

Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Modifizierung des
allergen Potentials von Kirsch- und
Erdnussproteinen durch nicht-enzymatische
Glycosylierung und enzymatische Bräunung**

Patrick Gruber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Thomas Hofmann,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster

Die Dissertation wurde am 23.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.02.2006 angenommen.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis Oktober 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Garching bei München durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hofmann, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, seine wertvollen Anregungen und die hervorragende Betreuung sowie das rege Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W.-M. Becker und Herrn Dr. M. Suhr vom Forschungszentrum Borstel für die Überlassung von Untersuchungsmaterial, die wertvollen Ratschläge und die gute Zusammenarbeit. Gleiches gilt für Herrn Prof. Dr. Vieths und Frau A. Wangorsch vom PAUL-EHRLICH-Institut in Langen, wo ich zwei sehr lehrreiche und angenehme Forschungsaufenthalte verbringen durfte. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die Förderung der Arbeit bedanken.

Herr PD Dr. P. Köhler und die Mitglieder der „Tee-Runden“ - Frau Dr. S. Antes, Frau Dr. N. Bauer, Herr Dr. A. Freisleben, Frau Dr. C. Gellrich, Herr Dr. G. Helmerich, Herr Dr. M. Lindenmeier, Herr M. Piber, Frau Dr. K. Schliekelmann, Frau Dr. A. Setrdle und Herr F. Schurer - trugen durch den intensiven Erfahrungsaustausch und die konstruktiven Beiträge maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Forschungsanstalt und des Institutes für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders danke ich meinen Laborkollegen Herrn Dr. I. Heberle, Herrn Dr. G. Helmerich, Herrn Dr. M. Lindenmeier und Frau Dr. A. Setrdle für das angenehme Arbeitsklima.

Bei Frau I. Otte bedanke ich mich sehr herzlich für Ihre unermüdliche Unterstützung und intensive Einweisung in die LC-Massenspektrometrie.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren gilt mein Dank dem NMR-Team um Herrn Dr. M. Steinhaus, Herrn Dr. O. Frank und Herrn T. Stark. Ebenso danke ich Herrn H. Krause vom Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München für die MALDI-TOF-Spektren, Frau A. Köhler für die Durchführung der EDMAN-Sequenzierungen und Herrn D. Börger für die Berechnung der energieminierten 3D-Strukturen. Herrn Dipl.-Ing. D. Noa danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung eines Delphi-Programms zur Massen- und Fragmentierungsberechnung. Bei Herrn Dr. J. Bergmann und Frau Dr. A. Setrdle bedanke ich mich für das große Engagement bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. J. Bergmann, Herrn Dr. I. Heberle, Herrn Dr. M. Lindenmeier und Frau Dr. A. Setrdle für den steten Zuspruch und die freundschaftliche Unterstützung.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Kenntnisstand der Lebensmittelallergie</i>	1
1.2	<i>Die Allergie auf Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>)</i>	3
1.3	<i>Die Allergie auf Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)</i>	5
1.4	<i>Stabilität von Lebensmittelallergenen</i>	8
1.5	<i>Reaktionsabläufe der MAILLARD-Reaktion</i>	10
1.6	<i>Multiple Antigenpeptide (MAP)</i>	17
1.7	<i>Problemstellung</i>	18
2	Ergebnisse	21
2.1	<i>Untersuchungen zum Hauptallergen Pru a 1 der Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>)</i>	21
2.1.1	Einfluss von Hitze und der MAILLARD-Reaktion auf rPru a 1	21
2.1.2	Entwicklung eines neuen ELISA auf CovaLink-Basis	28
2.1.3	Einfluss der enzymatischen Bräunung auf rPru a 1	30
2.1.4	Diskussion	32
2.2	<i>Untersuchungen zu Proteinen aus der Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)</i>	35
2.2.1	Einfluss der MAILLARD-Reaktion und der enzymatischen Bräunung auf Erdnusslectin	35
2.2.2	Einfluss der MAILLARD-Reaktion auf rAra h 2	42
2.2.3	Einfluss der MAILLARD-Reaktion auf die IgE-Bindungsaffinität von Ara h 2-Partialsequenzen	49
2.2.3.1	<i>Immunologische Untersuchung von Peptiden</i>	49
2.2.3.2	<i>Untersuchungen zu den lysinhaltigen Sequenzabschnitten von Ara h 2</i>	51
2.2.3.3	<i>Untersuchungen zum N-Terminus von Ara h 2</i>	54
2.2.3.4	<i>Untersuchungen zum Epitop 3 von Ara h 2</i>	57
2.2.3.5	<i>Untersuchungen zum Epitop 6 von Ara h 2</i>	63
2.2.3.6	<i>Untersuchungen zum Epitop 7 von Ara h 2</i>	70
2.2.4	Einfluss der enzymatischen Bräunung auf rAra h 2	79
2.3	<i>Synthese von modifizierten Peptiden</i>	83
2.3.1	Vorüberlegungen	83
2.3.2	Synthese von CML- und CEL-Peptiden	84
2.3.3	Synthese N-terminal modifizierter Peptide	91
2.3.4	Synthese von Dehydroalanin- und Lanthionin-Peptiden	94
2.3.5	Synthese von Peptiden mit AGE-Modifikationen des Arginins	102
2.3.6	Diskussion	126
2.4	<i>Synthese von Multiplen Antigenpeptiden und Gewinnung spezifischer Antisera</i>	129
2.4.1	Synthese Multipler Antigenpeptide	129
2.4.2	Gewinnung eines epitopspezifischen Antiserums gegen MAP3	131
2.4.3	Erkennung der MAPs durch verschiedene Sera	135
2.4.4	Synthese von MAPs mit CML-Peptiden	138
2.4.5	Diskussion	141
3	Material und Methoden	143

3.1	<i>Reagenzien und Materialien</i>	143
3.1.1	Chemikalien	143
3.1.2	Materialien	147
3.2	<i>Analytische Geräte</i>	147
3.3	<i>Weitere Geräte</i>	149
3.4	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften</i>	149
3.4.1	Durchführung der Modellansätze.....	149
3.4.1.1	<i>Allergen/Peptide-Kohlenhydrat-Reaktionsmischungen</i>	149
3.4.1.2	<i>Aufreinigung von Bräunungsansätzen und Peptid-Lösungen mit RP-C18-Kartuschen</i>	149
3.4.1.3	<i>Allergen/Polyphenole/PPO-Reaktionsmischungen</i>	150
3.4.1.4	<i>Peptide/Polyphenole/PPO-Reaktion an fester Phase</i>	150
3.4.1.5	<i>Carboxymethylierung von Allergenen</i>	150
3.4.2	Immobilisierung von Proteinen und Peptiden.....	150
3.4.2.1	<i>Kupplung von Peptiden und Proteinen an bromcyanaktivierte Nitrocellulose mit Detektion einer IgE-Bindung (DotBlot)</i>	150
3.4.2.2	<i>Kopplung von Allergenen an bromcyanaktivierte Papierscheiben</i>	151
3.4.2.3	<i>Kupplung von Peptiden und Proteinen an CovaLink-Platten</i>	151
3.4.2.4	<i>Belegung von MaxiSorb-Platten mit Allergenen</i>	152
3.4.3	ELISA.....	152
3.4.3.1	<i>Direkter ELISA</i>	152
3.4.3.2	<i>Enzym-Allergosorbens-Test (EAST); Inhibitionsversuche</i>	153
3.4.4	Elektrophoresen.....	153
3.4.4.1	<i>Diskontinuierliche SDS-PAGE</i>	153
3.4.4.2	<i>Western-Blot</i>	155
3.4.5	Peptidfestphasensynthesen	155
3.4.5.1	<i>Festphasensynthese von Peptiden an WANG-Harz</i>	155
3.4.5.2	<i>Festphasensynthese von Peptiden an 2-Chlortritylchlorid-Harz</i>	155
3.4.5.3	<i>Austausch der N-terminalen Fmoc-Gruppe gegen Boc</i>	156
3.4.5.4	<i>Abspaltung N-terminaler Fmoc-Gruppen von Hand</i>	156
3.4.5.5	<i>Kondensation von Fmoc-Aminosäuren oder Fragmenten von Hand</i>	156
3.4.5.6	<i>Selektive Abspaltung von Dde- und ivDde-Gruppen</i>	156
3.4.5.7	<i>Spaltung von Peptiden von WANG-Harz unter Entfernung aller Schutzgruppen</i>	156
3.4.5.8	<i>Spaltung von Peptiden von 2-Chlortritylharzen unter Erhalt aller Schutzgruppen</i>	157
3.4.5.9	<i>Peptid-Spot-Library</i>	157
3.5	<i>Synthesen</i>	158
3.5.1	Synthese von Standard-Peptiden.....	158
3.5.2	Synthese von Bausteinen und Derivatisierungsreagenzien	161
3.5.2.1	<i>(S)-6-((tert.-Butoxycarbonyl)-(2-tert.-butoxy-2-oxoethyl)amino)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure</i>	161
3.5.2.2	<i>(S)-6-((tert.-Butoxycarbonyl)-(2-tert.-butoxy-1-methy-2-oxoethyl)amino)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure</i>	163
3.5.2.3	<i>Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH</i>	164
3.5.2.4	<i>N,N'-Di-Boc-N-methcarboxymethyl-S-methylisothioharnstoff</i>	165
3.5.2.5	<i>N,N'-Di-Boc-N-tert.-butcarboxymethyl-S-methylisothioharnstoff</i>	165
3.5.2.6	<i>N,N'-Di-Boc-N-(1-methcarboxyethyl)-S-methylisothioharnstoff</i>	166
3.5.2.7	<i>N,N'-Di-Boc-N-(1-tert.-butcarboxyethyl)-S-methylisothioharnstoff</i>	167
3.5.2.8	<i>5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4H-imidazol-4-on</i>	167

3.5.3	Synthese von modifizierten Peptiden.....	168
3.5.4	Synthese von Multiplen Antigenpeptiden.....	186
4	Zusammenfassung.....	189
5	Literaturverzeichnis.....	191
6	Anhang.....	203

Abkürzungen

2-Cl-Trt	2-Chlortrityl
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Api g 1	Hauptallergen aus Sellerie (<i>Apium graveolens</i>)
Ara h 1/2/3/4/5/6/7	Allergene aus Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bet v 1/2	Allergene aus Birkenpollen (<i>Betula v</i>)
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
Bzl	Benzyl
CBS	Citratgepufferte Kochsalzlösung
CD	Circulardichroismus
Cor a 1.0401	Hauptallergen aus Haselnüssen (<i>Corylus avellana</i>)
d	Dublett (NMR-Daten)
Dau c 1	Hauptallergen aus Karotte (<i>Daucus carota</i>)
DBF	Dibenzofulven
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-1-cyclohexyliden)-ethyl
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPCDI	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dptu	<i>N,N'</i> -Diphenylthioharnstoff (diphenyl thiourea)
EAST	Enzym-Allergosorbent-Test
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epic	Epicatechin
eq	Äquivalent(e)
ESI-MS	Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry
Fmoc	9'-Fluorenylmethoxycarbonyl

Fru	Fructose
Glu	Glucose
Gly	Glyoxal
HNE	4-Hydroxy-(<i>E</i>)-2-nonenal
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Konzentration für 50 %ige Inhibition
IgE	Immunglobuline Typ E
ivDde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-1-cyclohexyliden)-3-methylbutyl
kDa	Kilodalton
M	Masse des Hauptisotopomers
Mal	Maltose
Mal d 1	Hauptallergen aus Apfel (<i>Malus domestica</i>)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MAP	Multiple Antigenpeptide
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MDA	Malondialdehyd
MeGly	Methylglyoxal
M _m	Monoisotopische Molekularmasse
M _{rel}	Relative Molekularmasse
MS	Massenspektrometrie
MTBE	<i>tert.</i> -Butylmethylether
MTT	(Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMA	Nahrungsmittelallergie
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NSB	Nicht-spezifische Bindung
OAS	Oral Allergy Syndrome
O ^t Bu	<i>tert.</i> -Butoxy
PAM	4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PEC	Pyridylethylcystein
PEI	PAUL-EHRILCH-Institut
Pip.	Piperidin
PNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PPO	Polyphenoloxidase
PR-10-Proteine	Pathogenesis Related Proteins
Pru a 1	Hauptallergen aus Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>)
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pyr c 1	Hauptallergen aus Birne (<i>Pyrus communis</i>)
q	Quartett (NMR-Daten)
rAra h 2	Rekombinantes Ara h 2
Rib	Ribose
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
rPru a 1	Rekombinantes Pru a 1
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR-Daten)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
Sulfo-NHS	2-Sulfo- <i>N</i> -hydroxysuccinimid
t	Triplett (NMR-Daten)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	Trisgepufferte Saline Kochsalzlösung mit Tween 20
TBSTB	Trisgepufferte Saline Kochsalzlösung mit Tween 20 und BSA
^t Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
u	Atomare Masseneinheit

Die natürlichen Aminosäuren

Dreibuchstaben- code	Aminosäure	Einbuchstaben -code	für die Fmoc-SPPS verwendete Schutzgruppe in der Seitenkette
Ala	Alanin	A	-
Arg	Arginin	R	Pbf
Asn	Asparagin	N	Trt
Asp	Asparaginsäure	D	O ^t Bu
Cys	Cystein	C	Trt
Gln	Glutamin	Q	Trt
Glu	Glutaminsäure	E	O ^t Bu
Gly	Glycin	G	-
His	Histidin	H	Trt
Ile	Isoleucin	I	-
Leu	Leucin	L	-
Lys	Lysin	K	Boc
Met	Methionin	M	-
Phe	Phenylalanin	F	-
Pro	Prolin	P	-
Ser	Serin	S	^t Bu
Thr	Threonin	T	^t Bu
Trp	Tryptophan	W	(Boc)
Tyr	Tyrosin	Y	^t Bu
Val	Valin	V	-
βAla	β-Alanin		-
Har	Homoarginin		-
Orn	Ornithin		Boc

Modifizierte Aminosäuren

Abkürzung	Struktur
CEA	Carboxyethylarginin XXI
CEL	Carboxyethyllysin XIII
CMA	Carboxymethylarginin XVI
CML	Carboxymethyllysin XII
Cys(O ₃ H)	Cysteinsäure
CysO ₂	Cystein- <i>S</i> -sulfon
Dha	Dehydroalanin (2-Aminopropensäure)
Glarg	(<i>S</i>)-2-Amino-5-(2-imino-5-oxoimidazolidin-1-yl)-pentansäure XV
π -Hal	π -Histidinoalanin (2-Amino-3-(5-(2-amino-3-oxobutyl)-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)propansäure)
τ -Hal	τ -Histidinoalanin (2-Amino-3-(4-(2-amino-3-oxobutyl)-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)propansäure)
Lal	Lysinoalanin (2-Amino-6-((2-amino-2-carboxyethyl)amino)hexansäure)
Lan	Lanthionin (2-Amino-3-((2-amino-2-carboxyethyl)thio)propansäure)
MG-H1	(<i>S</i>)-2-Amino-5-[(5-methyl-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)amino]-pentansäure XVIII
MG-H2	(<i>S</i>)-2-Amino-5-(2-amino-5-methyl-4-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-pentansäure XIX
MG-H3	(<i>S</i>)-2-Amino-5-(2-amino-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-pentansäure XX

Zur Nomenklatur von Aminosäurederivaten wird der Dreibuchstabencode verwendet. Bei freiem N-Terminus wird diesem Code das Präfix „NH-“ vorangestellt, bei freiem C-Terminus das Suffix „-OH“ nachgestellt. Bei Modifizierungen an diesen Positionen werden diese endständigen Gruppen durch die Abkürzung der entsprechenden Gruppe ersetzt. Befindet sich eine zusätzliche Gruppe an der Seitenkette, so wird eine entsprechende Bezeichnung zwischen Aminosäure und C-Suffix in Klammern eingefügt. Beispielsweise bedeutet Ac-Lys(Boc)-OH, dass die α -Aminogruppe des Lysins acetyliert vorliegt, während die Aminofunktion der Seitenkette mit Boc geschützt ist. Die C-terminale Säuregruppe ist nicht modifiziert.

Für Aminosäuren innerhalb der Peptide wird sowohl die Ein- als auch Dreibuchstabencodierung verwendet. Im Gegensatz zu freien Aminosäuren werden die N- und C-Termini von Peptiden nur dann gesondert bezeichnet, wenn sie modifiziert sind. Liegt innerhalb eines vollständig geschützten Peptides die Seitenkette von Ornithin bzw. Lysin frei vor, so wird diese abweichend mit (\emptyset) indiziert.

1 Einleitung

1.1 Kenntnisstand der Lebensmittelallergie

Seit vielen Jahren beobachten Ärzte in den Industrieländern eine Zunahme von Allergien bzw. der genetischen Disposition zu allergischen Reaktionen (Wüthrich, 1991). Diese äußern sich vor allem in Reaktionen der Haut, der Schleimhäute und des Magen-Darm-Traktes sowie in allergischem *Asthma bronchiale*. Über die Häufigkeit allergischer Erkrankungen gibt es vielfältiges Datenmaterial. Exakte Ergebnisse sind jedoch schwierig zu erhalten, da der klinische Nachweis besonders bei uncharakteristischen Beschwerden nicht einfach ist. Gut untersucht sind Pollenallergien, die die häufigste Allergieform darstellen. In der Schweiz liegt deren Häufigkeit bei etwa 10 % der Bevölkerung (Wüthrich, 1991). Für Deutschland dürfte ein ähnlicher Wert realistisch sein. Wegen ihrer Häufigkeit und des großen diagnostischen und therapeutischen Aufwandes stellen Allergien ein nicht unbedeutendes volkswirtschaftliches Problem dar.

Nahrungsmittelallergien - diese werden in der ärztlichen Praxis so bezeichnet, obwohl der Gesetzgeber den Begriff „Lebensmittel“ festgelegt und definiert hat - nehmen aus mehreren Gründen eine Sonderstellung unter den Allergien ein, denn sie äußern sich meist in Reaktionen direkt am Ort des Kontaktes. Die häufigsten Symptome sind Reaktionen der Mund- und Rachenschleimhaut, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Nach Hofer und Wüthrich (1985) zeigen 11 % der untersuchten Nahrungsmittelallergiker ausschließlich gastrointestinale Symptome, etwa 8 % nur asthmatische Beschwerden und etwa 20 % nur Reaktionen der Haut. So erklärt sich der besonders hohe diagnostische Aufwand bei Lebensmittelallergien (Aulepp und Vieths, 1992) und die Schwierigkeit, genaue Zahlen zur Häufigkeit dieser Erkrankung zu erhalten. Weiterhin muss zwischen einer Allergie auf native Lebensmittel und einer auf Lebensmittelzusatzstoffe unterschieden werden. Bei Lebensmittelüberempfindlichkeiten liegt die objektive Häufigkeit bei ca. 5 %, für Zusatzstoffe konnte ein Wert von 0,01-0,23 % festgestellt werden (Young, 1992). Ebenfalls muss die Lebensmittelallergie von anderen, nicht-immunologisch bedingten Reaktionen des Körpers abgegrenzt werden. Dazu zählen toxische Reaktionen z. B. durch bakterielle oder marine Gifte sowie die so genannten Lebensmittelintoleranzen wie beispielsweise die Lactoseunverträglichkeit. Eine Allergie gegen ein Lebensmittel stellt für den Betroffenen

nicht nur eine gesundheitliche Beeinträchtigung dar. Durch die Umstellung der Ernährung oder strenge Diät geht auch ein Teil der Lebensqualität verloren. Die Meidung des allergieauslösenden Lebensmittels ist bis heute die einzige Therapie dieser Erkrankung.

Seit den siebziger Jahren wird in zunehmendem Maße beobachtet, dass Allergien gegen native Lebensmittel pflanzlicher Herkunft sehr häufig mit Pollenallergien assoziiert sind. Statistisch besteht bei 80-90 % aller Nahrungsmittelallergiker parallel eine Pollenallergie (Wüthrich, 1989; Thiel, 1991). Meist entwickelt sich eine Nahrungsmittelallergie in Folge einer Pollenallergie. Dieses Phänomen beruht auf dem Vorhandensein gemeinsamer Epitopstrukturen, die eine Immunreaktion verursachen, sowohl in Pollen als auch in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Auf diese Weise kann sich aus einer bestehenden Pollinosis zu einem späteren Zeitpunkt eine Sensibilisierung gegen pflanzliche Nahrungsbestandteile entwickeln. Im Laufe der Jahre kann die Anzahl der Lebensmittel zunehmen, auf die der Patient allergisch reagiert. Dabei ist eine botanische Verwandtschaft von Pollenpflanze und Nahrungsmittelpflanze nicht zwingend.

Bezogen auf die zugrunde liegende Pollinosis unterscheidet man mehrere Arten dieser pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien. Birkenpollenallergiker zeigen besonders häufig eine Reaktion auf rohe Früchte aus der Familie der Rosaceen (Apfel, Birne, Kirsche, Pfirsich), auf Haselnüsse, rohe Apiaceen wie Karotte oder Sellerie sowie auf Kiwi (Vieths, 1997a; Jäger und Wüthrich, 1998; Caballero und Martin-Esteban, 1998; Vieths *et al.*, 2002). In einer Studie an 380 Birkenpollenallergikern wurde festgestellt, dass 53 % der Personen allergisch auf Haselnüsse, 47 % auf Äpfel, 34 % auf Pfirsiche, 29 % auf Kirschen und 27 % auf Mandeln reagierten (Eriksson *et al.*, 1982). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Vieths *et al.* (1993), die bei 50-93 % der untersuchten Birkenpollenallergiker eine parallel bestehende Allergie gegen Äpfel und Haselnüsse diagnostizierten. Eine jüngere Untersuchung in Japan ergab, dass 61 % von 54 Birkenpollenallergikern Überempfindlichkeiten gegenüber Lebensmitteln zeigten (Gotoda *et al.*, 2001). Bei Beifußpollenallergikern sind Allergien gegen rohe Karotten, Sellerie, Fenchel und Gewürze (z. B. Anis, Pfeffer, Kümmel, Paprika, Koriander) häufig. Daher spricht man vom „Sellerie-Beifuß-Karotten-Gewürz-Syndrom“. Bei einer Gräser- und Getreideallergie wird gelegentlich eine zusätzliche Sensibilisierung gegen Leguminosen wie Linsen, Erbsen, Soja und Erdnuss festgestellt. Weitere derartige „Verwandtschaften“ bestehen zwischen Kiwi, Haselnuss und Roggenmehl, zwischen Haselnuss, Sesam, Roggenmehl und Mohn sowie zwischen Tomate, Gräserpollen und Erdnuss (Aulepp und Vieths, 1992). Man

geht davon aus, dass 2-4 % der Erwachsenen in den Industrieländern unter einer pollenassozierten Nahrungsmittelallergie leiden (Pastorello *et al.*, 1996; Vieths, 1997b).

Alle bisher isolierten und charakterisierten Pollen- und Lebensmittelallergene sind Proteine oder Glycoproteine und somit natürliche Inhaltsstoffe der Pflanze. Durch immunologische Tests konnte nachgewiesen werden, dass Antikörper gegen bestimmte Pollenallergene auch mit bestimmten Pflanzenallergenen reagieren können. Eine solche Kreuzreaktion wurde z. B. für die Paare Sellerie-Birkenpollen und Apfel-Birkenpollen nachgewiesen (Aulepp und Vieths, 1992).

1.2 Die Allergie auf Süßkirsche (*Prunus avium*)

Die Symptome einer Allergie gegenüber Süßkirschen reichen von leichten Reizungen der Mund- und Rachenschleimhaut („oral allergy syndrome“, OAS) bis hin zu schweren systemischen Körperreaktionen (Scheurer *et al.*, 2001; Ballmer-Weber *et al.*, 2002). Eine Allergie gegen Kirschen ist meist mit einer Birkenpollenallergie assoziiert. In der Studie von Gotoda *et al.* (2001) wiesen 58 % der birkenpollenassozierten Nahrungsmittelallergiker eine Überempfindlichkeit gegenüber Kirschen auf. Erste Hinweise auf ein Allergen in Süßkirschen fanden Schöning *et al.* (1995). Die Arbeitsgruppe beschrieb ein 18 kDa schweres Protein, welches eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen das Hauptallergen aus Birkenpollen (Bet v 1) aufwies. Scheurer *et al.* (1997) konnten die entsprechende RNA aus Süßkirschen isolieren und die Sequenz des so genannten Pru a 1 ableiten. Nach Klonierung und Expression des Allergens zeigten 17 von 19 Kirschallergikern eine spezifische IgE-Antikörperreaktion gegen das rekombinante rPru a 1. Somit kann Pru a 1 als Hauptallergen der Kirsche betrachtet werden.

Pru a 1 gehört zur Familie der PR-10-Proteine aus der Gruppe der sog. „pathogenesis related proteins“. Die genaue Funktion dieser Proteine ist unbekannt; man vermutet jedoch, dass sie an pflanzlichen Abwehrreaktionen gegenüber Umwelteinflüssen und mikrobiellem Stress beteiligt sind (Breiteneder und Ebner, 2000; Hoffmann-Sommergruber, 2000). Die Abfolge der Aminosäuren stimmt in weiten Teilen mit den Allergenen Bet v 1 (Birke), Mal d 1 aus Äpfeln (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995; Son *et al.*, 1999), Api g 1 aus Sellerie (Breiteneder *et al.*, 1995), Pyr c 1 aus Birnen (Karamloo *et al.*, 2001), Cor a 1.0401 aus Haselnüssen (Lüttkopf *et al.*, 2002) und Dau c 1 aus Karotten (Hoffmann-Sommergruber, 2000) überein. Auch diese

Allergene gehören zur Gruppe der PR-10-Proteine, die somit einen im Pflanzenreich weit verbreiteten Pool an potentiellen Lebensmittelallergenen darstellen. Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von Pru a 1 durch Röntgenstrukturanalyse wiesen eine große Übereinstimmung mit Bet v 1 auf (**Abb. 1-1**; Scheurer *et al.*, 1997). Dabei zeigte sich, dass der glycinreiche Abschnitt 46-54 von Bet v 1 eine P-Schleife bildet, die von einem Lysinrest gefolgt wird. Dieses Strukturelement (GXGGXGXXK) findet sich auch in den verwandten Allergenen Pru a 1, Mal d 1, Pyr c 1, Dau c 1 und Api g 1. Darüber hinaus scheinen die Proteine ein sehr ähnliches Muster der Sekundärstruktur zu besitzen, wie durch computergestützte Rechnung ermittelt werden konnte. Die räumliche Ähnlichkeit von Bet v 1 und Pru a 1 wurde durch CD-Spektroskopie bestätigt.

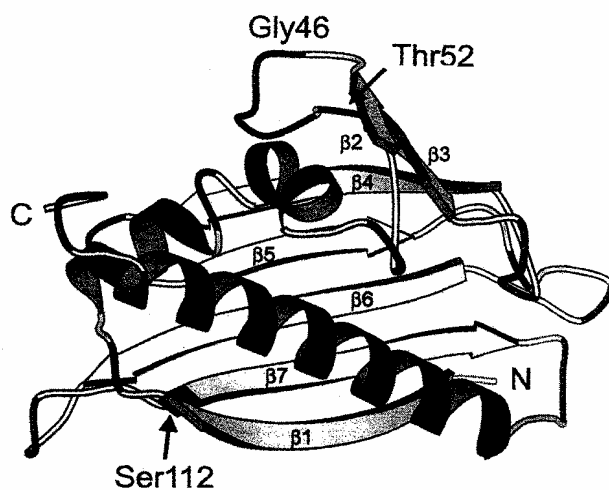


Abb. 1-1: Dreidimensionales Strukturmodell von Pru a 1 unter Verwendung der Röntgenstrukturanalyse von Bet v 1 (Scheurer *et al.*, 1997).

Die große Homologie der Allergene von Birkenpollen, Kirsche und der genannten Lebensmittel erklärt, warum Birkenpollenallergiker besonders häufig gegenüber diesen Lebensmitteln sensibilisiert sind. Zur Lokalisierung von möglichen Epitopen wurden sieben Bruchstücke von Pru a 1 mit Längen zwischen 60 und 121 Aminosäuren mittels IgE-Immunoblotting untersucht. Diese zeigten nur eine schwache IgE-Bindung. Daraus wurde gefolgert, dass es sich bei Pru a 1 um ein Konformationsallergen handelt, bei dem die Antikörperbindung durch die räumliche Struktur des Proteins (Konformationsepitope) und nicht durch kontinuierlichen Aminosäuresequenzen (Sequenzepitope) vermittelt wird (Scheurer *et al.*, 1997). **Abb. 1-2** zeigt schematisch den Unterschied zwischen Sequenzepitopen und Konformationsepitopen. Neben diesen beiden Varianten kennt man noch sog. versteckte Epitope, die im nativen Zustand des Allergens im Inneren des Proteins

verborgen liegen und daher von Antikörpern z. B. aufgrund sterischer Effekte nicht erkannt werden können.

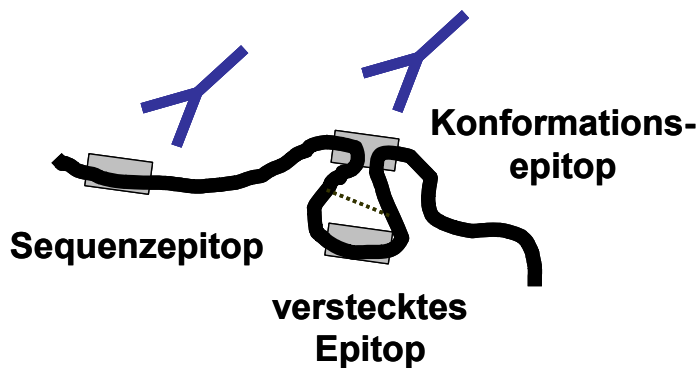


Abb. 1-2: Schematische Darstellung von Sequenz-, Konformations- und versteckter Epitope (nach Lottspeich und Zorbas, 1998, verändert).

Weiteren Aufschluss brachten Untersuchungen mit sieben Mutanten von Pru a 1. Dabei handelte es sich um Substitutionsmutationen einer (T10G; G46P; S112P; S112C; I113V) oder zweier Aminosäuren (SI112/113CV) sowie um eine Auslassungsmutation ($\Delta T52$). Durch den Austausch von Gly⁴⁶ bzw. Auslassung von Thr⁵² wurde die oben erwähnte P-Schleife gezielt verändert. Diese Veränderungen führten im Vergleich zur Wildform zu einer Minderung der IgE-Bindung. Daher wird vermutet, dass diese Region für die Bindung der Antikörper mitverantwortlich ist. Während eine Substitution von Ile¹¹³ keinen Effekt zu haben schien, konnte durch Austausch von Ser¹¹² eine stark verminderte IgE-Bindung an das modifizierte Allergen beobachtet werden. Dies traf für alle untersuchten Patientensera zu. Eine fast vollständige Aufhebung der IgE-Bindung wurde bei der Variante (S112P) beobachtet. Vermutlich führt diese Punktmutation zu einer Änderung der Tertiärstruktur, da mit Prolin weder eine exakte α -Helix noch eine β -Faltblattstruktur ausgebildet werden kann. Dadurch gehen potentielle IgE-Bindungsstellen des Konformationsepitopes verloren (Scheurer *et al.*, 1997). Kürzlich konnte durch mehrdimensionale NMR-Spektroskopie ein hochaufgelöstes 3D-Modell von Pru a 1 in Lösung erhalten werden (Neudecker *et al.*, 2001). Auch hier zeigte sich, dass Pru a 1, Bet v 1 und die anderen Vertreter der birkenpollenassoziierten Lebensmittelallergene gemeinsame IgE-Konformationsepitope teilen.

1.3 Die Allergie auf Erdnuss (*Arachis hypogaea*)

Unter den Lebensmittelallergien gilt die Erdnussallergie als eine der gefährlichsten. Die Symptome reichen von leichten lokalen Reizungen bis hin zum schweren anaphylaktischen Schock, der tödlich enden kann. Man schätzt, dass 10-47 % der anaphylaktischen Reaktionen

auf Lebensmittel durch Erdnüsse verursacht werden. Meist treten die Symptome binnen weniger Minuten nach Verzehr auf. In den Vereinigten Staaten sind ca. 0,5 % der Bevölkerung von dieser Allergie betroffen. In Großbritannien werden jährlich ca. 20 Todesfälle mit einer Erdnussüberempfindlichkeit in Zusammenhang gebracht. Da keine Therapie zur Verfügung steht, ist die strikte Meidung von Erdnüssen und daraus hergestellten Produkten die einzige Möglichkeit für den Betroffenen, dieser lebensgefährlichen Bedrohung aus dem Weg zu gehen (Shin *et al.*, 1998).

Auf molekularer Ebene scheint die Erdnussallergie sehr kompliziert, wurden doch inzwischen nicht weniger als sieben allergene Erdnussproteine identifiziert. Von diesen gelten Ara h 1 (Burks *et al.*, 1991; Burks *et al.*, 1995; Burks *et al.*, 1997; Kleber-Janke *et al.*, 1997), Ara h 2 (Burks *et al.*, 1992; Kleber-Janke *et al.*, 1997; Stanley *et al.*, 1997), Ara h 3 (Burks *et al.*, 1998; Rabjohn *et al.*, 1999) und Ara h 4 (Kleber-Janke *et al.*, 1997; Burks *et al.*, 1998) als Hauptallergene, da über 50 % der Allergiker eine immunologische Reaktion mit diesen Proteinen zeigen. Diese Allergene zählen zu den Reserveproteinen des Erdnussamens, wobei Ara h 1 zur Gruppe der Viciline, Ara h 2 zur Conglutin-Familie und Ara h 3 bzw. Ara h 4 zu den Glycininen gerechnet werden. Daneben kennt man noch drei weitere Nebenallergene. Ara h 5 zählt zur Klasse der Profiline und Ara h 6 bzw. Ara h 7 gelten wie Ara h 2 als Conglutin-Homologe (Kleber-Janke *et al.*, 1999).

Ara h 2 wird von über 90 % der Allergiker durch IgE-Bindung erkannt. Das Protein ist hauptsächlich in den Keimblättchen lokalisiert. Es liegt als Glycoprotein vor, jedoch scheint der Zuckeranteil für die Allergenität ohne Bedeutung zu sein (Stanley *et al.*, 1997). Die Aminosäuresequenz konnte aus der Nukleotidsequenz eines Ara h 2 cDNA-Klons abgeleitet werden und ist in **Abb. 1-3** aufgeführt.

1	11	21	31
LTILVALALF	LLAAHASARQ	QWELQGDRRC	QSQLERANLR
41	51	61	71
PCEQHLMQKI	QRDEDS YERD	PYSPSQDPYS	PSPYDRRGAG
81	91	101	111
SSQHQRCCN	ELNEFENNQR	CMCEALQQIM	ENQSDRLQGR
121	131	141	151
QQEQQFKREL	RNLPQQCGLR	APQRCDLDVE	SGGRDRY

Abb. 1-3: Aminosäuresequenz von Ara h 2 abgeleitet aus der Nukleotidsequenz eines Ara h 2 cDNA-Klons (Stanley *et al.*, 1997). Die Hauptepitope sind hervorgehoben.

Ara h 2 sowie daraus gewonnene tryptische Bruchstücke wurden einer Peptidsequenzierung unterzogen. Für die N-terminale Sequenz wurde die Folge XQQWELQGDRRRQSQLER ermittelt. X steht dabei für eine nichtidentifizierte Aminosäure. Die Folge entspricht dem Abschnitt 19-36 der Sequenz in **Abb. 1-3**. Der vorgeschaltete Abschnitt L¹TILVALALFLLAAHASA¹⁸ wird als Signalsequenz betrachtet, die nach der Expression des Proteins abgespalten wird. Ferner erkennt man, dass sich im nativen Protein an Position 30 ein Arginin-Rest befindet. Im Genom ist für diese Stelle ein Cystein-Rest codiert. Ara h 2 gilt im Gegensatz zu Pru a 1 als ein Allergen mit Sequenzepitopen, bei dem die Bindung der Antikörper über definierte, kontinuierliche Sequenzabschnitte verläuft. Durch Synthese von überlappenden Bruchstücken konnten mittels IgE-Bindungsstudien zehn Epitope identifiziert werden (**Tab.1-1**). Von diesen werden die Peptide 3, 6 und 7 als Hauptepitope angesehen, da sie von allen untersuchten Patientensera erkannt wurden und die größte IgE-Affinität zeigten (Stanley *et al.*, 1997).

Tab. 1-1: Aminosäuresequenzen der zehn Epitope von Ara h 2. Die Hauptepitope sind hervorgehoben (Stanley *et al.*, 1997).

Peptid	Aminosäuresequenz	Position
1	HASARQQWEL	15-24
2	QWELQGDRRC	21-30
3	DRRCQSQLER	27-36
4	LRPCEQHLMQ	39-48
5	KIQRDEDSYE	49-58
6	YERDPYSPSQ	57-66
7	SQDPYSPSPY	65-74
8	DRLQGRQQEQ	115-124
9	KRELRNLPQQ	127-136
10	QRCDLDVESG	143-152

Interessanterweise wurde von Stanley *et al.* (1997) auch die Signalsequenz in das Epitopmapping einbezogen. Teile dieser Sequenz finden sich in Epitop 1 wieder. Epitop 3 enthält das genomisch codierte Cystein, welches im nativen Protein durch Arginin substituiert ist.

1.4 Stabilität von Lebensmittelallergenen

Seit langem ist bekannt, dass technologische Prozesse, wie sie sowohl bei der industriellen Verarbeitung als auch bei der haushaltsmäßigen Zubereitung von Lebensmitteln üblich sind, Veränderungen ernährungsphysiologischer, sensorischer sowie funktioneller Eigenschaften von Lebensmittelproteinen zur Folge haben. Insbesondere die thermische Verarbeitung von Lebensmitteln gehört zu den wohl wichtigsten technologischen Verfahren, die bei der Lebensmittelherstellung eingesetzt werden.

Die Stabilität von Lebensmittelallergenen unter diesen Bedingungen ist sehr unterschiedlich. Kern- und Steinobst sowie Doldenblütler bereiten für Allergiker häufig nur im rohen Zustand Probleme. Nach Kochen, Dünsten oder auch Reiben werden sie von den meisten Patienten problemlos vertragen. Für den Aktivitätsverlust kommen drei Möglichkeiten in Betracht. Zum einen wird die Denaturierung durch Hitzeeinwirkung diskutiert, welche vor allem bei Konformationsallergenen eine Inaktivierung erwarten lässt. Die Denaturierung des Proteins kann zur Zerstörung der diskontinuierlichen Konformationsepitope führen, was mit einem Verlust der allergenen Aktivität einhergeht. Tatsächlich zeigen in-vitro-Experimente, dass das Apfelallergen Mal d 1 durch Kochen der Frucht schnell inaktiviert wird. Gleiches gilt für das Sellerieallergen Api g 1 (Vieths *et al.*, 1996a; Vieths *et al.*, 1996b). Allerdings wurden diese Stabilitätsuntersuchungen in der intakten Fruchtmatrix durchgeführt. Semi-aufgereinigte Api g 1-Extrakte aus Sellerie zeigten jedoch keinen Aktivitätsverlust, wenn sie für 30 Minuten auf 100 °C erhitzt wurden. Selbst das labile Allergen Mal d 1 wies in gereinigtem Zustand unter ähnlichen Bedingungen noch eine gewisse Restallergenität auf (Vieths *et al.*, 1998). Daher müssen neben der thermisch induzierten Konformationsänderung auch chemische Veränderungen allergener Proteine vor allem durch Interaktion reaktiver Aminosäureseitenketten mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen in Betracht gezogen werden. Beispielsweise verliert roher, geriebener Apfel seine allergene Aktivität. Nach Zerkleinerung des Fruchtfleisches kommt das Allergen mit den Bestandteilen der Matrix, insbesondere mit Polyphenolen und Polyphenoloxidasen in Kontakt. Aus den Polyphenolen entstehen durch die Aktivität der Enzyme hochreaktive Chinone, die z. B. mit nukleophilen Gruppen des Proteins reagieren könnten (Björkstén *et al.*, 1980; Vieths *et al.*, 1992; Rudeschko *et al.*, 1995). Schließlich wird eine Reaktion der Proteine mit reduzierenden Zuckern im Sinne einer MAILLARD-Reaktion diskutiert. Hier vermutet man eine Interaktion reaktiver

Aminosäureseitenketten mit reduzierenden Kohlenhydraten. Bezüglich Pru a 1 und anderer Bet v 1-homologer Allergene sind derzeit keine Untersuchungen bekannt, die sich mit dem Einfluss von Hitze, enzymatischer Bräunung und MAILLARD-Reaktion beschäftigen.

Im Gegensatz zu reinen Konformationsallergenen ist bei Sequenzallergenen eine gewisse Thermostabilität zu erwarten. Ein Erhitzungsschritt verändert nicht die Aminosäuresequenz der Epitope, und das Antikörperbindungspotential kann erhalten bleiben. Als hitzestabil gelten beispielsweise Allergene aus Nüssen oder Gewürzen. Oft enthält eine Pflanze mehrere Allergene mit unterschiedlicher Stabilität. Als Beispiel sei wiederum der Sellerie genannt. Neben Api g 1 enthält Sellerie ein allergenes Profilin und IgE-aktive Kohlenhydratseitenketten von Glycoproteinen, die gegen thermische Einflüsse weitgehend resistent sind (Vieths *et al.*, 1996b).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Proteinextrakte aus gerösteten Erdnüssen eine höhere Antikörperaffinität besitzen als Protein aus nativen Erdnüssen. Chung und Champagne unternahmen 1999 erstmals Erhitzungsversuche von Erdnussproteinen unter MAILLARD-Bedingungen. Sie überprüften anhand von Erdnusslectin, ob ein nicht-allergenes Erdnussprotein durch nicht-enzymatische Glycosylierung in ein Protein mit Antikörperaffinität umgewandelt werden kann. Reaktionsmischungen von Lectin und Glucose bzw. Fructose wurde mittels SDS-PAGE-Immunoblotting untersucht. Nach einer Inkubation des Erdnusslectins mit Glucose und Fructose wurden bis zu vier Reaktionsprodukte mit IgE-Aktivität detektiert. Eine stärkere Färbung der Banden im Fructoseansatz wurde als Zeichen einer schneller ablaufenden Reaktion im Vergleich zu Glucose interpretiert. Eine nicht-spezifische Bindung konnte durch Kontrollexperimente mit einem Nichtallergikerserum ausgeschlossen werden. Mit Glucose bzw. Fructose umgesetztes Erdnusslectin zeigte einen inhibierenden Effekt bezüglich einer Erdnussallergen-Humanantikörper-Reaktion. Bei nativem Lectin trat dieser Effekt nicht auf. In einem weiteren Experiment konnten die Autoren einen stärkeren Inhibitionseffekt für Proteinextrakte aus gerösteten Erdnüssen nachweisen als für Extrakte aus rohen Erdnüssen (Chung und Champagne, 1999).

Maleki *et al.* (2000) untersuchten den Einfluss von Glucose, Mannose, Xylose und Galactose auf Ara h 1, Ara h 2 und einen Erdnuss-Proteinextrakt. Modellinkubationen wurden dabei einem kompetitiven ELISA unterzogen, um Aufschluss über eine Veränderung der AK-Bindungskapazität zu erlangen. Die Ergebnisse legen eine Zunahme der IgE-Affinität der

Proteine nach MAILLARD-Reaktion nahe. Kürzlich synthetisierte die Arbeitsgruppe Chung und Champagne (2001) polyklonale IgE-Antikörper gegen bestimmte Proteinmodifizierungen wie Carboxymethyllysin-BSA oder glycosyliertes BSA. Die Autoren konnten immunologisch nachweisen, dass „advanced glycation endproducts“ (AGE), Carboxymethyllysin und Addukte von Proteinen mit Intermediaten des oxidativen Fettsäureabbaus wie Malondialdehyd und 4-Hydroxy-*E*-2-nonenal sowohl in rohen als auch in gerösteten Erdnüssen vorkommen. In roher und gerösteter Ware wurde ein gleicher Gehalt an Carboxymethyllysin und 4-Hydroxy-*E*-2-nonenal-Addukten ermittelt, wohingegen geröstete Erdnüsse deutlich mehr Gesamt-AGE und Malondialdehyd-Addukte als native Nüsse enthielten (Chung und Champagne, 2001).

Zusammenfassend kann die Steigerung der IgE-Bindungsaffinität von Erdnuss-Protein-Extrakten durch die MAILLARD-Reaktion als bewiesen betrachtet werden. Über deren Ausmaß und die beteiligten Proteine gibt es jedoch widersprüchliche Ansichten, da Chung und Champagne (2001) die Gültigkeit der Inhibitionsversuche aus den vorangegangenen Publikationen anzweifelten. Zum Einfluss einer möglichen enzymatischen Bräunung auf Erdnussallergene liegen keine Daten vor.

1.5 Reaktionsabläufe der MAILLARD-Reaktion

Erste Untersuchungen zum Reaktionsablauf der nicht-enzymatischen Bräunung von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern wurden von Amadori (1931), Kuhn und Weygand (1947) sowie Simon und Kraus (1970) durchgeführt. Die Reaktion einer Aldose (Pentose $R_1=H$, Hexose $R_1=CH_2OH$), welche in verschiedenen cyclischen und offenkettigen Formen vorliegen kann (**I**, **Ia** und **Ib** in **Abb. 1-4**), wird durch eine nukleophile Addition der Aminokomponente an die Carbonylgruppe eingeleitet. Daraus entsteht zunächst das Glycosylamin (**II**), das aufgrund seiner Instabilität im Verlauf der AMADORI-Umlagerung über das Enamin (**III**) in die AMADORI-Produkte *N*-(1-Desoxy-pentulos-1-yl)-amin (**IVa**) bzw. *N*-(1-Desoxy-hexulos-1-yl)-amin (**Va**) übergeht. Letztere können in verschiedenen cyclischen Formen vorliegen.

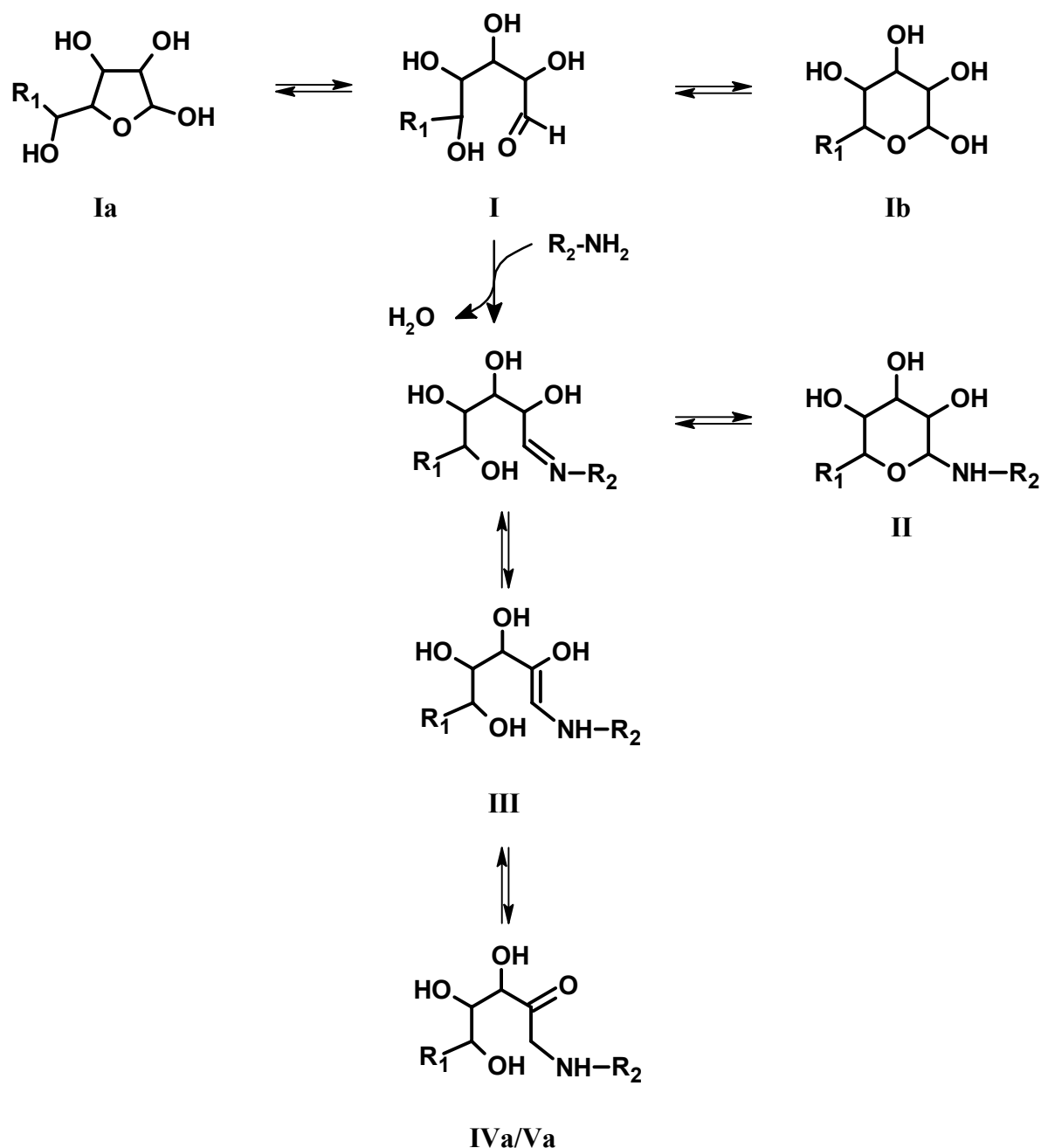


Abb. 1-4: Reaktion einer Aldose **I** (Pentose: $R_1=H$, Hexose: $R_1=CH_2OH$) mit einer Aminokomponente zu den sog. AMADORI-Produkten *N*-(1-Desoxy-pentulos-1-yl)-amin (**IVa**, $R_1=H$) bzw. *N*-(1-Desoxy-hexulos-1-yl)-amin (**Va**, $R_1=CH_2OH$).

Wie **Abb. 1-5** zeigt, können aus den AMADORI-Produkten durch Enolisierung, Dehydratisierung und Desaminierung verschiedene Desoxyosone wie die 1-Desoxy-2,3-pentodiulose (**VIa**) bzw. 1-Desoxy-2,3-hexodiulose (**VIIa**) und 3-Desoxy-2-pentosulose (**VIb**) bzw. 3-Desoxy-2-hexosulose (**VIIb**) hervorgehen. In wässriger Lösung sollten diese Desoxyosone im Gleichgewicht mit verschiedenen cyclischen Hemiacetalen und Hemiketalen vorliegen (Ledl und Schleicher, 1990).

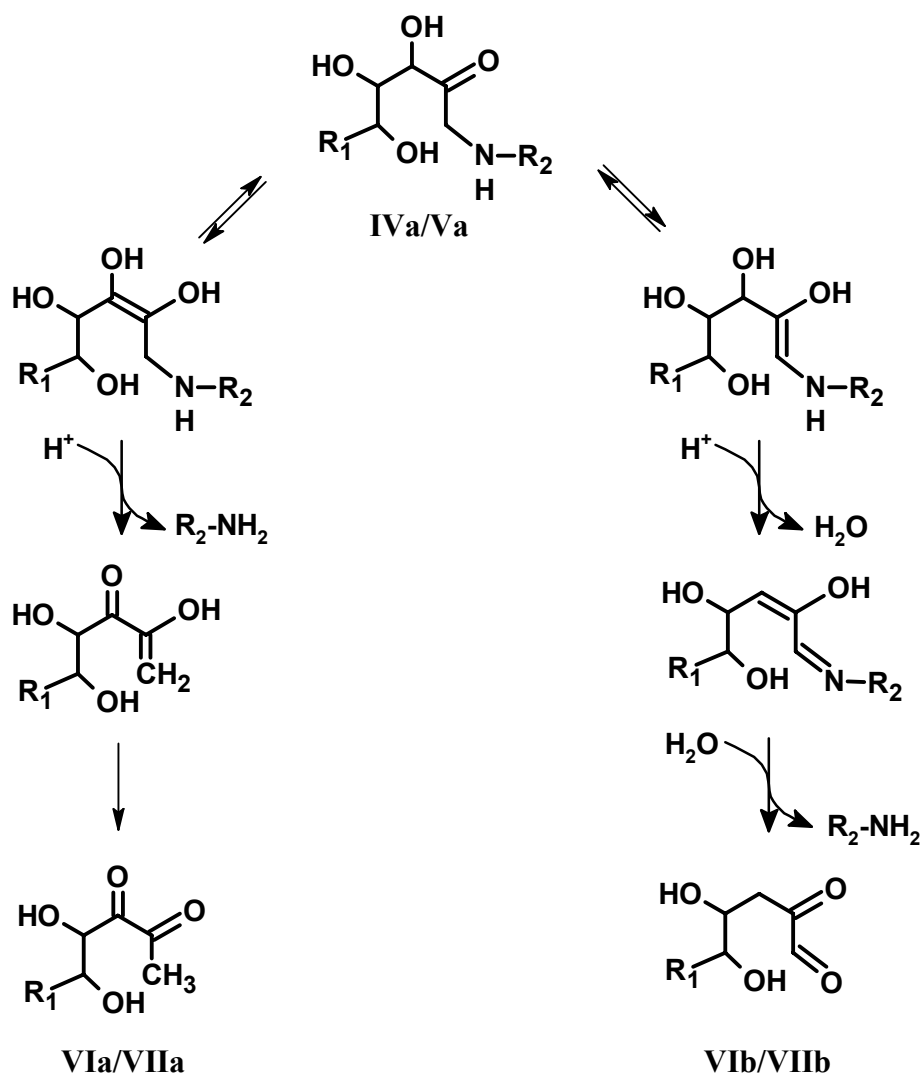


Abb. 1-5: Entstehung von Desoxyosonen aus den AMADORI-Produkten einer Pentose ($R_1=H$) bzw. Hexose ($R_1=CH_2OH$).

Desoxyosone stellen als α -Dicarbonylverbindungen reaktive Intermediate dar und werden im weiteren Verlauf der MAILLARD-Reaktion durch Enolisierungen, Wasserabspaltungen und Cyclisierungen zu zahlreichen Folgeprodukten umgesetzt. Durch retro-Aldol- und Diketo-Spaltungen entstehen kurzkettige Produkte mit C_2 -, C_3 - und C_4 -Körpern. So konnten u. a. Glyoxal, Glycolaldehyd, Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton, Methylglyoxal, 2,3-Butandion und 2-Hydroxy-3-butanon in erhitzten Kohlenhydrat/Aminosäure-Lösungen nachgewiesen werden (Severin *et al.*, 1984; Nedvidek *et al.*, 1992; Hofmann, 1999). Einen möglichen Reaktionsablauf zur Entstehung von Glycolaldehyd (VIII) und Methylglyoxal (IX) aus einer cyclischen Form der 3-Desoxy-2-pentosulose (VIb) zeigt **Abb. 1-6**.

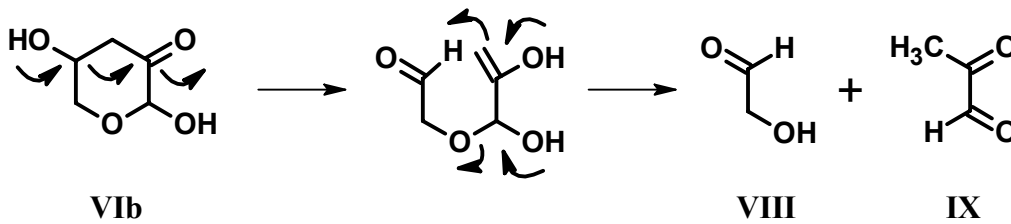


Abb. 1-6: Fragmentierung des 3-Desoxy-2-pentosulose-hemiacetals (**VIb**) zu Glycolaldehyd (**VIII**) und Methylglyoxal (**IX**).

Die kurzkettingen Carbonylverbindungen stellen äußerst reaktive Zwischenstufen der nicht-enzymatischen Bräunung dar, die rasch Folgereaktionen eingehen können. Besonders wichtig ist dabei die Reaktion dieser Carbonyle mit reaktiven Seitenketten von Peptiden bzw. Proteinen. Hierbei kommen nach derzeitigem Kenntnisstand nur stickstoffhaltigen Gruppen wie die ϵ -Aminogruppe des Lysins oder die Guanidingruppe des Arginins in Frage. Durch Addition, Kondensation und Umlagerungen entstehen mehr oder weniger stabile „advanced glycation endproducts“ (AGE) in Form modifizierter Aminosäuren bzw. Proteinquervernetzungsprodukte (Crosslinks). Am besten untersucht sind die AGE des Lysins. Das einfachste und gleichzeitig wichtigste Lysin-AGE ist Carboxymethyllysin (CML, **XII**, Ahmed *et al.*, 1986). Man geht davon aus, dass CML durch eine Reaktion von proteingebundenem Lysin (**X**) mit Glyoxal (**XI**) entsteht (**Abb. 1-7**). Als Quelle des Glyoxals kommt neben der MAILLARD-Reaktion auch die autoxidative Zersetzung von Glucose in Betracht (Wells-Knecht *et al.*, 1995a). Alternativ kann CML auch durch direkte Reaktion von Glucose mit proteingebundenem Lysin via oxidativer Spaltung der SCHIFF-Base (Glomb und Monnier, 1995; Hayashi und Namiki, 1986) bzw. des AMADORI-Produkts (Ahmed *et al.*, 1986; Wells-Knecht *et al.*, 1995b) entstehen. Die genannten Bildungswege von CML sind in **Abb. 1-7** dargestellt.

Die homologe Verbindung Carboxyethyllysin (CEL, **XIII**, Ahmed *et al.*, 1997) kann analog durch eine Reaktion von proteingebundenem Lysin mit Methylglyoxal (**IX**) gebildet werden. Das reaktive Methylglyoxal kann sowohl unter den Bedingungen der MAILLARD-Reaktion auch unter physiologischen Bedingungen entstehen, beispielsweise durch β -Elimination von Triosephosphat (Richard, 1991; Thornalley, 1996a, 1996b). Eine autoxidative Fragmentierung von Glucose, Pentosen und Ascorbinsäure zu Methylglyoxal wird ebenfalls diskutiert (Degenhardt *et al.*, 1998). CML und CEL wurden bereits in vielen verarbeiteten Lebensmitteln sowie in humanem Gewebe nachgewiesen (Baynes, 1991; Wells-Knecht *et al.*, 1995a; Ahmed *et al.*, 1997).

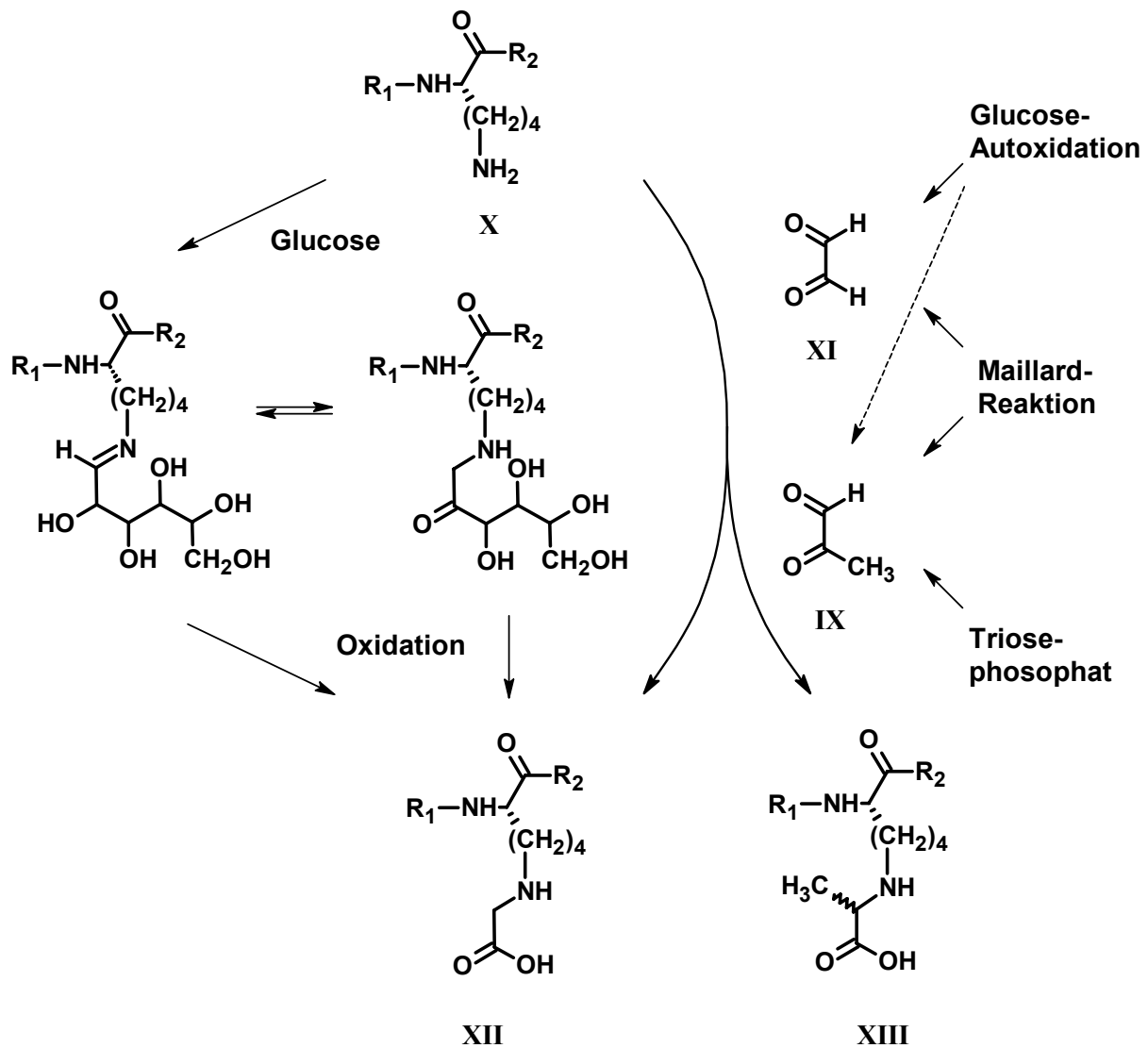


Abb. 1-7: Mögliche Entstehungswege von Carboxymethyllysine (XII) bzw. Carboxyethyllysine (XIII).

Im Folgenden wird der bisherige Kenntnisstand zu den AGE des Arginins umrissen (Abb. 1-8). Bedingt durch die drei Stickstoffatome der Guanidingruppe entstehen bei Kondensationsreaktionen mit α -Dicarbonylen verschiedene Isomere. Aus der Reaktion mit Glyoxal gehen als Endprodukte Glarg (XV, Schwarzenbolz *et al.*, 1997) und Carboxymethylarginin (CMA, XVI) hervor, die miteinander in einem pH-abhängigen Gleichgewicht stehen. Glomb und Lang (2001) konnten zeigen, dass als wichtige Zwischenstufe bei der Bildung dieser AGE das Dihydroxyimidazolidin (XIV) auftritt, das langsam in das stabilere CMA umgewandelt wird (Abb. 1-8). Glarg hingegen betrachten die Autoren als Artefakt, welches nur unter den stark sauren Bedingungen der Proteinhydrolyse

auftritt. Diskutiert wird auch ein weiteres, zum Dihydroxyimidazolidin **XIV** isomeres Additionsprodukt (**XVII**) (Glass und Pelzig, 1978).

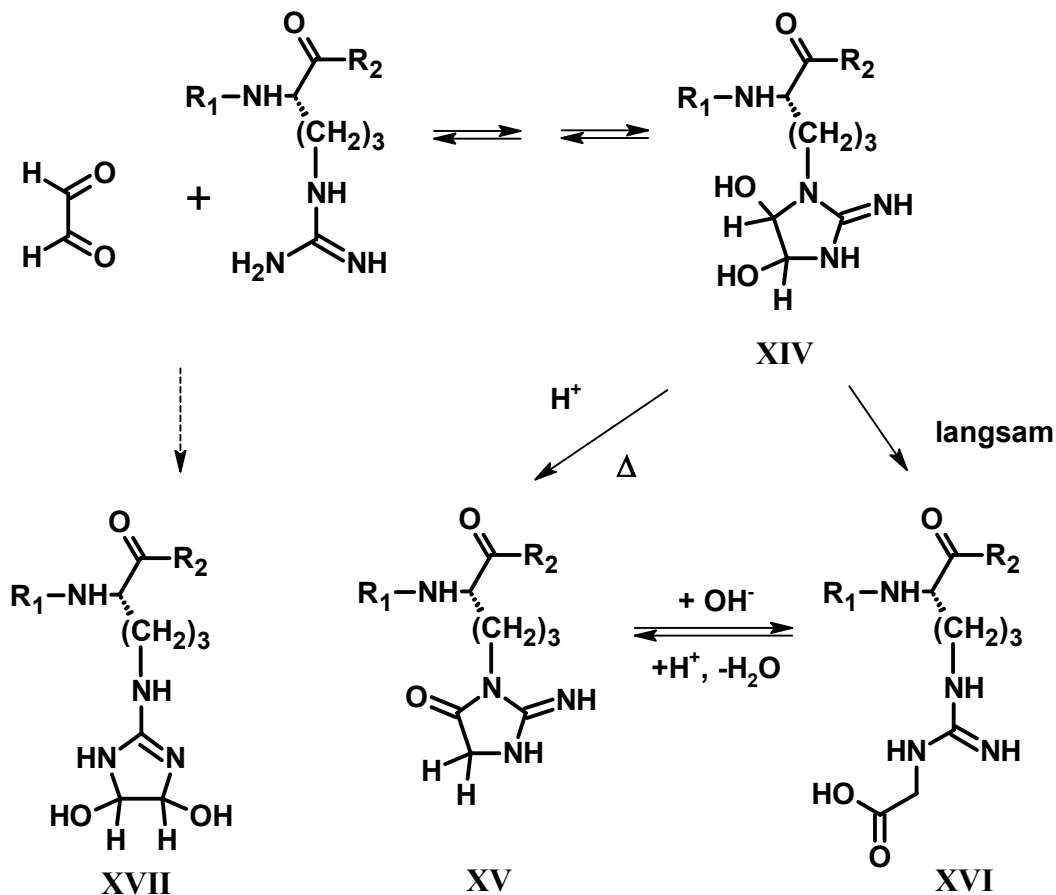


Abb. 1-8: Entstehung von Glarg (**XV**) bzw. Carboxymethylarginin (**XVI**) aus der Reaktion von Arginin mit Glyoxal über die Zwischenstufe des Dihydroxyimidazolidin (**XIV**, nach Glomb und Lang, 2001).

Die einfachsten Kondensationsprodukte von Arginin und Methylglyoxal sind die drei in **Abb. 1-9** dargestellten isomeren Methylimidazolidinone, die als MG-H1 (**XVIII**), MG-H2 (**XIX**) und MG-H3 (**XX**) bezeichnet werden (Henle *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 2002). Die Halbwertszeit der drei Methylimidazolidinone unter physiologischen Bedingungen ist relativ kurz. Im Falle von MG-H1, dem langlebigsten der drei Isomere, beträgt sie bei pH 7,4 und 37 °C nur 12 Tage (Ahmed *et al.* 2002). Daher nimmt man an, dass sich diese AGE im Unterschied zu den stabilen Derivaten CML und CEL nicht in langlebigen Körperproteinen anreichern. Ähnlich wie beim Gleichgewicht zwischen Glarg und CMA vermutet man auch bei MG-H3 unter physiologischen Bedingungen eine Ringöffnung zum stabileren Carboxyethylarginin (CEA, **XXI**, **Abb. 1-9**).

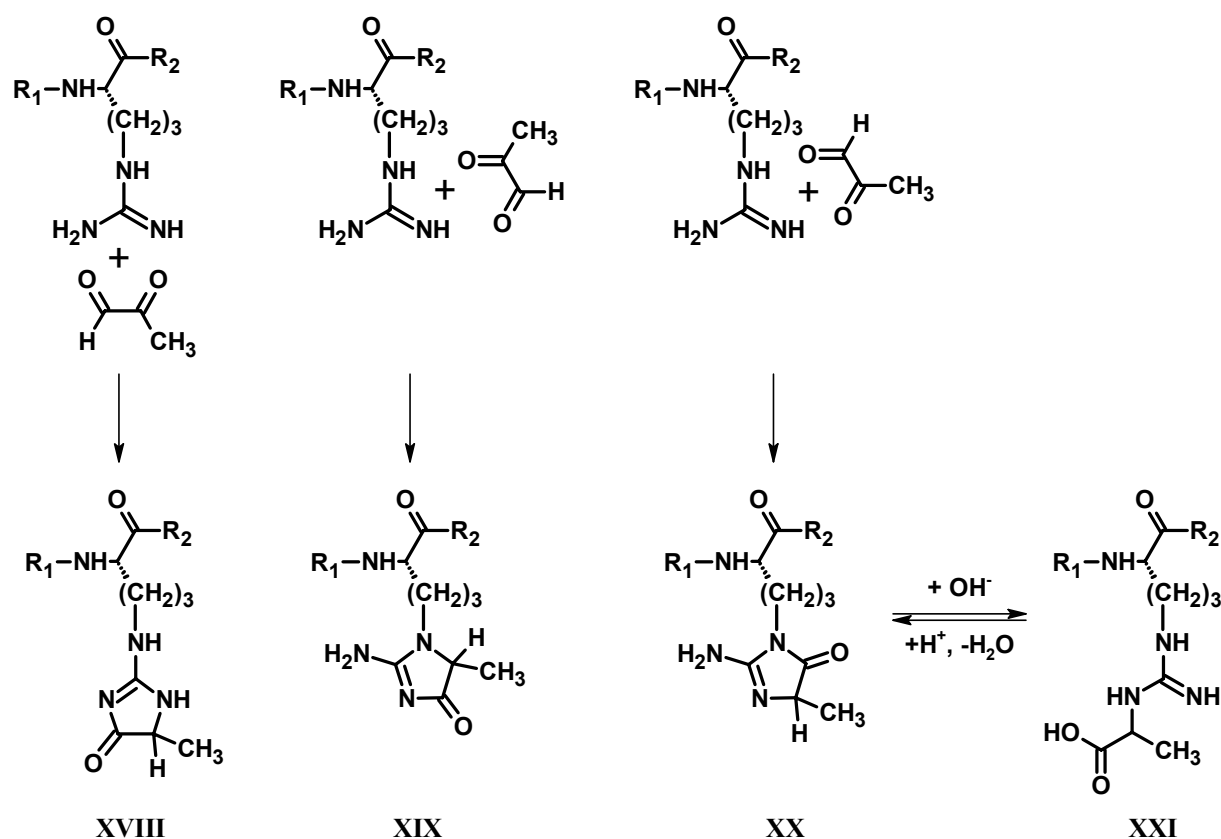


Abb. 1-9: Die drei isomeren Methylimidazolidinone MG-H1 (XVIII), MG-H2 (XIX) und MG-H3 (XX) als Kondensationsprodukte von proteingebundenem Arginin mit Methylglyoxal.

Daneben sind vom Arginin eine Reihe weiterer Modifikationen mit zum Teil sehr komplizierten Strukturen bekannt. Als Beispiele sollen das fluoreszierende Argpyrimidin (XXII, Shipanova *et al.*, 1997; Glomb *et al.*, 2001) sowie das als Tetrahydropyrimidin bekannte Derivat XXIII (Oya *et al.*, 1999) aufgeführt werden (**Abb. 1-10**).

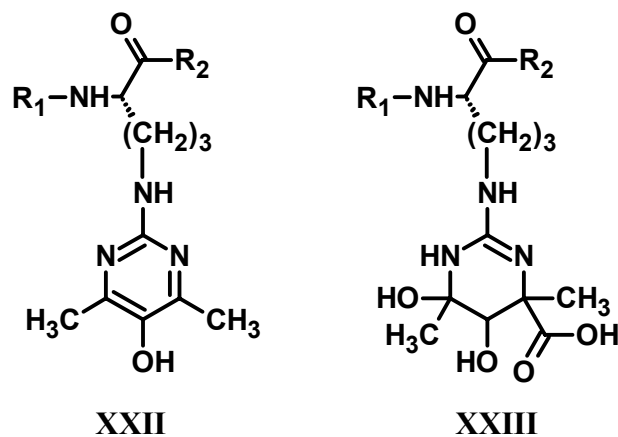


Abb. 1-10: Strukturen von Argpyrimidin (XXII) und Tetrahydropyrimidin (XXIII).

1.6 Multiple Antigenpeptide (MAP)

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen bestimmte Proteine wie beispielsweise Allergene werden diese einem Versuchstier gespritzt. Zusätzlich werden Adjuvantien verabreicht, die die Immunantwort des Tieres verstärken. Nach einer gewissen Wartezeit finden sich im Serum des Tieres verschiedene, spezifische Antikörper gegen diesen Eiweißstoff. Für die Immunogenität eines Proteins gelten hierbei folgende Voraussetzungen:

- Das Protein muss eine gewisse Größe (>5-10 kDa) besitzen; kleine Peptide, die aus weniger als 30 Aminosäuren bestehen, sind gewöhnlich nicht immunogen.
- Das Protein muss eine gewisse Komplexität besitzen, d. h. verschiedene Aminosäuren müssen verknüpft sein. Polymerisierte Monoaminosäuren sind nicht immunogen.
- Die immunogenen Abschnitte müssen frei zugänglich sein.

Kleine Peptide wie kurze Epitopsequenzen rufen daher keine Immunreaktion hervor und sind deshalb unmodifiziert nicht für Immunisierungsexperimente einsetzbar. Wünschenswert ist eine Verbindung, die schwer genug ist, um vom Immunsystem erkannt zu werden, andererseits aber nichts anderes als die Sequenz des Zielpeptids präsentiert. Zu diesem Zweck führte James P. Tam (1988) die multiplen Antigenpeptide (MAP) ein. Diese besitzen ein Lysin-Dendrimer (K) als Grundgerüst, dessen N-terminale Aminofunktionen mit mehrfachen Kopien des Zielpeptides verknüpft sind. **Abb. 1-11** zeigt schematisch den Aufbau dieser Substanzen.

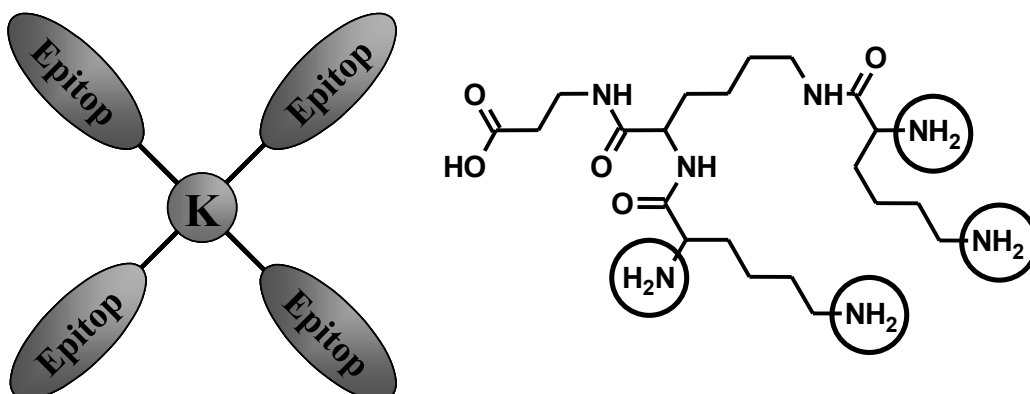


Abb. 1-11: Schema eines MAP mit vier Armen (links) und Struktur eines Lysin-Dendrimers für ein 4-armiges MAP (rechts), bestehend aus β -Alanin und drei Lysin-Einheiten. Das Peptid besitzt vier freie Aminogruppen, welche die Anbindung von vier Peptidkopien erlauben.

Die multiplen Antigenpeptide erfüllen die gesuchten Anforderungen für Immunisierungsexperimente: Durch die Polyfunktionalität des Dendrimers können je nach dessen Generationszahl vier, acht oder 16 Peptidketten angefügt werden, wodurch die Gesamtmasse der Verbindung erheblich vergrößert wird. Diese Peptidketten schirmen den vergleichsweise kleinen Dendrimerkern ab, so dass die Zellen des Immunsystems nur die Peptidsequenz erkennen (Tam, 1988; Pessi *et al.*, 1990). Bei der Erzeugung von Antikörpern mittels MAP-Technologie wurde im Vergleich zu herkömmlichen Konjugaten ein höherer Titer an Antikörpern beobachtet. Dies wird auf die Polyfunktionalität der MAPs zurückgeführt. Vergleicht man MAPs verschiedener Generationszahl miteinander, so stellt man fest, dass der Titer mit der Anzahl der Peptidarme zunimmt, dann ein Maximum durchläuft und wieder absinkt (Tam, 1988). Meist werden heute MAPs mit vier oder acht Peptidarmen eingesetzt. Die ersten Synthesen von Tam erfolgten manuell mittels Peptidfestphasensynthese an einem Boc- β -Ala-OCH₂-PAM-Harz. Durch sukzessives Anfügen von Boc-Lys(Boc)-OH wurde das Dendrimer aufgebaut. An dieses Dendrimer-Harz wurden dann die Peptidkopien manuell Aminosäure für Aminosäure gemäß der Boc-Chemie angefügt (Tam, 1988). Zwei Jahre später wurde eine automatisierte Synthese basierend auf der Fmoc-Chemie vorgestellt (Pessi *et al.*, 1990). Fmoc-geschützte Lysindendrimere an WANG-Harz sind heute kommerziell erhältlich und die Synthese von MAPs ist fest etabliert (Current Protocols of Immunology, 1993).

1.7 Problemstellung

Über den Einfluss von verarbeitungsbedingten Veränderungen, insbesondere der nicht-enzymatischen Glycosylierung, auf die Allergenität von Lebensmittelproteinen liegen bislang nur sehr lückenhafte Kenntnisse vor. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass sich die meisten Untersuchungen nur auf die Temperaturstabilität von Lebensmittelallergenen unter Prozessbedingungen beziehen, so wie sie bei der Lebensmittelverarbeitung auftreten. Nur sehr wenige Arbeiten beschäftigten sich mit dem Einfluss der nicht-enzymatischen Glycosylierung (MAILLARD-Reaktion) auf Eiweißstoffe mit allergenem Potential. Bei Erdnussproteinen ist eine Zunahme der Allergenität durch MAILLARD-Reaktion belegt. Über die molekularen Ursachen dieses Effektes ist jedoch nichts bekannt.

Neben Hitzeeinwirkung und der Reaktion mit reduzierenden Kohlenhydraten wird ferner über einen Einfluss der enzymatischen Bräunung auf die Allergenität von Lebensmittelproteinen

diskutiert. Experimentelle Untersuchungen hierzu sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Am Beispiel zweier gut charakterisierter Lebensmittelallergene soll daher in den beiden ersten Teilen der Arbeit der Einfluss von MAILLARD-Reaktion als auch von enzymatischer Bräunung auf die Allergenität dieser Proteine untersucht werden. Um die Verschiedenartigkeit der Wirkung von Lebensmittelallergenen abzudecken, sollen die Untersuchungen sowohl an einem Konformationsallergen als auch an einem Sequenzallergen erfolgen. Für die Untersuchung der Konformationsepitope wurde das Hauptallergen Pru a 1 der Süßkirsche gewählt. Untersuchungen zum Einfluss von Hitze, MAILLARD-Reaktion und enzymatischer Bräunung auf das Allergen stehen in engem Bezug zur lebensmitteltechnologischen Praxis, da neben frischen Kirschen vor allem Verarbeitungsprodukte wie Marmelade und Saft weit verbreitet sind. Die Untersuchungen sollen an rekombinantem rPru a 1 durchgeführt werden. In Modellstudien soll das Allergen in Ab- und Anwesenheit von reduzierenden Kohlenhydraten erhitzt werden und mittels ELISA-Verfahren die IgE-Bindungskapazität des thermisch behandelten bzw. glycosylierten Proteins mit dem des nativen Allergens verglichen werden. Ferner soll rPru a 1 mit ausgewählten Pflanzenphenolen und Polyphenoloxidase umgesetzt werden, um die Reaktionsabläufe einer enzymatischen Bräunung zu simulieren. Derartig behandeltes Allergen soll ebenfalls immunologisch evaluiert werden.

Im Gegensatz zu Pru a 1 gilt das Erdnussallergen Ara h 2 als Sequenzallergen. Eine Steigerung des allergenen Potentials durch nicht-enzymatische Glycosylierung wurde bereits in der Literatur beschrieben. Dies ist deshalb von Bedeutung, da Erdnüsse nur in gerösteter Form in den Handel gelangen. Analog zu rPru a 1 soll das Verhalten des rekombinanten Allergens rAra h 2 (Lehmann *et al.*, 2003) während Erhitzung und MAILLARD-Reaktion untersucht werden. Sollte sich die von Maleki *et al.* (2000) publizierte Zunahme der IgE-Affinität auch für das rekombinante Protein bestätigen, so werden die von Stanley *et al.* (1997) publizierten Epitope in die Untersuchung miteinbezogen. Hierzu sollen diese Epitope durch automatisierte Peptidfestphasensynthese hergestellt und in Modellmischungen mit reduzierenden Kohlenhydraten umgesetzt werden. Durch ein geeignetes Verfahren zur immunologischen Evaluierung von Peptiden soll nachgewiesen werden, ob und wie die Epitope ihr IgE-Bindungsverhalten unter MAILLARD-Bedingungen ändern. Eventuell lassen sich so die molekularen Ursachen für die Allergenitätssteigerung von Ara h 2 durch nicht-enzymatische Bräunung klären. In Anlehnung an die Arbeiten von Chung und Champagne (1999) soll kommerziell erhältliches Erdnusslectin ebenfalls in Modellversuchen glycosyliert

und das allergene Potential des modifizierten Lectins untersucht werden. Ferner sollen rAra h 2 und Erdnusslectin einer enzymatischen Bräunung unterworfen und der Einfluss dieser Reaktion auf die immunologischen Eigenschaften der Proteine bestimmt werden.

Im letzten Teil der Arbeit soll die sog. MAP-Technologie erstmalig auf dem Gebiet der Lebensmittelallergie zur Gewinnung von Antisera eingesetzt werden. Es sollen verschiedene multiple Antigenpeptide synthetisiert werden, die die von Stanley *et al.* (1997) publizierten Hauptepitope von Ara h 2 tragen. Nach erfolgreicher Synthese und umfassender Charakterisierung sollen diese Peptide Versuchstieren verabreicht und so sequenzspezifische Antisera erhalten werden. Es besteht dabei die begründete Hoffnung, dass Antikörper erhalten werden, die nur auf die ausgewählten Ara h 2-Epitope ansprechen. Derartig hochselektive Antisera könnten neue Möglichkeiten beim immunologischen Nachweis von Ara h 2 in Lebensmitteln eröffnen.

2 Ergebnisse

2.1 Untersuchungen zum Hauptallergen Pru a 1 der Süßkirsche (*Prunus avium*)

2.1.1 Einfluss von Hitze und der MAILLARD-Reaktion auf rPru a 1

Um die Temperaturstabilität von Pru a 1 und den Einfluss nicht-enzymatischer Glycosylierungsreaktionen auf dessen IgE-Bindungsaktivität zu studieren, wurden gleiche Volumina einer Lösung von rPru a 1 ($c = 500 \mu\text{g/mL}$ in PBS) in Abwesenheit bzw. in Gegenwart verschiedener Zucker und Carbonylverbindungen (50 mM) 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten bei 95 °C erhitzt. Auf Grund ihrer weiten Verbreitung im Pflanzenreich wurden dabei Maltose, Glucose und Ribose sowie Stärke als Saccharidkomponenten eingesetzt. Von Glycerinaldehyd und Glyoxal ist bekannt, dass diese Carbonylverbindungen als hochreaktive Intermediate während der MAILLARD-Reaktion auftreten (Hofmann, 1999). Die Modellinkubationen von rPru a 1 wurden einer SDS-PAGE-Elektrophorese unterzogen, und das modifizierte Allergen mit Coomassie Brilliant Blau G250 angefärbt (**Abb. 2-1-1**).

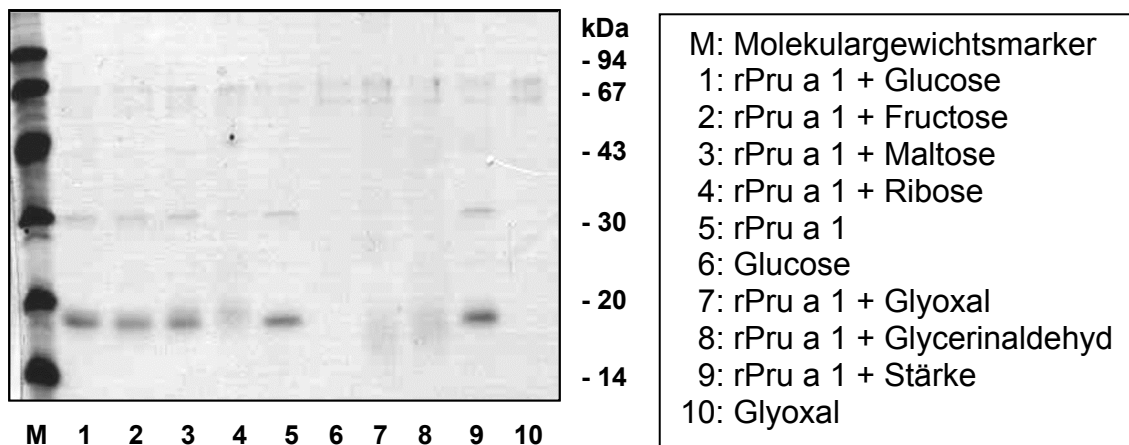


Abb. 2-1-1: SDS-PAGE von verschiedenen rPru a 1-Inkubationen nach Anfärbung mit Coomassie Blau.

Spur 5 in **Abb. 2-1-1** zeigt die Proteinbande von nativem rPru a 1 (17,7 kDa) etwas unterhalb des Molekulargewichtsmarkers von 20 kDa. Die Modellansätze des Allergens mit Stärke (Spur 9), Maltose (Spur 3), Glucose (Spur 1) und Fructose (Spur 2) zeigten ebenfalls die relativ scharfe Bande von rPru a 1 mit vergleichbarer Intensität. Mit Hilfe der SDS-PAGE konnte eine Veränderung am Protein nach Inkubation mit den genannten Kohlenhydraten

nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu löste sich diese Bande im Ribose-Ansatz (Spur 4) zu Gunsten eines verbreiterten, diffusen Flecks auf. In den Bräunungsansätzen aus Allergen und Glyoxal (Spur 7) bzw. Glycerinaldehyd (Spur 8) konnten hingegen keine definierten Proteinbanden mehr identifiziert werden. Es wurde daraus gefolgert, dass durch die Interaktion mit diesen beiden hochreaktiven Intermediaten inner- und intermolekulare Verknüpfungen des Allergens auftreten, die zu einem breiten Spektrum an Produkten mit verschiedener Molekularmasse führten. Kontrollansätze aus reiner Glucose bzw. Glyoxal zeigten erwartungsgemäß keine anfärbbaren Banden (Spuren 6 und 10).

Um die IgE-Bindungskapazität von thermisch belastetem bzw. unterschiedlich glycosyliertem rPru a 1 zu bestimmen, wurden von den Reaktionsansätzen gleiche Volumina entnommen, die z. T. modifizierte Proteine an bromcyanaktivierte Filterscheiben (Ceska und Lundkvist, 1972) gebunden und mit einem verdünnten Allergiker-Poolserum von fünf Patienten inkubiert (Vieths *et al.*, 1992; Vieths *et al.*, 1994). Die Bindung der Antikörper wurde mittels eines ELISA sichtbar gemacht. Als Sekundärantikörper diente hierzu ein Kaninchen-anti-human-IgE-Antikörper, an welchen in einem zweiten Schritt ein anti-Kaninchen-Ig-Biotin-Konjugat gebunden wurde. Über die spezifische Biotin-Affinität des Streptavidins konnte durch ein Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat der gesamte Antikörperkomplex mit einem Enzym markiert werden. Als Enzymsubstrat diente farbloses p-Nitrophenylphosphat, welches durch die Phosphatase in gelbes p-Nitrophenolat gespalten wurde, dessen Farbintensität bei 405 nm photometrisch bestimmt wurde (Vieths, 2000; Vieths *et al.*, 1993). Die Abbildung **Abb. 2-1-2** zeigt die IgE-Bindungskapazität von rPru a 1 nach 30 Minuten Erhitzen in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Kohlenhydraten.

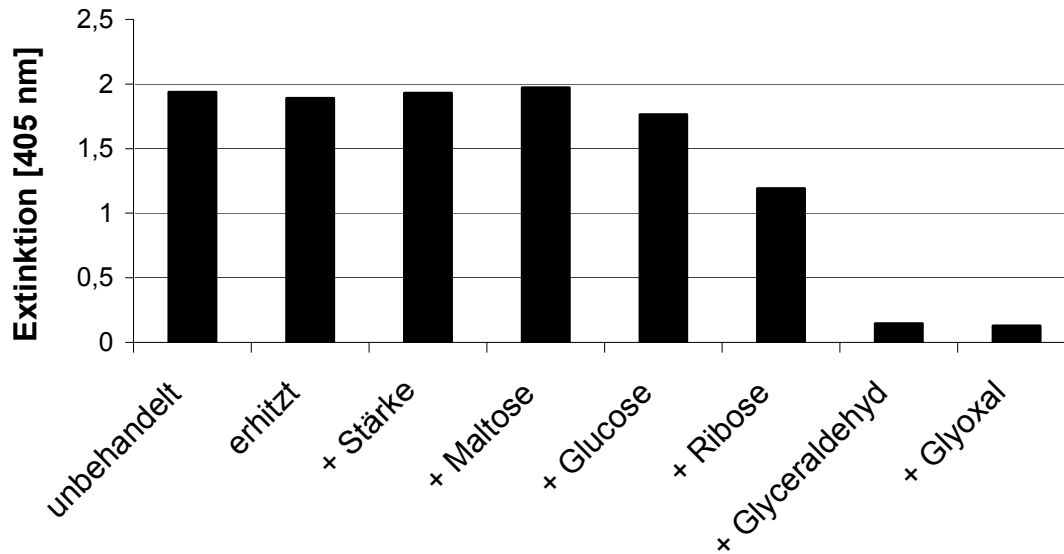


Abb. 2-1-2: ELISA von nativem (unbehandelt) und erhitztem (30 min, 95 °C) rPru a 1 (500 ng/Scheibe) ohne und mit Kohlenhydratzusatz (Stärke, Maltose, Glucose, Ribose, Glycerinaldehyd, Glyoxal).

