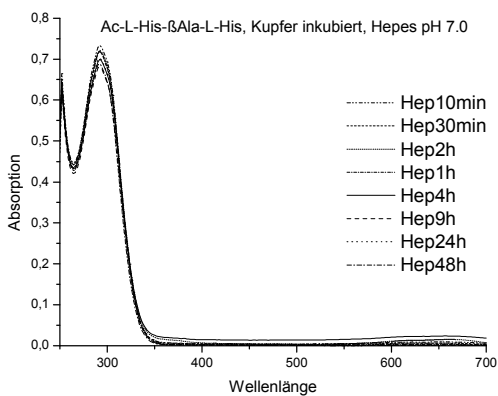
Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Nickel und Indigo in CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



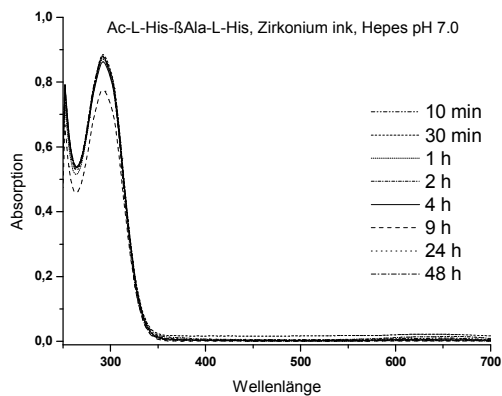
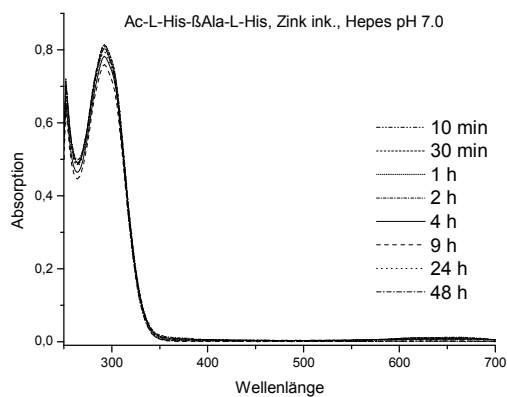
Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Zink und Indigo in CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



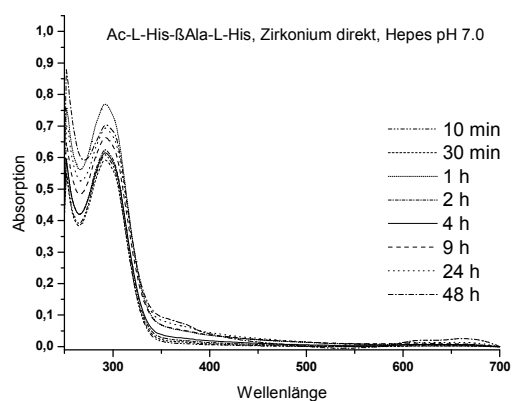
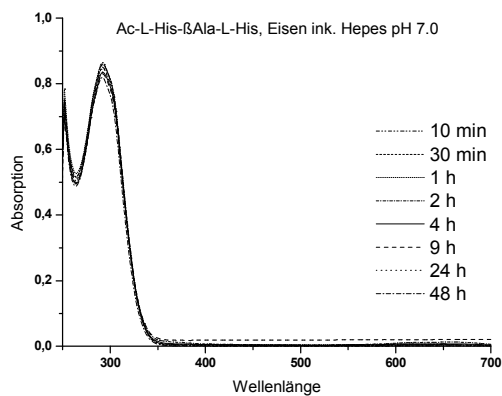
Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase nach Inkubation mit Kupfer und Nickel und direkter Zugabe von Indigo in HEPES pH 7.0



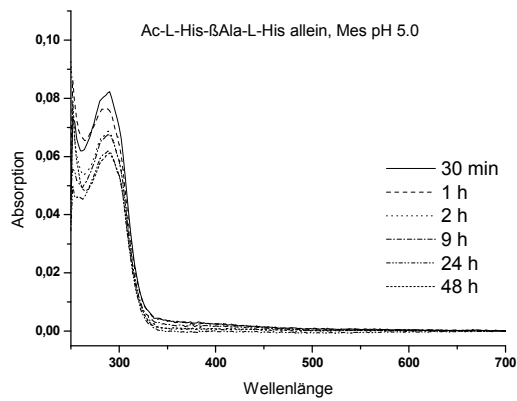
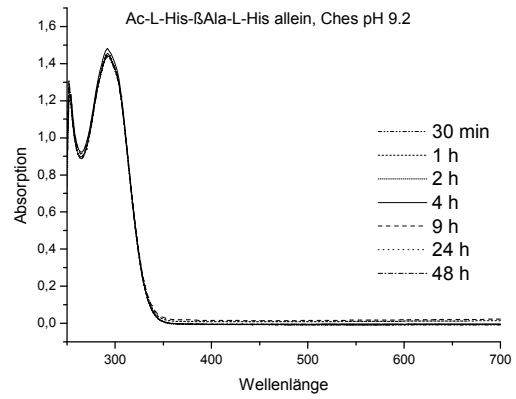
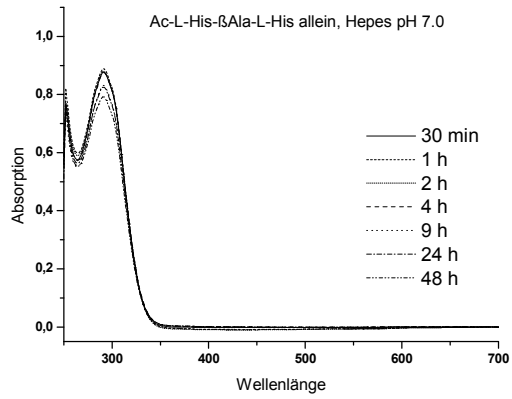
Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase nach Inkubation mit Zink und Zirkonium und direkter Zugabe von Indigo in HEPES pH 7.0