Die Daten in **Abb. 2-1-2** zeigen, dass das Erhitzen von rPru a 1 in Abwesenheit von Kohlenhydraten kaum zu einer Verminderung der IgE-Bindungsaktivität führte. Auch nach 30 Minuten zeigte das thermisch behandelte Allergen eine vergleichbare IgE-Affinität wie das native rPru a 1. Während die Inkubation in Gegenwart von Stärke und Maltose die IgE-Bindung von rPru a 1 nicht weiter beeinflusste, wurde diese in Anwesenheit von Glucose und Ribose signifikant vermindert, wobei der Effekt bei Ribose deutlicher ausgeprägt war. Im Vergleich zu den Monosacchariden induzierten die Zuckerabbauprodukte Glycerinaldehyd und Glyoxal rasch einen nahezu vollständigen Verlust der IgE-Bindungsaktivität. Die Kontrollexperimente mit den Sera von Nichtallergikern zeigten in allen Fällen keine IgE-Bindung. Somit konnten einerseits die Entstehung von unspezifischen IgE-bindenden Strukturen aus der MAILLARD-Reaktion und andererseits nicht-spezifische Bindungseffekte ausgeschlossen werden.

Um den Einfluss der Reaktionszeit auf die IgE-Bindungsaktivität von rPru a 1 in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Sacchariden näher zu beleuchten, wurden zeitabhängige Erhitzungsexperimente durchgeführt. In **Abb. 2-1-3** ist die Extinktion der ELISA-Farbreaktion als Maß für die AK-Bindung gegen die Erhitzungsdauer aufgetragen. Innerhalb der ersten 30 Minuten der Erhitzung war nur eine geringe Änderung der IgE-Bindung des Allergens messbar. Erst nach längerer thermischer Belastung wurde rPru a 1 teilweise inaktiviert. Aber auch nach 90 Minuten war immer noch eine Extinktion von ca. 75 % des Ausgangswertes zu beobachten. Ein Erhitzen von rPru a 1 in Gegenwart von Glucose führte

nach ca. 60 Minuten zu einer signifikanten Hemmung der IgE-Bindungsaktivität. In Einklang mit der Reaktivität der Zucker führte eine Glycosylierung mit Ribose bereits nach 30 Minuten zu einer Abnahme der IgE-Bindung um 50 %. Nach einer Stunde war im Fall von Ribose keine AK-Bindung mehr nachweisbar.

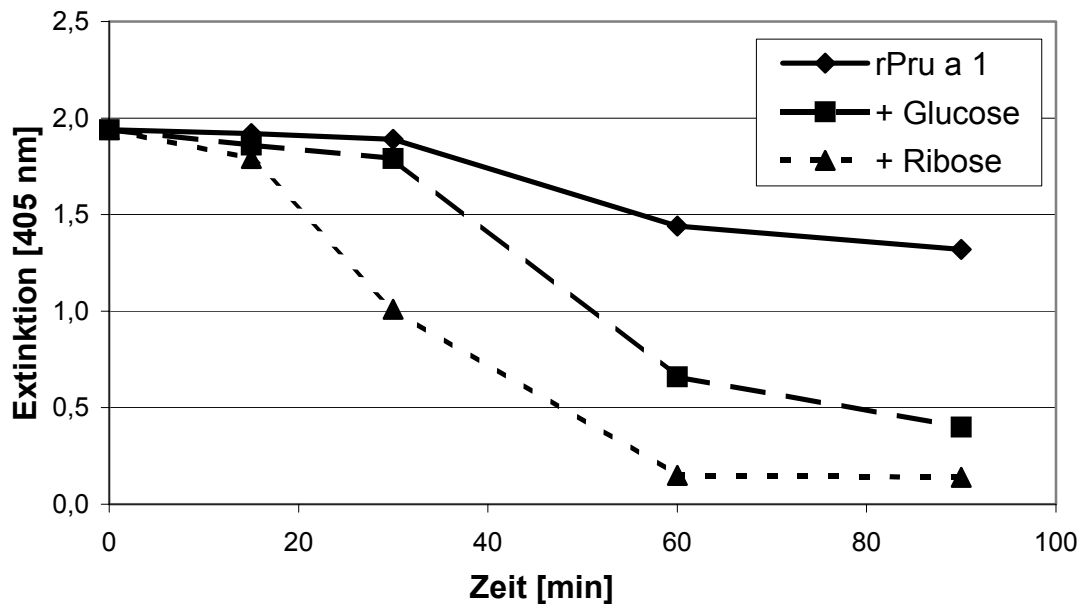


Abb. 2-1-3: ELISA der zeitabhängigen Inkubationen von rPru a 1 (500 ng/Scheibe) ohne Zuckersatz (◆) und in Anwesenheit von Glucose (■) und Ribose (▲) bei 95 °C.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurden kompetitive ELISA-Tests (EAST-Inhibitionsversuch nach Vieths, 2000) durchgeführt. Hierzu wurde nichtmodifiziertes rPru a 1 an Papierscheiben gebunden und gleichzeitig mit dem Patienten-Poolserum Verdünnungsreihen der für 45 Minuten erhitzten rPru a 1/Saccharid-Gemischen als Inhibitoren zugegeben. Aus der Extinktion nach IgE-Detektion konnte die Hemmwirkung der Inhibitoren ermittelt werden. Wurde die prozentuale Hemmung gegen die Verdünnung halblogarithmisch aufgetragen, so konnten die in **Abb. 2-1-4** dargestellten sigmoiden Hemmkurven erhalten werden. Aus deren Lage lässt sich die IgE-Affinität der modifizierten Allergene ablesen. Eine Verschiebung der Hemmkurven zu größeren IC_{50} -Werten bedeutet im Folgenden eine Verminderung der IgE-Affinität, einer Verschiebung zu kleineren IC_{50} -Werten eine Zunahme (Vieths *et al.*, 1993).

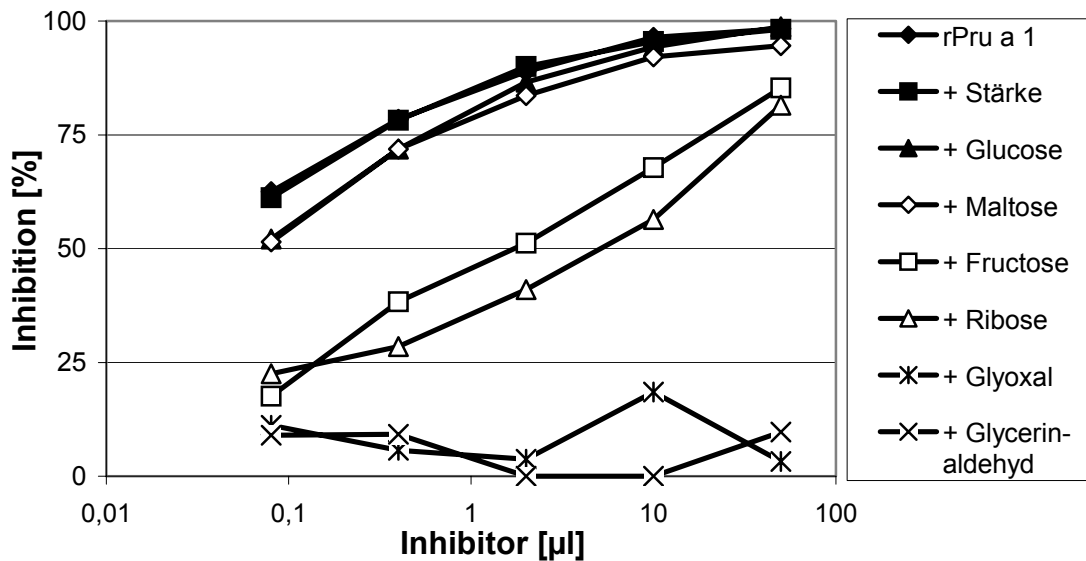


Abb. 2-1-4: EAST-Inhibitionsversuch der rPru a 1/Kohlenhydrat-Inkubationen (45 min, 95 °C). Eine Verschiebung der Hemmkurven zu größeren IC_{50} -Werten (oder größeren Inhibitormengen) entspricht einer Verminderung der Antikörperbindung.

Die in **Abb. 2-1-4** dargestellten Ergebnisse bestätigen einen deutlichen Einfluss des Kohlenhydrates auf die IgE-Bindungsaffinität des Allergens. Wie bereits beim direkten ELISA gezeigt, geht die Minderung der IgE-Affinität des glycosylierten Allergens rPru a 1 mit der Reaktivität der Zucker einher. Die Hemmkurven von rPru a 1 ohne Zusatz bzw. bei Reaktion mit Stärke zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf, was eine ähnliche AK-Bindungsaffinität nahe legt. Dem gegenüber sind die ebenfalls deckungsgleichen Kurven des Glucose- und des Maltose-Ansatzes zu etwas größeren IC_{50} -Werten (ca. 0,1 µL Inhibitor bezogen auf den unverdünnten Bräunungsansatz) verschoben, was einer schwachen Minderung der IgE-Affinität entspricht. In diesem Experiment wurde auch Fructose eingesetzt, von der bekannt ist, dass sie schneller in nicht-enzymatische Bräunungsprodukte umgesetzt wird als Glucose. In der Tat ist bei Fructose und Ribose die Inaktivierung von rPru a 1 sehr viel deutlicher ausgeprägt als bei Glucose. Dies ist erkennbar aus IC_{50} -Werten, welche ca. 2 µL bzw. 9 µL unverdünntem Bräunungsansatz entsprechen. Mit Glyoxal oder Glycerinaldehyd modifiziertes Protein zeigt keinen inhibitorischen Effekt mehr.

Auch die Zeitabhängigkeit der zuckerinduzierten Minderung der Allergenaktivität konnte durch kompetitive ELISA bestätigt werden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der zeitabhängigen Ribose-Ansätze und zwei Allergen-Inkubationen ohne Zuckerzusatz eingesetzt (**Abb. 2-1-5**).

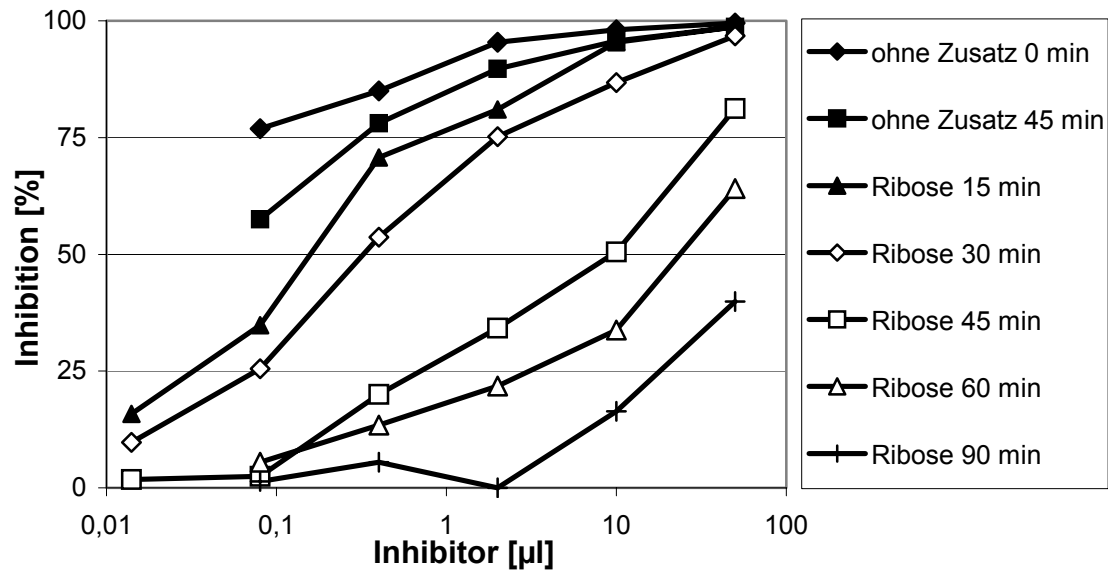


Abb. 2-1-5: EAST-Inhibitionsversuch zur zeitabhängigen Inhibierung von rPru a 1 in Gegenwart von Ribose bei 95 °C. Eine Verschiebung der Hemmkurven zu größeren IC_{50} -Werten entspricht einer Verminderung der Antikörperbindung.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den ribosehaltigen Ansätzen bereits nach 15 Minuten (IC_{50} -Wert entsprechend 0,1 µL unverdünntem Bräunungsansatz) eine signifikante Reduktion der IgE-Bindungsaffinität im Vergleich zum zuckerfreien System messbar war (IC_{50} -Werte « 0,05). Eine zunehmende Erhitzungszeit führte zu einer weiteren Abnahme der IgE-Bindungsaktivität, so dass nach 90 Minuten das modifizierte Protein die IgE-Bindung an das gebundene native rPru a 1 kaum noch inhibieren konnte.

Der zeitabhängige Einfluss der zuckerinduzierten Inaktivierung von rPru a 1 wurde auch mittels SDS-PAGE untersucht. Das entsprechende Elektropherogramm ist in **Abb. 2-1-6** dargestellt. Glucose/rPru a 1-Lösungen wurden 15, 30, 60 und 90 Minuten auf 95 °C erhitzt, einer SDS-PAGE-Elektrophorese unterzogen und das modifizierte Allergen mit Coomassie Brilliant Blau R 250 angefärbt. Nach 15- bzw. 30-minütiger Erhitzung konnte rPru a 1 immer noch als deutliche Bande bei 17,7 kDa detektiert werden (Spuren 1 und 2). Eine Verlängerung der Erhitzungsdauer auf 60 Minuten führte zu einem deutlichen Intensitätsverlust der gefärbten Proteinbande (Spur 3), und nach 90 Minuten war diese beinahe gänzlich verschwunden (Spur 4). Dies belegt eindeutig, dass die Glycosylierungsreaktion zu Strukturänderungen des Allergens führt, die elektrophoretisch mittels SDS-PAGE nachweisbar sind.

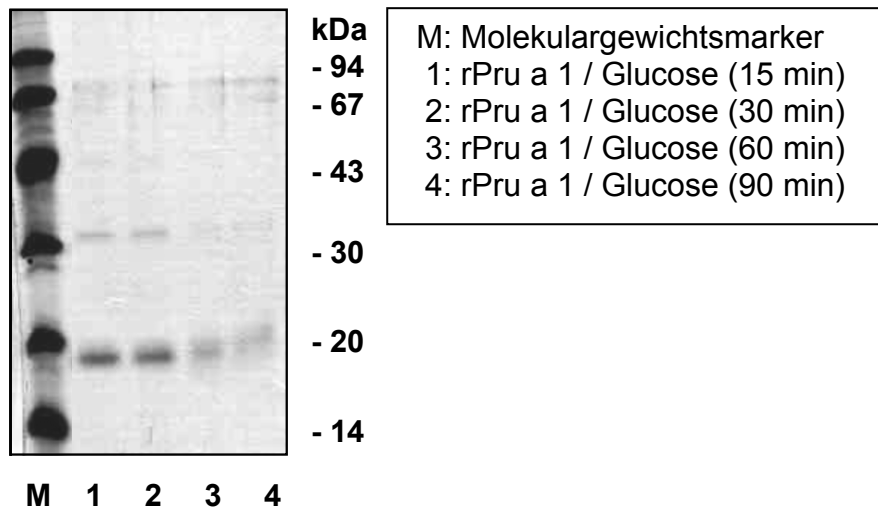


Abb. 2-1-6: SDS-PAGE von zeitabhängigen rPru a 1/Glucose-Inkubationen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es im Laufe der MAILLARD-Reaktion zu einer Modifizierung von Lysin- und Arginin-Seitenketten des Proteins unter Bildung von so genannten AGEs kommen kann. Durch diese Modifizierungen wäre es denkbar, dass die räumliche Struktur des Allergens verändert wird und ein Verlust der Konformationsepitope die Folge ist. Carboxymethyllysin (CML, **XII**, cf. **Abb. 1-7**) wird als das wichtigste AGE-Derivat des Lysins angesehen. Eine Überführung von lysinhaltigen Peptiden oder Proteinen in entsprechende CML-Derivate ist durch reduktive Alkylierung mit Glyoxylsäure und Natriumcyanoborhydrid möglich. Um den Einfluss einer Carboxymethylierung von Lysinseitenketten des Allergens näher zu untersuchen, wurde rPru a 1 entsprechend carboxymethyliert und das modifizierte Protein im ELISA auf seine immunologische Aktivität getestet. Dazu wurde das Protein durch nichtkovalente Wechselwirkungen an Maxisorb-Mikrotiterplatten gebunden. Wie die **Abb. 2-1-7** zeigt, beeinflusst die Zugabe von Glyoxylsäure bzw. Natriumcyanoborhydrid alleine nicht die AK-Affinität des Proteins. Wird jedoch das Allergen rPru a 1 mit beiden Reagenzien zusammen inkubiert, sinkt die AK-Bindung deutlich.

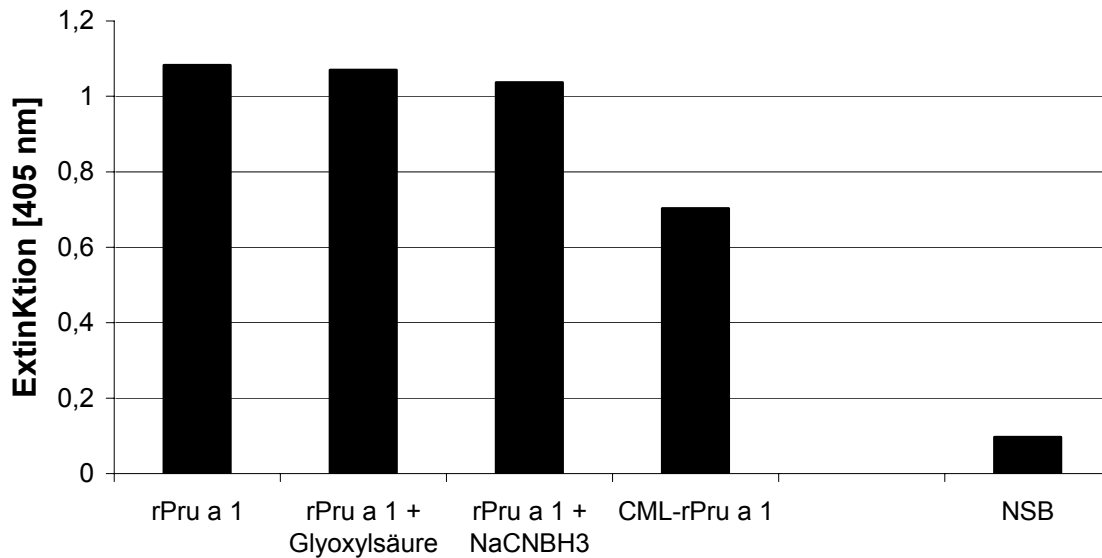


Abb. 2-1-7: ELISA von nativem und carboxymethyliertem rPru a 1 (250 ng/well). NSB = Negativkontrolle

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den bisherigen Experimenten und lässt den Schluss zu, dass eine Modifizierung der Seitenketten von rPru a 1 zum Verlust von Konformationsepitopen und damit zur Inaktivierung des Allergens führen kann.

2.1.2 Entwicklung eines neuen ELISA auf CovaLink-Basis

Bei den in 2.1.1 beschriebenen EAST-Versuchen nach Vieths (2000) werden Proteine an bromcyanaktivierte Papierscheiben gebunden. Dieses Verfahren ist sehr aufwändig und kostspielig. Proteine lassen sich auch nichtkovalent an Polystyrol-Mikrotiterplatten binden und mit Antikörpern detektieren, wie dies bereits für die Messungen von carboxymethyliertem rPru a 1 in 2.1.1 gezeigt wurde. Als weitere Möglichkeit wurde eine kovalente Bindung des Allergens direkt an die Oberfläche der Kavitäten von speziell modifizierten Mikrotiterplatten untersucht. Hierzu wurden für alle folgenden Inhibitionsversuche so genannte CovaLink-Mikrotiterplatten verwendet. Der Aufbau dieser Polystyrolplatten ist in **Abb. 2-1-8** dargestellt. An die Polystyroloberfläche der Kavitäten sind lange Spacer angeheftet, die in einer sekundären Aminogruppe enden. Die kovalente Bindung des Proteins an diesen Spacer erfolgt über eine Carbonsäurefunktion des Biomoleküls nach Aktivierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und 2-Sulfo-*N*-hydroxysuccinimid (Sulfo-NHS) (Staros *et al.*, 1986; Søndergård-Andersen *et al.*, 1990).

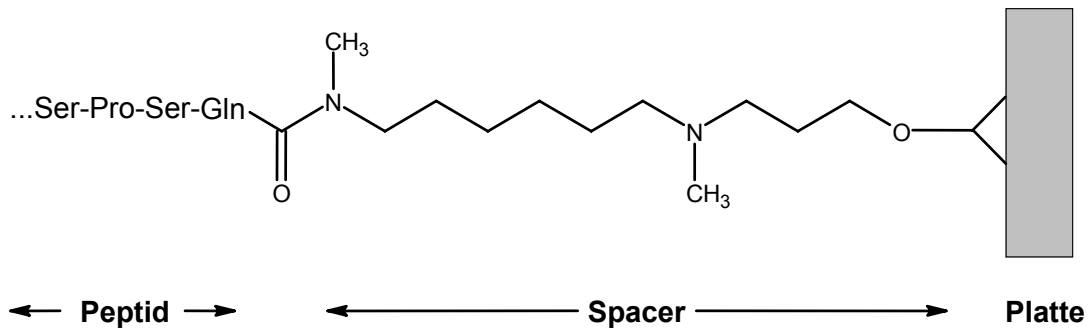


Abb. 2-1-8: Schematische Darstellung der kovalenten Bindung eines Proteins an den Spacer einer CovaLink-Platte. Eine Carbonsäurefunktion wie hier der C-Terminus ist an ein sekundäres Amin gebunden, welches über eine lange Dialkylmethylaminkette mit der Polystyroloberfläche der Platte verknüpft ist (nach Nunc, 1997, verändert).

Diese Methode zur kovalenten Bindung von Biomolekülen sollte mit derjenigen über bromcyanaktivierte Filterpapierscheiben nach Vieths (2000) verglichen werden. Hierzu wurde rPru a 1 an CovaLink-Platten gebunden und ein kompetitiver ELISA mit den für 45 Minuten erhitzten rPru a 1/Saccharid-Ansätzen durchgeführt. Dabei ergaben sich die in **Abb. 2-1-9** gezeigten Inhibitionskurven. Tendenziell stimmt der Kurvenverlauf mit denjenigen in **Abb. 2-1-4** überein. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind jedoch unterschiedlich, was durch den völlig verschiedenen Versuchsaufbau bedingt ist. Beispielsweise findet sich für den Fructose-Ansatz ein IC_{50} -Wert von umgerechnet ca. $0,2 \mu\text{L}$ unverdünntem Bräunungsansatz verglichen mit einem Wert von etwa $2 \mu\text{L}$ im Versuch an beschichteten Filterpapierscheiben. Dennoch führen sowohl der EAST-Versuch nach Vieths als auch die Messung an CovaLink-Platten zum gleichen Ergebnis: Während die Umsetzung von rPru a 1 mit Stärke, Maltose und Glucose die Inhibitionswirkung des Allergens nicht beeinflusst, ist bei der Reaktion mit Fructose und Ribose eine deutliche Inaktivierung festzustellen. Mit Glyoxal modifiziertes rPru a 1 zeigt keinen inhibitorischen Effekt mehr. Dieses Ergebnis belegt, dass für inhibitorische ELISA die Immobilisierung des Allergens mit bromcyanaktivierten Filterpapierscheiben durch die einfachere CovaLink-Methode ersetzt werden kann.

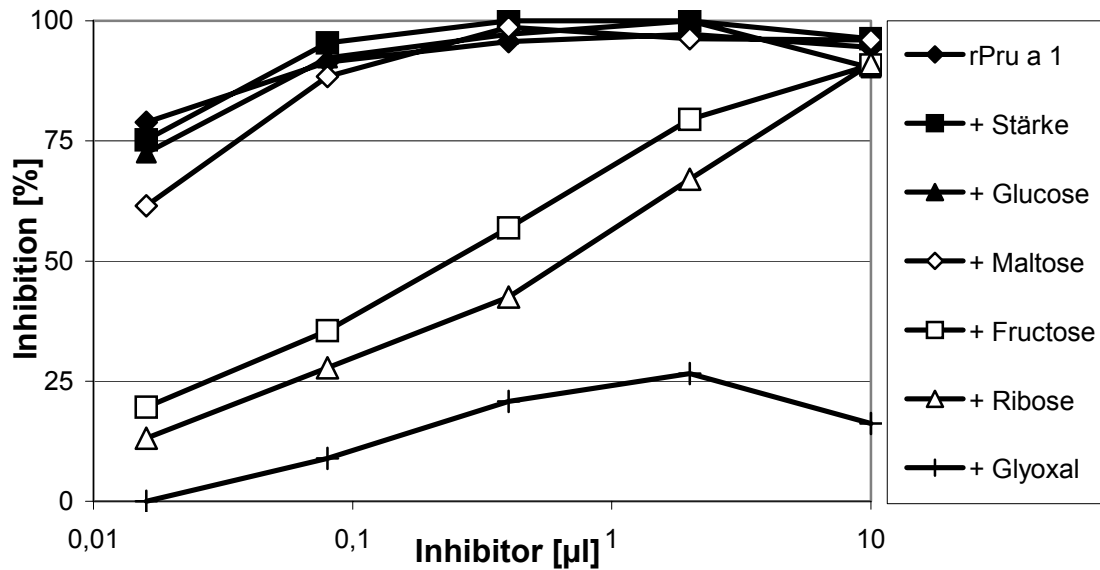


Abb. 2-1-9: Kompetitiver ELISA der 45-Minuten-Experimente von rPru a 1 an mit rPru a 1 beschichteten CovaLink-Platten.

2.1.3 Einfluss der enzymatischen Bräunung auf rPru a 1

Um den Effekt der enzymatischen Bräunung auf rPru a 1 zu untersuchen, wurde zunächst die Stabilität des Allergens gegenüber Polyphenolen und Polyphenoloxidase getestet. Als Pflanzenphenol wurde das in Kirschen vorkommende Epicatechin gewählt (Risch und Herrmann, 1988; Arts *et al.*, 2000). Eine Lösung von rPru a 1 ($c = 500 \mu\text{g/mL}$ in PBS) wurde in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Epicatechin (2,5 mmol/L) bzw. Polyphenoloxidase 30 Minuten bei Raumtemperatur bzw. 100 °C inkubiert. Die unveränderten und modifizierten Allergene wurden dann an MaxiSorb-Mikrotiterplatten gebunden und nachfolgend ein ELISA-Test durchgeführt, dessen Extinktionen in **Abb. 2-1-10** dargestellt sind.

Die Daten zeigen eindeutig, dass die AK-Affinität von rPru a 1 unbeeinflusst war, wenn es zusammen mit Epicatechin 30 Minuten bei Raumtemperatur bzw. bei 100 °C inkubiert wurde. Demnach scheint rPru a 1 auch unter forcierten Bedingungen keine Reaktion mit dem Polyphenol einzugehen. Auch eine Inkubation mit Polyphenoloxidase resultierte nicht in einer Änderung der IgE-Bindungsaktivität von rPru a 1. Wurden hingegen Polyphenoloxidase und ihr Substrat Epicatechin zusammen mit dem Allergen inkubiert, so konnte nach 30 Minuten keine AK-Bindung mehr detektiert werden.

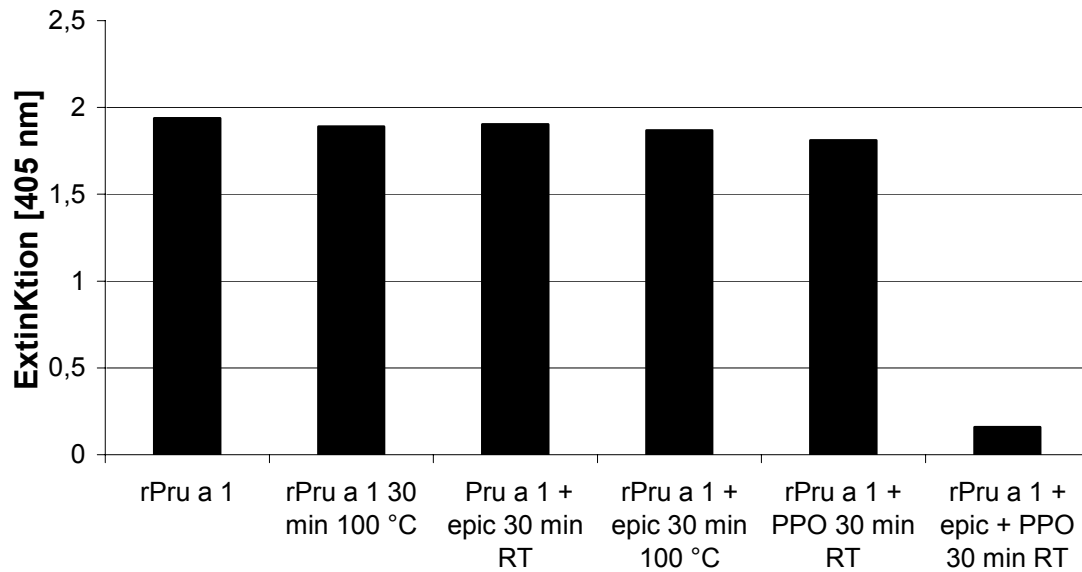


Abb. 2-1-10: ELISA von verschiedenen Modellansätzen bestehend aus rPru a 1 (250 ng/well), Epicatechin (epic) und Polyphenoloxidase (PPO).

Auch andere Polyphenole wie Catechin, Kaffeesäure, Gallussäure und Quercetin führten zu einer Schädigung von rPru a 1, wenn sie mit Polyphenoloxidase und dem Allergen zur Reaktion gebracht wurden. In allen Fällen wurde eine Abnahme der AK-Bindung beobachtet (**Abb. 2-1-11**). Dabei zeigt Kaffeesäure neben Epicatechin den stärksten Hemmeffekt, gefolgt von Catechin und Gallussäure mit etwas geringerer Aktivität. Das Flavon-3-ol Quercetin löste den schwächsten, aber immer noch deutlich messbaren Effekt aus.

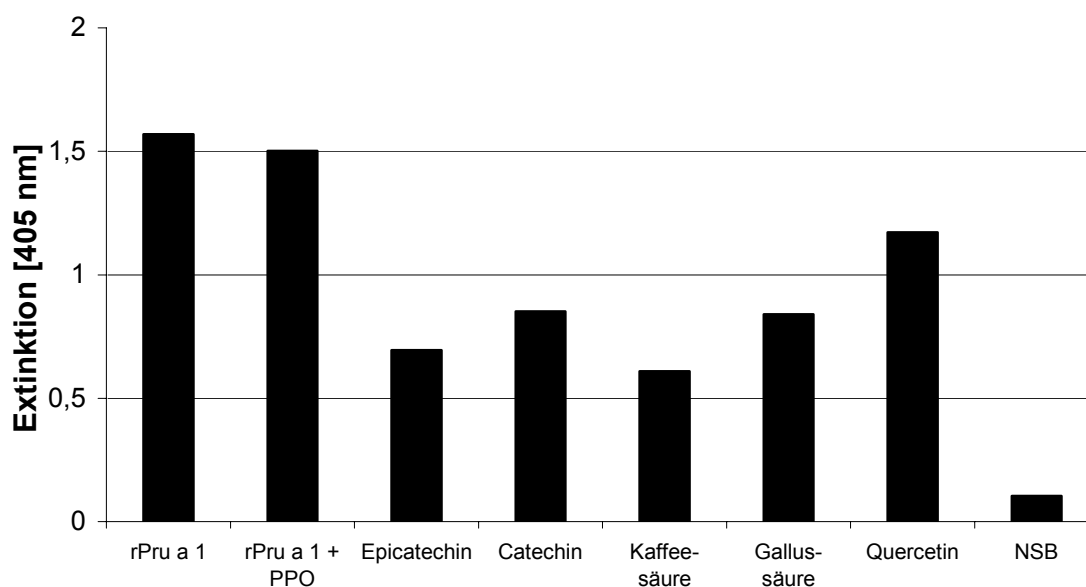


Abb. 2-1-11: ELISA von verschiedenen Modellansätzen bestehend aus rPru a 1 (250 ng/well), Polyphenoloxidase und verschiedenen Polyphenolen.

2.1.4 Diskussion

Untersuchungen zur Hitzebeständigkeit von rPru a 1 zeigten, dass dieses Allergen nicht so thermolabil ist, wie es die Zugehörigkeit zu den Bet v 1-homologen Konformationsallergenen zunächst erwarten ließ. Ein Erhitzen auf 95 °C für 30 Minuten führte zu keiner messbaren Änderung der IgE-Affinität. Erst durch eine längere thermische Belastung wurde rPru a 1 teilweise inaktiviert. Damit unterscheidet sich Pru a 1 von den anderen Allergenen der PR-10-Familie wie Mal d 1 oder Api g 1, von denen bekannt ist, dass sie unter Hitzeeinwirkung ihre allergene Potenz verlieren (Vieths *et al.*, 1996a; Vieths *et al.*, 1996b). Allerdings beziehen sich diese Erkenntnisse auf Erhitzungsversuche der Allergene in ihrer natürlichen Matrix. Isoliert ist beispielsweise das Sellerieallergen Api g 1 relativ stabil und verliert seine allergene Potenz auch nicht nach 30 Minuten bei 100 °C (Vieths *et al.*, 1998). Ein ähnliches Verhalten gegenüber Hitze zeigt nun auch das untersuchte Hauptallergen rPru a 1 der Süßkirsche. Wird die Erhitzungsdauer auf 90 Minuten ausgedehnt, zeigt rPru a 1 immer noch eine Restaktivität von ungefähr drei Viertel des Ausgangswertes. Daher ist anzunehmen, dass sich die in der Literatur beschriebene Hitzelabilität der Bet v 1-homologen Lebensmittelallergene nur auf die in der natürlichen Pflanzenmatrix eingebundenen Proteine beziehen kann. Die langsame Abnahme der IgE-Bindung dürfte auf eine hitzeinduzierte Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen sein. Während der Erhitzung scheinen konformationsbedingte Epitope verloren zu gehen.

Der Zusatz von reduzierenden Kohlenhydraten und gleichzeitige Erhitzung führte zu einer verstärkten Abnahme der IgE-Affinität. Der Umfang dieser Abnahme korrelierte mit der Reaktivität der zugesetzten Saccharide. Stärke und die wenig reaktive Maltose hatten bei einer Erhitzungsdauer von bis zu 90 Minuten keinen zusätzlichen Einfluss auf das Allergen. Monosaccharide wie Glucose, Fructose und Ribose führten hingegen im Vergleich zum zuckerfreien System zu einer signifikanten Abnahme der IgE-Bindung. Das Ausmaß dieses Effektes korrelierte zum einen mit der Reaktivität des Kohlenhydrates (Pentose > Keto-hexose > Aldo-hexose) und zum anderen mit der Erhitzungsdauer. Beispielsweise führte die Inkubation mit Ribose zu einer stärkeren Inaktivierung des Allergens als die entsprechende Umsetzung mit Fructose und Glucose. Dies stimmt mit der bekannten Tatsache überein, dass Pentosen in der MAILLARD-Reaktion im allgemeinen schneller umgesetzt werden als Hexosen. Diese Effekte konnten sowohl durch direkte ELISA-Experimente als auch durch kompetitive EAST-Inhibitionsversuche belegt werden. Dass während dieser Reaktion Glycosylierungen des Proteins im Sinne einer MAILLARD-Reaktion ablaufen, zeigte die

Verbreiterung der Proteinbanden bei der elektrophoretischen Analyse der Bräunungsansätze. Wurden die Kohlenhydrate durch hochreaktive Zuckerabbauprodukte der MAILLARD-Reaktion wie Glyoxal oder Glycerinaldehyd ersetzt, so ging die IgE-Affinität des Allergens rasch und vollständig verloren. Um zu überprüfen, ob das als Reaktionsprodukt von Lysinseitenketten und Glyoxal beschriebene Carboxymethyllysin für solch einen dramatischen Verlust der IgE-Bindungsaffinität eines Allergens verantwortlich sein könnte, wurde rPru a 1 mit Glyoxylsäure und Natriumcyanoborhydrid carboxymethyliert. Dabei konnte mittels ELISA eine deutliche Abnahme der IgE-Affinität des Allergens rPru a 1 gemessen werden. Vermutlich führt die Umwandlung von Lysin in CML zu Konformationsänderungen des Proteins und somit zum teilweisen Verlust von Epitopen. Das vollständig carboxymethylierte rPru a 1 besaß aber noch eine gewisse Restallergenität, während mit Glyoxal behandeltes Protein keine IgE-Bindung mehr aufwies. Eine Ursache könnte sein, dass durch Glyoxal neben den Lysinseitenketten auch die Argininreste des Proteins modifiziert werden können und auf diese Weise weitere Konformationsepitope zerstört werden, die durch die selektiven Carboxymethylierungsreagenzien Glyoxylsäure/Natriumcyanoborhydrid nicht angegriffen werden.

Neben der Zerstörung der Konformationsepitope durch thermisch induzierte Denaturierung und durch MAILLARD-Reaktion konnte ferner gezeigt werden, dass Reaktionen im Sinne einer enzymatischen Bräunung das Allergen schädigen können. Das in Kirschen vorkommende Flavan-3-ol Epicatechin (Risch und Herrmann, 1988; Arts *et al.*, 2000) hatte als Einzelkomponente auch bei Erhitzen auf 100 °C keinen Einfluss auf die Allergenität von rPru a 1. Ähnliches wurde auch bei Inkubation des Allergens mit dem Enzym Polyphenoloxidase erhalten. Letzteres Ergebnis ist zunächst etwas überraschend, denn neben der Umwandlung von *o*-Diphenolen in *o*-Chinonen besitzt das eingesetzte Enzym auch die Fähigkeit, Monophenole wie Tyrosin zu *o*-Diphenolen bzw. *o*-Chinonen zu oxidieren (Duckworth und Coleman, 1970; Jolley *et al.*, 1974). Daher wäre es denkbar, dass die Polyphenoloxidase die Tyrosinreste von rPru a 1 verändert, was mit einer Zerstörung von konformellen Epitopen einhergehen könnte. Eine Inkubation mit Polyphenoloxidase führte aber zu keiner messbaren Inaktivierung des Allergens. Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass keine Reaktion unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen stattgefunden hat, erklärbar dadurch, dass z. B. die eingesetzte Menge an Enzym zu gering bzw. die Reaktionszeit zu kurz war. Andererseits ist auch denkbar, dass eine enzymatische Reaktion stattgefunden hat, diese aber nicht zu einer ausreichenden Konformationsänderung führte, um in einer Inaktivierung

des Allergens zu resultieren. Wurden jedoch Epicatechin und Polyphenoloxidase zusammen mit dem Allergen inkubiert, so wurde rPru a 1 binnen Minuten stark geschädigt. Diese Reaktionsbedingungen treten bekanntermaßen bei der Dekompartimentierung von Fruchtgewebe auf. Ähnliche Effekte waren auch bei anderen Polyphenolen wie Catechin, Gallussäure, Kaffeesäure und Quercetin zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass das Enzym aus den Phenolen hochreaktive *o*-Chinone freisetzt, die nukleophile Seitenketten von Aminosäuren modifizieren können (Björkstén *et al.*, 1980; Vieths *et al.*, 1992; Rudeschko *et al.*, 1995). Auch dadurch können bestehende Konformationsepitope zerstört und die IgE-Bindung an das Allergen vermindert werden (Abb. 2-1-12).

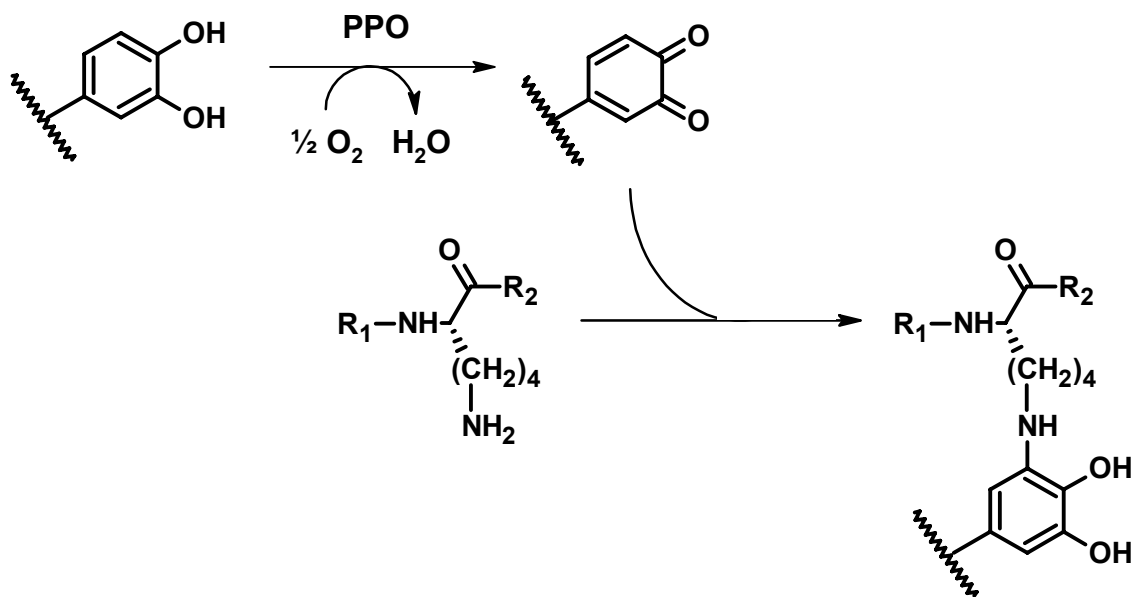


Abb. 2-1-12: Oxidation eines *o*-Diphenols zu einem *o*-Chinon und nachfolgende Addition an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes.

2.2 Untersuchungen zu Proteinen aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*)

2.2.1 Einfluss der MAILLARD-Reaktion und der enzymatischen Bräunung auf Erdnusslectin

Das allergene Potential von nativem Erdnusslectin

In einem einfachen ELISA-Experiment wurde natives Erdnusslectin an Maxisorb-Platten gebunden und mit den verdünnten Sera verschiedener Erdnussallergiker inkubiert. Hierbei kamen die Patientensera PEI 163 und PEI 164 (PAUL-EHRLICH-Institut), sowie die Sera JG 3, HF 4, JB 5, SK 26 und GK 31 (Forschungszentrum Borstel) zum Einsatz. Als Kontrollen wurden die Sera von zwei Nichtallergikern (DFA 1 und DFA 2) und mehrerer Kirschallergikern (PEI 50, 79, 147, 160, 165) verwandt. Wie **Abb. 2-2-1** verdeutlicht, wurde Erdnusslectin von sechs der sieben Erdnussallergikern selektiv erkannt.

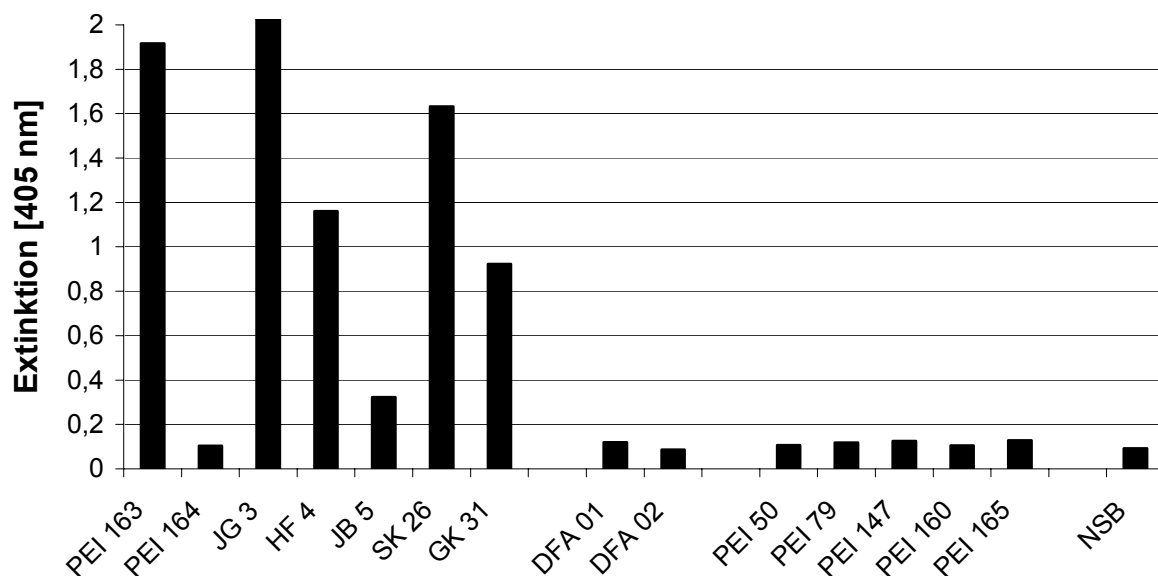


Abb. 2-2-1: ELISA von Erdnusslectin (250 ng/well) mit verschiedenen Sera von Erdnussallergikern, Nichtallergikern und Kirschallergikern. PEI 163 1:100, alle anderen Sera 1:10.

Die stärkste Reaktion wurde bei den Sera JG 3 und SK 26 detektiert, während die Antikörperbindung bei den Patienten HF 4 und GK 31 etwas schwächer ausfiel. Bei JB 5 war gerade noch eine Antikörperbindung nachweisbar. Im Fall des Serums PEI 164 lag das Signal auf Höhe der Kontrollsera bzw. des Reagenzienblindwertes (NSB). Während diese Sera 1:10 verdünnt eingesetzt wurden, war bei PEI 163 auch in einer 1:100 Verdünnung noch eine

deutliche AK-Bindung zu beobachten. Es war davon auszugehen, dass es sich um eine spezifische Antigen/Antikörperreaktion von Erdnusslectin und den Serum-IgE-Antikörpern der Patienten mit Erdnussallergie handelt. Theoretisch wäre auch eine nichtspezifische Bindung über die zuckerbindende Eigenschaft des Lectins denkbar, da Antikörper glycosyliert sein können. Dagegen spricht, dass im Falle der Nichtallergiker und Kirschallergiker keine AK-Bindung zu erkennen ist. Ferner zeigt ein polyklonales anti-rAra h 2-Kaninchenserum eine starke Affinität zu Erdnusslectin, während zwei Kontrollsera von nicht-immunisierten Kaninchen keine IgE-Bindungen zeigten.

Einfluss der MAILLARD-Reaktion auf die IgE-Bindung von Erdnusslectin

Um den Einfluss von Glycosylierungsreaktionen auf die IgE-Bindung des Erdnusslectins zu studieren, wurden Erhitzungsexperimente in Analogie zu den rPru a 1-Modellversuchen (cf. 2.1.1) durchgeführt ($c = 500 \mu\text{g/mL}$ in PBS ($\text{pH} = 6,8$); 50 mM Zucker; 95°C). Während des Erhitzens fiel das Lectin langsam aus, konnte aber durch Verdünnen mit TBS-Puffer nach der Reaktion wieder in Lösung gebracht werden. Die Ergebnisse in **Abb. 2-2-2** zeigen, dass die IgE-Bindungsaktivität des Lectins durch 60-minütiges Erhitzen nur wenig vermindert wurde. Ebenso besaß das mit Maltose bzw. Glucose umgesetzte Lectin eine dem erhitzten Lectin vergleichbare Antikörperaffinität. Wurde die Hitzebehandlung jedoch in Anwesenheit stark reaktiver Kohlenhydrate durchgeführt, sank die IgE-Bindung drastisch. Dabei zeigte der ELISA, dass Ribose zu einer stärkeren Inaktivierung führt als Fructose.

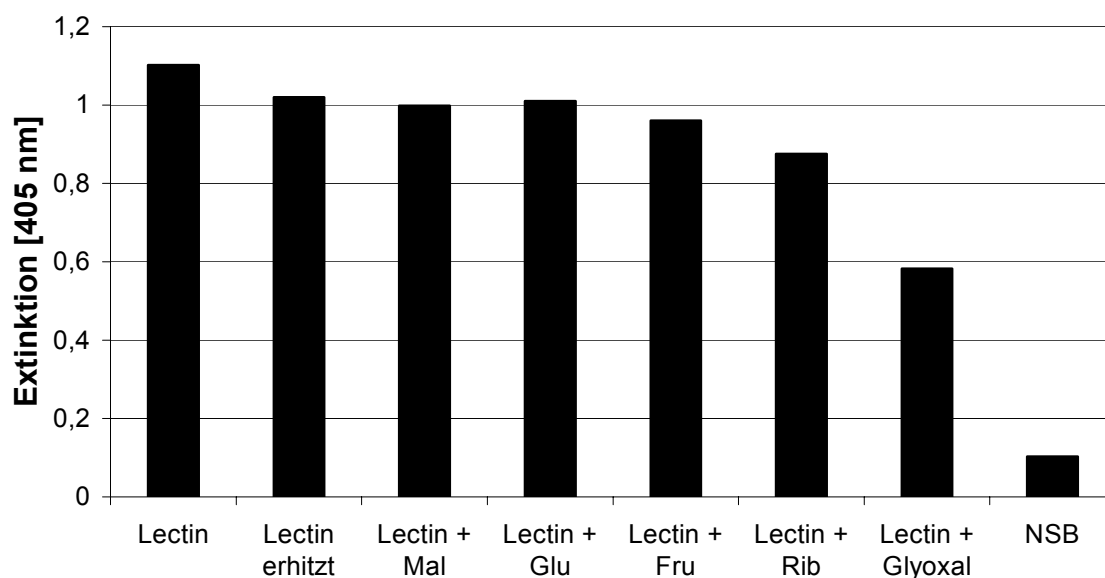


Abb. 2-2-2: ELISA von nativem und erhitztem Erdnusslectin (125 ng/well) ohne und mit Zucker; Erhitzungsdauer 60 min; Patientenserum PEI 163 1:100.

Den größten Einfluss auf die IgE-Bindungsaffinität zeigt das sehr reaktive Zuckerabbauprodukt Glyoxal. Nach 60 Minuten Reaktionsdauer war nur ein Signal von ca. 50 % des Ausgangswertes zu detektieren.

Diese Ergebnisse konnten durch einen kompetitiven ELISA bestätigt werden, für den das anti-Ara h 2-Kaninchenserum benutzt wurde (**Abb. 2-2-3**). Es zeigte sich, dass die mit dem wenig reaktiven Disaccharid Maltose inkubierte Lectinlösung eine identische Inhibitionswirkung aufwies wie die ohne Zuckerzusatz erhitzte Proteinlösung (IC_{50} -Werte entsprechend 0,1 μ L unverdünnter Lectinlösung). Ansätze mit den Hexosen Glucose und Fructose zeigten eine 50%ige Inhibition bei Inhibitorvolumina von ca. 0,15 μ L, was einer schwachen Minderung der AK-Affinität entspricht. Zu einer weiteren Verschiebung der Hemmkurven nach rechts führte die Umsetzung von Lectin mit Ribose. Die Inhibitionswirkung des mit Glyoxal modifizierten Lectins war noch geringer (IC_{50} -Wert entsprechend 2 μ L Bräunungsansatz).

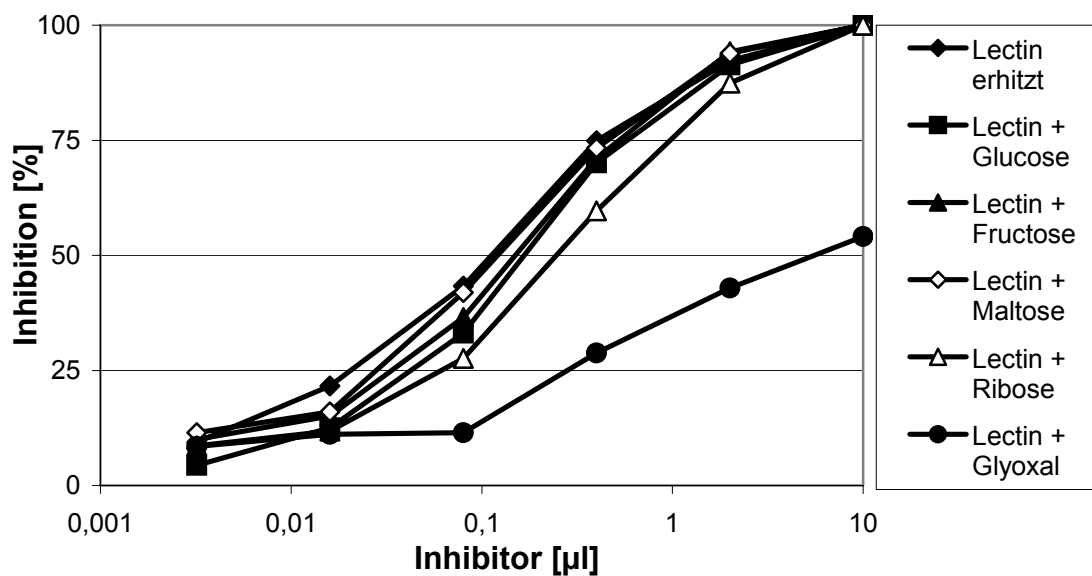


Abb. 2-2-3: EAST-Inhibitionsversuch der 60-Minuten Erhitzungsversuche von Lectin mit Zuckern mit anti-Ara h 2-Kaninchenserum. Eine Verschiebung der Hemmkurven nach rechts entspricht einer Verminderung der Antikörperbindung.

In **Abb. 2-2-4** ist der zeitabhängige Verlauf dieser Inaktivierung am Beispiel des Patientenserums PEI 163 dargestellt. Innerhalb der ersten 30 Minuten ist beim Erhitzen eine messbare Abnahme der AK-Bindung zu erkennen, während längeres Erhitzen zu keiner signifikanten Minderung der AK-Bindung mehr führte. Inkubation in Anwesenheit von Glucose oder Ribose resultierte in einer stärkeren Inaktivierung des Lectins. Hierbei reagierte Ribose erwartungsgemäß stärker als Glucose. Erhitzen mit Glyoxal führte innerhalb der ersten halben Stunde zu einer sehr starken Hemmung der AK-Bindung, die dann ebenfalls nur noch langsam abnahm. Erklärbar werden die Beobachtungen dadurch, dass das Lectin beim

Erhitzen langsam ausfällt. So können innerhalb der ersten halben Stunde Reaktionen des Lectins in Lösung stattfinden. Danach wirken die Reagenzien auf ausgefallenes Protein ein, was zu einer starken Minderung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

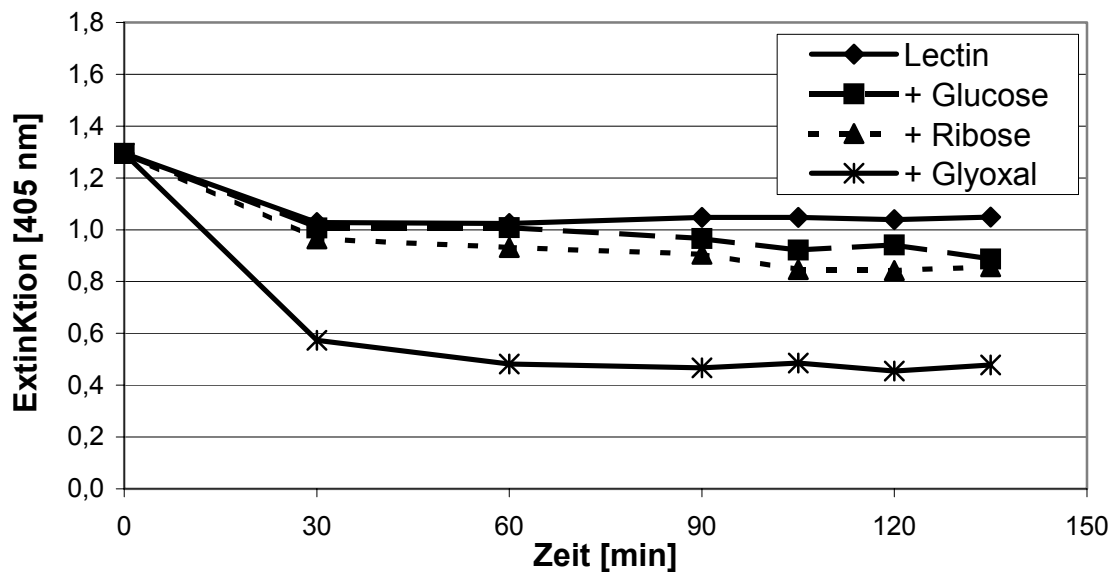


Abb. 2-2-4: ELISA der zeitabhängigen Inaktivierung von Erdnusslectin (125 ng/well) ohne Zuckerzusatz (♦) und in Anwesenheit von Glucose (■), Ribose (▲) und Glyoxal (*). Patientenserum PEI 163 (1:100).

Auch Erdnusslectin wurde einer chemischen Carboxymethylierung unterworfen, um die Überführung von Lysin-Resten in CML zu simulieren. Hierzu wurde natives Erdnusslectin mit einem Überschuss an Glyoxylsäure und Natriumcyanoborhydrid inkubiert. Im ELISA zeigte sich, dass im Falle der Humansera schon die alleinige Behandlung mit Natriumcyanoborhydrid das Lectin schädigte und die IgE-Affinität verminderte. Beim Kaninchenserum trat dieser Effekt nicht auf. In allen drei Fällen wurde für CML-Lectin eine deutlich geringere IgE-Affinität bestimmt als für entsprechende Kontrollansätze (**Abb. 2-2-5**).

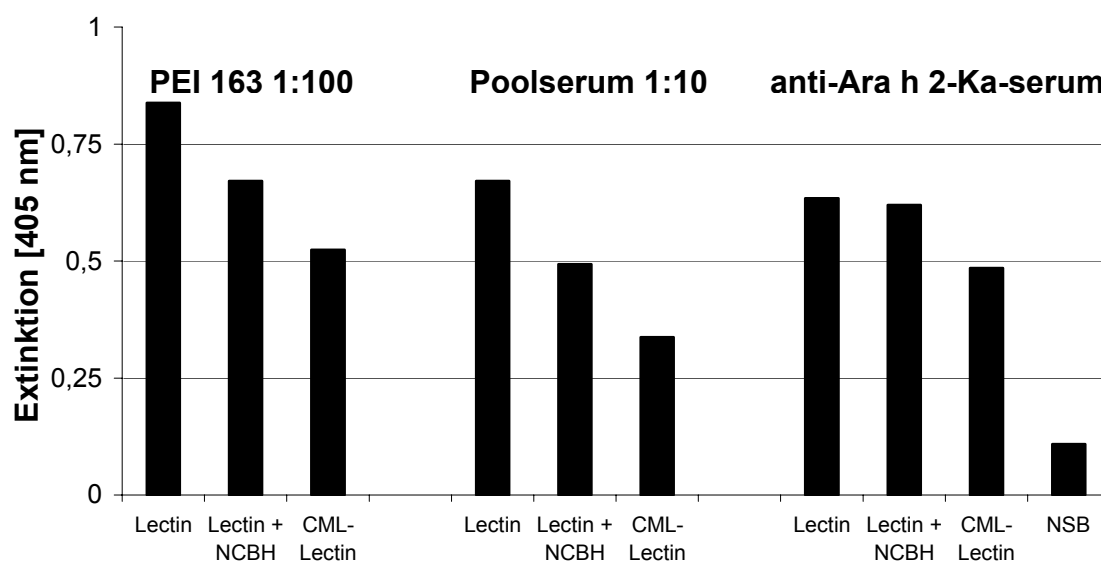


Abb. 2-2-5: ELISA von nativem und carboxymethyliertem Erdnusslectin (250 ng).

NCBH = Natriumcyanoborhydrid.

Einfluss der enzymatischen Bräunung auf die IgE-Bindung von Erdnusslectin

Um analog zu den Studien zum Kirschallergen den Einfluss der enzymatischen Bräunung auf die IgE-Bindungsaktivität des Erdnusslectins zu untersuchen, wurde das Lectin in An- bzw. Abwesenheit von Polyphenoloxidase bzw. einzelnen Pflanzenphenolen inkubiert. **Abb. 2-2-6** verdeutlicht, dass Polyphenoloxidase alleine keinen entscheidenden Einfluss auf die AK-Bindung ausübte, während bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Polyphenols eine deutliche Minderung der AK-Bindung zu beobachten war. Den schwächsten Hemmeffekt von den untersuchten Polyphenolen wies die Gallussäure auf, während die Bräunung mit Kaffeesäure die allergene Potenz fast völlig zerstörte. Diese Effekte konnten sowohl beim Patienten-Poolserum als auch beim anti-rAra h 2-Kaninchenserum nachgewiesen werden.

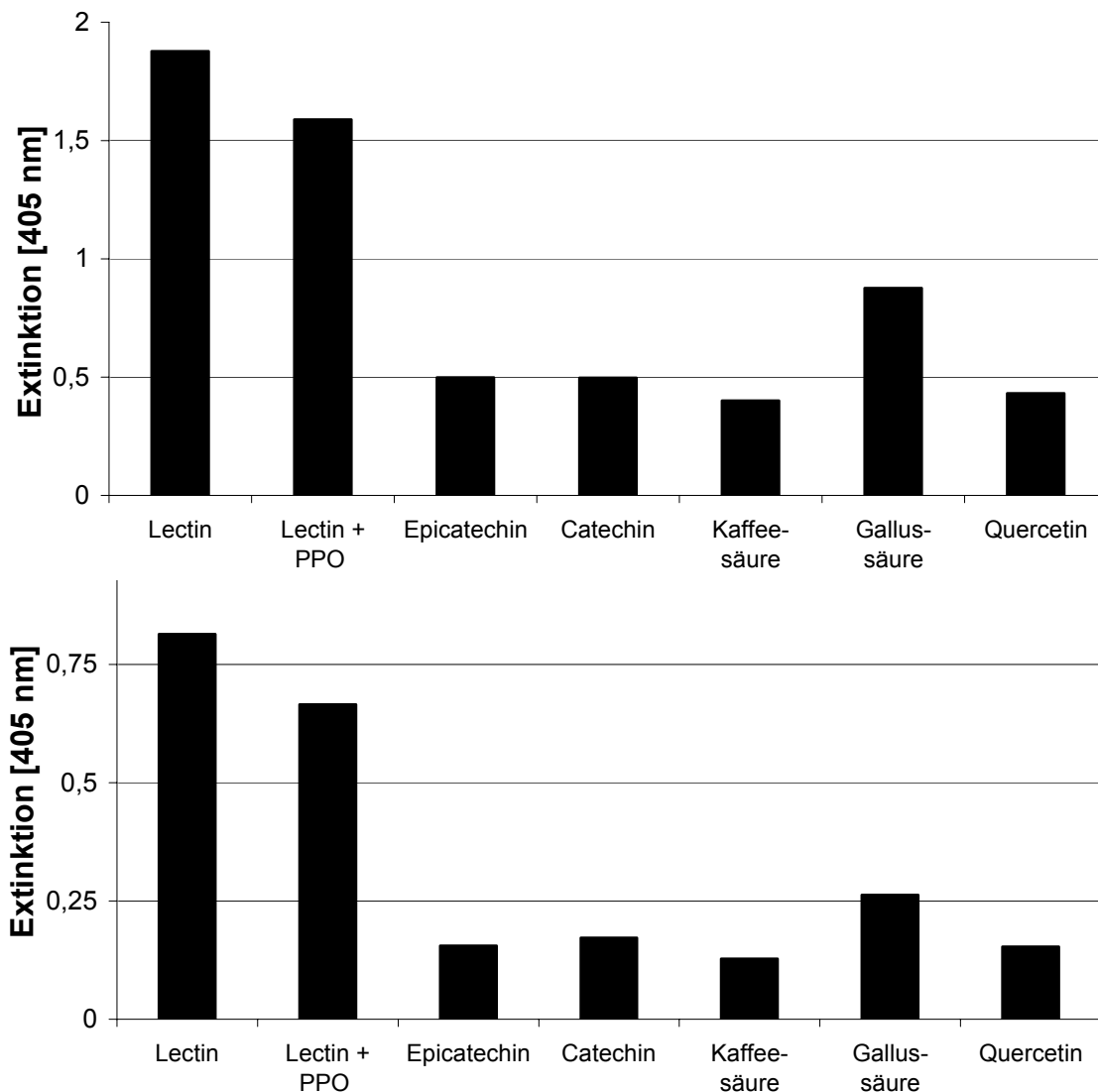


Abb. 2-2-6: ELISA von verschiedenen Modellansätzen bestehend aus Erdnusslectin (250 ng), Polyphenoloxidase (PPO) und verschiedenen Polyphenolen; oben Poolserum (1:10), unten anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:100.000).

Diskussion

In ELISA-Studien wurde die IgE-Affinität von kommerziell erhältlichem Erdnusslectin untersucht. Danach wurde in Analogie zu den Studien zum Kirschallergen der Einfluss von thermischer Belastung und zucker-induzierten Glycosylierungsreaktionen auf die immunologischen Eigenschaften des Lectins näher beleuchtet. Die Arbeitsgruppe um Chung und Champagne (1999) gelangte durch immunologische Versuche zur Ansicht, dass Erdnusslectin keinerlei Reaktion mit den Sera von Erdnussallergikern eingeht. Erst durch MAILLARD-Reaktion entstünden daraus AK-bindende Produkte. Im Widerspruch zu diesen Daten wurde in den durchgeführten ELISA-Studien bei sechs von sieben untersuchten Erdnussallergikersera eine spezifische IgE-Bindung an natives Erdnusslectin festgestellt. Durch Kontrollexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen nicht-spezifischen Bindungseffekt über die zuckerbindende Eigenschaft des Lectins handelt. Erdnusslectin stellt somit ein weiteres potentiell allergenes Erdnussallergen dar. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, die klinische Relevanz dieses Proteins abzuschätzen. Interessanterweise zeigte auch ein polyklonales anti-rAra h 2-Kaninchenserum eine starke Affinität zu Erdnusslectin. In einem Vergleich der Primärsequenzen konnten allerdings keine Homologien zwischen dem Lectin und dem Erdnussallergen festgestellt werden. Daher scheiden gemeinsame Strukturelemente wie identische oder ähnliche Sequenzepitope als Ursache für diese Kreuzreaktivität aus. Unwahrscheinlich ist, dass das zur Immunisierung des Kaninchens benutzte Ara h 2 mit Lectin verunreinigt oder das Versuchstier durch das Futter mit diesem Protein in Kontakt kam. Eine Verunreinigung des kommerziell erhältlichen Erdnusslectins mit Ara h 2 konnte durch elektrophoretische Analysen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Plausibel scheint hingegen die Annahme von gemeinsamen Konformationsepitopen in Erdnusslectin und Ara h 2. Dass Ara h 2 eben den publizierten Sequenzepitopen auch konformelle IgE-Bindungsstellen enthält, belegen jüngste Experimente (Dr. Becker, Forschungszentrum Borstel, persönliche Mitteilung). Die Existenz von Konformationsepitopen im Erdnusslectin wird durch Beobachtungen bezüglich der Thermostabilität gestützt. Durch Erhitzungsexperimente konnte gezeigt werden, dass Erdnusslectin unter Kochbedingungen langsam inaktiviert wird.

Chung und Champagne (1999) beobachteten die Entstehung von IgE-bindenden Strukturen aus Erdnusslectin bei der Umsetzung mit Glucose und Fructose. Die Wiederholung dieser Experimente zeigte jedoch den gegenteiligen Effekt. Je nach Reaktivität des in der MAILLARD-Reaktion eingesetzten Kohlenhydrates wurde die allergene Potenz des Proteins mehr oder weniger stark vermindert. Ribose und Fructose zeigten einen deutlicheren Effekt als Glucose und Maltose. Wie beim Kirschallergen führte die Inkubation mit dem Zuckerabbauprodukt Glyoxal zu einer drastischen Minderung der IgE-Bindung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine künstliche Carboxymethylierung die IgE-Bindung herabsetzt. Ferner zeigten auch enzymatische Bräunungsreaktionen eine schädigende Wirkung auf das Allergen. Da über die Natur der Epitope von Erdnusslectin keine Erkenntnisse vorliegen, kann über die Ursachen dieser Effekte nur spekuliert werden. Falls analog zum Kirschallergen Pru a 1 Konformationsepitope vorliegen sollten, ist es denkbar, dass thermische Einflüsse bzw. die Modifizierung von reaktiven Aminosäuren zu einer Konformationsänderung und somit zum Verlust dieser Bindungsstellen führen.

2.2.2 Einfluss der MAILLARD-Reaktion auf rAra h 2

Um die Temperaturstabilität von rAra h 2 und den Einfluss nicht-enzymatischer Glycosylierungsreaktionen auf dessen IgE-Bindungsaktivität zu untersuchen, wurde das rekombinante Allergen in Analogie zu den Inkubationsexperimenten von rPru a 1 und Erdnusslectin zucker-induzierten Glycosylierungsreaktionen unterzogen. Hierzu wurde rAra h 2 in An- bzw. Abwesenheit von verschiedenen Zuckern und Dicarbylen für 60 bzw. 90 Minuten bei 95 °C inkubiert (cf. 2.1.1; c = 280 µg/mL). Die Messung der Antikörperbindung erfolgte analog dem beim Erdnusslectin beschriebenen Verfahren durch einen direkten ELISA an Polystyrol-Mikrotiterplatten bzw. EAST-Inhibitionsversuche an CovaLink-Platten. Für das Allergiker-Poolserum, das Patientenserum PEI 163 und das polyklonale anti-Ara h 2-Kaninchenserum konnte nachgewiesen werden, dass bereits einfaches Erhitzen von rAra h 2 zu einer gesteigerten Antikörperbindung führte (**Abb. 2-2-7**). Dies kann z. B. auf einer Auffaltung des Proteins und einer damit verbundenen besseren Zugänglichkeit möglicherweise verborgener Epitope basieren. Das Erhitzen von rAra h 2 in Gegenwart von Kohlenhydraten resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Antikörperbindung. Dieser Effekt war von der Reaktivität der Zucker abhängig. Die Pentose Ribose verursachte im Fall des Patientensersums PEI 163 sowie des Kaninchensersums eine deutliche Zunahme, während der Effekt bei den Hexosen Glucose und Fructose bedeutend schwächer ausfiel. Inkubation mit Maltose brachte hingegen keine Zunahme der AK-Bindung im Vergleich zum zuckerfreien System. Besonders eindrucksvoll war die Erhöhung der IgE-Bindungsaktivität durch Reaktion mit den Zuckerabbauprodukten Glyoxal und Methylglyoxal. So wurde die IgE-Bindungsaktivität beim Patientenpoolserum um den Faktor 4-5 im Vergleich zum nativen Protein gesteigert. Beim Patientenpoolserum konnte nur bei Inkubation mit den Dicarbylen eine deutliche Steigerung der IgE-Bindungsaktivität des Proteins gemessen werden. Der starke Effekt des Glyoxal- bzw. Methylglyoxal-modifizierten Proteins im Poolserum verschiedener Patienten machte deutlich, dass Modifikationen des rAra h 2 mit α -Dicarbylen offensichtlich eine besondere Bedeutung bei der Steigerung der IgE-Bindung zukam (**Abb. 2-2-7**).

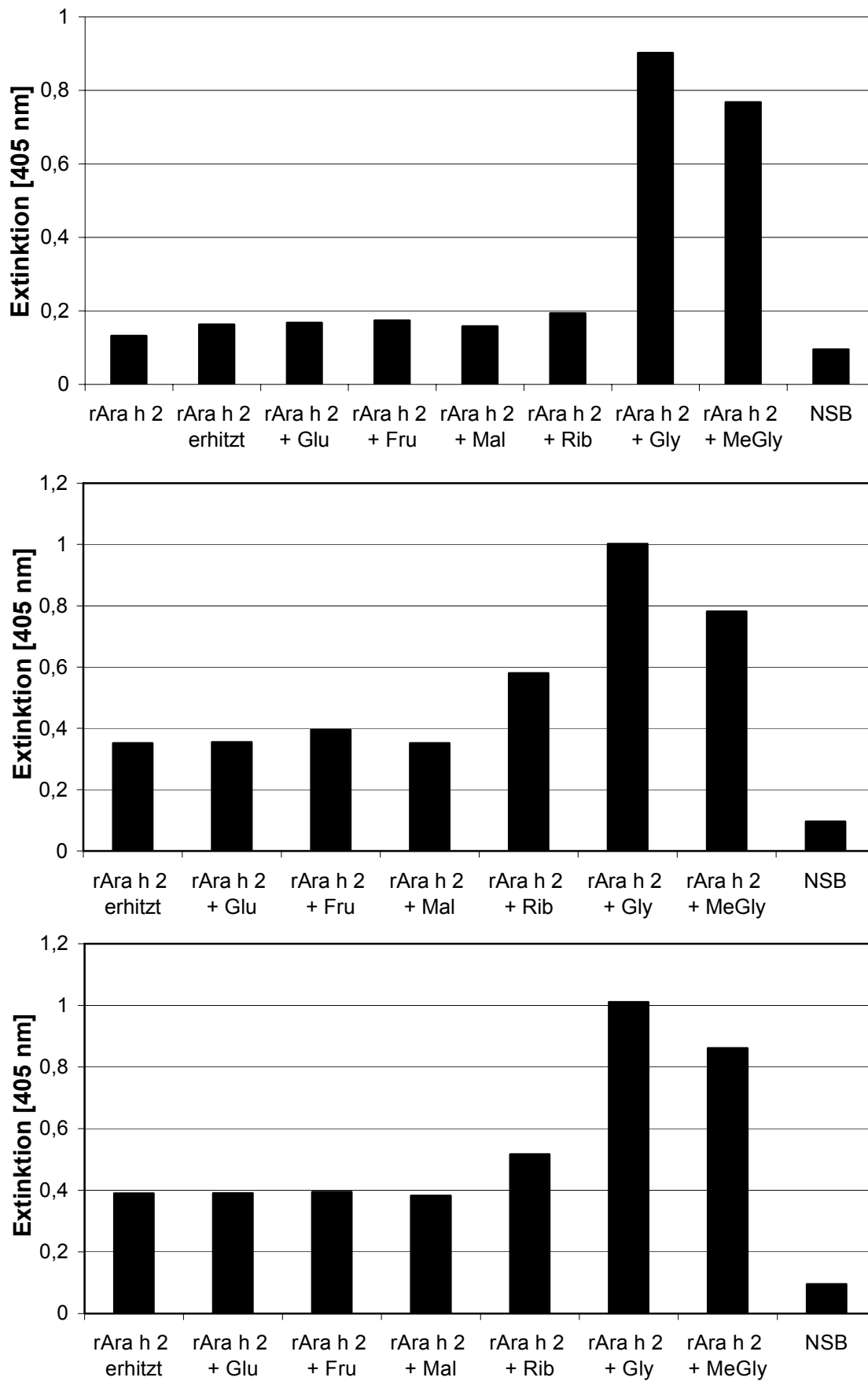


Abb. 2-2-7: ELISA von nativem und erhitztem rAra h 2 (50 ng) ohne und mit Zusatz von Zucker und Dicarbonylen (90 Minuten). Gly = Glyoxal, MeGly = Methylglyoxal
 Oben: Poolserum (1:10), Mitte: Patientenserum PEI 163 (1:200)
 Unten: anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:200.000)

Die Ergebnisse sollten nun durch entsprechende Inhibitionsexperimente weiter abgesichert werden. **Abb. 2-2-8** zeigt einen Versuch mit dem polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum. Eine Erhitzung (90 min, 95 °C) ohne Zucker führte zu einer Verschiebung der Hemmkurven zu kleineren IC_{50} -Werten, was einer erhöhten Antikörperaffinität entspricht. Während Erhitzen mit Maltose, Glucose und Ribose zu keiner weiteren Erhöhung der IgE-Affinität führte, wurde nach Inkubation mit dem reaktiven Intermediat Glyoxal eine deutliche Zunahme der Antikörper-Affinität gemessen. So genügte bei Glyoxal-modifiziertem rAra h 2 bereits ein Zehntel des Inhibitorvolumens, um im Vergleich zu ohne Zusatz erhitztem rAra h 2 eine 50%ige Hemmung der Antikörperreaktion auszulösen. Diese Ergebnisse korrelieren somit sehr gut mit den Daten der direkten ELISA-Experimente.



Abb. 2-2-8: EAST-Inhibitionsversuch der Erhitzungsversuche (60 min/95 °C) von rAra h 2 mit Zuckern bzw. Glyoxal (Kaninchenserum).

Ein analoges Inhibitionsexperiment wurde mit dem Patientenserum PEI 163 (**Abb. 2-2-9**) durchgeführt. Hier wurde Glyoxal gegen das Zuckerabbauprodukt Glycerinaldehyd ausgetauscht. Aus den Daten ist ersichtlich, dass erhitztes rAra h 2 eine größere Inhibitionswirkung besitzt als natives. Reaktion mit Glucose und Maltose führt zu einer weiteren Erhöhung der IgE-Bindung. Noch deutlicher verschiebt die Umsetzung mit Ribose die Hemmkurve hin zu kleineren IC_{50} -Werten. Mit Glycerinaldehyd gebräuntes Allergen besitzt eine ähnliche Inhibitionswirkung. Glycerinaldehyd scheint somit eine der Ribose vergleichbare Aktivität zu besitzen. Auch diese Daten korrelieren gut mit den Ergebnissen der direkten ELISA-Messungen.

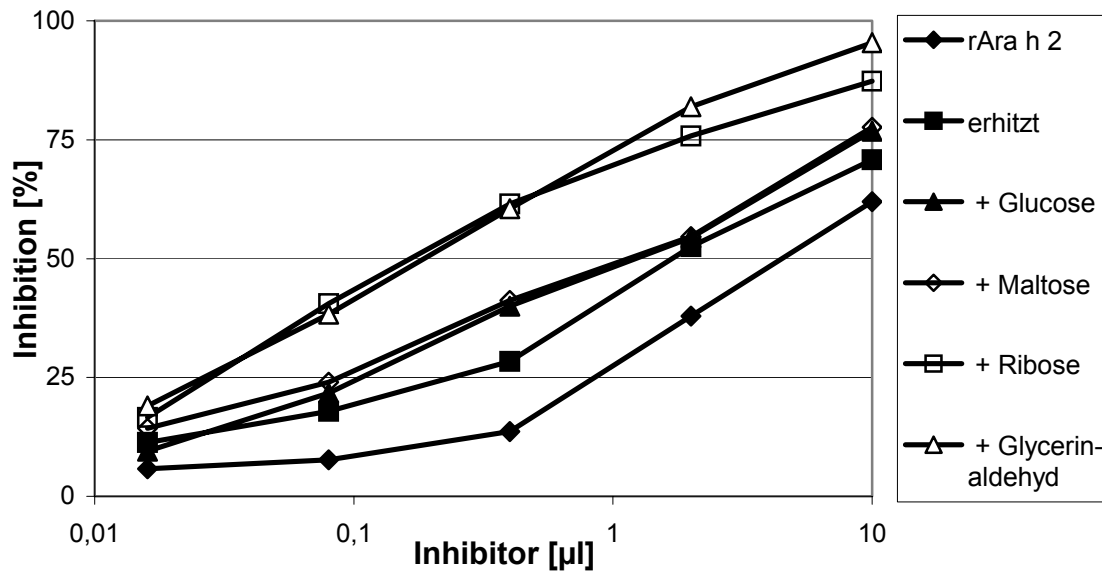


Abb. 2-2-9: EAST-Inhibitionsversuch der Erhitzungsversuche (90 min/95 °C) von rAra h 2 mit Zuckern bzw. Glycerinaldehyd (Patientenserum PEI 163).

In entsprechenden Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass natives, erhitztes sowie glycosyliertes rAra h 2 keine IgE-Aktivität in ELISA mit einem Kaninchen-Kontrollserum (gewonnen vor der Immunisierung) bzw. einem humanen Nichtallergikerserum aufwies. Des Weiteren wurde für ein nicht-allergenes Protein (Rinderserumalbumin) unter vergleichbaren Bedingungen keinerlei AK-Bindung detektiert (Daten nicht dargestellt).

Diskussion

Anhand von direkten ELISA-Experimenten sowie von kompetitiven Inhibitionstests konnte gezeigt werden, dass die beim Erhitzen von rAra h 2 in Gegenwart von reduzierenden Zuckern ablaufenden nicht-enzymatischen Glycosylierungsreaktionen (MAILLARD-Reaktion) zu einer Erhöhung der Antikörperbindung des Proteins führen. Die wenig reaktiven Zucker Maltose und Glucose führten zu einer schwachen, Fructose und Ribose zu einer deutlichen Steigerung des allergenen Potentials. Als besonders reaktiv stellten sich kurzkettige α -Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal heraus. Diese führten zu einer drastischen Zunahme der Antikörperbindung. Für die Reaktivitäten der einzelnen Saccharide und Intermediate ergab sich bezüglich der Modulation der Allergenaktivität die gleiche Reihenfolge, die auch beim Kirschallergen Pru a 1 und beim Erdnusslectin aufgestellt wurde. Bei rAra h 2 wurde jedoch der gegenteilige Effekt einer IgE-Bindungszunahme gemessen. Dies konnte sowohl im direkten wie kompetitiven ELISA-Versuchen beobachtet werden. Die Daten decken sich mit den Erkenntnissen aus der Literatur, wonach die nicht-enzymatische Glycosylierung von Ara h 2 zu einer dramatischen Zunahme der AK-Bindung führt (Maleki

et al., 2000). Dies war sowohl bei allen untersuchten Allergikersera als auch beim polyklonalen anti-rAra h 2-Kaninchenserum der Fall. Es muss davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt von Modifizierungen am Ara h 2-Protein ausgelöst wird. Eine Zunahme der AK-Bindung durch Entstehung von nicht-proteinischen Bräunungsprodukten aus der MAILLARD-Reaktion konnte durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden. Zum einen wurde in ELISA-Studien von glycosyliertem rAra h 2 mit Nichtallergikersera keine AK-Bindung festgestellt, auch für nicht-allergenes Rinderserumalbumin wurde nach Bräunung unter vergleichbaren Bedingungen keinerlei IgE-Affinität gemessen. Zum anderen zeigten die Versuche beim Erdnusslectin eine Minderung des AK-Bindungspotentials bei analogem Versuchsaufbau. Es ist also unwahrscheinlich, dass nicht-proteinischen Reaktionsprodukte eine Bindungsaffinität zu Antikörpern im Allgemeinen und zu rAra h 2-spezifischen Antikörpern im Besonderen besitzen.

Es stellte sich nun die Frage, warum MAILLARD-modifiziertes Ara h 2 eine höhere IgE-Affinität im ELISA aufweist. Es war unwahrscheinlich, dass die verstärkte IgE-Erkennung im ELISA auf einer Interaktion von glycosyliertem Ara h 2 und nicht-spezifischen AGE-Antikörpern der Sera beruht. Da Menschen und auch Versuchstiere mit AGE-haltigen Lebensmitteln in Kontakt kommen, wäre es höchst verwunderlich, warum nur Erdnussallergiker mit glycosyliertem Ara h 2 verstärkt reagieren und Nichtallergiker keine Bindung mit dem modifizierten Protein eingehen. Denkbar wäre hingegen, dass Erdnussallergiker durch den Konsum von Lebensmitteln aus gerösteten Erdnüssen für bestimmte Ara h 2-Modifizierungen sensibilisiert wurden und sich daher im Serum dieser Patienten spezifische AGE-Ara h 2-Antikörper gebildet haben. Diese könnten im ELISA das glycosylierte Protein zusätzlich erkennen und den gemessenen Effekt auslösen. Dem widersprechen jedoch die Versuche mit dem anti-Ara h 2-Kaninchenserum. Es ist unwahrscheinlich, dass die Versuchstiere mit gerösteten Erdnussbestandteilen in Kontakt kamen, da bei deren Ernährung penibel auf die Abwesenheit von Erdnussprodukten geachtet wurde. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass durch bestimmte, kohlenhydrat-induzierte Modifizierungen bestehende Epitope verändert oder neue Epitope erzeugt werden.

Die deutlichste Steigerung der IgE-Bindungsaktivität von Ara h 2 wurde bei Inkubation mit den hochreaktiven MAILLARD-Intermediaten Glyoxal und Methylglyoxal beobachtet. Von diesen α -Dicarbonylverbindungen ist bekannt, dass sie reaktive Seitenketten von Proteinen modifizieren können. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, wie dieser Effekt zustande

kommen kann. Denkbar ist eine modifizierungsspezifische Steigerung der Antikörperbindungskonstante bestehender Epitope. Durch strukturelle Veränderungen der Epitope könnten die Paratope der Antikörper gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip besser an diese Strukturen angreifen (linker Weg in **Abb. 2-2-10**). Dieser als „better fit“ bezeichnete Mechanismus wurde durch Stanley *et al.* (1997) beim Alanin-Scan der Ara h 2-Epitope in einigen Fällen bereits nachgewiesen. So führte der Austausch von Ser⁷⁰ in Epitop 7 gegen Alanin zu einer signifikanten Steigerung der IgE-Bindung an dieses Epitop.

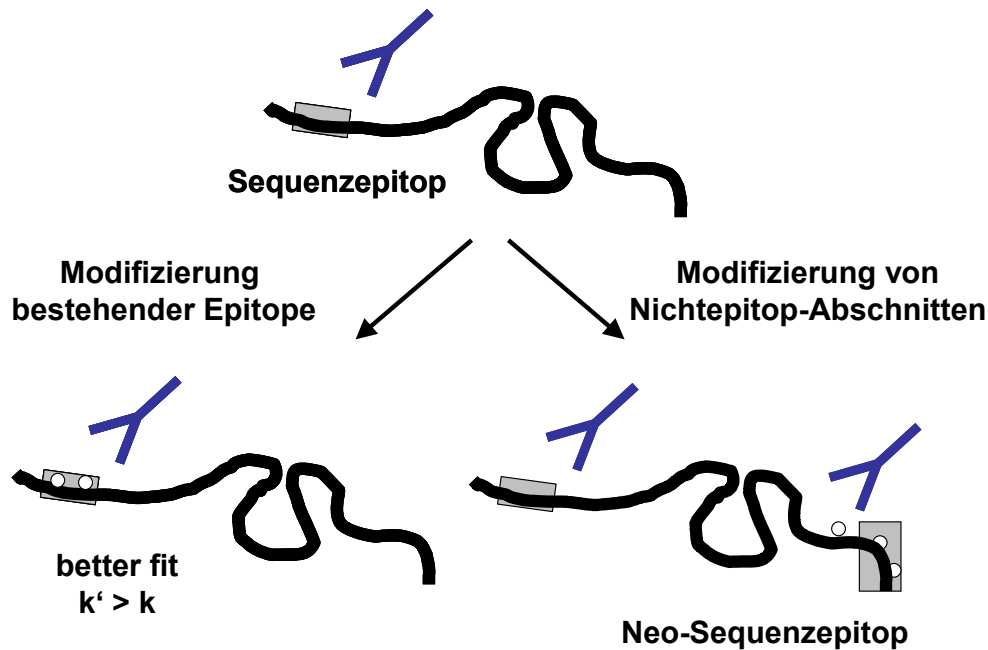


Abb. 2-2-10: Entstehung von Epitopen mit „better fit“ durch Glycosylierung von bestehenden Sequenzepitopen oder Bildung von Neo-Sequenzepitopen durch Modifizierung von bislang nicht IgE-affinen Abschnitten.
O = Modifizierung

Des Weiteren lässt sich über die Bildung kohlenhydrat-induzierter Neo-Epitope spekulieren (rechter Weg in **Abb. 2-2-10**). Allergenabschnitte, die im nativen Zustand nicht von Antikörpern erkannt werden, könnten durch MAILLARD-induzierte Veränderungen spontan eine IgE-Affinität hervorbringen. Ferner ist es denkbar, dass sich die nicht-enzymatische Bräunung auch auf die räumliche Struktur des Allergens auswirkt. Hierdurch könnten zum einen bisher verborgene Sequenzepitope plötzlich freigelegt (linker Weg in **Abb. 2-2-11**) oder konformationsbedingte Neoepitope neu entstehen (rechter Weg in **Abb. 2-2-11**). Alle diese Mechanismen könnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessene Steigerung der IgE-Bindung von glycosyliertem rAra h 2 erklären.

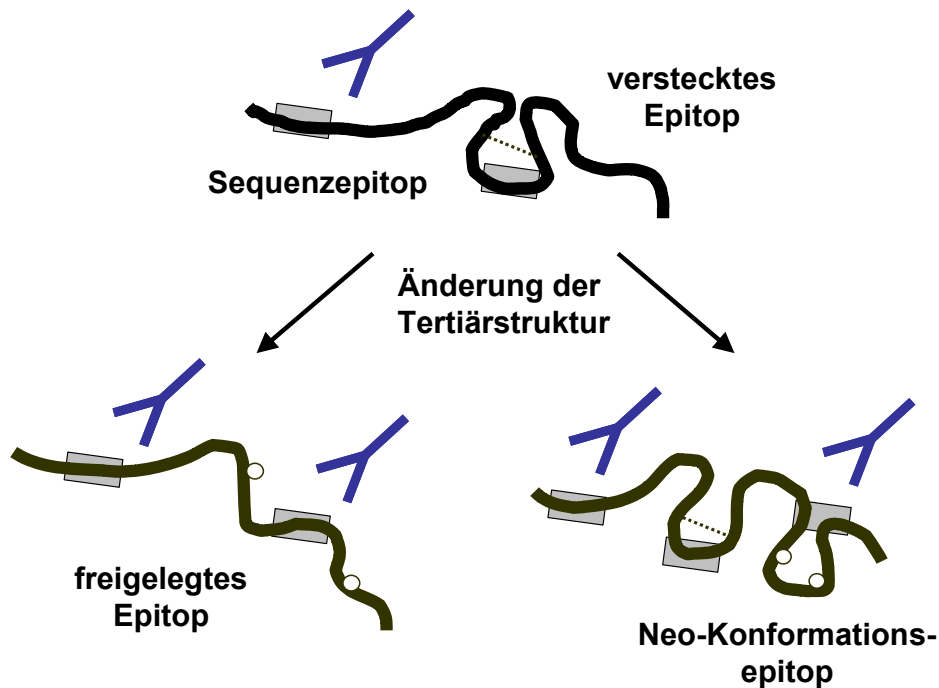


Abb. 2-2-11: Entstehung von freigelegten Epitopen und Neo-Sequenzepitopen durch Kohlenhydrat-induzierte Modifizierung. O = Modifizierung

Als am plausibelsten und einfachsten nachzuweisen erwiesen sich die beiden zuerst beschriebenen Szenarien. Unter dieser Annahme sollte versucht werden, die Positionen und Strukturen dieser potenten Modifizierungen in glycosyliertem rAra h 2 zu lokalisieren. Reaktionsprodukte von α -Dicarbonylverbindungen waren gemäß dem derzeitigen Kenntnistand nur mit den Seitenketten von Lysin und Arginin zu erwarten (cf. Kapitel 1.5). Darüber hinaus war allenfalls noch eine Interaktion mit der freien Aminogruppe des N-Terminus denkbar. Diese möglichen MAILLARD-*targets* sollten beginnend mit den lysinhaltigen Abschnitten von Ara h 2 im Folgenden untersucht werden.