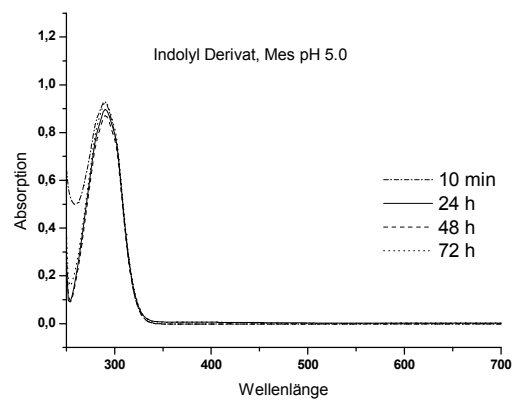
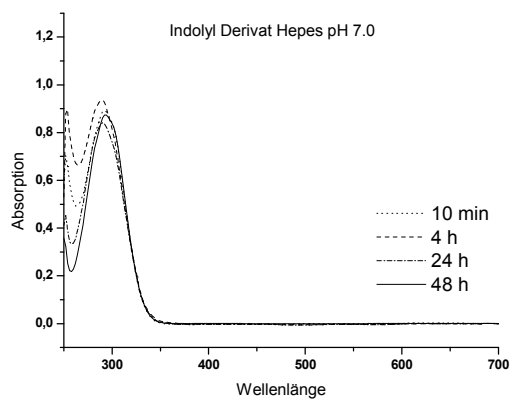
Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase nach Inkubation mit Eisen (links) und direkter Zugabe von Zirkonium (rechts) und Indigo in HEPES pH 7.0

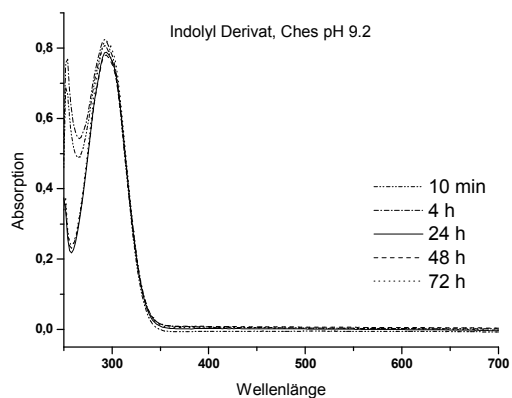


Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ auf Festphase und Zugabe von Indigo in HEPES pH 7.0, CHES pH 9.2 und Mes pH 5.0

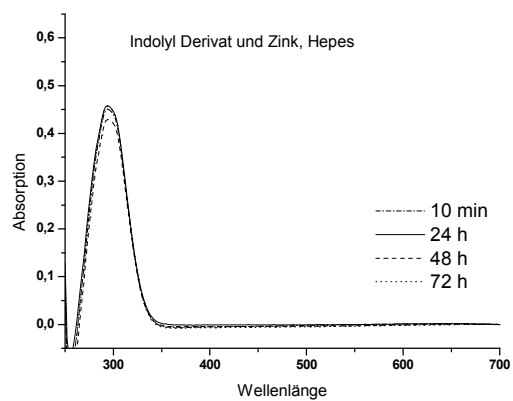
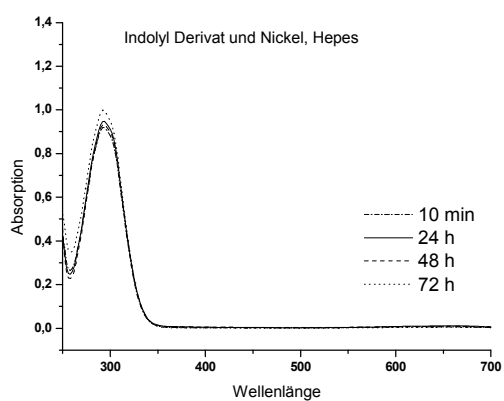
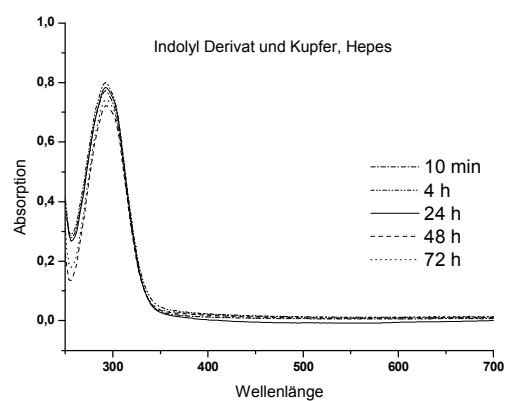
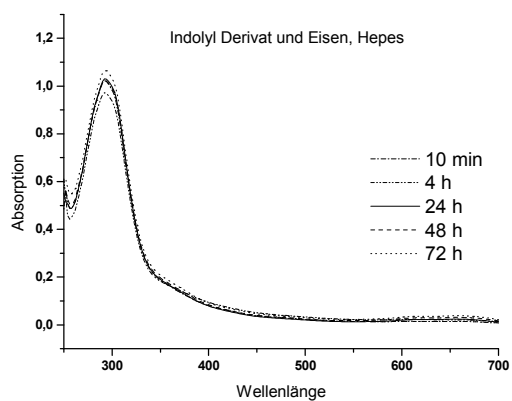


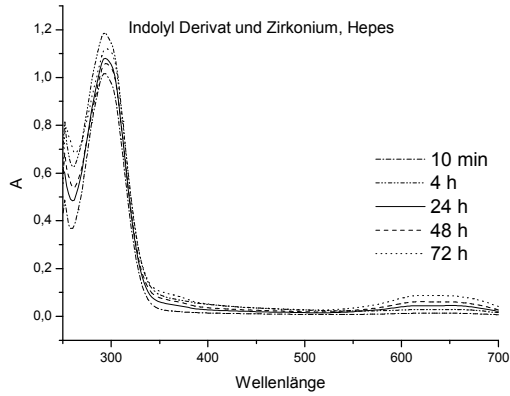
Indolyl-mono-phosphat in HEPES pH 7.0, CHES pH 9.2 und MES pH 5.0



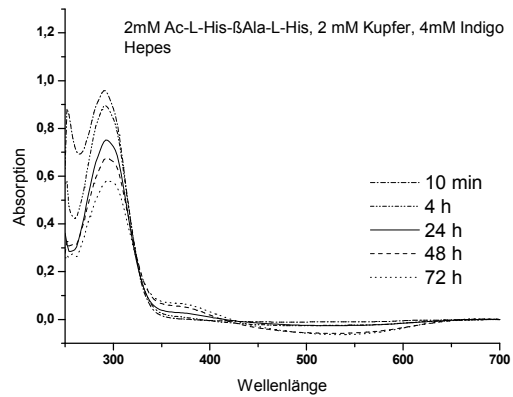
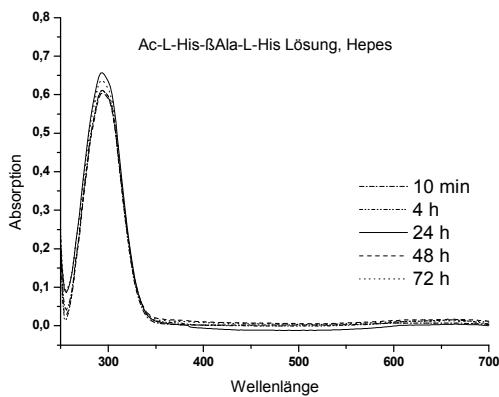


Indolyl-mono-phosphat und einzelne Metalle in HEPES pH 7.0 (in Lösung)

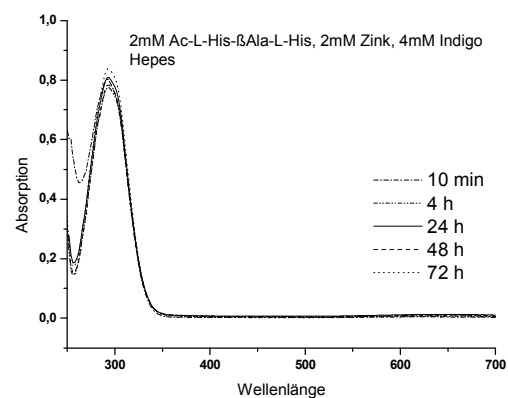
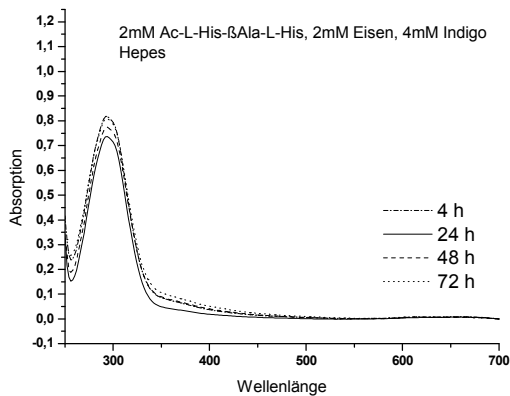




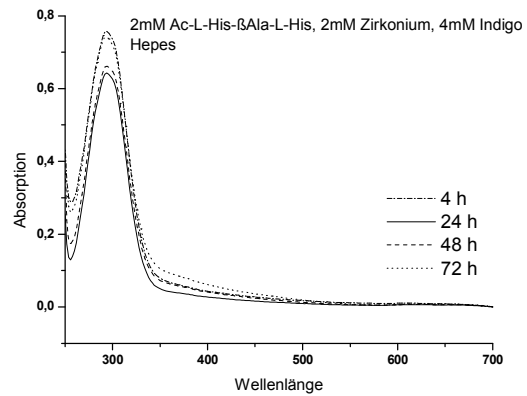
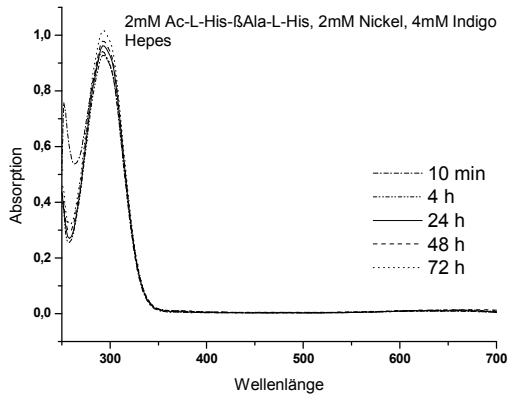
Lösungsstudien von 2 mM Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂ und 2 mM Kupfer mit 4 mM Indigo in HEPES pH 7.0



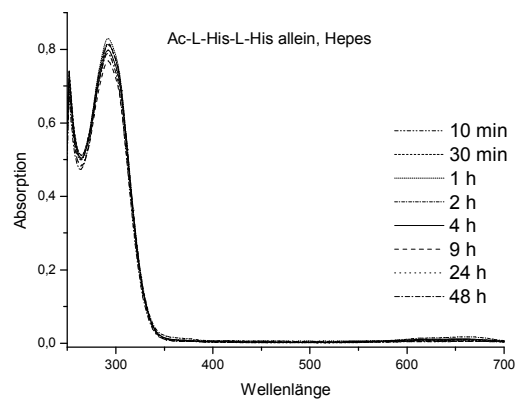
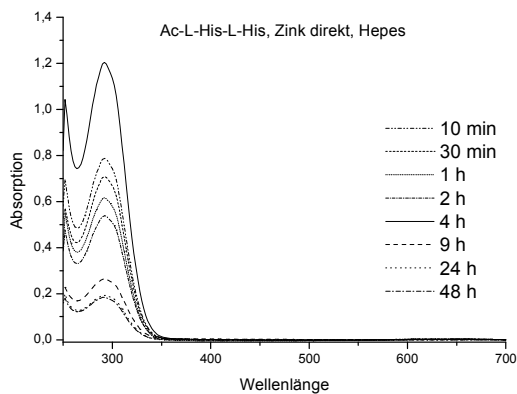
2 mM Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂, 2 mM Eisen und 2 mM Zink mit 4 mM Indigo in Hepes pH 7.0 (Peptid in Lösung)



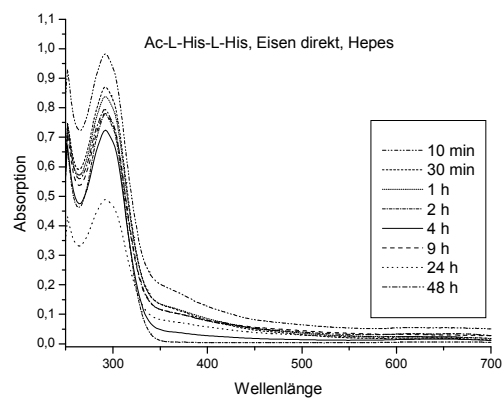
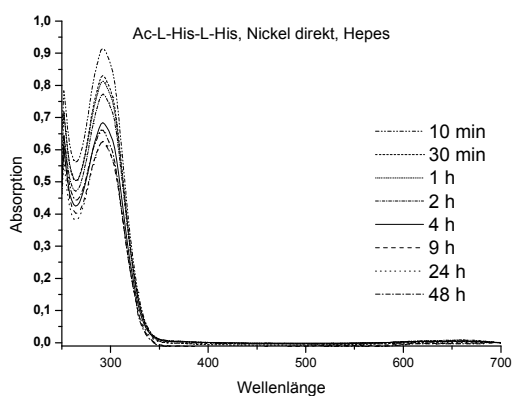
2 mM Ac-L-His- β -Ala-L-His-NH₂, 2 mM Nickel und 2 mM Zirkonium mit 4 mM Indigo in Hepes pH 7.0