2.2.3 Einfluss der MAILLARD-Reaktion auf die IgE-Bindungsaffinität von Ara h 2-Partialsequenzen

2.2.3.1 Immunologische Untersuchung von Peptiden

Im Folgenden sollten einzelne Partialsequenzen von Ara h 2 synthetisiert, mit Kohlenhydraten umgesetzt und dann die IgE-Bindungsaktivität der glycosylierten Peptide mit der der unbehandelten Peptide verglichen werden. Die Antikörperaffinität eines Peptids kann mittels DotBlot-Techniken sowie mit dem im Rahmen der Arbeit entwickelten ELISA an CovaLink-Platten (cf. Kapitel 2.1.2) untersucht werden. Für einen Antikörper-Test müssen die Peptide jedoch eine bestimmte Mindestgröße besitzen, um von Antikörpern erkannt zu werden. In einem Vorversuch wurden zunächst zwei der von Stanley *et al.* (1997) identifizierten Ara h 2-Hauptepitope (**Tab. 2-2-1**) als Decapeptide durch Peptidfestphasensynthese (Fields und Noble, 1990) hergestellt. Peptid **P1** stellt das Hauptepitop 6, Peptid **P2** das Hauptepitop 7 dar.

Tab. 2-2-1: Modellpeptide für die Hauptepitope von Ara h 2.

Bezeichnung	Sequenz	Position in Ara h 2	Ausbeute Rohprodukt	Reinheit Rohprodukt
P1	YERDPYSPSQ	57-66	95 %	84 %
P2	SQDPYSPSPY	65-74	95 %	> 90%
P3	LQGDRRCQSQLERAN	24-38	72 %	68 %
P4	RDEDSYERDPYSPSQ	52-66	82 %	78 %
P5	PYSPSQDPYSPSPYD	61-75	85 %	> 95 %
Epitop 3	DRRCQSQLER	27-36		
Epitop 6	YERDPYSPSQ	57-66		
Epitop 7	SQDPYSPSPY	65-74		

Nach Aufreinigung durch HPLC an RP-C18-Kieselgel wurden **P1** und **P2** diese mittels DotBlot-Techniken auf bromcyan-aktivierter Nitrocellulose fixiert, mit verschiedenen Sera inkubiert und die Antikörperbindung durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Hierbei konnte im Widerspruch zu den von Stanley *et al.* (1997) publizierten Daten auch bei hohen Serakonzentrationen für ein humanes Allergikerserum keinerlei, für das polyklonale anti-rAra h 2-Kaninchenserum nur im Fall des Epitops 7 eine mäßige IgE-Bindung beobachtet werden (**Abb. 2-2-12** links). Da möglicherweise die zu geringe Länge der Decapeptide für die schlechte IgE-Bindung verantwortlich sein könnte, wurden deshalb die drei Hauptepitope von Ara h 2 in Form von Pentadecapeptiden synthetisiert (**P3**, **P4** und **P5** in **Tab. 2-2-1**) und analog untersucht. In diesem Fall wurden vom humanen Allergikerserum bzw. vom

polyklonales Kaninchenserum je zwei der drei Peptide detektiert (**Abb. 2-2-12** rechts). Ausgehend von diesem Befund wurden alle im Folgenden zu untersuchenden Peptide mit einer Mindestlänge von 15 Aminosäuren hergestellt. Eine nicht-spezifische Bindung konnte durch Vergleich mit einem Präimmunisierungs-Kaninchenserum bzw. einem humanen Nichtallergikerserum sowie durch Versuche mit einem nicht-allergenem Bet v 1-Abschnitt ausgeschlossen werden (**Abb. 2-2-12**).

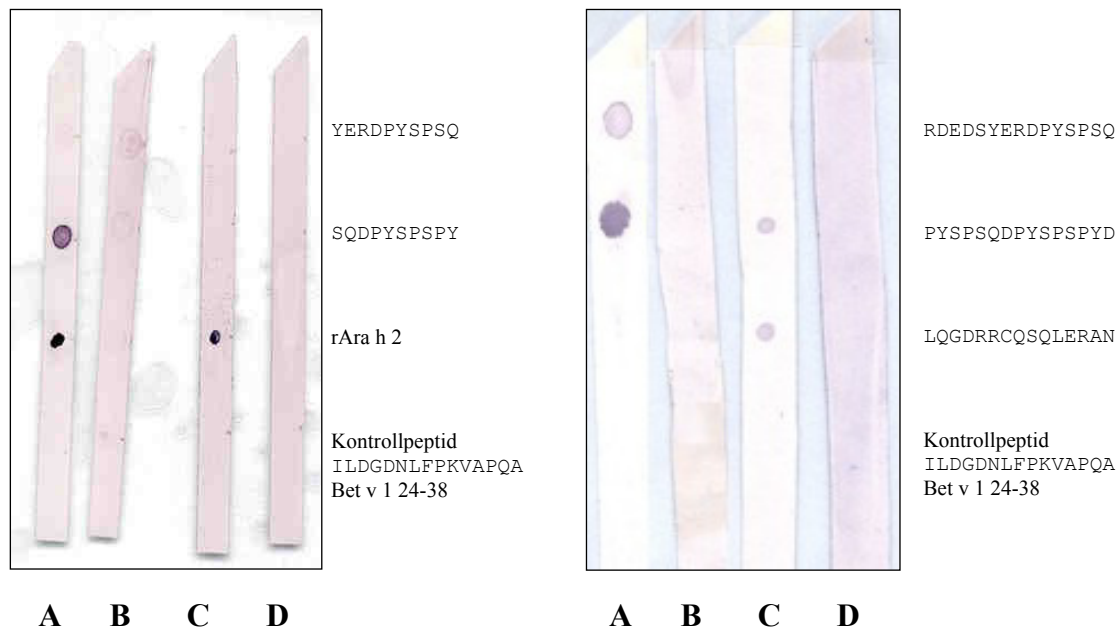


Abb. 2-2-12: DotBlot-Experimente auf bromcyanaktivierter Nitrocellulose; alle Peptide je 100 ng
 A: anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:20.000); B: präimmunisiertes Kaninchenserum (1:20.000)
 C: Erdnussallergikerserum PEI 163 (1:10); D: Nichtallergikerserum DFA 01 (1:10)

In ähnlicher Weise wurden die drei Hauptepitope 3, 6 und 7 in Form der Pentadecamere einem ELISA an CovaLink-Platten unterzogen. Hier erkannten das Kaninchenserum und das Allergikerserum PEI 163 alle drei Epitope, wenn auch mit unterschiedlicher Stärke (**Abb. 2-2-13**). Während beide Sera eine hohe Affinität zu den Epitopen 3 und 7 aufwiesen, fiel die Bindung an Epitop 6 deutlich geringer aus. Nichtspezifische Bindungen konnten auch hier durch Kontrollexperimente mit dem Bet v 1-Bruchstück sowie einem humanem Nichtallergikerserum (DFA 01) und dem Kaninchen-Präimmunisierungsserum ausgeschlossen werden. Somit war gezeigt, dass mittels des CovaLink-ELISA die IgE-Bindung von Peptiden nachgewiesen und diese in ihrer IgE-Affinität verglichen werden können.

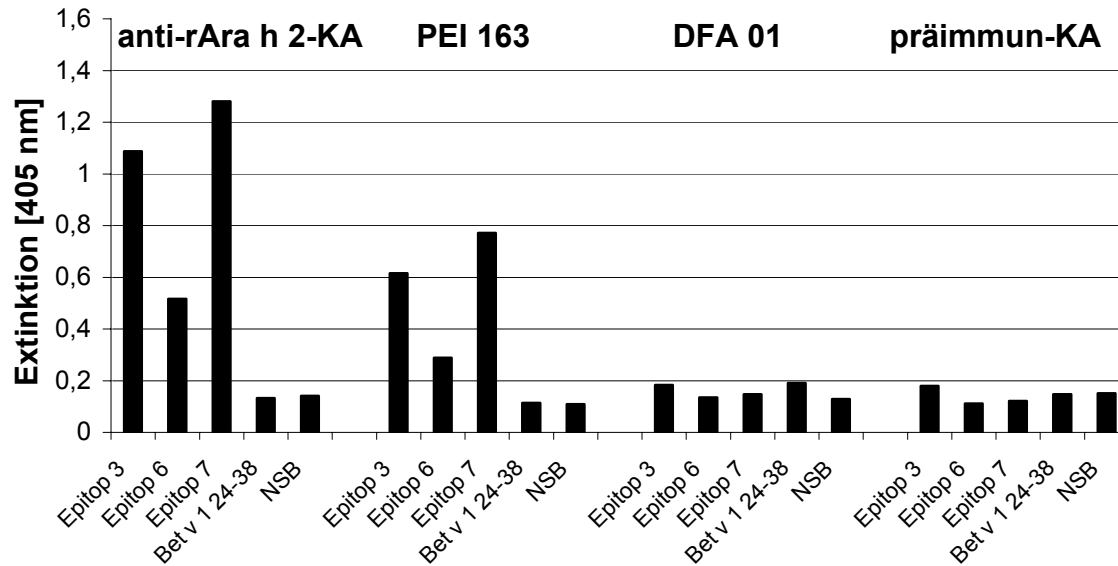


Abb. 2-2-13: CovaLink-ELISA der Epitope 3 (P3, LQGDRCQSQLERAN), 6 (P4, RDEDSYERDPYSPSQ) und 7 (P5, PYSPSQDPYSPSPYD, je 300 pmol/well) mit anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:100.000), Erdnussallergikerserum PEI 163 (1:100), Nichtallergikerserum DFA 01 (1:10) und dem präimmunisierten Kaninchenserum (1:100.000).

2.2.3.2 Untersuchungen zu den lysinhaltigen Sequenzabschnitten von Ara h 2

Synthese und Untersuchung der nativen Ara h 2-Sequenzen

Aus Literaturarbeiten ging hervor, dass das Ara h 2-Protein nur zwei Lysin-Einheiten enthält, welche sich in Abschnitten befinden, die bisher als wenig bedeutsame Nebenepitope bewertet wurden (Stanley *et al.*, 1997). Es wäre daher denkbar, dass diese Abschnitte durch eine Kohlenhydratmodifizierung der Lysin-Seitenkette in Strukturen mit größerem Antikörperbindungspotential überführt werden. Die wichtigsten AGE-Produkte des Lysins, CML (XII) und CEL (XIII), entstehen u.a. bei Reaktion von Lysin mit Glyoxal bzw. Methylglyoxal. Gerade bei Inkubation mit diesen Dicarbylen zeigte rAra h 2 die größte Steigerung der AK-Bindung. Daher sollten diese lysinhaltigen Abschnitte in Form von Peptiden synthetisiert, mit Zuckern bzw. Carbonylverbindungen umgesetzt und dann die IgE-Bindungsaffinität der nativen mit der der glycosylierten Peptide verglichen werden.

Bezüglich der zu synthetisierenden lysinhaltigen Ara h 2-Abschnitte sollte der Lysin-Rest in der Mitte der Testpeptide liegen, um nach beiden Seiten einen möglichst weiten Bereich abzudecken. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben wurden die Abschnitte aa 39-56 und aa

116-133 von Ara h 2 ausgewählt. Die als **P6** und **P7** bezeichneten Peptide (**Tab. 2-2-2**) wurden mittels automatisierter Peptidfestphasensynthese (SPPS) gemäß der Fmoc/O^tBu-Strategie synthetisiert.

Tab. 2-2-2: Synthetisierte Modellpeptide mit lysinhaltigen Ara h 2-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz	Position in rAra h 2	Ausbeute Rohprodukt	Reinheit Rohprodukt
P6	LRPCEQHLMQKIQRDEDS	39-56	90 %	69 %
P7	LQGRQQEQQFKRELRNL	116-133	92%	89 %

Nach Aufreinigung mittels HPLC wurden die Peptide **P6** und **P7** analog den Inkubationsexperimenten von rAra h 2 (cf. Kap. 2.2.2) einer MAILLARD-Reaktion mit Zuckern und ausgewählten Dicarbonylen unterworfen (90 min; 95 °C). Aliquote der gebräunten Lösungen wurden über RP-18-Festphasen-Kartuschen aufgereinigt, um störende Begleitstoffe wie Salze, Puffer, nicht umgesetzte Zucker bzw. Dicarbonyle sowie sonstige polare Nebenprodukte abzutrennen. Die (modifizierten) Peptide wurden mit EDC und Sulfo-NHS kovalent an CovaLink-Mikrotiterplatten gebunden (cf. Kap. 2.1.2). Ein ELISA zeigte, dass die Peptide **P6** und **P7** weder vor noch nach MAILLARD-Reaktion von Antikörpern erkannt wurden. Dies traf für das Kaninchenserum, das Humanserum PEI 163 und das Poolserum zu. Auf der Basis dieser Daten sollten die lysinhaltigen Abschnitte bei der Aktivierung von rAra h 2 durch nicht-enzymatische Glycosylierung keine Rolle spielen.

Untersuchung von CML- und CEL-modifizierten Ara h 2-Sequenzen

Um sicher zu stellen, dass die wichtigen MAILLARD-Modifikationen CML und CEL wirklich keinen Einfluss auf die AK-Affinität von rAra h 2 haben, sollten den Peptiden **P6** und **P7** analoge Ara h 2-Sequenzen synthetisiert werden, bei denen das Lysin gegen CML bzw. CEL ersetzt werden musste. Zu diesem Zweck wurden spezielle Synthesestrategien entwickelt, welche den selektiven Einbau von CML und CEL in Peptide mittels automatisierter SPPS gemäß der Fmoc/O^tBu-Strategie erlauben. Diese sind im Kapitel 2.3.2 detailliert dargestellt. **Tab. 2-2-3** zeigt die synthetisierten Peptide.

Tab. 2-2-3: Synthetisierte Modellpeptide mit CML- bzw. CEL-haltigen Ara h 2-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz	Position in rAra h 2	Reinheit Rohprodukt
P8	LRPCEQHLMQ-CML-IQRDEDS	39-56	65 %
P9	LRPCEQHLMQ-CEL-IQRDEDS	39-56	54 %
P10	LQGRQQEQQF-CML-RELRNL	116-133	77 %
P11	LQGRQQEQQF-CEL-RELRNL	116-133	84 %

Die mittels HPLC gereinigten AGE-Peptide **P8-P11** wurden anschließend im ELISA eingesetzt. Dazu wurden sie zusammen mit den nicht-modifizierten Peptiden **P6** und **P7** äquimolar an CovaLink-Platten gebunden und mit Kaninchenserum, Humanserum PEI 163, dem Poolserum und einem Nichtallergikerserum inkubiert. Dabei wurde auch bei sehr hoher Serumkonzentration keine Antikörperbindung an die Peptide festgestellt. **Abb. 2-2-14** zeigt die Ergebnisse beispielhaft für die Peptide **P7**, **P10** und **P11**.

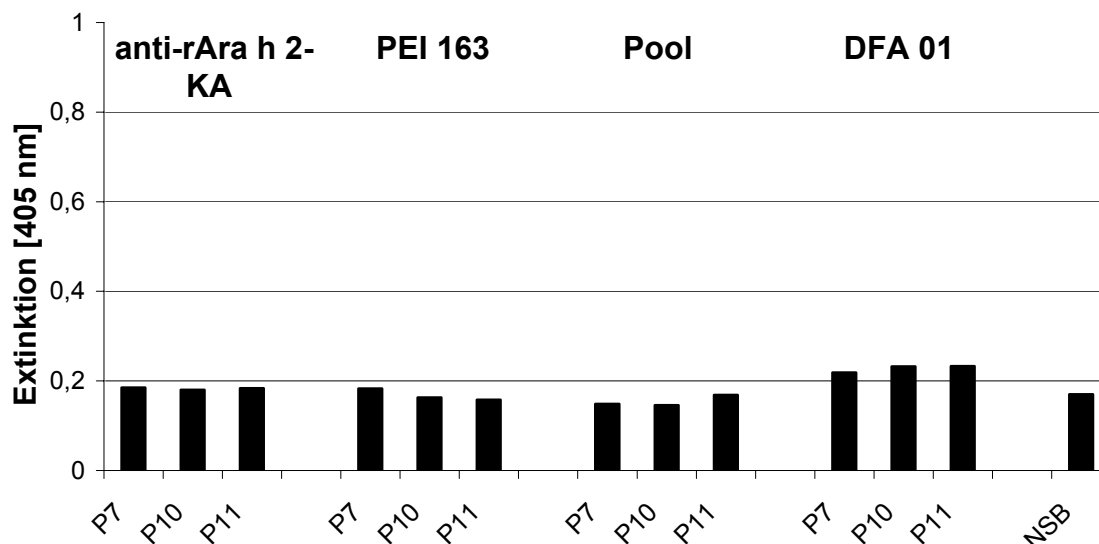


Abb. 2-2-14: CovaLink-ELISA der Peptide **P7**, **P10** und **P11** (500 pmol/well) mit Kaninchenserum (1:40.000), PEI 163 (1:100), Allergikerpoolserum (1:10) und dem Nichtallergikerserum DFA 01 (1:10).

Diskussion

Um die molekularen Ursachen für die Steigerung der IgE-Bindungsaffinität von (r)Ara h 2 durch nicht-enzymatische Glycosylierung zu klären, sollte zunächst den Einfluss einer kohlenhydrat-induzierten Modifizierung der zwei Lysin-Reste des Allergens auf dessen IgE-Bindungsverhalten untersucht werden. Hierzu wurden zwei Modellpeptide, welche die lysinhaltigen Abschnitte von Ara h 2 repräsentieren, durch SPPS dargestellt. Mittels immunologischer Tests konnte gezeigt werden, dass diese Peptide weder von humanen Erdnussallergikern bzw. dem anti-Ara h 2-Kaninchenserum erkannt werden. Dies deckt sich

mit der Epitopanalyse von Stanley *et al.* (1997). Auch nach MAILLARD-Reaktion zeigten die Modellpeptide keine Antikörperbindung. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass Glycosylierungsprodukte dieser Lysin-Reste für die Veränderung der Allergenität des Gesamtproteins nicht verantwortlich sind.

Anhand von CML- bzw. CEL-haltigen Peptiden aus der Ara h 2-Sequenz sollte überprüft werden, ob diese Modifikationen in reiner Form evtl. die IgE-Bindung modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide aus der Ara h 2-Sequenz synthetisiert, welche anstelle von Lysin einen CML- bzw. CEL-Rest tragen. Die gereinigten AGE-Peptide wurden in äquimolarer Menge einem ELISA an CovaLink-Platten unterzogen. Selbst bei hoher Serumkonzentration zeigten weder das polyklonale anti-rAra h 2-Kaninchenserum noch die humanen Allergikersera eine Antikörperbindung. Somit war gezeigt, dass die wichtigen Glycosylierungsprodukte der beiden Ara h 2-gebundenen Lysin-Reste, CML und CEL, nicht für die Allergenitätssteigerung des Proteins durch MAILLARD-Reaktion verantwortlich sind. Dies untermauert die Vermutung, wonach zucker-induzierte Veränderungen der Lysin-Reste von Ara h 2 ohne Bedeutung für die IgE-Bindung des Gesamtproteins sind.

In Anbetracht der weiten Verbreitung CML- und CEL-modifizierter Proteine *in vivo* und deren nach Literaturmeinung enormer Bedeutung bei Alterungsvorgängen und Diabetes mellitus (Brownlee *et al.*, 1988; Miyata *et al.*, 1996) stellen die aufgezeigten Methoden zur Synthese und immunologischen Evaluierung dieser AGE äußerst wertvolle Werkzeuge für zukünftige Untersuchungen in Allergologie, Geriatrie und Diabetes-Forschung dar.

2.2.3.3 Untersuchungen zum N-Terminus von Ara h 2

Neben den primären Aminogruppen der Lysin-Seitenketten ist auch der N-Terminus eines Peptides oder Proteins zur MAILLARD-Reaktion befähigt, da er eine freie, primäre Aminofunktion darstellt. Daher wäre denkbar, dass die Steigerung der IgE-Affinität von glycosyliertem Ara h 2 in Zusammenhang mit einer Modifizierung des N-Terminus steht.

Als Modell für den Protein-N-Terminus wurde das Peptid R¹⁹QQWELQGDRRCQSQL³⁴ (**P12**) synthetisiert. Der Abschnitt aa 1-18 von Ara h 2 (cf. **Abb. 1-3**) ist eine Signalsequenz, die nach der Expression des Proteins abgespalten und daher für die Untersuchungen ohne Belang ist. Nach Aufreinigung wurde das Peptid **P12** mittels ELISA immunologisch evaluiert. Dieses wies beim Kaninchenserum eine deutliche IgE-Bindung auf. Eine mögliche

Erklärung liegt darin, dass die Sequenz von **P12** schon einen Teil des von Stanley *et al.* als Hauptepitop identifizierten Epitopes 3 (D²⁷RRCQSQLER³⁶) enthält. Durch bloßes Erhitzen sank die AK-Affinität von **P12** etwas, Inkubation mit Zuckern und Dicarbonylen verstärkte diesen Effekt (**Abb. 2-2-15**). Für das Allergikerserum PEI 163 war nur eine sehr schwache AK-Bindung zu detektieren, die durch Glycosylierungsreaktionen nicht verändert wurde.

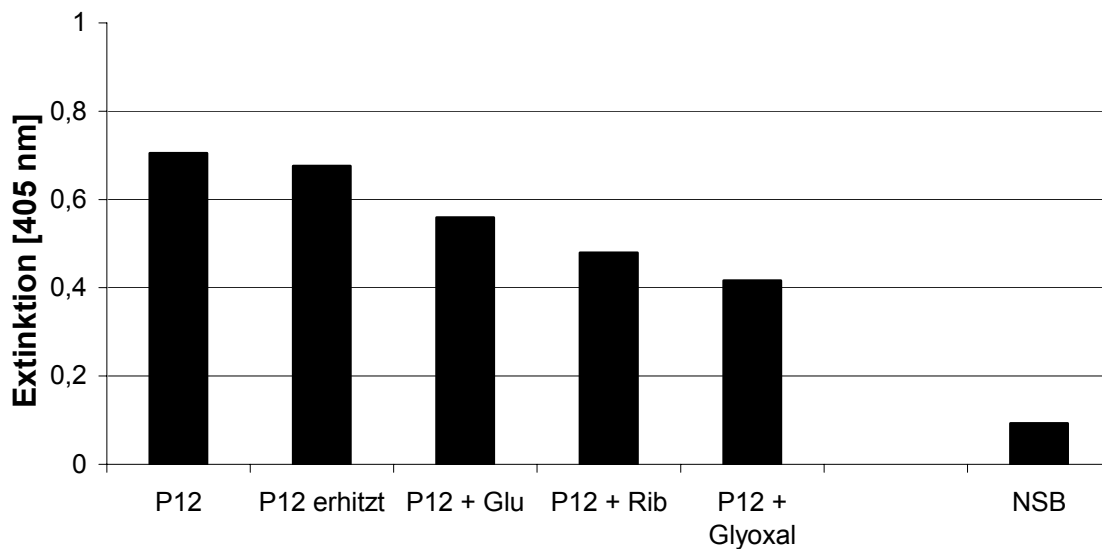


Abb. 2-2-15: CovaLink-ELISA des Peptides **P12** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (Glucose, Ribose, Glyoxal; 90 min, 95 °C; 490 pmol/well) mit dem anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:40.000).

Der N-Terminus eines Peptides bzw. Proteins ist mit seiner freien, primären Aminogruppe zu ähnlichen Reaktionen wie die ϵ -Aminogruppe des Lysins befähigt. Denkbar ist also, dass durch MAILLARD-Reaktion Derivate wie *N*-Carboxymethyl- oder *N*-Carboxyethylpeptide entstehen könnten. Daher wurden vom Peptid **P12** die N-terminal modifizierte Varianten CM-RQQWELQGDRRCQSQL (**P13**) und CE-RQQWELQGDRRCQSQL (**P14**) synthetisiert. Die Synthesewege für derartig modifizierte Peptide sind im Kapitel 2.3.3 gesondert dargestellt. Ein ELISA zeigte, dass eine Modifizierung der N-terminalen Sequenz von Ara h 2 keinen oder allenfalls einen sehr geringen Einfluss auf die Antikörperaffinität hatte (**Abb. 2-2-16**). Daher konnte die durch MAILLARD-Reaktion induzierte Abnahme der AK-Bindung an **P12** nicht durch eine Modifizierung des N-Terminus erklärt werden.

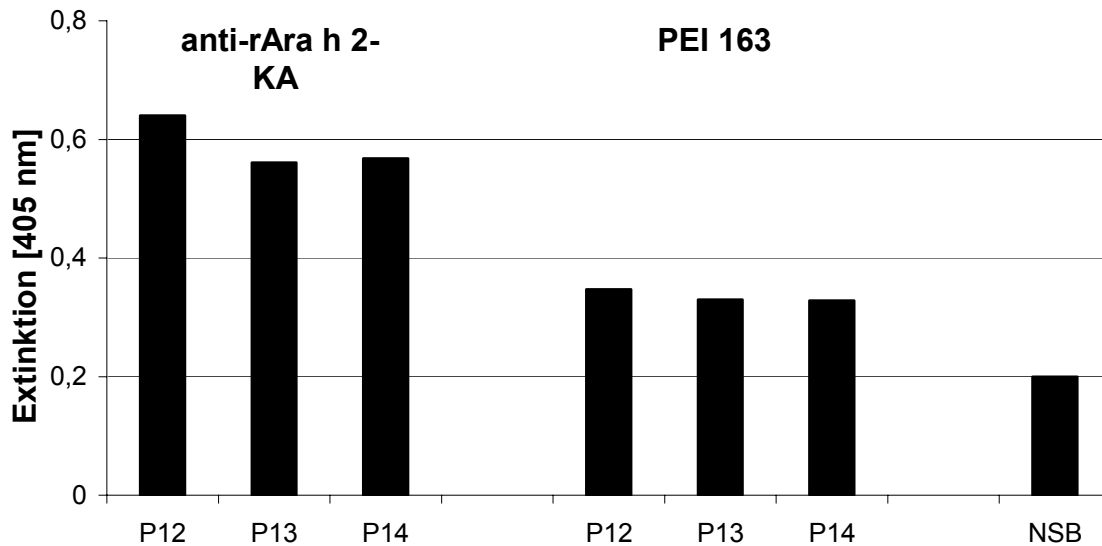


Abb. 2-2-16: Covalink-ELISA der Peptide **P12**, **P13** und **P14** (250 pmol/well) mit dem Kaninchenserum (1:40.000) und Patientenserum PEI 163 (1:100).

Diskussion

Um zu untersuchen, welche Bedeutung eine Modifizierung des N-Terminus von Ara h 2 auf dessen IgE-Bindungsaffinität besitzt, wurde ein Modellpeptid für die N-terminale Proteinsequenz synthetisiert. Das Modellpeptid wies in nativem Zustand beim anti-Ara h 2-Kaninchenserum eine starke, bei humanen Allergikersera eine schwache IgE-Bindung auf. Auf Basis der Epitopanalyse von Stanley *et al.* (1997) war zu vermuten, dass dies durch eine Überlappung der Modellsequenz mit Hauptepitop 3 verursacht wird. Unter den Bedingungen der MAILLARD-Reaktion wurde die IgE-Affinität des Modellpeptides vermindert. Eine gezielte Synthese von N-terminal carboxy(m)ethyliertem Modellpeptid zeigte, dass eine Modifizierung des N-Terminus keinen Einfluss auf die Antikörperbindung des Peptides ausübt. Somit war bewiesen, dass auch die Glycosylierung des N-Terminus nicht für die Allergenitätssteigerung von Ara h 2 durch zuckerinduzierte Bräunung verantwortlich ist. Als Ursache für die Minderung der IgE-Affinität des Modellpeptides durch MAILLARD-Reaktion waren daher Glycosylierungsprodukte der darin enthaltenen Arginin-Reste bzw. Modifikationen des Cystein-Restes wahrscheinlich. Da Epitop 3 diese Strukturelemente ebenfalls enthält, sollte dieser Ara h 2-Abschnitt als nächstes näher betrachtet werden.

2.2.3.4 Untersuchungen zum Epitop 3 von Ara h 2

Um die IgE-Bindung des Hauptepitops 3 sowie einer möglichen kohlenhydrat-induzierte Aktivitätsänderung zu studieren, wurde dieses Epitop in Form des Pentadecapeptides L²⁴QGDRRCQSQLERAN³⁸ (**P3**) synthetisiert. Nach Aufreinigung des Peptides mittels HPLC wurde ein ELISA an CovaLink-Platten durchgeführt. Sowohl für das Kaninchenserum als auch für das Allergikerserum PEI 163 wurde für das Peptid eine deutliche IgE-Affinität nachgewiesen (cf. Abb. 2-2-13). Parallel hierzu wurden Erhitzungsversuche in An- und Abwesenheit von reduzierenden Kohlenhydraten und Dicarbonylen durchgeführt und die Reaktionsprodukte einem ELISA unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass die AK-Bindungskapazität von **P3** durch alleiniges Erhitzen um mehr als ein Drittel gesenkt wurde. Dies traf sowohl beim Kaninchenserum wie auch beim Patientenserum PEI 163 auf. Bei Inkubation in Gegenwart von Disacchariden, Hexosen und Pentosen blieb das ELISA-Signal auf etwa diesem Niveau, während die Reaktion mit Dicarbonylen zu einer weiteren Verringerung der AK-Bindung führte (**Abb. 2-2-17**).

In **Abb. 2-2-18** ist der zeitabhängige Verlauf dieser Inaktivierung dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass bei Inkubation in Anwesenheit von Ribose oder Methylglyoxal die Zerstörung der IgE-Affinität von Epitop 3 schneller verläuft als ohne Zusatz. So sankt die IgE-Bindung an das Epitop bei Erhitzen mit Methylglyoxal bereits nach 15 Minuten auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes, während ohne Dicarbonylzusatz noch ca. 80 % der ursprünglichen AK-Bindung detektiert wurde. Ribose zeigte eine weit weniger starke Inhibitionswirkung auf das Epitop als Methylglyoxal. Nach 120 Minuten konnte im zuckerfreien System noch eine Restaktivität von ca. 70 % detektiert werden, bei Inkubation mit Ribose bzw. Methylglyoxal waren es nur noch 55 % bzw. 40 % des Ausgangswertes.

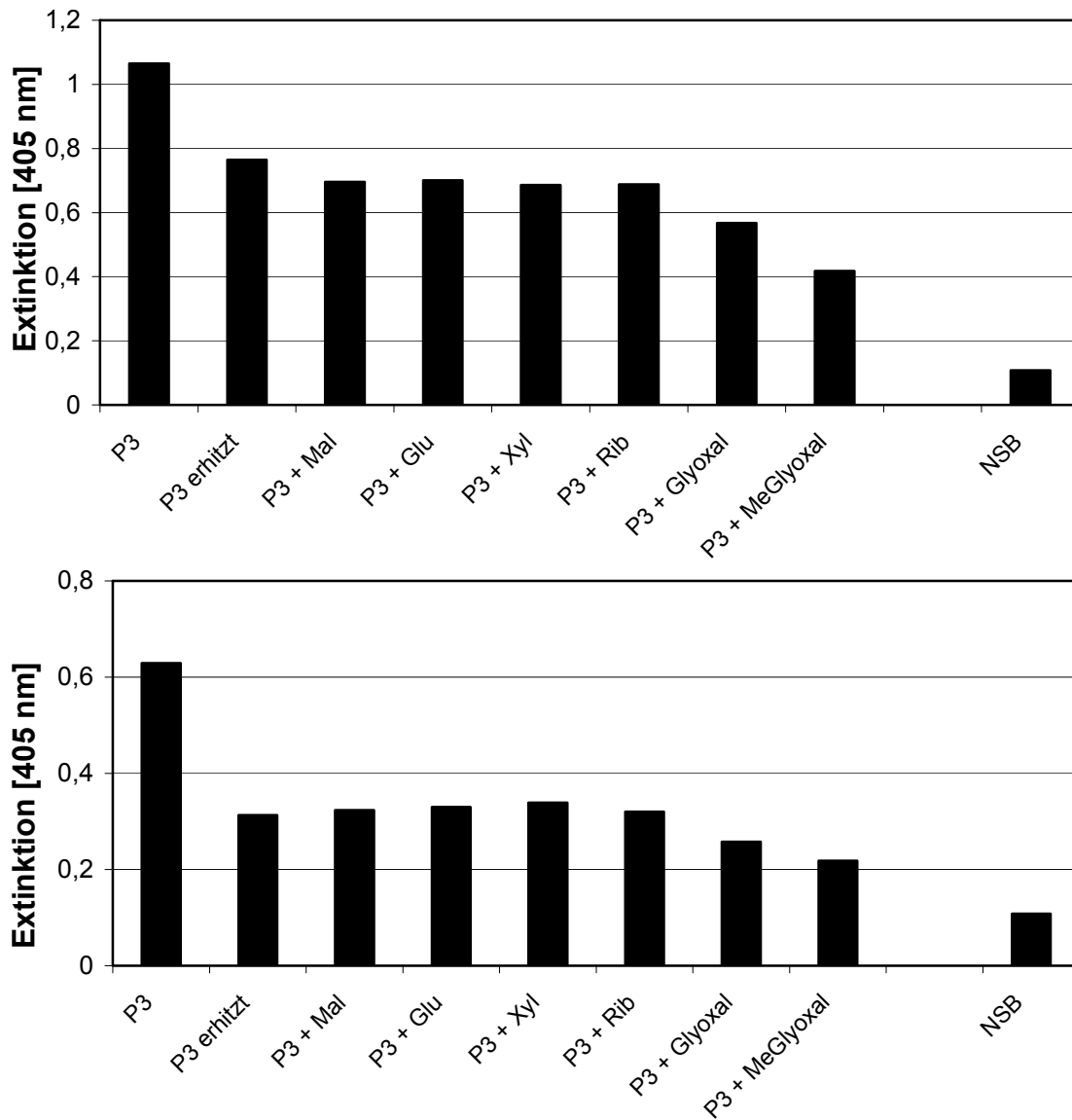


Abb. 2-2-17: CovaLink-ELISA des Peptides **P3** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 280 pmol/well).
oben: polyklonales anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:100.000)
unten: Patientenserum PEI 163 (1:50)

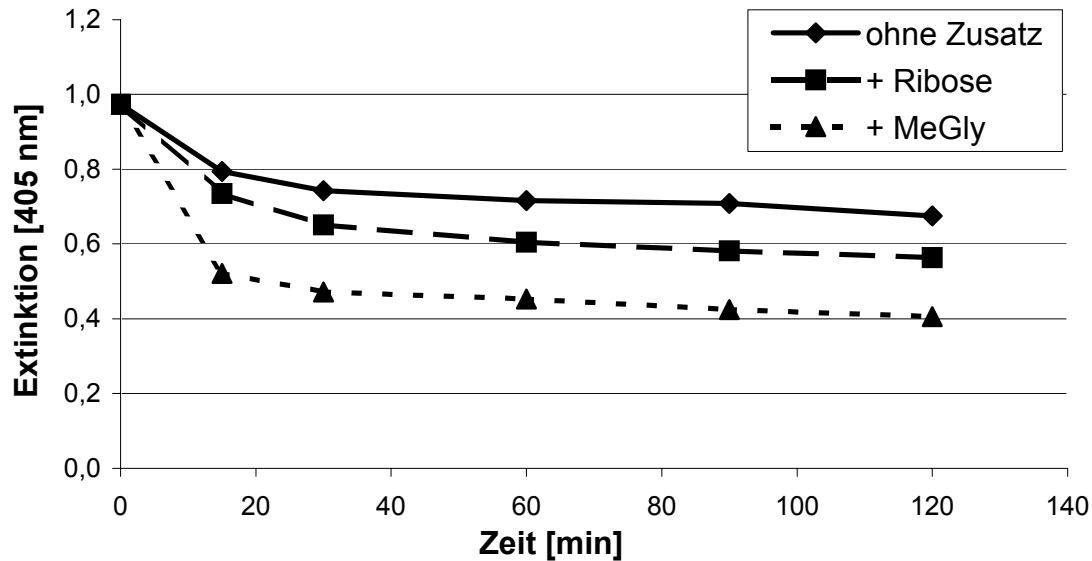


Abb. 2-2-18: CovaLink-ELISA der zeitabhängigen Inkubationen von P3 ohne Zuckerzusatz (♦) und in Anwesenheit von Ribose (■) und Methylglyoxal (▲); 280 pmol/well; anti-rAra h 2-Kaninchenserum 1:100.000.

IgE-Bindungsaktivität der Cystein-Modifikationen vom Ara h 2-Epitop 3

Es stellte sich die Frage, warum schon das bloße Erhitzen zu einer Abnahme der AK-Bindung führte. Da Epitop 3 die Aminosäure Cystein enthält und von Cystein-Peptiden bekannt ist, dass diese beim Erhitzen in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Cystin- bzw. Cysteinsäurepeptiden oxidieren werden können, wurden im Folgenden die Modifikationen des Cysteins in Epitop 3 näher beleuchtet. Ferner ist bekannt, dass durch Elimination von Schwefelwasserstoff aus Cystein die Aminosäure Dehydrolalanin (Dha) gebildet werden kann, welche als α -ungesättigtes Carbonyl zur Additionsreaktionen mit Nucleophilen wie Thiolen und Aminen befähigt ist (Abb. 2-2-19). Solche Addukte stellen die modifizierten Aminosäuren Lanthionin (Lan; Horn *et al.*, 1941), Lysinalanin (Lal; Bohak, 1964) und τ - bzw. π -Histidinoalanin (Hal; Henle *et al.*, 1993) dar, die in verschiedenen erhitzten Proteinen bereits nachgewiesen wurden (Friedman, 1999).

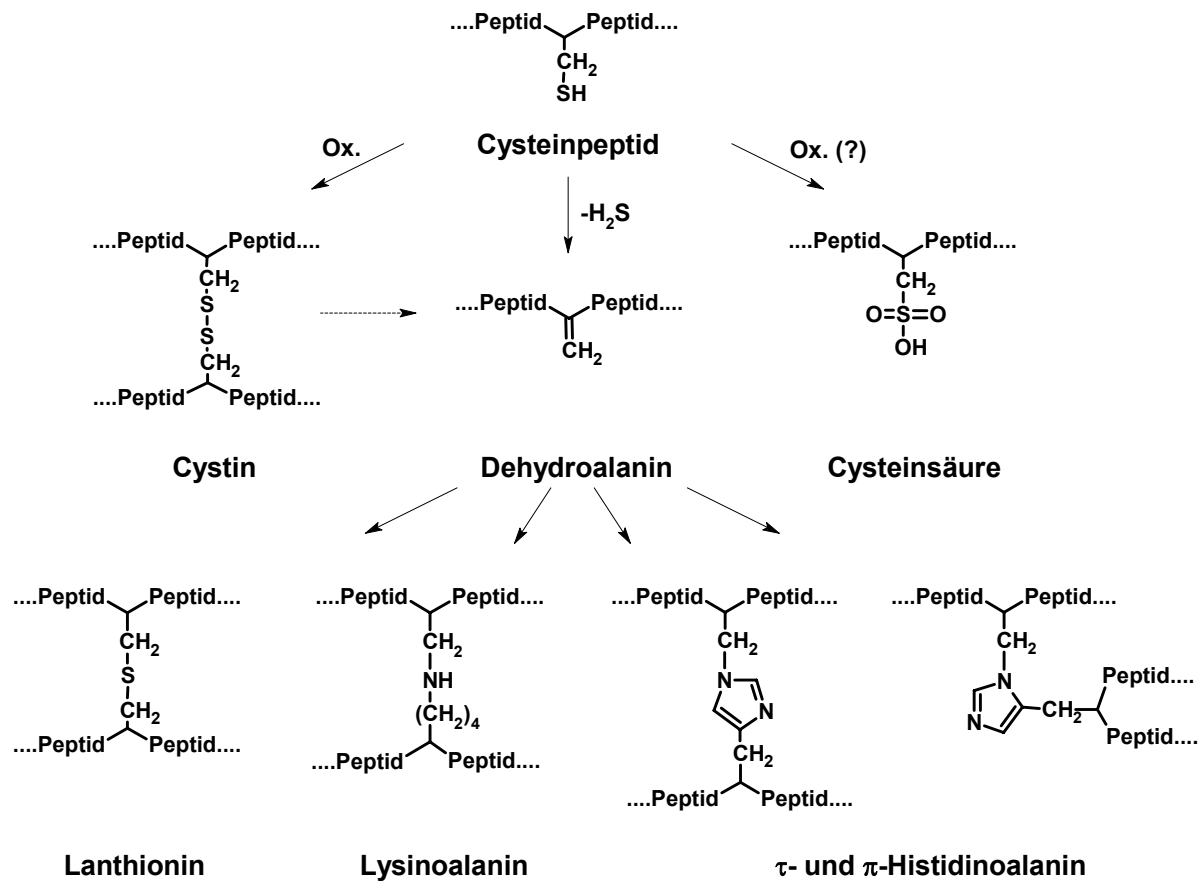


Abb. 2-2-19: Abbauege von Cystein-Seitenketten in Proteinen beim Erhitzen. Oxidation kann zu disulfidverbrückten Peptiden oder Cysteinsäure führen. Durch Elimination von H_2S entstehen Dehydroalanin-Peptide, welche durch Addition von nukleophilen Gruppen verschiedene Crosslinks ausbilden.

Um zu untersuchen, ob solche Reaktionen zur Verringerung der IgE-Bindung an Epitop 3 beitragen, wurden vom Peptid **P3** einige Varianten synthetisiert, bei denen Cystein gegen Cystin, Cysteinsäure, Dehydroalanin bzw. Lanthionin ausgetauscht wurde. Ein ELISA dieser Varianten sollte darüber Aufschluss bringen, welchen Einfluss derartige hitzeinduzierte Veränderungen auf die IgE-Bindungsaffinität von Epitop 3 besitzen. Das über eine Disulfidbindung verbrückte Dimere **P15** wurde durch Oxidation von **P3** mit Luftsauerstoff erhalten, ein Cystin-Analogon **P16** durch Luftoxidation in Gegenwart von freiem Cystein. Das Cysteinsäure-Peptid **P17** wurde aus **P3** durch Behandlung mit Perameisensäure dargestellt (**Tab. 2-2-4**). Die zugehörigen LC-MS(ESI)-Spektren finden sich in **Abb. 6-3** im Anhang. Darüber hinaus wurden Analoga von **P3** synthetisiert, welche anstelle des Cystein-Restes einen Dehydroalanin-Rest bzw ein Lanthionin-Strukturelement enthielten. Die hierzu entwickelten Synthesen sind in Kapitel 2.3.4 gesondert beschrieben.

Tab. 2-2-4: Die Sequenzen, Synthesemethoden und Ausbeuten von **P3** und einiger davon abgeleiteten Varianten.

Bez.	Struktur	Synthese	Ausbeute nach HPLC
P3	LQGDRR-Cys-QSQLERAN	SPPS	> 70 %
P15	LQGDRR-Cys-QSQLERAN		54 %
	LQGDRR-Cys-QSQLERAN	P3 + O ₂	
P16	LQGDRR-Cystin-QSQLERAN	P3 + Cystein + O ₂	44 %
P17	LQGDRR-Cys (O ₃ H) -QSQLERAN	P3 + HCO(O ₂)H	18 %
P18	LQGDRR-Dha-QSQLERAN	s. Kap. 2.3.4	6 %
P19	LQGDRR-Lan (Ac) (OMe) -QSQLERAN	s. Kap. 2.3.4	15 %

Die Peptide **P3** sowie **P15-P19** wurden nach Aufreinigung äquimolar an CovaLink-Platten gebunden und mit Kaninchen- bzw. Allergikerserum PEI 163 inkubiert. **Abb. 2-2-20** zeigt das Ergebnis des ELISA. Im Gegensatz zum nichtmodifizierten Peptid **P3** wurden die am Cystein veränderten Varianten weder vom Kaninchen- noch vom Allergikerserum erkannt. Jegliche Modifikation des Cysteins führte somit zum Verlust der IgE-Bindung.

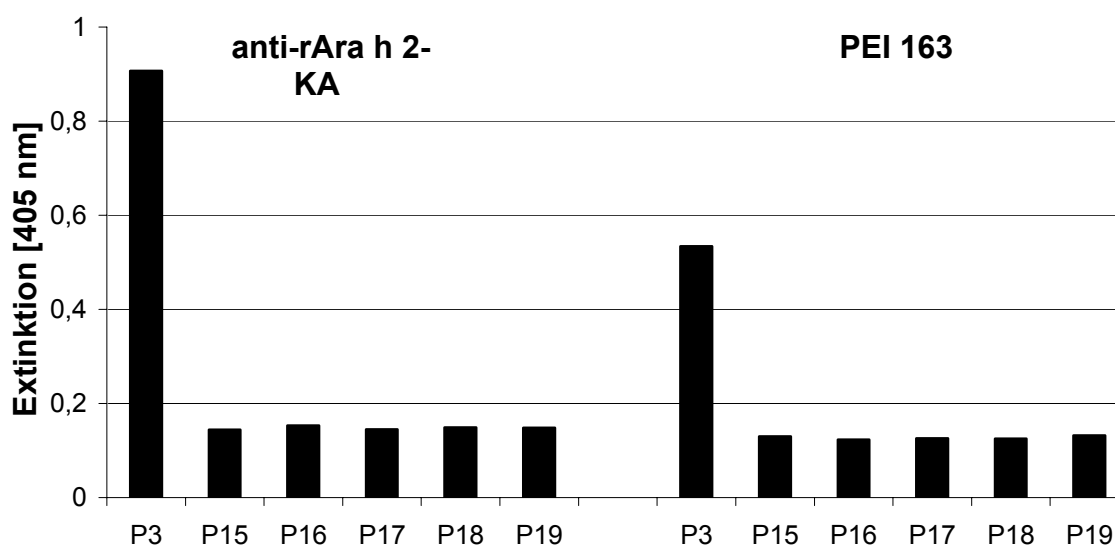


Abb. 2-2-20: CovaLink-ELISA der Peptide **P3** sowie **P15-P19** (280 pmol/well) bei Inkubation mit dem polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum (links, 1:100.000) und Patientenserum PEI 163 (rechts, 1:50).

Diskussion

Das Hauptepitop 3 von Ara h 2 wurde in Form des Pentadecapeptides synthetisiert. Dieses Peptid wurde erwartungsgemäß sowohl vom polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum als auch von einem Allergikerserum durch IgE-Bindung erkannt. Untersuchungen zur Veränderung der IgE-Affinität durch Erhitzen in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Kohlehydraten zeigten, dass die AK-Bindung an dieses Modellpeptid schon durch bloßes

Erhitzen sank. Die Umsetzung mit hochreaktiven Zuckerabbauprodukten führte zu einer weiteren Verringerung der AK-Bindung.

Die Minderung der IgE-Bindung durch bloßes Erhitzen kann durch Modifizierungen des reaktiven Cystein-Restes von Epitop 3 erklärt werden. Cystein-Reste können beim Erhitzen von Proteinen zu verschiedenen Oxidations- und Eliminationsprodukten sowie Crosslinks umgesetzt werden. Von Epitop 3 wurden mehrerer Varianten mit derartigen Modifizierungen synthetisiert. Es wurden Analoga von Epitop 3 dargestellt, welche anstelle des Cystein-Restes einen Cystin- bzw. Cysteinsulfonsäure-Rest tragen. Ferner wurde das durch eine Disulfidbindung verbrückte Dimere des Epitops synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine einfache Methode zur Festphasensynthese von Dha-Peptiden und davon abgeleiteten Strukturen mit einem Lanthionin bzw. Lysinoalanin-Rest entwickelt werden. Diese erlaubte die Synthese von Epitop 3-Varianten mit einem Dha- bzw. Lanthionin-Rest anstelle von Cystein. Die immunologische Evaluierung dieser Epitop 3-Varianten zeigte, dass nur das unveränderte Epitop 3 von IgE-Antikörpern erkannt wurde, nicht jedoch Peptidanaloga, bei denen Cystein gegen Cystin, Cysteinsäure, Dehydroalanin oder Lanthionin ausgetauscht wurde. Dies könnte erklären, warum die IgE-Bindung an Epitop 3 während einer Erhitzung abnimmt. Vermutlich wird durch die thermische Belastung der Cystein-Rest verändert, wobei die entstehenden Reaktionsprodukte nicht mehr mit den Antikörpern reagieren. Ein unveränderter Cystein-Rest in Epitop 3 scheint somit für die Erkennung durch Antikörper essentiell zu sein. Dies ist umso erstaunlicher, als dass Stanley *et al.* (1997) in nativem Ara h 2 an dieser Stelle einen Arginin-Rest identifizierten, während im Genom, auf das sich alle bisherigen Epitopuntersuchungen in der Literatur beziehen, ein Cystein-Rest codiert ist. Ferner gelangten Stanley *et al.* (1997) durch einen Alaninscan des cysteinhaltigen Epitops 3 zur Ansicht, dass ein Austausch von Cystein gegen Alanin die IgE-Bindung an das Epitop nicht beeinflusse. Dies steht im Widerspruch zu den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten.

Die Erhitzungsversuche zeigten, dass durch Zusatz von Dicarbonylen Epitop 3 schneller inaktiviert wird. Zwar kann eine Reaktion des Cystein-Restes mit diesen Zuckerabbauprodukten nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheint es plausibler, dass die Dicarbonyle mit dem in Epitop 3 vorkommenden Arginin-Resten reagieren und so das Epitop weiter schädigen.

2.2.3.5 Untersuchungen zum Epitop 6 von Ara h 2

Zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens von Hauptepitop 6 wurde dieses in Form des Peptides R⁵²DEDSYERDPYSPSQ⁶⁶ (**P4**) synthetisiert. Hinsichtlich einer möglichen MAILLARD-Modifizierung sind bei diesem Peptid die zwei Arginin-Reste Arg⁵² und Arg⁵⁹ von besonderer Bedeutung. Nach Reinigung des Peptides mittels HPLC wurde es in Analogie zu den Erhitzungsversuchen von Epitop 3 in Abwesenheit bzw. Gegenwart von verschiedenen Zuckern und Glyoxal für 90 Minuten auf 95 °C erhitzt. Aliquote der Lösungen wurden über RP-Kartuschen aufgereinigt und die (modifizierten) Peptide an CovaLink-Platten gebunden. **Abb. 2-2-21** zeigt das Ergebnis eines ELISA der Modellmischungen nach Inkubation mit dem Patientenserum PEI 163 bzw. dem anti-rAra h 2-Kaninchenserum. Dabei wurde so wenig Peptid an die Mikrotiterplatten gebunden, dass beim unbehandelten Peptid gerade noch eine schwache Antikörperbindung detektiert werden konnte.

Sowohl das Serum PEI 163 als auch das Kaninchenserum zeigten bei den glycosylierten Peptiden eine starke Zunahme der AK-Bindung im Vergleich zum nativen bzw. ohne Zuckerzusatz erhitzten Peptid. Dabei ging die Steigerung mit der Reaktivität der Zucker einher. In Übereinstimmung mit den am rAra h 2 gemessenen Ergebnissen (cf. 2.2.2) erwiesen sich Fructose und Ribose als diejenigen Kohlenhydrate, die die stärkste Steigerung der IgE-Affinität des Epitops induzierten, während der Effekt bei Maltose und Glucose etwas schwächer ausfiel. Eine Inkubation mit dem hochreaktiven Intermediat Glyoxal führte zu einem noch stärkeren Anstieg der Antikörperbindung. Die Tendenz stimmte somit gut mit den für das Gesamtprotein beobachteten Effekten überein (vgl. **Abb. 2-2-7**). Auch hier zeigte Glyoxal die größte Wirkung und verursachte eine drastische Zunahme des Antikörperbindungspotentials. Dies verstärkte den Verdacht, dass eine MAILLARD-Modifizierung eines Arginin-Restes im Peptid **P4** für diesen Effekt verantwortlich sein könnte.

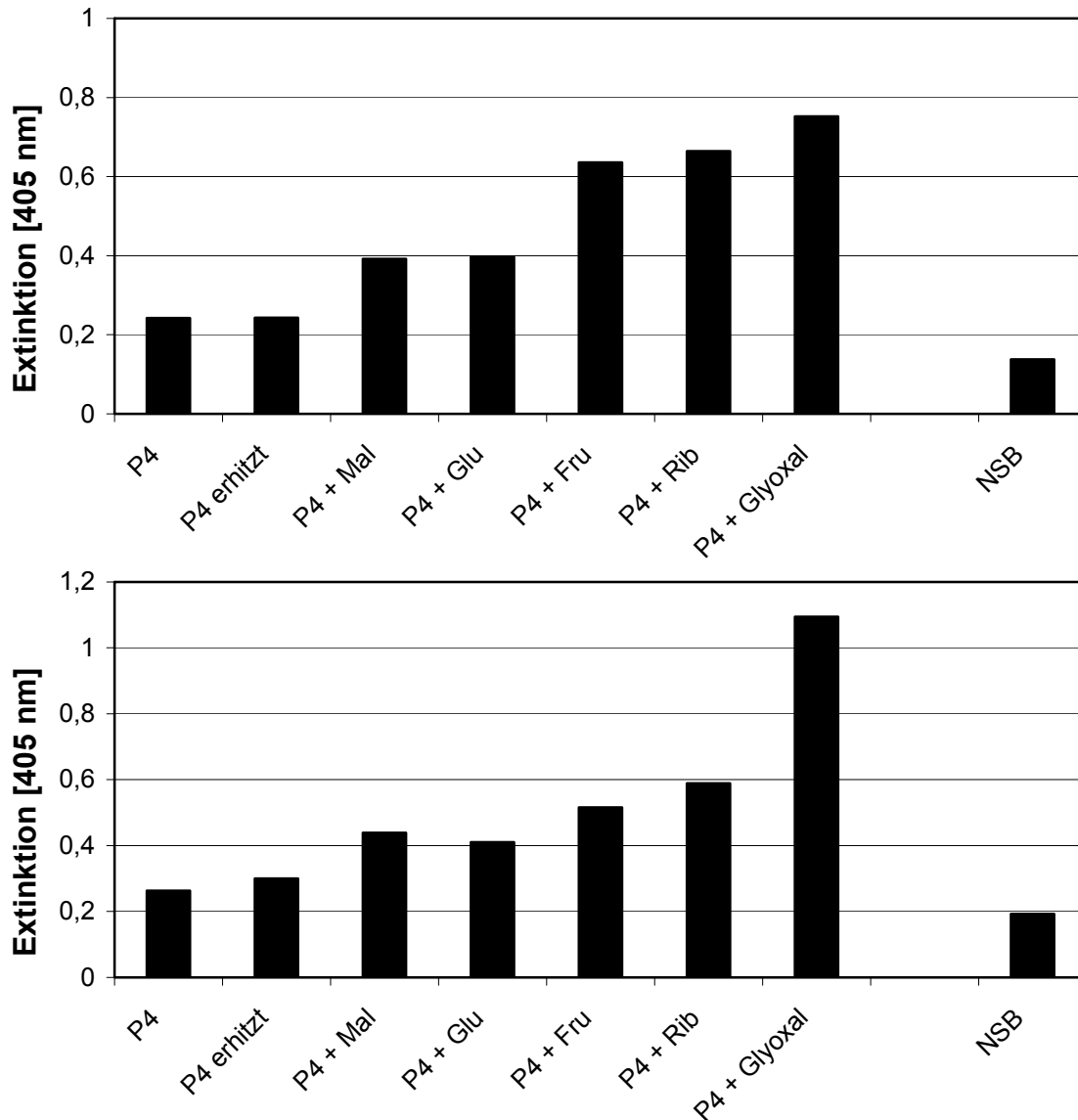


Abb. 2-2-21: CovaLink-ELISA des Peptides **P4** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 270 μ mol/well),
oben: Patientenserum PEI 163 (1:100)
unten: polyklonales anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:40.000)

Mit dem Ziel, solche zuckerinduzierten Modifikationen am Epitop aufzuspüren, die eine starke Zunahme der Antikörperbindung induzieren, wurde das Glyoxal-modifizierte Peptid **P4** mittels HPLC aufgetrennt, das Eluat in einzelne Fraktionen getrennt und diese einzeln zum ELISA eingesetzt. Aus dem in **Abb. 2-2-22** gezeigten Chromatogramm wird die Komplexität des entstandenen Produktspektrums ersichtlich. Einzelne Fraktionen der HPLC-Trennung zeigten zwar im ELISA eine im Vergleich zu unmodifiziertem **P4** erhöhte Ig-Bindung. Es gelang jedoch nicht, die dafür verantwortlichen Peptidderivate zu reinigen und in ihrer Struktur zu klären.

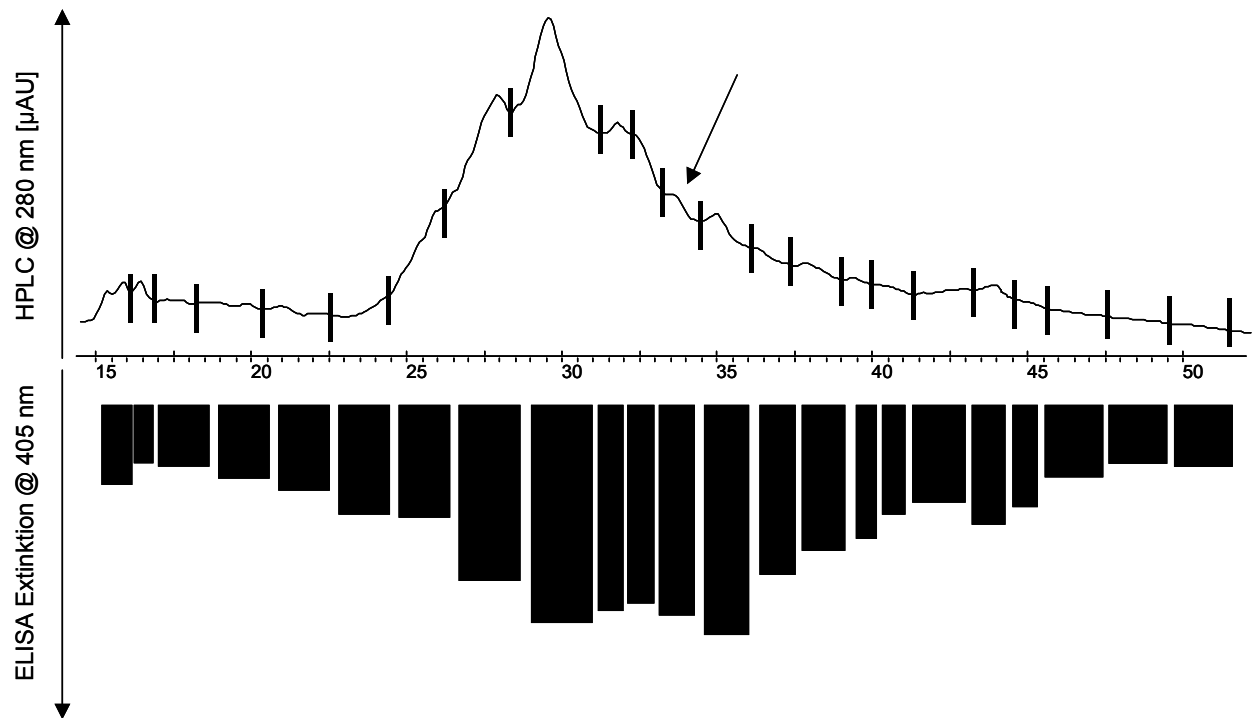


Abb. 2-2-22: HPLC-Trennung eines Bräunungsansatzes von **P4** und Glyoxal (obere Spur). Isolierte Fraktionen wurden einem CovaLink-ELISA zugeführt (untere Spur). Der Pfeil markiert die Elutionstelle von nicht-modifiziertem **P4**.

IgE-Bindungsaktivität gezielt eingeführter Arginin-Modifikationen von Epitop 6

Da die oben gezeigte analytische Vorgehensweise nicht zielführend war, sollte im Folgenden versucht werden, verschiedene, literaturbekannte Kohlenhydratmodifikationen des Arginins in das Epitop einzubauen und deren AK-Bindungspotential zu messen. In der Literatur wurden bislang keine Synthesewege für Peptide mit AGE-Derivaten des Arginins beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Methoden entwickelt, die die Darstellung von Peptiden mit den AGE-Aminosäuren Glarg (**XV**, **Abb. 1-8**), Carboxymethylarginin (CMA, **XVI**, **Abb. 1-8**), den drei isomeren Methylimidazolinonen MG-H1 (**XVIII**, **Abb. 1-9**), MG-H2 (**XIX**, **Abb. 1-9**) und MG-H3 (**XX**, **Abb. 1-9**) sowie Carboxyethylarginin (CEA, **XXI**, **Abb. 1-9**) erlaubten. Die Synthesewege sowie die Darstellung von Varianten des Epitop 6 mit diesen Modifikationen sind im Kapitel 2.3.5 detailliert dargestellt. **Tab. 2-2-5** zeigt die synthetisierten Peptide. Insgesamt standen acht AGE-Varianten des Modellpeptides RDEDSYERDPYSPSQ zur Verfügung. Bei sechs dieser Varianten war der Arginin-Rest an Position 1 gegen eine AGE-Modifikation ausgetauscht, bei zwei weiteren der Arginin-Rest an Position 8. In der Tabelle sind ebenfalls die Art der Synthese und die Reinheit des synthetisierten Peptides im Rohprodukt zusammengefasst.

Tab. 2-2-5: AGE-Derivate des Peptides **P4** mit der allgemeinen Struktur X₁-DEDSYE-X₂-DPYSPSQ

Peptid	X ₁	X ₂	Synthese	Reinheit Rohpeptid
P4	Arg	Arg	Standard-SPPS	78 %
P20	Glarg	Arg	s. Kap. 2.3.5	84 %
P21	CMA	Arg	s. Kap. 2.3.5	85 %
P22	Arg	Glarg	s. Kap. 2.3.5	16 %
P23	Arg	CMA	s. Kap. 2.3.5	26 %
P24	MG-H1	Arg	s. Kap. 2.3.5	17 %
P25	MG-H2	Arg	s. Kap. 2.3.5	18 %
P26	MG-H3	Arg	s. Kap. 2.3.5	6 %
P27	CEA	Arg	s. Kap. 2.3.5	80 %

Ein ELISA von äquimolaren Mengen der Peptide zeigte, dass keine dieser Verbindungen eine höhere IgE-Affinität besitzt als das nicht-modifizierte Peptid **P4**. In **Abb. 2-2-23** sind die ELISA-Ergebnisse zusammenfassend dargestellt und lassen erkennen, dass dies sowohl beim Kaninchenserum als auch bei den Patientensera der Fall war.

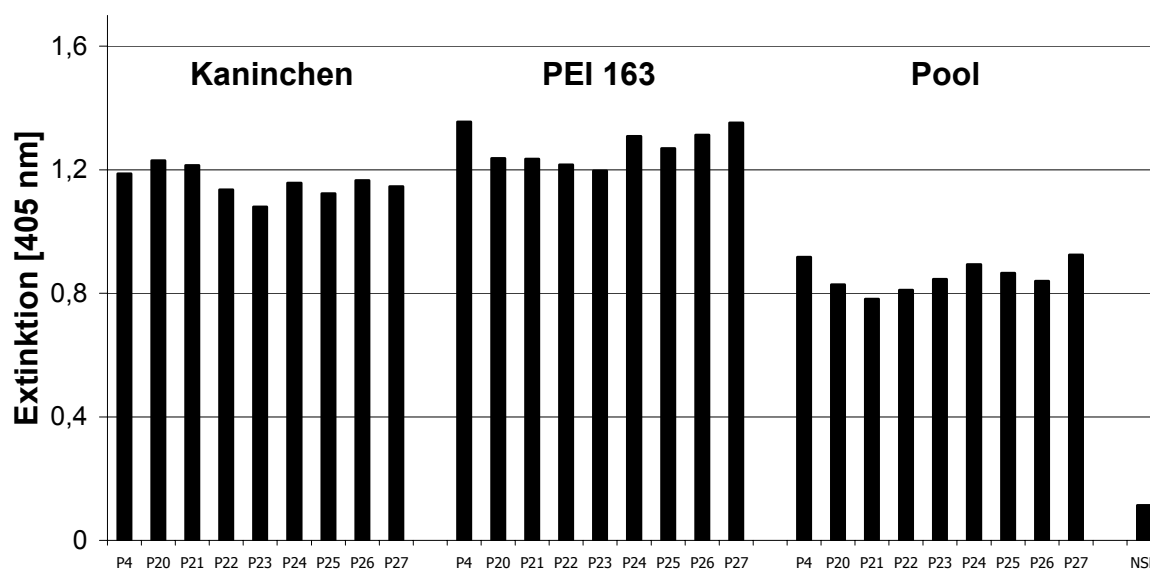


Abb. 2-2-23: CovaLink-ELISA der Peptide **P4** und **P20-P27** (je 270 pmol/well) bei Inkubation mit dem polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:40.000; links), dem Patientenserum PEI 163 (1:100; Mitte) und dem Patientenpoolserum (1:10; links).

Die Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass eine Substitution der Arginin-Reste im Modellpeptid durch die AGE-Modifikationen keinen Einfluss auf die IgE-Bindungsaktivität von Epitop 6 hat. Für die Antikörperbindung scheinen die Positionen 1 und 8 im Peptid ohne Bedeutung zu sein.

Um diese These abschließend zu beweisen, wurde das Peptid ADEDSYEADPYSPSQ (**P28**) synthetisiert. Bei diesem Peptid sind im Vergleich zu **P4** die beiden Arginin-Reste gegen Alanin ausgetauscht. Ein ELISA der beiden Peptide zeigte, dass das Peptid **P28** in etwa das gleiche Antikörperbindungspotential besitzt wie RDEDSYERDPYSPSQ (**P4**). Das Antikörperpotential dieses zweifach Alanin-substituierten Peptides konnte wie bei Epitop 6 durch nicht-enzymatische Glycosylierung gesteigert werden, wie das Ergebnis des in **Abb. 2-24** dargestellten ELISA-Tests zeigte.

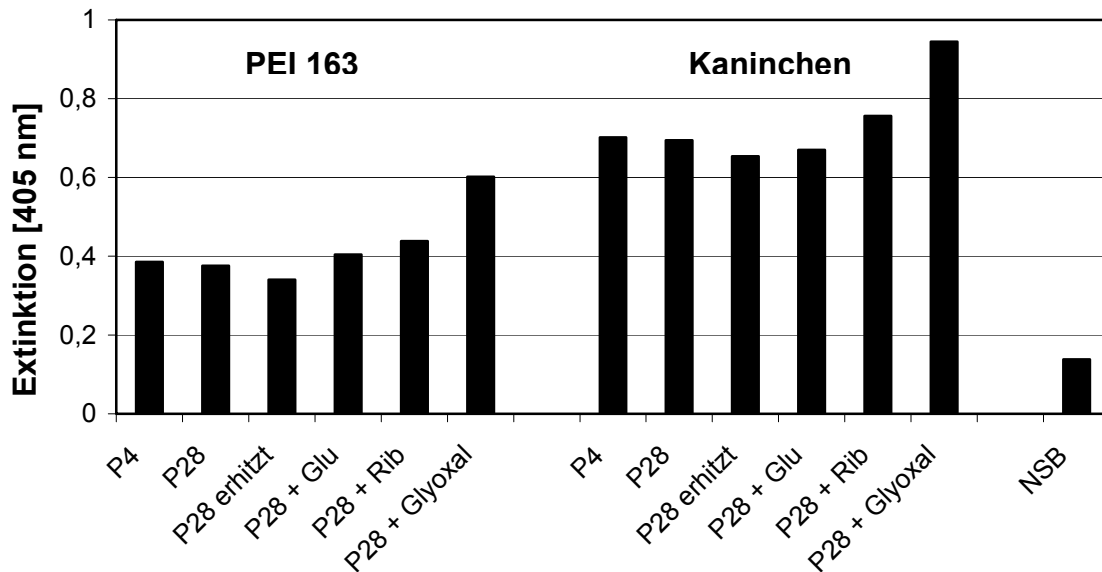


Abb. 2-2-24: CovaLink-ELISA der Peptide **P4** und **P28** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 270 µmol/well) mit dem Patientenserum PEI 163 (1:100; links) und polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:40.000; rechts).

Diese Daten beweisen somit, dass die Aminosäure Arginin nicht für die Modulation der IgE-Bindungsaktivität essentiell ist und legt nahe, dass andere Aminosäuren dieses Peptides dafür verantwortlich sein müssen.

Diskussion

Das Hauptepitop 6 von Ara h 2 wurde in Form des Pentadecapeptides RDEDSYERDPYSPSQ (**P4**) synthetisiert, welches sowohl vom polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum als auch vom Erdnussallergikerserum PEI 163 durch IgE-Bindung erkannt wurde. Bei beiden Sera kam es durch Erhitzen in Gegenwart von reduzierenden Zuckern zu einer starken Steigerung der IgE-Bindung. Eine Inkubation mit dem sehr reaktiven Zuckerabbauprodukt Glyoxal führte zu einem noch ausgeprägteren Anstieg der Antikörperbindung. Die gemessenen Effekte stimmten tendenziell mit dem Verhalten von rAra h 2 unter MAILLARD-Bedingungen überein und deckten sich mit den Ergebnissen

bezüglich des nativen Ara h 2 (Maleki *et al.*, 2000). Aus einem Bräunungsansatz des Modellpeptides mit Glyoxal konnten keine aktiven Strukturen isoliert und charakterisiert werden. Einzelne Fraktionen aus einer HPLC-Trennung einer Peptid-Glyoxal-Modellinkubation zeigten zwar im ELISA eine im Vergleich zu unmodifiziertem **P4** erhöhte IgE-Bindung. Jedoch konnten keine aktiven Strukturen isoliert und charakterisiert werden.

Zunächst wurde die Reaktion der zwei Arginin-Reste des Modellpeptides mit Dicarbonylen aus der MAILLARD-Reaktion als Ursache für die Steigerung der IgE-Affinität angenommen. Daher wurden diese Arginin-Reste im Peptid durch wichtige AGE-Derivate des Arginins substituiert. Hierzu wurden Festphasensynthesen entwickelt, die die Darstellung von Peptiden mit den AGE-Aminosäuren Glarg, CMA, MG-H1, MG-H2, MG-H3 und CEA erlauben. Insgesamt wurden acht AGE-Varianten des Modellpeptides RDEDSYERDPYSPSQ synthetisiert und immunologisch evaluiert. Die ELISA-Studien zeigten, dass die AGE-Varianten und das nicht modifizierte Stammpeptid eine ähnliche IgE-Bindungskapazität besaßen. Aus diesen Ergebnissen wird der Schluss gezogen, dass Modifikationen der Arginin-Reste im Peptid **P4** bzw. Epitop 6 nicht für die Steigerung der Antikörperbindung von Ara h 2 durch eine MAILLARD-Reaktion verantwortlich sind. Dies steht in Übereinstimmung mit IgE-Bindungsstudien des Peptides ADEDSYEADPYSPSQ (**P28**), bei dem die zwei Arginin-Reste durch Alanin ersetzt sind. Dieses Peptid zeigte eine ähnliche IgE-Affinität wie **P4**. Daraus kann gefolgert werden, dass es für die Wechselwirkung zwischen den Modellpeptiden von Epitop 6 und den Antikörpern ohne Belang ist, welche Aminosäuren sich an den Positionen 1 bzw. 8 in diesen Modellpeptiden (entsprechend den Positionen 52 und 59 im Protein) befinden. Dies deckt sich zumindest für den Arginin-Rest an Position 59 mit den Ergebnissen eines Alaninscans der Ara h 2-Epitope durch Stanley *et al.* (1997). Die Substitution von Arg⁵⁹ gegen Alanin im Decapeptid E⁵⁸RDPYSPSQ⁶⁶ führte bei diesen Untersuchungen nur zu einer minimalen Änderung der IgE-Affinität des Peptides im Vergleich zur Wildtypsequenz. Ein Austausch von Arg⁵² gegen Alanin im Decapeptid K⁴⁹IQRDEDSYE⁵⁸ führte hingegen zum völligen Verlust der IgE-Bindung. Die Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich der Bedeutung von Arg⁵² für die IgE-Affinität kann zum einen dadurch erklärt werden, dass Stanley *et al.* (1997) zwei getrennte Decapeptide (K⁴⁹IQRDEDSYE⁵⁸ und E⁵⁸RDPYSPSQ⁶⁶) untersuchten, während sich die vorliegende Arbeit auf ein Pentadecapeptid bezog (R⁵²DEDSYERDPYSPSQ⁶⁶), bei dem sich die Aminosäure Arg⁵² zudem noch am Ende befand. Zum anderen zeigten Voruntersuchungen, dass die zur Verfügung stehenden

Testmethoden mit kurzen Peptiden teilweise falsch-negative Ergebnisse liefern (cf. 2.2.3.1), während längere Sequenzen wie Pentadecapeptide verlässlichere Studien gestatten.

Auch bei Peptid **P28** konnte eine Zunahme der Antikörperaffinität durch nicht-enzymatische Glycosylierung beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen, dass die Arginin-Reste in Epitop 6 nicht in kausalem Zusammenhang mit der Steigerung der Antikörperbindung von Epitop 6 bzw. Ara h 2 durch MAILLARD-Reaktion stehen.

2.2.3.6 Untersuchungen zum Epitop 7 von Ara h 2

Analog zum Hauptepitop 6 wurden Untersuchungen zum Epitop 7 durchgeführt. Dieses Epitop überlappt teilweise mit Epitop 6. Die Ergebnisse zu diesem Ara h 2-Abschnitt werden im Folgenden dargestellt. Als Modell diente das Peptid P⁶¹YSPSQDPYSPSPYD⁷⁵ (**P5**). Mit Ausnahme des N-Terminus enthält es keine zur MAILLARD-Reaktion befähigte funktionelle Gruppe. Die ELISA-Studien, deren Ergebnisse in **Abb. 2-2-25** anschaulich dargestellt sind, zeigten eine deutliche Zunahme der IgE-Affinität des Modellpeptids **P5** bei Inkubation mit Zuckern und Dicarbonylen.

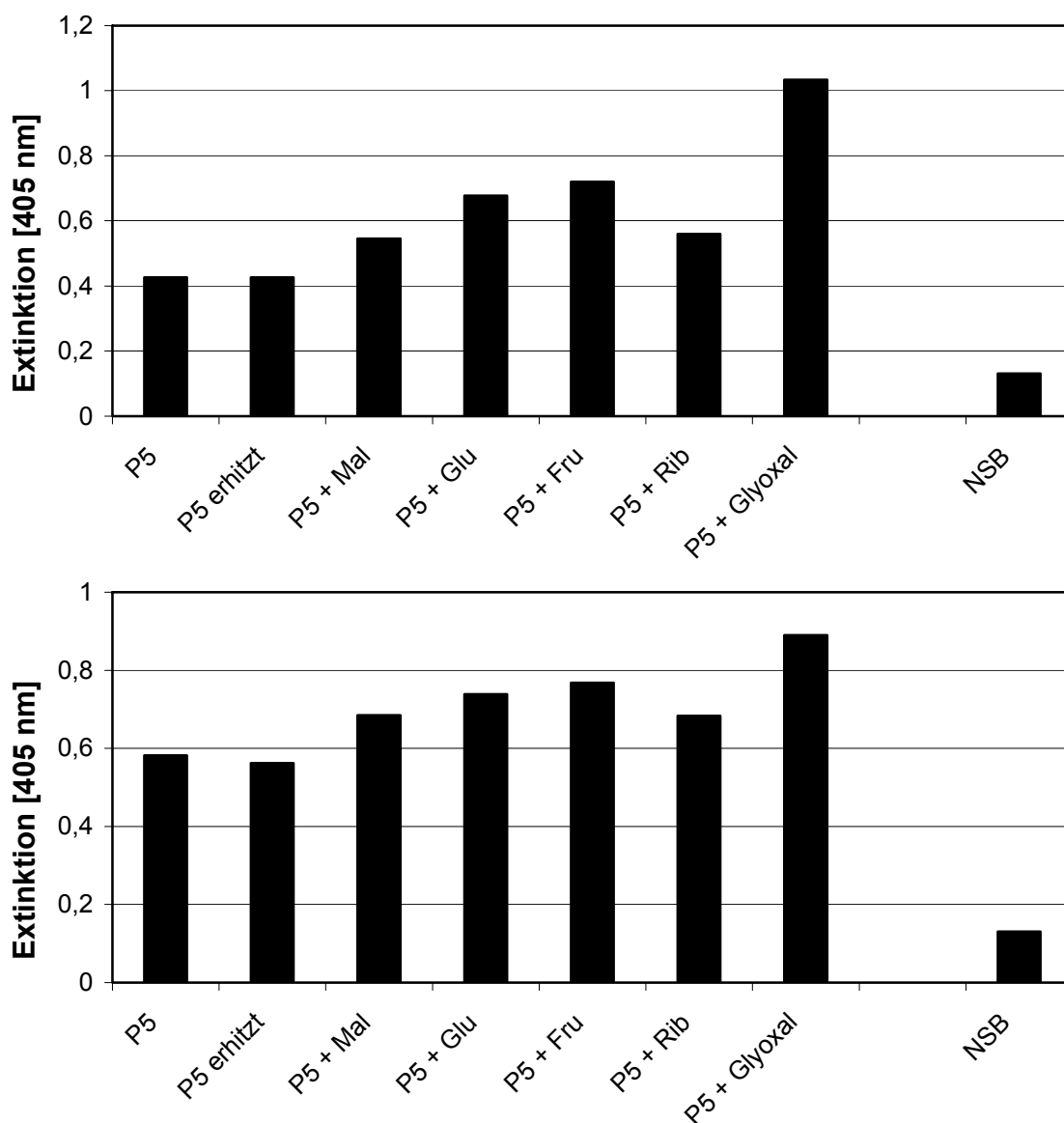


Abb. 2-2-25: CovaLink-ELISA des Peptides **P5** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 300 µmol/well).

oben: Patientenserum PEI 163 (1:100)

unten: anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:100.000)

Die größte Zunahme der IgE-Bindung wurde bei einer Inkubation mit Glyoxal beobachtet, während der Effekt bei Ribose im Unterschied zu Epitop 6 schwächer ausfiel als bei den Hexosen. Die Zunahme der IgE-Affinität wurde sowohl bei den Humansera als auch beim polyklonalen Kaninchenserum festgestellt. Das Peptid **P5** enthält weder Arginin noch Lysin und somit keine Aminosäure, von der bekannt ist, dass sie im Rahmen der nicht-enzymatischen Glycosylierung modifiziert wird.

Versuche zur Verkürzung des Modellpeptides

Die Sequenz von Epitop 7 überlappt teilweise mit der von Epitop 6 (Stanley *et al.*, 1997). Ebenso überlappen die Sequenzen der Modellpeptide **P4** und **P5** für diese Epitope. Es wäre daher möglich, dass sich der für den MAILLARD-Effekt relevante Abschnitt im Überlappungsbereich dieser Sequenz befindet. Denkbar wäre aber auch, dass es sich bei der Steigerung der IgE-Affinität von Epitop 6 und Epitop 7 um zwei getrennt Phänomene handelt, d. h. beide Epitope einen Bereich aufweisen, der durch eine MAILLARD-Reaktion IgE-bindende Strukturen ausbildet. Aus diesem Grund war es nahe liegend zu untersuchen, ob sich der relevante Ara h 2-Abschnitt R⁵²-D⁷⁵ der Epitope 6 und 7 eingrenzen lässt und eine Minimalstruktur gefunden werden kann, die sowohl beim Humanserum als auch beim Kaninchen eine Zunahme der IgE-Bindung nach MAILLARD-Reaktion zeigt. Sollte sich die Zunahme auch bei kleineren Bruchstücken des Abschnitts nachweisen lassen, könnte dies Hinweise darauf liefern, welche Teile der Epitope an der Bildung der relevanten Strukturen beteiligt sind. **Tab. 2-2-6** zeigt die Sequenzen der bisher untersuchten Modellpeptide für die Epitope 6 und 7 sowie die Sequenzen von drei Decapeptiden aus dem Überlappungsbereich der Epitope.

Tab. 2-2-6: Modellpeptide für die Epitope 6 und 7.

Peptid	Sequenz
P4	RDEDSYERDPYSPSQ
P5	PYSPSQDPYSPSPYD
P1	YERDPYSPSQ
P2	SQDPYSPSPY
P30	PYSPSQDPYS
Ara h 2	. . . RDEDSYERDPYSPSQDPYSPSPYD . . .
Epitop 6	YERDPYSPSQ
Epitop 7	SQDPYSPSPY

Leider zeigten die immunologische Evaluierung der drei Decapeptide **P1**, **P2** und **P30**, dass diese von den Humansera sowie vom Kaninchenserum nicht oder nur sehr schwach erkannt

wurden (cf. 2.3.3.1). Im Falle der Humansera konnte auch keine Antikörperbindung nach nicht-enzymatischer Glycosylierung dieser verkürzten Peptide festgestellt werden. Im Falle des Kaninchensera wurde mit dem Decapeptid PYSPSQDPYS (**P30**) aber ein Ara h 2-Abschnitt gefunden, der unbehandelt keine, hingegen nach Inkubation mit Glyoxal eine sehr starke IgE-Bindung aufwies (**Abb. 2-2-26**).

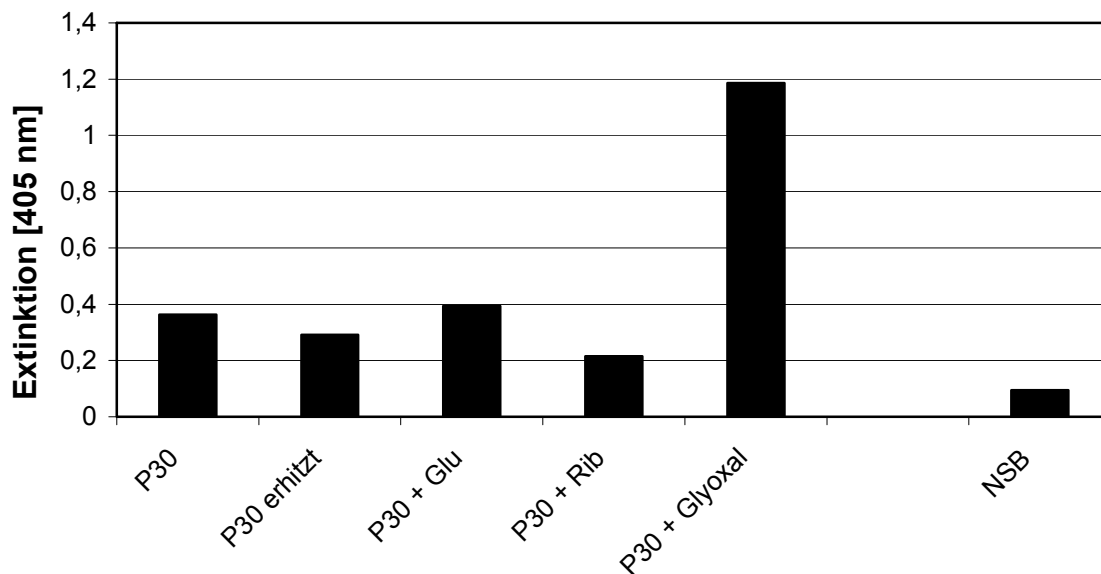


Abb. 2-2-26: CovaLink-ELISA des Peptides PYSPSQDPYS (**P30**) vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 300 µmol/well) mit dem polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:40.000).

Einzelne Fraktionen einer HPLC-Trennung des Bräunungsansatzes von **P30** und Glyoxal zeigten im ELISA eine erhöhte IgE-Bindung (**Abb. 2-2-27**). Doch war eine Isolierung und Strukturaufklärung der potenten Strukturen aus dem äußerst komplex zusammengesetzten Reaktionsgemisch nicht möglich.

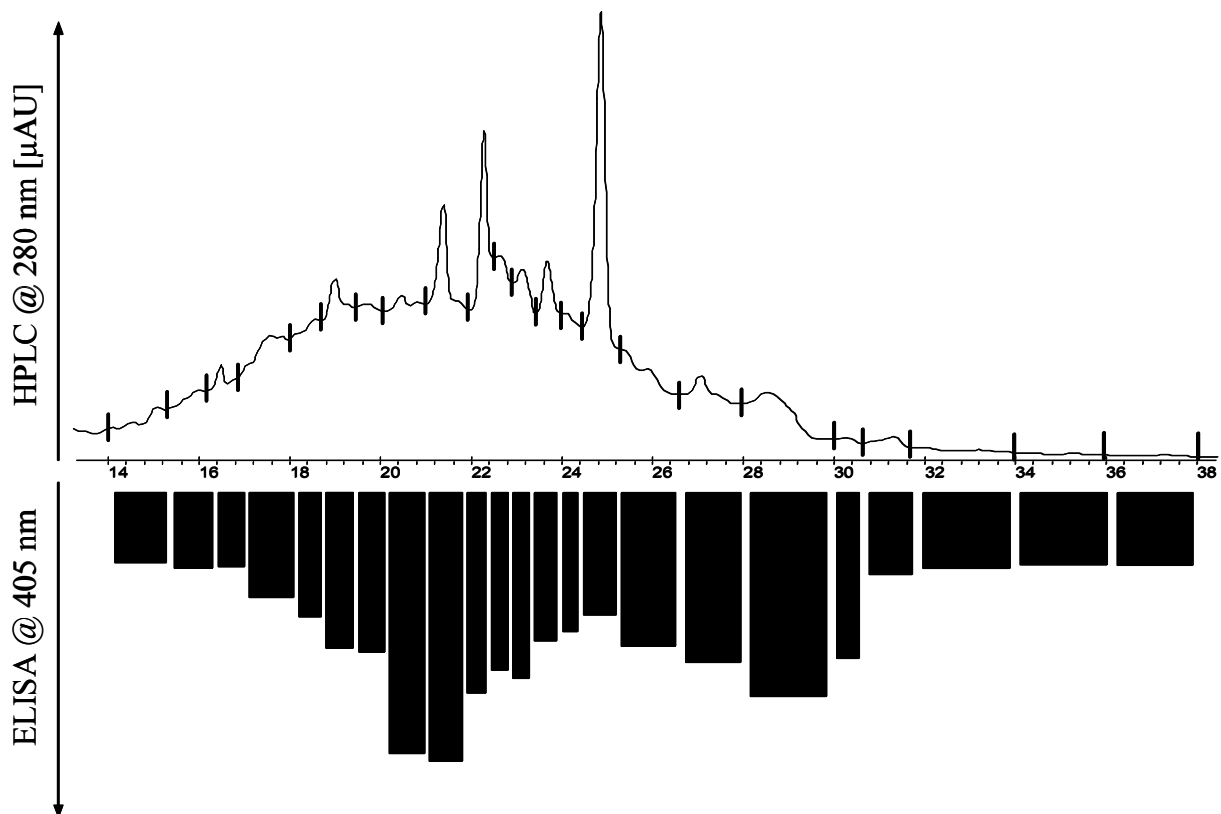


Abb. 2-2-27: HPLC-Trennung eines Bräunungsansatzes von **P30** und Glyoxal (obere Spur). Isolierte Fraktionen wurden einem CovaLink-ELISA zugeführt (untere Spur; polyklonales anti-Ara h 2-Kaninchenserum 1:40.000).

Das Epitop 7 zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Serin und Prolin aus. Aufgrund seiner cyclischen Kohlenwasserstoff-Seitenkette ohne funktionelle Gruppen scheidet Prolin als Reaktionspartner bei der Bildung der IgE-affinen Strukturen aus. Denkbar wäre hingegen eine Reaktion der Serin-Reste. Eine Wasserabspaltung führt zu Dehydroalanin-Strukturen, die evtl. mit Zuckerabbauprodukten weiterreagieren können. Daher wurden ausgehend vom Modellpeptid **P5** Peptide synthetisiert, deren Serin-Reste nacheinander durch Dehydroalanin bzw. Alanin ersetzt waren. In **Tab. 2-2-7** sind die Sequenzen dieser Modellpeptide, ihr Syntheseweg und die Reinheit der Rohprodukte zusammenfassend dargestellt. Die IgE-Affinität dieser Peptide wurde mittels ELISA vor und nach einer MAILLARD-Reaktion getestet.

Tab. 2-2-7: Dha- und Ala-substituierte Analoga von Epitop 7.

Bez.	Sequenz	Synthese	Reinheit Rohpeptid
P5	PY-Ser-P-Ser-QDPY-Ser-PSPYD	SPPS	> 95 %
P31	PY- Dha -P-Ser-QDPY-Ser-PSPYD	Dha-Methode	33 %
P32	PY-Ser-P- Dha -QDPY-Ser-PSPYD	Dha-Methode	25 %
P33	PY-Ser-P-Ser-QDPY- Dha -PSPYD	Dha-Methode	36 %
P34	PY- Ala -P-Ser-QDPY-Ser-PSPYD	SPPS	> 95 %
P35	PY-Ser-P- Ala -QDPY-Ser-PSPYD	SPPS	> 95 %
P36	PY-Ser-P-Ser-QDPY- Ala -PSPYD	SPPS	> 95 %

Die Synthese der Dha-Peptide erfolgte nach dem im Kapitel 2.3.4 gesondert beschriebenen Verfahren. Die Ergebnisse der ELISA-Studien dieser Peptide sind in **Abb. 2-2-28** zusammengefasst. Man erkennt, dass eine Substitution der Serin-Reste durch Dha in einer Abnahme der IgE-Affinität im Vergleich zu **P5** resultierte (Peptide **P31-P33** in **Abb. 2-2-28**). Dies war sowohl beim Human- als auch Kaninchenserum der Fall. Der Austausch von Ser⁷⁰ gegen Alanin führte hingegen beim Humanserum zu einer signifikanten Steigerung der IgE-Bindung (Peptid **P36** in **Abb. 2-2-28**).