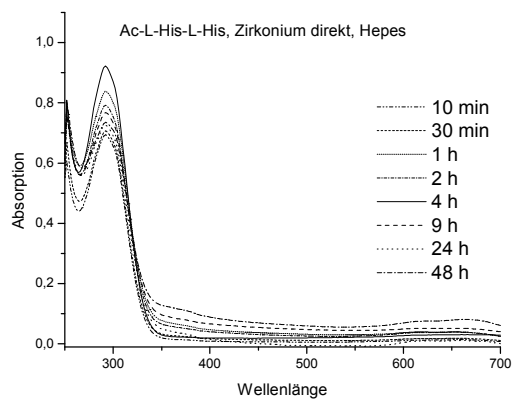
Ac-L-His-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Zink in HEPES pH 7.0



Ac-L-His-L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Nickel (links) und Eisen (rechts) in HEPES pH 7.0

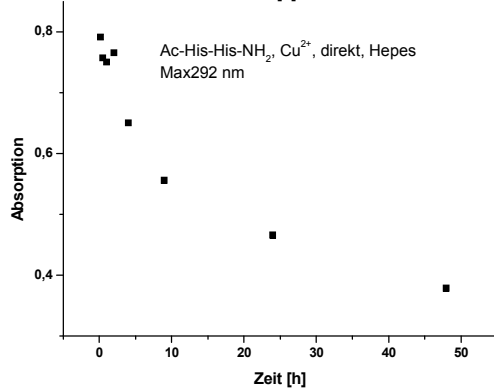
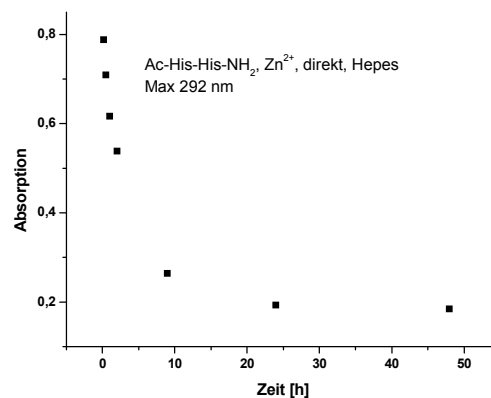
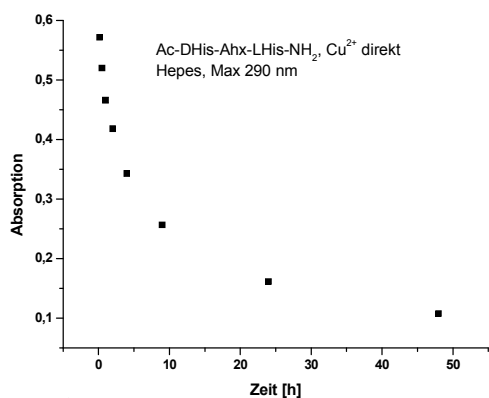


Ac-L-His -L-His-NH₂ auf Festphase nach direkter Zugabe von Zirkonium in HEPES pH 7.0 (Peptid auf TentaGel)



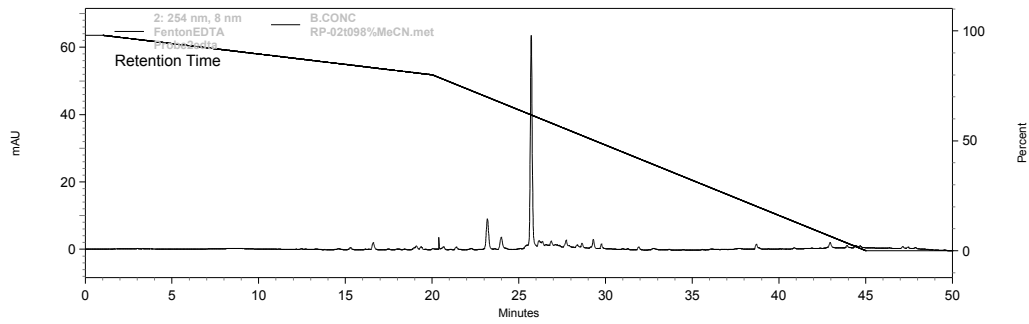
Die Spektren mit dem Dipeptid in Lösung sind nicht abgebildet, da in keinem Fall etwas passiert ist.