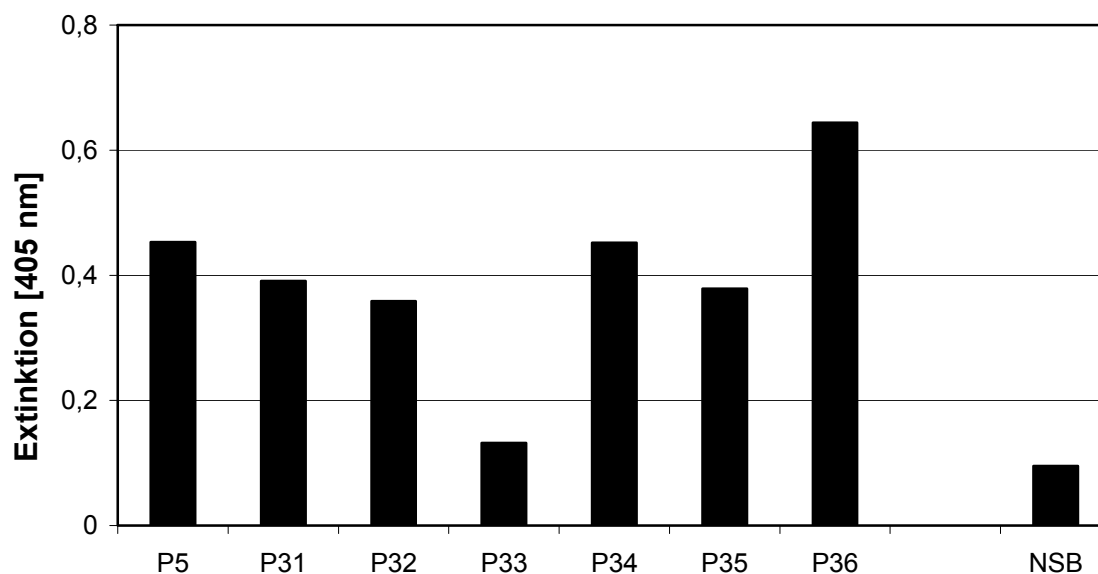


Abb. 2-2-28: CovaLink-ELISA der Peptide **P5** und **P31-P36** (je 60 pmol/well) bei Inkubation mit dem Patientenserum PEI 163 (1:100).

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Studien von Stanley *et al.* (1997) im Rahmen eines Alanin-Scans der Ara h 2-Epitope. Auch hier wurde eine Zunahme der Antikörperbindung an Epitop 7 durch die Substitution S70A gemessen. Ser⁷⁰ scheint also für die AK-Bindung essentiell zu sein. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass ein Austausch von Ser⁷⁰ gegen Dehydroalanin (Peptid **P33** in **Abb. 2-2-28**) zum vollständigen Verlust der AK-Affinität führte. Durch den Aminosäureaustausch zu Dehydroalanin erfolgte

ein Wechsel der Hybridisierung von sp^3 zu sp^2 am Kohlenstoffatom der Peptidkette. Damit wird die Geometrie des Peptides völlig geändert. Beim Austausch zu Alanin blieb hingegen das Stereozentrum mit der *S*-Konfiguration erhalten. Dies legt den Schluss nahe, dass - zumindest beim Humanserum - eine Veränderung an Position 70 für den MAILLARD-Effekt verantwortlich sein könnte.

Erhitzungsversuche von **P36** (mit Ala⁷⁰) mit reduzierenden Zuckern und Glyoxal zeigten jedoch trotz Substitution von Ser⁷⁰ durch Alanin eine Zunahme der IgE-Bindung nach MAILLARD-Reaktion (**Abb. 2-2-29** links). Da Alanin in der Seitenkette keine funktionellen Gruppen enthält, die mit Zuckern bzw. deren Abbauprodukten reagieren könnten, scheint die für die Zunahme der IgE-Affinität verantwortliche Reaktion an einer anderen Aminosäure als an Position 70 abzulaufen. Dies deckt sich mit der Vermutung, dass sich die für den positiven MAILLARD-Effekt verantwortliche Aminosäure(n) im Überlappungsbereich der Epitope 6 und 7 befinden muss.

Das Dha⁷⁰-Analogon **P33** zeigte auch nach nicht-enzymatischer Bräunung keine IgE-Affinität (**Abb. 2-2-29** rechts). Dies zeigt, dass die richtige Geometrie an Position 70 (sp^3 -Kohlenstoff) für die generelle Anbindung von Epitop 7 an die Antikörper von essentieller Bedeutung ist, unabhängig von eventuellen Veränderungen an anderen Aminosäuren des Epitops.

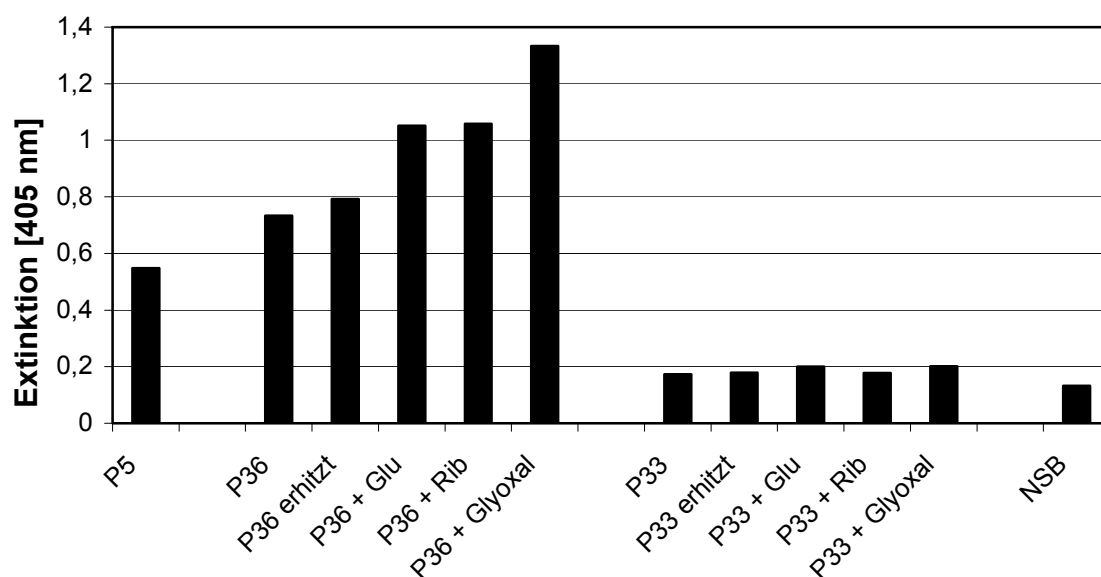


Abb. 2-2-29: CovaLink-ELISA der Peptide **P36** und **P33** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 60 μ mol/well) mit dem Patientenserum PEI 163 (1:100) im Vergleich zu unbehandeltem **P5**.

Mit den hier vorgestellten ELISA-Studien von modifizierten Peptiden konnte gezeigt werden, dass Dha⁷⁰ in Ara h 2 weder die gesuchte Modifizierung noch einen potenten Vorläufer darstellt.

Erhitzungsversuche der zwei anderen Alanin-substituierten Pentadecapeptide zeigten beim Patientenserum PEI 163 eine Zunahme der IgE-Bindung. Diese fiel jedoch schwächer als beim Modellpeptid für das Epitop 7 aus (**Abb. 2-2-30**). Aber auch hier führte die Inkubation mit Glyoxal zur größten Steigerung der IgE-Bindung. Hingegen war der Effekt bei Ribose schwächer ausgeprägt war als bei einer Bräunung mit Glucose, wie es auch bei den ELISA-Studien des Wildtyp-Epitops beobachtet wurde.

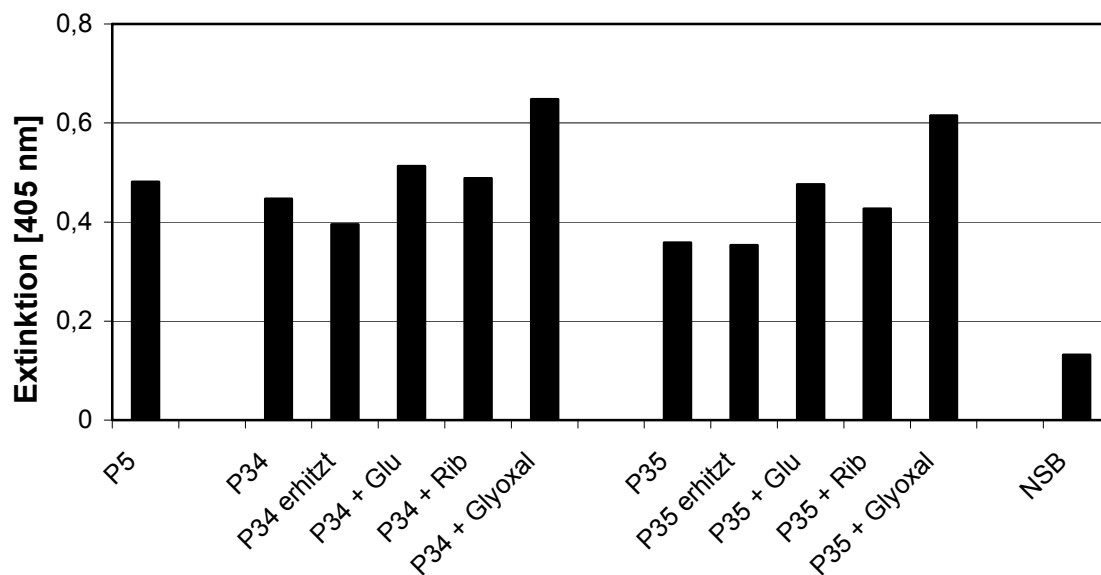


Abb. 2-2-30: CovaLink-ELISA des Peptides **P34** und **P35** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 60 µmol/well) mit dem Patientenserum PEI 163 (1:100) im Vergleich zu unbehandeltem **P5**.

Beim Kaninchenserum konnte gezeigt werden, dass der MAILLARD-Effekt bei Substitution von Ser⁶³ durch Alanin verschwindet (**Abb. 2-2-31**). Innerhalb der Messgenauigkeit konnte keine Veränderung der IgE-Affinität von **P34** bei Inkubation mit Glucose, Ribose und Glyoxal beobachtet werden.

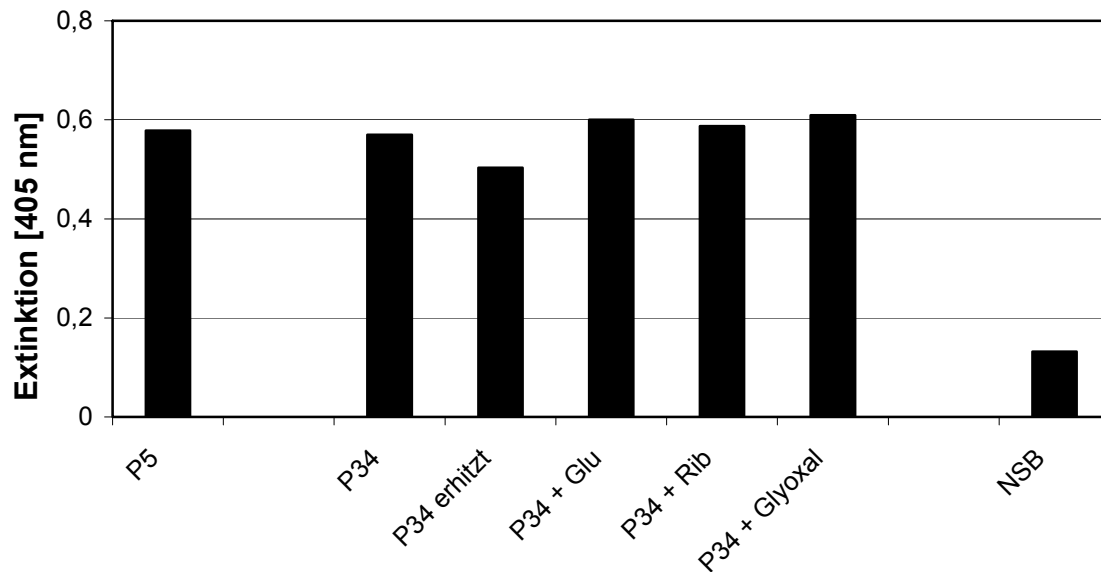


Abb. 2-2-31: CovaLink-ELISA des Peptides **P34** vor und nach nicht-enzymatischer Glycosylierung (90 min, 95 °C; 60 µmol/well) mit dem polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum (1:100.000) im Vergleich zu unbehandeltem **P5**.

Diskussion

Das Hauptepitop 7 von Ara h 2 wurde in Form des Pentadecapeptides synthetisiert, welches Teilsequenzen des Epitops 6 besitzt. Dieses wurde sowohl vom polyklonalen anti-Ara h 2-Kaninchenserum als auch vom Erdnussallergikerserum PEI 163 durch IgE-Bindung erkannt. Bei beiden Sera kam es durch Erhitzen in Gegenwart von reduzierenden Zuckern zu einer messbaren Steigerung der IgE-Bindung. Inkubation mit dem hochreaktiven Zuckerabbauprodukt Glyoxal führte wie beim Erdnussallergen und dem Epitop 6 zum stärksten Anstieg der IgE-Bindung. Im Unterschied zu den beim Gesamtprotein sowie Epitop 6 gemessenen Effekten induzierte Ribose eine schwächere Steigerung der IgE-Bindung als Glucose. Die Sequenzen der Epitope 6 und 7 überlappen teilweise (Stanley *et al.*, 1997), ebenso die für die Untersuchungen herangezogenen Modellpeptide **P4** und **P5** für diese Epitope. Naheliegend ist daher, dass der für die zuckerinduzierte Steigerung der IgE-Affinität von Ara h 2 verantwortliche Abschnitt im Überlappungsbereich dieser Sequenzen befindet.

Daher wurden verschiedene Decapeptide aus dem Überlappungsbereich der Epitope 6 und 7 synthetisiert. Leider zeigten diese kurzen Peptide keine IgE-Aktivität in den CovaLink-ELISA, was mit den Erfahrungen aus Kap. 2.2.3.1 in Einklang steht. Jedoch wurde nach Inkubation dieser Decapeptide unter MAILLARD-Bedingungen für die Sequenz P⁶¹YSPSQDPYS⁷⁰ eine drastische Zunahme der IgE-Affinität gemessen. Allerdings war dies nur beim anti-Ara h 2-Kaninchenserum messbar, für den Nachweis einer Wechselwirkung mit

humanen Antikörpern war die Peptidsequenz augenscheinlich zu kurz. Die Sequenz PYSPSQDPYS stellt exakt den Überlappungsbereich von Epitop 6 und 7 dar. Dies stärkt die Hypothese, wonach der Reaktionszentrum für die zuckerinduzierte Steigerung der IgE-Affinität von Ara h 2 genau in diesem Bereich zu suchen ist. Das Reaktionsgemisch einer Modellinkubation von PYSPSQDPYS und Glyoxal stellte sich als überraschend komplex heraus. Eine HPLC-Trennung war für eine Isolierung IgE-affiner Reaktionsprodukte nicht ausreichend.

Da Epitop 7 bzw. die aktive Sequenz PYSPSQDPYS keine Aminosäure enthält, von der bräunungsinduzierte Glycosylierungsprodukte bekannt sind, müssen die aktiven Strukturen auf anderem Wege als über die klassische MAILLARD-Reaktion gebildet werden. Aufgrund des hohen Seringehaltes des Epitops lag die Vermutung nahe, dass eine hitzeinduzierte und evtl. von Zuckern katalysierte Umwandlung in Dha-Reste bzw. deren Folgeprodukte für den gemessenen Effekt verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen, wurden mit der in dieser Arbeit etablierten Methode drei Dehydroalanin-substituierte Epitopanaloga synthetisiert und immunologisch vor und nach einer MAILLARD-Reaktion evaluiert. Das ELISA-Ergebnis zeigte, dass Dehydroalanin an den Positionen 63, 65 oder 70 weder die gesuchte Modifizierung noch einen potenten Vorläufer dieser Strukturen darstellt.

Durch einen Alanin-Scan des Epitopes und einem ELISA nach MAILLARD-Reaktion der Ser-Ala-substituierten Peptide wurde gezeigt, dass im Falle der Humansera Serin⁷⁰ für die AK-Bindung essentiell, aber nicht in die Entstehung der IgE-affinen Strukturen involviert ist. Ersteres steht in völligem Einklang mit den Ergebnissen eines Alanin-scans der Ara h 2-Epitope durch Stanley *et al.* (1997). Bei dieser Studie wurde für die S70A-Punktmutationsvariante des Epitopmodells S⁶⁵QDPYSPSPY⁷⁴ eine IgE-Bindung von 140 % im Vergleich zu Wildtypsequenz (100 %) nachgewiesen. Beim Kaninchenserum verschwand der MAILLARD-Effekt, als Serin⁶³ durch Alanin substituiert wurde. Damit scheint bewiesen, dass Serin⁶³ nach einer Modifizierung für die Zunahme der IgE-Bindung essentiell ist. Bei den Patientensera war dieser Effekt nicht zu beobachten. Daher ist anzunehmen, dass die molekularen Ursachen für den Anstieg der IgE-Bindung an Epitop 7 bzw. an rAra h 2 durch nicht-enzymatische Glycosylierung bei beiden Spezies verschieden sind. Die endgültige Klärung dieser Unterschiede macht weitergehende Modellstudien erforderlich.

2.2.4 Einfluss der enzymatischen Bräunung auf rAra h 2

Analog zu den Experimenten bei rPru a 1 und Erdnusslectin wurden Untersuchungen zum Einfluss der enzymatischen Bräunung auf rAra h 2 durchgeführt. Hierzu wurde rAra h 2 mit Polyphenoloxidase in An- und Abwesenheit mit den Pflanzenphenolen inkubiert, die schon bei den Untersuchungen zu rPru a 1 und Erdnusslectin verwandt wurden. Unverändertes und modifiziertes Allergen wurde dann an MaxiSorb-Mikrotiterplatten gebunden und nachfolgend ein ELISA-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse in **Abb. 2-2-32** dargestellt sind.

Die Daten zeigen, dass Polyphenoloxidase alleine keine relevante Änderung der IgE-Bindung an rAra h 2 ausübte. Bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Polyphenols war eine drastische Minderung der AK-Bindung zu beobachten. Epicatechin und Catechin führten zu einer vollständigen Löschung der IgE-Bindung. Wie bei den Studien zum Kirschallergen und zum Lectin wiesen Gallussäure und Quercetin den schwächsten Hemmeffekt von den untersuchten Polyphenolen auf. Aber auch hier war die Abnahme der Antikörperbindung überaus deutlich. Diese Effekte konnten sowohl beim anti-rAra h 2-Kaninchenserum also auch beim Patientenserum PEI 163 und dem Patienten-Poolserum nachgewiesen werden. Insgesamt wurde somit tendenziell ein ähnliches Resultat wie bei den Proteinen rPru a 1 und Erdnusslectin erhalten: Durch enzymatische Bräunungsreaktionen wird das Allergen dermaßen geschädigt, dass die Fähigkeit zur Antikörperbindung gemindert oder ganz zerstört wird.

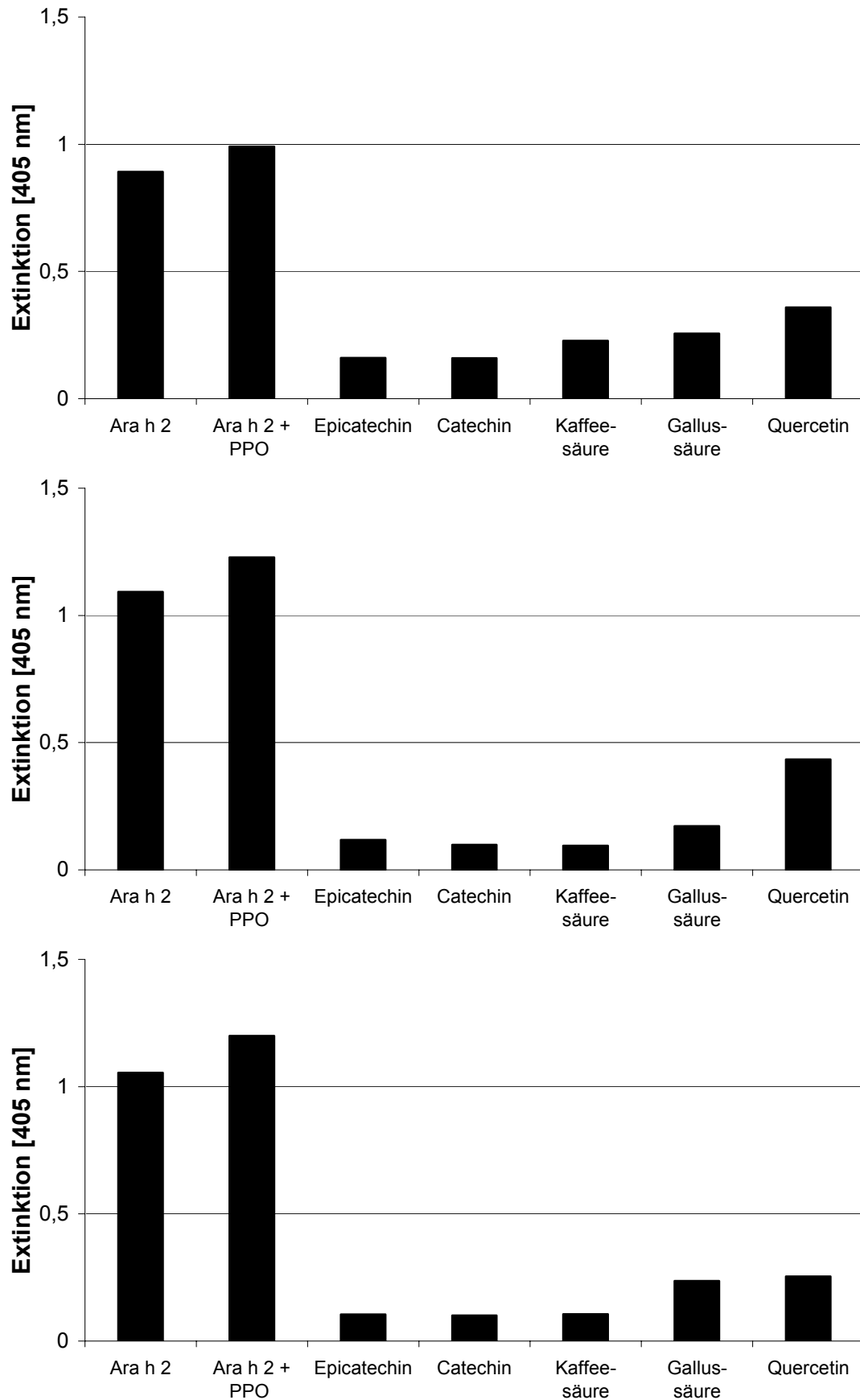


Abb. 2-2-32: ELISA von verschiedenen Modellansätzen bestehend aus rAra h 2 (125 ng/well) und Polyphenoloxidase unter Zusatz verschiedener Polyphenole. Oben: anti-rAra h 2-Kaninchenserum (1:100.000), mitte: PEI 163 (1:100), unten: Poolserum (1:10).

Bei rAra h 2 bot sich ferner die Gelegenheit, diesen Effekt auf Epitopebene zu untersuchen. Dazu wurden die drei Hauptepitope (**P3**, **P4** und **P5**) sowie der lysinhaltige Abschnitt L¹¹⁶RPCEQHLMQKIQRDEDS¹³³ (**P6**) an CovaLink-Platten gebunden und mit Polyphenoloxidase und Epicatechin inkubiert. Nach erfolgter Bräunung konnten das Enzym sowie nicht an die Peptide gebundene Bräunungsprodukte aus den Kavitäten der Mikrotiterplatte herausgewaschen werden. Die z. T. modifizierten Peptide verblieben jedoch kovalent gebunden an der Polystyroloberfläche. Mit Hilfe eines ELISA konnte die IgE-Bindungsaktivität der behandelten Peptide gemessen werden (**Abb. 2-2-33**).

Sowohl beim Kaninchenserum als auch beim Patientenserum PEI 163 zeigte sich, dass nur die gleichzeitige Inkubation mit dem Enzym und Polyphenol eine Zerstörung der Epitope bewirkt. Der Zusatz von Epicatechin alleine hatte keinen Einfluss auf die IgE-Affinität der Epitope. Eine Inkubation mit Polyphenoloxidase alleine bewirkte nur eine leichte Minderung der IgE-Bindung. Die Minderung der AK-Affinität bei Epitop 3 (**P3**) liegt wahrscheinlich im vorhandenen Cystein-Rest begründet. Durch eine Addition der Thiolfunktion an bei der enzymatischen Reaktion entstehende Chinone kann das Epitop derart verändert werden, dass Antikörper nicht mehr binden können. Dass ein intakter Cystein-Rest für die IgE-Bindung an Epitop 3 essentiell ist, wurde schon durch die Versuche in Kap. 2.2.3.4 nachgewiesen. Die Epitope 6 (**P4**) und 7 (**P5**) enthalten keine stark nukleophilen Gruppen. Vermutlich werden bei diesen beiden Epitopen die Tyrosin-Reste unter dem Einfluss der Enzymreaktion verändert. Das Peptid **P6** zeigte wie erwartet weder vor noch nach Bräunung eine IgE-Affinität (**Abb. 2-2-33**).

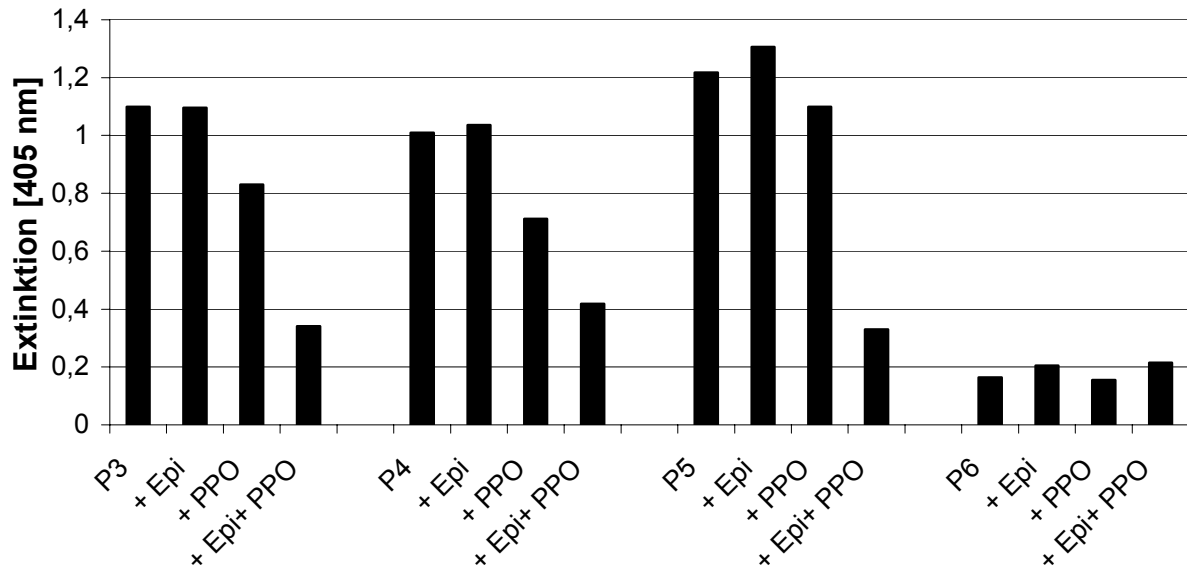


Abb. 2-2-33: Inkubationen von an CovaLink-Platten gebundenen Ara h 2-Abschnitten (**P3**, **P4**, **P5**, **P6**, 500 ng Peptid/well) mit Epicatechin (Epi) und Polyphenoloxidase (PPO) und anschließendem ELISA (Kaninchenserum 1:100.000). Bei den Versuchen mit **P4** wurde länger gefärbt, da die IgE-Bindung im Vergleich zu Epitop 3 und 7 schwächer ist.

2.3 Synthese von modifizierten Peptiden

2.3.1 Vorüberlegungen

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Glycosylierungsreaktionen auf das allergene Potential von Ara h 2 war es notwendig Ara h 2 Abschnitte zu synthetisieren, die an bestimmten Positionen AGE-Modifizierungen tragen. Zur Synthese derartiger AGE-Peptide kommen drei Strategien in Frage. Zunächst könnte man versuchen, Peptide mit reduzierenden Zuckern oder Dicarboxylen umzusetzen und die gewünschten AGE-Peptide aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren. Diese Strategie erweist sich als wenig praktikabel. Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, entstehen bei derartigen Umsetzungen hochkomplexe Gemische, aus denen Einzelkomponenten nicht zu isolieren sind. Dies ergibt sich u.a. aus der Polyfunktionalität größerer Peptide und der Vielzahl an möglichen Modifizierungsprodukten. Neben der Isolierung würden sich auch Schwierigkeiten bei Analytik der aufgereinigten AGE-Peptide ergeben. Zum einen müssten Anzahl und Position der Modifizierungen bestimmt werden, was z. B. durch EDMAN-Abbau oder massenspektrometrische Peptidsequenzierung möglich wäre. Zum anderen müsste dann die Struktur der Modifizierung mit aufwändigen Methoden wie NMR geklärt werden, da etliche Modifizierungen wie MG-H1, MG-H2 und MG-H3 gleiche Massen besitzen und somit durch MS nicht zu unterscheiden sind. Aus diesen Gründen wurde diese Vorgehensweise nicht weiter verfolgt.

Daher scheint die gezielte chemische Synthese derartiger Peptide aussichtsreicher. Generell kann hierbei zwischen mehreren Strategien unterschieden werden. Eine Möglichkeit wäre die Synthese eines unmodifizierten Peptides und die anschließende chemische Modifizierung, die wahlweise in Lösung oder an fester Phase (evtl. unter Ausnutzung von Schutzgruppenstrategien) durchgeführt werden kann. Zum anderen könnten AGE-Peptide komplett mittels Festphasensynthese aufgebaut werden, wobei spezielle Bausteine für den Einbau der AGE-Aminosäuren nötig wären. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien zur effizienten, chemischen Synthese von Peptiden mit den AGE-Modifizierungen CML (XII), CEL (XIII), Glarg, CMA, MG-H1 (XVIII), MG-H2 (XIX), MG-H3 (XX) und CEA ausgearbeitet. Diese sind in den folgenden Kapiteln dargestellt. Darüber hinaus war es für Untersuchungen zum Cystein-haltigen Epitop 3 von Ara h 2 nötig, Peptide mit Dehydroalanin

und Lanthionin anstelle von Cystein zu synthetisieren. Auch diese Synthesen werden im Folgenden beschrieben.

2.3.2 Synthese von CML- und CEL-Peptiden

Synthese über Bausteine

Zur Synthese von Peptiden mit den MAILLARD-Modifizierungen CML und CEL wurde zunächst die Strategie der Bausteine gewählt. Solche *building blocks* besitzen einen einheitlichen Bauplan: die N-terminale Aminogruppe ist mit Fmoc geschützt, die C-terminale Säurefunktion bleibt frei, während die funktionellen Gruppen der Seitenkette mit säurelabilen Schutzgruppen versehen sind. Bei Carbonsäuren boten sich hierfür vorzugsweise *tert.*-Butylester, bei Aminen Boc-Schutzgruppen an. Die Bausteine (*S*)-6-((*tert.*-Butoxycarbonyl)-(2-*tert.*-butoxy-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH, **1**) und (*S*)-6-((*tert.*-Butoxycarbonyl)-(2-*tert.*-butoxy-1-methyl-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH, **2**) erfüllten diese Bedingungen (**Abb. 2-3-1**).

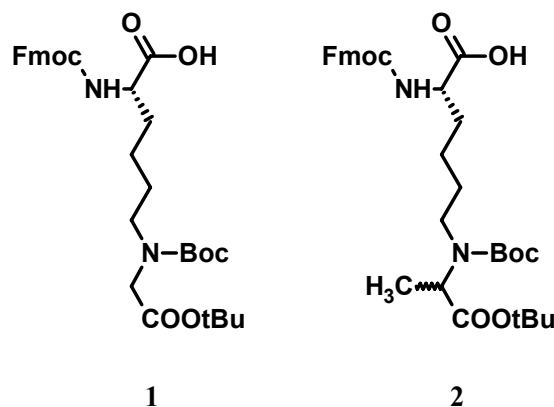


Abb. 2-3-1: Struktur der Bausteine Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**) und Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH (**2**).

Die Synthese dieser Bausteine gelang durch reduktive Alkylierung von Fmoc-Lys-OH (**3**) mit den *tert.*-Butylestern von Glyoxylsäure bzw. Brenztraubensäure und anschließender Einführung der Boc-Gruppe (**Abb. 2-3-2**). Die Darstellung von Glyoxylsäure-*tert.*-butylester gelang durch Umsetzung von Fumarsäuredichlorid mit *tert.*-Butanol zu Fumarsäuredi-*tert.*-butylester und anschließender Ozonolyse (Subasinghe *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1991; Yamago *et al.*, 1998). Brenztraubensäure-*tert.*-butylester wurde entsprechend durch Ozonolyse von Methacrylsäure-*tert.*-butylester erhalten.

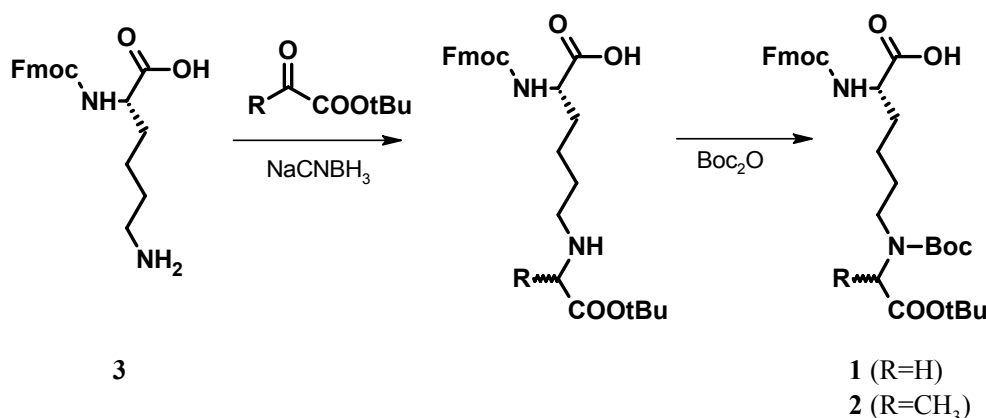


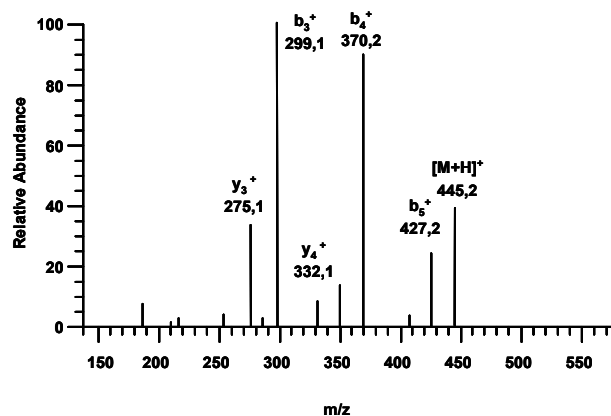
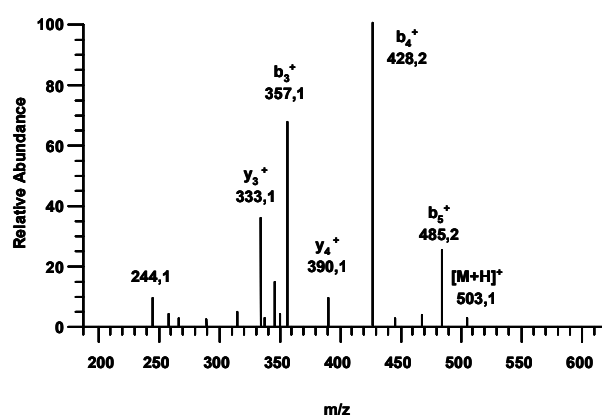
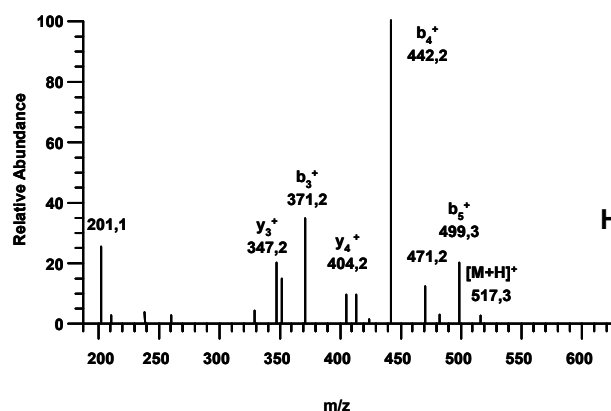
Abb. 2-3-2: Synthese der CML-/CEL-Bausteine **1** und **2** ausgehend von Fmoc-Lys-OH (**3**).

Um zu überprüfen, ob diese Bausteine tatsächlich Peptide mit CML und CEL liefern, wurden modellhaft Pentapeptide der Struktur Leu-Gly-Xxx-Ala-Gly synthetisiert. Die Sequenz wurde so gewählt, dass die Peptide wasserlöslich waren, gleichzeitig aber eine ausreichende Trennung durch HPLC an RP-18-Material zu erreichen war. Für die automatisierte Synthese der Peptide Leu-Gly-CML-Ala-Gly (**P38**) bzw. Leu-Gly-CEL-Ala-Gly (**P39**) wurden die *building blocks* **1** und **2** im fünffachen Überschuss relativ zum Harz eingesetzt. Die Reinheiten der nach Spaltung vom Harz erhaltenen Rohpeptide wurde durch HPLC-Analyse bestimmt. Sie lagen mit 86 % bzw 95 % im Bereich des zum Vergleich synthetisierten Lysin-Peptides Leu-Gly-Lys-Ala-Gly (**P37**, **Tab. 2-3-1**). Die zu erwartenden Diastereomere von **P39** konnten auf der verwendeten stationären HPLC-Phase nicht getrennt werden.

Tab. 2-3-1: Synthetisierte Pentapeptide mit Lysin, CML und CEL

Bez.	Sequenz	Baustein	Reinheit Rohprodukt
P37	Leu-Gly-Lys-Ala-Gly	Fmoc-Lys(Boc)-OH	94 %
P38	Leu-Gly-CML-Ala-Gly	Fmoc-CML(O ^t Bu)(Boc)-OH (1)	86 %
P39	Leu-Gly-CEL-Ala-Gly	Fmoc-CEL(O ^t Bu)(Boc)-OH (2)	95 %

Eine LC-MS/MS(ESI)-Analyse der Peptide **P38** und **P39** zeigte, dass sich CML und CEL bei der massenspektroskopischen Peptidsequenzierung wie Standard-Aminosäuren verhalten. Die gemessenen b- und y-Fragmentionen der Peptide stimmen mit den theoretischen Werten überein. Es tritt also keine Fragmentierung innerhalb der modifizierten Aminosäuren auf. Die Peptide zerfallen nur entlang der peptidischen Säureamidbindungen. **Abb. 2-3-3** zeigt die theoretische Fragmentierung der Pentapeptide sowie die entsprechende LC-MS/MS(ESI)-Spektren.

a) Leu-Gly-Lys-Ala-Gly (**P37**)
($R_1=R_2=H$)b) Leu-Gly-CML-Ala-Gly (**P38**)
($R_1=CH_2COOH$, $R_2=H$)c) Leu-Gly-CEL-Ala-Gly (**P39**)
($R_1=CH(CH_3)COOH$, $R_2=H$)

d)

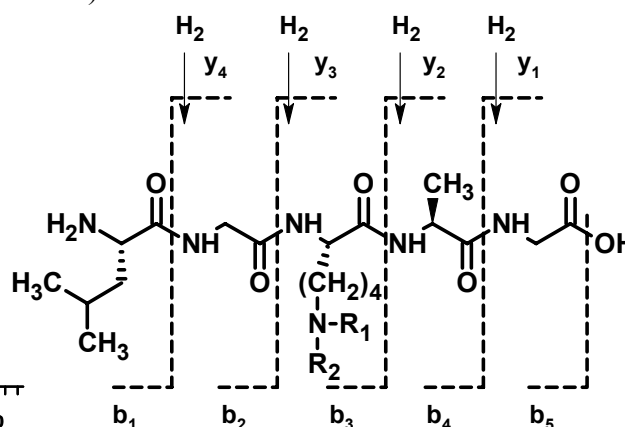


Abb. 2-3-3: a-c) LC-MS/MS(ESI)-Analyse der Pseudomolekülonen $[M+H]^+$ von **P37**, **P38** und **P39**.
d) Struktur und Fragmentierungsschema der Peptide **P37**, **P38** und **P39**.

Die ¹H-NMR-Spektren von **P38** und **P39** zeigen im Vergleich zu **P37** die zusätzlichen Signale der Methylen- bzw. Ethylprotonen aus den AGE-Modifizierungen (**Abb. 2-3-4**). Das CML-Peptid weist ein Singulett bei ca. 3,9 ppm auf. Für das CEL-Peptid ist ein koppelndes Paar von Dublett und Quartett bei 1,6 ppm bzw. 4,0 ppm mit einem Flächenverhältnis von 3:1 charakteristisch, welches große Ähnlichkeit mit den Alanin-Protonen besitzt. Im EDMAN-Abbau der modifizierten Peptide fand sich an Position 3 eine Lücke. Wahrscheinlich konnten die zu CML und CEL gehörenden PTH-Derivate im Standard-Trennungsprogramm für die zwanzig natürlichen Aminosäuren nicht detektiert werden.

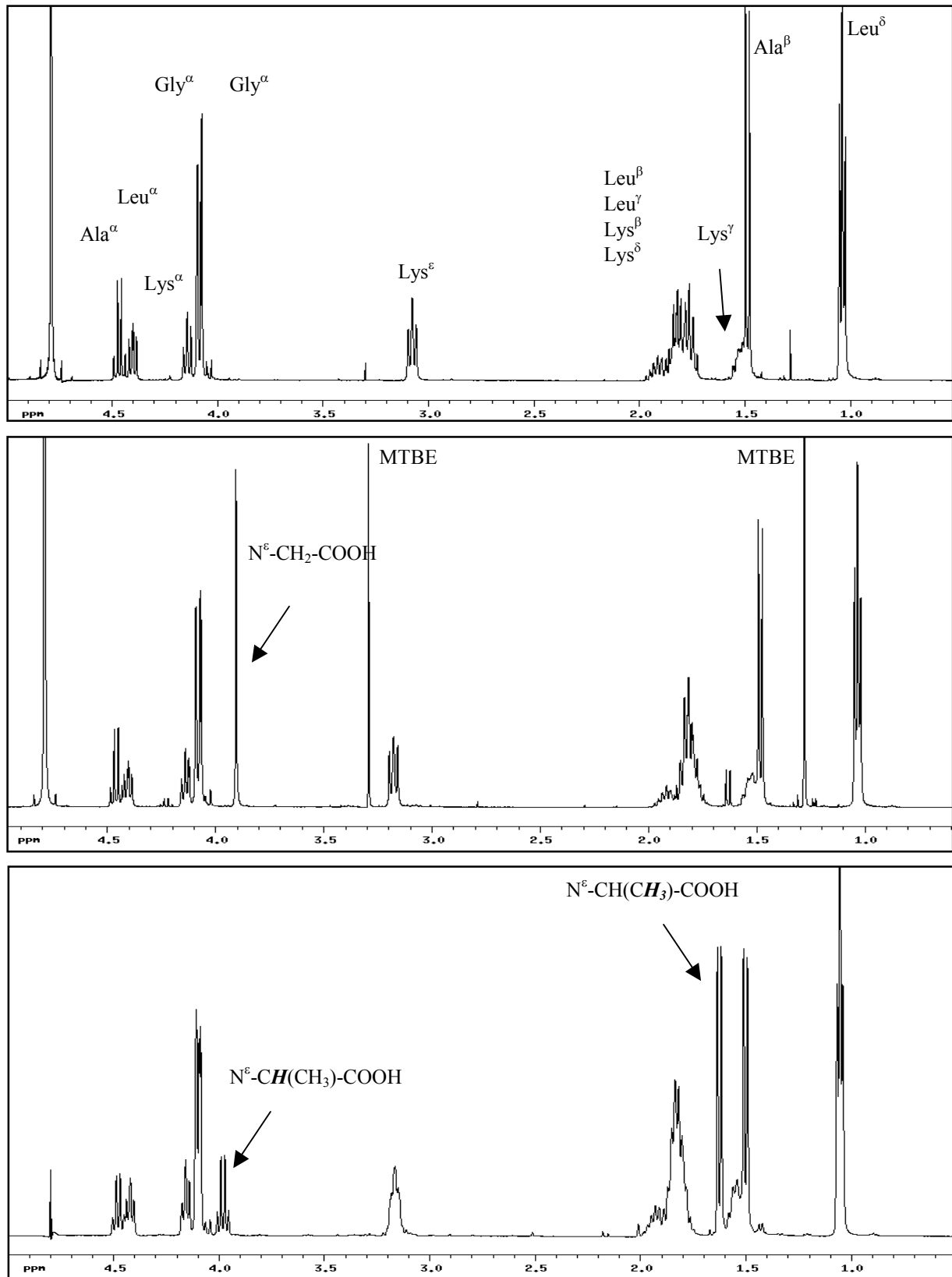


Abb. 2-3-4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, D_2O) der Peptide Leu-Gly-Lys-Ala-Gly (**P37**, oben), Leu-Gly-CML-Ala-Gly (**P38**, Mitte) und Leu-Gly-CEL-Ala-Gly (**P39**, unten). Die Pfeile verweisen auf die zusätzlichen Signale, die durch die AGE-Modifizierungen erzeugt werden.

Alternativer Syntheseweg für CML- und CEL-Peptide

Der Syntheseweg für CML- und CEL-Peptide über die Bausteine besitzt den Vorteil hoher Ausbeuten an relativ sauberem Peptid. Allerdings war die Synthese der *building blocks* aufwändig und es gingen bei der automatisierten SPPS 80-90 % der Bausteine verloren. Daher wurde ergänzend eine andere Strategie zur Festphasensynthese dieser modifizierten Peptide verfolgt. Diese soll zunächst wiederum an der kurzen Sequenz Leu-Gly-Xxx-Ala-Gly aufgezeigt werden. Unter Verwendung des Bausteins Fmoc-Lys(ivDde)-OH (**4**, Chhabra *et al.*, 1998, **Abb. 2-3-5**) wurde am Synthesizer ein Boc-Leu-Gly-Lys(ivDde)-Ala-Gly-WANG-Harz aufgebaut.

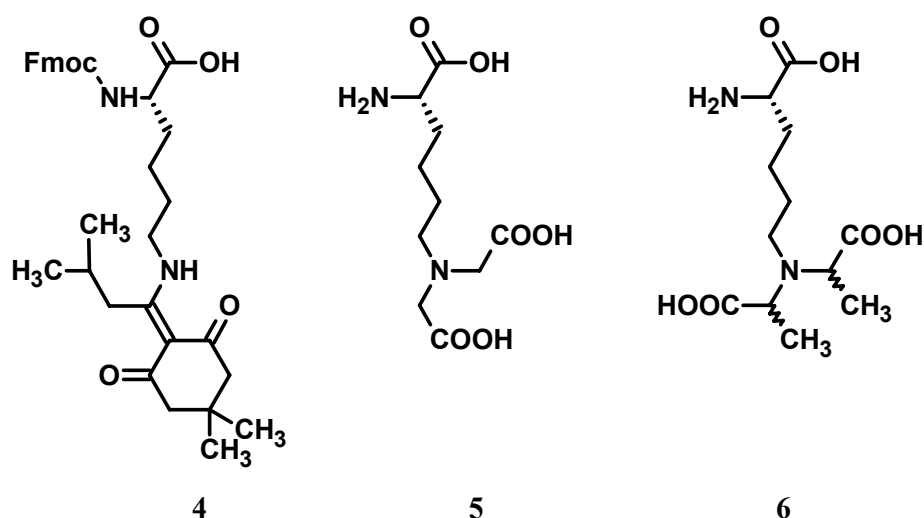


Abb. 2-3-5: Strukturen von Fmoc-Lys(ivDde)-OH (**4**), BisCML (**5**) und BisCEL (**6**).

Die ϵ -Aminogruppe des Lysins trägt hier die orthogonale ivDde-Schutzgruppe, die selektiv mit Hydrazin entfernt werden konnte (**Abb. 2-3-6**). Unter diesen Bedingungen verblieben alle säurelabilen Schutzgruppen am Peptid und dieses am Harz (Bycraft *et al.*, 1993). Die freie Aminogruppe des Lysins sollte nun mit Glyoxylsäure, Natriumcyanoborhydrid und DIPEA carboxymethyliert werden. Der Zusatz an Base sollte dabei verhindern, dass Glyoxylsäure während der Alkylierung unbeabsichtigt das Peptid vom Harz löst. Aufarbeitung des alkylierten Peptidylharzes lieferte überraschenderweise neben nichtalkyliertem Peptid Leu-Gly-Lys-Ala-Gly (**P37**) ein Peptid, bei dem die Seitenkette des Lysins zweimal carboxymethyliert worden war. Die diesem Peptid **P40** zugrundeliegende Aminosäure 2-Amino-6-bis(carboxymethyl)aminohexansäure (**5**, **Abb. 2-3-5**) wird im Folgenden als BisCML bezeichnet. Die Bildung dieser Biscarboxymethylaminosäure konnte auch durch

Änderung der molaren Verhältnisse von Lysin-Peptid und Glyoxylsäure nicht unterdrückt werden. Es schien, als ließe sich die Carboxymethylierung nicht auf der Stufe des CML-Peptides anhalten. Vielmehr reagierte einmal gebildetes CML-Peptid bevorzugt mit Glyoxylsäure zum BisCML-Peptid. Dies erklärt, warum selbst bei einem Unterschuss an Glyoxylsäure kein CML-Peptid erhalten werden. Eine derartige Mehrfachalkylierung war bei der Synthese des CML-Bausteins **1** nicht aufgetreten, wahrscheinlich bedingt durch die sterische Hinderung des dort verwendeten Glyoxylsäure-*tert.*-butylesters. Daher wurde versucht, ob sich durch Verwendung dieses Esters die Carboxymethylierung des Lysin-Peptides auf der Stufe des Monoalkylierungsproduktes anhalten ließe. Da die *tert.*-Butylester-Gruppe bei der finalen Spaltung des Peptides von der feste Phase ebenfalls hydrolysiert wird, entstünde als Endprodukt das gewünschte CML-Peptid. In der Tat konnte durch Umsetzung von Boc-Leu-Gly-Lys(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit Glyoxylsäure-*tert.*-butylester und Natriumcyanoborhydrid und abschließender Spaltung mit TFA/H₂O/TIS Leu-Gly-CML-Ala-Gly (**P38**) in hoher Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Das Peptid entsprach in seinen chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften exakt dem Peptid, welches mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH erzeugt wurde.

Eine Carboxyethylierung von Boc-Leu-Gly-Lys(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit Brenztraubensäure, Natriumcyanoborhydrid und DIPEA lieferte nach Aufarbeitung das gewünschte Peptid Leu-Gly-CEL-Ala-Gly (**P39**) in mäßiger Reinheit (66 %, **Abb. 2-3-6**). Auch dieses Peptid entsprach in seinen chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften dem Peptid, welches durch SPPS mit dem Baustein Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH erhalten wurde. In geringer Menge fand sich im Reaktionsprodukt das doppelt alkylierte Peptid **P41** mit der zum BisCML analogen Aminosäure 2-Amino-6-bis(1-carboxyethyl)aminohexansäure (**6**, **Abb. 2-3-5**), welche als BisCEL bezeichnet wurde. Wahrscheinlich verursacht die im Vergleich zur Glyoxylsäure zusätzliche Methylgruppe der Brenztraubensäure eine ausreichende sterische Hinderung, um eine weitere Alkylierung von CEL zum BisCEL weitgehend zu unterdrücken.

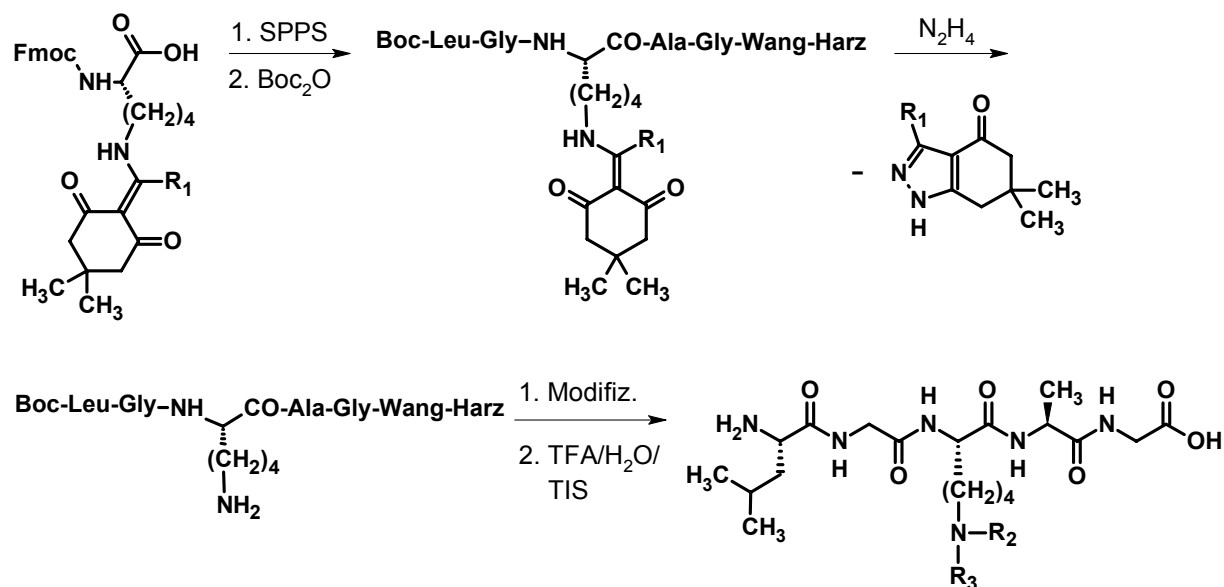


Abb. 2-3-6: Schema zu Seitenkettenmodifizierung von Lysin-Seitenketten mit der orthogonalen ivDde-Schutzgruppe (R₁=CH₂CH(CH₃)₂). Dabei können die mehrfach alkylierten Peptide **P40** (R₂=R₃=CH₂COOH) und **P41** (R₂=R₃=CH(CH₃)COOH) entstehen.

Synthese der modifizierten Ara h 2-Sequenzen

Nachdem anhand der Pentapeptide gezeigt worden war, dass mit den Bausteinen **1** und **2** CML- bzw. CEL-Peptide aufgebaut werden konnten, wurden die lysinhaltigen Abschnitte von Ara h 2 in Form der CML-/CEL-modifizierten Pentadecapeptide **P8** bis **P11** analog hergestellt (**Tab. 2-2-3**, Kapitel 2.2). Im Fall der Peptide **P8** und **P9** wurden in den Rohprodukten wie beim unmodifizierten Peptid größere Anteile an Auslassungspeptiden, nachgewiesen, bei denen der Arginin-Rest an Position 3 fehlte. Die Peptide **P10** und **P11** wurden hingegen in großer Reinheit (77 % bzw. 84 %) erhalten.

Parallel zu den Synthesen mittels der *building blocks* wurde versucht, eine der CEL-modifizierten Sequenzen auch über die Strategie der Carboxyethylierung von orthogonal geschützten Lysin-Resten an fester Phase zu synthetisieren. Dies wurde am Peptid LQGRQQEQQF-CEL-RELRNL (**P11**) erprobt. Hierzu wurde am Synthesizer Boc-LQ(Trt)GR(Pbf)Q(Trt)Q(Trt)E(O^tBu)Q(Trt)Q(Trt)F-Lys(ivDde)-R(Pbf)E(O^tBu)LR(Pbf)-N(Trt)L-WANG-Harz aufgebaut. Anschließend wurde die ivDde-Schutzgruppe mit Hydrazin entfernt und die nun freie Aminfunktion mit Brenztraubensäure, Natriumcyanoborhydrid und DIPEA alkyliert. Nach Aufarbeitung fanden sich als Hauptprodukte das nicht-modifizierte Peptid LQGRQQEQQF-Lys-RELRNL (**P7**) und das gewünschte Produkt LQGRQQEQQF-

CEL-RELRNL (**P11**). Insgesamt war somit gezeigt, dass diese Strategie prinzipiell auch auf größere Peptide anwendbar ist.

2.3.3 Synthese N-terminal modifizierter Peptide

Für Untersuchungen zur immunologischen Aktivität des N-Terminus von Ara h 2 war es notwendig, Peptide mit N-terminalen Modifizierungen zu synthetisieren. Die chemische Darstellung derartiger Peptide gestaltet sich an der festen Phase besonders einfach, da nach Aufbau der Sequenz an WANG-Harz alle funktionellen Gruppen des Peptides bis auf den N-Terminus geschützt vorliegen und letzterer somit selektiv manipuliert werden kann.

Ein möglicher Syntheseweg zu *N*-Carboxy(m)ethyl-Peptiden wurde zuerst an einem kleinen Tripeptid erprobt. Hierzu wurde am Synthesizer Leu-Gly-Ala-WANG-Harz aufgebaut. Eine Probespaltung lieferte Leu-Gly-Ala (**P42**) quantitativ und sauber. Wurde Leu-Gly-Ala-WANG-Harz mit Glyoxylsäure-*tert.*-butylester und Natriumcyanoborhydrid alkyliert, so konnte nach Spaltung unter Standardbedingungen *N*-Carboxymethyl-Leu-Gly-Ala (**P43**) in einer Reinheit von ca. 90 % erhalten werden. Glyoxylsäure-*tert.*-butylester wurde verwendet, um die bereits bekannte Mehrfachalkylierung zu unterdrücken, welche bei der Carboxymethylierung mit Glyoxylsäure auftritt. Die Verwendung von Brenztraubensäure zur Alkylierung führte zu *N*-Carboxyethyl-Leu-Gly-Ala (**P44**) in 74 % Reinheit als Diastereomerenpaar (**Abb. 2-3-7**). Die Diastereomeren konnten in diesem Fall mittels HPLC getrennt werden.

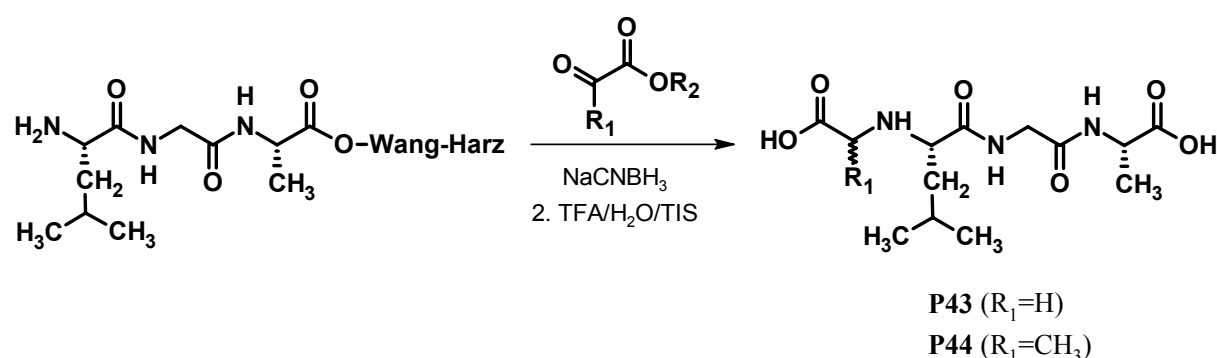


Abb. 2-3-7: Synthese der Peptide CM-Leu-Gly-Ala (**P43**) und CE-Leu-Gly-Ala (**P44**) durch reduktive Alkylierung von Leu-Gly-Ala-WANG-Harz mit Glyoxylsäure-*tert.*-butylester ($R_1=H$, $R_2=^tBu$) bzw. Brenztraubensäure ($R_1=CH_3$, $R_2=H$).

Alle Peptide wurden mittels HPLC aufgereinigt und mit LC-MS und LC-MS/MS im ESI-Modus sowie 1H -NMR charakterisiert. **Abb. 2-3-8** zeigt die 1H -NMR-Spektren von **P42**, **P43**

und **P44**. Die Pfeile zeigen auf die zusätzlichen Signale, die durch die Protonen der N-terminalen Modifizierungen erzeugt werden.

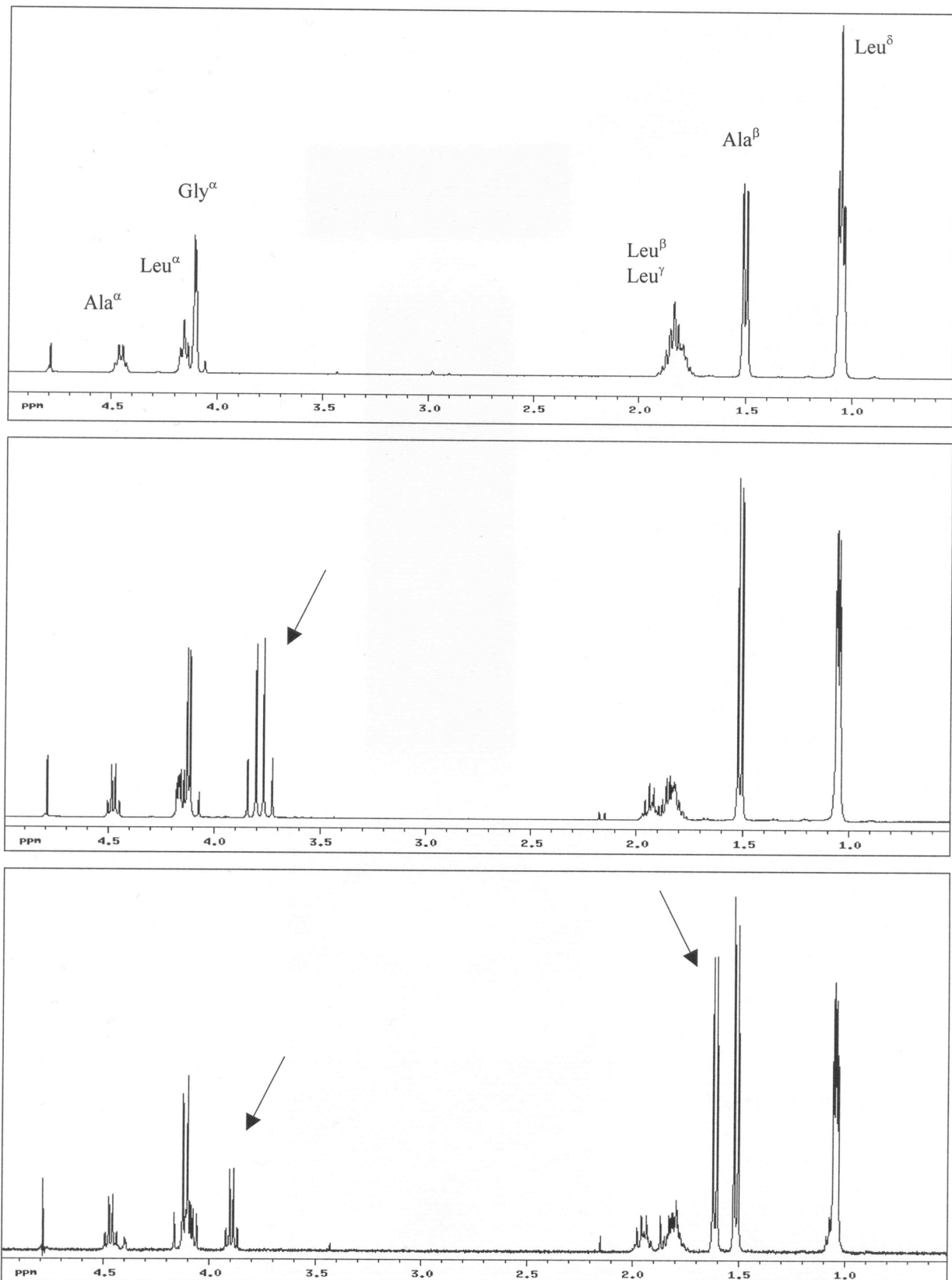


Abb. 2-3-8: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Peptide Leu-Gly-Ala (**P42**, oben), CM-Leu-Gly-Ala (**P43**, Mitte) und CE-Leu-Gly-Ala (**P44**, unten). Die Pfeile verweisen auf die zusätzlichen Signale, die durch die Alkylierungen am N-Terminus erzeugt werden.

Beim Peptid **P43** erkennt man bei ca. 3,8 ppm das zusätzlichen Doppeldublett der diastereotopen Methylenprotonen. Bei Peptid **P44** (ein Diastereomer) fällt ein koppelndes Paar von Dublett und Quartett bei 1,6 ppm bzw. 3,9 ppm mit einem Flächenverhältnis von 3:1 auf, welches von der Carboxyethylgruppe hervorgerufen wird.

Analog zu den modifizierten Tripeptiden wurden die Peptide CM-RQQWELQGDRRCQSQL (**P13**) und CE-RQQWELQGDRRCQSQL (**P14**) als mögliche AGE-Modifikationen der N-terminalen Sequenz **P12** in guten Ausbeuten synthetisiert. Hierzu wurde zunächst R(Pbf)Q(Trt)Q(Trt)WE(O^tBu)LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)C(Trt)Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)L-WANG-Harz am Synthesizer aufgebaut und der N-Terminus wie oben beschrieben alkyliert. Abspaltung vom Harz lieferte **P13** in 69 % Ausbeute und **P14** in 64 % Ausbeute. Beide Peptide wurden dann mittels HPLC aufgereinigt.

2.3.4 Synthese von Dehydroalanin- und Lanthionin-Peptiden

Zur Synthese von Dehydroalanin-Peptiden werden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. Diese lassen jedoch nur Synthesen von sehr kleinen Peptiden in Lösung zu (Burrage *et al.*, 1998) oder benötigen sehr teure und zudem hoch toxische Ausgangsverbindungen auf Selenocysteinbasis (Okeley *et al.*, 2000). Ausgehend von den Arbeiten von Burrage *et al.* (1998) und Yamada *et al.* (1998) sollte eine einfache und kostengünstige Festphasensynthese für Dha-Peptide entworfen werden. Diese soll an der kurzen Modellsequenz Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**) verdeutlicht werden. Zunächst wurde die gewünschte Sequenz mittels Standard-Fmoc/O^tBu-Strategie an WANG-Harz aufgebaut. An Position 3, die später die Dha-Einheit tragen soll, wurde mit dem kommerziell erhältlichen Baustein Fmoc-Cys(Bzl)-OH (**7**) ein *S*-benzylgeschützter Cystein-Rest eingeführt (**Abb. 2-3-9**).

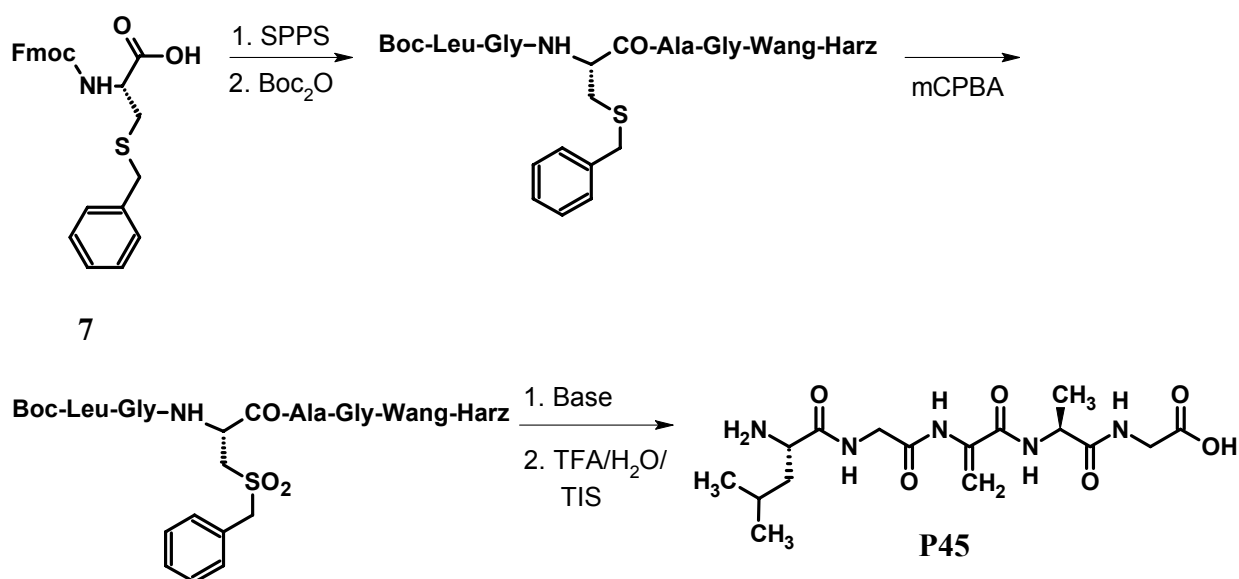


Abb. 2-3-9: Synthese des dehydroalaninhaltigen Pentapeptides Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**).

Nach Blockierung des N-Terminus mit der Boc-Schutzgruppe sollte das *S*-Benzylcystein-Peptid am Harz mit einer äquivalenten Menge an *m*-Chlorperbenzoesäure in DCM in das entsprechende Sulfoxid überführt werden. Eine Probespaltung zeigte jedoch, dass diese Oxidation nicht quantitativ abgelaufen war. Neben dem gewünschten Sulfoxid-Peptid fanden sich auch erhebliche Mengen an überoxidiertem Sulfon und nicht umgesetztem *S*-Benzylcystein-Peptid. **Abb. 2-3-10** zeigt die HPLC-Trennung des Gemisches. Man erkennt,

dass sich das Diastereomerenpaar des Sulfoxid-Peptides antrennen lässt. Ferner finden sich Reste an *m*-Chlorbenzoesäure ($R_t = 50$ min), da diese in DCM unlöslich ist und während der Reaktion in die Harzkügelchen eingelagert wurde.

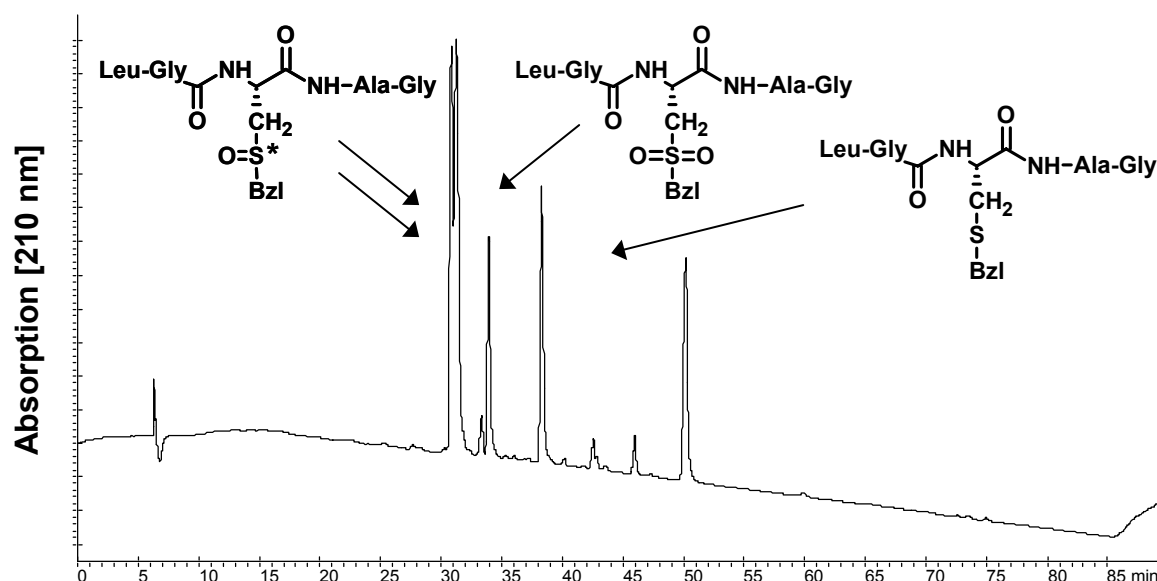


Abb. 2-3-10: HPLC-Trennung einer Probespaltung vom oxidierten Cys(Bzl)-Peptid.

Aus der Literatur geht hervor, dass sowohl *S*-Alkylcystein-*S*-oxid-Derivate als auch analoge Sulfone eine basenkatalysierte Eliminationsreaktion zum Dha-Derivaten eingehen würden (Kelly-Basetti *et al.*, 1994; Gosselin *et al.*, 1996). Allerdings wäre dann das entstandene Dha-Peptid mit dem nichtoxidierten *S*-Benzylcystein-Peptid verunreinigt. Daher wurde in einem zweiten Ansatz das harzgebundene *S*-Benzylcystein-Peptid mit 2,1 Äquivalenten *m*CPBA komplett zum Sulfon oxidiert und die Waschprozeduren intensiviert, um die *m*-Chlorbenzoesäure möglichst vollständig aus dem Harz zu entfernen. Eine Probespaltung lieferte nun Leu-Gly-CysO₂(Bzl)-Ala-Gly quantitativ und sauber. Durch Behandlung des Harzes mit einer sterisch gehinderten, nichtnukleophilen Base (Kalium-*tert.*-butylat bzw. DBU in THF) bildete sich ein festphasengebundenes Dha-Peptid, welches die finale Spaltung vom Harz mit TFA/H₂O/TIS unzersetzt überstand.

Eine HPLC-Analyse der Rohprodukte zeigte, dass der Eliminationsschritt in beiden Fällen nicht vollständig abgelaufen war. Im Fall von Kalium-*tert.*-butylat als Base fanden sich 50 % Leu-Gly-Dha-Ala-Gly im Rohpeptid, im Fall von DBU nur 37 %. Die Rohpeptide waren jedoch nur mit dem entsprechenden *S*-Benzylcysteinsulfon-Peptid verunreinigt. Somit war ein einfacher Zugang zu Dha-Peptiden erarbeitet worden. Die unvollständige Elimination bereitete keine Probleme, da das Dha-Peptid vom nicht umgesetzten *S*-Benzylcysteinsulfon-

Peptid aufgrund des großen Polaritätsunterschiedes mittels RP-HPLC einfach abgetrennt werden konnte (Abb. 2-3-11).

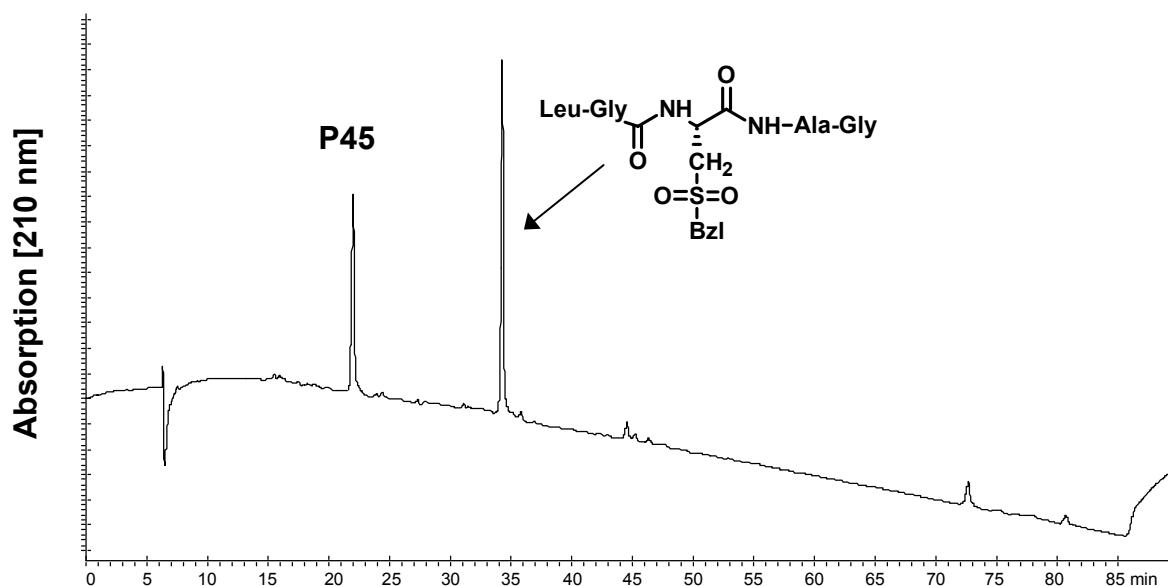


Abb. 2-3-11: HPLC-Trennung von rohem Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**, $R_t=22$ min) nach der Eliminationsreaktion mit DBU. Es verbleiben Reste der Vorstufe Leu-Gly-CysO₂(Bzl)-Ala-Gly ($R_t=34$ min).

Nach HPLC-Isolierung wurde das Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly mittels LC-MS(ESI), LC-MS/MS(ESI) sowie ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, COSY-, HMBC- und HMQC-Experimenten in der Struktur bestätigt. Dabei wurde festgestellt, dass sich auch Dehydroalanin bei der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung wie eine Standard-Aminosäure verhält (Abb. 2-3-12).

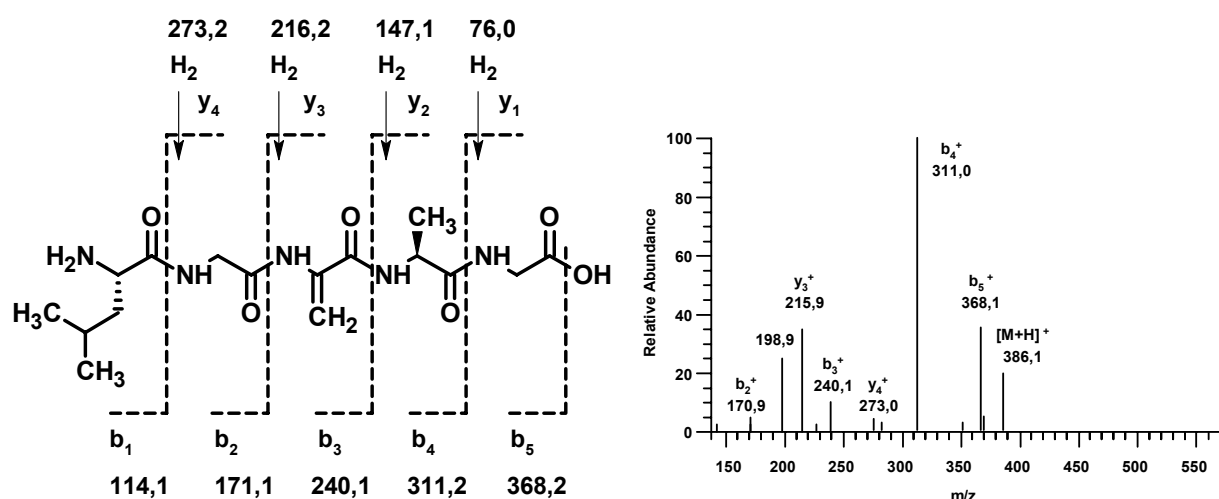


Abb. 2-3-12: Theoretisches Fragmentierungsschema (links) und gemessenes ESI-MS²-Spektrum (rechts) des Pseudomoleküliions $[M+H]^+$ von Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**).

Es war nun beabsichtigt, Peptide mit den vom Dha abgeleiteten Aminosäuren Lanthionin und Lysinalanin zu synthetisieren. Dies könnte sowohl in Lösung mit dem Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly als auch an fester Phase ausgehend von Boc-Leu-Gly-Dha-Ala-Gly-WANG-Harz durch Addition der Thiofunktion von Cystein bzw. der N^ϵ -Aminogruppe von Lysin erfolgen. Hierbei wurde der Reaktion an fester Phase der Vorzug gegeben, da in diesem Fall alle anderen funktionellen Gruppen des Peptides geschützt vorliegen und somit die Gefahr unbeabsichtigter Nebenreaktionen minimiert sein sollte. Da die Reaktion in einem organischen Lösungsmittel ablaufen muss, schieden die freien Aminosäuren Cystein und Lysin als Reaktionspartner aus Löslichkeitsgründen aus. Ferner bestand die Gefahr, dass auch die N^α -Aminogruppe der Aminosäuren an das Dha-Peptid addieren. Daher wurden die partiell geschützten Derivate *N*-Acetylcysteinmethylester (**8**) bzw. *N* ^{α} -Acetyllysinmethylester (**9**) mit dem Dha-Peptidylharz in THF zur Reaktion gebracht (**Abb. 2-3-13**). Nachfolgende Abspaltung mit TFA/H₂O/TIS lieferte so Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P46**, 35 % Ausbeute) bzw. Leu-Gly-Lal(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P47**, 10 % Ausbeute) jeweils als Diastereomerenmischung. Beide Peptide wurden nach HPLC-Aufreinigung durch LC-MS(ESI), LC-MS/MS(ESI) und NMR charakterisiert. Bei den ESI-MS²-Experimenten wurde festgestellt, dass sich die geschützten Lan- bzw. Lal-Elemente wie Standard-Aminosäuren verhalten und keine Fragmentierung in den Seitenketten aufweisen.

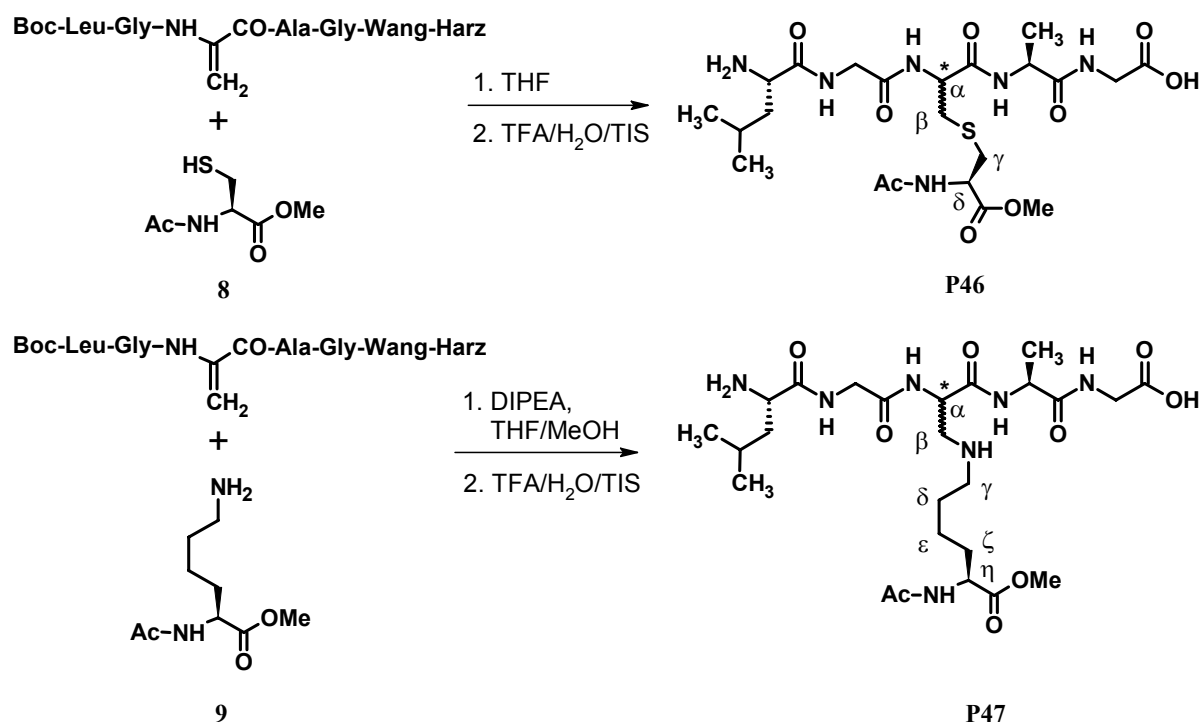


Abb. 2-3-13: Festphasensynthese von Pentapeptiden, die ein Lan- oder Lal-Strukturelement enthalten, durch nukleophile Addition von Ac-Cys-OMe (**8**) bzw. Ac-Lys-OMe (**9**) an ein Dha-Peptidylharz.

Im ^1H -NMR-Spektrum von Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**) erkennt man die Signale zweier nichtkoppelnden Protonen bei 5,6 und 6,0 ppm, welche den Methylenprotonen des Dehydroalanins entsprechen. Dies konnte aus einem Vergleichspektrum der kommerziell erhältlichen Verbindung *N*-Acetyldehydroalaninmethylester geschlossen werden. Im Spektrum von Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P46**) fallen zunächst zwei intensive Singulets bei 2,1 und 3,9 ppm auf. Diese entsprechen den Methylprotonen der Acetylgruppe bzw. des Methylesters aus der Seitenkette des geschützten Lanthionin-Restes. Zwischen 4,1 und 4,3 ppm erscheinen zwei Multipletts, die den Methinprotonen in α - und δ -Position von Lanthionin zuzuordnen sind. Da die Messung mit HDO-Unterdrückung erfolgte und die Signale in der Nähe des HDO-Restsignales liegen, entsprechen die Flächenintegrale nicht genau dem theoretischen Wert von eins. Zwischen 3,0 und 3,3 ppm befindet sich ein komplexes Signal, welches von den übrigen Lanthionin-Protonen hervorgerufen wird. Die Komplexität wird zum einen durch die Diastereotopie der β - und γ -Protonen, zum anderen durch die Verwendung eines Diastereomergemisches für die Messung hervorgerufen. Letzteres entsteht zwangsläufig bei der Reaktion des Dha-Peptides mit der Thiofunktion von **8**, da zwei Peptide mit *R*- bzw. *S*-Konfiguration am Lan^α -Kohlenstoff gebildet werden. Im Spektrum von Leu-Gly-Lal(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P47**) dominieren ebenfalls die intensive Singulets der Acetylgruppe bzw. des Methylesters bei 2,1 und 3,9 ppm. In dem für α -Methinprotonen von Aminosäuren typischen Fenster von 4 bis 5 ppm erscheinen die α - und η -Lal-Protonen, die teilweise vom Ala^α -Signal überdeckt sind. Zwischen 3,2 und 3,7 ppm erscheinen die β - und γ -Protonen von Lysinoalanin, da diese zur sekundären Aminofunktion von Lysinoalanin benachbart sind und dadurch einem gewissen Elektronenzug ausgesetzt sind. Die übrigen Protonen aus der Kohlenwasserstoffseitenkette von Lysinoalanin sind demgegenüber hochfeldverschoben und tauchen in dem für die Seitenkettenprotonen von Leucin und Alanin typischen Bereich von 1,5 bis 2,0 ppm auf.

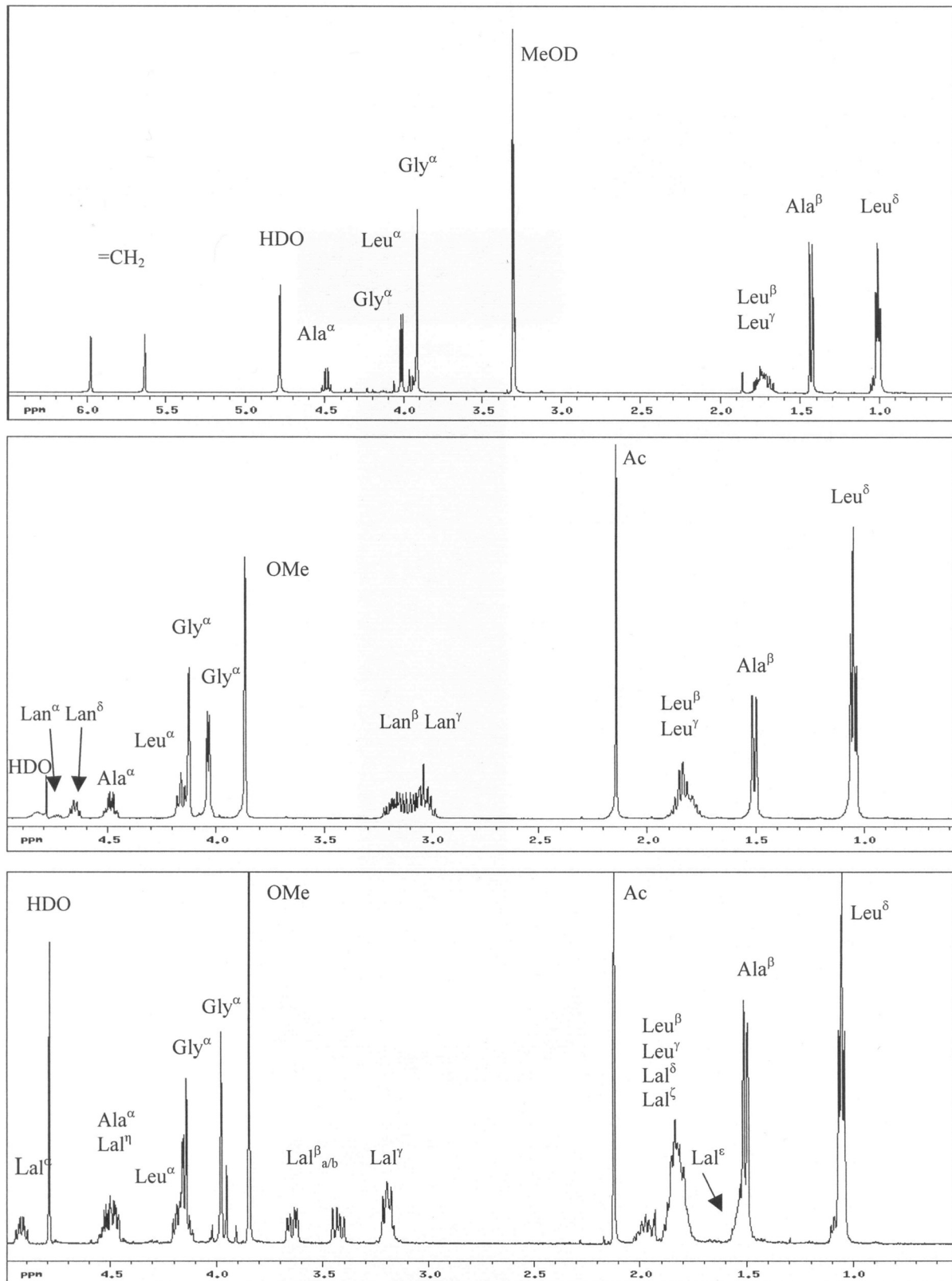


Abb. 2-3-14: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) der Peptide Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**, oben, CD_3OD), Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P46**, Mitte, D_2O) und Leu-Gly-Lal(Ac)(OMe)-Ala-Gly (**P47**, unten, D_2O). Die Nomenklatur der Aminosäuren mit griechischen Buchstaben ist aus **Abb. 2-3-13** ersichtlich.

Im Falle des Epitops 3 (**P3**) war auf die gezeigte Weise die Synthese von Varianten mit Dha (**P18**) bzw. einem Lanthionin-Strukturelement (**P19**) möglich. Hierzu wurde zuerst die Sequenz Boc-LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)-Cys(Bzl)-Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)LE(O^tBu)R(Pbf)-AN(Trt)-WANG-Harz aufgebaut, mit mCPBA zum Sulfon oxidiert und mit Kalium-*tert.*-butylat in THF die Elimination zum Dha-Peptid eingeleitet. Nach finaler Spaltung vom Harz fanden sich im Rohprodukt nur ca. 9 % des gesuchten Dha-Peptides **P18** neben ca. 85 % nicht umgesetztem LQGDRR-CysO₂(Bzl)-QSQLERAN. Die geringe Ausbeute kann auf sterische Effekte bei der basenkatalysierten Elimination zurückgeführt werden. Der *S*-Benzylcysteinsulfon-Rest befindet sich in der totalgeschützten Peptidform von Epitop 3 zwischen einem Arginin-Rest mit der voluminösen Pbf-Schutzgruppe und einen Glutamin-Rest mit der sterisch anspruchsvollen Trityl-Schutzgruppe. Daher ist der Angriff von Kalium-*tert.*-butylat an den ebenfalls gehinderten *S*-Benzylcysteinsulfon-Rest erschwert (**Abb. 2-3-15**).

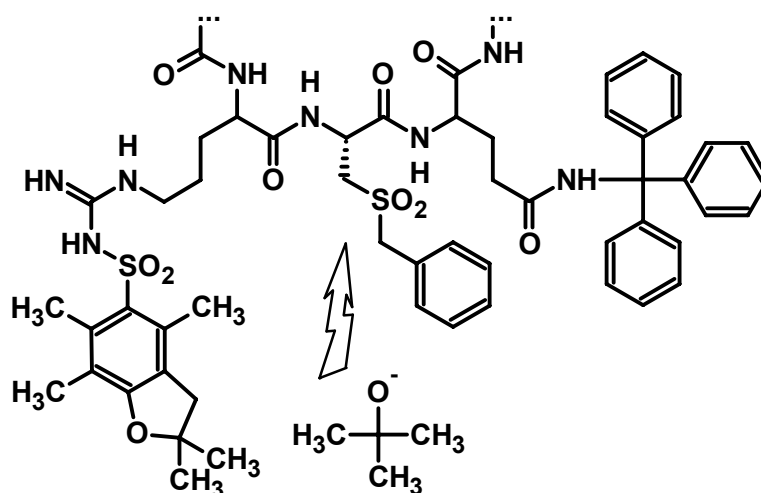


Abb. 2-3-15: Die sterische Hinderung eines *S*-Benzylcysteinsulfon-Restes durch benachbarte Pbf- und Trt-Gruppen erschwert den Angriff von Kalium-*tert.*-butylat.

Die Synthese des Lan-Peptides **P19** gelang ausgehend von Boc-LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)-Dha-Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)LE(O^tBu)R(Pbf)AN(Trt)-WANG-Harz durch Umsetzung mit *N*-Acetylcysteinmethylester (**8**) in THF und anschließende Spaltung vom Harz (**Tab. 2-3-5**).

Tab. 2-3-5: Die Sequenzen, Synthesemethoden und Ausbeuten von Epitop 3-Varianten

Bez.	Struktur	Synthese	Ausbeute nach HPLC
P3	LQGDRR-Cys-QSQLERAN	SPPS	> 70 %
P18	LQGDRR-Dha-QSQLERAN	s. Text	6 %
P19	LQGDRR-Lan (Ac) (OMe) -QSQLERAN	s. Text	15 %

Für Untersuchungen zum Epitop 7 waren drei Peptide notwendig, bei denen die drei Alanin-Reste von PYSQDPYSPSP (**P30**) einzeln gegen Dha ausgetauscht waren. Die Synthese dieser Peptide (**P31-P33**) erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Zunächst wurden Peptidylharze mit *S*-Benzylcystein-Resten aufgebaut und diese mit *m*-Chlorperbenzoesäure zu den entsprechenden Sulfonylen oxidiert. Probespaltungen und anschließende LC-MS-Analyse zeigten, dass diese Reaktionsschritte stets quantitativ erfolgten. Die Umwandlung der *S*-Benzylcysteinsulfon-Reste in Dha-Reste erfolgte durch Behandlung mit Kalium-*tert.*-butylat bzw. DBU. Nach finaler Spaltung mit TFA/H₂O/TIS fanden sich im Rohprodukt je nach Peptid und Eliminationsbedingungen bis zu 36 % Dha-Peptid (**Tab. 2-3-6**). Die Peptide wurden durch präparative HPLC von den *S*-Benzylcysteinsulfon-Peptiden sauber abgetrennt. Die **Abb. 6-4** im Anhang zeigt beispielhaft die ESI-MS-Spektren der Zwischenstufen PY-Cys(Bzl)-PSQDPYSPSPYD und PY-CysO₂(Bzl)-PSQDPYSPSPYD sowie von PY-Dha-PSQDPYSPSPYD (**P31**).

Tab. 2-3-6: Synthesebedingungen und Reaktionsumsätze der Dha-Peptidsynthesen.

Peptid	Eliminationsbedingungen	Verhältnis CysO ₂ -Peptid : Dha-Peptid im Rohprodukt
P31	2 eq DBU in DCM	84:16
P31	2 eq KO ^t Bu in THF	67:33
P32	2 eq DBU in DCM	75:25
P32	2 eq DBU in DCM	100:0
P33	2 eq KO ^t Bu in THF	89:11
P33	4 eq KO ^t Bu in THF	64:36

2.3.5 Synthese von Peptiden mit AGE-Modifikationen des Arginins

Synthese von Glarg- und CMA-Peptiden über Bausteine

Zunächst sollte analog zu den Bausteinen für die Glycosylierungsprodukte CML und CEL ein *building block* synthetisiert werden, der die Darstellung von Glarg-Peptiden durch SPPS gemäß der Fmoc/*O*^tBu-Strategie erlaubt. Als möglicher Baustein kam die Verbindung Fmoc-Glarg-OH (**10**, **Abb. 2-3-16**) in Betracht. Dabei handelt es sich um Glarg mit einer Fmoc-Gruppe an der *N*^α-Aminofunktion. Ein Schutz des Iminoimidazolidinon-Rings der Seitenkette erschien als nicht nötig, da ein Stickstoff bereits acyliert vorliegt und daher die Neigung des Ringsystems zur Reaktion mit einer aktivierten Aminosäure herabgesetzt sein sollte. Die Verbindung **10** sollte sich einfach aus Glarg und Fmoc-Cl herstellen lassen. Glarg wurde nach der Vorschrift von Glomb *et al.* (2001) durch Umsetzung von Arginin mit Glyoxal synthetisiert. Eine anschließende Umsetzung mit Fmoc-Cl nach Carpino und Han (1972) lieferte aber nicht die gewünschte Verbindung **10**, sondern das Derivat **11** mit zwei Fmoc-Gruppen. Durch NMR-Experimente konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die zweite Fmoc-Gruppe an den cyclischen oder exocyclischen Stickstoff der Seitenkette gebunden war.

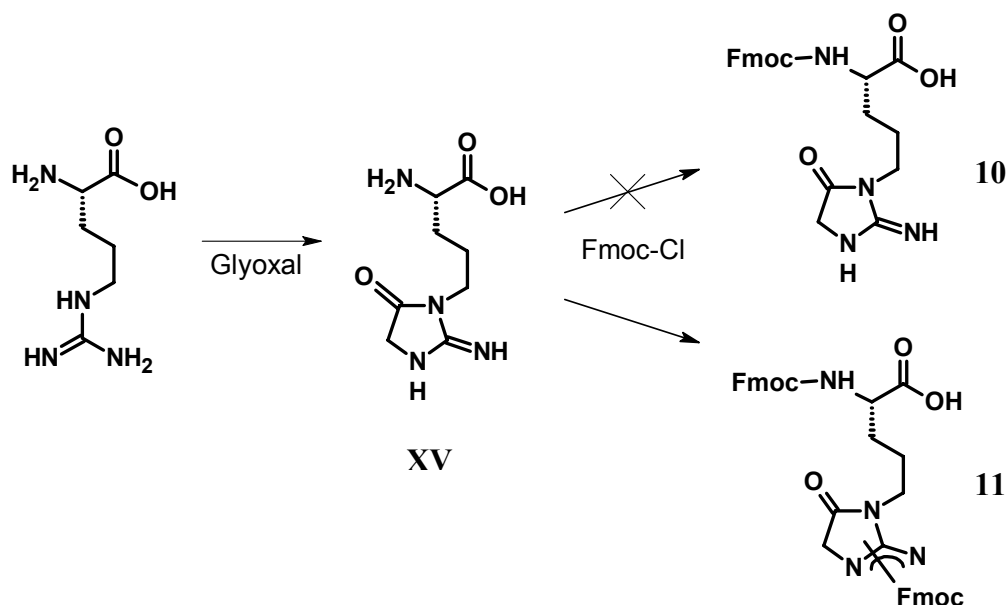


Abb. 2-3-16: Umsetzung von Arginin zu Glarg (XV) und anschließende Einführung der Fmoc-Schutzgruppe lieferte nicht die gesuchte Verbindung Fmoc-Glarg-OH (**10**) sondern das Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (**11**).

Dieser als Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (**11**) bezeichnete Baustein war höchst instabil und zersetzte sich in Lösung innerhalb weniger Stunden. Als Zersetzungsprodukte konnten u. a. Dibenzofulven und Fluorenylmethanol identifiziert werden. Dies zeigt einerseits, dass die

Seitenkette von Glarg acylierbar ist und somit die Peptidsynthese beeinflusst werden könnte. Andererseits scheinen diese Acylierungsprodukte nicht sehr stabil zu sein. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, Glarg-Peptide mit dem Baustein **11** am Synthesizer herzustellen. So konnte ein Peptid mit der kurzen Sequenz Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**) durch automatisierte SPPS unter Standardbedingungen gewonnen werden. Das isolierte Rohprodukt wies eine Reinheit von nur 57 % auf und enthielt zahlreiche Verunreinigungen, wie im HPL-Chromatogramm (**Abb. 2-3-17**) dargestellt ist. Nach massenspektrometrischer Analyse der Komponenten des komplexen Reaktionsgemisches konnten neben dem gewünschten linearen Peptid **P48** verzweigte Peptide wie **P49**, dessen Bruchstück Leu-Gly (**P50**) und das Auslassungspeptid Leu-Gly-Ala-Gly identifiziert werden (**Abb. 2-3-18**).

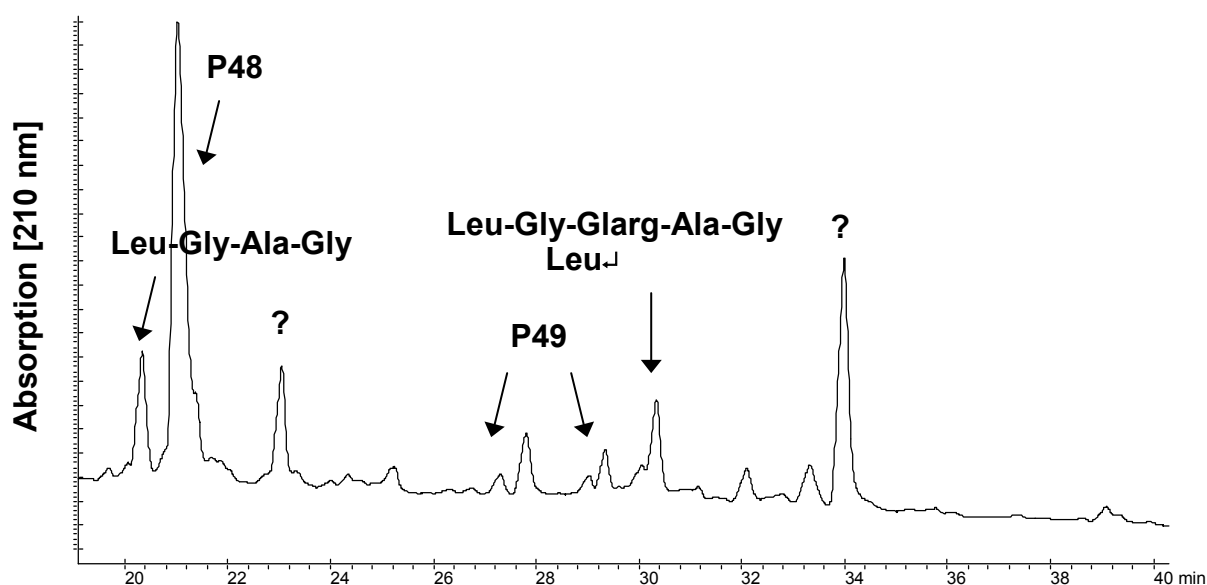


Abb. 2-3-17: HPLC-Trennung des Rohprodukts von Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**).

Abb. 2-3-18 zeigt mögliche Bildungswege dieser Nebenprodukte. Demnach entsteht das verzweigte Peptid **P49** durch wiederholte Kondensation von Glycin und Leucin an die ungeschützte Seitenkette von Glarg. Die genaue Art der Verknüpfung von Glycin an den Iminoimidazolidinon-Ring wurde nicht aufgeklärt. Da sich im HPL-Chromatogramm des Rohproduktes zwei Peaks mit identischer Masse und sehr ähnlichem EIS-MS/MS-Spektrum fanden, ist sogar davon auszugehen, dass zwei Isomere gebildet wurden. Diese verzweigten Peptide waren jedoch nicht stabil und zersetzen sich in wässriger Lösung langsam unter Abspaltung von Leu-Gly (**P50**) zum gewünschten Peptid **P48**. Der Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (**11**) war somit zur Festphasensynthese von Glarg-Peptiden nur bedingt tauglich.

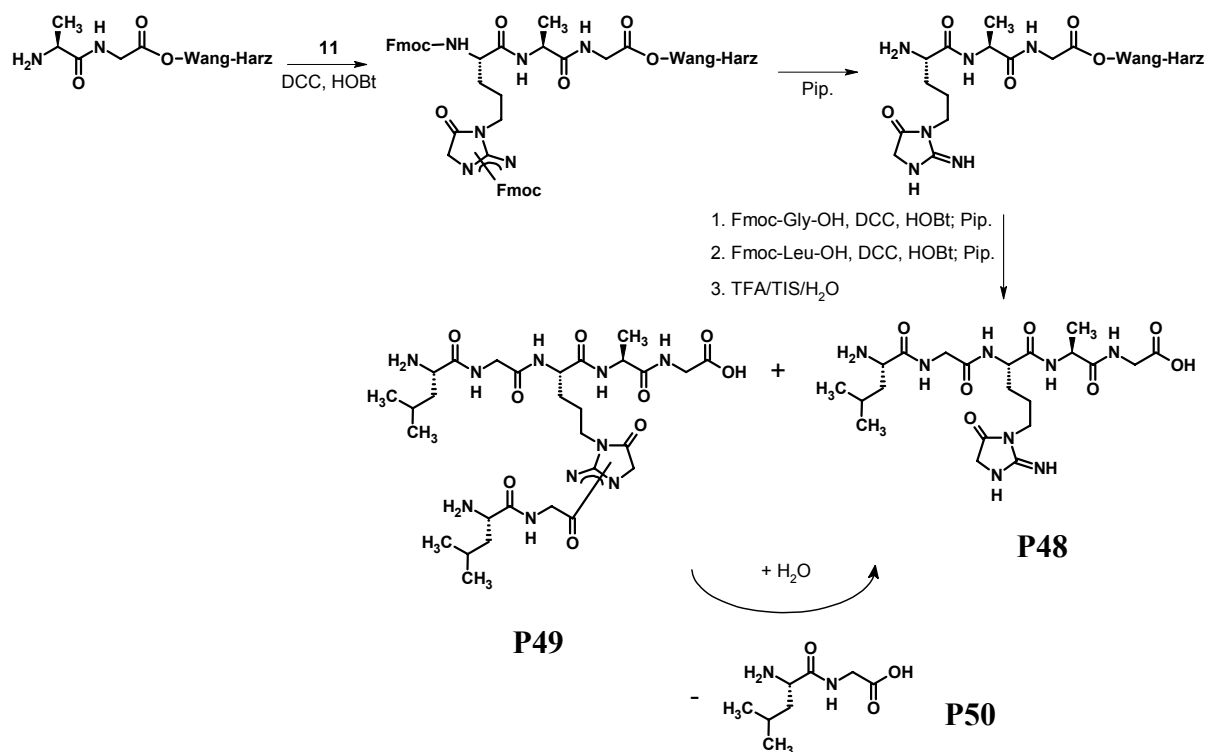


Abb. 2-3-18: Festphasensynthese von Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**) mit dem Baustein **11** und mögliche Bildungswege von Nebenprodukten (Pip. = Piperidin).

Das Peptid **P48** wurden mittels LC-MS(ESI), LC-MS/MS(ESI), ¹H-NMR und EDMAN-Abbau charakterisiert. Es zeigte sich, dass Glarg-Peptide den Regeln der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung gehorchen. Es wurde keine Fragmentierung in der Seitenkette von Glarg detektiert (**Abb. 2-3-29**). Im EDMAN-Abbau des Peptides fand sich an Position 3 eine Lücke.

Aus der Literatur war bekannt, dass Glarg in wässriger Lösung bei pH-Werten um den Neutralpunkt langsam zu Carboxymethylarginin hydrolysiert (Glomb *et al.*, 2001). Es war zu erwarten, dass dies ebenso auf Glarg-haltige Peptide zutrifft. Wurde gereinigtes Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly drei Tage in Carbonat-Puffer bei pH 8,0 inkubiert, so wandelte es sich fast quantitativ in ein Peptid mit einer um 18 u erhöhten Masse um. Die massenspektrometrische Peptidsequenzierung zeigte, dass diese Massenerhöhung an der dritten Aminosäure des Peptides stattfand und dieses somit die Struktur Leu-Gly-Xxx-Ala-Gly besitzt. Das ¹H-NMR-Spektrum des Peptides ist dem von **P48** sehr ähnlich. Die für Glarg typischen tieffeldverschobenen δ-Methylenprotonen sind jedoch um ca. 0,4 ppm hochfeldverschoben (**Abb. 2-3-20** Mitte und unten). In diesem Bereich absorbieren auch die Arg^δ-Protonen des Peptides Leu-Gly-Arg-Ala-Gly (**P52**, **Abb. 2-3-20** oben). Diese Verschiebung lag somit die Öffnung des Imidazolidinon-Rings nahe. Somit war belegt, dass aus Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**) das Carboxymethylarginin-Peptid Leu-Gly-CMA-Ala-Gly (**P51**) entstanden war (**Abb.**

2-3-19). Weiterhin lässt sich daraus folgern, dass nicht nur freies, sondern auch peptidisch gebundenes Glarg bei erhöhtem pH-Wert in Carboxymethylarginin umwandelt wird.

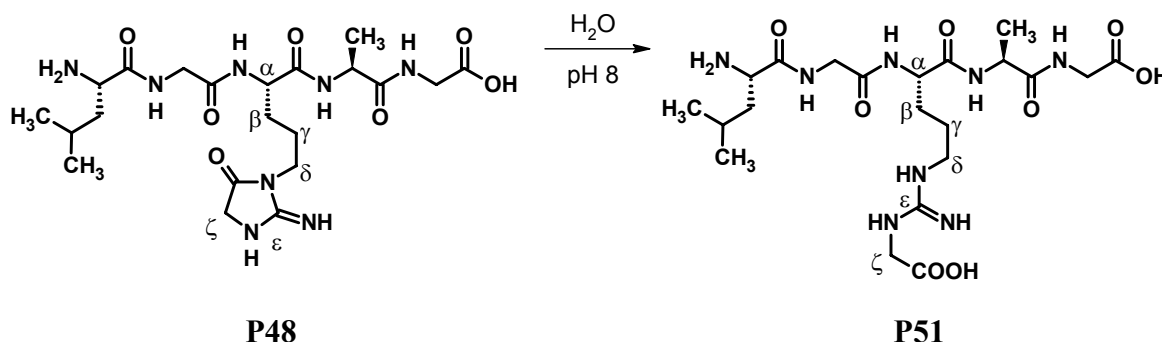


Abb. 2-3-19: Hydrolyse von Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**) zu Leu-Gly-CMA-Ala-Gly (**P51**).

Die Bildung von Nebenprodukten bei der Synthese von Glarg-Peptiden mit dem Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH lässt sich aus der Tatsache erklären, dass die funktionellen Gruppen der Glarg-Seitenkette beim Weiterbau der Peptidkette keine Schutzgruppe mehr tragen. Im Modellpeptid für das Epitop 6 (RDEDSYERDPYSPSQ) befindet sich ein N-terminaler Arginin-Rest. Soll dieser durch Glarg ersetzt werden, so sind bei der Verwendung des Bausteins **11** keine Nebenprodukte zu erwarten, da keine weitere Aminosäure an die Sequenz angefügt wird. Ein erster Versuch einer automatisierten SPPS von Glarg-DEDSYERDPYSPSQ (**P20**) schlug jedoch fehl, da sich der Baustein **11** im Synthesizer während des Aufbaus der langen Peptidsequenz zersetzte.

In einem zweiten Versuch wurde daher der Baustein **11** „von Hand“ an die Rumpfsequenz D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz angefügt, die Fmoc-Gruppen mit Piperidin entfernt und das Peptid schließlich mit TFA/H₂O/TIS vom Harz gespalten. So konnte das Peptid Glarg-DEDSYERDPYSPSQ (**P20**) auf einfache Weise mit einer Reinheit von 84 % gewonnen werden. Die Hydrolyse des Rohprodukts von **P20** in Carbonat-Puffer bei pH 8,0 lieferte das Peptid CMA-DEDSYERDPYSPSQ (**P21**) in 85 %iger Reinheit. Mittels präparativer HPLC konnten beide Pentadecapeptide aufgereinigt und in ausreichender Menge isoliert werden.

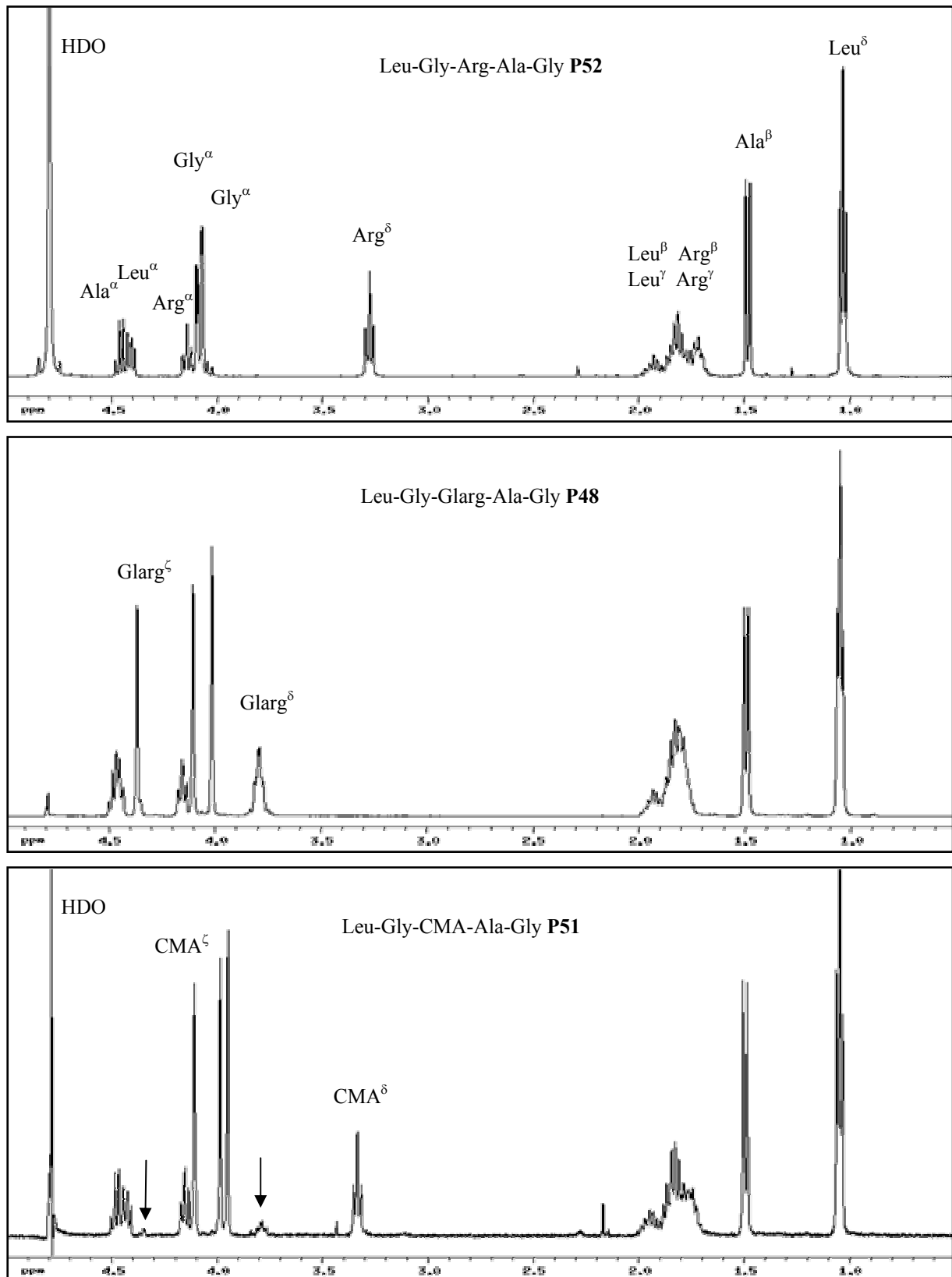


Abb. 2-3-20: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) der Peptide Leu-Gly-Arg-Ala-Gly (**P52**, oben), Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**, Mitte) und Leu-Gly-CMA-Ala-Gly (**P51**, unten). Die Nomenklatur der Aminosäuren mit griechischen Buchstaben ist aus Abb. 2-3-19 ersichtlich. Im Spektrum von **P51** erkennt man noch Reste des Glarg-Peptides **P48** (Pfeile).

Als weitere AGE-Variante des Modellpeptides RDEDSYERDPYSPSQ sollte der Arginin-Rest an Position 8 gegen Glarg bzw. CMA ausgetauscht werden. Um bei der Synthese von RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (**P22**) mit dem Baustein **11** die Bildung von Nebenprodukten weitgehend zu unterdrücken, wurde dieses Peptid durch eine sog. Segmentkondensation dargestellt. Hierzu wurde zuerst das geschützte Peptidylharz D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz automatisiert aufgebaut, der Baustein **11** „von Hand“ angefügt und die Fmoc-Gruppen entfernt, was zum Peptidylharz **12** führte. Parallel hierzu wurde das totalgeschützte Segment Boc-R(Pbf)D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)-S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)-OH (**13**) synthetisiert. Dies erfolgte durch automatisierte SPPS an säurelabilem 2-Chlortritylchlorid-Harz und abschließender Spaltung mit Hexafluorisopropanol unter Erhalt aller Schutzgruppen (Bollhagen *et al.*, 1994). Das Segment **13** stellt die N-terminale Hälfte von **P22** dar. Die Kondensation einer äquimolaren Menge von Segment **13** an Harz **12** und nachfolgender Spaltung mit TFA/H₂O/TIS lieferte das gewünschte Peptid RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (**P22**) in einer Reinheit von 18 % (**Abb. 2-3-21**). Das HPL-Chromatogramm des Rohproduktes in **Abb. 2-3-22** zeigte neben dem Zielpeptid **P22** einige weitere gut abgetrennte Signale, welche zum Teil massenspektrometrisch und mittels EDMAN-Abbau identifiziert wurden. Es handelt sich um die Peptide **P53** (das Segment **13** kondensierte an die Seitenkette von Glarg), (RDEDSYE)₂Glarg-DPYSPSQ (**P54**, das Segment **13** kondensierte sowohl an die Seitenkette als auch an den N-Terminus von Glarg), die nicht umgesetzte Rumpfsequenz Glarg-DPYSPSQ und ein unbekanntes Octapeptid der Struktur X-DPYSPSQ. Die Peptide **P53** und **P54**, bei denen die Seitenkette von Glarg acyliert worden war, zersetzten sich in wässriger Lösung rasch. Mittels präparative HPLC konnte **P22** aus der Mischung in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden.

Die Hydrolyse des Rohproduktes von **P22** in Carbonat-Puffer bei pH 8,0 lieferte das Peptid RDEDSYE-CMA-DPYSPSQ (**P23**) in 26 %iger Reinheit. Auch dieses Peptid konnte mit Hilfe der präparativen HPLC in ausreichender Menge sauber isoliert werden.

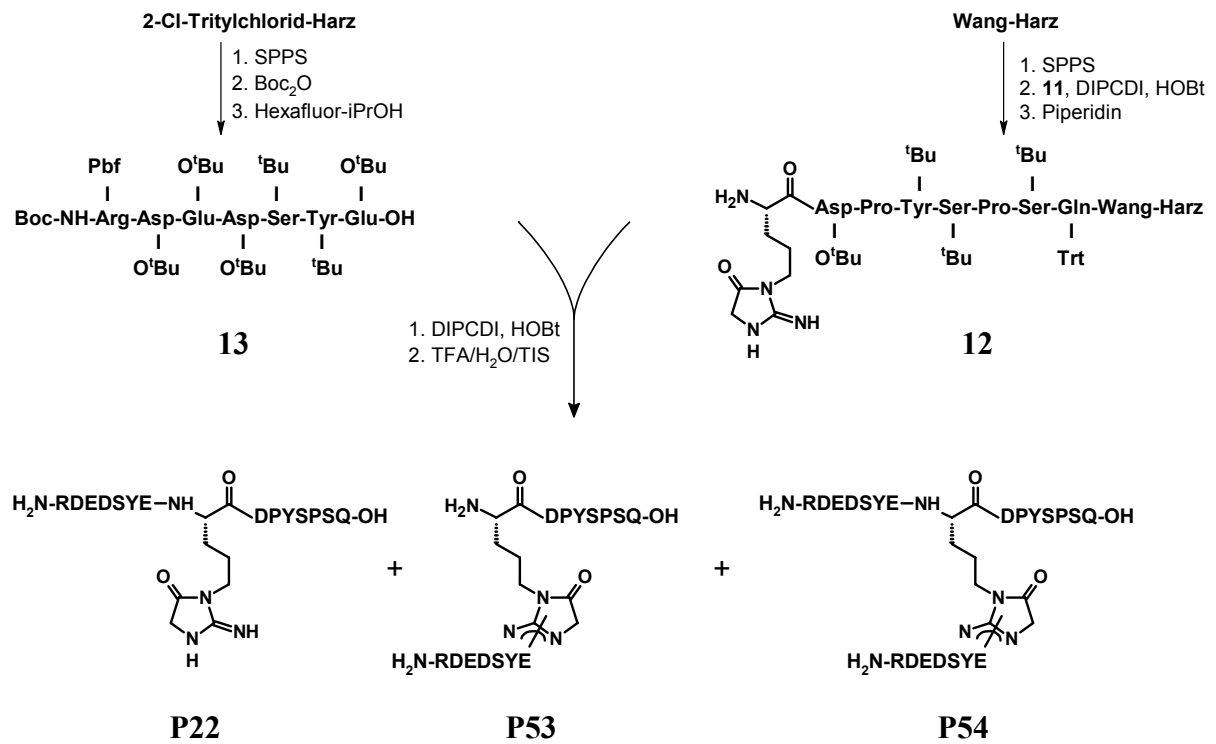


Abb. 2-3-21: Festphasensynthese von RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (**P20**) mit dem Baustein **11** durch Kondensation des totalgeschützten Segments **13** an das Rumpfarz **12**.

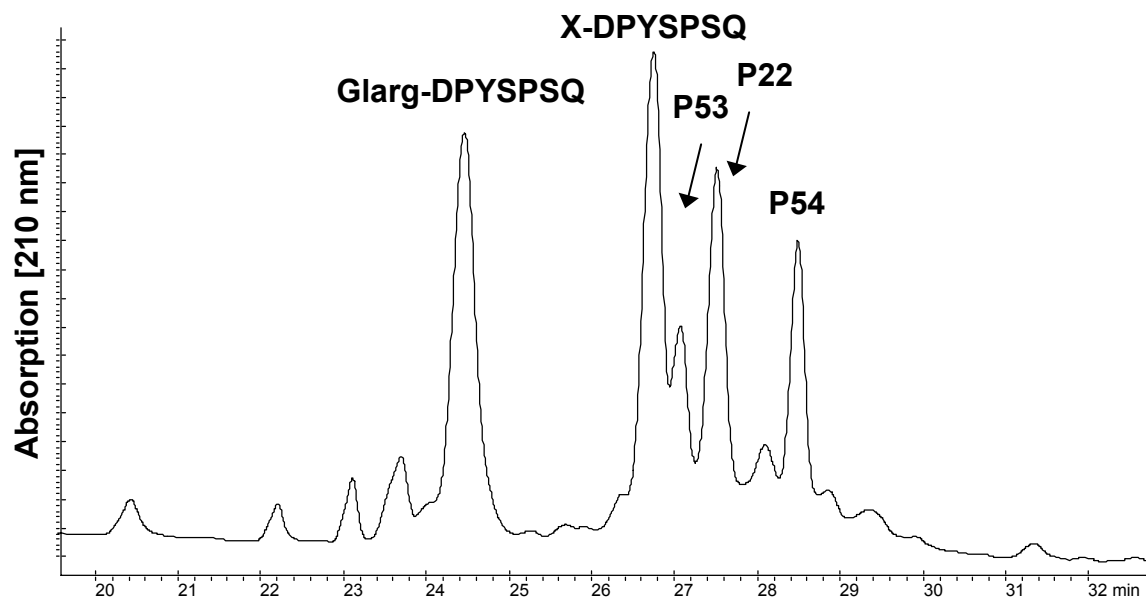


Abb. 2-3-22: HPLC-Trennung des Rohprodukts von RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (**P22**).

Alternative Synthese von Peptiden mit Glarg, CMA, MG-H3 und CEA

Da der Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH zur Synthese komplexer Glarg-Peptide nur bedingt einsetzbar war, wurde nach einer alternativen Synthesemöglichkeit für Glarg- und CMA-Peptide gesucht. Bei den AGE-Derivaten des Arginins handelt es sich um polysubstituierte Guanidine. In den letzten Jahren wurden elegante Strategien zur effizienten Synthese dieser Verbindungsklasse entwickelt. Eine gute Übersicht hierzu gibt Yet (1999). Anstatt ein Guanidin zu substituieren wird ein primäres Amin mit einem Guanylierungsreagenz in ein substituiertes Guanidin überführt. Als Reagenzien der Wahl haben sich *N,N'*-Di-Boc-S-methylisothioharnstoff (**14**; Dechantsreiter, 1998) bzw. *1H*-Pyrazol-*N,N'*-Di-Boc-carboxamidin (**15**; Bernatowicz *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993; Bernatowicz *et al.*, 1993) etabliert, welche wie in **Abb. 2-3-23** dargestellt mit primären Aminen zu geschützten Monoalkylguanidinen reagieren. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wird ein monosubstituiertes Guanidin erhalten.

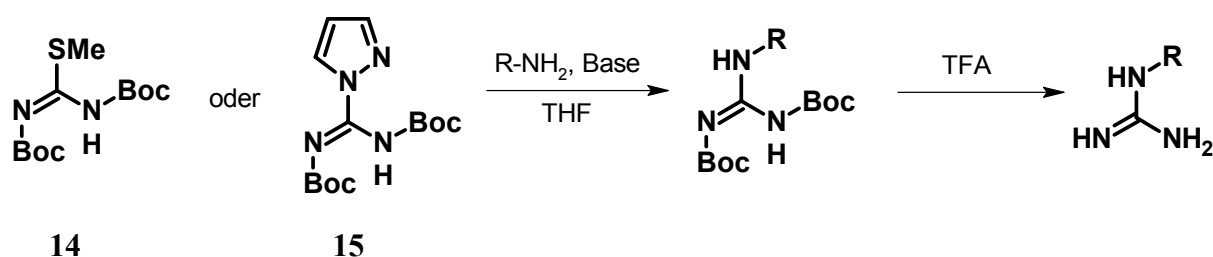


Abb. 2-3-23: Synthese von einfach-substituierten Guanidinen (nach Yet, 1999).

Mittels dieser Guanylierungsreagenzien konnten ornithinhaltige Peptide in Arginin-Peptide überführen werden (Lal und Gangopadhyay, 1996; Feichtinger *et al.*, 1998). Vor kurzem gelangen Kim *et al.* (1999) mit Hilfe einer Variante der MITSUNOBU-Reaktion die Alkylierung der Reagenzien **14** und **15**, so dass der Zugang zu polysubstituierten Guanidinen eröffnet war. Von Interesse für die Synthesen der vorliegenden Arbeit war eine spontane Cyclisierung, welche die Autoren zufällig bei der Umsetzung eines substituierten *1H*-Pyrazol-*N,N'*-di-Boc-carboxamidin mit Glycinmethylester beobachteten (**Abb. 2-3-24**).

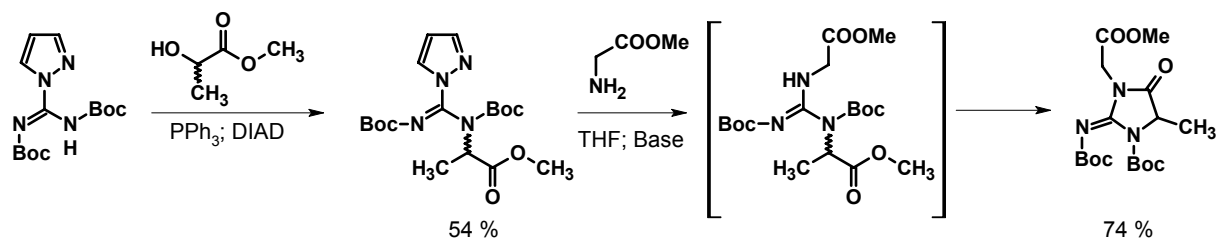


Abb. 2-3-24: Spontane Cyclisierung bei einer Guanylierungsreaktion (Kim *et al.*, 1999)

Das Endprodukt der Cyclisierungsreaktion besitzt einen substituierten Iminoimidazolidinon-Ring, wie er auch in den Seitenketten der AGE-Aminosäuren Glarg und MG-H3 vorkommt. Daher lag die Vermutung nahe, dass es mit geeigneten Guanylierungsreagenzien möglich sein sollte, Ornithin-Peptide in Glarg- bzw. MG-H3-Peptide zu überführen. Ausgehend von diesen Überlegungen wurden die in **Tab. 2-3-7** aufgeführten Guanylierungsreagenzien **16-19** durch Alkylierung von *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff mit den Methyl- und *tert.*-Butylestern von Glycolsäure bzw. L-Milchsäure synthetisiert (**Abb. 2-3-25**).

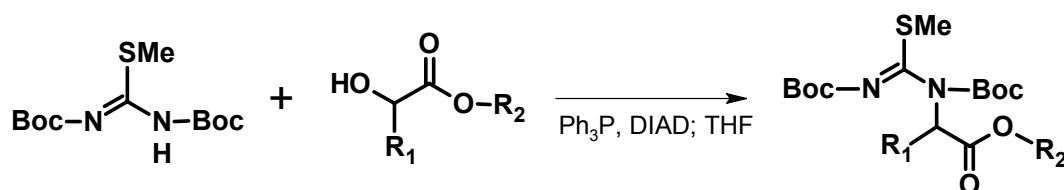


Abb. 2-3-25: Alkylierung von *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff nach Kim (1999).

Tab. 2-3-7: Ausbeuten an den Derivatisierungsreagenzien **16-19**

Verbindung	R ₁	R ₂	Bezeichnung	Ausbeute	Lit.
16	H	Me	Glarg-Reagenz	36 %	Kim <i>et al.</i> , 1999
17	H	^t Bu	CMA-Reagenz	21 %	-
18	Me	Me	MG-H3-Reagenz	26 %	Kim <i>et al.</i> , 1999
19	Me	^t Bu	CEA-Reagenz	11 %	-

Der zur Synthese von CMA-Reagenz **17** benötigte Glycolsäure-*tert.*-butylester wurde durch Umsetzung von Bromessigsäure-*tert.*-butylester mit Ameisensäure und Triethylamin zu 2-Formyloxyethansäure-*tert.*-butylester und anschließender Verseifung erhalten (Jurayj und Cushman, 1992; **Abb. 2-3-26**).

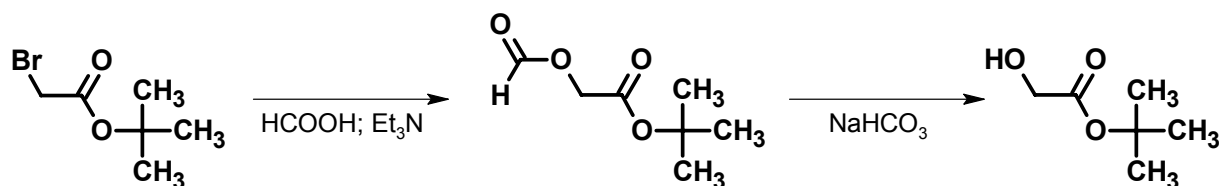


Abb. 2-3-26: Synthese von Glycolsäure-*tert.*-butylester.

Mit den Reagenzien **16-19** ließen sich ornithinhaltige Peptide an der festen Phase zu Peptiden mit AGE-Derivaten des Arginins umsetzen. Anhand der kurzen Sequenz Leu-Gly-Xxx-Ala-Gly sollen die einzelnen Syntheseschritte beschrieben werden. Zunächst wurde analog zur Synthese von Boc-Leu-Lys(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit dem orthogonalen Baustein Fmoc-Orn(Dde)-OH ein Boc-Leu-Gly-Orn(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz aufgebaut. Die folgende Umsetzung dieses Harzes mit Glarg-Reagenz **16** führte unter spontaner Cyclisierung zu einem geschützten Glarg-Peptid. Auf den üblichen Zusatz einer Base während der Guanylierungsreaktion wurde verzichtet, um einer eventuellen Öffnung des Imidazolidinon-Rings vorzubeugen. Wie in **Abb. 2-3-27** gezeigt, wurden durch Behandlung mit TFA/H₂O/TIS die Schutzgruppen entfernt und das Peptid vom Harz gespalten. Im Rohprodukt fanden sich neben 35 % nicht umgesetztem Ornithin-Peptid ca. 61 % des gewünschten Peptides Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly. Dieses entsprach in seinen chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften genau jenem Peptid, welches mittels des Bausteines Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH erhalten wurde. Bei der analogen Umsetzung von Boc-Leu-Gly-Orn(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit MG-H3-Reagenz **18** entstand das gewünschte Peptid Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**) mit einer Ausbeute von 26 %. Das Hauptprodukt war ein nicht identifizierbares Peptid der Masse 602 u.

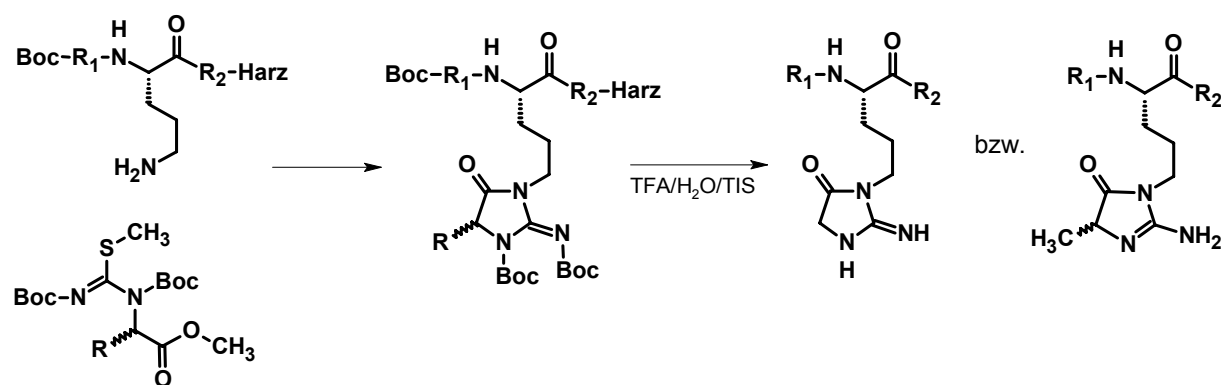


Abb. 2-3-27: Syntheschema für Peptide, die die AGE-Aminosäuren Glarg bzw. MG-H3 enthalten, mit Glarg-Reagenz (R=H) bzw. MG-H3-Reagenz (R=CH₃).

Bei Verwendung der Guanylierungsreagenzien **17** und **19**, welche anstelle einer Methylestergruppe einen *tert.*-Butylester tragen, unterblieb die Cyclisierung größtenteils (**Abb. 2-3-28**). Die Umsetzung von Boc-Leu-Gly-Orn(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit CMA-Reagenz **18** unter Basenzusatz lieferte nach Spaltung vom Harz das CMA-Peptid Leu-Gly-CMA-Ala-Gly in 47 %iger Reinheit. Im Rohprodukt fanden sich neben nicht umgesetztem Ornithin-Peptid noch ca. 5 % Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly. Letzteres entstand vermutlich durch

Cyclisierung des CMA-Peptides unter den stark sauren Bedingungen der Harzspaltung. Eine analoge Umsetzung von Boc-Leu-Gly-Orn(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit CEA-Reagenz **19** lieferte nach Aufarbeitung das CEA-Peptid Leu-Gly-CEA-Ala-Gly (**P56**) mit einem Anteil von 36 % im Rohprodukt.

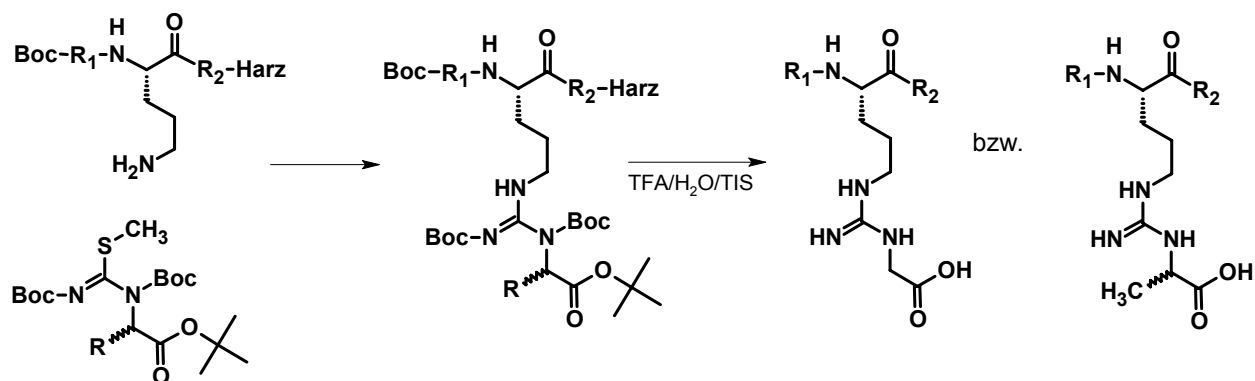


Abb. 2-3-28: Syntheschema für Peptide, die die AGE-Aminosäuren CMA bzw. CEA enthalten, mit CMA-Reagenz (R=H) bzw. CEA-Reagenz (R=CH₃).

Somit war es gelungen, Peptide mit den AGE-Derivaten Glarg, CMA, MG-H3 und CEA ausgehend von Ornithin-Peptiden zu synthetisieren. Besonders die Methoden zur Synthese von MG-H3 und CEA verdienen hierbei Beachtung, da diese Aminosäuren bisher nur präparativ aus Bräunungsansätzen von Arginin und Methylglyoxal gewonnen werden konnten (Ahmed *et al.*, 2002) und bislang keine Synthesestrategie für diese Verbindungen zur Verfügung stand. Alle AGE-Peptide wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und durch ESI-MS², ¹H-NMR-Spektroskopie und EDMAN-Abbau charakterisiert. Die AGE-Aminosäuren verhielten sich in der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung wie Standardamino-säuren: Die Peptide fragmentierten vorzugsweise an den Säureamid-Bindungen der Peptidkette und lieferten die theoretisch berechneten b- und y-Fragmentionen. In **Abb. 2-3-29** sind zwei Beispiele dargestellt. Im EDMAN-Abbau zeigten alle Peptide an Position 3 eine Lücke.

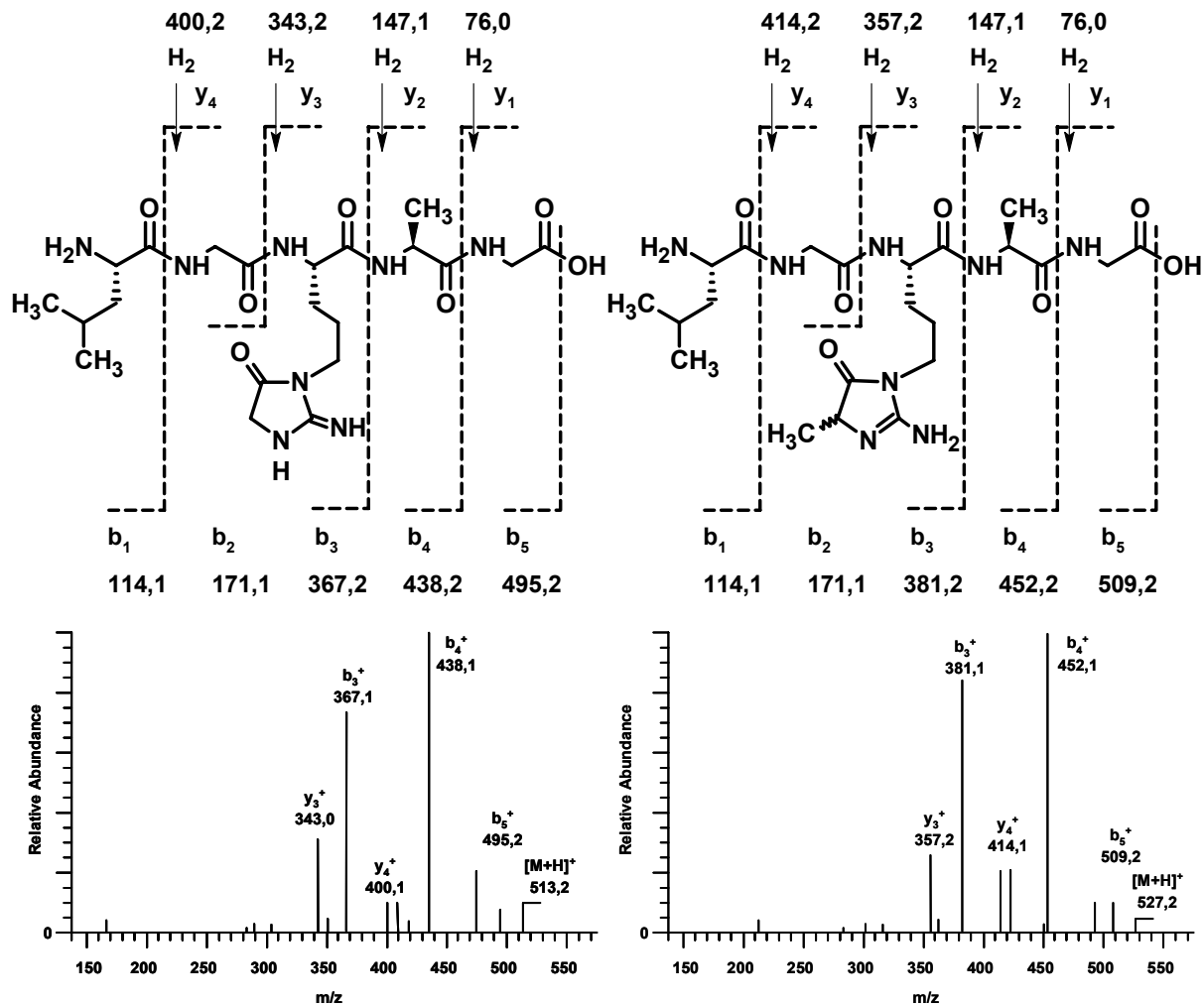


Abb. 2-3-29: Theoretische Fragmentierungsschemata und gemessene ESI-MS²-Spektren der Pseudomolekülonen $[M+H]^+$ von Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**, links) und Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**, rechts).

Ähnlich der Hydrolyse von Glarg zu Carboxymethylarginin wandelt sich auch MG-H3 in neutraler Lösung zu CEA um. Dies war auch für peptidisch gebundenes MG-H3 zu erwarten. In der Tat lagerte sich gereinigtes Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly in Carbonat-Puffer bei pH 8,0 fast quantitativ in Leu-Gly-CEA-Ala-Gly um (**Abb. 2-3-30**). Durch Vergleich der chromatographischen und spektroskopischen Charakteristika konnte die Identität des CEA-Peptides aus dem Hydrolyseansatz mit dem CEA-Peptid, welches mit Hilfe des CEA-Reagenz gewonnen wurde, gezeigt werden.

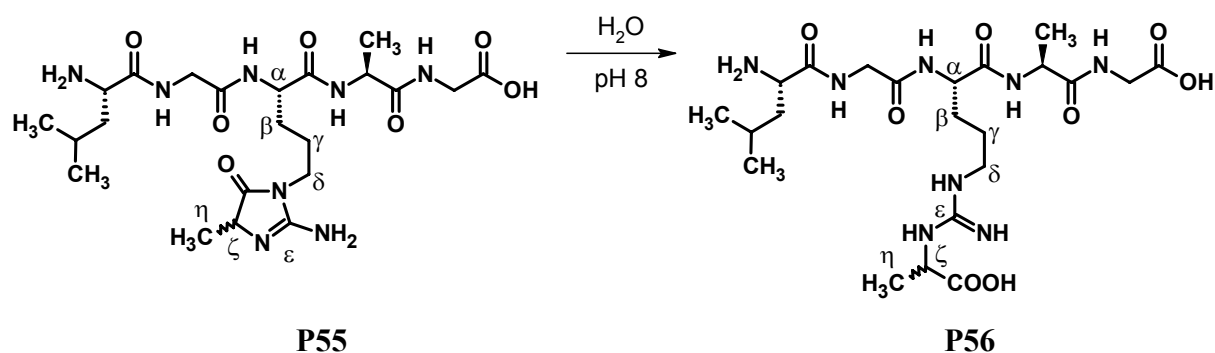


Abb. 2-3-30: Hydrolyse von Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**) zu Leu-Gly-CEA-Ala-Gly (**P56**).

Nachdem die Synthesemethoden für die AGE-Derivate des Arginins an einer kleinen Peptidsequenz hinreichend ausgetestet worden waren, konnten nun weitere Varianten des Hauptepitopes 6 synthetisiert werden. Um hierbei mögliche Schwierigkeiten mit orthogonalen Schutzgruppen zu umgehen, erschien es sinnvoll, nur den Arginin-Rest an Position 1 gegen MG-H3 bzw. CEA auszutauschen. Hierzu wurde das Harz Boc-Orn(Ø)-D(O'Bu)E(O'Bu)D(O'Bu)S('Bu)Y('Bu)E(O'Bu)R(Pbf)D(O'Bu)PY('Bu)S('Bu)PS('Bu)Q(Trt)-WANG-Harz am Synthesizer aufgebaut. In diesem Fall konnte auf die Anwendung von orthogonalen Schutzgruppen verzichtet werden, da dieses Harz mit dem „inversen“ Standard-Baustein Boc-Orn(Fmoc)-OH direkt am Synthesizer zugänglich war. Die anschließende Umsetzung mit MG-H3-Reagenz lieferte nach Aufarbeitung das gewünschte Peptid (MG-H3)-DEDSYERDPYSPSQ (**P26**). Allerdings war dieses nur zu 6 % neben viel nicht umgesetztem Ornithin-Peptid und einer unbekanntem Komponente im Rohprodukt enthalten. Aus mehreren Syntheseansätzen konnte **P26** jedoch durch sorgfältige Reinigung mittels HPLC in ausreichender Menge isoliert werden. Die Umsetzung des Ornithin-Peptidylharzes mit dem CEA-Reagenz lieferte das Peptid CEA-DEDSYERDPYSPSQ (**P27**) in ebenfalls nur geringer Ausbeute. Daher wurde ein Teil des gereinigten MG-H3-Peptides **P26** in Carbonatpuffer pH 8,0 zu **P27** umgelagert und durch HPLC gereinigt (Reaktionsumsatz ca. 80 %).

Synthese von Peptiden mit MG-H1

Einen in **Abb. 2-3-31** dargestellten Syntheseweg für die freie Aminosäure MG-H1 (**XVIII**) entwickelten Ahmed *et al.* (2002). Die Autoren setzten N^α -Boc-Ornithin mit dem Reagenz 5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on (**20**) um. Letzteres war in drei Stufen aus L-Alanin und Ammoniumthiocyanat zugänglich. Die Reaktion von N^α -Boc-Ornithin mit dem Reagenz **20** lieferte Boc-(MG-H1)-OH, von welchem sich die Boc-Schutzgruppe durch Behandlung mit TFA abspalten ließ. Ausgehend von N^α -Boc-Ornithin konnte so MG-H1 in 4 %iger Ausbeute erhalten werden.

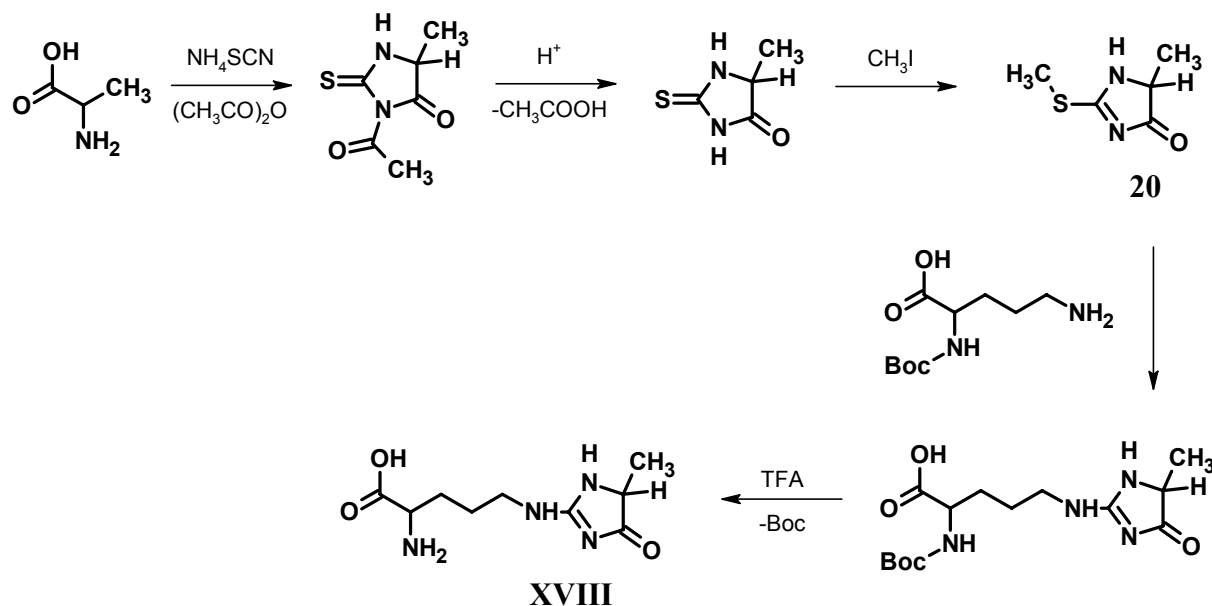


Abb. 2-3-31: Synthese der AGE-Aminosäure MG-H1 (**XVIII**) nach Ahmed *et al.* (2002).

Es sollte nun überprüft werden, ob sich mit dem Reagenz **20** auch festphasengebundene Ornithin-Peptide in MG-H1-Peptide umwandeln lassen. Es wurde erwartet, dass die finale Spaltung dieser Peptide vom Harz ohne Zersetzung von MG-H1 möglich sein sollte, da die erfolgreiche Entfernung der Boc-Schutzgruppe bei der Synthese von MG-H1 unter ähnlichen Bedingungen ablief.

Dieser Reaktionsweg wurde zunächst an der kurzen Sequenz Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly (**P57**) erprobt (**Abb. 2-3-32**). Die Umsetzung von Boc-Leu-Gly-Orn(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz mit 5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on unter Zusatz von DIPEA und nachfolgender Harzspaltung mit TFA/ H_2O /TIS lieferte ein komplexes Reaktionsgemisch aus vier Haupt- und einer Vielzahl an Nebenkomponenten. Das HPL-Chromatogramm des Rohprodukts ist in **Abb. 2-3-33** dargestellt. Das gewünschte Peptid Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-

Gly war darin neben nichtumgesetztem Leu-Gly-Orn-Ala-Gly zu 24 % enthalten und konnte mittels HPLC sauber isoliert werden.

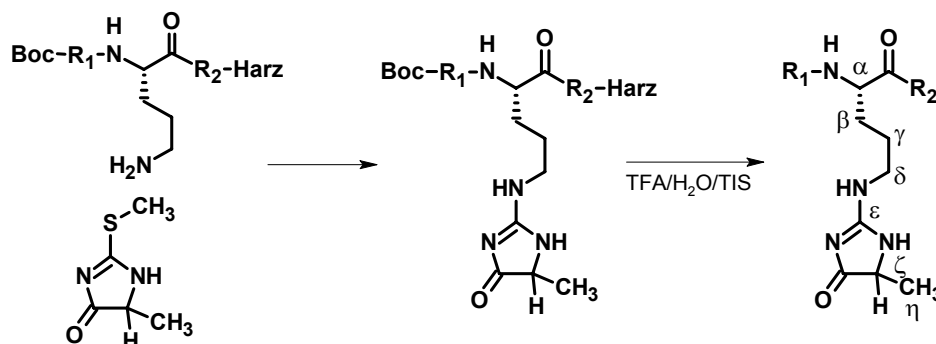


Abb. 2-3-32: Syntheschema für Peptide, die die AGE-Aminosäuren MG-H1 enthalten.

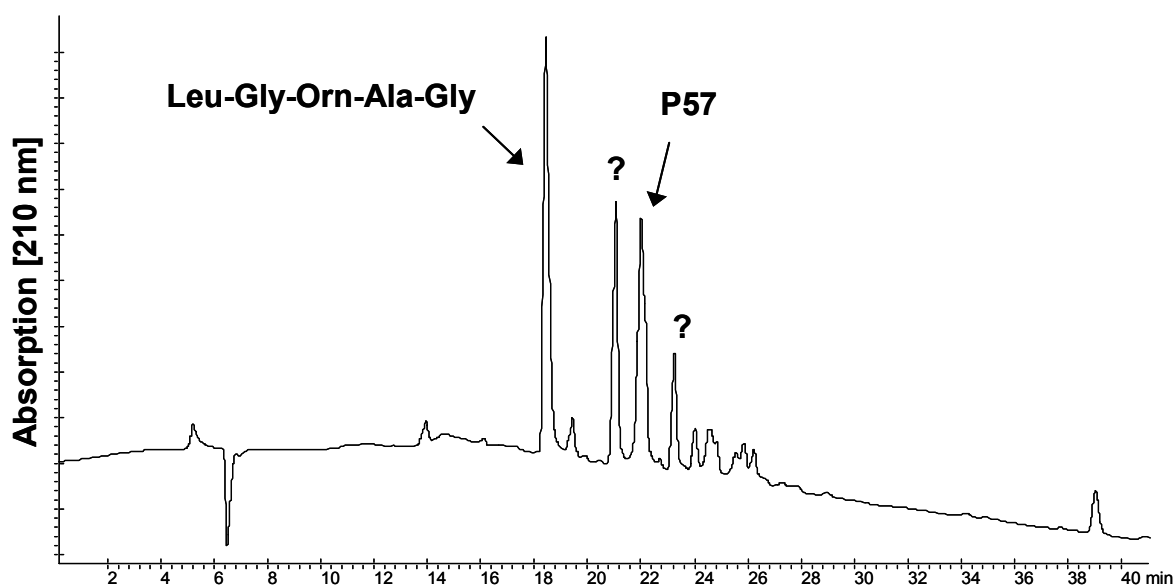


Abb. 2-3-33: HPLC-Trennung des Rohprodukts von Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly (P57).

Im Vergleich zur niedrigen Ausbeute an MG-H1 in der Synthese nach Ahmed *et al.* (2002) war dieser Gehalt an MG-H1-Peptid sehr bemerkenswert. Das Peptid zeigte ein dem isomeren Peptid Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly sehr ähnliches ESI-MS²-Spektrum, da es sich lediglich um Isomere bezüglich der Seitenkettengruppierung an Position 3 handelt. Im EDMAN-Abbau fand sich an Position 3 ebenfalls eine Lücke. Durch ¹H-NMR-Spektroskopie konnten die Isomere jedoch aufgrund der unterschiedlichen Verschiebung der δ-Protonen von MG-H1 bzw. MG-H3 unterschieden werden (Details s. S. 121).

Die Anwendbarkeit des Syntheseweges für MG-H1-Peptide auf große Peptide wurde mit dem bereits zuvor synthetisiertem Harz Boc-Orn(Ø)-D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)-Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)-D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz untersucht. Die

Umsetzung mit dem Reagenz **20** und anschließende Aufarbeitung lieferte das gewünschte Peptid (MG-H1)-DEDSYERDPYSPSQ (**P24**) in 17 %iger Reinheit neben drei weiteren Peptiden, von denen eines als nichtumgesetztes Orn-DEDSYERDPYSPSQ identifiziert werden konnte. Eine sorgfältige Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels präparativer HPLC ermöglichte die saubere Abtrennung des gesuchten AGE-Peptides in ausreichender Menge.

Synthese von Peptiden mit MG-H2

Ähnlich wie für die Aminosäure MG-H1 konnten Ahmed *et al.* (2002) das isomere AGE-Derivat MG-H2 (**XIX**) durch eine chemische Synthese selektiv darstellen. Der Syntheseweg ist in **Abb. 2-3-34** dargestellt. N^α -Boc-Ornithin wurde mit Brenztraubensäuremethylester und Natriumcyanoborhydrid zu N^α -Boc-Carboxyethylornithinmethylester umgesetzt. Durch die folgende Reaktion mit Cyanamid in Anwesenheit von Natriummethoxid wurde das sekundäre Amin zur Guanidin-Gruppe erweitert, wobei eine spontane Cyclisierung zum typischen Imidazolidinon-Ring auftrat. Die Behandlung mit TFA lieferte unter Abspaltung der Boc-Gruppe die Aminosäure MG-H2 in einer Ausbeute von 68 %.

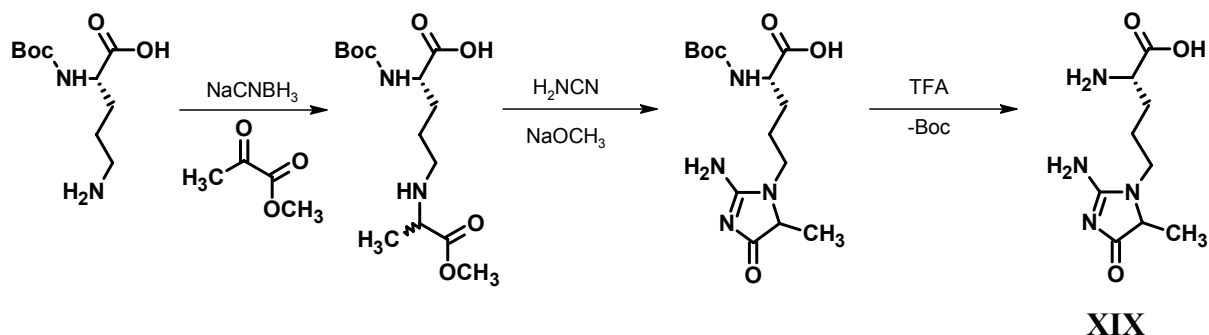


Abb. 2-3-34: Synthese der AGE-Aminosäure MG-H2 (**XIX**) nach Ahmed *et al.* (2002).

Dieser von Ahmed *et al.* aufgezeigte Syntheseweg sollte auf festphasengebundene Ornithin-Peptide übertragen werden. Wie bei allen Synthesen zuvor wurde auch hier die Synthese zuerst an einem kurzen Pentapeptid optimiert. So wurde Boc-Leu-Gly-Orn(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz mit einem Überschuss an Brenztraubensäuremethylester und Natriumcyanoborhydrid alkyliert (**Abb. 2-3-35**). Eine Probespaltung einer kleinen Harzmenge lieferte das gewünschte Carboxymethylornithinmethylester-Peptid Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly in einer Reinheit von 87 %. Im Rohprodukt fanden sich noch ca. 5 % nicht umgesetztes Leu-Gly-Orn-Ala-Gly sowie Spuren von Nebenprodukten. Eine Doppelalkylierung konnte nicht beobachtet werden. Dieser Reaktionsumsatz wurde als ausreichend betrachtet und auf eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen verzichtet.

Nachfolgend sollte nun die sekundäre Aminogruppe von Boc-Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly-WANG-Harz in eine Guanidin-Gruppe überführt werden. Die von Ahmed *et al.* (2002) angewandte Methode mit Cyanamid und Natriummethoxid führte aufgrund der stark basischen Bedingungen zur Abspaltung des Peptides vom Harz sowie zur teilweisen Zersetzung des Peptides. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich diese Guanylierung auch mit dem etablierten Reagenz *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff (**14**, **Abb. 2-3-35**) bewerkstelligen ließe (Dechantsreiter, 1998). Dabei würden zwei zusätzliche Boc-Schutzgruppen eingeführt. Diese sollte aber nicht weiter stören, da sie bei der finalen Spaltung des Peptides vom Harz ebenfalls entfernt und eine Cyclisierung nicht behindern würden. Das Boc-Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly-WANG-Harz wurde mit einem Überschuss an *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff behandelt und ein Teil des Harzes aufgearbeitet. Eine Analyse des Reaktionsgemisches mittels HPLC-ESI-MS zeigte, dass die erwartete Guanylierung des sekundären Amins nicht eingetreten war. Dafür wurde die geringe Menge an Ornithin-Peptid, welches durch unvollständige Alkylierung im vorangegangenen Syntheseschritt noch vorhanden war, quantitativ in das Arginin-Peptid Leu-Gly-Arg-Ala-Gly überführt. Das Ergebnis zeigt, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur primäre, aber nicht sekundäre Amine mit *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff reagieren. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus der Literatur, nach denen sich sekundäre Amine und Aniline mit *N,N'*-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff nur schwer oder überhaupt nicht guanylieren lassen (Yong *et al.*, 1997; Levallet *et al.*, 1997; Gibson, 2000).

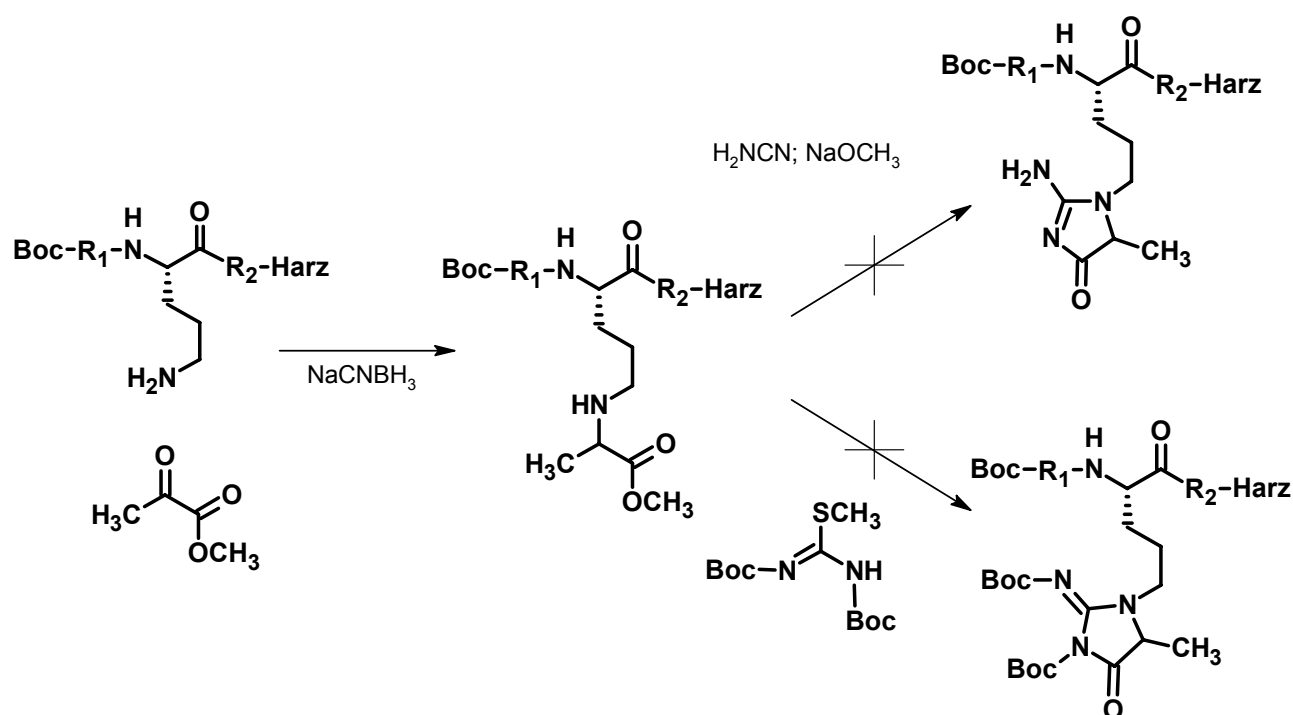


Abb. 2-3-35: Umsetzung eines Ornithin-Peptides zu einem CEO(OMe)-Peptid und erfolglose Strategien zur Guanylierung des sekundären Amins.

Die erfolgreiche Überführung sterisch gehinderter sekundärer Amine in Guanidine gelang Levallet *et al.* (1997) mit *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff (**21**) und Quecksilber(II)chlorid. Man nimmt dabei an, dass sich aus diesen Komponenten das sehr elektrophile *N,N'*-Di-Boc-carbodiimid (**22**) bildet, welches auch reaktionsträge Amine in ein Di-Boc-Guanidin überführt (**Abb. 2-3-36**). Ein Versuch, mit diesen Reagenzien Boc-Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly-WANG-Harz zu guanylieren, scheiterte jedoch ebenfalls, da als Nebenprodukt unlösliches Quecksilber(II)sulfid entstand, welches in das Harz eingelagert wurde und nicht mehr herausgelöst werden konnte. Um diese Problem zu umgehen, ersetzten Yong *et al.* (1997) Quecksilber(II)chlorid durch das MUKAYAMA-Reagenz 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (**23**, Shibamura *et al.*, 1977). Von diesem ist bekannt, dass es ebenso wie Quecksilber(II)chlorid Thioharnstoffe in Carbodiimide überführt. Die Autoren setzten auf diese Weise erfolgreich sekundäre Amine in Guanidine um, allerdings nur in Lösung. An fester Phase wurde die beschriebene Methode nur an primären Aminen erprobt. Die Synthesen erfolgten in DCM, da das MUKAYAMA-Reagenz **23** in diesem Lösungsmittel nur schwer löslich ist, und so stets nur geringe Mengen an hochreaktivem *N,N'*-Di-Boc-carbodiimid freigesetzt wurden, welche dann selektiv mit den Aminen abreagierten konnten (**Abb. 2-3-36**).

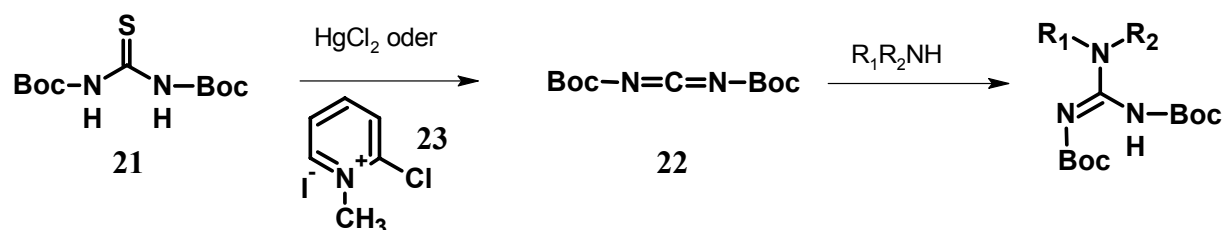


Abb. 2-3-36: Guanylierung von reaktionsträgen sekundären Aminen mit *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff über die Zwischenstufe des hochreaktiven *N,N'*-Di-Boc-carbodiimid.

Um die Eignung dieses erfolgversprechenden Verfahrens für festphasengebundene Peptide zu überprüfen, wurde zunächst versucht, Boc-Leu-Gly-Lys(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz zu guanylieren, welches eine freie primäre Aminogruppe aufweist. Die Umsetzung erfolgte analog den Literaturangaben in DCM mit *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff, MUKAYAMA-Reagenz und Triethylamin zum Abfangen des bei der Reaktion entstehenden Iodwasserstoffs (Yong *et al.*, 1997). Die Syntheseschritte sind in **Abb. 2-3-37** dargestellt. Nach Aufarbeitung des so guanylierten Peptidylharzes konnte das gewünschte Homoarginin-Peptid Leu-Gly-Har-Ala-Gly (**P58**) quantitativ und sauber isoliert werden.

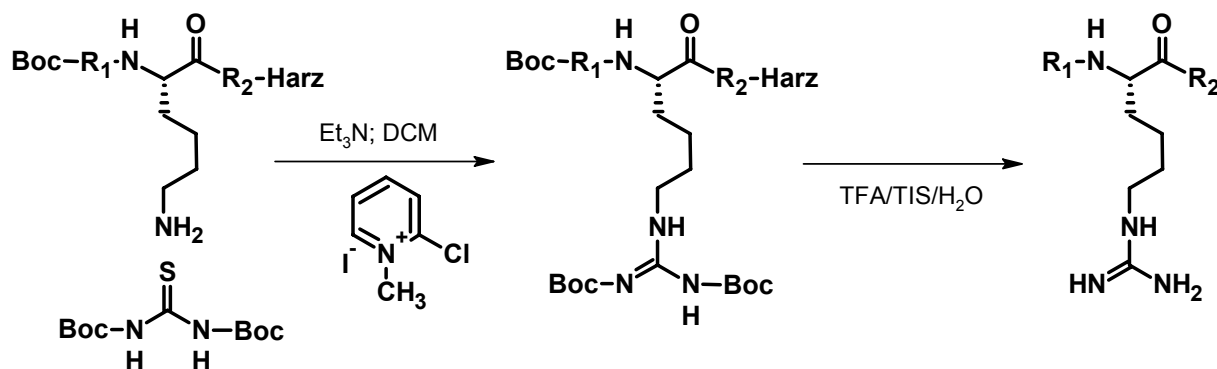


Abb. 2-3-37: Guanylierung eines selektiv entschützten Lys-Peptides mit *N,N'*-Di-Boc-thioharstoff und dem Mukayama-Reagenz zu einem Homoarginin-Peptid.

Die Struktur von **P58** konnte durch ESI-MS², ¹H-NMR und EDMAN-Abbau bestätigt werden. Im Chromatogramm des EDMAN-Abbaus von Leu-Gly-Har-Ala-Gly findet sich an Position 3 ein Peak, welcher zwischen den Signalen von PTH-Arginin und PTH-Tyrosin liegt und dem PTH-Derivat von Homoarginin entsprechen dürfte (**Abb. 6-1** im Anhang).

Somit wurde gezeigt, dass diese Methode zur Einführung einer Guanidin-Gruppe mit festphasengebundenen Peptiden verträglich ist und im Falle primärer Aminogruppen hohe Ausbeuten liefert. Analog wurde nun Boc-Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly-WANG-Harz, welches eine sekundäre Aminogruppe besitzt, guanyliert und mit TFA/ H_2O /TIS behandelt (**Abb. 2-3-38**). Bei der HPLC-Analyse des Rohprodukts zeigte sich, dass das gewünschte Peptid Leu-Gly-(MG-H2)-Ala-Gly (**P59**) zu 43 % entstanden war (**Abb. 2-3-39**). Offensichtlich war die Guanylierung des sekundären Amins sowie die anschließende Cyclisierung erfolgreich abgelaufen. Im Reaktionsgemisch fanden sich zwar einige Nebenprodukte, die aber unpolarer als das gewünschte Peptid waren und von **P59** gut abgetrennt werden konnten. Ferner enthielt die Mischung noch ca. 5 % Leu-Gly-Arg-Ala-Gly, das sehr wahrscheinlich durch Guanylierung von im Harz enthaltenem Ornithin-Peptid entstanden ist.

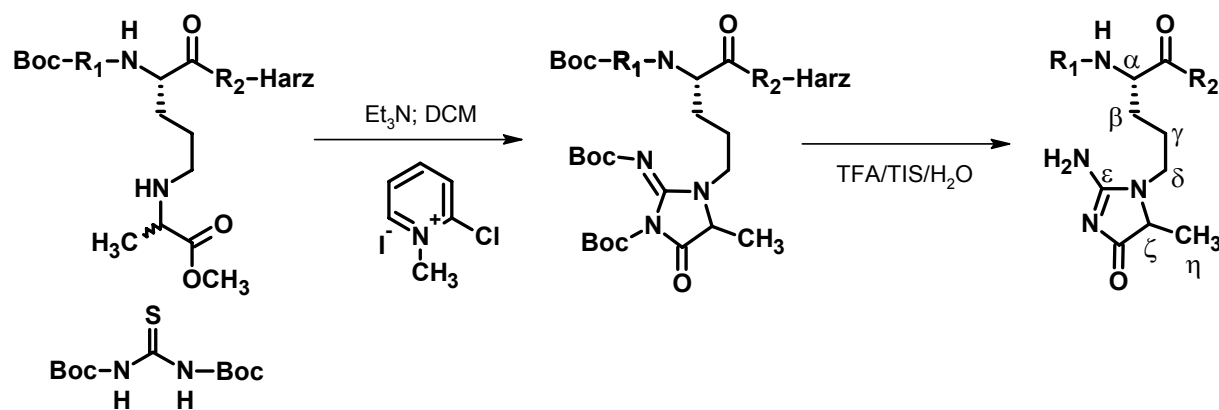


Abb. 2-3-38: Guanylierung eines CEO(OMe)-Peptides zu einem MG-H2-Peptid.

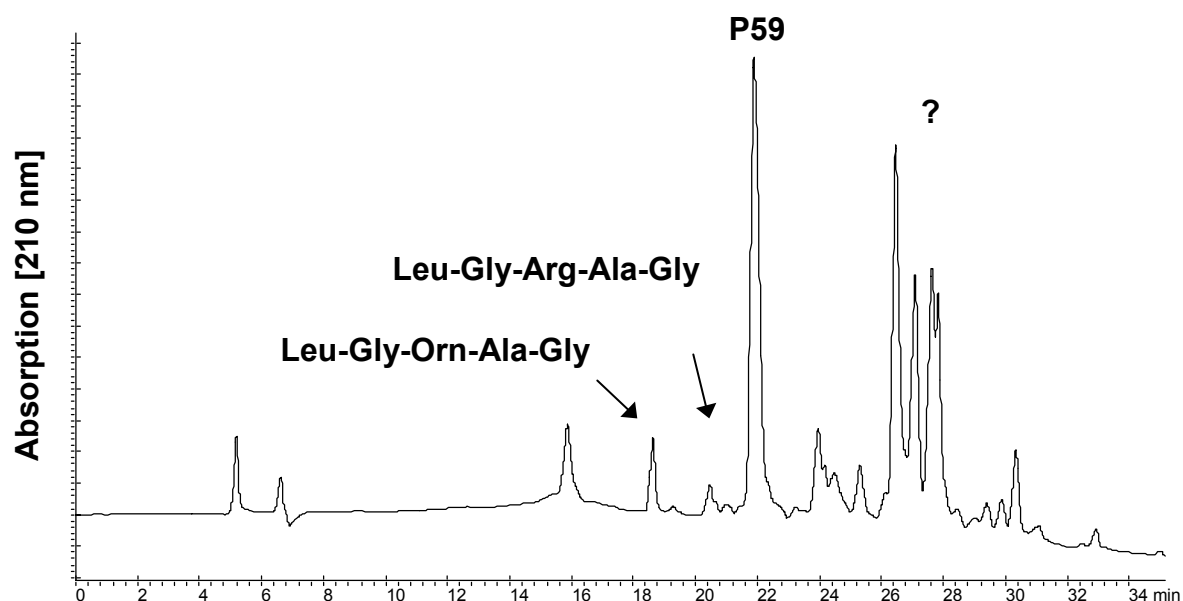


Abb. 2-3-39: HPLC-Trennung des Rohprodukts von Leu-Gly-(MG-H2)-Ala-Gly (**P59**).

Im Vergleich zur mäßigen Ausbeute an MG-H2 nach der Methode von Ahmed *et al.* (2002) war dieser Gehalt an MG-H2-Peptid akzeptabel. Daher wurde die Synthese nicht weiter optimiert. Das Peptid **P59** zeigte ein den isomeren Peptiden Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly (**P57**) und Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**) sehr ähnliches ESI-MS²-Spektrum. Im EDMAN-Abbau fand sich an Position 3 ebenfalls eine Lücke.

Da nun Referenzpeptide mit den drei isomeren Glyoxalmodifikationen des Arginins und zusätzlich ein Peptid mit der offenkettigen Modifikation CEA vorlagen, sollen die zugehörigen ¹H-NMR-Spektren (Abb. 2-3-40 und 2-3-41) an dieser Stelle diskutiert werden. Die Signale der nichtmodifizierten Aminosäuren Leucin, Glycin und Alanin konnten anhand des Vergleichsspektrums von Leu-Gly-Arg-Ala-Gly (Abb. 2-3-20) eindeutig identifiziert werden. Da die zugehörigen Protonen vom Ort der Modifizierung weit entfernt sind, waren hier kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren festzustellen. Ähnliches gilt für die

Signale der α -, β -, γ -, η -, und ζ -Protonen der Aminosäuren MG-H1, MG-H2 und MG-H3. Hingegen ist die chemische Verschiebung sowie die Aufspaltung der zwei δ -Protonen für jedes der drei Isomere sehr charakteristisch. Bei MG-H1 ist die zu den δ -Protonen benachbarte Aminogruppe nicht Bestandteil des Ringsystems, so dass dieses nur einen schwachen Einfluss auf die chemische Verschiebung dieser Protonen hat. Daher erscheinen diese Protonen bei ca. 3,5 ppm und sind somit gegenüber den Signalen entsprechender Arginin- δ -Protonen (3,3 ppm, **Abb. 2-3-20**) nur um ca. 0,2 ppm tieffeldverschoben (**Abb. 2-3-40**, oben). Bei MG-H2 ist die zu den δ -Protonen benachbarte Aminogruppe jedoch Bestandteil des Heterocyclus. Dieser übt nun einen stärkeren Elektronenzug aus, so dass die Signale weiter tieffeldverschoben werden. Aus **Abb. 2-3-40** Mitte erkennt man, dass die δ -Protonen nun zwischen 3,5 und 3,7 ppm absorbieren. Besonders auffällig ist, dass die beiden Protonen kein einzelnes Multiplett wie bei MG-H1 erzeugen, sondern zu einem doppelten Multiplett aufspalten. Diese Eigentümlichkeit der MG-H2- δ -Protonen bemerkten schon die Entdecker dieser Verbindung und führen diese auf Tautomerieeffekte im Ringsystem zurück (Henle *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 2002). Offensichtlich bleibt dieses Charakteristikum auch bei peptidisch verknüpftem MG-H2 erhalten. Auch bei MG-H3 ist die zu den δ -Protonen benachbarte Aminogruppe Bestandteil des Ringsystems. Allerdings liegt sie hier in einer amindartigen Verknüpfung vor. Die Oxogruppe übt einen noch stärkeren Elektronenzug auf die δ -Protonen aus, so dass deren Signal zu 3,8 ppm verschoben ist (**Abb. 2-3-40**, unten). Wie bei MG-H1 spalten die Protonen nicht auf, sondern liefern ein einzelnes Multiplett. Augenscheinlich kann über die chemische Verschiebung sowie über die Multiplizität der δ -Protonen-Signale zwischen den Isomeren MG-H1, MG-H2 und MG-H3 eindeutig unterscheiden werden. Beim CEA-Peptid (**Abb. 2-3-41**) zeigen die α -, β -, γ - und ζ -Protonen kaum Unterschiede zu den cyclischen AGE-Varianten, jedoch gibt es auffallende Unterschiede bei den δ - und η -Protonen. Da durch die Öffnung des Rings der Einfluss der heterocyclischen Struktur auf die δ -Protonen verschwindet, werden deren Signale ins Hochfeld verschoben. Der Wert von 3,3 ppm liegt im Bereich der δ -Protonen von Arginin und CMA und ist deutlich kleiner als der Wert der cyclischen AGE-Modifikationen. Ähnliches gilt für die drei η -Protonen. Bei MG-H1, MG-H2 und MG-H3 war diese Methylgruppe ein Substituent des Ringsystems, welches das η -Duplett etwas ins tiefe Feld verschob (1,6 ppm) und so deutlich von den strukturell ähnlichen Ala ^{β} -Protonen (1,5 ppm) unterscheidbar machte. Bei CEA entfällt dieser Effekt. Die Methylgruppe wird etwas hochfeldverschoben und fällt nun mit den Ala ^{β} -Protonen zusammen.