Abnahme der Maxima mit der Zeit

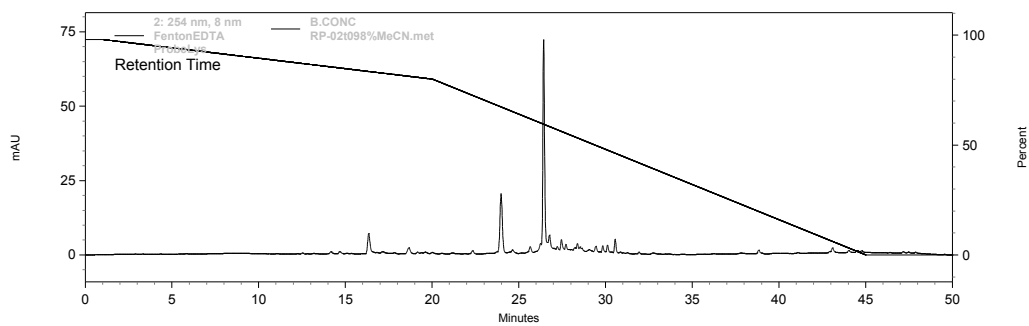


HPLC Sequenzen mit den Fluorophor-Quencher Peptid, Fenton Reaktion

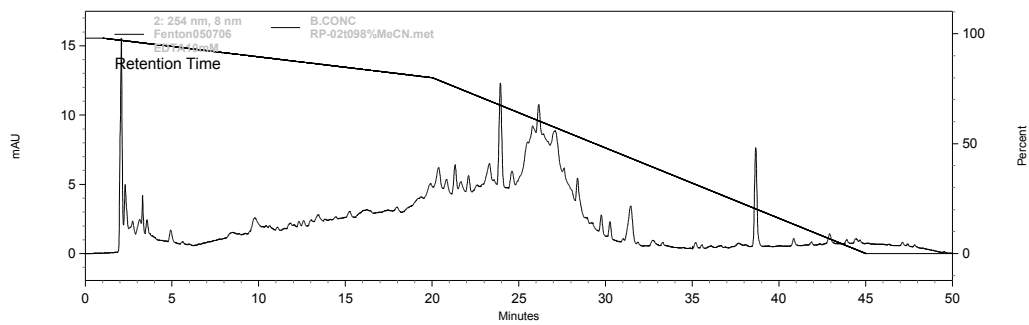
EDTA-Peptid



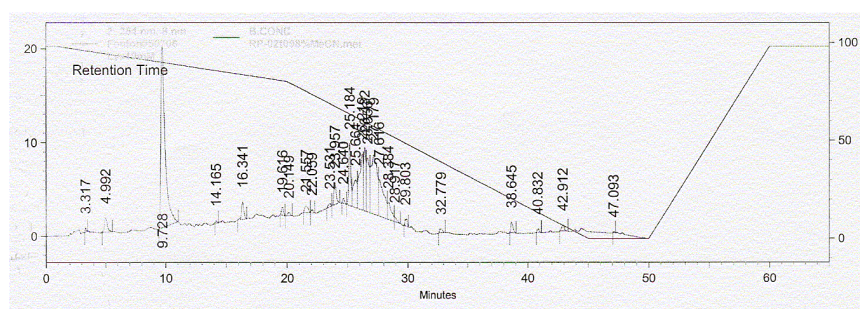
Lysin-Peptid



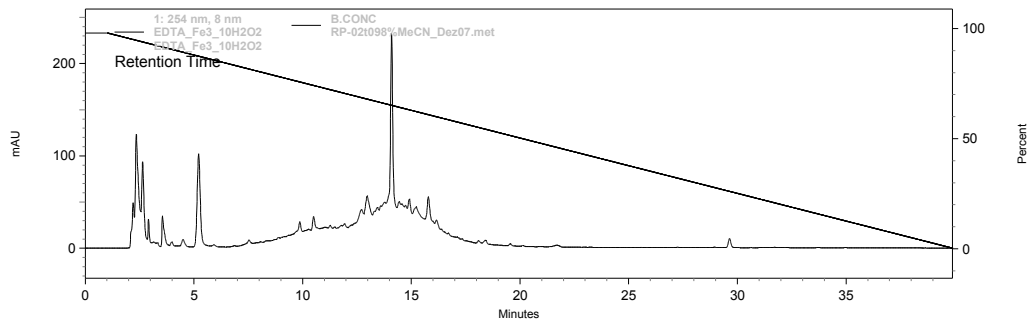
EDTA-Peptid Fenton mit Fe²⁺



Lysin-Peptid Fenton mit Fe²⁺



EDTA-Peptid Fenton mit Fe³⁺



Silber Projekt

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach Lichtreduktion

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	ACHC	L-Tyr	7x
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	3x
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Tyr	4x
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Ser	ACHC	L-Tyr	3x
Ac	D-Ser	ACHC	L-Tyr	4x
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	2x
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	2x
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Ser	5x
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-Ser	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Ser	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser	2x
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Ser	
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	
Ac	D-His	ACHC	L-Ser	
Ac	L-His	Gly	D-Ser	
Ac	D-His	Ahx	L-Ser	
Ac	L-His	Gly	L-Ser	
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Ser	
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	2x
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	
Ac	L-Ser	Gly	L-His	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	D-His	2x
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His	
Ac	L-Tyr	Ahx	D-His	
Ac	L-His	Gly	L-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	L-His	Gly	D-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Asp	

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Pentapeptidbibliothek und Silber nach Lichtreduktion, (rote beads)

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	D-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	Ahx	D-Ser	β -Ala	D-His
Ac	L-Ser	----	D-Ser	ACHC	D-His

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	ACHC	D-Ser	ACHC	D-His
Ac	L-His	β -Ala	D-His	β -Ala	L-His
Ac	L-His	β -Ala	L-Asp	Gly	D-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Ser	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Ser	----	D-Ser
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-Ser	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Ser	Gly	L-Ser	β -Ala	L-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Ser	Gly	L-Tyr	----	L-Ser
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	ACHC	D-Ser
Ac	L-His	ACHC	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Ser	----	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	ACHC	L-Ser
Ac	L-Asp	ACHC	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-His	β -Ala	D-His	β -Ala	D-Ser
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-Ser
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-His	Ahx	L-His	ACHC	L-Ser
Ac	L-His	Gly	L-His	Gly	L-Ser
Ac	D-Ser	β -Ala	L-Ser	Pro-Aib	L-Ser
Ac	D-Ser	ACHC	D-His	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	D-His	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Ser	Gly	D-His	----	L-Tyr
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-Ser	----	L-Ser	Ahx	L-Tyr
Ac	L-His	β -Ala	D-Ser	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	L-Tyr	Ahx	L-Tyr
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	L-Tyr
Ac	L-His	Ahx	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr
Ac	L-Tyr	----	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr
Ac	L-Tyr	β -Ala	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Gly	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Pentapeptidbibliothek und Silber nach Lichtreduktion, (orange beads)

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-His	----	L-His	Gly	L-His
Ac	D-His	----	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-His	----	D-His	----	D-His
Ac	L-His	----	D-His	Ahx	D-His
Ac	D-His	----	D-His	Pro-Gly	L-His
Ac	L-His	----	L-His	Ahx	L-His
Ac	L-His	----	D-His	ACHC	L-His
Ac	L-His	ACHC	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-His	----	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Gly	L-His
Ac	D-His	----	L-His	β -Ala	D-His
Ac	L-His	Gly	L-His	Gly	D-His
Ac	L-His	Gly	D-His	Ahx	L-His

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Tyr	----	L-His	β -Ala	L-His
Ac	L-Tyr	----	L-His	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	β -Ala	D-His	----	D-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-Ser	----	L-His	β -Ala	D-His
Ac	L-Ser	----	D-His	β -Ala	D-His
Ac	D-Asp	Gly	D-His	ACHC	D-His
Ac	L-Asp	Pro-Aib	D-His	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	----	L-Tyr	----	D-His
Ac	D-Ser	----	L-Tyr	----	D-His
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	ACHC	L-His
Ac	L-Ser	Ahx	D-Asp	----	L-His
Ac	D-Ser	Pro-Aib	L-His	Gly	L-Ser
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	Pro-Gly	L-Ser
Ac	L-Ser	Ahx	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-Tyr	Gly	D-His	Pro-Aib	L-Ser
Ac	L-Tyr	Gly	D-Asp	ACHC	L-Ser
Ac	L-Ser	Ahx	D-Ser	Pro-Gly	D-Ser
Ac	L-His	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr	ACHC	L-Tyr