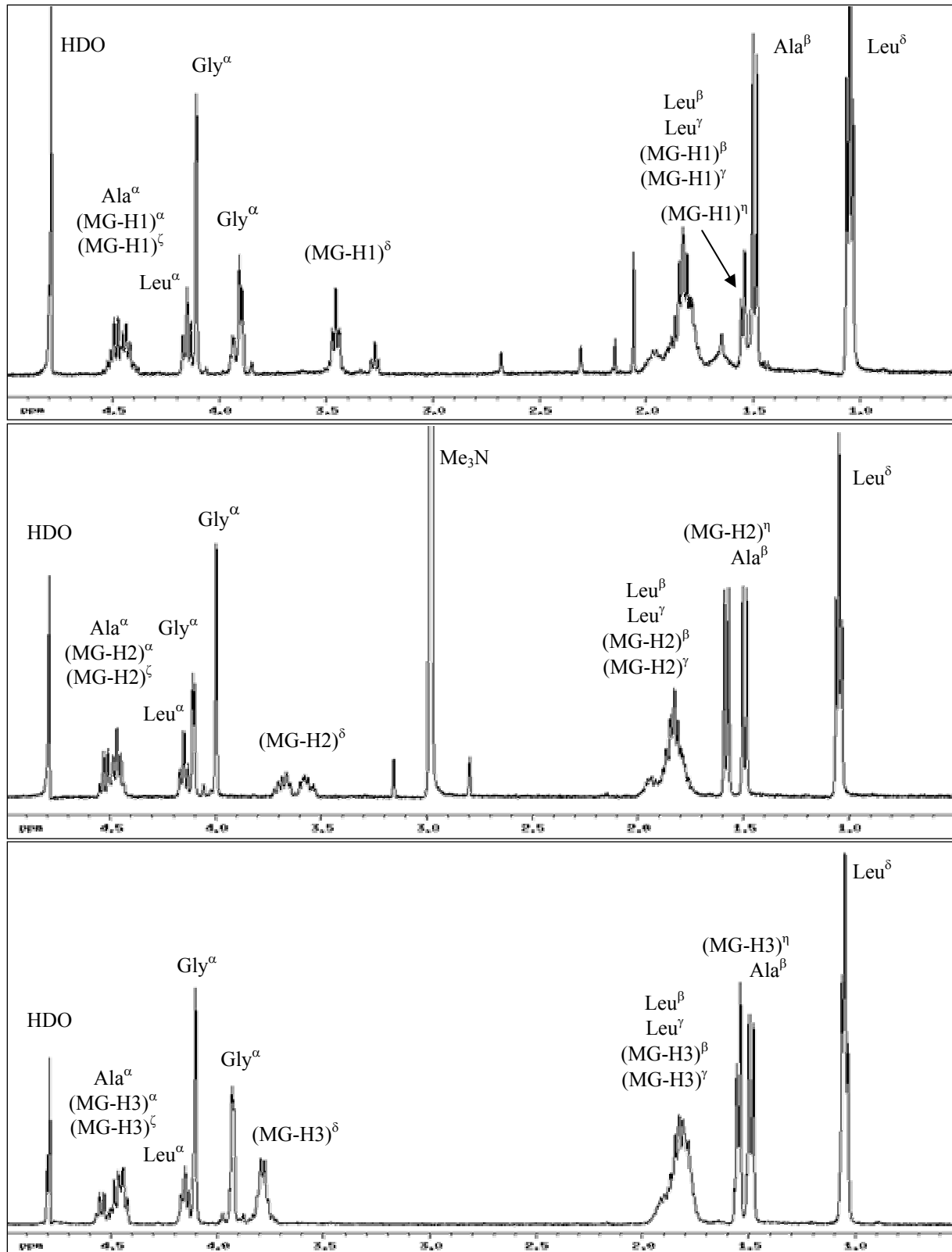


Abb. 2-3-40: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, D_2O) der Peptide Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly (**P57**, oben), Leu-Gly-(MG-H2)-Ala-Gly (**P59**, Mitte) und Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**, unten). Die Nomenklatur der AGE-Aminosäuren mit griechischen Buchstaben ist aus den Abb. 2-3-30, 2-3-32 und 2-3-38 ersichtlich.

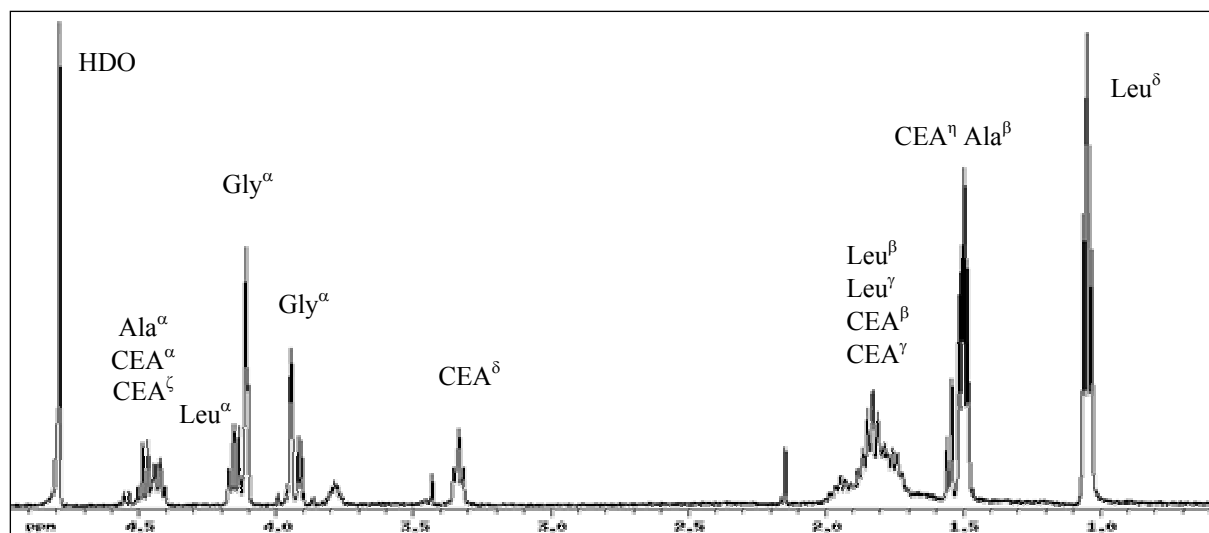
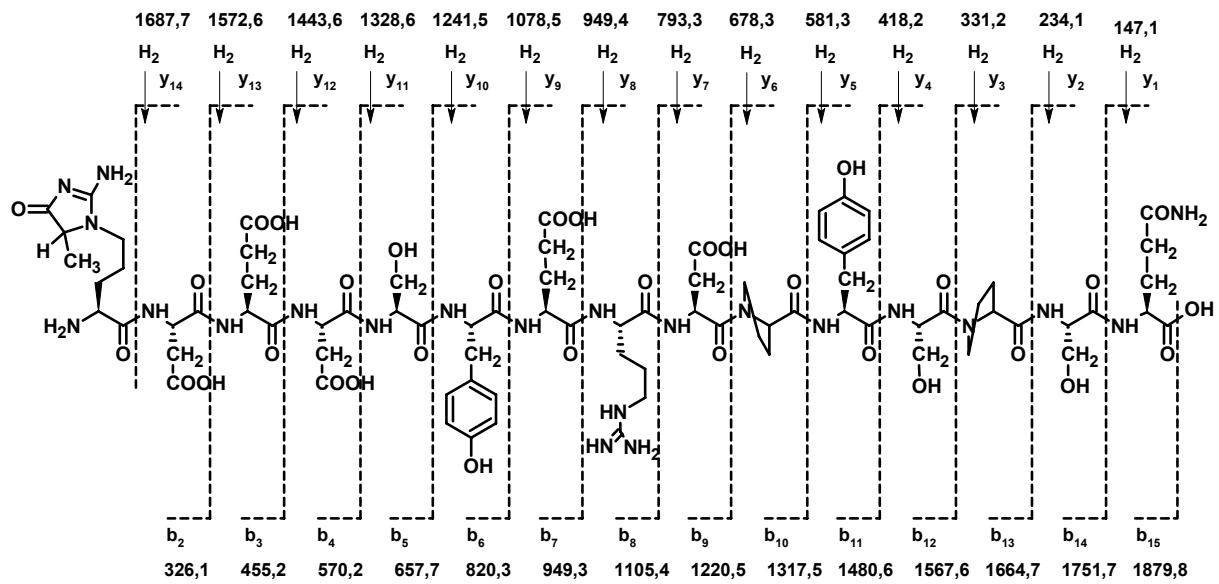


Abb. 2-3-41: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) des Peptids Leu-Gly-CEA-Ala-Gly (**P56**). Die Nomenklatur der AGE-Aminosäure mit griechischen Buchstaben ist aus Abb. 2-3-30 ersichtlich.

Mit der vorgestellten Methode wurde nun versucht, eine entsprechende (MG-H2)-modifizierte Variante des Hauptepitops 6 zu synthetisieren. Am erfolgversprechendsten erschien dies bei einer Anwendung des bereits beschriebenen Boc-Orn(\emptyset)-D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)-Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz. Das Harz wurde mit Brenztraubensäuremethylester und Natriumcyanoborhydrid alkyliert. Eine Probespaltung zeigte, dass die gewünschte Zwischenstufe CEO(OMe)-DEDSYERDPYSPSQ zu ca. 90 % entstanden war. Das Peptidylharz wurde nun mit *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff, MUKAYAMA-Reagenz und Triethylamin guanyliert und die Peptide mit TFA/ H_2O /TIS vom Harz abgespalten. Das Rohprodukt enthielt das gesuchte Peptid (MG-H2)-DEDSYERDPYSPSQ (**P25**) zu 18 %. Durch sorgfältige Reinigung mittels HPLC konnte das AGE-Peptid sauber und in ausreichender Menge isoliert werden.

Abb. 2-3-42 zeigt das theoretische Fragmentierungsschema des Peptids **P25** und das ESI- MS^2 -Spektrum des Pseudomolekülions $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ($m/z = 950$). Fast alle Signale konnten einem Fragment zugeordnet werden. Da das Mutterion zweifach protoniert war, wurden sowohl einfach als auch zweifach geladene Fragmentionen detektiert. Argininhaltige Fragmente spalten zum Teil Ammoniak ab, was zur Bildung von Satellitenionen führt, die um 17 (einfach protoniert) bzw. 9 (zweifach protoniert) m/z -Einheiten vermindert sind.



6-280503_030528162050 #23 RT: 0.71 AV: 1 SB: 2 0.01, 0.01 NL: 8.08E4
 T: + c Full ms2 950.00@28.50 [260.00-2000.00]

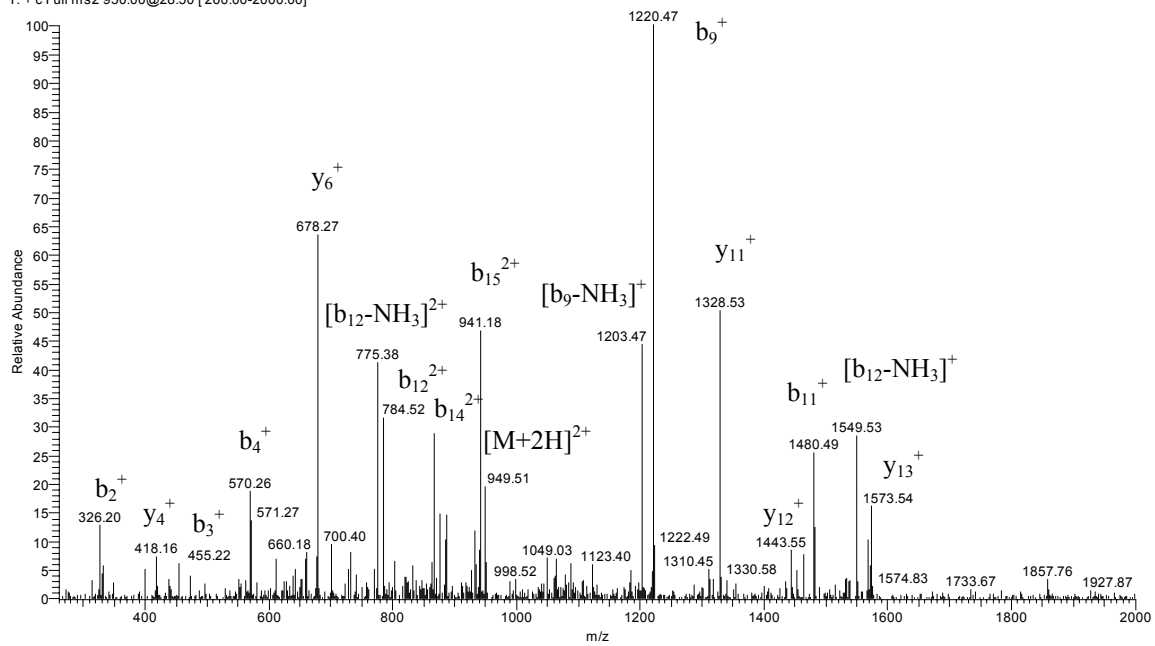


Abb. 2-3-42: Theoretisches Fragmentierungsschema von (MG-H2)-DEDSYERDPYSPSQ (gilt analog auch für die (MG-H1)- und (MG-H3)-Isomeren) und ESI-MS²-Massenspektrum von $[M+2H]^{2+}$.

2.3.6 Diskussion

Um die Bedeutung definierter Glycosylierungsprodukte in der Modulation der Aktivität von Ara h 2-Epitopen zu studieren, wurden erstmals Methoden entwickelt, die die chemoselektive Synthese von Peptiden mit definierten AGE-Derivaten der Aminosäuren Lysin und Arginin ermöglichen. Für die Verbindungen Carboxymethyllysin (CML), Carboxyethyllysin (CEL), das Imidazolinon-Derivat Glarg, die drei isomeren Methylimidazolidinone MG-H1, MG-H2, MG-H3, sowie das Carboxymethylarginin (CMA) und Carboxyethylarginin (CEA) wurden Synthesestrategien entwickelt, die einen Einbau in den Peptidverband bzw. den Aufbau dieser Modifikationen am Peptidverband erlaubten.

Zwar konnten die Lysinderivate CML und CEL bereits erfolgreich als freie Aminosäuren synthetisiert werden (Ahmed *et al.*, 1986; Ahmed *et al.*, 1997), jedoch gab es bislang kein effektives Verfahren zur Synthese von Peptiden mit CML bzw. CEL. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Strategien etabliert. Zum einen wurden Bausteine entwickelt, welche den selektiven Einbau von CML und CEL in Peptide mittels automatisierter Solid-Phase-Peptid-Synthese (SPPS) gemäß der Fmoc/O^tBu-Strategie erlaubten. Diese *building blocks* wurden durch reduktive Alkylierung von Fmoc-Lys-OH mit den *tert.*-Butylestern von Glyoxylsäure bzw. Brenztraubensäure und anschließender Einführung der Boc-Gruppe in guter Ausbeute erhalten. Mit diesen Bausteinen wurden CML- bzw. CEL-Peptide erfolgreich am Synthesizer aufgebaut. Ausbeute und Reinheit der modifizierten Peptide lagen im Bereich der Werte, die für entsprechende Lysin-Analoga mit dem Lysin-Standardbaustein Fmoc-Lys(Boc)-OH erzielt wurden. Nachteil der Methode ist jedoch der große Verlust an Bausteinen, da bei der automatisierten SPPS mit einem großen Überschuss an *building blocks* gearbeitet werden muss. Alternativ konnten CML/CEL-Peptide auch durch Derivatisierung von selektiv geschütztem Lysin in einem festphasengebundenen Peptid erhalten werden. Nach Aufbau von Peptiden, welche Lysin mit der orthogonalen ivDde-Schutzgruppe enthalten, wurde diese an fester Phase selektiv mit Hydrazin abgespalten. Reduktive Alkylierung der nun freien N^ε-Aminogruppe mit dem *tert.*-Butylester von Glyoxylsäure bzw. Brenztraubensäure und anschließender Spaltung von Harz lieferte gute Ausbeuten an CML- bzw. CEL-Peptiden vor allem bei kurzen Sequenzen. Nachteile dieser Methode sind jedoch der hohe Preis von ivDde-geschütztem Lysin sowie die unvollständige Abspaltung der ivDde-Gruppe bei sehr langen Peptiden.

Auch bei AGE-Derivaten des Arginins sind bislang nur Synthesen der freien Aminosäuren bekannt (Glomb *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2002). Bei MG-H3 und CEA fehlen selbst diese und beide wurden bislang nur aufwändig aus Bräunungsansätzen von Arginin und Methylglyoxal isoliert (Ahmed *et al.*, 2002). Chemospezifisch synthetisierte Peptide mit Glarg, MG-H1, MG-H2, MG-H3, CMA und CEA waren bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurden Strategien entwickelt, mit denen sich derartige AGE-Peptide darstellen lassen. Dabei wurde die Strategie einer selektiven Modifizierung von orthogonal geschützten Ornithin-Peptiden an fester Phase verfolgt. In der Tat lieferten speziell entwickelte Derivatisierungsreaktionen der Ornithin-Seitenkette die entsprechenden AGE-Peptide. Zur Überführung von Ornithin in Glarg, CML, MG-H3 und CEL wurden Derivatisierungsreagenzien bereitgestellt, die sich durch Alkylierung von *N,N'*-Di-Boc-*S*-methyl-isothioharnstoff mit den Methyl- und *tert.*-Butylestern von Glycolsäure bzw. L-Milchsäure synthetisieren lassen. Die Überführung von peptidischem Ornithin in MG-H1 gelang mit dem bekannten Reagenz 5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on. MG-H2-Peptide wurden aus Ornithin-Peptiden durch reduktive Alkylierung mit Brenztraubensäure-*tert.*-butylester und Natriumcyanoborhydrid sowie anschließender Guanylierung mit *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff erhalten. Allen Methoden gemeinsam ist, dass bei kurzen Sequenzen gute bis mäßige Ausbeuten an AGE-Peptiden erhalten wurden. Bei langen Peptiden sank die Ausbeute beträchtlich. Hauptgründe hierfür dürfen zum einen die bekannte Unvollständigkeit der orthogonalen Entschützung bei langen Sequenzen, zum anderen sterische Effekte sein. Letztere treten vor allem dann auf, wenn das zu modifizierende Ornithin zu Aminosäuren mit raumfüllenden Schutzgruppen benachbart ist. Ferner ist bekannt, dass lange Peptide an fester Phase stabile Aggregate ausbilden können, welche eine chemische Reaktion behindern.

Ob sich mit den beschriebenen Verfahren auch Bausteine wie beim Lysin erhalten lassen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Beispielsweise wäre es im Falle von CMA denkbar, die Säuregruppe von Fmoc-Orn-OH temporär zu schützen und dann das Ornithin wie zuvor beschrieben in CMA zu überführen. Entfernung der Schutzgruppe würde dann zu Fmoc-CMA(Boc)₂(*O'*Bu)-OH führen, welches alle chemischen Eigenschaften eines *building blocks* für die SPPS gemäß der Fmoc/*O'*Bu-Strategie aufweist.

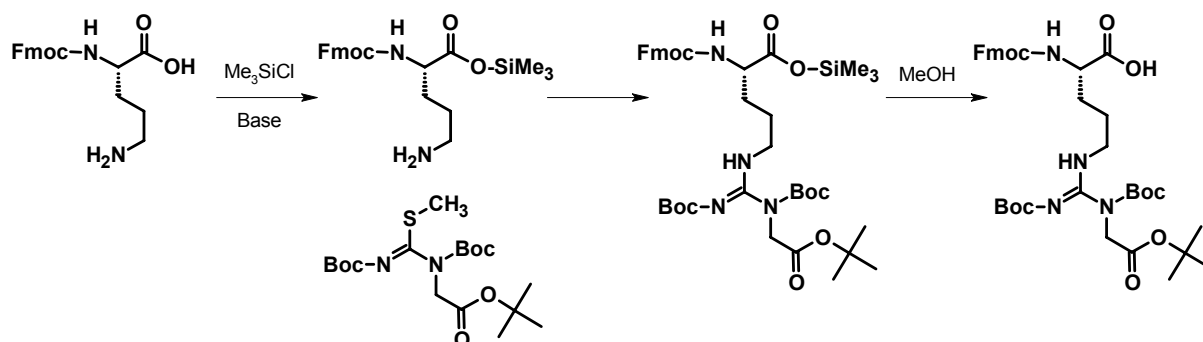


Abb. 2-3-43: Synthesestrategie für den potentiellen CMA-Baustein Fmoc-CMA(Boc)₂(O'Bu)-OH.

Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren war es möglich, eine Fülle an Ara h 2-Sequenzen zu synthetisieren, welche an bestimmten Positionen AGE-Modifizierungen tragen. Neben Peptiden mit AGE-modifizierten Aminosäuren wurden auch Peptide synthetisiert, welche Modifikation des Cysteins enthalten. Unter lebensmittelchemischen Gesichtspunkten waren hierbei vor allem Peptide mit Dehydroalanin (Dha), Lanthionin und Lysinalanin von Bedeutung, da solche Derivate unter Bedingungen entstehen, wie sie bei der Lebensmittelverarbeitung auftreten (Freidmann, 1999). Zwar gibt es etablierte Methoden zum Aufbau von Dha-Peptiden, doch entweder erfolgen sie in Lösung (Burrage *et al.*, 1998) oder benötigen sehr teure und zudem hoch toxische Ausgangsverbindungen auf Selenocysteinbasis (Okeley *et al.*, 2000). Daher wurde eine einfache Synthesestrategie ausgearbeitet, welche Dha-Peptide an fester Phase aufbaut. Ausgehend von preisgünstigem Fmoc-Cys(Bzl)-OH wurden festphasengebundene Cys(Bzl)-Peptide hergestellt, diese zu den entsprechenden Sulfonen oxidiert und durch eine basenkatalysierte Eliminationsreaktion in Dha-Peptide umgewandelt. Auch hier zeigte sich, dass sich bei kurzen Sequenzen gute, bei langen Sequenzen hingegen nur mäßige Ausbeuten an Dha-Peptiden erhalten lassen. Auch hierfür dürften sterische Effekte verantwortlich sein. Ferner konnte gezeigt werden, dass sich festphasengebundene Dha-Peptide durch Additionsreaktionen mit den funktionellen Seitengruppen von Cystein und Lysin zu Peptiden mit Lanthionin und Lysinalanin umwandeln lassen.

2.4 Synthese von Multiplen Antigenpeptiden und Gewinnung spezifischer Antisera

2.4.1 Synthese Multipler Antigenpeptide

Da kleine Peptide aufgrund ihrer geringen Größe keine Immunreaktion hervorrufen, sind diese nicht unmittelbar zur Gewinnung von Antikörpern einsetzbar. Im letzten Teil der Arbeit sollte daher versucht werden, multiple Antigenpeptide (MAPs, Tam, 1988; Pessi *et al.*, 1990) unter Verwendung der Epitopsequenzen von Ara h 2 zu synthetisieren, die als Werkzeug für die Gewinnung spezifischer Antisera dienen könnten. Ausgehend von $(\text{Fmoc}_2\text{-Lys})_2\text{Lys-}\beta\text{-Ala-WANG-Harz}$ wurden durch sukzessives Anhängen von Aminosäuren am Peptid-Synthesizer gemäß der Fmoc/O^tBu-Strategie die in **Abb. 2-4-1** dargestellten „vierarmigen“ MAPs in hoher Ausbeute synthetisiert. Nach Aufreinigung durch RP-HPLC wurden die Strukturen durch ESI-MS, MALDI-TOF und EDMAN-Abbau bestätigt. MAP1 enthält die Sequenz von Epitop 6 in Form eines Pentadecapetides in vierfacher Kopie. MAP2 präsentiert das Epitop 7, MAP 3 enthält das Epitop 3.

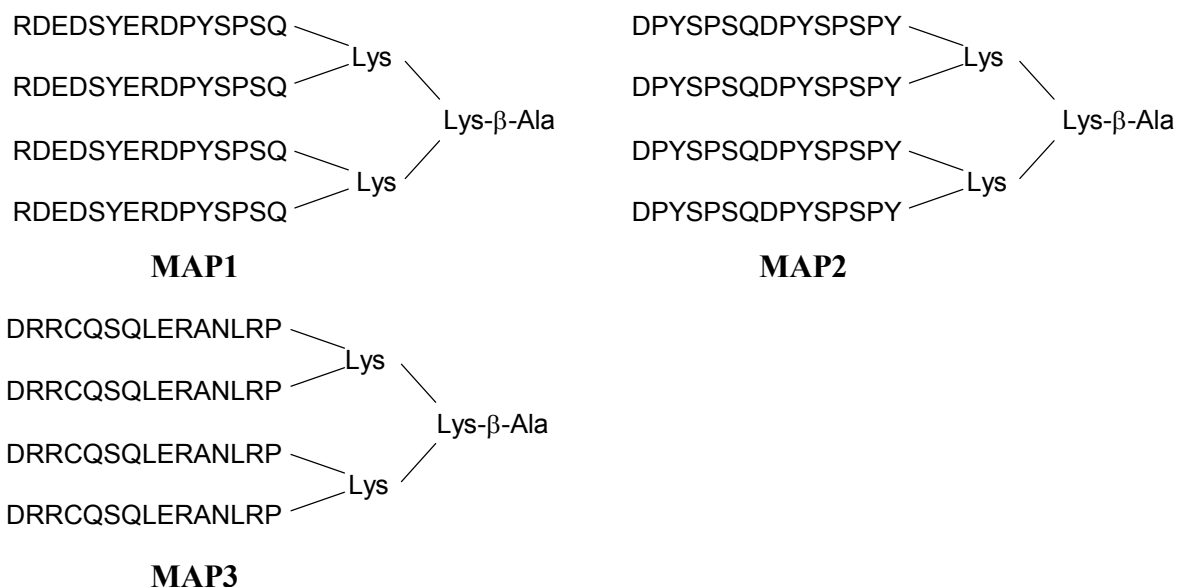


Abb. 2-4-1: Schematische Darstellung der Strukturen von MAP1, MAP2 und MAP3.

Tab. 2-4-1 zeigt die massenspektroskopischen Daten der multiplen Antigenpeptide. Sowohl die MALDI-MS- als auch die ESI-MS-Experimente lieferten Molekulargewichte, die mit den theoretisch berechneten Massen gut übereinstimmen.

Tab 2-4-1: Massenspektrometrische Daten der multiplen Antigenpeptide MAP1-MAP3

Bez.	Rel. Molekülmasse [u]	MALDI-TOF m/z (%)	ESI-MS m/z (%)
MAP1	7776,9	15553,0 (5) [2M+H] ⁺	1297,1 (19) [M+6H] ⁶⁺
		7775,4 (100) [M+H] ⁺	1112,0 (38) [M+7H] ⁷⁺
		3886,5 (51) [M+2H] ²⁺	973,3 (100) [M+8H] ⁸⁺
			865,1 (95) [M+9H] ⁹⁺
			778,8 (28) [M+10H] ¹⁰⁺
MAP2	7200,5	7200,2 (100) [M+H] ⁺	1801,1 (100) [M+4H] ⁴⁺
		3599,6 (69) [M+2H] ²⁺	1440,9 (8) [M+5H] ⁵⁺
			1201,2 (2) [M+6H] ⁶⁺
MAP3	7769,8	7770,8 (83) [M+H] ⁺	1942,7 (23) [M+4H] ⁴⁺
		3886,1 (100) [M+2H] ²⁺	1555,1 (100) [M+5H] ⁵⁺
		2591,6 (36) [M+3H] ³⁺	1295,9 (38) [M+6H] ⁶⁺
			1110,8 (20) [M+7H] ⁷⁺
			972,0 (13) [M+8H] ⁸⁺
			864,5 (8) [M+9H] ⁹⁺
			778,8 (2) [M+10H] ¹⁰⁺

Abb. 2-4-2 zeigt beispielhaft die zu MAP3 gehörigen ESI-MS- und MALDI-TOF-Spektren. Das ESI-MS-Spektrum zeigt ein Ion mit $m/z = 1555,1$ als Basispeak, das dem fünffach protonierten Pseudomolekülion $[M+5H]^{5+}$ von MAP3 entspricht. Zusätzlich wurden die vierfach ($m/z = 1942,7$), sechsfach ($m/z = 1295,9$), siebenfach ($m/z = 1110,8$), achtfach ($m/z = 972,0$), neunfach ($m/z = 864,5$) und zehnfach ($m/z = 778,8$) geladenen Ionen detektiert. Das MALDI-TOF-Spektrum zeigte die Signale der einfach, zweifach und dreifach protonierten Pseudomolekülionen. Die erhaltenen Daten korrelieren gut mit der relativen Molekülmasse von 7769,8 u. Der EDMAN-Abbau von MAP3 lieferte schließlich die Aminosäureabfolge DRRCQSQLERANLRP, wobei an der Stelle des Cysteins eine Lücke auftrat, da dieses nicht mit Vinylpyridin derivatisiert wurde. Der dendrimere Lysinkern wurde im EDMAN-Abbau nicht sequenziert.

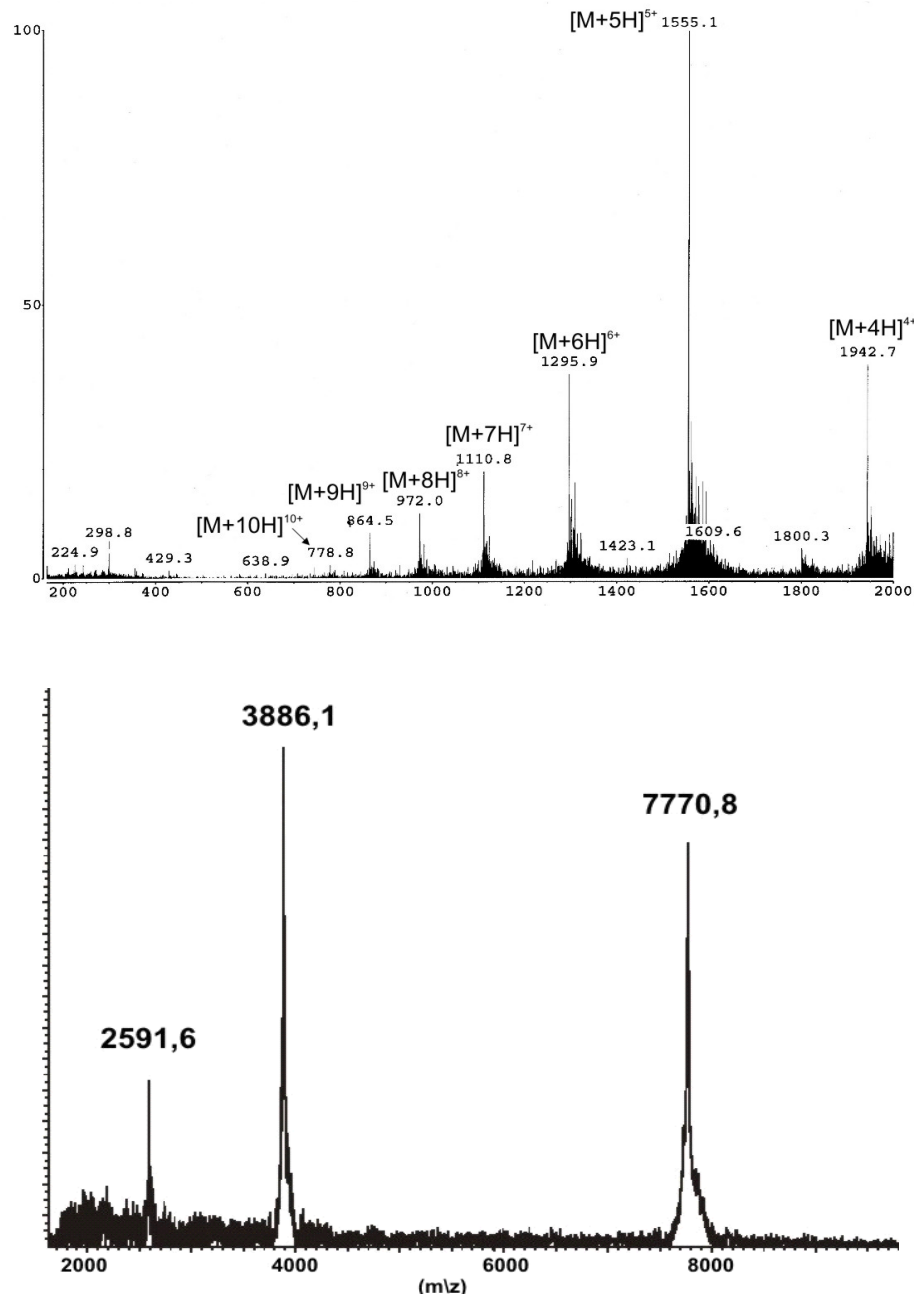


Abb. 2-4-2: ESI-MS (oben) und MALDI-TOF-MS-Spektrum (unten) von MAP3.

2.4.2 Gewinnung eines epitopspezifischen Antiserums gegen MAP3

Für ein Experiment zur Gewinnung epitopspezifischer Antikörper wurde MAP3 ausgewählt. Die Immunisierung eines Kaninchens mit MAP3 wurde von Dr. Becker in Borstel durchgeführt. Im Abstand mehrerer Wochen wurden dem Versuchstier Blutproben entnommen und der Titer des Serums mittels Westernblot bestimmt. Dieser lag nach drei Wochen bei $1:10^4$, nach fünf Wochen bei $1:6,4 \times 10^6$ und nach neun Wochen bei $1:10^7$.

Mittels Westernblot wurde die Selektivität des gewonnen Antiserums untersucht. **Abb. 2-4-3** zeigt das Ergebnis eines Westernblots mit einem Erdnussextrakt, bei dem das erhaltene anti-MAP 3-Kaninchenserum mit dem vorhandenen anti-Ara h 2-Kaninchenserum bzw. einem humanen Allergikerserum verglichen wurde. Das anti-Ara h 2-Kaninchenserum (Spur 4) erkannte neben der typischen Doppelbande von Ara h 2 bei 17 kDa noch ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Protein bei 11 kDa. Die Doppelbande wird von zwei im Erdnussextrakt vorhandenen Isoformen von Ara h 2 hervorgerufen. Das anti-MAP 3-Serum (Spur 2) band aber selektiv nur an Ara h 2 und konnte in einer Verdünnung von bis zu 1:1.000.000 eingesetzt werden. Zu Vergleich zeigt die Spur 1 das IgE-Bindungsmuster des Patientensерums JG 3 und Spur 3 das eines spezifischen anti-Ara h 6-Kaninchensерums.

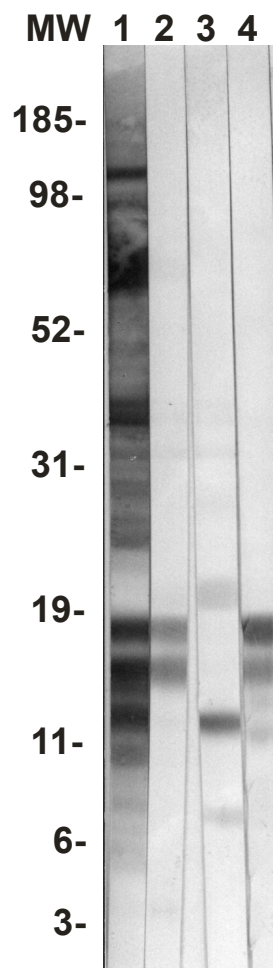


Abb. 2-4-3: Westernblot eines Erdnussextraktes auf eine PVDF-Membran unter reduzierenden Bedingungen (Messung: Dr. Becker, Forschungszentrum Borstel).

In einem ELISA konnte gezeigt werden, dass das anti-MAP 3-Serum im Gegensatz zum anti-Ara h 2-Kaninchenserum bzw. den Patientensera keine Kreuzreaktivität auf Erdnusslectin besitzt. Es wurde somit ein hochspezifisches Antiserum erhalten, welches im Vergleich zum Patientensерum JG 3 bzw. dem anti-Ara h 2-Kaninchenserum nur Ara h 2 erkennt.

Um herauszufinden, welche Epitope des Ara h 2 vom anti-MAP 3-Serum erkannt werden, wurde ein entsprechendes „Epitop-Mapping“ (Frank und Overwin, 1996; Frey und Schmidt, im Druck) durchgeführt. Hierzu wurde eine Cellulosemembran (Frank, 1992), die die Aminosäuresequenz von Ara h 2 in Form überlappender Peptidbruchstücke (15 AS, off-set 2) präsentiert, mit Patientenserum JG 3, dem anti-Ara h 2-Kaninchenserum und dem anti-MAP 3-Serum inkubiert. Die Immunodetektion ist in **Abb. 2-4-4** dargestellt und zeigt, welche Sequenzen von den Sera erkannt wurden. Patient JG 3 erkannte die Hauptepitope 3 (Spots 12-14), 5, 6 und 7 (Spots 25-34). Das anti-Ara h 2-Kaninchenserum detektierte in diesem Experiment nur die Hauptepitope 6 und 7 (Spots 26-34). Das anti-MAP 3-Serum band hingegen selektiv an die Spots 11-18, welche Epitop 3 repräsentieren. **Tab. 2-4-2** zeigt die zu den Spots 11-18 gehörenden Peptidsequenzen.

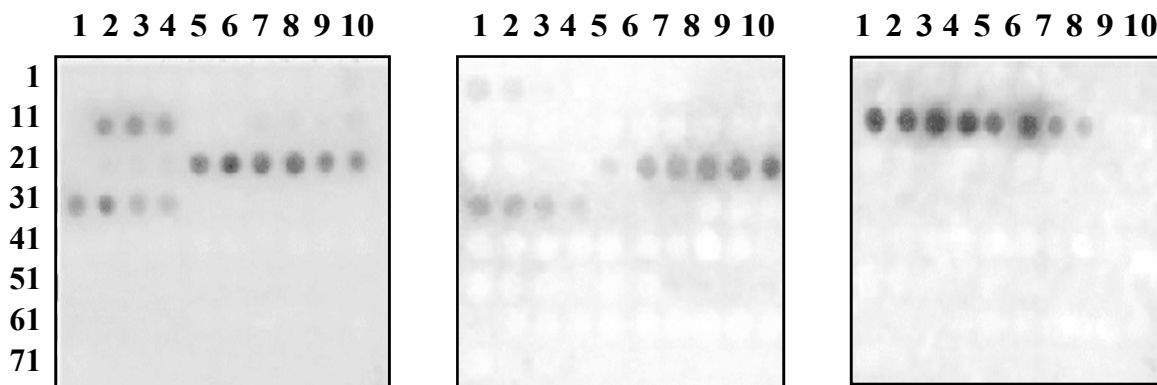


Abb. 2-4-4: „Epitop-Mappings“ an einer Ara h 2-Spotlibrary mit Patientenserum JG 3 (links), dem anti-Ara h 2-Kaninchenserum (mitte) und dem anti-MAP 3-Serum (rechts; Messung: Dr. Becker, Forschungszentrum Borstel).

Tab. 2-4-2: Spots der Ara h 2-Bibliothek, die vom anti-MAP3-Kaninchenserum erkannt werden, und die zugehörigen Peptidsequenzen.

Spot	Sequenz
11	QWELQGDRRCQSQLE
12	ELQGDRRCQSQLERA
13	QGDRRCQSQLERANL
14	DRRCQSQLERANLRP
15	RCQSQLERANLRPCE
16	QSQLERANLRPCEQH
17	QLERANLRPCEQHLM
18	ERANLRPCEQHLMQK
MAP3	DRRCQSQLERANLRP

Alle detektierten Peptide enthalten ganz oder teilweise die Sequenz von MAP3. Auffällig ist, dass alle erkannten Spots die Aminosäure Glu³³ beinhalten. Es ist jedoch höchst unwahrscheinlich, dass sich die Immunantwort auf einen einzelnen Antikörperklon gegen Glutaminsäure zurückführen lässt, denn einzelne Aminosäuren wirken in der Regel nicht

immunogen. Ferner fällt auf, dass sich innerhalb der angefärbten Spots die Punkte 23 und 26 besonders stark hervorheben. Diese zwei Maxima sind ein Indiz für das Vorliegen eines polyklonalen Serums. Trotzdem scheint die Aminosäure Glu³³ für die Interaktion der Peptide mit den Antikörpern essenziell zu sein, denn randständige Teilsequenzen von Epitop 3 ohne Glu³³ werden vom Serum nicht erkannt. Diese Beobachtung deckt sich mit der Erkenntnis von Stanley *et al.* (1997), wonach der Austausch von Glu³³ in Epitop 3 gegen Alanin zum Verlust der IgE-Bindung führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit MAP3 ein Serum hervorbrachte, welches ausschließlich mit Peptiden reagiert, welche mindestens 7 bis 9 Aminosäuren der Sequenz von Epitop 3 enthalten. Diese hohe Spezifität erklärt auch die Ara h 2-Selektivität des Serums. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass andere Erdnussproteine als Ara h 2 die Aminosäureabfolge von Epitop 3 besitzen. Daher bindet das Serum im Westernblot ausschließlich an die Isoformen von Ara h 2.

Auf den ersten Blick scheint verwunderlich, weshalb das anti-Ara h 2-Kaninchenserum im Epitop-Mapping der **Abb. 2-4-4** nicht die Spots von Epitop 3 erkennt. In den zuvor durchgeführten ELISA-Studien zum Epitop 3 war eine deutliche IgE-Bindung feststellbar. Dieser offensichtliche Widerspruch kann durch den Umstand erklärt werden, dass die Cystein-Reste der Spotlibrary aus Synthesegründen noch eine Acm-Schutzgruppe tragen. Ein ELISA von Cystein-modifizierten Varianten von Epitop 3 im Kapitel 2.2.3.3 zeigte, dass derartige Modifizierungen im Falle des anti-Ara h 2-Kaninchenserum zum vollständigen Verlust der IgE-Bindung führen. Wahrscheinlich verhindert die Acm-Gruppe analog die Bindung der Antikörper an die Spots mit der Sequenz von Epitop 3. Das Patientenserum JG 3 und das anti-MAP 3-Kaninchenserum scheinen jedoch eine derartige Modifizierung zu tolerieren und binden auch an Acm-geschützte Epitop 3-Sequenzen. Diese Toleranz konnte im Falle des anti-MAP 3-Kaninchenserums mittels eines CovaLink-ELISAs tatsächlich nachgewiesen werden. So zeigt ein ELISA, dass das Serum nicht nur das Epitop 3 in Form des Peptides LQGDRRCQSQLERAN (**P3**) erkennt, sondern auch an die modifizierten Analoga **P15-P19** bindet (**Abb. 2-4-5**). Diese Bindung fällt jedoch schwächer aus als an das nicht-modifizierte Peptid. Von allen Varianten wird dabei das über eine Disulfidbrücke verbundene Dimere **P15** noch am besten erkannt, während ein Austausch von Cystein gegen Cystin (**P16**) oder Cysteinsäure (**P17**) die Bindung erheblich schwächt. Wird Cystein gegen Dha ersetzt, so wird die Bindung weiter vermindert. Dies könnte an einer Konformationsänderung des Peptides liegen, die durch den sp²-hybridisierten Dha-

Kohlenstoff hervorgerufen wird. Im Falle einer Lan-Variante (**P19**, Diastereomerenpaar) mit sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff in der Peptidkette steigt die IgE-Affinität wieder an.

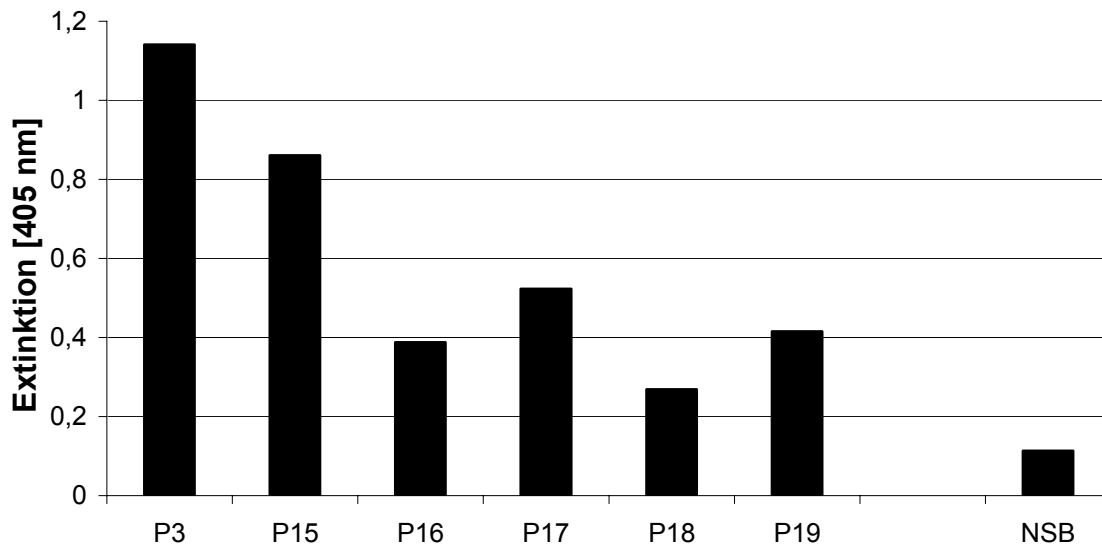


Abb. 2-4-5: ELISA der Peptide **P3** und **P15-P19** (280 pmol/well) mit anti-MAP3-Kaninchenserum (1:100.000).

2.4.3 Erkennung der MAPs durch verschiedene Sera

Außer für Immunisierungsexperimente können die epitoptragenden MAPs auch als Werkzeug zum Epitopmapping verschiedener Sera verwandt werden. Aufgrund ihrer Größe verhalten sich MAPs wie kleine Proteine und lassen sich durch nichtkovalente Wechselwirkung am Polystyrol-Mikrotiterplatten binden. Ein ELISA der MAPs 1-3 zeigte die Selektivitäten einzelnen Sera (**Abb. 2-4-6**).

Die Erdnussallergiker PEI 163 und JG 3 sowie das anti-rAra h 2-Kaninchenserum reagierten mit den MAPs 1 und 2, welche die Hauptepitope 6 und 7 repräsentieren. MAP3 wurde in diesen Experimenten nicht erkannt. Vermutlich bildet MAP3 bei längerer Exposition an Luft, wie es bei ELISA zwangsläufig der Fall ist, spontan innermolekulare Disulfidbrücken. Für das Serum PEI 163 und das Kaninchenserum wurde bereits gezeigt, dass diese das über eine Disulfidbrücke dimerisierte Epitop 3 nicht erkennen. Das anti-MAP3-Kaninchenserum erkennt selektiv nur MAP3 und reagiert nicht mit anderen MAPs. Diese Ergebnis belegt, dass die Interaktion der Antikörper mit MAP3 über die Epitopsequenz der „MAP-Ärmchen“ verläuft und nicht über den Lysin-Kern, den auch die anderen MAPs beinhalten. Anders ausgedrückt erfolgt die Immunisierung mit einem MAP nur gegen die Sequenz in den Seitenarmen, während sich der Dendrimerkern immunologisch neutral verhält.

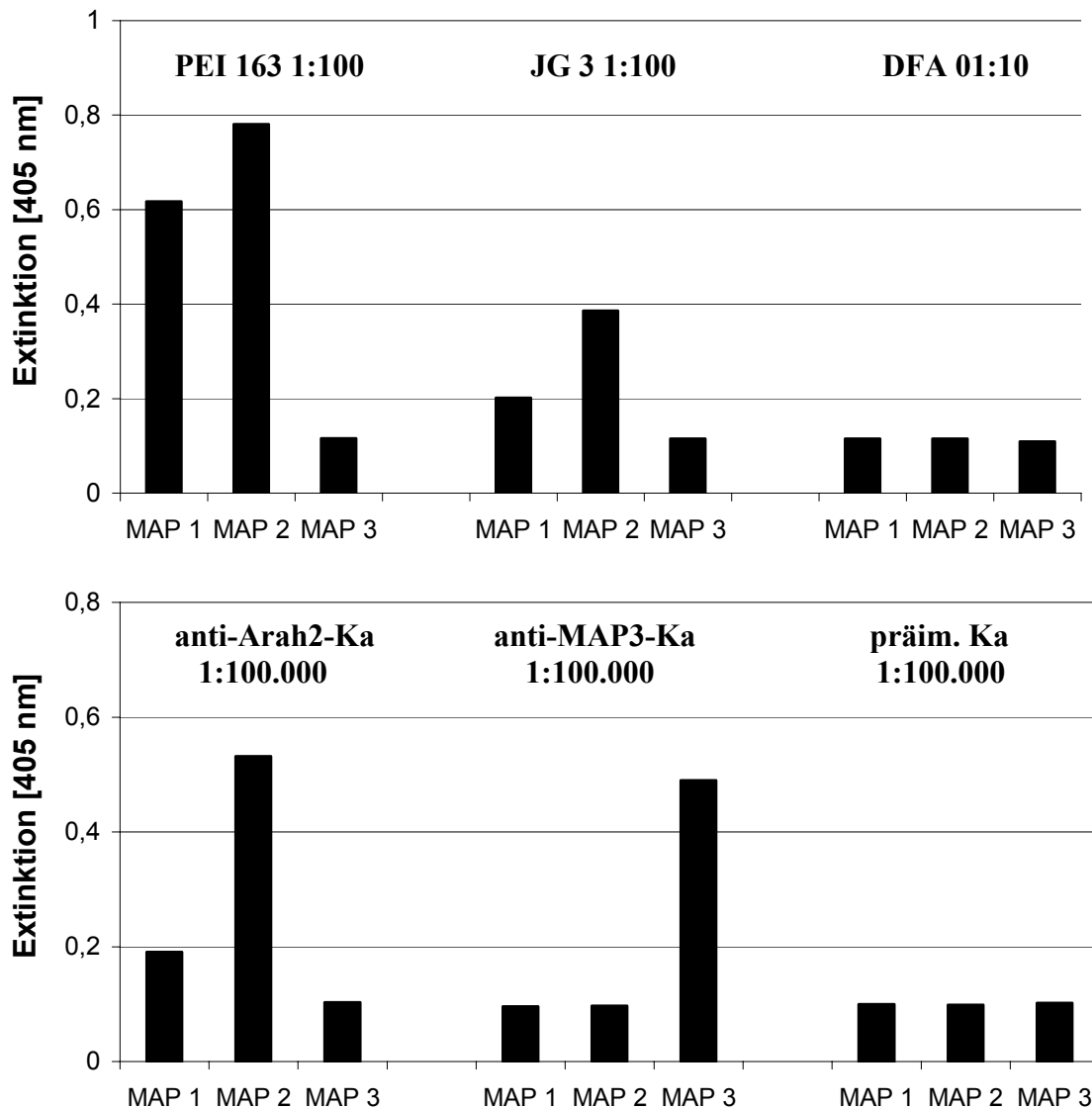


Abb. 2-4-6: ELISA von MAPs1-5 (230 pmol/well) an MaxiSorb-Platten mit verschiedenen Sera.

Abb. 2-4-7 zeigt ein energieminiertes 3D-Modell von MAP3 und erklärt diesem Umstand. Durch die vier Peptidketten ist der Lysin-Kern abgeschirmt. Dadurch wird eine Teilnahme an der Immunisierungsreaktion erschwert. Selbst für den unwahrscheinlichen Fall, dass sich spezifische Antikörper gegen das zentrale Lysindendrimer gebildet hätten, so könnten diese aufgrund der sterischen Abschirmung des Kerns wohl schwerlich an ein MAP binden. Nicht-spezifische Bindungen konnte durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden. Weder ein humanes Nichtallergikerserum (DFA 01) noch ein Präimmunisierungsserum eines Kaninchens zeigten eine Bindung an ein MAP.

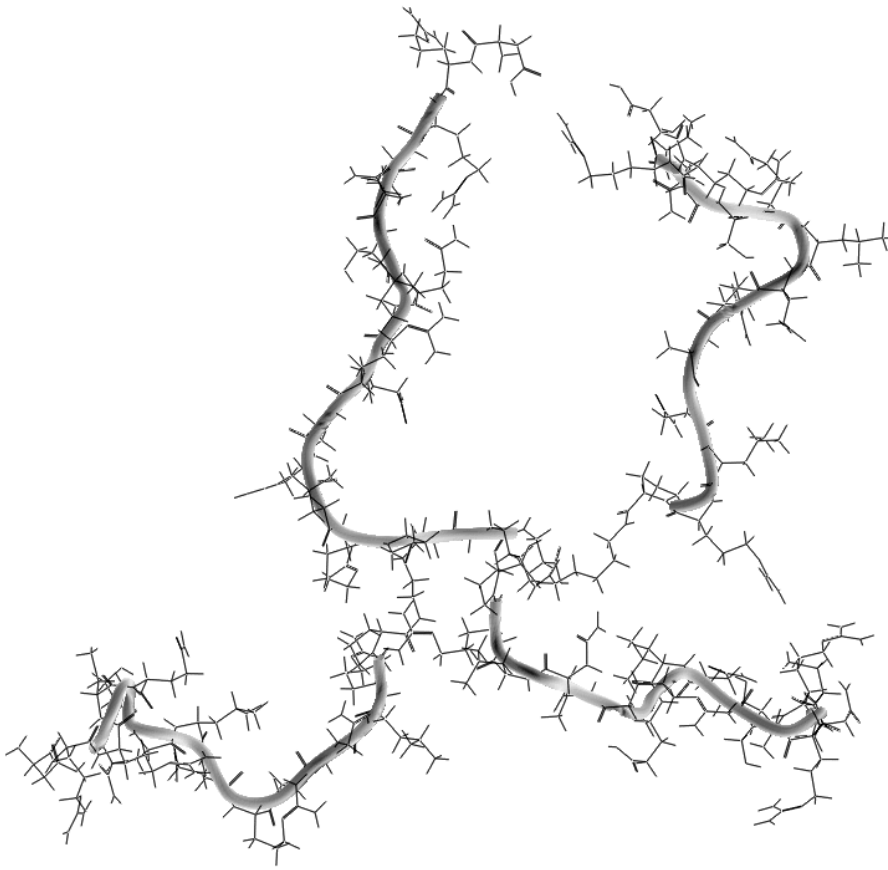


Abb. 2-4-7: Energieminimiertes 3D-Modell von MAP3. Zur besseren Erkennung sind die vier Dendrimerarme grau unterlegt.

Wird MAP3 unter reduzierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot unterworfen, so kann man in der India-Ink-Färbung eine Proteinbande bei ca. 6 kDa erkennen (**Abb. 2-4-8**; Spur 1). Dass es sich hierbei um MAP3 handelt (Molekulargewicht ca. 7,8 kDa), belegt die Immunodetektion mit dem Patientenserum JG 3 (Spur 2) und dem anti-MAP3-Kanincheserum (Spur 3). Wie im entsprechenden ELISA erkennt anti-Ara h 2-Kanincheserum MAP3 nicht (Spur 4). Dass letzterer Effekt auch unter reduzierenden Bedingungen, die ja eine Bildung von Disulfidbrücken verhindern sollen, zu erkennen ist, könnte an einer nachträglichen Oxidation des MAPs während der Elektrophorese oder an Modifizierungen der Cysteinreste durch monomere Acrylamidreste im Gel erklärt werden.

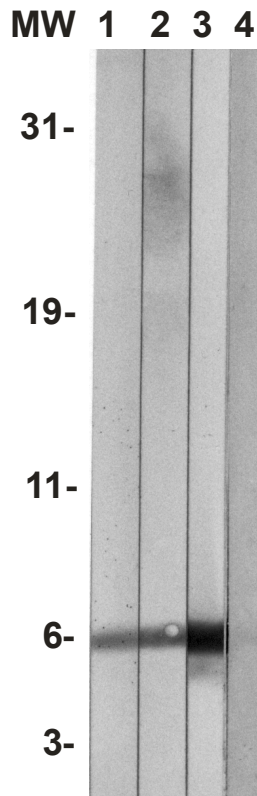


Abb. 2-4-8: Westernblot von MAP3 an Nitrocellulose unter reduzierenden Bedingungen. Trennung an 10% NuPAGE. MW = Molekulargewichtsmarker; Spur 1: Proteinfärbung mit India Ink; Spur 2: IgE-Detektion des Patientenserum JG 3; Spur 3: Ig-Detektion des anti-MAP3-Kanincheserum; Spur 4: Ig-Detektion des anti-rAra h 2-Kanincheserum. (Messung: Dr. Becker, Forschungszentrum Borstel)

2.4.4 Synthese von MAPs mit CML-Peptiden

Als Fusion der erfolgreichen MAP-Strategie und der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Synthese von Peptiden mit AGE-Aminosäuren kam die Idee, ein MAP mit einer MAILLARD-modifizierten Ara h 2-Sequenz zu synthetisieren. Solche MAPs könnten zukünftig verwendet werden, um hochspezifische Antisera gegen eine bestimmte MAILLARD-Modifizierung an einer genau bestimmten Position in Ara h 2 zu erhalten. Mit solchen Antisera könnte ein genauer, d.h. sequenzabhängiger und modifizierungsspezifischer Blick in die MAILLARD-Reaktion eines Proteins geworfen werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass ein solches MAP vier Kopien einer AGE-modifizierten Sequenz trägt, kamen nur die AGE-Aminosäuren in Betracht, für die effektive Synthesewege zur Verfügung standen. Am einfachsten war die Darstellung eines derartigen MAPs mit einer CML- oder CEL-Einheit anstelle von Lysin zu bewerkstelligen. Für diese beiden Aminosäuren waren Bausteine entwickelt worden, welche den selektiven Einbau dieser Derivate in Peptide in hoher Ausbeute erlauben. Als Modellsequenzen kamen die Lysin-haltige Abschnitte Arg¹²⁰ bis Pro¹³⁴ bzw. Glu⁴³ bis Ser⁵⁶ in Betracht. Im natürlichen Ara h 2 steht an Position 127 bzw. 49 ein Lysin-Rest. Dieser sollte durch CML ersetzt werden. Die Sequenzausschnitte wurden so gewählt, dass das CML genau in der Mitte der Pentadecamere

zu liegen kommt. **Abb. 2-4-9** zeigt die Strukturen von MAP4 und MAP5.

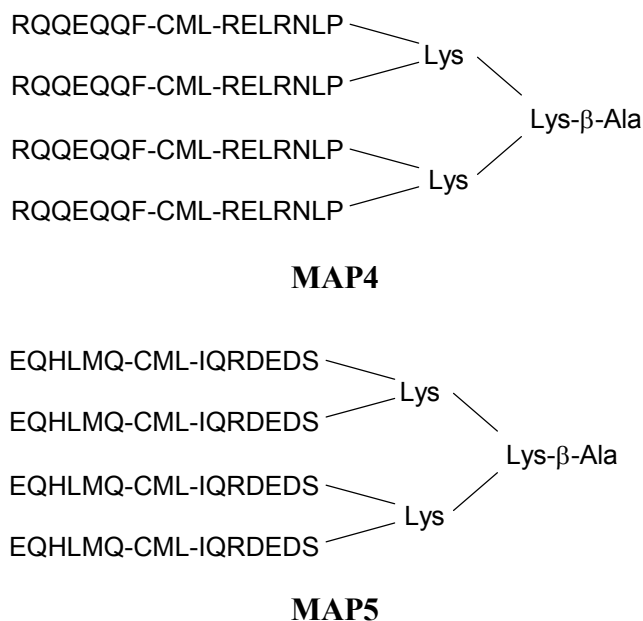


Abb. 2-4-9: Schematische Darstellung der Strukturen von MAP4 und MAP5.

Die Synthese der beiden MAPs verlief analog der MAPs1-3 ausgehend von (Fmoc₂-Lys)₂Lys-β-Ala-WANG-Harz durch sukzessives Anhängen von Aminosäuren am Peptid-Synthesizer unter Einsatz von Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**Abb. 2-4-10**). Finale Spaltung lieferte die gesuchten Peptide MAP4 (Ausbeute 77 %, Reinheit 68 %) und MAP5 (Ausbeute 92 %, Reinheit 32 %) in akzeptabler Weise. Die MAPs wurden mittels HPLC aufgereinigt und durch ESI-MS, MALDI-TOF und EDMAN-Abbau charakterisiert. **Abb. 2-4-11** zeigt stellvertretend die ESI-MS- und MALDI-TOF-MS-Spektren von MAP4. Die Daten korrelieren gut mit der relativen Molekülmasse dieses Peptides von 8514,6 u (vgl. **Abb. 6-2** im Anhang). Im EDMAN-Abbau fand sich wie erwartet an der CML-Position eine Lücke. Damit war es erstmals gelungen, MAILLARD-modifizierte MAPs aufzubauen.

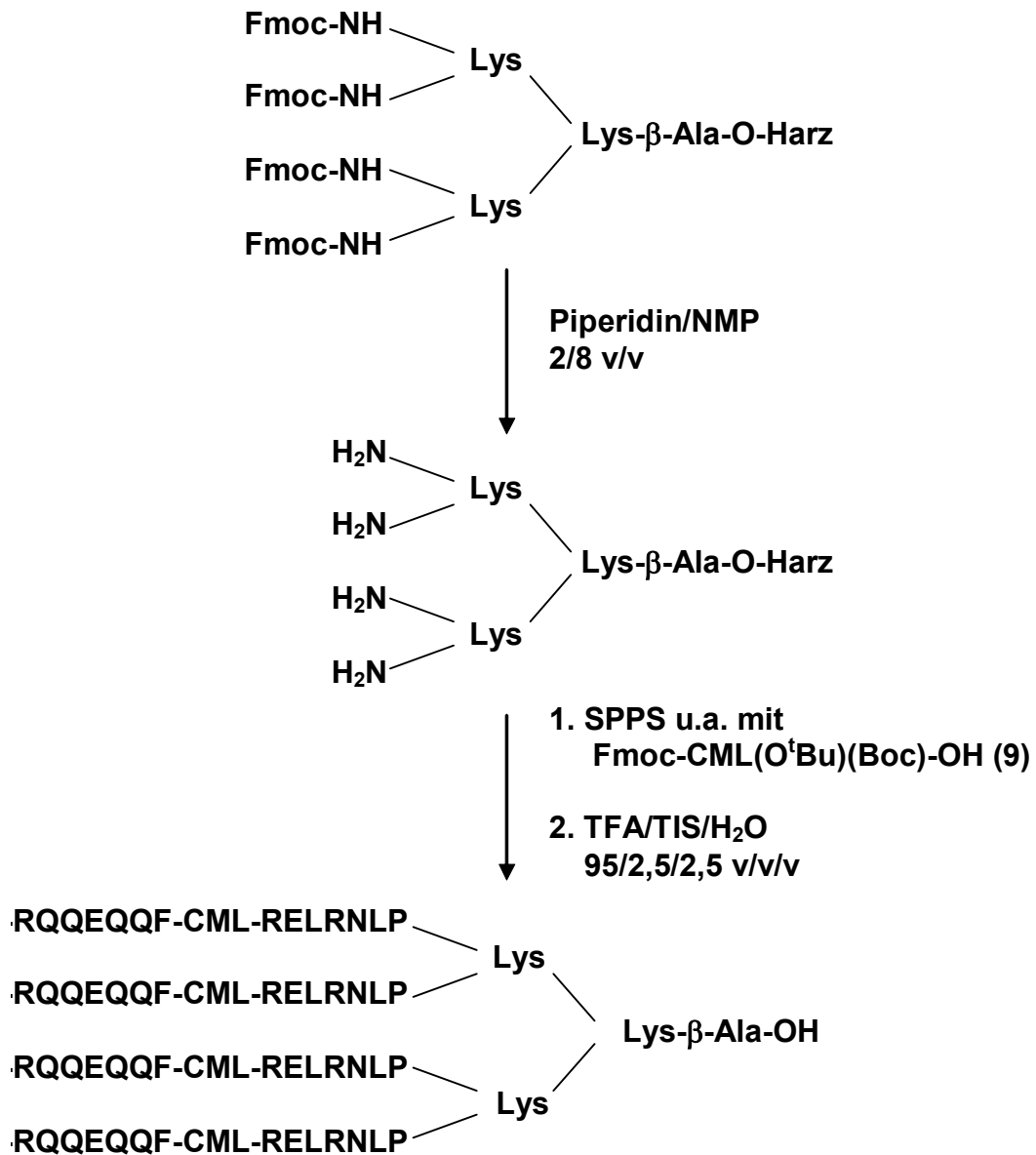


Abb. 2-4-10: Syntheschema für MAP4.

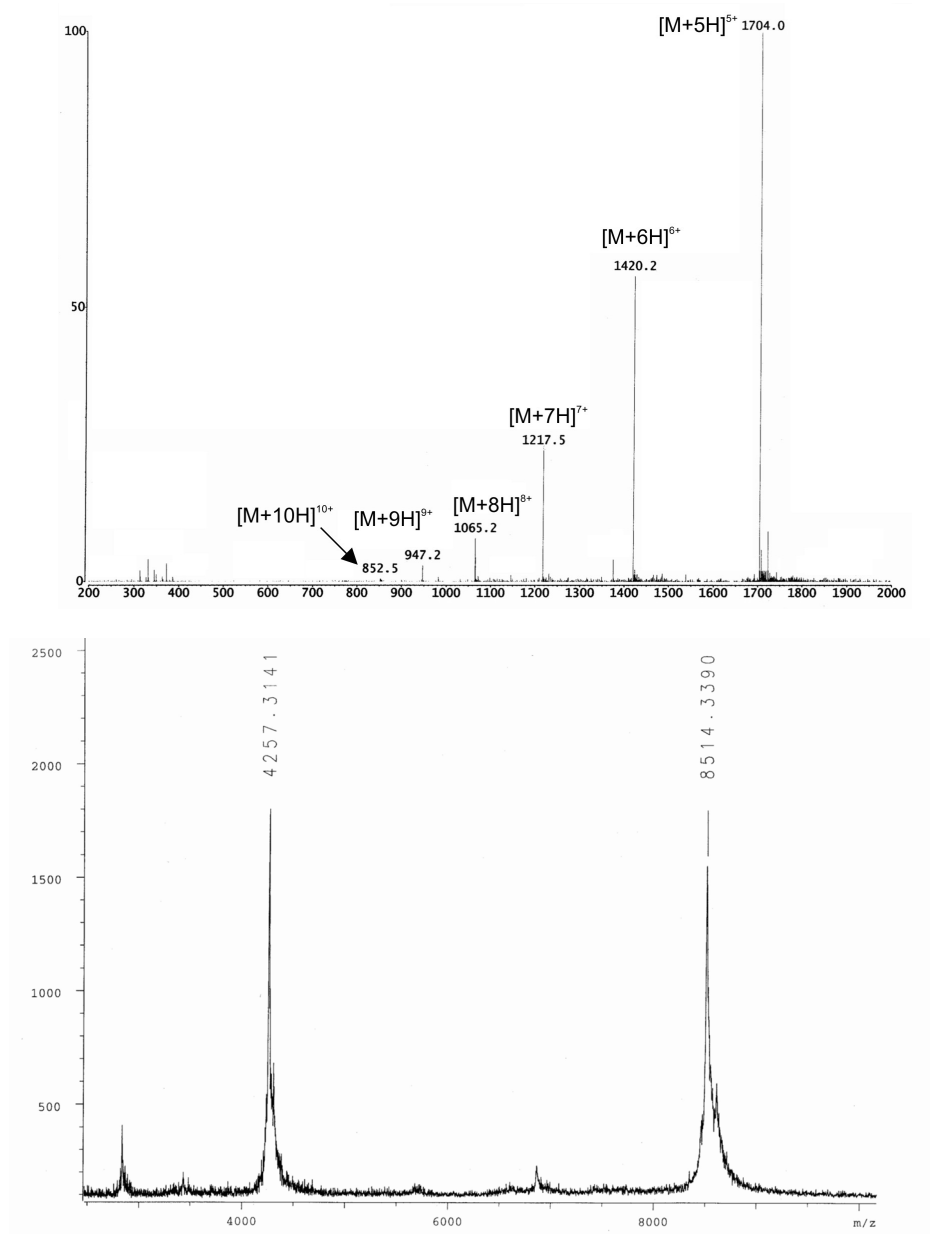


Abb. 2-4-11: ESI-MS und MALDI-TOF-MS-Spektren von MAP4.

2.4.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die MAP-Technologie (Tam, 1988) zur Gewinnung von sequenzspezifischen Antisera auf dem Gebiet der Lebensmittelallergie angewandt. Durch Peptidfestphasensynthese konnten drei verschiedene MAPs erhalten werden, die die Sequenzen der drei Hauptepitope von Ara h 2 jeweils in vierfacher Kopie enthalten. Die Peptide wurden durch Massenspektrometrie und EDMAN-Abbau charakterisiert. Ein Immunisierungsexperiment mit MAP 3 in einem Kaninchen lieferte ein hochspezifisches, polyklonales Serum, welches Antikörper enthält, die spezifisch an das Hauptepitop 3 von Ara h 2 binden. Dies konnte sowohl durch Reaktion des Antiserums mit einer Ara h 2-

Peptidbibliothek als auch durch Peptid-ELISA nachgewiesen werden. Da dieses Serum hochspezifisch für das Epitop 3 von Ara h 2 ist, lässt es sich, wie in einem Westernblot gezeigt, zum selektiven Nachweis von Ara h 2 in einem Erdnussproteinextrakt verwenden. Es ist dabei dem bisher verwendeten anti-rAra h 2 Serum überlegen, da letzteres neben den beiden Isoformen von Ara h 2 an ein weiteres, unbekanntes Erdnuss bindet. Darüber hinaus zeigt das anti-MAP3-Serum einen erstaunlich hohen Antikörpertiter (10^7 im Westernblot). Dieses Antiserum stellt somit ein neuartiges und wertvolles Werkzeug zum Nachweis von Ara h 2 dar und eröffnet neue Möglichkeiten in der Lebensmittelüberwachung oder medizinischen Diagnostik.

Durch Kombination der MAP-Festphasensynthese mit der in dieser Arbeit etablierten Methode zur Einführung eines CML-Restes in Peptide war es erstmals möglich, zwei MAPs zu synthetisieren, welche Teilsequenzen von Ara h 2 enthalten, bei denen Lysin durch CML ersetzt ist. Mit der Nutzung solcher MAILLARD-modifizierter MAPs und damit hergestellten Antisera sollte es möglich sein, eine ganz bestimmte AGE-Modifizierung in einem Protein sequenzspezifisch mittels immunologischer Techniken nachzuweisen.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Materialien

Alle Chemikalien hatten, soweit nicht anders vermerkt, Analysenqualität („p.a.“).

3.1.1 Chemikalien

Fmoc-geschützte Aminosäuren

Boc-Orn(Fmoc)-OH und Fmoc-Orn(Dde)-OH wurden von der Firma Bachem, Ulm, Fmoc-Thr(^tBu)-OH von der Firma PerSeptive Biosystems, Hamburg bezogen. Alle übrigen Fmoc-geschützten Aminosäuren stammten von der Firma Novabiochem, Läuflingen, Schweiz.

Harze für die Peptid-Festphasensynthese

WANG-Harz, 200-400 mesh, 1,13 mmol/g, Novabiochem, Läuflingen, Schweiz

2-Chlortritylchlorid-Harz, 1,20 mmol/g, Novabiochem, Läuflingen, Schweiz

Fmoc₄-Lys₂-Lys-β-Ala-WANG-Harz, 0,27 mmol/g, Novabiochem, Läuflingen, Schweiz

Feinchemikalien

Ac-Cys-OMe	Fluka, Neu-Ulm
Ac-Lys-OMe x HCl	Sigma, Steinheim
Acrylamidlösung 30 % (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniaklösung 25 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Merck, Darmstadt
Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD)	Merck, Darmstadt
Brenztraubensäure	Fluka, Neu-Ulm
Brenztraubensäuremethylester	Fluka, Neu-Ulm
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Steinheim
Bromessigsäure- <i>tert.</i> -butylester	Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>iso</i> -Butanol	Merck, Darmstadt
<i>tert.</i> -Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid, wasserfrei	Merck, Darmstadt
(+)-Catechin	Sigma, Steinheim
<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure	Merck, Darmstadt
Chlorameisensäure-(9-fluorenylmethyl)-ester (Fmoc-Cl)	Fluka, Neu-Ulm
2-Chlor- <i>N</i> -methylpyridiniumiodid	Fluka, Neu-Ulm
Coomassie Brilliant Blau G 250	Merck, Darmstadt

L-Cystein	Merck, Darmstadt
<i>N,N'</i> -Di-Boc-thioharnstoff	Aldrich, Steinheim
<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	Fluka, Neu-Ulm
<i>N,N</i> -Dimethylanilin	Merck, Darmstadt
Diisopropylcarbodiimid	Sigma, Steinheim
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Aldrich, Steinheim
Di- <i>tert.</i> -butyldicarbonat (Boc ₂ O)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfid	Merck, Darmstadt
(Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
1,2-Ethandithiol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Fluka, Neu-Ulm
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDC)	Sigma, Steinheim
(-)-Epicatechin	Fluka, Neu-Ulm
D-Fructose	Fluka, Neu-Ulm
Fumarsäuredichlorid	Fluka, Neu-Ulm
Gallussäure-Monohydrat	Fluka, Neu-Ulm
D-Glucose	Fluka, Neu-Ulm
Glycerin, 99+ %	Sigma, Steinheim
DL-Glycerinaldehyd	Aldrich, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Glyoxal 40 % in Wasser	Aldrich, Steinheim
Glyoxylsäure 40 % in Wasser	Aldrich, Steinheim
Glykolsäuremethylester	Lancaster, Mühlheim a. Main
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Hexafluorisopropanol	Aldrich, Steinheim
Hydrazin-Hydrat	Merck, Darmstadt
Hydroxybenzotriazol 0,5 M in DMF	Applied Biosystems, Weiterstadt
Iodmethan	Merck, Darmstadt
Kaffeensäure	Merck, Darmstadt
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalium- <i>tert.</i> -butylat	Merck, Darmstadt
Maltose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercapto-1-ethanol	Merck, Darmstadt
Methacrylsäure- <i>tert.</i> -butylester	Aldrich, Steinheim
Methylglyoxal	Aldrich, Steinheim
Milchsäure- <i>tert.</i> -butylester	Fluka, Neu-Ulm
Milchsäuremethylester	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcyanoborhydrid	Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
Piperidin	Applied Biosystems
Quercetin-Dihydrat	Lancaster, Mühlheim am Main
D-Ribose	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin Fraktion V	Serva, Heidelberg

Stärke, löslich nach Zulkowski	Merck, Darmstadt
2-Sulfo- <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (Sulfo-NHS)	Pierce, Nr. 24510ZZ
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	Biorad, München
Triethylamin	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Triisopropylsilan	Merck, Darmstadt
Triphenylphosphan	Fluka, Neu-Ulm
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Tyrosinase aus Pilzen (EC 1.14.18.1)	Sigma, Steinheim, Nr. T 7755
Wasserstoffperoxid 30 % in Wasser	Merck, Darmstadt
D-Xylose	Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

Allergene und Peptide

rPru a 1: ein rekombinantes Nichtfusionsprodukt wurde von Prof. Nerkamp (Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt.

rAra h 2: eine Probe wurde von Dr. Becker (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt.

Erdnusslectin: Sigma, Steinheim

Das Kontrollpeptid ILDGDNLFPKVAPQA (Bet v 1 aa 24-38) wurde von Prof. Vieths (PEI, Langen) zur Verfügung gestellt.

Antikörper

Kaninchen-Anti-human-IgE: DAKO, Hamburg

Anti-Kaninchen-Ig-Biotin: DAKO, Hamburg, Nr. E 0432

Streptavidin-alkalische-Phosphatase: Medac, Wedel, Nr. SA 1008

Anti-Human-IgE-alkalische-Phosphatase: Pharmingen, Heidelberg, Nr. 555859

Ziege-anti-Kaninchen-IgG-alkalische-Phosphatase: Dianova, Hamburg

Sera

Aus Datenschutzgründen werden nur die Codebezeichnungen der Spender genannt. Alle Sera entstammen den Serabibliotheken des PAUL-EHRLICH-Instituts, Langen, des Forschungszentrums Borstel und einer eigenen Serasammlung der DFA.

Kirsche-Poolserum: Pool aus PEI 50, 79, 147, 160 und 165 zu gleichen Teilen

Erdnussallergiker: PEI 163

Erdnuss-Poolserum: Pool aus JG 3, HF 4, JB 5, SK 26 und GK 31 zu gleichen Teilen

Nichtallergiker: DFA 01 und DFA 02

Polyklonales Kaninchenserum gegen Ara h 2, polyklonales Kaninchenserum gegen MAP3 und MAP4, anti-Ara h 6-Kaninchenserum sowie die Kaninchen-Präimmunsera: Dr. Becker, Borstel

Kits

„Spezifischer IgE-ELISA-Testkit“, Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek

Färbekit PNPP auf alkalische Phosphatase, Biorad, München, Nr. 172-1063

Nitroblue-Tetrazolium-Färbekit, Biorad, München, Nr. 170-6432

LMW-Marker (low molekular weight marker), Fa. Pharmacia: 94 kDa (Phosphorylase b aus Kanninchenmuskel); 67 kDa (Rinderserumalbumin); 43 kDa (Ovalbumin); 30 kDa (Carbonische Anhydrase aus Rindererythrocyten) 20,1 kDa (Trypsininhibitor aus Sojabohnen); 14,1 kDa (α -Lactalbumin)

Puffer

PBS: 0,15 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 6,8
 TBS: 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4
 TBST 0,3 %: 0,3 % Tween 20 in TBS
 TBST 0,05 %: 0,05 % Tween 20 in TBS
 TBSTB 1 %: 1 % BSA in TBST 0,05 %
 TBSTB 0,1 %: 0,1 % BSA in TBST 0,05 %
 CBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Zitronensäure, pH 7,0
 CBS-Substratpuffer: CBS + 5 mM MgCl₂, pH 7,0
 Strippingpuffer: 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 0,5 % 2-Mercapto-1-ethanol in TBS, pH 7,0 mit Essigsäure einstellen

Lower-Tris-Puffer pH 8,8:

Tris	36,34 g
SDS-Lösung 20 %	4,0 mL

pH mit konz. HCl auf 8,8 einstellen, ad 200 mL Millipore-Wasser

Upper-Tris-Puffer pH 6,8:

Tris	6,06 g
SDS-Lösung 20 %	2,0 mL

pH mit konz. HCl auf 6,8 einstellen, ad 100 mL Millipore-Wasser

Probenpuffer für SDS-PAGE 4fach:

SDS-Lösung 20 %	5,0 mL
Glycerin 99+ %	5,0 mL
1 M Tris-HCl pH 6,8	4,0 mL
Bromphenolblaulösung 0,2 %	0,5 mL
2-Mercapto-1-ethanol	2,5 mL
Millipore-Wasser	8,0 mL

Laufpuffer für SDS-PAGE 10fach:

Glycin	360,0 g
Tris	77,5 g

ad 2500 mL demin. Wasser; bei Raumtemperatur stabil

Laufpuffer für SDS-PAGE einfach:

Laufpuffer 10fach	50,0 mL
SDS-Lösung 20 %	2,5 mL

ad 500 mL demin. Wasser

3.1.2 Materialien

Mikrotiterplatten: NUNC GmbH & Co KG, Wiesbaden, Art.-Nr. 269 620

CovaLink-Platten NH: NUNC GmbH & Co KG, Wiesbaden, Art.-Nr. 478 042

Plattendeckel: NUNC GmbH & Co KG; Wiesbaden, Art.-Nr. 263 339

Nitrocellulosemembran 0,45 µm: Schleicher und Schüll, Dassel

PVDF-Membran: Millipore, Eschborn

Bromcyanaktivierte Nitrocellulose: Dr. Becker, Borstel

Bromcyanaktivierte Papierscheiben: Schleicher und Schüll, Dassel

Kieselgel 60-Fertigplatten Alu GF₂₅₄: Merck, Darmstadt

Kieselgel 60-Fertigplatten 0,5 mm o. Fluoreszenzindikator: Merck, Darmstadt

Safe-Lock-Caps 0,5 mL: Eppendorf

RP18-Kartuschen: Waters, Eschborn, WAT 051910

Kieselgel 60: Merck, Darmstadt

Ionenaustauscher DOWEX WX 8: Serva, Heidelberg

3.2 Analytische Geräte

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC: BIO-TEK Instruments, Eching

Pumpe: HPLC System 522, BIO-TEK Instruments, Eching

Injektor: Sechs-Wege-Ventil Nr. 7725, Rheodyne

Probenschleife: 100 µL

Trennsäule: Nukleosil 100 C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)

Fluss: 1,6 mL/min

Detektoren: HPLC 540+ Diode Array Detector, BIO-TEK Instruments, Eching

Steuerung und

Datenverarbeitung: Kroma 3000, BIO-TEK Instruments, Eching

Programm Peptide: von 0 % B in 80 min auf 80 % B

Programm Würzburg: in 30 min von A/B 5/95 auf A/B 80/20, dann in 10 min auf A 100, dann 5 min isokratisch, dann in 5 min auf A/B 5/95

Laufmittel: wenn nicht anders angegeben A: TFA 0,1 % und B: Acetonitril

Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

Gerät: Finnigan LCQ-Massenspektrometer mit Finnigan Electrospray Ionisation-Interface (ESI), Finnigan, Bremen

ESI-Interface: Quarzkapillare 200°C; Kapillarspannung 46 V; Spray-Spannung 4,5 kV; Sheathgas Stickstoff 5,0 (70 psi); Hilfsgas Stickstoff 5,0 (10 psi)

Scanbereich: 50-2000 m/z

Fluss: 0,8 mL/min

Injektion: Loop

Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-Of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Gerät Biflex 3, Bruker, Rheinstetten

Matrix: α -Cyanohydroxyzimtsäure; Dry-Droped-Präparation

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Gerät AMX 400, Bruker, Rheinstetten

Standard TMS oder Lösungsmittel

ELISA-Reader

Microplate Reader Spectramax 340, Molekular Devices, Ismaning

Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte durch das Programm SOFT max PRO 2.4.

MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Denkendorf

Automatischer EDMAN-Sequenator

Model: Procise 492, Applied Biosystems, Weiterstadt, Pulsed-Liquid-Modus

HPLC-System: Model 140c Microgradient Delivery System

Trennsäule: Nucleosil C-18, 5 μ m (200 mm \times 2,1 mm); 55 °C

Elutionssystem: A: 1000 mL 3,5 % THF + 22 mL Premix Buffer
B: Acetonitril/2-Propanol (9/1; v/v)

Fluss: 325 μ L/min

Detektor: 785A Programmable Absorbance Detector bei 269 nm

Programm: The Model 610A

Aufgabemenge: 50-100 pmol in 10 μ L TFA 0,1 %

3.3 Weitere Geräte

Peptidsynthesizer: Applied Biosystems 431 A, Weiterstadt

Betrieb im Programm Fmoc-Small-Scale

Mikrotiterplattenwascher: Columbus Washer, TECAN, Crailsheim

Ozonisator: Ozon Generator 502, Fischer

PCR-Cycler: Uno Thermoblock, Biometra, Heidelberg

Elektrophoresezelle: MiniPROTEAN Elektrophoresesystem, Biorad, München

3.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

3.4.1 Durchführung der Modellansätze

3.4.1.1 Allergen/Peptide-Kohlenhydrat-Reaktionsmischungen

Allergen-Lösungen

rPru a 1: 1 mg/mL in PBS

Erdnusslectin: 1 mg/mL in PBS

rAra h 2: Resuspension von 280 μ g Lyophilisat in 1 mL bidest. Wasser

Peptide: 1 mg/mL HPLC-gereinigtes und lyophilisiertes Peptid in PBS

Kohlenhydrat-Lösungen

Maltose, Ribose, Xylose, Glucose, Fructose, Glycerinaldehyd, Glyoxal und

Methylglyoxal je 100 mM in PBS

Stärke 18 mg/mL in PBS

Je 150 μ L Protein/Peptid-Lösung und 150 μ L Kohlenhydrat-Lösung werden in Safe-Lock-Caps gemischt und im PCR-Cycler bei 95 °C mit Deckelheizung (110 °C) erhitzt.

3.4.1.2 Aufreinigung von Bräunungsansätzen und Peptid-Lösungen mit RP-C18-Kartuschen

RP-C18-Kartuschen werden mit Acetonitril (2 mL) konditioniert und mit bidest. Wasser (10 mL) gespült. Dann wird der Bräunungsansatz (200 μ L, entspricht 100 μ g Peptid) bzw. Peptid-Lösung (entsprechend 100 μ g Peptid) aufgeben. Verunreinigungen wie Puffer, Salze, Zucker und Dicarbonylverbindungen werden mit bidest. Wasser (1 mL) entfernt, die Peptide mit 20 %igem Acetonitril in einen 5 mL-Messkolben eluiert.

3.4.1.3 Allergen/Polyphenole/PPO-Reaktionsmischungen

Je 150 μL Allergen-Lösung (1 mg/mL in PBS; bei rAra h 2 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in bidest. Wasser) und 150 μL Polyphenol-Lösung (5 mM in PBS) werden in Safe-Lock-Caps gemischt, mit 5 μL Tyrosinase-Lösung (0,5 mg/mL in PBS) und bei 30 min bei RT bzw. im PCR-Cycler bei 95 $^{\circ}\text{C}$ mit Deckelheizung (110 $^{\circ}\text{C}$) inkubiert. Für Kontrollexperimente wird entweder die Polyphenol-Lösung oder die Tyrosinase-Lösung durch PBS ersetzt.

3.4.1.4 Peptide/Polyphenole/PPO-Reaktion an fester Phase

Die über RP-Kartuschen entsalzten Peptide werden in Wasser gelöst und je 500 ng/well nach 2.4.2.3 an CovaLink-Platten gebunden. Nach Blockieren und Waschen mit bidest. Wasser wird Epicatechin-Lösung (1 mM in PBS; 100 $\mu\text{L}/\text{well}$) und Tyrosinase-Lösung (0,5 mg/mL; 5 $\mu\text{L}/\text{well}$) zugesetzt und 3 h bei RT inkubiert. Für Kontrollexperimente wird entweder die Polyphenol-Lösung oder die Tyrosinase-Lösung durch PBS ersetzt. Danach wird dreimal mit 300 μL bidest. Wasser pro Kavität gewaschen, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Dann wird jede Kavität dreimal mit TBST 0,05 % gespült, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Die Platten werden sofort zum ELISA eingesetzt.

3.4.1.5 Carboxymethylierung von Allergenen

Allergene, Glyoxylsäure und Natriumcyanoborhydrid werden im molaren Verhältnis von 1:100:200 umgesetzt. Hierzu werden 150 μL Allergen-Lösung (1 mg/mL in PBS; bei rAra h 2 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in bidest. Wasser), 75 μL Glyoxylsäure-Lösung in PBS und 75 μL Natriumcyanoborhydrid-Lösung in PBS gemischt und übernacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wird mit PBS verdünnt und ein ELISA an MixiSorb-Platten durchgeführt (3.4.2.4).

3.4.2 Immobilisierung von Proteinen und Peptiden

3.4.2.1 Kupplung von Peptiden und Proteinen an bromcyanaktivierte Nitrocellulose mit Detektion einer IgE-Bindung (DotBlot)

Bromcyanaktivierte Nitrocellulose wird in 5 mm breite Streifen geschnitten und die Oberseite markiert. Je 1 μL Peptid- oder Protein-Lösungen (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in TBS; entspricht 100 ng) wird auf den Streifen pipettiert. Dann werden die Streifen mind. 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die Streifen werden in Mikroinkubationsschale oder kleinen Reagenzgläsern dreimal je 10 Minuten mit TBST 0,05 % gewaschen und dann abgesaugt. Freie

Bindungsstellen werden durch Inkubation der Streifen in TBST 0,3 % (zweimal je 15 Minuten) abgesättigt. Anschließend wird dreimal je 10 Minuten mit TBST 0,05 % gewaschen. Die Streifen werden nun mit verdünntem Serum (600 µL in TBST 0,1 %) in Mikroinkubationsschalen verschlossen über Nacht auf dem Orbitalschüttler inkubiert, anschließend gewaschen und abgesaugt.

Mit Humansera behandelte Streifen werden 4 Stunden mit 1 mL anti-Human-IgE-alkalische-Phosphatase 1:750 in TBST 0,05 % inkubiert. Mit Kaninchenserum behandelte Streifen werden eine Stunde mit 1 mL anti-Kaninchen-Ig-Biotin 1:6000 in TBST 0,05 % inkubiert, gewaschen, abgesaugt und dann 30 Minuten mit 1 mL Streptavidin-alkalische-Phosphatase 1:3000 in TBST 0,05 % behandelt.

Danach werden alle Streifen abgesaugt und gewaschen. Die Streifen werden in ein Färbebad aus dem Nitroblue-Tetrazolium-Färbekit nach Anweisung des Herstellers gelegt und bis zur deutlichen Färbung inkubiert. Anschließend werden die Streifen zweimal 10 Minuten in destilliertes Wasser verbracht, um die Reaktion abubrechen. Die Streifen werden über Nacht getrocknet und dann zwischen Klarsichtfolien eingescannt.

3.4.2.2 Kopplung von Allergenen an bromcyanaktivierte Papierscheiben

Die Scheiben werden in 0,1 M NaHCO₃ (167 µL/Scheibe) 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert, abgesaugt, im gleichen Volumen 0,1 M NaHCO₃ aufgenommen und tropfenweise unter Umschütteln mit Allergen-Lösung bzw. Bräunungsansatz versetzt (in der Regel 500 ng Allergen pro Scheibe). Die Scheiben werden über Nacht bei 4 °C auf einem Kreisschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Allergenslösung abgesaugt und die Scheiben mit 0,1 M NaHCO₃ (167 µL/Scheibe) versetzt, 10 Minuten umgeschwenkt und die Flüssigkeit abgesaugt. Dieser Vorgang wird wiederholt. Dann werden die Scheiben mit Desaktivierungslösung (0,1 M Ethanolamin in 0,1 M NaHCO₃; 167 µL/Scheibe) versetzt und 2 h bei RT auf dem Kreisschüttler inkubiert. Danach wird abgesaugt und nochmals eine Stunde mit Desaktivierungslösung behandelt. Im Anschluss wird der Ansatz zweimal je 10 Minuten mit 0,1 M NaHCO₃ (167 µL/Scheibe) 5 Minuten gewaschen und abgesaugt. Die Allergenscheiben werden zweimal 30 Minuten in Acetatpuffer (5 mM; 167 µL/Scheibe) und danach in PBS (150 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4; 167 µL/Scheibe) inkubiert. Die Scheiben können nun direkt zum Test eingesetzt werden, für sehr kurze Zeit bei 4 °C in PBS aufbewahrt werden oder durch Lyophilisieren getrocknet werden. Nach dem Lyophilisieren werden die Scheiben bei -20 °C gelagert.

3.4.2.3 Kupplung von Peptiden und Proteinen an Covalink-Platten

Peptide und Bräunungsansätze werden nach 3.4.1.2 aufgereinigt, Allergene in bidest. Wasser gelöst. Die gewünschte Stoffmenge an Protein bzw. Peptid wird mit Sulfo-NHS (9,2 µg/µg

Protein/Peptid) in 50 μL bidest. Wasser in die Kavitäten verteilt und die Reaktion durch Zugabe von EDC (61,5 μg in 50 μL bidest. Wasser, frisch bereitet) gestartet. Die Platte wird zwei Stunden bei RT abgedeckt stengelassen. Danach wird dreimal mit 300 μL bidest. Wasser pro Kavität gewaschen, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Pro Kavität werden 300 μL TBSTB 1 % einpipettiert und die Platte abgedeckt für 1 h bei RT stehen gelassen. Dann wird jede Kavität dreimal mit TBST 0,05 % gespült, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Die Platten werden sofort zum ELISA eingesetzt.

3.4.2.4 Belegung von MaxiSorb-Platten mit Allergenen

Die gewünschte Stoffmenge an Protein wird in 50 μL TBS in die Kavitäten verteilt und 2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird dreimal mit 300 μL TBS pro Kavität gewaschen, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Pro Kavität werden 300 μL TBSTB 1 % einpipettiert und die Platte abgedeckt für 1 h bei RT stehen gelassen. Dann wird jede Kavität dreimal mit TBST 0,05 % gespült, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Die Platten werden sofort zum ELISA eingesetzt.

3.4.3 ELISA

3.4.3.1 Direkter ELISA

In belegte Platten (CovaLink-Platten nach Kap. 3.4.2.3 bzw. Maxisorb-Platten nach Kap. 3.4.2.4) oder mit belegten Filterpapierscheiben versehene Polystyrol-Mikrotiterplatten werden 50 μL Serum (verdünnt in TBSTB 0,1%) pro well einpipettiert und über Nacht bei 4 °C abgedeckt inkubiert. Danach wird dreimal mit TBST 0,05 % gewaschen, beim dritten Mal 15 min stehen gelassen und ausgeklopft. Bei humanen Sera werden 50 μL Kaninchen-anti-human-IgE 1:4000 in TBST 0,05 % zugegeben, 1 h bei RT inkubiert und dreimal mit TBST 0,05 % gewaschen. Bei Kaninchensera wird dieser Schritt übersprungen. Dann werden 50 μL anti-Kaninchen-Ig-Biotin 1:6000 in TBST 0,05 % einpipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Danach wird dreimal mit TBST 0,05% gewaschen. Es folgt die Zugabe von 50 μL Streptavidin-AP 1:3000 in TBST 0,05 % pro Kavität für 1 h bei RT. Die Kavitäten werden wieder dreimal mit TBST 0,05 % gewaschen. Die Farbreaktion erfolgt durch Zugabe von 100 μL Substrat aus dem PNPP-Färbekit der Fa. Biorad. Es wird bis zur gewünschten Farbdichte, längstens jedoch 90 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert und dann durch Zugabe von 100 μL 1 N NaOH abgebrochen. Die Extinktion wird am ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt. Im Fall von Papierscheiben werden 150 μL der Farblösung pro well auf eine zweite Polystyrol-Mikrotiterplatte übertragen und dann vermessen.

Alle Versuche werden als Doppelerperimente mit Blindwertkontrolle durchgeführt.

Bildwert NSB (nichtspezifische Bindung): anstelle mit Serum erfolgt Inkubation mit TBSTB 0,1 %.

Blindwert „0“: es werden Kavitäten ohne Allergen/Peptid mit Serum inkubiert.

3.4.3.2 Enzym-Allergosorbens-Test (EAST); Inhibitionsversuche

Der Versuch lehnt sich an Vieths (1993, 2000) an.

Inhibitorverdünnungsreihe

Allergen-Lösungen bzw. Bräunungsansätze werden mit TBSTB (0,3% BSA; 0,5% Tween 20) stufenweise im Verhältnis 1:5 verdünnt.

ELISA

Der ELISA folgt gemäß Kap. 3.4.3.1. Vor Zugabe der Sera werden 50 µL der verdünnten Inhibitoren einpipetiert. Die Kavitäten mit dem Kontrollwert NSB enthalten keinen Inhibitor und kein Serum, sondern 100 µL TBSTB (0,3 % BSA; 0,5 % Tween 20). Die Kavitäten mit dem Kontrollwert B0 enthalten statt des Inhibitors 50 µL TBSTB (0,3 % BSA; 0,5 % Tween 20). Anschließend wird in jede Kavität bis auf NSB 50 µL verdünntes Serum pipetiert. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgt wie unter Punkt 3.4.5 angegeben. Die Auswertung erfolgt computergestützt. Für jede Inhibitorverdünnung kann eine prozentuale Hemmung gemäß der Formel

$$\text{Hemmung [\%]} = (\text{B0-Extinktion})/(\text{B0-NSB}) \times 100\%$$

berechnet werden.

Für jeden Inhibitor wird die prozentuale Hemmung gegen die Konzentration bzw. Verdünnungsstufe (logarithmische Skala) aufgetragen. Im Idealfall erhält man sigmoide Kurvenverläufe, aus denen sich bei 50 %iger Hemmung ein IC₅₀-Wert ableiten lässt.

3.4.4 Elektrophoresen

3.4.4.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE werden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970).

Herstellung von Sammel- und Trenngel

Lower-Tris-Puffer pH 8,8 und Upper-Tris-Puffer pH 6,8: s. Punkt 3.1.1

Ammoniumperoxodisulfatlösung: 20 mg/mL

Bromphenolblaulösung: 2 mg/mL

Lowergel-Mischung für SDS-PAGE (ergibt Trenngel): 12,5 %

Acrylamidlösung 30 % 8,4 mL

Millipore-Wasser 5,9 mL

Lower-Tris-Puffer	5,0 mL
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- ethylendiamin	20 µL

werden gemischt und kurz vor dem Gießen des Geles mit Ammoniumperoxodisulfatlösung (700 µL) versetzt; von dieser Masse werden 6,9 mL pro Platte eingegossen, mit *iso*-Butanol (200 µL) überschichtet und ausgehärtet; *iso*-Butanol wird abgegossen, mit Wasser nachgespült und die Geloberkante mit Filterpapier nachgetrocknet. Diese Menge reicht für zwei Gelplatten.

Uppergel-Mischung für SDS-PAGE (ergibt Sammelgel): 4 %

Acryllösung 30%	1,3 mL
Millipore-Wasser	5,8 mL
Upper-Tris-Puffer	2,5 mL
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- ethylendiamin	20 µL

Bromphenolblaulösung 40 µL

werden gemischt und kurz vor dem Gießen des Geles mit Ammoniumperoxodisulfatlösung (400 µL) versetzt. Die Menge reicht für zwei Gelplatten.

Probenvorbereitung

Ein Volumenteil Proteinlösung wird mit drei Volumenteilen Probenpuffer (s. 3.1.1) in einem 500 µL-Eppendorf-Cap vermischt und im Thermomixer bei 99 °C 5-10 Minuten erhitzt. Anschließend werden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert. Aufgabemenge: 3 µg Protein.

Elektrophoresebedingungen

Laufpuffer s. Punkt 3.1.1

Die Trennung im Laufpuffer erfolgt bei 60 V, bis die Bromphenolblaufront das Sammelgel verlassen hat, ab dann bei 100 V. Sobald die blaue Farbstoffbande das untere Gelende erreicht hat, wird der Strom abgeschaltet.

Färbung

Coomassie-Färbereagenz:

Methanol	450 mL
demin. Wasser	450 mL
Eisessig	100 mL
Coomassie Blau G 250	500 mg

Das Gel wird vorsichtig in ein Färbebad überführt und darin eine Stunde unter sachter Bewegung belassen. Danach wird das Gel zur Entfärbung in ein Bad aus 10 %iger Essigsäure

gelegt. Die Entfärbung erfolgt über mehrere Stunden bzw. über Nacht. Das feuchte Gel wird zwischen farblosen Kunststofffolien eingescannt.

3.4.4.2 Western-Blot

Das Blotten erfolgt entweder auf eine Nitrocellulosemembran mittels Semidry-Blotting (Kyhse-Andersen, 1984) mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ über 30 min oder auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn, Germany) mittels Tank-Blotting gemäß den Anweisungen des Herstellers. Nitrocellulosemembranen werden in TBST 0,05 % für eine Stunde blockiert. Anschließend wird dreimal je 10 Minuten mit TBST 0,05 % gewaschen. PVDF-Membranen werden in einer 5 %igen Lösung von fettfreiem Milchkpulver in TBS blockiert. Die Inkubation mit Sera erfolgt wie unter Punkt 3.4.2.1 (Humansera 1:10, Kaninchensera $1:2 \times 10^7$). Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgt ebenso analog Punkt 3.4.2.1.

3.4.5 Peptidfestphasensynthesen

3.4.5.1 Festphasensynthese von Peptiden an WANG-Harz

Die Synthese erfolgt am Festphasen-Peptidsynthesizer nach den Anweisungen des Herstellers im „small scale“-Betrieb an 100 - 150 μmol WANG-Harz-Äquivalenten. Es wird grundsätzlich je 1 mmol der entsprechenden Fmoc-Aminosäuren eingesetzt und aktiviert, so dass sich ein bis zu 10facher Überschuss an Aminosäure ergibt. Teure und selbst synthetisierte Bausteine können auch in geringerem (3-5fachem) Überschuss eingesetzt werden.

Die erste Aminosäure wird mittels DCC (1 mmol) und DMAP (0,1 mmol) an das Harz gebunden. Alle weiteren Aminosäuren werden mittels DCC (1 mmol) und HOBt (1 mmol) aktiviert. Fmoc-Schutzgruppen werden mittels Piperidin (20 % in NMP) abgespalten.

3.4.5.2 Festphasensynthese von Peptiden an 2-Chlortritylchlorid-Harz

Die erste Aminosäure wird ohne Aktivierung von Hand an das Harz gebunden. Hierzu werden 1,2 eq Fmoc-Baustein (relativ zum Harz) und 4 eq DIPEA in einem 10 mL-Spitzkolben (bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und im Exsiccator abgekühlt) eingewogen und in DCM (10 mL pro Gramm Harz) gelöst. Dann wird das Harz zugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Das Harz wird in einer G3-Fritte trocken gesaugt, mit $3 \times 10 \text{ mL}$ DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1 v/v/v), $3 \times 10 \text{ mL}$ DCM, $2 \times 10 \text{ mL}$ DMF und $2 \times 10 \text{ mL}$ DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Das Harz wird in den Peptidsynthesizer gegeben und alle weiteren Aminosäuren mit dem Programm für „prelabeled resins“ angehängt.

3.4.5.3 Austausch der N-terminalen Fmoc-Gruppe gegen Boc

Die Einführung der N-terminalen Boc-Gruppe erfolgt am Synthesizer automatisch durch Einstellung zweier weiterer Cartridges mit je 1 mmol Boc₂O.

3.4.5.4 Abspaltung N-terminaler Fmoc-Gruppen von Hand

Das Harz wird in Portionen von maximal 500 mg viermal mit Piperidin (2 mL 20 %ige Lösung in DMF oder NMP) für je 3 min behandelt und anschließend mit 5 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL NMP und 5 x 3 mL DCM gewaschen.

3.4.5.5 Kondensation von Fmoc-Aminosäuren oder Fragmenten von Hand

Die Fmoc-Aminosäure oder das geschützte Fragment (1 eq) wird in einem Kolben (bei 120 °C getrocknet) in wenig DCM/DMF (1/1 v/v) gelöst und mit 1 eq HOBt versetzt. Dann wird 1 eq DIPCDI zugesetzt und verschossen unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit 10 min gerührt. Diese Mischung wird nun zum Harz gegeben und 60 min unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit vorsichtig geschüttelt. Danach wird abfiltriert, das Harz mit 5 x 5 mL DCM, 3 x 5 mL NMP und 5 x 5 mL DCM gründlich gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3.4.5.6 Selektive Abspaltung von Dde- und ivDde-Gruppen

Das Harz wird mit einer Lösung von 2 % Hydrazin-Hydrat in DMF (25 mL pro Gramm Harz) 3 min gerührt und dann abfiltriert. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Danach wird das Harz mit DMF so lange gewaschen, bis der Ablauf neutral reagiert. Vor allem bei größeren Peptiden ist die Entfernung der (iv)Dde-Gruppe oft nicht quantitativ. Daher empfiehlt sich hier, die Behandlung mit Hydrazin auf 3 x 10 min auszudehnen.

3.4.5.7 Spaltung von Peptiden von WANG-Harz unter Entfernung aller Schutzgruppen

Spaltungsreagenzien

normale Peptide: TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v)

Peptide mit Cys und Met: TFA/Wasser/1,2-Ethandithiol/TIS (94/2,5/2,5/1 v/v/v/v)

Das *in vacuo* über KOH getrocknete Harz wird mit dem Spaltungsreagenz (10 mL pro Gramm Harz) 90 min bei RT gerührt. Das Harz wird durch Filtrieren über eine Fritte unter Nachspülen mit TFA (1 mL) und DCM (20 mL) von der Peptidlösung abgetrennt. Die flüssige Phase wird bei max. 40 °C am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das Peptid wird

durch Zugabe von eiskaltem *tert.*-Butylmethylether (bis zu 50 mL) ausgefällt und die Mischung 30 min bei -25°C aufbewahrt. Das Rohprodukt wird mittels einer G4-Fritte abgetrennt, mit kaltem *tert.*-Butylmethylether gewaschen und im Vakuumexsiccator über KOH getrocknet, anschließend in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Mirkoausführung dieser Vorschrift

Die Harzbeads werden in einem 500 µL-Eppendorf-Cap mit Spaltungsreagenz (200-500 µL) versetzt und 90 min ab und zu geschüttelt. Dann wird über eine mit wenig Glaswolle gefüllte Pasteur-Pipette in ein 2 mL-Cap filtriert und mit DCM (1 mL) nachgespült. Die Flüssigkeit wird im Stickstoffstrom weitgehend abgeblasen und der Rückstand mit *tert.*-Butylmethylether (1,5 mL) versetzt. Nach 30 min bei -25 °C wird das ausgefallene Peptid abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

3.4.5.8 Spaltung von Peptiden von 2-Chlortritylharzen unter Erhalt aller Schutzgruppen

Das Harz wird mit Hexafluorisopropanol/DCM (1/4 v/v; 10 mL pro Gramm Harz) 5 min gerührt, abfiltriert und solange mit DCM gewaschen, bis das Harz blaugrün wird. Die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei maximal 40 °C bis zur Trockene eingengt (Bollhagen *et al.*, 1994).

3.4.5.9 Peptid-Spot-Library

Die Ara h 2-Spot-Bibliothek wird gemäß dem Protokoll von Frey und Schmidt (im Druck) als überlappende Pentadecapeptide mit einem offset von zwei Aminosäuren synthetisiert. Die Peptidsequenzen werden automatisiert mit einem ABIMED ASP 422 Peptidesynthesizer (ABIMED, Langenfeld) auf säureresistentem Whatman 540 Cellulose Filterpapier mit β -Alanin- β -alanin-Spacern gemäß der Fmoc/O^tBu-Strategie aufgebaut. Für β -Alanin wird der Baustein Fmoc- β Ala-OH, für Cystein-Reste der Baustein Fmoc-Cys(Acm)-OH verwendet. Die freien N-Termini werden mit Essigsäureanhydrid acetyliert und die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten durch Behandlung mit TFA entfernt. Die Inkubation mit Sera und die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgt nach der Methode von Frank und Overwin (1996). Hierzu wird die Membran zunächst mit MBS-Blockierungspuffer (Sigma, Steinheim) über Nacht inkubiert und anschließend mit TBST 0,05 % für 30 min gewaschen. Die Inkubation mit Sera erfolgt wie unter Punkt 3.4.2.1 beschrieben in MBS-Puffer (Humansera 1:10, Kaninchensera 1:100.000). Die Antikörperdetektion erfolgt im Falle von Humansera mit anti-human-IgE-AP-Konjugat aus dem „Spezifischen IgE-ELISA-Testkit“ von Allergopharma (1:2000 in MBS), im Falle von Kaninchensera mit Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat (1:5000 in MBS). Nach Spülen mit TBST 0,05 % wird zweimal mit CBS

gewaschen. Die Färbung erfolgt mit MTT/BCIP in CBS-Substratpuffer oder dem PNPP-Färbekit der Fa. Biorad bis zur gewünschten Intensität, dann wird mit TBS gewaschen und zwischen Klarsichtfolien eingescannt.

Zum Wiederverwendung der Membranen können diese nach der Methode von Frey und Schmidt (im Druck) von Farbstoffen und Antikörpern befreit werden. Hierzu werden diese zuerst in nassem NMF im Ultraschallbad, dann mit Strippingpuffer behandelt und abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.5 Synthesen

3.5.1 Synthese von Standard-Peptiden

Die Synthesen erfolgen gemäß Kapitel 3.4.5.1 am Festphasen-Peptidsynthesizer an 100 μmol WANG-Harz-Äquivalenten. Die Spaltung der Peptide vom Harz verläuft gemäß Kapitel 3.4.5.7. Ein Teil des Rohpeptides wird durch RP-HPLC (Programm „Peptide“) aufgereinigt. Pro Lauf werden 500-2000 μg Rohpeptid chromatographiert und das saubere Produkt gefriergetrocknet. Diese gereinigten Peptide werden dann für die Bräunungsansätze bzw. Bioassays verwendet. Im Folgenden beziehen sich - wenn nicht anders vermerkt - alle Retentionszeiten der HPLC auf das Programm „Peptide“.

YERDPYSPSQ (P1)

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** 84 % **R_t HPLC:** 25,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1241,6 (100) [M+H]⁺, 911,5 (11) [b₇]⁺, 621,2 (11) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1241: m/z (%) 1241,4 (16) [M+H]⁺, 1224,5 (100) [y₁₀-NH₃]⁺, 1113,4 (13), 1095,4 (10) [b₉]⁺, 949,5 (40) [y₈]⁺, 911,3 (9) [b₇]⁺, 824,4 (6) [b₆]⁺, 678,1 (6) [y₆]⁺, 564,1 (88) [b₄]⁺, 449,0 (3) [b₃]⁺

SQDPYSPSPY (P2)

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** >90 % **R_t HPLC:** 27,5 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1162,5 (17) [M+Na]⁺, 1140,3 (100) [M+H]⁺, 925,3 (7) [y₈]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1140: m/z (%) 1140,3 (5) [M+H]⁺, 1122,3 (71) [b₁₀]⁺, 924,9 (82) [y₉]⁺, 862,1 (100) [b₈]⁺, 810,3 (91) [y₇]⁺, 678,3 (50) [b₆]⁺, 612,4 (26), 530,8 (21)

LQGDRRCQSQLERAN (P3)

Ausbeute: 72 % **Reinheit:** 68 % **R_t HPLC:** 22,5 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1774,0 (31) [M+H]⁺, 1183,2 (8) [2M+3H]³⁺, 887,8 (100) [M+2H]²⁺, 592,6 (9) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1774: m/z 1774,1 (23) [M+H]⁺, 1756,1 (100) [b₁₅]⁺, 1739,1 (12) [b₁₅-NH₃]⁺, 1722,1 (7) [b₁₅-2NH₃]⁺, 1705,1 (2) [b₁₅-3NH₃]⁺, 1533,0 (2) [y₁₃]⁺, 1414,9 (2) [b₁₂]⁺, 1360,9 (6) [y₁₁]⁺, 957,7 (2) [b₈]⁺, 817,6 (2) [y₇]⁺, 726,6 (3) [b₆]⁺

RDEDSYERDPYSPSQ (P4)

Ausbeute: 82 % **Reinheit:** 78 % **R_t HPLC:** 24,5 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1844,6 (9) [M+H]⁺, 922,7 (100) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1844: m/z (%) 1844,6 (17) [M+H]⁺, 1826,6 (100) [b₁₅]⁺, 1687,6 (5) [y₁₄]⁺, 1572,5 (12) [y₁₃]⁺, 1443,6 (4) [y₁₂]⁺, 1328,5 (19) [y₁₁]⁺, 1166,4 (14) [b₉]⁺, 1149,4 (9) [b₉-NH₃]⁺, 949,5 (5) [y₈]⁺, 895,4 (2) [b₇]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 923: m/z (%) 1687,6 (4) [y₁₄]⁺, 1572,5 (8) [y₁₃]⁺, 1443,4 (7) [y₁₂]⁺, 1328,4 (79) [y₁₁]⁺, 1166,4 (52) [b₉]⁺, 1149,4 (48) [b₉-NH₃]⁺, 1051,4 (12) [b₈]⁺, 949,4 (26) [y₈]⁺, 895,3 (47) [b₇]⁺, 766,3 (11) [b₆]⁺, 678,2 (44) [y₆]⁺, 583,9 (41) [b₉]²⁺, 516,2 (100) [b₄]⁺, 418,1 (5) [y₄]⁺, 401,1 (12) [b₃]⁺, 331,1 (17) [y₃]⁺

PYSPSQDPYSPSPYD (P5)

Ausbeute: 85 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 29,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1699,4 (100) [M+H]⁺, 1306,4 (9) [b₁₂]⁺, 1122,3 (11) [b₁₀]⁺, 1035,3 (5) [b₉]⁺, 850,5 (81) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1699: m/z (%) 1699,4 (12) [M+H]⁺, 1681,5 (58) [b₁₅]⁺, 1566,5 (48) [b₁₄]⁺, 1439,3 (46) [y₁₃]⁺, 1352,4 (54) [y₁₂]⁺, 1306,4 (40) [b₁₂]⁺, 1219,4 (5) [b₁₁]⁺, 1122,3 (49) [b₁₀]⁺, 1040,3 (11) [y₉]⁺, 1035,3 (17) [b₉]⁺, 925,3 (100) [y₈]⁺, 907,3 (8), 775,2 (16) [b₇]⁺, (4) 665,2 [y₆]⁺, 578,2 (6) [y₅]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 851: m/z (%) 1439,3 (10) [y₁₃]⁺, 1403,4 (5) [b₁₃]⁺, 1352,4 (22) [y₁₂]⁺, 1306,4 (20) [b₁₂]⁺, 1288,8 (30) [y₁₂-H₂O]⁺, 1219,4 (14) [b₁₁]⁺, 1201,3 (17) [y₁₁-H₂O]⁺, 1122,3 (71) [b₁₀]⁺, 1040,3 (25) [y₉]⁺, 1035,3 (34) [b₉]⁺, 925,3 (81) [y₈]⁺, 907,2 (83) [y₈-H₂O]⁺, 850,2 (22) [M+2H]²⁺, 841,5 (100) [b₁₅]²⁺, 783,9 (40) [b₁₄]²⁺, 775,2 (93) [b₇]⁺, 665,1 (43) [y₆]⁺, 660,2 (31) [b₆]⁺, 578,2 (48) [y₅]⁺, 532,0 (4) [b₅]⁺, 481,2 (12) [y₄]⁺, 445,1 (3) [b₄]⁺, 394,1 (21) [y₃]⁺, 348,1 (17) [b₃]⁺, 261,0 (7) [b₂]⁺

LRPCEQHLMQKIQRDEDS (P6)

Ausbeute: 90 % **Reinheit:** 69 % **R_t HPLC:** 27,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1124,9 (17) [M+Na+H]²⁺, 1113,9 (69) [M+2H]²⁺, 743,5 (100) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1114: m/z (%) 1250,5 (5) [y₁₀]⁺, 1114,2 (4) [M+2H]²⁺, 1105,5 (46) [b₁₈]²⁺, 1061,5 (100) [b₁₇]²⁺, 939,4 (11) [b₁₅]²⁺

Das Rohpeptid enthält größere Mengen der Fehlsequenz LRPCEQHLMQKIQRDEDS (R_t HPLC 29,5 min)

LQGRQQEQQFKRELRNL (P7)**Ausbeute:** 92 % **Reinheit:** 89 % **R_t HPLC:** 33,7 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1448,2 (12) [2M+3H]³⁺, 1086,5 (100) [M+2H]²⁺, 724,9 (14) [M+3H]³⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1087:** m/z (%) 1528,6 (5) [b₁₂]⁺, 1460,6 (4) [y₁₁]⁺, 1332,8 (7) [y₁₀]⁺, 1202,3 (3) [y₉]⁺, 1086,5 (14) [M+2H]²⁺, 1078,3 (100) [y₁₇]²⁺, 1021,3 (13) [b₁₆]²⁺, 840,6 (5) [b₉]⁺, 515,3 (2) [y₄]⁺**RQQWELQGDRRCQSQL (P12)****Ausbeute:** 84 % **Reinheit:** 53 % **R_t HPLC:** 33,0min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1354,3 (16) [2M+3H]³⁺, 1016,3 (100) [M+2H]²⁺, 678,4 (37) [M+3H]³⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1016:** m/z (%) 1303,5 (2) [y₁₁]⁺, 1141,3 (4) [b₉]⁺, 1016,3 (19) [M+2H]²⁺, 1007,2 (100) [b₁₈]²⁺, 890,3 (3) [y₇]⁺**AEDSYEADPYSPSQ (P28)****Ausbeute:** 91 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 26,7 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1673,6 (14) [M+H]⁺, 837,3 (100) [M+2H]²⁺**PYSPSQDPYS (P30)****Ausbeute:** >95 % **Reinheit:** 91 % **R_t HPLC:** 27,9 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1140,3 (100) [M+H]⁺, 775,2 (11) [b₇]⁺, 570,8 (46) [M+2H]²⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1140:** m/z (%) 1140,3 (10) [M+H]⁺, 1122,3 (32) [b₁₀]⁺, 880,2 (42) [y₈]⁺, 793,2 (63) [y₇]⁺, 775,2 (100) [b₇]⁺, 660,1 (9) [b₆]⁺**PYAPSQDPYSPSPYD (P34)****Ausbeute:** 91 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 30,2 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1683,4 (69) [M+H]⁺, 842,6 (100) [M+2H]²⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1683:** m/z (%) 1684,3 (19) [M+H]⁺, 1665,3 (41) [b₁₅]⁺, 1568,3 (43) [y₁₄-H₂O]⁺, 1550,3 (42) [b₁₄]⁺, 1423,3 (33) [y₁₃]⁺, 1352,3 (93) [y₁₂]⁺, 1290,2 (38) [b₁₂]⁺, 1168,2 (7) [y₁₀]⁺, 1106,2 (49) [y₈]⁺, 759,2 (13) [b₇]⁺**PYSPAQDPYSPSPYD (P35)****Ausbeute:** 93 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 31,0 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1683,3 (100) [M+H]⁺, 1290,3 (12) [b₁₂]⁺, 842,5 (48) [M+2H]²⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1683:** m/z (%) 1683,3 (26) [M+H]⁺, 1665,2 (29) [b₁₅]⁺, 1568,3 (30) [y₁₄-H₂O]⁺, 1550,3 (37) [b₁₄]⁺, 1423,3 (32) [y₁₃]⁺, 1336,1 (45) [y₁₂]⁺, 1290,1 (29) [b₁₂]⁺, 1168,1 (5) [y₁₀]⁺, 1106,2 (40) [b₁₀]⁺, 1040,2 (13) [y₉]⁺, 1019,2 (10) [b₉]⁺, 925,2 (100) [y₈]⁺, 759,1 (21) [b₇]⁺

PYSPSQDPYAPSPYD (P36)**Ausbeute:** 87 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 29,7 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1683,3 (100) [M+H]⁺, 1290,3 (20) [b₁₂]⁺, 1106,2 (31) [b₁₀]⁺, 842,5 (79) [M+2H]²⁺, 578 (12) [y₅]⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 1683:** m/z (%) 1683,2 (8) [M+H]⁺, 1665,2 (30) [b₁₅]⁺, 1568,2 (41) [y₁₄-H₂O]⁺, 1550,2 (38) [b₁₄]⁺, 1423,2 (29) [y₁₃]⁺, 1336,2 (39) [y₁₂]⁺, 1290,2 (35) [b₁₂]⁺, 1106,2 (100) [b₁₀]⁺, 1035,2 (17) [b₉]⁺, 909,2 (84) [y₈]⁺, 775,1 (12) [b₇]⁺, 578,0 (9) [y₅]⁺**Leu-Gly-Lys-Ala-Gly (P37)****Ausbeute:** 95 % **Reinheit:** 94 % **R_t HPLC:** 18,8 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 889,2 (49) [2M+H]⁺, 445,2 (100) [M+H]⁺, 223,3 (19) [M+2H]²⁺**ESI-MS/MS pos. von m/z 445:** m/z (%) 445,2 (38) [M+H]⁺, 427,2 (25) [b₅]⁺, 370,2 (91) [b₄]⁺, 350,1 (13), 332,1 (7) [y₄]⁺, 299,1 (100) [b₃]⁺, 275,1 (36) [y₃]⁺**¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ 4.47 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.42 (1H, t, J=6,1 Hz, Lys^α), 4.16 (1H, t, J=7,2, Leu^α), 4.11 (2H, d, J=1,6 Hz, Gly^α), 4.09 (2H, d, J=2,2 Hz, Gly^α), 3.09 (2H, t, J=7,5 Hz, Lys^ε), 2.00-1.74 (7H, komp., Leu^β, Leu^γ, Lys^β, Lys^δ), 1.56 (2H, m, Lys^γ), 1.50 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.07 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu^δ), 1.05 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu^δ)**3.5.2 Synthese von Bausteinen und Derivatisierungsreagenzien****3.5.2.1 (S)-6-((*tert.*-Butoxycarbonyl)-(2-*tert.*-butoxy-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH) (1)**

In einem 250 mL-Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflusskühler, Septum und Rührfisch wird *tert.*-Butanol (0,3 mol, 29,5 mL, getrocknet über Molekularsieb) unter Stickstoff und Rühren mit *N,N*-Dimethylanilin (0,29 mol, 24,1 mL) und DMAP (10 mmol, 1,22 g) in Diethylether (70 mL) versetzt. Bei 5 °C wird langsam Fumarsäuredichlorid (93 mmol, 10,1 mL) in Diethylether (10 mL) zugegeben. Dabei wird die Temperatur unter 15 °C gehalten. Dann wird die Mischung auf RT gebracht, über Nacht gerührt, der schwarz gefärbte Ansatz mit Diethylether verdünnt und filtriert. Anschließend wird mit eiskalter 1 N HCl schnell gewaschen, dann mit gesättigter NaCl-, gesättigter NaHCO₃- und wieder mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleiben schwarze Kristalle, die in Portionen von je ca. 1,5 g in wenig Pentan/Diethylether (90/10 v/v) gelöst und über ein Kieselgelbett (6 cm x 4 cm) mit

Pentan/Diethylether (90/10 v/v) filtriert werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels verbleibt Fumarsäuredi-*tert.*-butylester in Form großer, farbloser Kristalle.

Ausbeute: 26 % (5,49 g)

R_f (SiO₂; Pentan/Ether 90/10 v/v): 0,53

Schmelzpunkt: 69-70 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.67 (2H, s), 1.49 (18H, s)

In einem 100 mL-Dreihalskolben mit Gaseinleitung, Gasableitung, Septum und Rührfisch wird Fumarsäuredi-*tert.*-butylester (16 mmol, 3,7 g) in DCM (50 mL) gelöst. Mittels Trockeneis/2-Propanol wird die Lösung auf -75 °C gekühlt und unter Rühren Ozon bis zur Blaufärbung eingeleitet. Anschließend wird überschüssiges Ozon durch Einleitung von Stickstoff vertrieben, bis eine farblose, klare Lösung entsteht. Durch das Septum wird nun unter Stickstoff, Rühren und Kühlen Dimethylsulfid (50 mmol, 3,7 mL) langsam zugegeben. Die Gaszuleitung wird durch ein Tieftemperaturthermometer ersetzt und der Ansatz langsam auf Raumtemperatur gebracht. Nach Zugabe von Na₂SO₄ wird noch 30 min gerührt. Nach Filtration wird der Ansatz am Rotationsverdampfer von DCM, Dimethylsulfid und DMSO weitestgehend befreit. Man erhält 4,52 g einer schwach gelblichen Lösung. Diese besteht aus ca. 90 Massenprozent Glyoxylsäure-*tert.*-butylester und ca. 10 Massenprozent DMSO (Subasinghe *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1991; Yamago *et al.*, 1998).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.30 (1H, s, CHO), 1.57 (9H, s, ^tBu)

Fmoc-Lys-OH (3 mmol, 1,105 g) wird in DCM/MeOH (1/1 v/v, 100 mL) suspendiert. Dann werden Glyoxylsäure-*tert.*-butylester (4 mmol in DMSO) und Natriumcyanoborhydrid (4,5 mmol, 283 mg) zugegeben und über Nacht heftig gerührt. Die Mischung wird vom Ungelösten abfiltriert, in Wasser (175 mL) gegeben, DCM und Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen und die Lösung etwas eingeeengt. Dann wird mit 1 N HCl auf pH 5,0 eingestellt und mit Diethylether (50 mL) gewaschen. Dann wird mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Man erhält (*S*)-6-((2-*tert.*-Butoxy-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CML(O^tBu)-OH).

Ausbeute: 76 % (1,10 g)

R_f (SiO₂; DCM/MeOH 80/20 v/v): 0,39

R_t HPLC (Programm „Würzburg“, 280 nm): 27,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 483,1 (100) [M+H]⁺, 427,2 (18) [M-C₄H₈+H]⁺, 179,3 (2) [DBF+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 483: m/z (%) 483,0 (14) [M+H]⁺, 427,1 (100) [M-C₄H₈+H]⁺

In einem 25 mL-Kolben wird Fmoc-CML(O^tBu)-OH (1,63 mmol, 790 mg) in DCM (16 mL) suspendiert. Dann wird (Boc)₂O (2,5 mmol, 541 mg) in DCM (3 mL) zugeben und 120 min gerührt, filtriert, eingeeengt, mit Wasser überschichtet, eingefroren und gefriergetrocknet. Die

Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Chloroform/2-Propanol (90/10 v/v).

Ausbeute: 95 % (902 mg)

R_f(SiO₂; DCM/MeOH 90/10 v/v): 0,29

R_t HPLC (Programm „Würzburg“, 280 nm): 38,2 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 605,1 (15) [M+Na]⁺, 483,1 (100) [M-Boc+H]⁺, 427,1 (62) [M-Boc-C₄H₈+H]⁺, 179,2 (3) [DBF+H]⁺

ESI-MS neg.: m/z (%) 581,0 (100) [M-H]⁻, 385,2 (61), 359,2 (82) [M-Fmoc-H]⁻

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 7.89 (2H, d, J=7,5 Hz, Fmoc), 7.72 (2H, d, J=7,5 Hz, Fmoc), 7.57 (1H, t, J=6,9 Hz, NH), 7.41 (2H, t, J=7,5 Hz, Fmoc), 7.33 (2H, t, J=7,5 Hz, Fmoc), 4.28 (2H, d, J=7,1 Hz, Fmoc-CH₂-O), 4.21 (1H, t, J=7,1 Hz, Fmoc-H), 3.90 (1H, m, Lys^α), 3.76 (2H, d, J=6,9 Hz, N-CH₂-COO^tBu), 3.14 (2H, m, Lys^ε), 1.78-1.54 (2H, m, Lys^β), 1.44-1.21 (22H, m, 2x^tBu, Lys^γ, Lys^δ)

3.5.2.2 (S)-6-((*tert*-Butoxycarbonyl)-(2-*tert*-butoxy-1-methy-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH) (2)

Brenztraubensäure-*tert*-butylester wird analog Glyoxylsäure-*tert*-butylester (3.5.2.1) durch Ozonolyse von Methacrylsäure-*tert*-butylester hergestellt. Ausgehend von Methacrylsäure-*tert*-butylester (16 mmol, 2,62 mL) in DCM (50 mL) und Dimethylsulfid (50 mmol, 3,7 mL) erhält man 2,77 g einer schwach gelblichen Lösung. Diese besteht aus ca. 55 Massenprozent Brenztraubensäure-*tert*-butylester, 38 Massenprozent Methacrylsäure-*tert*-butylester und 7 Massenprozent DMSO.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.42 (3H, s, CH₃), 1.54 (9H, s, ^tBu)

Fmoc-Lys-OH (3 mmol, 1,105 g) wird in DCM/MeOH (1/1 v/v, 100 mL) suspendiert. Dann werden Brenztraubensäure-*tert*-butylester (obige Lösung, entsprechend 4 mmol) und Natriumcyanoborhydrid (4,5 mmol, 283 mg) zugegeben und über Nacht heftig gerührt. Die Mischung wird vom Ungelösten abfiltriert, in Wasser (175 mL) gegeben, DCM und Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen und die Lösung etwas eingengt. Dann wird mit 1 N HCl auf pH 5,0 eingestellt und mit Ether (50 mL) gewaschen. Dann wird mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Man erhält (S)-6-((2-*tert*-butoxy-1-methy-2-oxoethyl)amino)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexansäure (Fmoc-CEL(O^tBu)-OH).

Ausbeute: 75 % (1,12 g)

R_f(SiO₂; DCM/MeOH 80/20 v/v): 0,29

R_t HPLC (Programm „Würzburg“, 280 nm): 27,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 497,1 (100) [M+H]⁺, 441,2 (18) [M-C₄H₈+H]⁺, 179,2 (2) [DBF+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 497: m/z (%) 497,2 (6) [M+H]⁺, 441,1 (100) [M-C₄H₈+H]⁺

In einem 25 mL-Kolben wird Fmoc-CEL(O^tBu)-OH (2 mmol, 1,0 g) in DCM (16 mL) suspendiert. Dann wird (Boc)₂O (3 mmol, 606 mg) in DCM (3 mL) zugeben und 120 min gerührt, filtriert, eingengt, mit Wasser überschichtet, eingefroren und gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Chloroform/2-Propanol (95/5 v/v).

Ausbeute: 95 % (1,13 g)

R_f (SiO₂; DCM/MeOH 15/1 v/v): 0,16

R_t HPLC (Programm „Würzburg“, 280 nm): 39,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 619,2 (100) [M+Na]⁺, 497,2 (28) [M-Boc+H]⁺, 441,2 (35) [M-Boc-C₄H₈+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 619: m/z (%) 619,1 (20) [M+Na]⁺, 563,1 (100) [M-C₄H₈+Na]⁺, 519,1 (43) [M-Boc+Na]⁺, 463,1 (11) [M-Boc-C₄H₈+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 7.88 (2H, d, J=7,5 Hz, Fmoc-Ar), 7.70 (2H, d, J=7,5 Hz, Fmoc-Ar), 7.57 (1H, t, J=6,9 Hz, NH), 7.41 (2H, t, J=7,5 Hz, Fmoc-Ar), 7.34 (2H, t, J=7,5 Hz, Fmoc-Ar), 4.40 (3H, m, Fmoc-CH₂, CH₃-CH-), 4.23 (1H, t, J=7,1 Hz, Fmoc-CH), 3.91 (1H, m, Lys^α), 3.12 (2H, m, Lys^ε), 1.80-1.51 (2H, m, Lys^β), 1.45-1.18 (25H, m, 2x^tBu, Lys^γ, Lys^δ, CH₃-CH)

3.5.2.3 Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (11)

L-Arginin (15 mmol, 2,61 g) wird in Wasser (150 mL) gelöst und Glyoxal-Lösung (40 % in Wasser, 3 mL) zugegeben. Mit 1 N HCl wird auf pH 7,4 eingestellt und bei 37 °C im Trockenschrank 4 h inkubiert. Dann gibt man 12 N HCl (150 mL) zu und erhitzt 1 h zum schwachen Sieden unter Rückfluss. Die Salzsäure wird nun innerhalb von 2 h bis auf einen kleinen Flüssigkeitsrest abdestilliert. Die restliche Flüssigkeit wird filtriert und am Rotationsverdampfer bei 50°C abgezogen. Es bleibt ein hellbraunes Öl. DOWEX WX 8 wird über Nacht in 3 N HCl gequollen und in eine Säule gepackt (2 x 20 cm). Mit bidest. Wasser wird so lange gespült, bis der Abfluss neutral reagiert. Dann wird das Rohprodukt in etwas Wasser aufgenommen und aufgeben. Es wird mit bidest. Wasser (120 mL) und 1 N HCl (120 mL) gewaschen und schließlich mit 3 N HCl (1000 mL) eluiert (Fraktionsgröße 100 mL). Fraktionen mit R_f = 0,42 (SiO₂; 1-Butanol/H₂O/Pyridin/Eisessig 4/2/3/3 v/v/v/v; Ninhydrin) werden gesammelt, bei 60 °C einrotiert, bei 40 °C getrocknet, mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Man erhält 3,19 g eines hellbraunen Rückstandes, der größtenteils aus Glarg und seinem Hydrochlorid besteht (Glomb *et al.*, 2001).

R_f (SiO₂; 1-Butanol/H₂O/Pyridin/Eisessig 4/2/3/3 v/v/v/v; Ninhydrin): 0,42

R_t HPLC (TFA 0,1% isokratisch, 210 nm): 6,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 215,2 (100) [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.36 (s, 2H, C7-H₂), 4.20 (t, 1H, J = 6.2 Hz, C2-H), 3.82 (t, 2H, J = 7.0 Hz, C5-H₂), 2.07 (m, 2H, C3-H₂), 1.89 (m, 2H, C4-H₂)

Glarg (9,34 mmol, 2 g) wird in Wasser (10 mL) gelöst, mit 4 N NaOH auf pH 7 eingestellt und einrotieren. Der Rückstand wird in 10 %iger Na₂CO₃-Lösung (27 mL) und Dioxan (12 mL) gelöst und im Eisbad gekühlt. Dann wird innerhalb von 30 min eine Lösung von Fmoc-Cl (18,68 mmol, 14,83 g) in Dioxan (30 mL) zugeben und weitere 30 min bei RT gerührt. Die Mischung wird in Wasser (300 mL) gegossen, mit 4 N HCl auf pH 2,5 gebracht und mit Diethylether (100 mL) gewaschen. Der ausgefallene Niederschlag wird mit einer G4-Fritte abgetrennt, in wenig DCM gelöst, mit Diethylether wieder ausgefällt und abfiltriert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit DCM/MeOH (85/15 v/v). Man erhält Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH als weißes Pulver.

Ausbeute: 50 % (3,07 g)

R_f (SiO₂; DCM/MeOH 85/15 v/v): 0,33

R_t HPLC (Programm „Würzburg“, 280 nm): 32,3 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 659,2 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 659: m/z (%) 659,0 (12) [M+H]⁺, 615,2 (31), 437,1 (100) [M-Fmoc+H]⁺

Ein ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung war wegen der Instabilität der Verbindung nicht zu erhalten.

3.5.2.4 *N,N'*-Di-Boc-*N*-methcarboxymethyl-*S*-methylisothioharnstoff (16)

N,N'-Di-Boc-*S*-methylisothioharnstoff (1 mmol, 290 mg), Triphenylphosphan (1,5 mmol, 393 mg) und Glycolsäuremethylester (1 mmol, 90 mg) werden unter Stickstoff in trockenem, peroxidfreiem THF (5 mL) gelöst. Unter Stickstoff und Rühren wird langsam mit DIAD (1,5 mmol, 300 µL) in THF (2 mL) versetzt und über Nacht gerührt (Kim *et al.*, 1999). Dann wird im Stickstoffstrom so weit wie möglich eingeeengt, der Rückstand mit Hexan/Ethylacetat (85/15 v/v) extrahiert, eingeeengt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Hexan/Ethylacetat (85/15 v/v) aufgereinigt.

Ausbeute: 36 % (132 mg)

R_f (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 85/15 v/v): 0,14

ESI-MS pos.: m/z (%) 401,0 (33) [M+K]⁺, 385,0 (100) [M+Na]⁺, 363,0 (3) [M+H]⁺, 285,0 (13) [M-Boc+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.31 (2H, s, CH₂-COO-), 3.76 (3H, s, -O-CH₃), 2.45 (3H, s, S-CH₃), 1.51 (9H, s, ^tBu), 1.48 (9H, s, ^tBu)

3.5.2.5 *N,N'*-Di-Boc-*N*-tert.-butcarboxymethyl-*S*-methylisothioharnstoff (17)

Eine Lösung von Ameisensäure (38,46 mmol, 1,77 g) in Ethylacetat (40 mL) wird mit Triethylamin (41,03 mmol, 4,14 g) versetzt und 5 min gerührt. Dann wird Bromessigsäure-*tert.*-butylester (25,6 mmol, 5 g) langsam zugegeben und die Mischung bei RT 24 h gerührt. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit Diethylether (100 mL) nachgespült. Die vereinigten organischen Phasen werden mit halbgesättigter Kochsalzlösung (30 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt. Es bleiben 2,85 g 2-Formyloxyethansäure-*tert.*-butylester als ein farbloses Öl.

Ausbeute: 70 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.13 (1H, t, J=0,7 Hz, CHO), 4.58 (2H, d, J=0,6 Hz, CH₂), 1.49 (9H, s, ^tBu)

2-Formyloxyethansäure-*tert.*-butylester (17,8 mmol, 2,85 g) wird in Wasser (60 mL) suspendiert und unter heftigem Rühren mit Natriumhydrogencarbonat (39,1 mmol, 3,28 g) versetzt. Die Emulsion wird bei RT 48 h heftig gerührt, wobei sie einphasig wird. Dann wird mit Wasser auf 140 mL aufgefüllt und mit Diethylether kontinuierlich für 20 h extrahiert (Apparatur für kontinuierliche Flüssig-flüssig-Extraktion unter Rückfluss). Die etherische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das verbliebene gelbe Öl wird im Vakuum destilliert. Man erhält 1,95 g Glycolsäure-*tert.*-butylester als farblose Flüssigkeit, welche im Kühlschrank zu langen, farblosen Nadeln erstarrt (Jurayj und Cushman, 1992).

Ausbeute: 83 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.02 (2H, d, J=4,9 Hz, CH₂), 2.07 (1H, t, J=5,2 Hz, OH), 1.50 (9H, s, ^tBu)

Die Synthese von *N,N'*-Di-Boc-*N*-*tert.*-butcarboxymethyl-*S*-methylisothioharnstoff (**17**) verläuft analog Verbindung **16** mit Glycolsäure-*tert.*-butylester (1 mmol, 132 mg). Elutionsmittel Hexan/Ethylacetat (90/10 v/v)

Ausbeute: 21 % (85 mg)

R_f (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 90/10 v/v): 0,18

ESI-MS pos.: m/z (%) 426,9 (22) [M+Na]⁺, 404,8 (100) [M+H]⁺, 304,8 (60) [M-Boc+H]⁺, 248,9 (29) [M-Boc-C₄H₈+H]⁺, 204,9 (6) [M-2Boc+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.18 (2H, s, CH₂-COO-), 2.44 (3H, s, S-CH₃), 1.50 (9H, s, ^tBu), 1.49 (9H, s, ^tBu), 1.48 (9H, s, ^tBu)

3.5.2.6 *N,N'*-Di-Boc-*N*-(1-methcarboxyethyl)-*S*-methylisothioharnstoff (**18**)

Analog Verbindung **16** mit Milchsäuremethylester (1 mmol, 104 mg).

Ausbeute: 26 % (97 mg)

R_f (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 85/15 v/v): 0,18

ESI-MS pos.: m/z (%) 398,9 (100) [M+Na]⁺, 376,9 (6) [M+H]⁺, 298,9 (10) [M-Boc+Na]⁺, 277,0 (13) [M-Boc+H], 177,0 (38) [M-2Boc+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.54 (1H, q, J=7,2 Hz, CH-COO-), 3.75 (3H, s, -O-CH₃), 2.42 (3H, s, S-CH₃), 1.60 (3H, d, J=7,2 Hz, CH₃-CH), 1.51 (9H, s, ^tBu), 1.47 (9H, s, ^tBu)

3.5.2.7 *N,N'*-Di-Boc-*N*-(1-*tert.*-butcarboxyethyl)-*S*-methylisothioharnstoff (19)

Analog Verbindung **16** mit Milchsäure-*tert.*-butylester (1 mmol, 146 mg). Elutionsmittel Hexan/Ethylacetat (90/10 v/v)

Ausbeute: 11 % (45 mg)

R_f (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 90/10 v/v): 0,19

ESI-MS pos.: m/z (%) 456,9 (22) [M+K]⁺, 440,9 (32) [M+Na]⁺, 418,9 (13) [M+H]⁺, 318,8 (27) [M-Boc+H]⁺, 262,8 (100) [M-Boc-C₄H₈+H]⁺, 218,9 (18) [M-2Boc+H]⁺, 206,9 (48) [M-Boc-2C₄H₈+H]⁺, 163,0 (19) [M-2Boc-C₄H₈+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.37 (1H, q, J=7,2 Hz, CH-COO-), 2.40 (3H, s, S-CH₃), 1.56 (3H, d, J=7,2 Hz, CH₃-CH), 1.51 (9H, s, ^tBu), 1.49 (9H, s, ^tBu), 1.48 (9H, s, ^tBu)

3.5.2.8 5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on (20)

L-Alanin (60 mmol, 5,34 g) und Ammoniumthiocyanat (60 mmol, 4,56 g) werden in Essigsäureanhydrid (30 mL) und Eisessig (3 mL) gelöst und im Siliconölbäd für 45 min unter Rühren auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird auf Eiswasser (150 mL) gegossen, der Niederschlag durch eine Fritte abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 3-Acetyl-5-methyl-2-thioxo-4-imidazolidinon in Form gelber Kristallnadeln.

Ausbeute: 44 % (4,52 g)

R_f (SiO₂; Chloroform/Ethanol 90/10 v/v): 0,66

ESI-MS pos.: m/z (%) 173,1 (100) [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 3.96 (1H, q, J=6,9 Hz, CH), 2.78 (3H, s, CH₃CO), 1.53 (3H, d, J=6,9 Hz, CH₃)

3-Acetyl-5-methyl-2-thioxo-4-imidazolidinon (11,2 mmol, 1,93 g) wird in HCl (10 %ig, 12 mL) suspendiert und für 45 min auf 100 °C erhitzt. Danach wird langsam abgekühlt und die Lösung im Kühlschrank gelagert. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit Wasser gewaschen und *in vacuo* über KOH getrocknet. Man erhält 5-Methyl-2-thioxo-4-imidazolidinon in Form farbloser Plättchen.

Ausbeute: 56 % (0,81 g)

R_f (SiO₂; Chloroform/Ethanol 90/10 v/v): 0,37

ESI-MS pos.: m/z (%) 131,1 (100) [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.20 (1H, q, J=7,1 Hz, CH), 1.37 (3H, d, J=7,1 Hz, CH₃)

5-Methyl-2-thioxo-4-imidazolidinon (2,5 mmol, 330 mg) und wasserfreies Kaliumcarbonat (2,6 mmol, 360 mg) werden in Acetonitril (25 mL) suspendiert, mit Iodmethan (3 mmol, 200 µL) versetzt und 4 h bei RT heftig gerührt. Die Mischung wird filtriert, mit Acetonitril (5 mL) nachgewaschen und eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Chloroform/Ethanol (90/10 v/v) liefert 5-Methyl-2-(methylthio)-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on als weißes Pulver (Ahmend *et al.*, 2002).

Ausbeute: 54 % (194 mg)

R_f (SiO₂; Chloroform/Ethanol 90/10 v/v): 0,20

ESI-MS pos.: m/z (%) 286,9 (62) [2M+H]⁺, 145,0 (100) [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 3.96 (1H, q, J=7,3 Hz, CH), 2.51 (3H, s, -S-CH₃), 1.29 (3H, d, J=7,3 Hz, CH₃)

¹³C-NMR (80 MHz, CD₃CN): δ 201.8 (N=CS-), 187.2 (C=O), 62.2 (CH), 17.1 (CH₃), 13.1 (SCH₃)

3.5.3 Synthese von modifizierten Peptiden

Die Synthesen erfolgen entweder gemäß Kapitel 3.4.5.1 am Festphasen-Peptidsynthesizer mit speziellen Bausteinen oder durch Derivatisierung von Peptidylharzen. Die Spaltung der Peptide vom Harz verläuft gemäß Kapitel 3.4.5.7. Ein Teil des Rohpeptides wird durch RP-HPLC (Programm „Peptide“) aufgereinigt. Pro Lauf werden 500-2000 µg Rohpeptid chromatographiert und das saubere Produkt gefriergetrocknet. Diese gereinigten Peptide werden dann für die Bioassays und NMR-Messungen verwendet.

LRPCEQHLMQ-CML-IQRDES (P8)

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 µmol, 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**, 500 µmol, 290 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: 82 % **Reinheit:** 65 % **R_t HPLC:** 28,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1524,4 (3) [2M+3H]³⁺, 1143,4 (33) [M+2H]²⁺, 762,6 (100) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1143: m/z (%) 1686,6 (4) [y₁₃]⁺, 1517,4 (9) [b₁₂-NH₃]⁺, 1420,1 (4) [y₁₁]⁺, 1220,7 (6) [b₁₀-NH₃]⁺, 1142,9 (30) [M+2H]²⁺, 1133,9 (69) [b₁₈]²⁺, 1090,5 (100) [b₁₇]²⁺, 968,4 (11) [b₁₅]²⁺, 911,0 (3) [b₁₄]²⁺, 832,3 (2) [b₁₃]²⁺,

Das Rohpeptid enthält größere Mengen der Fehlsequenz LPCEQHLMQ-CML-IQRDEDS (R_t HPLC 31,2 min).

LRPCEQHLMQ-CEL-IQRDES (P9)

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol , 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH (**2**, 500 μmol , 299 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: 81 % **Reinheit:** 54 % **R_t HPLC:** 33,3 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1532,5 (10) [2M+3H]³⁺, 1149,9 (67) [M+2H]²⁺, 767,3 (100) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1150: m/z (%) 1571,3 (2) [y₁₂]⁺, 1436,2 (2) [b₁₁]⁺, 1149,9 (12) [M+2H]²⁺, 1141,0 (25) [b₁₈]²⁺, 1097,4 (100) [b₁₇]²⁺, 1039,4 (8) [b₁₆]²⁺, 975,6 (14) [b₁₅]²⁺, 917,6 (2) [b₁₄]²⁺, 727,4 (3) [b₆]⁺, 599,4 (6) [b₅]⁺

Das Rohpeptid enthält größere Mengen der Fehlsequenzen LRPCEQHLMQIQRDEDS (R_t HPLC 32,0 min), LPCEQHLMQIQRDEDS (R_t HPLC 33,8 min) und LPCEQHLMQ-CEL-IQRDEDS (R_t HPLC 35,0 min).

LQGRQQEQQF-CML-RELRNL (P10)

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol , 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**, 500 μmol , 290 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: 93 % **Reinheit:** 77 % **R_t HPLC:** 35,5 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1486,9 (20) [2M+3H]³⁺, 1115,9 (31) [M+2H]²⁺, 744,3 (100) [M+3H]³⁺

LQGRQQEQQF-CEL-RELRNL (P11)

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol , 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH (**2**, 500 μmol , 299 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: 76 % **Reinheit:** 84 % **R_t HPLC:** 34,2 + 34,7 min (Diastereomerenpaar)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1122,5 (78) [M+2H]²⁺, 748,8 (100) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1123: m/z (%) 1599,8 (4) [b₁₂]⁺, 1122,6 (21) [M+2H]²⁺, 1113,5 (100) [b₁₇]²⁺, 1056,9 (14) [b₁₆]²⁺, 1029,9 (52), 626,4 (3), 515,3 (2) [y₄]⁺

CM-RQQWELQGDRRCQSQL (P13)

R(Pbf)Q(Trt)Q(Trt)WE(O^tBu)LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)C(Trt)Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)L-
WANG-Harz (18,9 μmol , 100 mg) wird analog **P43** mit Glyoxylsäure-*tert.*-butylester (27 μmol in DMSO) umgesetzt..

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** 69 % **R_t HPLC:** 32,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1045,7 (47) [M+2H]²⁺, 697,4 (100) [M+3H]³⁺

CE-RQQWELQGDRRCQSQL (P14)

R(Pbf)Q(Trt)Q(Trt)WE(O^tBu)LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)C(Trt)Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)L-
WANG-Harz (18,9 μmol , 100 mg) wird analog **P44** mit Brenztraubensäure (27 μmol , 6,8 μL) umgesetzt.

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** 64 % **R_t HPLC:** 33,3 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1402,4 (11) $[2M+3H]^{3+}$, 1052,2 (100) $[M+2H]^{2+}$, 702,0 (86) $[M+3H]^{3+}$

(LQGDRRCQSQLERAN)₂ (P15)

LQGDRRCQSQLERAN (Rohprodukt, 5 μ mol, 8,5 mg) wird in Ammoniumacetat-Lösung (50 mM, 5 mL) gelöst und mit Ammoniak-Lösung auf pH 7,8 eingestellt. Unter Luftzutritt wird über Nacht heftig gerührt und dann gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in Wasser (200 μ L) aufgenommen und über RP-HPLC gereinigt (Programm Peptide, 100 μ l, $R_t=26,5$ min).

Ausbeute Reinprodukt: 4,8 mg (54 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1775,1 (5) $[M+2H]^{2+}$, 1183,0 (100) $[M+3H]^{3+}$, 887,9 (35) $[M+4H]^{4+}$, 710,7 (2) $[M+5H]^{5+}$, 592,3 (3) $[M+6H]^{6+}$

LQGDRR-Cystin-QSQLERAN (P16)

LQGDRRCQSQLERAN (Rohprodukt, 10 μ mol, 17 mg) und L-Cystein (100 μ mol, 12 mg) werden in Ammoniumacetat-Lösung (50 mM, 10 mL) gelöst und mit Ammoniak-Lösung auf pH 7,8 eingestellt. Unter Luftzutritt wird über Nacht heftig gerührt und dann gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in Wasser (800 μ L) aufgenommen und über RP-HPLC gereinigt (Programm „Peptide“, 200 μ L, $R_t=24,2$ min).

Ausbeute Reinprodukt: 6,6 mg (44 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1893,5 (12) $[M+H]^+$, 1262,3 (19) $[2M+3H]^{3+}$, 947,2 (100) $[M+2H]^{2+}$, 632,5 (22) $[M+3H]^{3+}$

LQGDRR-Cys(O₃H)-QSQLERAN (P17)

Ameisensäure (1,8 mL) wird mit Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %ig, 200 μ L) versetzt und 1 h bei RT stehen gelassen. Dann wird Methanol (200 μ L) zugegeben und die Mischung auf -24 °C abgekühlt. LQGDRRCQSQLERAN (Rohprodukt, 5,6 μ mol, 10 mg) wird in 500 μ L obiger Mischung gelöst und 150 min im Gefrierschrank bei -24 °C aufbewahrt. Die Lösung wird mit kaltem Wasser (4 mL) verdünnt, sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in Wasser (200 μ L) aufgenommen und über HPLC gereinigt (Programm „Peptide“, 100 μ l, $R_t=24,1$ min).

Ausbeute Reinprodukt: 2,9 mg (28 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1822,6 (7) $[M+H]^+$, 1214,8 (11) $[2M+3H]^{3+}$, 911,7 (100) $[M+2H]^{2+}$, 608,7 (12) $[M+3H]^{3+}$

LQGDRR-Dha-QSQLERAN (P18)

Die Synthese der Vorstufen verläuft analog zum Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (**P45**). Boc-LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)-CysO₂(Bzl)-Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)LE(O^tBu)R(Pbf)AN(Trt)-WANG-Harz (21 μ mol, 100 mg) wird in THF (500 μ L) suspendiert, mit Kalium-*tert.*-butylat

(84 μmol , 9 mg) in THF (500 μL) versetzt und 120 min bei RT gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 3 mL THF und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid LQGDRR-Dha-QSQLERAN.

Ausbeute: 82 % **Reinheit:** 9 % **R_t HPLC:** 25,0 min

Aus 20 mg Rohpeptid werden mittels RP-HPLC 1,3 mg **P18** (6 %) isoliert.

ESI-MS pos.: m/z (%) 1740,7 (11) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 882,4 (25) $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, 870,7 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 581,1 (28) $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 1741: m/z (%) 1740,6 (11) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1721,5 (100) $[\text{b}_{15}]^+$, 1704,3 (22) $[\text{b}_{15}-\text{NH}_3]^+$, 1607,2 (3) $[\text{b}_{14}]^+$, 1536,3 (2) $[\text{b}_{13}]^+$, 1326,5 (2) $[\text{y}_{11}]^+$

LQGDRR-Lan(Ac)(OMe)-QSQLERAN (P19)

Boc-LQ(Trt)GD(O^tBu)R(Pbf)R(Pbf)-CysO₂(Bzl)-Q(Trt)S(^tBu)Q(Trt)LE(O^tBu)R(Pbf)AN-(Trt)-WANG-Harz (11 μmol , 50 mg) und Kalium-*tert.*-butylat (84 μmol , 9 mg) werden in THF (1 mL) 120 min gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 3 mL THF und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Das Harz wird mit Ac-Cys-OMe (33 μmol , 6 mg) unter Stickstoff in THF (1 mL) suspendiert und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit 5 x 3 mL THF und 2 x 3 mL MeOH gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid LQGDRR-Lan(Ac)(OMe)-QSQLERAN.

Ausbeute: 84 % **Reinheit:** 24 % **R_t HPLC:** 26,5 + 26,7 min (Diastereomerenpaar)

Aus 17 mg Rohpeptid werden mittels RP-HPLC 2,5 mg **P19** (15 %) isoliert.

ESI-MS pos.: m/z (%) 1917,1 (3) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1278,5 (7) $[\text{2M}+3\text{H}]^{3+}$, 959,3 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 640,4 (43) $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

Glarg-DEDSYERDPYSPSQ (P20)

D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz wird nach 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. An das Harz (37 μmol , 122 mg) wird nach Punkt 3.4.5.5 der Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (336 μmol , 221 mg) angefügt und die N-terminalen Fmoc-Gruppen nach Punkt 3.4.5.4 entfernt. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Glarg-DEDSYERDPYSPSQ.

Ausbeute: 92 % **Reinheit:** 84 % **R_t HPLC:** 29,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1883,6 (11) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 942,7 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z: 1884: m/z (%) 1883,5 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1866,5 (100) $[\text{b}_{15}]^+$, 1848,5 (32) $[\text{b}_{15}-\text{NH}_3]^+$, 1702,5 (7), 1670,4 (9) $[\text{y}_{14}-\text{NH}_3]^+$, 1572,7 (13) $[\text{y}_{13}]^+$, 1467,7 (7) $[\text{b}_{11}]^+$, 1443,6 (6) $[\text{y}_{12}]^{2+}$, 1328,7 (16) $[\text{y}_{11}]^+$, 1206,3 (19) $[\text{b}_9]^+$, 1075,5 (5) $[\text{b}_8-\text{NH}_3]^+$, 931,4 (4) $[\text{y}_8-\text{NH}_3]^+$

CMA-DEDSYERDPYSPSQ (P21)

Glarg-DEDSYERDPYSPSQ (Rohprodukt, 2,7 μmol , 5 mg) wird in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 8,0, 0,05 % NaN_3 , 3 mL) gelöst und 3 d gerührt, mit Wasser (3 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. HPLC-Analyse zeigt eine Reinheit von 89 % bezogen auf den Peptidanteil. Der Rückstand wird in Wasser (400 μL) aufgenommen und über RP-HPLC gereinigt (Programm Peptide, 100 μl , $R_t=27,6$ min).

Ausbeute Reinprodukt: 3,8 mg (76 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1902,6 (25) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1268,2 (4) $[2\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 951,8 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 952: m/z (%) 1572,4 (8) $[\text{b}_{12}]^+$, 1443,5 (6) $[\text{y}_{12}]^+$, 1328,5 (34) $[\text{y}_{11}]^+$, 1224,4 (53) $[\text{b}_9]^+$, 1206,5 (20) $[\text{b}_9\text{-NH}_3]^+$, 951,5 (14) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 942,8 (100) $[\text{b}_{15}]^{2+}$, 678,2 (48) $[\text{y}_6]^+$, 574,2 (33) $[\text{b}_4]^+$, 418,0 (5) $[\text{y}_4]^+$, 331,1 (4) $[\text{y}_3]^+$

RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (P22)

D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz wird nach 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. An das Harz (70 μmol , 149 mg) wird nach 3.4.5.5 der Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (350 μmol , 231 mg) angefügt und die N-terminalen Fmoc-Gruppen nach 3.4.5.4 entfernt.

Parallel hierzu wird an 2-Cl-Tritylchloridharz (150 μmol , 144 mg) die Sequenz Boc-R(Pbf)D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)-2-Cl-Tritylharz nach 3.4.5.2 und 3.4.5.5 aufgebaut. Abspaltung nach 3.4.5.8 liefert das totalgeschützte Peptidsegment Boc-R(Pbf)D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu) (**13**, 121,9 mg, 76 μmol , 76 % Ausbeute, Reinheit >95 %, R_t HPLC = 74,7 min).

ESI-MS pos.: m/z (%) 1639,5 (29) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1623,6 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1601,5 (22) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 823,5 (11) $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$

MS/MS pos. von m/z 1601: m/z (%) 1601,4 (19) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1545,3 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 1501,4 (32) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$, 1489,3 (28) $[\text{M}-2\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 1445,4 (19) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{Boc}+\text{H}]^+$, 1433,3 (5) $[\text{M}-2\text{C}_4\text{H}_8-\text{O}^t\text{Bu}+\text{H}]^+$, 1389,3 (6) $[\text{M}-2\text{C}_4\text{H}_8-\text{Boc}+\text{H}]^+$, 1331,5 (10)

Das Segment **13** (76 μmol , 121,9 mg) wird nach Punkt 3.4.5.5 an Glarg-D(O^tBu)PY(^tBu)-S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz (70 μmol) gekuppelt. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ.

Ausbeute: 54 % **Reinheit:** 16 % **R_t HPLC:** 27,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1884,5 (5) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 942,7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 943: m/z (%) 1612,6 (12) $[\text{y}_{13}]^+$, 1553,4 (10) $[\text{b}_{12}]^+$, 1466,4 (8) $[\text{b}_{11}]^+$, 1368,3 (33) $[\text{y}_{11}]^+$, 1206,4 (84) $[\text{b}_9]^+$, 1091,4 (5) $[\text{b}_8]^+$, 989,4 (10) $[\text{y}_8]^+$, 942,4 (28) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 933,7 (10) $[\text{b}_{15}]^{2+}$, 895,3 (9) $[\text{b}_7]^+$, 869,3 (8) $[\text{b}_{14}]^{2+}$, 678,2 (67) $[\text{y}_6]^+$, 516,3 (24) $[\text{b}_4]^+$, 418,1 (4) $[\text{y}_4]^+$, 331,1 (6) $[\text{y}_3]^+$

RDEDSYE-CMA-DPYSPSQ (P23)

RDEDSYE-Glarg-DPYSPSQ (10 mg Rohprodukt) wird in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 8,0, 0,05 % NaN_3 , 3 mL) gelöst und 3 d gerührt, mit Wasser (3 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. HPLC-Analyse zeigt eine Reinheit von 26 % bezogen auf den Peptidanteil. Der Rückstand wird in Wasser (500 μL) aufgenommen und über RP-HPLC gereinigt (Programm Peptide, 100 μL , $R_t = 27,5$ min).

Ausbeute Reinprodukt: 1,9 mg (19 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1901,6 (12) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1268,2 (4) $[2\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 951,7 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 952: m/z (%) 1612,6 (9) $[\text{y}_{13}]^+$, 1386,4 (47) $[\text{y}_{11}]^+$, 1224,4 (100) $[\text{b}_9]^+$, 1206,4 (45) $[\text{b}_9\text{-NH}_3]^+$, 1109,4 (7) $[\text{b}_8]^+$, 1007,5 (12) $[\text{y}_8]^+$, 951,5 (17) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 943,1 (78) $[\text{b}_{15}]^{2+}$, 895,4 (14) $[\text{b}_7]^+$, 678,2 (93) $[\text{y}_6]^+$, 516,2 (39) $[\text{b}_4]^+$, 418,0 (5) $[\text{y}_4]^+$, 331,1 (8) $[\text{y}_3]^+$

(MG-H1)-DEDSYERDPYSPSQ (P24)

Boc-Orn(\emptyset)-D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)-PS(O^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz wird an WANG-Harz (150 μmol , 133 mg) nach Punkt 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Boc-Orn(Fmoc)-OH verwendet. Das Harz (13 μmol , 50 mg) wird in DMF (800 μL) vorgequollen. Dann werden 5-Hydro-5-methyl-2-methylthio-4-imidazolone (vgl. 3.5.2.8; 39 μmol , 5,6 mg) in Acetonitril (200 μL) und DIPEA (39 μmol , 7 μL) zugegeben und über Nacht gerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit 3 x 3 mL DMF, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid (MG-H1)-DEDSYERDPYSPSQ.

Ausbeute: 92 % **Reinheit:** 17 % **R_t HPLC:** 27,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1897,6 (30) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 949,7 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 950: m/z (%) 1573,5 (18) $[\text{y}_{13}]^+$, 1549,5 (41) $[\text{b}_{12}\text{-NH}_3]^+$, 1480,6 (20) $[\text{b}_{11}]^+$, 1329,5 (28) $[\text{y}_{11}]^+$, 1220,5 (70) $[\text{b}_9]^+$, 1105,3 (19) $[\text{b}_8]^+$, 949,5 (63) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 941,3 (100) $[\text{b}_{15}]^{2+}$, 877,0 (21), 784,9 (12) $[\text{b}_{12}]^{2+}$, 678,3 (51) $[\text{y}_6]^+$, 570,2 (28) $[\text{b}_4]^+$, 455,3 (6) $[\text{b}_3]^+$, 311,1 (12) $[\text{y}_3]^+$

(MG-H2)-DEDSYERDPYSPSQ (P25)

Boc-Orn(\emptyset)-D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)-PS(O^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz wird an WANG-Harz (150 μmol , 133 mg) nach Punkt 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Boc-Orn(Fmoc)-OH verwendet. Das Harz (13 μmol , 50 mg) wird in DCM (700 μL) vorgequollen. Dann wird Brenztraubensäuremethylester (20 μmol , 1,8 μL) zugegeben und mit einer Lösung von Natriumcyanoborhydrid (30 μmol , 2 mg) in MeOH (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht bei RT umgerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit 3 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und *in vacuo* über KOH getrocknet. Das Harz wird in DCM (750 μL) suspendiert, mit Triethylamin (52 μmol , 8 μL) und *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff (39 mmol,

11 mg) versetzt und 15 min gerührt. Anschließend wird 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (Mukajama-Reagenz, 39 μmol , 10 mg) zugegeben und 4 h gerührt. Das Harz wird filtriert, mit 3 x 5 mL DCM, 3 x 5 mL DMF und 3 x 5 mL DCM gewaschen und getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid (MG-H2)-DEDSYERDPYSPSQ.

Ausbeute: 84 % **Reinheit:** 18 % **R_t HPLC:** 28,2 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1897,6 (11) [M+H]⁺, 949,7 (100) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 950: m/z (%) 1573,5 (15) [y₁₃]⁺, 1549,5 (28) [b₁₂-NH₃]⁺, 1480,5 (26) [b₁₁]⁺, 1443,6 (10) [y₁₂]⁺, 1328,5 (51) [y₁₁]⁺, 1220,5 (100) [b₉]⁺, 1203,5 (45) [b₉-NH₃]⁺, 949,5 (20) [M+2H]²⁺, 941,2 (47) [b₁₅]²⁺, 784,5 (32) [b₁₂]²⁺, 775,4 (42) [b₁₂-NH₃]²⁺, 678,3 (64) [y₆]⁺, 570,3 (20) [b₄]⁺, 455,2 (4) [b₃]⁺, 418,2 (8) [y₄]⁺, 326,2 (14) [b₂]⁺

(MG-H3)-DEDSYERDPYSPSQ (P26)

Boc-Orn(Ø)-D(O^tBu)E(O^tBu)D(O^tBu)S(^tBu)Y(^tBu)E(O^tBu)R(Pbf)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)-PS(O^tBu)Q(Trt)-WANG-Harz wird an WANG-Harz (150 μmol , 133 mg) nach Punkt 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Boc-Orn(Fmoc)-OH verwendet. Das Harz (13 μmol , 50 mg) wird in THF (500 μL) vorgequollen. Dann wird *N,N'*-Di-Boc-*N*-(1-methcarboxyethyl)-*S*-methylisothioharnstoff (**23**, 65 μmol , 25 mg) zugeben und über Nacht gerührt. Das Harz wird filtriert, mit 5 x 3 mL THF, 5 x 3 mL MeOH und 5 x 3 mL DCM gewaschen und getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid (MG-H3)-DEDSYERDPYSPSQ.

Ausbeute: 91 % **Reinheit:** 6 % **R_t HPLC:** 27,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 949,7 (100) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 950: m/z (%) 1688,0 (3) [y₁₄]⁺, 1573,6 (12) [y₁₃]⁺, 1480,5 (9) [b₁₁]⁺, 1328,5 (52) [y₁₁]⁺, 1220,5 (100) [b₉]⁺, 949,5 (50) [M+2H]²⁺, 941,2 (10) [b₁₅]²⁺, 784,5 (9) [b₁₂]²⁺, 775,4 (11) [b₁₂-NH₃]²⁺, 678,3 (76) [y₆]⁺, 570,3 (61) [b₄]⁺, 455,2 (5) [b₃]⁺, 418,2 (7) [y₄]⁺, 326,2 (9) [b₂]⁺

Aus zwei Ansätzen mit insgesamt 41 mg Rohpeptid werden mittels RP-HPLC 1,9 mg (MG-H3)-Peptid (4 %) isoliert.

CEA-DEDSYERDPYSPSQ (P27)

Gereinigtes (MG-H3)-DEDSYERDPYSPSQ (1,0 mg) wird in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 8,0, 0,05 % NaN₃, 3 mL) gelöst und 3 d gerührt. HPLC-Analyse zeigt eine Reinheit von 80 % bezogen auf den Peptidanteil. Die Lösung wird über RP-HPLC gereinigt (Programm „Peptide“, 200 μL , R_t=27,8 min).

Ausbeute Reinprodukt: 0,62 mg (62 %)

ESI-MS pos.: m/z (%) 1916,9 (5) [M+H]⁺, 958,8 (100) [M+2H]²⁺, 639,5 (11) [M+3H]³⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 959: m/z (%) 1573,5 (5) $[y_{13}]^+$, 1443,6 (3) $[y_{12}]^+$, 1328,5 (13) $[y_{11}]^+$, 1238,4 (16) $[b_9]^+$, 1220,5 (15) $[b_9]^+$, 1123,3 (3) $[b_8]^+$, 958,8 (15) $[M+2H]^{2+}$, 949,8 (100) $[b_{15}]^{2+}$, 902,1 (14), 793,4 (3) $[y_7]^+$, 678,3 (29) $[y_6]^+$, 588,3 (15) $[b_4]^+$, 473,3 (2) $[b_3]^+$, 418,0 (4) $[y_4]^+$, 344,2 (2) $[b_2]^+$

PY-Dha-PSQDPYSPSPYD (P31)

Die Synthese der Vorstufen verläuft analog zum Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly. Boc-PY(^tBu)-CysO₂(Bzl)-PS(^tBu)Q(Trt)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)PY(^tBu)D(O^tBu)-WANG-Harz (14,3 μmol, 50 mg) wird in THF (500 μL) suspendiert, mit Kalium-*tert.*-butylat (29 μmol, 3,2 mg) in THF (500 μL) versetzt und 90 min bei RT gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 3 mL THF und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid PY-Dha-PSQDPYSPSPYD.

Ausbeute: 73 % **Reinheit:** 33 % **R_t HPLC:** 34,2 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1703,4 (44) $[M+Na]^+$, 1681,3 $[M+H]^+$ (100), 1288,3 (35) $[b_{12}]^+$, 1104,2 (25) $[b_{10}]^+$, 1017,2 (13) $[b_9]^+$, 841,4 (27) $[M+2H]^+$, 757,3 (11) $[b_7]^+$, 665,2 (11) $[y_6]^+$, 578,2 (16) $[y_5]^+$, 394,1 (12) $[y_3]^+$

ESI-MS/MS pos. von m/z 1681: m/z (%) 1663,4 (20) $[b_{15}]^+$, 1548,2 (23) $[b_{14}]^+$, 1352,2 (83) $[y_{12}]^+$, 1288,3 (16) $[b_{12}]^+$, 1104,3 (18) $[b_{10}]^+$, 1040,2 (15) $[y_9]^+$, 925,2 (100) $[y_8]^+$, 665,2 (12) $[y_6]^+$, 578,2 (13) $[y_5]^+$

PYSP-Dha-QDPYSPSPYD (P32)

Die Synthese der Vorstufen verläuft analog zum Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly. Boc-PY(^tBu)S(^tBu)P-CysO₂(Bzl)-Q(Trt)D(O^tBu)PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)PY(^tBu)D(O^tBu)-WANG-Harz (150 μmol) wird in DCM (5 mL) suspendiert, mit DBU (300 μmol, 45 μl) in DCM (3 mL) versetzt und 120 min bei RT gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 5 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid PYSP-Dha-QDPYSPSPYD.

Ausbeute: 86 % **Reinheit:** 25 % **R_t HPLC:** 33,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1703,7 (65) $[M+Na]^+$, 1681,7 (67) $[M+H]^+$, 863,7 (87) $[M+2Na]^{2+}$, 853,2 (100) $[M+H+Na]^{2+}$, 841,4 (38) $[M+2H]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 1681: m/z (%) 1680,6 (41) $[M+H]^+$, 1663,7 (13) $[b_{15}]^+$, 1567,4 (17) $[y_{14}-H_2O]^+$, 1548,7 (16) $[b_{14}]^+$, 1421,5 (32) $[y_{13}]^+$, 1334,5 (56) $[y_{12}]^+$, 1288,5 (30) $[b_{12}]^+$, 1201,4 (9) $[b_{11}]^+$, 1104,3 (28) $[b_{10}]^+$, 1040,4 (13) $[y_9]^+$, 1017,3 (16) $[b_9]^+$, 925,3 (100) $[y_8]^+$, 757,3 (21) $[b_7]^+$, 665,1 (10) $[y_6]^+$, 578,2 (17) $[y_5]^+$

PYSPSQDPY-Dha-PSPYD (P33)

Die Synthese der Vorstufen verläuft analog zum Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly. Boc-PY(^tBu)S(^tBu)PS(^tBu)Q(Trt)D(O^tBu)PY(^tBu)-CysO₂(Bzl)-PS(^tBu)PY(^tBu)D(O^tBu)-WANG-

Harz (14,3 μmol , 50 mg) wird in THF (500 μL) suspendiert, mit Kalium-*tert.*-butylat (29 μmol , 3,2 mg) in THF (500 μL) versetzt und 90 min bei RT gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 3 mL THF und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid PYSQDPY-Dha-PSPYD.

Ausbeute: 67 % **Reinheit:** 36 % **R_t HPLC:** 34,4 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1681,2 [M+H]⁺ (72), 1288,3 (41) [b₁₂]⁺, 1104,2 (47) [b₁₀]⁺, 1035,2 (51) [b₉]⁺, 842,0 (100) [M+2H]²⁺, 775,3 (20) [b₇]⁺, 578,2 (18) [y₅]⁺, 394,1 (9) [y₃]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 1681: m/z (%) 1681,2 (16) [M+H]⁺, 1664,2 (20) [b₁₅]⁺, 1567,2 (19) [y₁₄-H₂O]⁺, 1548,7 (16) [b₁₄]⁺, 1421,1 (17) [y₁₃]⁺, 1334,2 (29) [y₁₂]⁺, 1288,5 (15) [b₁₂]⁺, 1150,0 (3) [y₁₀]⁺, 1104,1 (32) [b₁₀]⁺, 1035,2 (100) [b₉]⁺, 907,1 (46) [y₈]⁺, 775,1 (21) [b₇]⁺

Leu-Gly-CML-Ala-Gly (P38)

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol , 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**, 500 μmol , 290 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** 86 % **R_t HPLC:** 19,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1005,2 (53) [M+2H]²⁺, 503,2 (100) [M+H]⁺, 390,1 (11) [y₄]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 503: m/z (%) 503,1 (5) [M+H]⁺, 485,2 (20) [b₅]⁺, 428,1 (100) [b₄]⁺, 390,1 (8) [y₄]⁺, 357,1 (68) [b₃]⁺, 333,1 (28) [y₃]⁺, 244,1 (10)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.46 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala ^{α}), 4.41 (1H, t, J=6,1 Hz, Lys ^{α}), 4.14 (1H, t, J=6,9 Hz, Leu ^{α}), 4.09 (2H, d, J=1,6 Hz, Gly ^{α}), 4.07 (2H, d, J=2,4 Hz, Gly ^{α}), 3.91 (2H, s, N ^{ϵ} -CH₂-COOH), 3.18 (2H, t, J=7,6 Hz, Lys ^{ϵ}), 2.00-1.74 (7H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , Lys ^{β} , Lys ^{δ}), 1.54 (2H, m, Lys ^{γ}), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.05 (3H, d, J=5,1 Hz, Leu ^{δ}), 1.03 (3H, d, J=5,1 Hz, Leu ^{δ})

EDMAN-Sequenzierung: LG-AG

Leu-Gly-CEL-Ala-Gly (P39)

Methode 1:

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol , 88 mg) nach Punkt 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-CEL(O^tBu)(Boc)-OH (**2**, 500 μmol , 299 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: >95 % **Reinheit:** 95 % **R_t HPLC:** 20,4 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 517,3 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 517: m/z (%) 517,3 (5) [M+H]⁺, 499,3 (21) [b₅]⁺, 471,1 (17), 442,2 (100) [b₄]⁺, 440,2 (11) [y₄]⁺, 371,2 (37) [b₃]⁺, 347,2 (22) [y₃]⁺, 201,1 (26)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.48 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala ^{α}), 4.42 (1H, t, J=6,4 Hz, Lys ^{α}), 4.16 (1H, t, J=6,9 Hz, Leu ^{α}), 4.11 (2H, d, J=1,6 Hz, Gly ^{α}), 4.09 (2H, d, J=2,7 Hz, Gly ^{α}), 3.98 (1H, q, J=7,2 Hz, -CH(CH₃)-COOH), 3.17 (2H, t, J=6,8 Hz, Lys ^{ϵ}), 1.98-1.74 (7H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , Lys ^{β} , Lys ^{δ}), 1.63 (3H, d, J=7,2 Hz, -CH(CH₃)-COOH), 1.54 (2H, m, Lys ^{γ}), 1.51 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.07 (3H, d, J=5,5 Hz, Leu ^{δ}), 1.05 (3H, d, J=5,5 Hz, Leu ^{δ})

EDMAN-Sequenzierung: LG-AG**Methode 2:**

Leu-Gly-Lys(ivDde)-Ala-Gly-WANG-Harz wird an WANG-Harz (200 μmol , 177 mg) nach 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Fmoc-Lys(ivDde)-OH (**4**) verwendet. Der N-Terminus wird nach 3.4.5.3 mit Boc geschützt. Eine Probespaltung lieferte Leu-Gly-Lys(ivDde)-Ala-Gly.

Reinheit: 95 % **R_t HPLC:** 44,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 651,3 (100) [M+H]⁺, 326,2 (22) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 651: m/z (%) 651,2 (8) [M+H]⁺, 633,2 (19) [b₅]⁺, 576,2 (100) [b₄]⁺, 505,2 (80) [b₃]⁺, 491,1 (28), 481,2 (17)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.48 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala ^{α}), 4.40 (1H, dd, J₁=5,6 Hz, J₂=8,4 Hz, Lys ^{α}), 4.15 (1H, t, J=7,2 Hz, Leu ^{α}), 4.11 (2H, s, Gly ^{α}), 3.89 (1H, d, J=17,3 Hz, Gly ^{α}), 3.83 (1H, d, J=17,3 Hz, Gly ^{α}), 3.70 (2H, t, J=6,6 Hz, Lys ^{ϵ}), 3.08 (2H, d, J=7,2 Hz, ivDde C=CH₂), 2.49 (4H, s, 2 x ivDde CO-CH₂), 2.05-1.73 (8H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , Lys ^{β} , Lys ^{δ} , ivDde CH(CH₃)₂), 1.56 (2H, m, Lys ^{γ}), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.10 (6H, s, ivDde C(CH₃)₂), 1.03 (12H, m, Leu ^{δ} , ivDde CH(CH₃)₂)

Die ivDde-Gruppe wird vom Harz nach Punkt 3.4.5.6 mit Hydrazin abgespalten. Das Harz (150 μmol) wird in DCM (700 μL) vorgequollen und DIPEA (200 μmol , 35 μL) und Brenztraubensäure (150 μmol , 11 μL) zugeben. Die Mischung wird mit Natriumcyanoborhydrid (200 μmol , 13 mg) in Methanol (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 5 mL DCM, 3 x 5 mL MeOH und 3 x 5 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-CEL-Ala-Gly.

Ausbeute: 83 % **Reinheit:** 66 % **R_t HPLC:** 20,4 min

Das Rohpeptid enthält noch ca. 18 % Leu-Gly-Lys(ivDde)-Ala-Gly.

Leu-Gly-BisCML-Ala-Gly (P40)

Boc-Leu-Gly-Lys(\emptyset)-Ala-Gly-WANG-Harz (21 μmol , 30 mg, Darstellung vgl. **P39** Methode 2) wird in DCM (700 μL) vorgequollen und DIPEA (32 μmol , 6 μL) und Glyoxylsäure (21 μmol , 2,4 μL 40 %ige Lösung in Wasser) zugeben. Die Mischung wird mit Natriumcyanoborhydrid (32 μmol , 2,1 mg) in Methanol (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-BisCML-Ala-Gly.

Ausbeute: 83 % **Reinheit:** 42 % **R_t HPLC:** 19,2 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 583,2 (18) [M+Na]⁺, 561,1 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 561: m/z (%) 561,1 (17) [M+H]⁺, 543,1 (9) [b₅]⁺, 486,0 (100) [b₄]⁺, 448,0 (3) [y₄]⁺, 415,1 (77) [b₃]⁺, 391,0 (10) [y₃]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.46 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.42 (1H, dd, J₁=5,3 Hz, J₂=8,8 Hz, Lys^α), 4.16 (1H, t, J=6,9 Hz, Leu^α), 4.11 (2H, d, J=1,8 Hz, Gly^α), 4.07 (2H, d, J=2,1 Hz, Gly^α), 3.96 (4H, s, N^ε(CH₂-COOH)₂), 3.37 (2H, t, J=7,8 Hz, Lys^ε), 2.00-1.73 (7H, komp., Leu^β, Leu^γ, Lys^β, Lys^δ), 1.55 (2H, m, Lys^γ), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ), 1.04 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ)

Das Rohpeptid enthält noch ca. 50 % Leu-Gly-Lys-Ala-Gly.

CM-Leu-Gly-Ala (P43)

Leu-Gly-Ala-WANG-Harz wird an WANG-Harz (170 μmol, 150 mg) nach Punkt 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Eine Probespaltung von 50 mg Harz nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-Ala **P42**.

Ausbeute: 98 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 21,7 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 260,0 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 260: m/z (%) 259,8 (4) [M+H]⁺, 241,9 (12) [b₃]⁺, 215,0 (14), 170,9 (100) [b₂]⁺, 147,2 (2) [y₂]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.45 (1H, q, J=7,3 Hz, Ala^α), 4.16 (1H, m, Leu^α), 4.11 (1H, s, Gly^{α_a}), 4.10 (1H, s, Gly^{α_b}), 1.91-1.73 (3H, komp., Leu^β, Leu^γ), 1.51 (3H, d, J=7,3 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ), 1.05 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ)

Leu-Gly-Ala-WANG-Harz (45 μmol, 50 mg) wird in DCM (700 μL) suspendiert und dann Glyoxylsäure-*tert.*-butylester (68 μmol in DMSO, Darstellung vgl. Punkt 3.5.2.1) zugegeben. Die Mischung wird mit Natriumcyanoborhydrid (135 μmol, 8,5 mg) in MeOH (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht bei RT sachte gerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit 3 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid CM-Leu-Gly-Ala **P43**.

Ausbeute: 20 % (Peptid konnte nicht vollständig ausgefällt werden)

Reinheit: 90 % **R_t HPLC:** 22,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 340,1 (9) [M+Na]⁺, 318,0 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 318: m/z (%) 317,9 (15) [M+H]⁺, 299,9 (19) [b₃]⁺, 228,9 (100) [b₂]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.47 (1H, q, J=7,3 Hz, Ala^α), 4.16 (1H, m, Leu^α), 4.14 (1H, d, J=16,7 Hz, Gly^{α_a}), 4.09 (1H, d, J=16,7 Hz, Gly^{α_b}), 3.82 (1H, d, J=16,4 Hz, CH_a-COOH), 3.75 (1H, d, J=16,4 Hz, CH_b-COOH), 1.94-1.80 (3H, m, Leu^β, Leu^γ), 1.52 (3H, d, J=7,3 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu^δ), 1.05 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu^δ)

CE-Leu-Gly-Ala (P44)

Leu-Gly-Ala-WANG-Harz (45 μmol , 50 mg) wird in DCM (700 μL) suspendiert und dann DIPEA (90 μmol , 16 μL) und Brenztraubensäure (68 μmol , 4,7 μL) zugegeben. Die Mischung wird mit Natriumcyanoborhydrid (135 μmol , 8,5 mg) in MeOH (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht bei RT sachte gerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit 3 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid CE-Leu-Gly-Ala **P44**.