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Pentapeptidbibliothek und Silber nach Lichtreduktion, (gelbe beads)

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	D-His	Ahx	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-His	Pro-Gly	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	Ahx	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	L-Ser	Gly	L-Asp	ACHC	L-His
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	----	D-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-His	Pro-Aib	L-Asp	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Ser	ACHC	D-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	ACHC	D-Asp	ACHC	L-His
Ac	L-Asp	----	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-Asp	----	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Ser	----	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Aib	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	D-Ser	ACHC	L-Asp	Ahx	L-His
Ac	L-Asp	Ahx	D-Asp	β -Ala	L-His
Ac	D-Ser	Ahx	D-Asp	Ahx	D-His
Ac	L-Asp	Ahx	D-Asp	β -Ala	D-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-Ser	Gly	D-His
Ac	L-His	ACHC	L-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Asp	ACHC	D-Ser	Pro-Gly	L-His
Ac	D-Asp	----	L-Tyr	Pro-Gly	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	L-Ser	Gly	L-Tyr	β -Ala	D-His
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	Gly	L-Tyr
Ac	D-Asp	----	D-His	Pro-Aib	L-Tyr
Ac	D-Ser	ACHC	D-Asp	ACHC	L-Tyr
Ac	L-Tyr	----	L-Asp	Gly	L-Tyr
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-Ser	Gly	L-Tyr
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-Tyr	ACHC	L-Tyr
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-Tyr	Gly	L-Ser

	AA3	Linker	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-Tyr	ACHC	L-Ser
Ac	L-His	ACHC	D-Ser	β -Ala	L-Ser
Ac	D-His	β -Ala	D-Ser	Ahx	D-Ser
Ac	L-His		L-Ser	----	L-Ser
Ac	L-Ser	Pro-Gly	L-His	ACHC	D-Ser
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-His	Pro-Gly	D-Ser
Ac	D-Asp	Pro-Aib	L-His	Pro-Aib	D-Ser
Ac	L-Ser	----	D-His	ACHC	L-Ser
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His	Ahx	L-Ser

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat, (gelbgrüne beads)

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-Tyr	ACHC	D-Ser	2x
Ac	L-Tyr	Ahx	D-Ser	
Ac	L-Asp	Gly	D-Ser	
Ac	D-Asp	Ahx	D-Ser	
Ac	D-Ser	ACHC	D-Ser	
Ac	L-Ser	Gly	D-Ser	
Ac	L-His	ACHC	D-Ser	
Ac	L-Tyr	ACHC	L-His	
Ac	D-Asp	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-Ser	Pro-Gly	L-His	
Ac	D-His	ACHC	L-His	

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat, (hellgraue beads)

	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Asp	Pro-Gly	D-His
Ac	D-His	ACHC	L-His
Ac	L-His	ACHC	D-Asp
Ac	L-His	----	D-Asp
Ac	D-His	ACHC	L-Asp
Ac	D-His	Pro-Aib	D-Asp
Ac	D-His	Pro-Aib	L-Asp
Ac	L-His	ACHC	L-Asp

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat, (orange beads)

	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Ser	3x
Ac	L-His	Ahx	L-His	
Ac	D-His	----	D-His	
Ac	D-His	β -Ala	L-His	
Ac	D-His	ACHC	L-His	
Ac	L-Ser	Pro-Aib	L-His	2x
Ac	L-Tyr	----	L-His	
Ac	L-Tyr	----	D-His	

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat, (schwarze beads)

	AA2	Linker	AA1
Ac	L-Ser	β -Ala	D-His
Ac	L-Ser	β -Ala	L-His
Ac	L-Ser	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Tyr	Ahx	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Aib	L-His
Ac	L-Tyr	Pro-Gly	D-His
Ac	L-Asp	β -Ala	L-His
Ac	D-His	Ahx	D-His
Ac	L-His	Pro-Aib	D-His
Ac	D-His	----	L-Tyr
Ac	L-His	β -Ala	L-Tyr

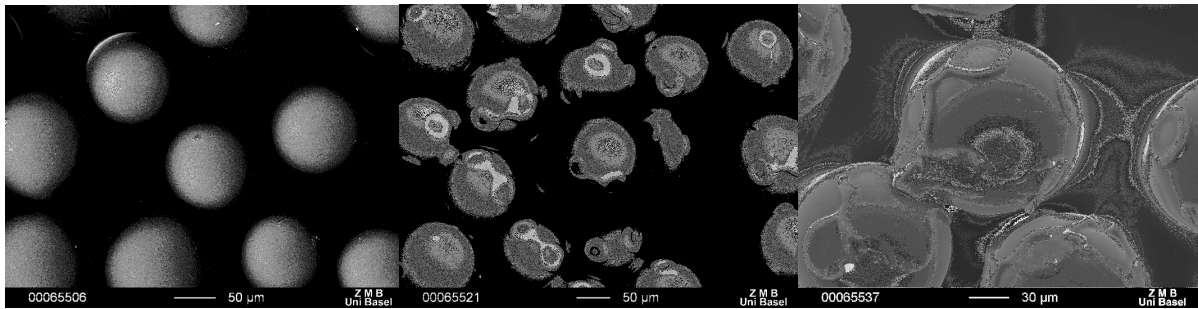
Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Tripeptidbibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat, (rote beads)

	AA2	Linker	AA1	
Ac	D-His	Ahx	L-Asp	2x
Ac	L-His	Ahx	D-Asp	
Ac	D-His	Ahx	D-Asp	
Ac	L-His	Pro-Gly	D-Asp	2x
Ac	D-His	Pro-Gly	L-Asp	
Ac	L-His	Pro-Gly	L-Asp	2x
Ac	D-His	Gly	D-Asp	4x
Ac	L-His	β -Ala	L-Asp	
Ac	L-His	Gly	L-Asp	
Ac	L-Asp	β -Ala	D-His	3x
Ac	D-Asp	β -Ala	L-His	
Ac	D-Asp	β -Ala	D-His	
Ac	D-His	Pro-Gly	D-Asp	2x
Ac	L-His	Gly	D-Asp	
Ac	D-His	Gly	L-His	