Ausbeute: 36 % (Peptid konnte nicht vollständig ausgefällt werden)

Reinheit: 74 % **R_t HPLC:** 22,9 + 22,5 min (Diastereomerenpaar)

ESI-MS pos.: m/z (%) 354,1 (19) [M+Na]⁺, 331,9 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 332: m/z (%) 332,0 (15) [M+H]⁺, 313,9 (30) [b₃]⁺, 286,0 (23), 242,9 (100) [b₂]⁺, 157,9 (16)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, ein Diastereomer): δ 4.47 (1H, q, J=7,3 Hz, Ala ^{α}), 4.15 (1H, d, J=16,6 Hz, Gly ^{α} _a), 4.09 (1H, m, Leu ^{α}), 4.08 (1H, d, J=16,6 Hz, Gly ^{α} _b), 3.90 (1H, q, J=7,2 Hz, CH(CH₃)COOH), 1.99-1.76 (3H, m, Leu ^{β} , Leu ^{γ}), 1.61 (3H, d, J=7,2 Hz, CH(CH₃)COOH), 1.51 (3H, d, J=7,3 Hz, Ala ^{β}), 1.05 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu ^{δ}), 1.04 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu ^{δ})

Leu-Gly-Dha-Ala-Gly (P45)

Leu-Gly-Cys(Bzl)-Ala-Gly-WANG-Harz wird an WANG-Harz (200 μmol , 177 mg) nach 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Fmoc-Cys(Bzl)-OH (7) verwendet. Der N-Terminus wird nach Punkt 3.4.5.3 mit Boc geschützt. Eine Probespaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) lieferte das Peptid Leu-Gly-Cys(Bzl)-Ala-Gly.

ESI-MS pos.: m/z (%) 532,2 (11) [M+Na]⁺, 510,2 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos von m/z 510: m/z (%) 510,0 (16) [M+H]⁺, 492,1 (13) [b₅]⁺, 434,9 (100) [b₄]⁺, 396,9 (1) [y₄]⁺, 364,0 (20) [b₃]⁺, 340,0 (18) [y₃]⁺, 311,0 (60)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.53-7.41 (5H, m, Ph), 4.55 (1H, dd, J₁=6,1 Hz, J₂=7,5 Hz, Cys ^{α}), 4.48 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala ^{α}), 4.16 (1H, dd, J₁=J₂=7,2 Hz, Leu ^{α}), 4.08 (2H, s, Gly ^{α}), 3.95 (1H, d, J=17,5 Hz, Ph-CH_a-S), 3.92 (2H, s, Gly ^{α}), 3.87 (1H, d, J=17,5 Hz, Ph-CH_b-S), 3.05 (1H, dd, J₁=6,1 Hz, J₂=14,0 Hz, Cys ^{β} _a), 2.94 (1H, dd, J₁=7,5 Hz, J₂=14,0 Hz, Cys ^{β} _b), 1.92-1.73 (3H, m, Leu ^{β} , Leu ^{γ}), 1.50 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.06 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu ^{δ}), 1.05 (3H, d, J=6,1 Hz, Leu ^{δ})

Das Harz (136 μmol , 200 mg) wird in DCM (2 mL) 10 Minuten im Eisbad vorquollen. Derweil wird mCPBA (286 μmol , 62 mg 80 %ige Substanz) in DCM (1 mL) gelöst und bei 0 °C langsam zugeben. Die Mischung wird bei 0 °C 3 h vorsichtig gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 10 mL DCM, 3 x 10 mL DCM/MeOH (1/1 v/v), 3 x 10 mL MeOH und 3 x

10 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Eine Probespaltung nach 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) lieferte das Peptid Leu-Gly-CysO₂(Bzl)-Ala-Gly.

ESI-MS pos.: m/z (%) 542,2 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 542: m/z (%) 542,1 (17) [M+H]⁺, 524,1 (3) [b₅]⁺, 466,9 (100) [b₄]⁺, 396,9 (3) [b₃]⁺, 372,0 (6) [y₃]⁺, 311,0 (26)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.59 (5H, m, Ph), 5.08 (1H, dd, J₁=4,3 Hz, J₂=8,6 Hz, Cys^α), 4.79 (1H, s, Ph-CH_a-SO₂), 4.71 (1H, s, Ph-CH_b-SO₂), 4.48 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.16 (1H, dd, J₁=6,6 Hz, J₂=7,5 Hz, Leu^α), 4.09 (1H, s, Gly^α), 4.08 (1H, s, Gly^α), 3.96 (1H, s, Gly^α), 3.95 (1H, s, Gly^α), 3.95 (1H, dd, J₁=4,3 Hz, J₂=14,7 Hz, Cys^{β_a}), 3.73 (1H, dd, J₁=8,6 Hz, J₂=14,7 Hz, Cys^{β_b}), 1.90-1.73 (3H, m, Leu^β, Leu^γ), 1.50 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.05 (3H, d, J=5,9 Hz, Leu^δ), 1.04 (3H, d, J=5,9 Hz, Leu^δ)

Das zweite Signal der Benzylgruppe fällt in die HDO-Unterdrückung.

In einem Vorversuch entstand noch etwas **Leu-Gly-CysO(Bzl)-Ala-Gly**

ESI-MS pos.: m/z (%) 548,1 (9) [M+Na]⁺, 526,1 (100) [M+H]⁺, 386,1 (26) [Leu-Gly-Dha-Ala-Gly+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 526: m/z (%) 526,0 (3) [M+H]⁺, 386,0 (100) [Leu-Gly-Dha-Ala-Gly+H]⁺, 311,0 (16)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, ein Diastereomer): δ 7.56 (3H, m, Ph), 7.48 (2H, m, Ph), 4.94 (1H, dd, J₁=5,8 Hz, J₂=7,9 Hz, Cys^α), 4.49 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.45 (1H, d, J=13,2 Hz, Ph-CH_a-SO), 4.27 (1H, d, J=13,2 Hz, Ph-CH_b-SO), 4.15 (1H, dd, J₁=J₂=7,2 Hz, Leu^α), 4.11 (1H, d, J=16,8 Hz, Gly^α), 4.06 (1H, d, J=16,8 Hz, Gly^α), 3.91 (1H, d, J=17,4 Hz, Gly^α), 3.83 (1H, d, J=17,4 Hz, Gly^α), 3.60 (1H, dd, J₁=5,8 Hz, J₂=13,8 Hz, Cys^{β_a}), 3.21 (1H, dd, J₁=7,9 Hz, J₂=13,8 Hz, Cys^{β_b}), 1.90-1.73 (3H, m, Leu^β, Leu^γ), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.05 (3H, d, J=5,8 Hz, Leu^δ), 1.03 (3H, d, J=5,8 Hz, Leu^δ)

Das Harz (33 μmol, 50 mg) wird in THF (500 μL) suspendiert, mit Kalium-*tert.*-butylat (66 μmol, 8 mg) in THF (500 μL) versetzt und 120 min bei RT gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 10 x 3 mL THF und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-Dha-Ala-Gly.

Ausbeute: 82 % **Reinheit:** 51 % **R_t HPLC:** 21,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 729,9 (20) [2M+Na]⁺, 771,1 (47) [2M+H]⁺, 424,2 (13) [M+K]⁺, 408,2 (37) [M+Na]⁺, 386,1 (100) [M+H]⁺, 311,0 (17) [b₄]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 386: m/z (%) 386,1 (16) [M+H]⁺, 368,1 (35) [b₅]⁺, 331,0 (100) [b₄]⁺, 273,0 (2) [y₄]⁺, 240,1 (6) [b₃]⁺, 215,9 (33) [y₃]⁺, 198,9 (23) [Gly-Dha-Ala]⁺, 170,9 (3) [b₂]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.98 (1H, s, =CH), 5.64 (1H, s, =CH), 4.49 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.04 (1H, d, J=16,7 Hz, Gly^α), 3.99 (1H, d, J=16,7 Hz, Gly^α), 3.94 (1H, m, Leu^α), 3.92 (2H, s, Gly^α), 1.81-1.68 (3H, m, Leu^β, Leu^γ), 1.43 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.02 (3H, d, J=5,4 Hz, Leu^δ), 1.01 (3H, d, J=5,4 Hz, Leu^δ)

¹³C-NMR (80 MHz, CD₃OD): δ 174.5 (Leu-CO), 174.4 (Ala-CO), 172.2 (Gly-CO), 169.6 (Gly-CO), 165.6 (Dha-CO), 136.0 (Dha^α), 107.5 (Dha^β), 52.6 (Leu^α), 50.4 (Ala^α), 43.8 (Gly^α), 41.4 (Gly^α), 41.0 (Leu^β), 25.0 (Leu^γ), 21.7 (2xLeu^δ), 17.0 (Ala^β)

Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly (P46)

Boc-Leu-Gly-Dha-Ala-Gly-WANG-Harz (37 μmol, 50 mg) und Ac-Cys-OMe (111 μmol, 20 mg) werden unter Stickstoff in THF (1 mL) suspendiert und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 5 x 3 mL THF und 2 x 3 mL MeOH gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly.

Ausbeute: 87 % **Reinheit:** 35 % **R_t HPLC:** 25,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 585,8 (47) [M+Na]⁺, 563,2 (100) [M+H]⁺, 488,1 (4) [b₄]⁺, 450,1 (2) [y₄]⁺, 417,1 (3) [b₃]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 563: m/z (%) 563,1 (10) [M+H]⁺, 545,1 (13) [b₅]⁺, 488,0 (100) [b₄]⁺, 450,0 (3) [y₄]⁺, 417,1 (43) [b₃]⁺, 393,0 (30) [y₃]⁺, 311,0 (25)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.75 (1H, m, Lan^α), 4.65 (1H, m, Lan^δ), 4.49 (1H, m, Ala^α), 4.16 (1H, dd, J₁=J₂=7,1 Hz, Leu^α), 4.08 (2H, s, Gly^α), 4.04 (2H, d, J=3,9 Hz, Gly^α), 3.87 (3H, s, OMe), 3.23-2.99 (4H, m, Lan^β, Lan^γ), 2.15 (3H, s, Ac), 1.91-1.75 (3H, m, Leu^β, Leu^γ), 1.51 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu^δ), 1.04 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu^δ)

¹³C-NMR (80 MHz, D₂O): δ 174.8 (Ala-CO), 174.5 (Ac), 174.3 (Gly-CO), 172.7 (CO₂Me), 172.6 (Lan-CO), 171.9 (Lan-CO), 171.2 (Leu-CO), 171.1 (Gly-CO), 53.5 (OMe), 53.3 und 53.0 (Lan^α, Lan^δ), 51.9 (Leu^α), 49.8 (Ala^α), 42.2 (Gly^α), 41.7 (Gly^α), 40.0 (Leu^β), 33.4 und 33.0 (Lan^β, Lan^γ), 23.9 (Leu^γ), 21.9 (Ac), 21.6 (Leu^δ), 21.4 (Leu^δ), 16.8 (Ala^β)

Leu-Gly-Lal(Ac)(OMe)-Ala-Gly (P47)

Boc-Leu-Gly-Dha-Ala-Gly-Wangharz (33 μmol, 47 mg), DIPEA (264 μmol, 46 μl) und Ac-Lys-OMe x HCl (99 μmol, 24 mg) werden unter Stickstoff in THF/MeOH (2/1 v/v, 1 mL) suspendiert und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert (Filtrat aufheben), mit 2 x 3 mL THF, 2 x 3 mL THF/MeOH (1/1 v/v), 2 x 3 mL MeOH, 2 x 3 mL MeOH/H₂O (1/1 v/v), 2 x 3 mL MeOH, 2 x 3 mL MeOH/DCM (1/1 v/v) und 2 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly.

Ausbeute: 48 % **Reinheit:** 10 % **R_t HPLC:** 23,7 + 24,0 min (Diastereomerenpaar)

Bedingt durch die Anwesenheit von MeOH und DIPEA findet bei der Reaktion teilweise Abspaltung vom Harz statt. Daher kann aus dem Filtrat nach Einengen und Entfernen der Boc-Gruppe mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) weiteres Leu-Gly-Lan(Ac)(OMe)-Ala-Gly isoliert werden.

ESI-MS pos.: m/z (%) 610,3 (12) [M+Na]⁺, 588,3 (100) [M+H]⁺, 475,2 (9) [y₄]⁺, 294,8 (28) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 588: m/z (%) 588,3 (13) [M+H]⁺, 570,3 (100) [b₅]⁺, 513,2 (4) [b₄]⁺, 442,2 (3) [b₃]⁺, 418,2 (29) [y₃]⁺, 374,1 (10)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 2 Diastereomere): δ 4.92 (1H, m, Lal^α), 4.52 (1H, m, Ala^α), 4.48 (1H, m, Lal^η), 4.17 (1H, m, Leu^α), 4.14 (2H, s, Gly^α), 3.98 (2H, s, Gly^α), 3.85 (3H, s, OMe), 3.64 (1H, dd, J₁=5,4 Hz, J₂=13,3 Hz, Lal^{β_a}), 3.43 (1H, dd, J₁=7,9 Hz, J₂=13,3 Hz, Lal^{β_b}), 3.20 (2H, m, Lal^γ), 2.13 (3H, s, Ac), 2.03-1.74 (7H, kompl., Leu^β, Leu^γ, Lal^δ, Lal^ε), 1.57 (2H, m, Lal^ε), 1.51 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ), 1.04 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu^δ)

Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (P48)

Methode 1:

Die Synthese erfolgt an WANG-Harz (100 μmol, 88 mg) nach 3.4.5.1 mit dem Baustein Fmoc-Glarg(Fmoc)-OH (**11**, 500 μmol, 330 mg, gelöst in etwas NMP).

Ausbeute: 87 % **Reinheit:** 57 %

Methode 2:

Leu-Gly-Orn(Dde)-Ala-Gly-WANG-Harz wird an WANG-Harz (200 μmol, 177 mg) nach 3.4.5.1 am Synthesizer aufgebaut. Dazu wird der Building-Block Fmoc-Orn(Dde)-OH verwendet. Der N-Terminus wird nach 3.4.5.3 mit Boc geschützt. Eine Probespaltung lieferte Leu-Gly-Orn(Dde)-Ala-Gly.

Reinheit: >95 % **R_t HPLC:** 35,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 617,3 (29) [M+Na]⁺, 595,2 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 595: m/z (%) 595,3 (11) [M+H]⁺, 577,2 (18) [b₅]⁺, 520,2 (100) [b₄]⁺, 482,1 (6) [y₄]⁺, 449,2 (86) [b₃]⁺, 435,1 (8), 425,1 (17) [y₃]⁺, 309,2 (7)

Die Dde-Gruppe wird vom Harz nach Punkt 3.4.5.6 mit Hydrazin abgespalten. Das so dargestellte Boc-Leu-Gly-Orn(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz (20 μmol, 30 mg) wird in THF (1000 μL) suspendiert, *N,N'*-Di-Boc-*N*-methoxycarbonylmethyl-*S*-methylisothioharnstoff (**16**, 60 μmol, 22 mg) zugeben und unter Stickstoff über Nacht gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 5 x 2 mL THF, 5 x 2 mL MeOH und 5 x 2 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach 3.4.9 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert die Peptide Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly

Ausbeute: >90 % **Reinheit:** 61 % **R_t HPLC:** 20,6 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 535,3 (7) $[M+Na]^+$, 513,2 (100) $[M+H]^+$, 400,1 (27) $[y_4]^+$, 257,2 (21) $[M+2H]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 513: m/z (%) 513,2 (13) $[M+H]^+$, 495,2 (8) $[b_5]^+$, 478,1 (19), 438,1 (100) $[b_4]^+$, 400,1 (11) $[y_4]^+$, 367,1 (77) $[b_3]^+$, 343,0 (31) $[y_3]^+$

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.47 (2H, m, Ala $^\alpha$, Glarg $^\alpha$), 4.37 (2H, s, Glarg $^\zeta$), 4.16 (1H, q, $J=7,0$ Hz, Leu $^\alpha$), 4.11 (2H, s, Gly $^\alpha$), 4.02 (2H, s, Gly $^\alpha$), 3.79 (2H, m, Glarg $^\delta$), 1.99-1.74 (7H, komp., Leu $^\beta$, Leu $^\gamma$, Glarg $^\beta$, Glarg $^\gamma$), 1.50 (3H, d, $J=7,2$ Hz, Ala $^\beta$), 1.06 (3H, d, $J=5,5$ Hz, Leu $^\delta$), 1.05 (3H, d, $J=5,5$ Hz, Leu $^\delta$)

Leu-Gly-CMA-Ala-Gly (P51)

Methode 1:

Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly (**P48**, Reinprodukt, 10 μ mol, 5 mg) wird in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 8,0, 0,05 % NaN_3 , 3 mL) gelöst und 3 d gerührt, mit Wasser (3 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. HPLC-Analyse zeigt eine Reinheit von 95 % bezogen auf den Peptidanteil.

Methode 2:

Analog Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly Methode 2 mit *N,N'*-Di-Boc-*N*-*tert.*-butcarboxymethyl-*S*-methylisothioharnstoff (**17**, 62 μ mol, 25 mg).

Ausbeute: 83 % **Reinheit:** 47 % **R_t HPLC:** 19,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 531,3 (100) $[M+H]^+$, 513,2 (43) $[b_5]^+$, 266,2 (33) $[M+2H]^{2+}$

ESI-MS/MS pos. von m/z 531: m/z (%) 531,2 (10) $[M+H]^+$, 513,2 (100) $[b_5]^+$, 456,1 (20) $[b_4]^+$, 385,1 (12) $[b_3]^+$, 367,2 (13), 339,9 (10)

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.48 (1H, q, $J=7,2$ Hz, Ala $^\alpha$), 4.43 (1H, t, $J=6,3$ Hz, CMA $^\alpha$), 4.16 (1H, dd, $J_1=J_2=7,0$ Hz, Leu $^\alpha$), 4.11 (2H, s, CMA $^\zeta$), 3.99 (2H, d, $J=2$ Hz, Gly $^\alpha$), 3.95 (2H, d, $J=2$ Hz, Gly $^\alpha$), 3.34 (2H, t, $J=6,8$ Hz, CMA $^\delta$), 2.00-1.72 (7H, komp., Leu $^\beta$, Leu $^\gamma$, CMA $^\beta$, CMA $^\gamma$), 1.50 (3H, d, $J=7,2$ Hz, Ala $^\beta$), 1.06 (3H, d, $J=5,6$ Hz, Leu $^\delta$), 1.05 (3H, d, $J=5,6$ Hz, Leu $^\delta$)

Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (P55)

Analog Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly Methode 2 mit *N,N'*-Di-Boc-*N*-(1-methcarboxyethyl)-*S*-methylisothioharnstoff (**18**, 60 μ mol, 23 mg).

Ausbeute: > 90 % **Reinheit:** 26 % **R_t HPLC:** 22,7 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 527,3 (100) $[M+H]^+$

ESI-MS/MS pos. von m/z 527: m/z (%) 527,2 (6) $[M+H]^+$, 509,2 (13) $[b_5]^+$, 492,2 (14), 452,1 (100) $[b_4]^+$, 424,1 (19), 414,1 (21) $[y_4]^+$, 381,1 (88) $[b_3]^+$, 357,2 (32) $[y_3]^+$

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.55-4.39 (3H, kompl., Ala $^\alpha$, MG-H3 $^\alpha$, MG-H3 $^\zeta$), 4.14 (1H, q, $J=7,1$ Hz, Leu $^\alpha$), 4.09 (2H, s, Gly $^\alpha$), 3.83 (2H, d, $J=2$ Hz, Gly $^\alpha$), 3.78 (2H, m, MG-H3 $^\delta$), 1.91-1.72 (7H, komp., Leu $^\beta$, Leu $^\gamma$, MG-H3 $^\beta$, MG-H3 $^\gamma$), 1.53 (3H, d, $J=6,8$ Hz, MG-H3 $^\eta$), 1.47 (3H, d, $J=7,2$ Hz, Ala $^\beta$), 1.04 (3H, d, $J=5,4$ Hz, Leu $^\delta$), 1.03 (3H, d, $J=5,4$ Hz, Leu $^\delta$)

Leu-Gly-CEA-Ala-Gly (P56)**Methode 1:**

Leu-Gly-(MG-H3)-Ala-Gly (**P55**, Reinprodukt, 10 μmol , 5 mg) wird in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 8,0, 0,05 % NaN_3 , 3 mL) gelöst und 3 d gerührt, mit Wasser (3 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. HPLC-Analyse zeigt eine Reinheit von >85 % bezogen auf den Peptidanteil.

Methode 2:

Analog Leu-Gly-Glarg-Ala-Gly Methode 2 mit *N,N'*-Di-Boc-*N*-(1-*tert.*-butcarboxyethyl)-*S*-methylisothioharnstoff (**19**, 60 μmol , 25 mg).

Ausbeute: > 90 % **Reinheit:** 36 % **R_t HPLC:** 23,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 545,2 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 545: m/z (%) 545,2 (8) [M+H]⁺, 527,2 (100) [b₅]⁺, 470,1 (9) [b₄]⁺, 432,1 (5) [y₄]⁺, 399,0 (4) [b₃]⁺, 381,1 (10)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.50-4.41 (3H, kompl., Ala ^{α} , CEA ^{α} , CEA ^{ζ}), 4.15 (1H, dd, J₁=J₂=7,2 Hz, Leu ^{α}), 4.11 (2H, s, Gly ^{α}), 3.95 (2H, d, J=2,2 Hz, Gly ^{α}), 3.34 (2H, m, CEA ^{δ}), 2.01-1.70 (7H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , CEA ^{β} , CEA ^{γ}), 1.50 (6H, m, MG-H3 ^{η} , Ala ^{β}), 1.06 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu ^{δ}), 1.04 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu ^{δ})

Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly (P57)

Boc-Leu-Gly-Orn(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz (33 μmol , 50 mg, Darstellung vgl. **P48** Methode 2) wird in THF (666 μL) suspendiert, 5-Hydro-5-methyl-2-methylthio-4-imidazolone (**20**, 100 μmol , 14,4 mg) und DIPEA (100 μmol , 18 μL) in Acetonitril (333 μL) zugegeben und unter Stickstoff über Nacht gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 3 mL THF, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-(MG-H1)-Ala-Gly

Ausbeute: >90 % **Reinheit:** 24 % **R_t HPLC:** 21,1 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 527,3 (100) [M+H]⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 527: m/z (%) 527,1 (14) [M+H]⁺, 509,2 (22) [b₅]⁺, 492,1 (9), 452,1 (65) [b₄]⁺, 424,1 (8), 414,1 (17) [y₄]⁺, 381,1 (100) [b₃]⁺, 357,2 (29) [y₃]⁺, 268,1 (5)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.54-4.38 (3H, kompl., Ala ^{α} , MG-H1 ^{α} , MG-H1 ^{ζ}), 4.15 (1H, dd, J₁=J₂=7,0 Hz, Leu ^{α}), 4.11 (2H, s, Gly ^{α}), 3.90 (2H, d, J=5 Hz, Gly ^{α}), 3.46 (2H, m, MG-H1 ^{δ}), 1.97-1.73 (7H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , MG-H1 ^{β} , MG-H1 ^{γ}), 1.55 (3H, d, J=6,7 Hz, MG-H1 ^{η}), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.06 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu ^{δ}), 1.04 (3H, d, J=5,6 Hz, Leu ^{δ})

Leu-Gly-Har-Ala-Gly (P58)

Boc-Leu-Gly-Lys(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz (33 μmol , 50 mg, Darstellung vgl. **P38**) wird mit Triethylamin (92 μmol , 13 μg), *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff (69 μmol , 19 mg) und 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid (Mukajama-Reagenz, 69 μmol , 18 mg) analog Leu-Gly-(MG-H2)-

Ala-Gly umgesetzt. Harzspaltung nach 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-Har-Ala-Gly.

Ausbeute: >90 % **Reinheit:** >95 % **R_t HPLC:** 22,0 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 487,2 (100) [M+H]⁺, 374,2 (8) [y₄]⁺, 244,3 (35) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 487: m/z (%) 487,2 (22) [M+H]⁺, 470,1 (85) [M-NH₃+H]⁺, 469,1 (51) [b₅]⁺, 452,1 (22) [b₅-NH₃]⁺, 412,1 (96) [b₄]⁺, 395,0 (62) [b₄-NH₃]⁺, 384,2 (70), 341,1 (44) [b₃]⁺, 324,1 (100) [b₃-NH₃]⁺, 300,1 (12) [y₃-NH₃]⁺, 296,2 (13), 283,0 (12), 171,0 (5) [b₂]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.49 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.40 (1H, dd, J₁=J₂=7,1 Hz, Har^α), 4.15 (1H, dd, J₁=J₂=7,2 Hz, Leu^α), 4.11 (2H, s, Gly^α), 3.92 (1H, d, J=17,4 Hz, Gly^α), 3.86 (1H, d, J=17,4 Hz, Gly^α), 3.27 (2H, t, J=6,8 Hz, Har^ε), 1.97-1.64 (7H, komp., Leu^β, Leu^γ, Har^β, Har^γ), 1.50 (5H, m, Har^δ, Ala^β), 1.06 (3H, d, J = 5,2 Hz, Leu^δ), 1.04 (3H, d, J = 6,1 Hz, Leu^δ)

EDMAN-Sequenzierung: L-G-Har-A-G (Abb. 6-1 im Anhang)

Leu-Gly-(MG-H2)-Ala-Gly (P59)

Boc-Leu-Gly-Orn(Ø)-Ala-Gly-WANG-Harz (33 μmol, 50 mg, Darstellung vgl. P48 Methode 2) wird in DCM (700 μL) suspendiert und Brenztraubensäuremethylester (50 μmol, 4,5 μL) zugegeben. Die Mischung wird mit Natriumcyanoborhydrid (60 μmol, 4 mg) in MeOH (420 μL) versetzt, geschüttelt und über Nacht bei RT sachte gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 3 mL DCM, 3 x 3 mL MeOH und 3 x 3 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Eine Probespaltung nach 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly.

Ausbeute: >90 % **Reinheit:** 87 % **R_t HPLC:** 21,7 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 539,2 (13) [M+Na]⁺, 517,2 (100) [M+H]⁺, 404,1 (11) [y₄]⁺, 259,2 (10) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 517: m/z (%) 517,1 (22) [M+H]⁺, 499,2 (48) [b₅]⁺, 482,1 (7), 457,1 (3), 442,1 (80) [b₄]⁺, 414,0 (22), 404,1 (9) [y₄]⁺, 371,1 (100) [b₃]⁺, 347,2 (49) [y₃]⁺, 339,0 (24), 226,0 (17), 201,0 (61)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.48 (1H, q, J=7,2 Hz, Ala^α), 4.46 (1H, m, Leu^α), 4.25 (1H, q, J=7,2 Hz, N^δ-CH(CH₃)-COOMe), 4.16 (1H, dd, J₁=J₂=7,2 Hz, Orn^α), 4.11 (2H, s, Gly^α), 3.94 (3H, s, OMe), 3.87 (1H, d, J=17,2 Hz, Gly^α), 3.81 (1H, d, J=17,2 Hz, Gly^α), 3.21 (2H, m, Orn^δ), 2.05-1.75 (7H, komp., Leu^β, Leu^γ, Orn^β, Orn^γ), 1.67 (3H, d, J=7,2 Hz, N^δ-CH(CH₃)-COOMe), 1.50 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala^β), 1.06 (3H, d, J=5,5 Hz, Leu^δ), 1.05 (3H, d, J=5,5 Hz, Leu^δ)

Boc-Leu-Gly-CEO(OMe)-Ala-Gly-WANG-Harz (23 μmol, 35 mg) wird in DCM (750 μL) suspendiert. Dann werden Triethylamin (92 μmol, 13 μL) und *N,N'*-Di-Boc-thioharnstoff (69 μmol, 19 mg) zugegeben und 15 min gerührt. Anschließend wird 2-Chlor-*N*-

methylpyridiniumiodid (Mukajama-Reagenz, 69 μmol , 18 mg) zugegeben und 4 h gerührt. Dabei wandelt sich die Farbe von Gelb nach Dunkelgrün. Dann wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 10 mL DCM, 3 x 10 mL DMF und 3 x 10 mL DCM gewaschen und über KOH *in vacuo* getrocknet. Harzspaltung nach Punkt 3.4.5.7 mit TFA/Wasser/TIS (95/2,5/2,5 v/v/v) liefert das Peptid Leu-Gly-(MG-H2)-Ala-Gly.

Ausbeute: >90 % **Reinheit:** 43 % **R_t HPLC:** 21,8 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 527,2 (100) [M+H]⁺, 414,2 (22) [y₄]⁺, 264,3 (23) [M+2H]²⁺

ESI-MS/MS pos. von m/z 527: m/z (%) 527,2 (5) [M+H]⁺, 509,2 (12) [b₅]⁺, 492,1 (42), 452,1 (61) [b₄]⁺, 424,1 (23), 414,2 (50) [y₄]⁺, 381,1 (100) [b₃]⁺, 357,2 (28) [y₃]⁺, 268,1 (5), 211,0 (12), 166,1 (11)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.55-4.43 (3H, kompl., Ala ^{α} , MG-H2 ^{α} , MG-H2 ^{ζ}), 4.15 (1H, dd, J₁=J₂=7,1 Hz, Leu ^{α}), 4.11 (2H, d, J=3,5 Hz, Gly ^{α}), 4.00 (2H, s, Gly ^{α}), 3.69 (1H, m, MG-H2 ^{δ_a}), 3.57 (1H, m, MG-H2 ^{δ_b}), 1.97-1.72 (7H, komp., Leu ^{β} , Leu ^{γ} , MG-H2 ^{β} , MG-H2 ^{γ}), 1.58 (3H, d, J=7,1 Hz, MG-H1 ^{η}), 1.49 (3H, d, J=7,2 Hz, Ala ^{β}), 1.06 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu ^{δ}), 1.04 (3H, d, J=5,7 Hz, Leu ^{δ})

3.5.4 Synthese von Multiplen Antigenpeptiden

Die Synthesen erfolgen gemäß 3.4.5.1 am Festphasen-Peptidsynthesizer an (Fmoc₂Lys)₂Lys- β -Ala-WANG-Harz (6,75 μmol ; 100 mg) Die Spaltung der Peptide vom Harz verläuft gemäß Punkt 3.4.5.7. Ein Teil des Rohpeptides wird durch RP-HPLC (wenn nicht anders angegeben Programm „Peptide“) aufgereinigt. Pro Lauf werden 500-2000 μg Rohpeptid chromatographiert und das saubere Produkt gefriergetrocknet. Diese gereinigten MAPs werden dann für die Bioassays und Immunisierungsexperimente verwendet.

((RDEDSYERDPYSPSQ)₂Lys)₂Lys- β -Ala (MAP1)

Summenformel: C₃₂₅H₄₇₅N₉₅O₁₂₉

Rel. Molekülmasse M_{rel}: 7776,909 u

Monoisotopische Masse M_m: 7772,353 u

Masse des Hauptisotopomers M: 7776,4 u

Ausbeute: 70 % **Reinheit:** 88 % **R_t HPLC:** 34,2 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1297,1 (19) [M+6H]⁶⁺, 1112,0 (38) [M+7H]⁷⁺, 973,3 (100) [M+8H]⁸⁺, 865,1 (95) [M+9H]⁹⁺, 778,8 (28) [M+10H]¹⁰⁺

MALDI-TOF-MS: m/z (%) 15553,0 (5) [2M+H]⁺, 7775,4 (100) [M+H]⁺, 3886,5 (51) [M+2H]²⁺

EDMAN-Sequenzierung: RDEDSYERDPYSPSQ

((DPYSPSQDPYSPSPY)₂Lys)₂Lys-β-Ala (MAP2)**Summenformel:** C₃₂₉H₄₄₃N₇₁O₁₁₃**Rel. Molekülmasse M_{rel}:** 7200,547 u**Monoisotopische Masse M_m:** 7196,110 u**Masse des Hauptisotopomers M:** 7200,1 u**Ausbeute:** 84 % **Reinheit:** 74 % **R_t HPLC:** 35,5 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1801,1 (100) [M+4H]⁴⁺, 1440,9 (8) [M+5H]⁵⁺, 1201,2 (2) [M+6H]⁶⁺**MALDI-TOF-MS:** m/z (%) 7200,2 (100) [M+H]⁺, 3599,6 (69) [M+2H]²⁺**EDMAN-Sequenzierung:** DPYSPSQDPYSPSPYD**((DRRCQSQLERANLRP)₂Lys)₂Lys-β-Ala (MAP3)****Summenformel:** C₃₁₃H₅₄₇N₁₂₇O₉₇S₄**Rel. Molekülmasse M_{rel}:** 7769,848 u**Monoisotopische Masse M_m:** 7765,066 u**Masse des Hauptisotopomers M:** 7769,1 u**Ausbeute:** 65 % **Reinheit:** 46 % **R_t HPLC:** 30,7 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1942,7 (23) [M+4H]⁴⁺, 1555,1 (100) [M+5H]⁵⁺, 1295,9 (38) [M+6H]⁶⁺, 1110,8 (20) [M+7H]⁷⁺, 972,0 (13) [M+8H]⁸⁺, 864,5 (8) [M+9H]⁹⁺, 778,8 (2) [M+10H]¹⁰⁺**MALDI-TOF-MS:** m/z (%) 7770,8 (83) [M+H]⁺, 3886,1 (100) [M+2H]²⁺, 2591,6 (36) [M+3H]³⁺**EDMAN-Sequenzierung:** DRR-QSQLERANLRP

Zur Aufreinigung werden 6,5 mg Rohprodukt in Wasser/1,2-Ethandithiol (999/1 v/v, 300 μL) gelöst und dann im isokratischen System A/B 22/78 (v/v) (100 μL pro Lauf, R_t = 8,8 min) getrennt.

Ausbeute Reinprodukt: 1,4 mg (22 %)**(RQQEQQF-CML-RELRNLP)₄Lys₂Lys-β-Ala (MAP4)**

Die Synthese erfolgt mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**, 345 μmol, 200 mg, gelöst in etwas NMP).

Summenformel: C₃₆₅H₆₀₃N₁₂₇O₁₀₉**Rel. Molekülmasse M_{rel}:** 8514,593 u**Monoisotopische Masse M_m:** 8509,555 u**Masse des Hauptisotopomers M:** 8513,6 u**Ausbeute:** 77 % **Reinheit:** 68 % **R_t HPLC:** 34,8 min**ESI-MS pos.:** m/z (%) 1704,0 (100) [M+5H]⁵⁺, 1420,2 (61) [M+6H]⁶⁺, 1217,5 (26) [M+7H]⁷⁺, 1065,2 (10) [M+8H]⁸⁺, 947,2 (4) [M+9H]⁹⁺, 852,5 (1) [M+10H]¹⁰⁺**MALDI-TOF-MS:** m/z (%) 8514,3 (89) [M+H]⁺, 4257,3 (100) [M+2H]²⁺**EDMAN-Sequenzierung:** RQQEQQF-RELRNLP

Zur Aufreinigung werden 6,0 mg Rohprodukt in Wasser (300 μ L) gelöst und dann im System 25 % auf 35 % B in 20 min (100 μ L pro Lauf, R_t = 13,4 min) getrennt.

Ausbeute Reinprodukt: 2,1 mg (35 %)

(EQHLMQ-CML-IQRDEDS)₄Lys₂Lys- β -Ala (MAP5)

Die Synthese erfolgt mit dem Baustein Fmoc-CML(O^tBu)(Boc)-OH (**1**, 345 μ mol, 200 mg, gelöst in etwas NMP).

Summenformel: C₃₁₃H₅₁₁N₉₉O₁₁₇S₄

Rel. Molekülmasse M_{rel} : 7661,361 u

Monoisotopische Masse M_m : 7656,596 u

Masse des Hauptisotopomers M : 7660,6 u

Ausbeute: 93 % **Reinheit:** 32 % **R_t HPLC:** 21,9 min

ESI-MS pos.: m/z (%) 1916,0 (100) [M+4H]⁴⁺, 1533,0 (43) [M+5H]⁵⁺, 1277,8 (5) [M+6H]⁶⁺, 1095,7 (2) [M+7H]⁷⁺

MALDI-TOF-MS: m/z (%) 7658,4 (100) [M+H]⁺, 3826,0 (41) [M+2H]²⁺

EDMAN-Sequenzierung: EQHLMQ-IQRDEDS

4 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Hitzebeständigkeit des rekombinanten Kirschkernallergens rPru a 1 zeigten, dass die IgE-Bindungsfähigkeit dieses Allergens durch Hitzeinfluss nur langsam gemindert wird. Die langsame Abnahme der IgE-Bindung dürfte auf hitzeinduzierte Konformationsänderungen des Proteins zurückzuführen sein, wodurch Konformationsepitope verloren gehen. Der Zusatz von reduzierenden Kohlenhydraten während der Erhitzung führte zu einer verstärkten Abnahme der IgE-Affinität. Der Umfang dieser Abnahme korrelierte einerseits mit der Reaktivität der zugesetzten Saccharide (Pentose > Kethexose > Aldohexose >> Di- und Polysaccharide), andererseits mit der Erhitzungsdauer. Diese Effekte konnten sowohl durch ELISA-Experimente als auch durch kompetitive EAST-Inhibitionsversuche belegt werden. Wurden die Kohlenhydrate durch hochreaktive Zuckerabbauprodukte wie Glyoxal oder Glycerinaldehyd ersetzt, so ging die IgE-Affinität des Allergens rasch und vollständig verloren. Die chemische Überführung der Lysinseitenketten des Allergens in die *advanced glycation endproduct*-Aminosäure N^ε-Carboxymethyllysin führte zu einer deutlichen Abnahme der IgE-Affinität des Allergens, ein weiterer Beleg für den Verlust von Konformationsepitopen durch MAILLARD-Reaktion.

Im Widerspruch zu Literaturdaten wurde in ELISA-Studien eine spezifische IgE-Bindung von humanen Allergikersera an natives Erdnusslectin gemessen. Untersuchungen zum Einfluss der MAILLARD -Reaktion zeigten, dass je nach Reaktivität des eingesetzten Kohlenhydrates bzw. Zuckerabbauproduktes die allergene Potenz des Proteins mehr oder weniger stark vermindert wurde (Glyoxal > Pentose > Hexose >> Di- und Polysaccharide). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine chemische Carboxymethylierung des Proteins die IgE-Bindung herabsetzte.

Untersuchungen am rekombinanten Haupterdnussallergen rAra h 2 zeigten, dass das Erhitzen des Allergens in Gegenwart von reduzierenden Zuckern zu einer Erhöhung der AK-Bindungskapazität führte. Als besonders reaktiv stellten sich kurzkettige α -Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal heraus. Diese führten zu einer drastischen Zunahme der Antikörperbindung. Dies war bei allen untersuchten Allergikersera der Fall. Studien zur Modulation der IgE-Affinität verschiedener Sequenzabschnitte von Ara h 2 zeigten, dass Glycosylierungsprodukte der Lysin-Seitenketten, des N-Terminus und der Arginin-Seitenketten in den Epitopen nicht für diesen beobachteten Effekt verantwortlich

sind. Stattdessen scheinen bislang nicht bekannte, MAILLARD -induzierte Modifikationen der Serin-Reste in Epitop 7 mit der Zunahme der Antikörper-Bindung in Zusammenhang zu stehen. Im Rahmen der Arbeit wurden Strategien entwickelt, die den Einbau der wichtigsten *advanced glycation endproduct*-Modifikationen der Aminosäuren Lysin (CML, CEL) und Arginin (Glarg, CMA, MG-H1, MG-H2, MG-H3, CEA) in Peptide erlauben.

Untersuchungen zum Einfluss der enzymatischen Bräunung auf das allergene Potential von rPru a 1, Erdnusslectin und rAra h 2 zeigten, dass die IgE-Bindungskapazität aller drei Proteine unter diesen Bedingungen stark gemindert wird. ELISA-Studien an ternären Mischungen aus Allergen, einem Pflanzenpolyphenol und dem Enzym Polyphenoloxidase zeigten, dass der Grad der Modulation der IgE-Affinität vom eingesetzten Polyphenol abhängig ist. Von den untersuchten Pflanzenphenolen zeigten Epicatechin und Kaffeesäure den stärksten Effekt. Die Abnahme der IgE-Bindung dürfte auf chemisch induzierte Modifikationen des Proteins zurückzuführen sein, wodurch Epitope verloren gehen. Die Hemmung der IgE-Anbindung an lineare Epitope durch derartige Bräunungsreaktionen konnte im Fall von rAra h 2 an Modellstudien mit Epitop-Peptiden belegt werden.

Durch Anwendung der MAP-Technologie konnte erstmals auf dem Gebiet der Lebensmittelallergie ein epitopspezifisches Antiserum gewonnen werden. Ein multiples Antigenpeptid (MAP), das die Sequenz des Ara h 2-Hauptepitop 3 enthält, generierte ein Antiserum, welches selektiv dieses Epitop und somit ohne Nebenaktivitäten Ara h 2 in einem Erdnussproteinextrakt erkannte. Solche Antisera stellen ein neuartiges Werkzeug zum Nachweis von allergenen Proteinen dar und eröffnen neue Möglichkeiten in der Lebensmittelüberwachung und medizinischen Diagnostik.

5 Literaturverzeichnis

Ahmed, M.U.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W., Identification of N^ε-(Carboxymethyl)lysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein, *J. Biol. Chem.*, 261, **1986**, 4889-4894

Ahmed, M.U.; Brinkmann-Frye, E.; Degenhardt, T.P.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W., N^ε-(Carboxyethyl)lysine, a Product of the Chemical Modification of Protein by Methylglyoxal, Increases with Age in Human Lens Proteins, *Biochem. J.*, 324, **1997**, 565-570

Ahmed, N.; Argirov, O.; Minhas, H.; Cordeiro, C.; Thornalley, P., Assay of Advanced Glycation Endproducts: Surveyings AGEs by Chromatographic Assay with Derivatisation by 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and Application to N-Carboxymethyllysine- and N-Carboxyethyllysine-modified Albumin, *Biochem. J.*, 364, **2002**, 1-14

Amadori, M., Prodotti de condensazione tra glucosia e p-touidina, *Atti R. Acad. Naz. Lincei Mem. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.*, 13, **1931**, 72-77

Arts, I.; van de Putte, B.; Hollman, P., Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in the Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods and Processed Foods, *J. Agric. Food Chem.*, 48, **2000**, 1746-1751

Aulepp, H.; Vieths, S., Probleme der Nahrungsmittelallergie, *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 6 (88), **1992**

Ballmer-Weber, B.K.; Scheurer, S.; Fritsche, P.; Enrique, E.; Cistero, A.; Haase, T.; Wüthrich, B., Component Resolved Diagnosis Using Recombinant Allergens in Cherry Allergic Patients, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110, **2002**, 167-173

Baynes, J.W., The Role of Oxidative Stress in the Development of Complications in Diabetes, *Diabetes*, 40, **1991**, 405-412

Bernatowicz, M.S.; Wu, Y.; Matsueda, G.R., 1H-Pyrazole-1-carboxamide Hydrochloride: An Attractive Reagent for Guanylation of Amines and its Application to Peptide Synthesis, *J. Org. Chem.*, 57, **1992**, 2497-2502

Bernatowicz, M.S.; Wu, Y.; Matsueda, G.R., Urethane Protected Derivates of 1-Guanylpyrazole for the Mild and Efficient Preparation of Guanidines, *Tetrahedron Lett.*, 34, **1993**, 3389-3392

Bishop, J.E.; O'Connell, J.F.; Rapoport, H., The Reaction of Thioimides with Phosphorus Ylides, *J. Org. Chem.*, 56, **1991**, 5079-5091

Björkstén, F.; Halmepuro, L.; Hannuksela, M.; Lahti, A., Extraction and Properties of Apple Allergens, *Allergy*, 35, **1980**, 671-677

Bohak, Z., N^ε-(DL-2-Amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, a New Amino Acid Formed on Alkaline Treatment of Proteins, *J. Biol. Chem.*, 239, **1964**, 2878-2882

Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Barlos, K.; Grell, E., A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides Synthesized on 2-Chlorotriyl Chloride Resin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 777, **1994**, 2559-2560

Breiteneder, H.; Hoffmann-Sommergruber, K.; O'Riordain, G.; Susani, M.; Ahorn, H.; Ebner, C.; Kraft, D.; Scheiner, O., Molecular Characterization of Api g 1, the Major Allergen of Celery (*Apium graveolens*), and its Immunological and Structural Relationships to a Group of 17 kDa Tree Pollen Allergens, *Eur. J. Biochem.*, 233, **1995**, 484-489

Breiteneder, H.; Ebner C., Molecular and Biochemical Classification of Plant-Derived Food Allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, **2000**, 27-36

Brownlee, M.; Cerami A.; Vlassara, H., Advanced Glycosylation Endproducts in Tissue and the Biochemical Basis of Diabetic Complications, *N. Engl. J. Med.*, 318, **1988**, 1315-1320

Burks, A.W.; Williams, L.W.; Helm, R.M.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; O'Brian, T., Identification of a Major Peanut Allergen, Ara h 1, in Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenges, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 88, **1991**, 172-179

Burks, A.W.; Williams, L.W.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; O'Brian, T.; Helm, R.M., Identification and Characterization of a Second Major Peanut Allergen, Ara h 2, with Use of Sera of Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenges, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90, **1992**, 962-969

Burks, A.W.; Cockrell, G.; Stanley, J.S.; Helm, R.M.; Bannon, G.A., Recombinant Peanut Allergen Ara h 1 Expression and IgE Binding in Patients with Peanut Hypersensitivity, *J. Clin. Invest.*, 96, **1995**, 1715-1721

Burks, A.W.; Shin, D.; Cockrell, G.; Stanley, J.S.; Helm, R.M.; Bannon, G.A., Mapping and Mutational Analysis of the IgE-binding Epitopes on Ara h 1, a Legume Vicillin Protein and a Major Allergen in Peanut Hypersensitivity, *Eur. J. Biochem.*, 245, **1997**, 334-339

Burks, A.W.; Sampson, H.A.; Bannon, G.A., Peanut Allergens, *Allergy*, 53, **1998**, 725-730

Burrage, S.; Raynham, T.; Bradley, M., A Highly Effective Route to Dehydroalanine Containing Peptides, *Tetrahedron Lett.*, 39, **1998**, 2831-2834

Bycroft, B.W.; Chan, W.C.; Chharbra, S.R.; Hone, N.D., A Novel Lysine-protecting Procedure for Continuous Flow Solid Phase Synthesis of Branched Peptides, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 778, **1993**, 778-779

Caballero, T.; Martin-Esteban, M., Association Between Pollen Hypersensitivity and Edible Vegetable Allergy: A Review., *Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1, **1998**, 6-16

Carpino, L.A.; Han, G.Y., The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group, *J. Org. Chem.*, 22, **1972**, 3404-3409

Ceska, M.; Lundkvist, U., A New and Simple Radioimmunoassay Method for the Determination of IgE, *Immunochemistry*, 9, **1972**, 1021-1030

Chharbra, S.R.; Hothi, B.; Evans D.J.; White, P.D., Bycroft, B.W., Chan, W.C., An Appraisal of New Variants of Dde Amine Protecting Group for Solid Phase Peptides Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 39, **1998**, 1603-1606

Chung, S.-Y.; Champagne, E., Allergenicity of Maillard Reaction Products from Peanut Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 47, **1999**, 5227-5231

Chung, S.-Y.; Champagne, E., Association of End-Product Adducts with Increased IgE Binding of Roasted Peanuts, *J. Agric. Food Chem.*, 49, **2001**, 3911-3916

Current Protocols in Immunology, Synthesis and Use of Multiple Antigen Peptide (MAP) Systems, in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan, J.E. Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M.; Strober, W. (Hrsg.), Greene/Wiley-Interscience, New York, **1993**, Kapitel 9.6.1

Dechantsreiter, M., Synthese und Strukturmerkmale N-alkylierter Peptide, Entwicklung und Optimierung potentieller Tumortheraeutika, Dissertation, TU München, **1998**

Degenhardt, T.P.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W., Chemical Modification of Proteins by Methylglyoxal, *Cell. mol. Biol.*, 44(7), **1998**, 1139-1145

Duckworth, H.; Coleman, J., Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, 245, **1970**

Eriksson, N.E.; Formgren, H.; Svenonius, E., Food Hypersensitivity in Patients with Pollen Allergy, *Allergy*, 37, **1982**, 437-443

Feichtinger, K.; Sings, H.; Baker, T.; Matthwes, K.; Goodman, M., Triurethan-Protected Guanidines and Triflyldiurethan-Protected Guanidines: New Reagents for Guanidinylation Reactions, *J. Org. Chem.*, 62, **1998**, 8432-8439

Fields, G.; Noble, R., Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, **1990**, 161-214

Frank, R., SPOT-Synthesis: An Easy Technique for Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support, *Tetrahedron*, 48, **1992**, 9217

Frank, R.; Overwin, H., in: Methods in Molecular Biology, Band 66, Morris (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, USA, **1996**, 149-160

Frey, A.; Schmidt, M.A., in: Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Gassen, H.G., Schrimpf, G., (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, im Druck

Friedman, M., Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 47(4), **1999**, 1295-1319

Gibson, C., Kombinatorische Festphasensynthese und biologische Evaluation niedermolekularer RGD-Mimetika, *Dissertation*, **1998**, Technische Universität München

Glass, J.D.; Pelzig, M., Reversible Modification of Arginine Residues with Glyoxal and Glycoaldehyde, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 81, **1978**, 527-531

Glomb, M.; Monnier, V., Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycoaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard-Reaction, *J. Biol. Chem.*, 270, **1995**, 10017-10026

Glomb, M.; Lang, G., Isolation and Characterization of Glyoxal-Arginine Modifications, *J. Agric. Food Chem.*, 49, **2001**, 1493-1501

Glomb, M.; Rösch, D.; Nagaraj, R.H., N^δ-(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-L-ornithine, a Novel Methylglyoxal-Arginine Modification in Beer, *J. Agric. Food Chem.*, 49, **2001**, 366-372

Gosselin, F.; Di Renzo, M.; Ellis, T.H.; Lubell, W.D., Photoacoustic FTIR Spectroscopy, a Nondestructive Method for Sensitive Analysis of Solid-Phase Organic Chemistry, *J. Org. Chem.*, 61, **1996**, 7980-7981

Gotoda, H.; Shiroh, M.; Kawahara, H.; Terayama, Y.; Fukuda, S., Springtime Pollinosis and Oral Allergy Syndrome in Sapporo, *Auris Nasus Larynx*, 28, **2001**, 49-52

Hayashi, T.; Namiki, M., Role of Sugar Fragmentation in the Maillard-Reaction, in: Amino-Carbonyl-Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki, M., Namiki, M., Kato, H. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, Niederlande, **1986**, 29-38

Henle, T.; Walter, A.; Klostermeyer, H., Detection and Identification of the Cross-linking Amino Acids N^T- and N^T-(2'-Amino-2'-carboxy-ethyl)-L-histidine in Heated Milk Products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197, **1993**, 114-117

Henle, T.; Walter, A.; Häßner, R.; Klostermeyer, H., Detection and Identification of a Protein-bound Imidazolone Resulting from the Reaction of Arginine Residues and Methylglyoxal, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, **1994**, 55-58

Hofer, T.; Wüthrich, B., Nahrungsmittelallergien II: Häufigkeit der Organmanifestationen und der allergieauslösenden Nahrungsmittel, *Schweiz. med. Wschr.*, 115, **1985**, 1437-1442

Hoffmann-Sommergruber, K., Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins. What do They Have in Common?, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122, 2000, 155-166

Hofmann, T., Quantitative Studies on the Role of Browning Precursors in the Maillard-Reaction of Pentoses and Hexoses with L-Alanine, *Eur. Food Res. Technol.*, 209, **1999**, 113-121

Horn, M.J.; Jones, B.; Ringel, S.J., Isolation of a New Sulfur-containing Amino Acid (Lanthionine) from Sodium Carbonate-treated Wool, *J. Biol. Chem.*, 138, **1941**, 141-149

Jäger, L.; Wüthrich, B., Food Allergies and Intolerances, erste Auflage, Gustav Fischer Verlag, Ulm, **1998**

Jolley, R.; Evans, L.; Makino, N.; Mason, H., Oxytyrosinase, *J. Biol. Chem.*, 249, **1974**

Jurayj, J.; Cushman, M., Approaches to the Synthesis of Endothiopeptides: Synthesis of a Thioamide-containing C-Terminal Bombesin Nonapeptide, *Tetrahedron*, 48, **1992**, 8601-8614

Karamloo, F.; Scheurer, S.; Wangorsch, A.; May, S.; Haustein, D.; Vieths, S., Pyr c 1, the Major Allergen from Pear, is a New Member of the Bet v 1 Allergen Family, *J. Chromatogr. B*, 756, **2001**, 281-293

Kelly-Basetti, B.M.; Mackay, M.F.; Pereira, S.M.; Savage, G.P.; Simpson, G.W., Asymmetric Synthesis of a Homochiral Δ^2 -Isoxazoline Amino Acid Derivate, *Heterocycles*, 37(1), **1994**, 529-538

Kim, H.; Mathew, F.; Ogbu, C., A Convenient Synthesis of Disubstituted Guanidines via the Mitsunobu Protocol, *Synlett*, 2, **1999**, 193-194

Kleber-Janke, T.; Cramer, R.; Appenzeller, U.; Schlaak, M.; Becker, W.-M., Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and S2 Albumins, by Phage Display Technology, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 119, **1999**, 265-274

Kuhn, R.; Weygand, F., Die Amadori-Umlagerung, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, B70, **1937**, 769-772

Kyhse-Andersen, J., Electrophoretic Blotting of Multiple Gels: A Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer from Polyacrylamide to Nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, **1984**, 203-209

Lal, B.; Gangopadhyay, A.K., A Practical Synthesis of Free and Protected Guanidino Acids from Amino Acids, *Tetrahedron Lett.*, 37, **1996**, 2483-2486

Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, **1970**, 680-685

Ledl, F.; Schleicher, E., Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zur Chemie, Biochemie und Medizin, *Angew. Chem.*, 102, **1990**, 597-626

Lehmann, K.; Hoffmann, S.; Neudecker, P.; Suhr, M.; Becker, W.-M.; Rösch, P., High-yield Expression in *Escherichia coli*, Purification, and Characterization of Properly Folded Major Peanut Allergen Ara h 2, *Protein Expr. Purif.*, 31, **2003**, 250-259

Levallet, C.; Lerpiniere, J.; Ko, S.Y., The HgCl₂-Promoted Guanylation Reaction: The Scope and Limitations, *Tetrahedron*, 53(14), **1997**, 5291-5304

Lottspeich, F.; Zorbas, H., (Hrsg.), Bioanalytik, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**, 75

Lüttkopf, D.; Müller, U.; Skov, P.S.; Ballmer-Weber, B.K.; Wüthrich, B.; Skamstrup-Hansen, K.; Poulsen, L.K.; Kästner, M.; Haustein, D.; Vieths, S., Comparison of Four Variants of a Major Allergen in Hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 with the Major Hazel Pollen Allergen Cor a 1.01, *Mol. Immunol.*, 38, **2002**, 515-525

Maleki, S.J.; Chung, S.Y.; Champagne, E.T.; Raufman, J.P., The Effects of Roasting on the Allergenic Properties of Peanut Proteins, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, **2000**, 763-768

Miyata, T.; Hori, O.; Zhan, J.; Yan, S.D.; Ferran, L.; Iiada, Y.; Schmidt, A.M., The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) is a Central Mediator of the Interaction of AGE-b2 Microglobulin with Human Monoclonal Phagocytes via an Oxidant-sensitive Pathway. Implications for the Pathogenesis of Dialysis-related Amyloidosis, *J. Clin. Invest.*, 98, **1996**, 1088-1094

Nedvidek, W.; Ledl, F.; Fischer, P., Detection of 5-Hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and of α -Dicarbonyl Compounds in Reaction Mixtures of Hexoses with Different Amines, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 194, **1992**, 222-228

Neudecker, P.; Schweimer, K.; Nerkamp, J.; Scheurer, S.; Vieths, S.; Sticht, H.; Rösch, P., Allergic Cross-Reactivity Made Visible, *J. Biol. Chem.*, 276(25), **2001**, 22756-22763

Nunc, Covalent Binding of DNA to CovaLink™ NH – Methods and Applications in: Tech Bulletin No. 10, second edition, **1997**, Fa. Nunc, Roskilde, Denmark

Okeley, N.; Zhu, Y.; van der Donk, W., Facile Chemoselective Synthesis of Dehydroalanine-containing Peptides, *Organic Letters*, 23, **2000**, 3603-3606

Oya, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y.; Miyata, S.; Maeda, S.; Osawa, T.; Uchida, K., Methylglyoxal Modification of Protein, *J. Biol. Chem.*, 274(26), **1999**, 18492-18502

Pastorello, E. A.; Ispano, M.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Incorvaia, C.; Ansaloni, R.; Rotondo, F.; Vigano, G.; Ortolani, C., Cross-reacting Allergens in Clinical Syndromes, *Monographs in Allergy*, 32, **1996**, 57-62

Pessi, A.; Bianchi, E.; Bonelli, F.; Chiappinelli, L., Application of the Continuous-flow Polyamide Method to the Solid-phase Synthesis of a Multiple Antigen Peptide (MAP) Based on the Sequence of a Malaria Epitope, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 8-9

Rabjohn, P.; Helm, E.M.; Stanley, J. S.; West, M.; Sampson, H.; Burks, A.W.; Bannon, G. A., Molecular Cloning and Epitope Analysis of the Peanut Allergen Ara h 3, *J. Clin. Invest.*, 103, **1999**, 535-542

Richard, J.P., Kinetic Parameters for the Elimination Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase and an Estimation of the Reaction's Physiological Significance, *Biochemistry*, 30, **1991**, 4581-4585

Risch, B.; Herrmann, K., Die Gehalte an Hydroxyzimtsäureverbindungen und Catechinen in Kern- und Steinobst, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 186, **1988**, 225-230

Rudeschko, O.; Fahlbusch, B.; Schlenvoigt, G.; Herrmann, D.; Vieths, S.; Jäger, L., Investigation of the Stability of Apple Allergen Extracts, *Allergy*, 50, **1995**, 575-580.

Scheurer, S.; Metzner, K.; Haustein, D.; Vieths, S., Molecular Cloning, Expression and Characterization of Pru a 1, the Major Cherry Allergen, *Molecular Immunology*, 8/9(34), **1997**, 619-629

Scheurer, S.; Pastorello, E.A.; Wangorsch, A.; Kästner, M.; Haustein, D.; Vieths, S., Recombinant Allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a Newly Identified Lipid Transfer Protein in the *in vitro* Diagnosis of Cherry Allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107, **2001**, 724-731.

Schöning, B.; Vieths, S.; Petersen, A.; Baltes, W., Identification and Characterization of Allergens Related to Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen in Apple, Cherry, Celery and

Carrot by Two-dimensional Immunoblotting and N-terminal Microsequencing, *J. Sci. Food Agric.*, 67, 1995, 431-440

Schwarzenbolz, U.; Henle, T.; Haeßner, R.; Klostermeyer, H., On the Reaction of Glyoxal with Protein, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 205, 1997, 121-124

Severin, T.; Hiebl, J.; Popp-Ginsbach, H., Untersuchungen zur Maillard-Reaktion – XX. Nachweis von Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und anderer hydrophilen Zuckerabbauprodukten in Caramelisierungsgemischen, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 178, 1984, 284-287

Shin, D. S.; Comparde, C.M.; Maleki, S.J.; Kopper, R.A.; Sampson, H.; Huang, S. K.; Burks, A.W.; Bannon, G.A., Biochemical and Structural Analysis of the IgE Binding Sites on Ara h 1, an Abundant and Highly Allergic Peanut Protein, *J. Biol. Chem.*, 273, 1998, 13753-13759

Shipanova, I.N.; Glomb, M.A.; Nagaraj, R.H., Protein Modification by Methylglyoxal: Chemical Nature and Synthetic Mechanism of a Major Fluorescent Adduct, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 344, 1997, 29-36

Simon, H.; Kraus, A., Mechanistische Untersuchungen über Glycosylamine, Zuckerhydrazone, Amadori-Umlagerungsprodukte und Osazone, *Fortschr. Chem. Forsch.*, 14, 1970, 430-471

Son, D.Y.; Scheurer, S.; Haustein, D.; Vieths, S., Pollen-Related Food Allergy: Cloning and Immunological Analysis of Isoforms and Mutants of Mal d 1, the Major Apple Allergen, and Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen, *Eur. J. Nutr.*, 38, 1999, 201-215

Søndergård-Andersen, J.; Lauritzen, E.; Lind, K.; Holm, A., Covalently Linked Peptides for Enzyme Linked Immunosorbent Assay, *J. Imm. Methods*, 131, 1990, 99-104

Stanley, J.S.; King, N.; Burks, A.W.; Huang, S.K.; Sampson, H.; Cockrell, G.; Helm, R.M.; West, C.M.; Bannon, G.A., Identification and Mutational Analysis of the Immunodominant IgE Binding Epitopes of the Major Peanut Allergen Ara h 2, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342, 1997, 244-253

Staros, V.V.; Wright, R.W.; Swigle, D.M., Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water Soluble Carbodiimide-mediated Coupling Reactions, *Analytical Biochemistry*, 156, 1986, 220-222

Subasinghe, N.; Schulte, M.; Chan, M.Y.-M.; Roon, R.J.; Koerner, J.F.; Johnson, R. L., Synthesis of Acyclic and Dehydroaspartic Acid Analogues of Ac-Asp-Glu-OH and Their Inhibition of Rat Brain *N*-Acetylated α -Linked Acidic Dipeptidase (NAALA Dipeptidase), *J. Med. Chem.*, 33, **1990**, 2734-2744

Tam, J., Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-density Multiple Antigenic Peptide System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, **1988**, 409-413

Thiel, C., Lebensmittelallergien und -intoleranzreaktionen, *Z. Ernährungswissenschaft*, 30, **1991**, 158-173

Thornalley, P.J., Pharmacology of Methylglyoxal, *Gen. Pharmacol.*, 27, **1996a**, 565-573

Thornalley, P.J., Advanced Glycation and the Development of Diabetic Complications: Unifying the Involvement of Glucose, Methylglyoxal and Oxidative Stress, *Endocrinol. Metabol.*, 3, **1996b**, 149-166

Vanek-Krebitz, M.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Laimer da Camara, M.; Susani, M.; Ebner, C.; Kraft, D.; Scheiner, O.; Breiteneder, H., Cloning and Sequencing of Mal d 1, the Major Allergen from Apple (*Malus domestica*), and its Immunological Relationship to Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, **1995**, 538-551

Vieths, S., Allergenic Cross-Reactivity, Food Allergy and Pollen, *ETAP-Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 4, **1997a**, 61-70

Vieths, S., Allergenes in Fruits and Vegetables, in: Handbook of Plant Fungal Toxicants, Felix D'Mello J. P. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, **1997b**, 157-174

Vieths, S., Blockpraktikum „Immunologische und molekularbiologische Lebensmittelanalytik“, interne Druckschrift des PAUL-EHRLICH-Instituts, Langen, **2000**

Vieths, S.; Schöning, B.; Brockmann, S. and Aulepp, H., Untersuchung zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 88, **1992**, 239-243 und 273-279.

Vieths, S.; Schöning, B.; Aulepp, H.; Baltes, W., Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie*, 47, **1993**, 49-53

Vieths, S.; Jankiewicz, A.; Schöning, B.; Aulepp, H., Apple Allergy: the IgE Binding Potency of Apple Strains is Related to the Occurrence of the 18-kDa Allergen, *Allergy*, 49, 1994, 262-271

Vieths, S.; Aulepp, J.; Becker, W. M.; Buschmann, L., Characterization of Labile and Stable Allergens in Food of Plant Origin, in: Food Allergies and Intolerances, Eisenbrand, H.; Aulepp, H.; Dayan, A. D.; Elias, P. S.; Grunow, W. (Eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1996a, 130-149

Vieths, S.; Haustein, D.; Hoffmann, A.; Jankiewicz, A.; Schöning, B., Labile und stabile Allergene in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, *GIT Fachz. Lab.*, 4, 1996b, 360-367

Vieths, S.; Scheurer, S.; Ballmer-Weber, B.K., Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 964, 2002, 47-68

Wells-Knecht, K.J.; Zyzak, D.V.; Litchfield, J.E.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W., Mechanism of Autoxidative Glycosylation: Identification of Glyoxal and Arabinose as Intermediates in the Autoxidative Modification of Proteins by Glucose, *Biochemistry*, 34, 1995a, 3702-3709

Wells-Knecht, K.J.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W., Pathways of Formation of Glycoxidation Products During Glycation of Collagen, *Biochemistry*, 34, 1995b, 15134-15141

Wu, Y.; Matsueda, G.R.; Bernatowicz, M., An Efficient Method for the Preparation of ω, ω' -Bisurethane Protected Arginine Derivates, *Synthetic Communications*, 23, 1993, 3055-3060

Wüthrich, B., Nahrungsmittelallergie, in: Jahrbuch der Dermatologie 1988, Dr. Hans Biermann Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Zürich, 1989, 27-49

Wüthrich, B., Zur Häufigkeit der Pollenallergie in der Schweiz, in: Epidemiologie allergischer Erkrankungen – Nehmen Allergien zu?, Ring, J. (Hrsg.), MMV Medizin-Verlag München, 1991

Yamago, S.; Nakamura, M.; Wang, X.; Yanagawa, M.; Tokumitsu, S.; Nakamura, E., Thermal Hetero [3 + 2] Cycloaddition of Dipolar Trimethylenemethane to *O*-Alkyloximes. Straightforward Synthetic Routes to Substituted Pyrrolidines and Prolines, *J. Org. Chem.*, 63, 1998, 1694-1703

Yamada, M.; Miyajima, T.; Horikawa, H., Solid Phase Synthesis of Dehydroalanine Derivates, *Tetrahedron Lett.*, 39, **1998**, 289-292

Yet, L., Recent Developments in Guanylation Chemistry, in: Technical Reports, Vol. 3, Nr. 6, published by Albany Molecular Research Inc., **1999**

Yong, Y.F.; Kowalski, J.A.; Lipton, M.A., Facile and Efficient Guanylation of Amines Using Thioureas and Mukaiyama's Reagent, *J. Org. Chem.*, 62, **1997**, 1540-1542

Young, E., Food Additives, Food and Dermatology, in: Recent Advances in Dermatology, Vol. 9, Champion, R.H.; Pye, R.J. (Hrsg.), Churchill Livingstone, Edinburgh, **1992**, 133-145

6 Anhang

Abb. 6-1:

Oben: EDMAN-Chromatogramm der PTH-Derivate von natürlichen Aminosäuren (Standard-Mischung)

Mitte: EDMAN-Chromatogramm des PTH-Derivates von Ornithin

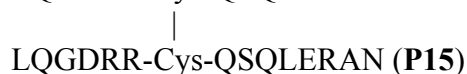
Unten: EDMAN-Chromatogramm des PTH-Derivates von Homoarginin

Abb. 6-2:

Im Rahmen dieser Arbeit entstand das Delphi-Programm PEPTIDBOY, welches die Berechnung der Molekularmasse, der Elementarzusammensetzung, der Isotopomerenverteilung sowie der theoretischen a-, b-, c-, x-, y- und z-Fragmente von (MAILLARD-modifizierten) Peptiden und MAPs erlaubt. Die Abbildungen zeigen beispielhaft die Berechnung der Masse (oben) und Isotopomerenverteilung (unten) von MAP 4 durch PEPTIDBOY.

Abb. 6-3:

Oben: ESI-MS-Spektrum des Peptids LQGDRR-Cys-QSQLERAN



Mitte: ESI-MS-Spektrum des Peptids LQGDRR-Cystin-QSQLERAN (P16)

Unten: ESI-MS-Spektrum des Peptids LQGDRR-Cys(O₃H)-QSQLERAN (P17)

Abb. 6-4:

Oben: ESI-MS-Spektrum des Peptids PY-Cys(Bzl)-PSQDPYSPSPYD

Mitte: ESI-MS-Spektrum des Peptids PY-CysO₂(Bzl)-PSQDPYSPSPYD

Unten: ESI-MS-Spektrum des Peptids PY-Dha-PSQDPYSPSPYD (P31)

Teilweise fragmentieren die Peptide schon bei einfachen ESI-MS-Experimenten.

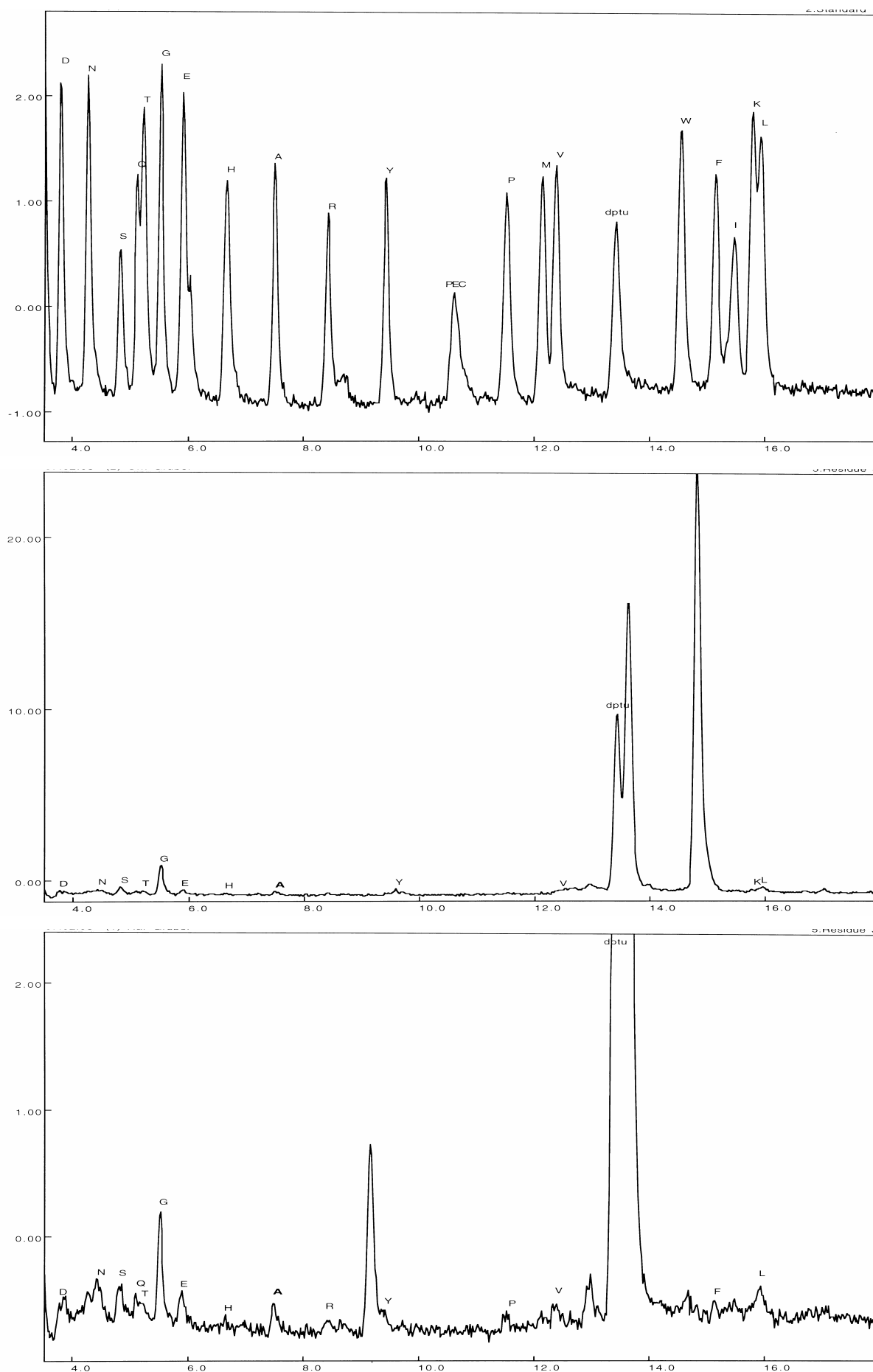


Abb. 6-1: EDMAN-Chromatogramme von Standard (oben), Ornithin (Mitte) und Homoarginin (unten).

PeptidBoy 2.3 by Patrick Gruber

Sequenz 1 = CML 3 = Glarg 5 = DHAlanin 7 = Cys-S-Dioxid
2 = CEL 4 = CMA 6 = Cys-S-Oxid 0 = Ornithin

Sequenz: RQREQQFIRELRNLP

Art des Peptides: MAP 4-armig

Peptidmodifizierung

N-Term. -Arg- Gln- Gln- Glu- Gln- Gln- Phe- CML- Arg- Glu- Leu- Arg-
keine
-Asn- Leu- Pro- C-Term.
. keine

Disulfidbrücke

Formel und Masse

Formel: C₃₆₅ H₆₀₃ N₁₂₇ O₁₀₉

relative Molekülmasse: 8514,593 amu

Monoisotopische Masse (Hauptisotope): 8509,555 amu

Elementarzusammens.: C 51,49 % N 20,89 %
H 7,14 % O 20,48 %

Berechne

Isotopomerenverteilung
mehrfach geladene Ionen
Bruchstücke
Einwaagen

EmulgatorBoy 1.1

Info Exit

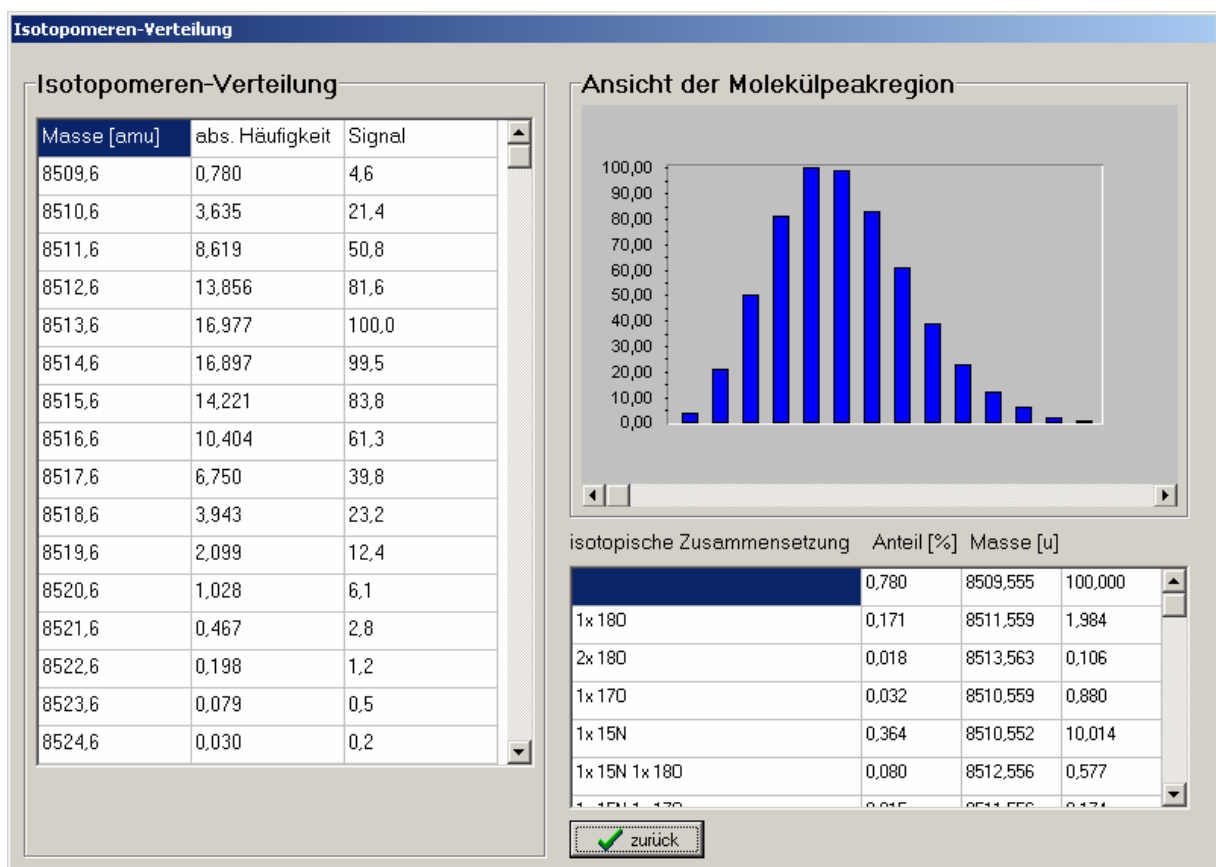
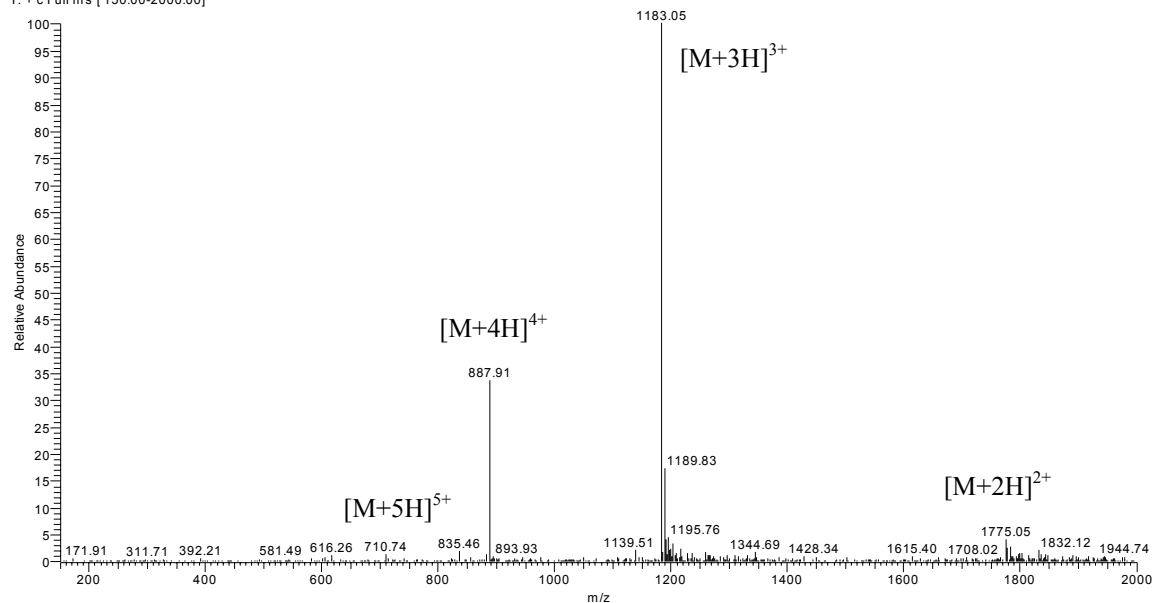
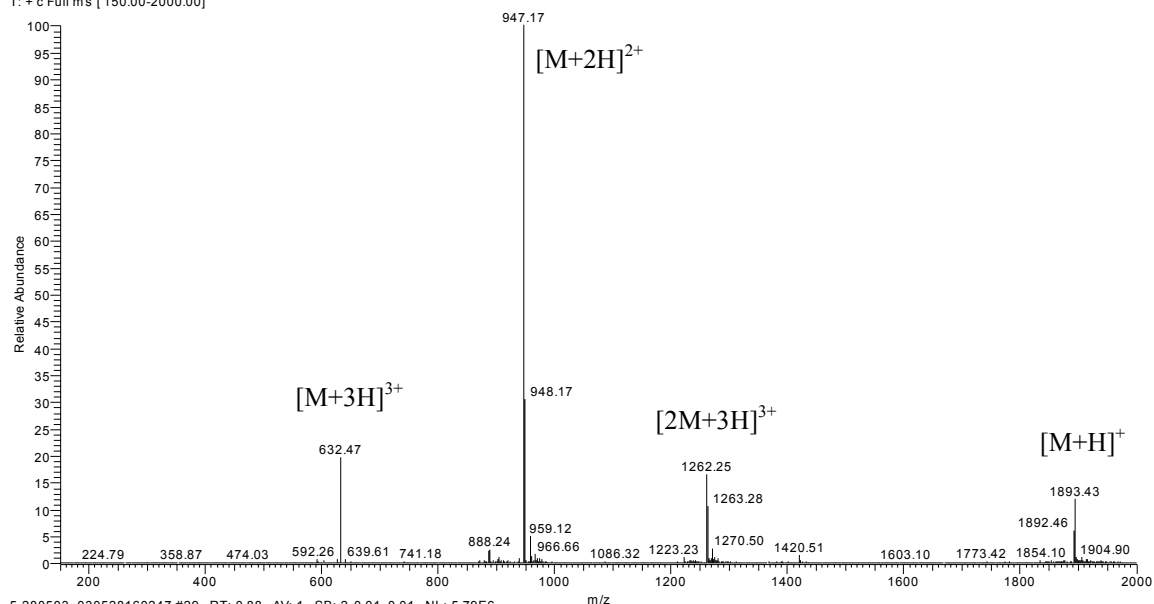


Abb. 6-2: Berechnung der Masse (oben) und Isotopomerenverteilung (unten) von MAP 4 durch PEPTIDBOY.

1-250403 #37 RT: 0.61 AV: 1 SB: 2 0.03, 0.03 NL: 1.92E7
T: + c Full ms [150.00-2000.00]



2-240403 #32 RT: 0.93 AV: 1 NL: 2.02E7
T: + c Full ms [150.00-2000.00]



5-280503_030528160247 #29 RT: 0.88 AV: 1 SB: 2 0.01, 0.01 NL: 5.79E6
T: + c ms [150.00-2000.00]

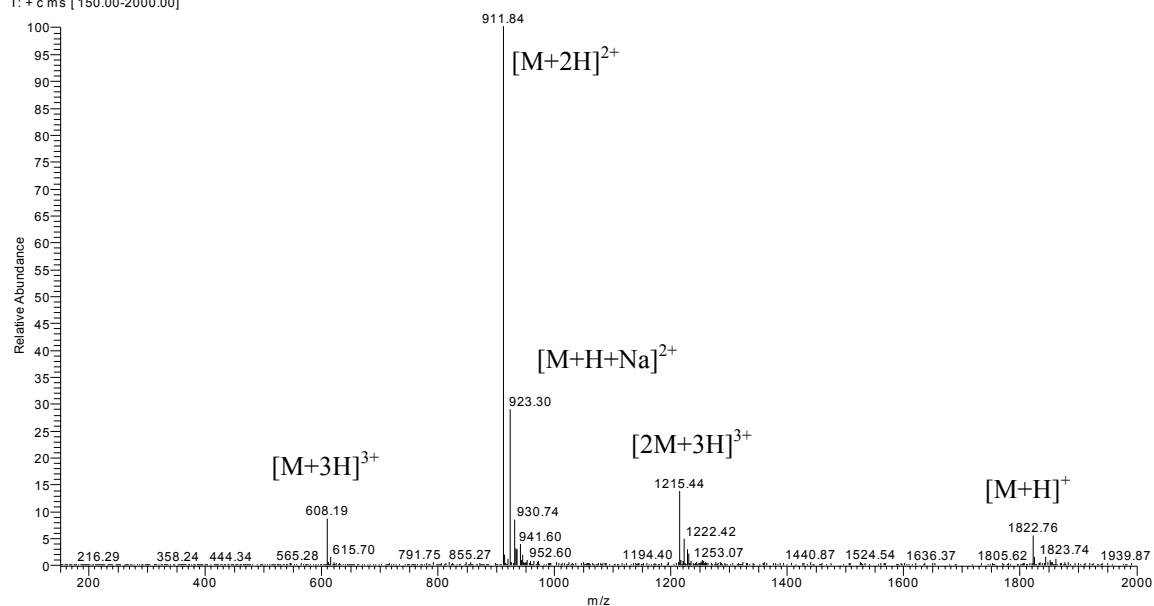


Abb. 6-3: ESI-MS-Spektren der Peptide P15 (oben), P16 (Mitte) und P17 (unten).

1-170303 #133 RT: 4.18 AV: 1 SB: 2 0.01, 0.01 NL: 1.31E6
T: + c Full ms [150.00-2000.00]

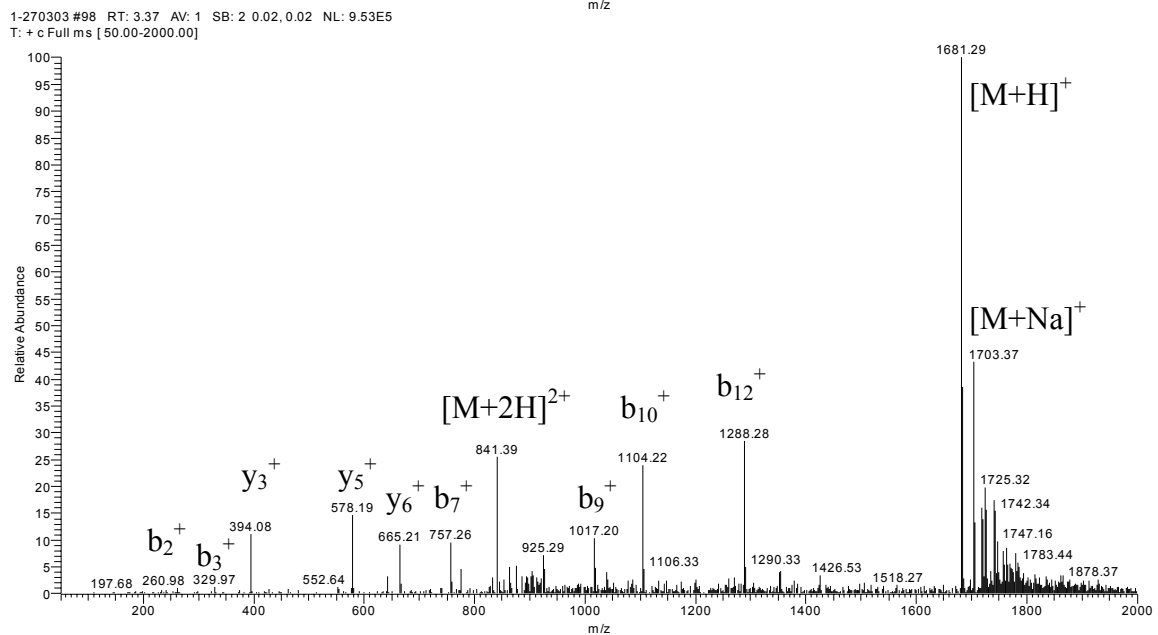
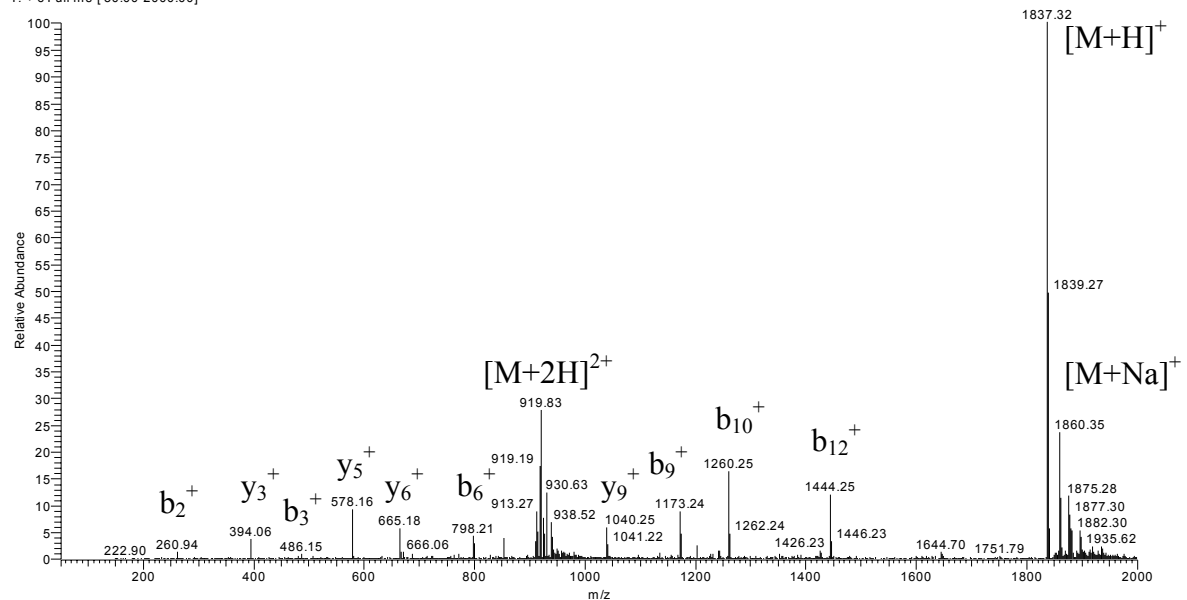
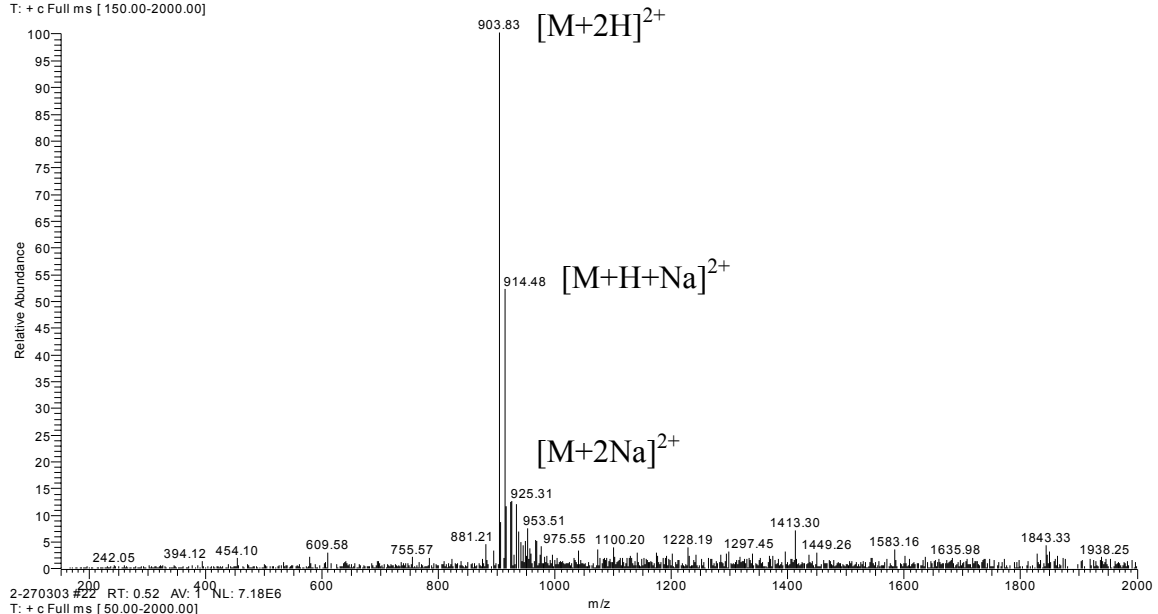


Abb. 6-4: ESI-MS-Spektren des Peptids **P31** (unten), der Cys(Bzl)-Vorstufe (oben) und der CysO₂(Bzl)-Vorstufe (Mitte)