Farbe und Silberaufnahme der Pentapeptide nach Licht- und chemischer Reduktion

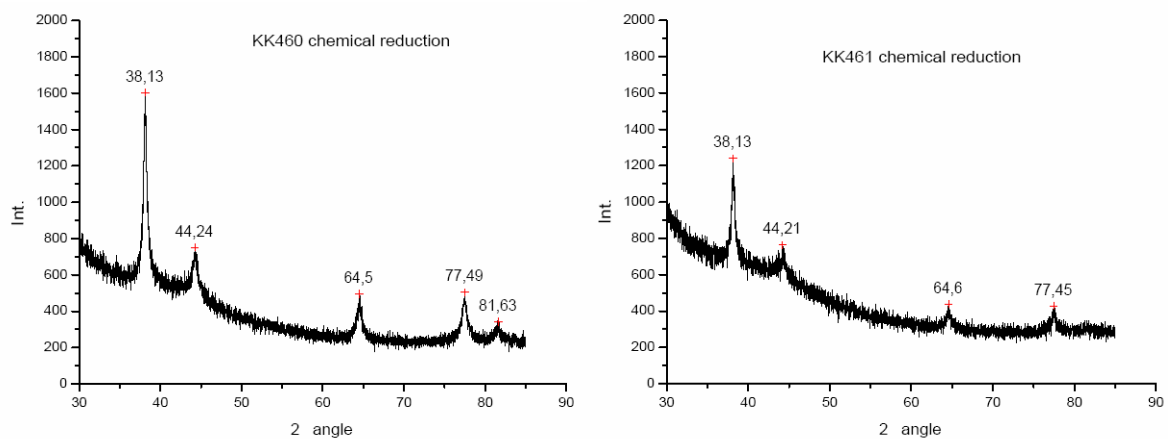
Peptid	Farbe nach Licht Reduktion	Farbe nach chemischer Reduktion	Silber Aufnahme mmolAg/mmolPeptid
AcLTyrProGlyLTyrProGlyLSer	Farblos	Farblos	0.41
AcLHisLHisProGlyDHis	Rotviolett	Schwarz	1.27
AcLSerAhxDAspAhxDHis	Farblos	Dunkelrot	0.36

SEM Aufnahmen der Pentapeptide



Links: *AcLTyrProGlyLTyrProGlyLSer*, Mitte: *AcLHisLHisProGlyDHis*, Rechts:
AcLSerAhxDAspAhxDHis.

Pulverdiffraktogramme von zwei der Pentapeptiden nach chemischer Reduktion



Pulverdiffraktogramme von links: *AcLHisLHisProGlyDHis*; rechts: *AcLSerAhxDAspAhxDHis*.

Analysierte Sequenzen aus der Reaktion mit der Fluorophor-Bibliothek und Silber nach chemischer Reduktion mit Ascorbat

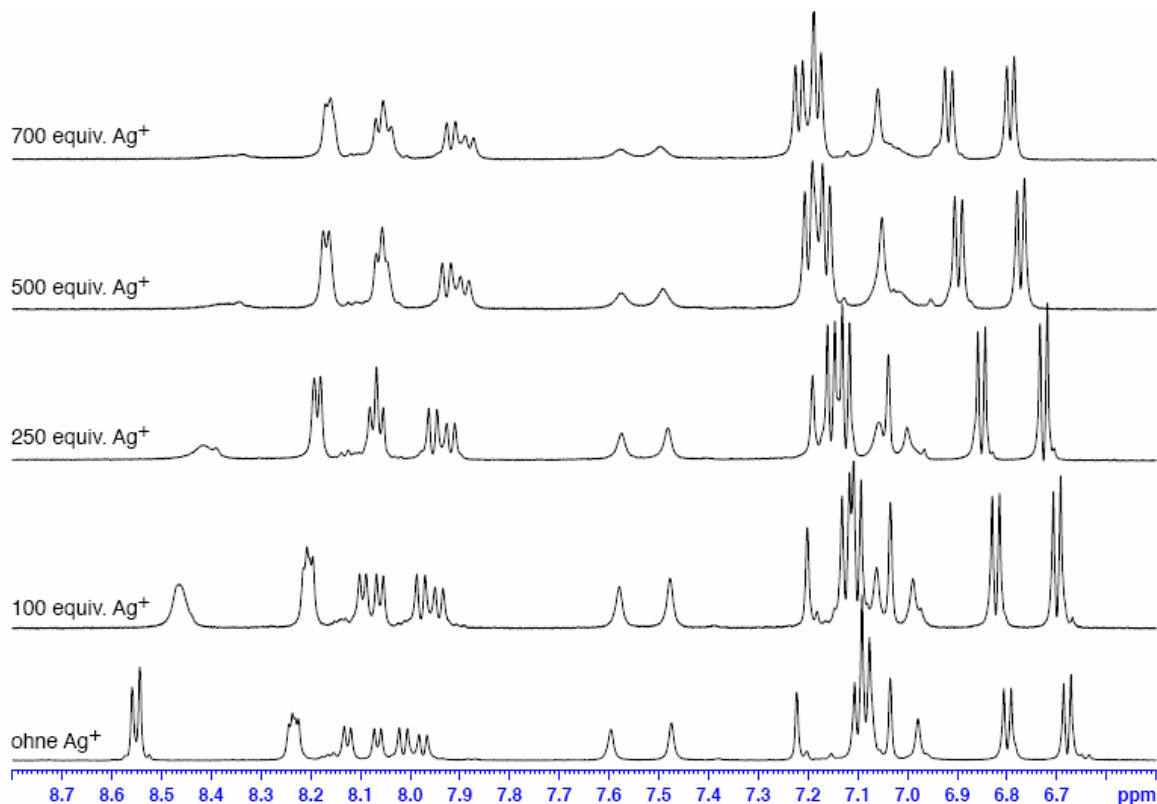
	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-His	L-His	L-Ala	
Ac	L-His	D-Leu	L-Ala	
Ac	D-His	D-Leu	L-Ala	
Ac	D-His	D-His	L-Ser	2x
Ac	D-His	L-His	D-Thr	
Ac	D-His	D-His	L-Phe	
Ac	D-His	L-Phe	L-Pro	
Ac	D-Cys	D-Lys	D-His	
Ac	L-His	D-His	L-His	

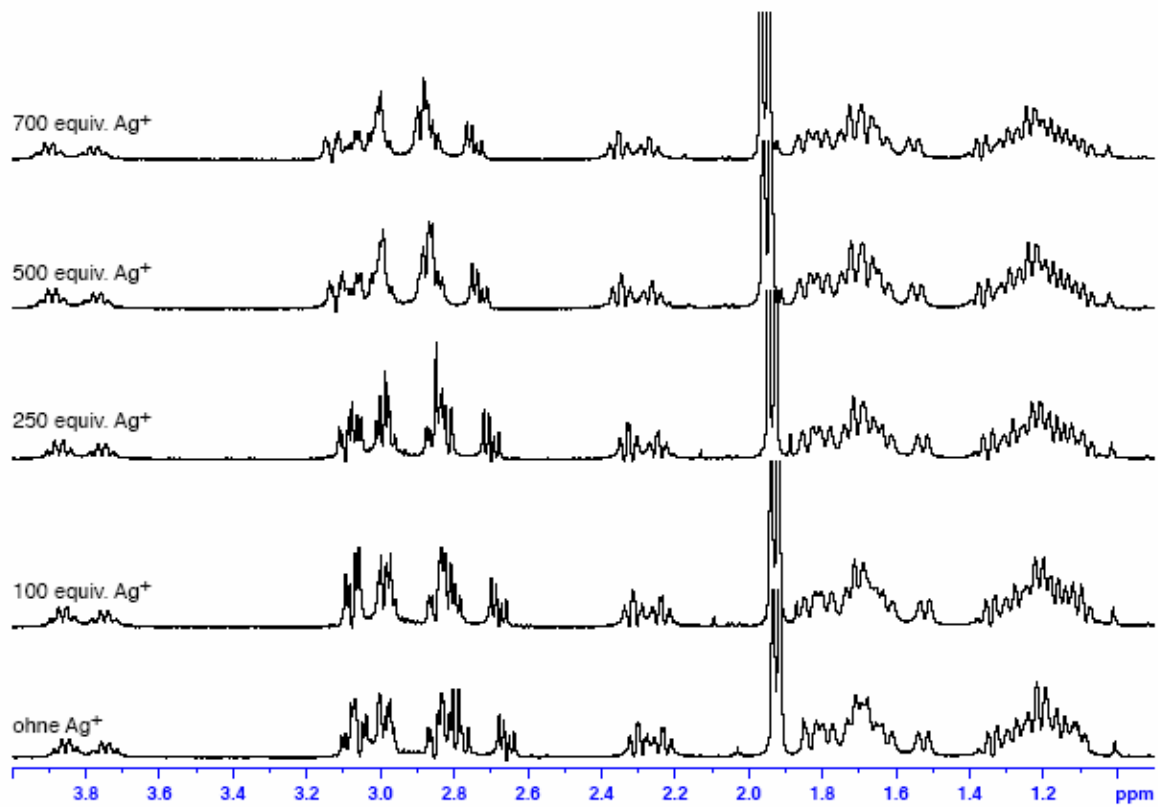
	AA2	Linker	AA1	
Ac	L-His	D-Val	L-His	
Ac	L-Phe	D-His	D-Ala	2x
Ac	L-Asp	D-His	D-Ala	
Ac	L-Arg	L-Thr	D-Gln	
Ac	D-Glu	D-Gln	L-Gln	
Ac	L-His	D-Pro	L-Ser	
Ac	D-His	D-Ser	D-Glu	
Ac	D-Lys	D-His	D-Arg	

NMR Titration, Signalverschiebungen im ppb Bereich

Die Verschiebung ergibt sich aus der Differenz von der Messung von 700 eq Silber zur Messung von reinem Peptid.

H ϵ -His (180 ppb), NH-Tyr (67.4 ppb), NH-His (63.5 ppb), NH-ACHC (97.2 ppb), NH₂-Terminus (-21.2/35.2 ppb), H δ -His (-22.8 ppb), H ϵ -Tyr (-110 ppb), H α -His (-64.1), H α -Tyr (-9.7), H1-ACHC (-41.4), H2-ACHC (-50.8), Acetyl (-30.7), H δ -Tyr (-131 ppb), H β -Tyr (-24.0/ -77.1 ppb), H β -His (-28.1/ -81.7 ppb).





Dipl.-Chem. Kirsten Belser (geborene Koch)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Peptid-Metall-Wechselwirkungen-
Anwendung selektiver Bindung zur Esterhydrolyse und Bildung von Silber-Nanopartikeln“

nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Universität und keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.

Basel, den 05. 02. 2008

Kirsten Belser

An meiner Hochschulausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Universität des Saarlandes:

Prof. Dr. Theophil Eicher, PD Dr. Andreas Speicher, Prof. Dr. Kaspar Hegetschweiler, Prof. Dr. Michael Veith, Prof. Dr. Horst Philipp Beck, Prof. Dr. Hans-Jörg Schneider, Prof. Dr. Heinz Dürr, Prof. Dr. Uli Kazmeier, Prof. Dr. Rita Bernhardt, Prof. Dr. Gerhard Wenz, Prof. Dr. Hans Dieter Breuer, Prof. Dr. Rolf Hempelmann, Prof. Dr. Michael Springborg, PD Dr. Hans Werner Adolph, Prof. Dr. Heinz Engelhardt, Prof. Dr. Uwe Hartmann,

Universität Basel:

Prof. Dr. Helma Wennemers

CURRICULUM VITAE

Nationalität: Deutsch
Geburtstag: 1. September 1977 (Saarbrücken, Deutschland)
Familienstand: verheiratet (Mädchenname Koch)

Ausbildung

09/ 2003 – 2007 Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Helma Wennemers (Universität Basel, Schweiz)
07/ 2002 – 02/ 2003 Diplomarbeit unter der Leitung von Dr. Hans-Werner Adolph (Universität des Saarlandes, Deutschland)
10/ 1997 – 02/ 2003 Chemiestudium (Universität des Saarlandes, Deutschland)
06/ 1997 Abitur (Marienschule Saarbrücken, Deutschland)

Lehrtätigkeit

10/ 2004 – 02/ 2007 Assistentin im Organisch-Chemischen Praktikum für Studierende der Biologie und Pharmazeutischen Wissenschaften an der Universität Basel
03/ 2003 – 07/ 2003 Chemie-Lehrerin im “Studienkolleg der Universität des Saarlandes”
03/ 2003 – 08/ 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gruppe von Dr. Hans-Werner Adolph (Universität des Saarlandes, Deutschland)

Forschungstätigkeit

08/ 2001 – 12/ 2001 Hilfs-Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Horst Philipp Beck im Institut für “Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie” (Universität des Saarlandes, Deutschland)