

Biochemie in der Mikrowelle

Einsatz der Mikrowelle zur Synthese und Analytik von Peptiden und Proteinen



► Dr. Andreas Rybka,
Director of Peptide Chemistry, Aplagen



► Ulf Sengutta,
CEM

Proteine bzw. Peptide spielen für die physiologischen und biochemischen Funktion lebender Organismen eine herausragende Rolle. Peptide und Petidomimetika kommen z. B. auch als Wirkstoffe mit potenter Wirksamkeit in Frage, was schnelle Synthesemöglichkeiten für die Forschung interessant macht; oder Proteine sind selbst Ziel von Wirksubstanzen z. B. in Form von Enzymhemmern. Daher ist die Sequenz- und Struktur-Analyse von Proteinen ein weiteres wichtiges Aufgabenfeld.

Chemische Reaktionen wie die Peptid-Synthese sind unter Mikrowelleneinwirkung typischerweise deut-

Während in der organischen Chemie (z. B. Heterocyclen-Chemie) die mikrowellenunterstützte organische Synthese längst Einzug in die Labors gehalten hat, werden mittlerweile immer mehr Anwendungen für die Mikrowelle in der Biochemie entdeckt. So sehen mehr und mehr Wissenschaftler die Vorteile des Mikrowellen-Einsatzes bei der Synthese von Peptiden sowie bei der Analyse von Peptiden und Proteinen.

lich schneller als unter konventionellen Bedingungen. Organische und biochemische Reaktionen laufen bei Verwendung von Mikrowellenenergie in wenigen Minuten ab, anstelle von Stunden, wie es bei traditionellen Methoden üblich ist. Die genauen Mechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt, doch mittlerweile berichten viele tausende von Veröffentlichungen und Übersichtsartikeln für die unterschiedlichsten Einsatzbereiche von den enormen Möglichkeiten dieser leicht zu bedienende Technologie [1].

Für temperatursensitive Produkte oder Zwischenstufen ist auch die Kombination von Mikrowellenaktivierung mit gleichzeitiger Kühlung zur Gewährleistung von niedrigen Reaktionstemperaturen im Modell Discover CoolMate möglich. [2]. Bereman et al. bestrahlten einen enzymatischen Aufschluss bei 25°C mit ~250 W bei der gleichzeitigen Kühlung im Discover CoolMate und zeigten verbesserte Ergebnisse gegenüber den Reaktionsbedingungen ohne Kühlung. [3]



Abb. 2: Synthese am Liberty und Micro Cleavage am Accent

Peptid-Synthese

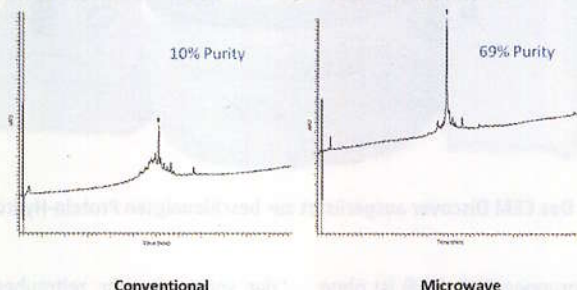
Nach anfänglicher Skepsis der meisten Peptidchemiker hat sich in den letzten Jahren der Einsatz der Mikrowelle auch bei der Synthese von Peptiden mehr und mehr durchsetzen können. Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre [4, 5, 6, 7] belegen, dass unter Mikrowelleneinwirkung gerade sehr schwierige Sequenzen gut synthetisierbar werden, was vor allem auf die Eliminierung der Aggregationsproblematik hydrophober Peptidketten zurückzuführen ist.

Hervorzuheben ist, dass es in der Mikrowelle trotz thermischer Effekte zu einer Unterdrückung der Racemisierung kommt [8]. Auch andere klassische Nebenreaktionen in der Peptidsynthese wie z. B. Aspartimidbildung können durch Optimierung der Reaktionsbedingungen in der Mikrowelle minimiert werden. Durch die zunehmende Verbreitung der Mikrowellenpeptidsynthese werden natürlich auch die Protokolle zur Peptidsynthese zunehmend verfeinert und optimiert. So wird beispielsweise von vielen Anwendern das leichter zugängliche und weniger gesund-



Abb. 1: CEM Discover mit Spezialausrüstung für die Festphasen-Peptid-Synthese nach Merrifield

1-42 β -amyloid



- ❖ Mikrowellen Energie erhöht die Reinheit
- ❖ Gesamtzeit der Synthese 19 Stunden
- ❖ HBTU Aktivator

Abb. 3: Vorteile der mikrowellenaktivierten SPPS im Liberty

heittschädliche Piperazin zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe benutzt. Durch all diese Optimierungen werden die Ausbeuten bei den ein-

zelnen Syntheseschritten kontinuierlich optimiert, so dass die Kettenlänge der synthetisierbaren Peptide in den letzten Jahren deut-



Abb. 4: Accent-Modul für Mikro-Cleavage der Peptide

lich gestiegen ist. In Verbindung mit einer geeigneten Capping/ Tagging-Strategie lassen sich heutzutage auch Peptide mit mehr als 100 Aminosäuren sinnvoll an einem Stück synthetisieren.

Apparativ stehen dem Anwender dabei mittlerweile sowohl manuelle als auch voll automatisierte Systeme zur Verfügung. Für die

manuelle Peptidsynthese findet das Discover SPS Anwendung (Abb. 1), in dem Ansatzgrößen von bis zu 3mmol realisierbar sind. Ein durchschnittlicher Kopplungszyklus (incl. Waschvorgängen) dauert in diesem System ca. 10 Minuten, so dass hier pro Stunde bis zu 6 Aminosäuren gekoppelt werden können.

SIGMA
Laboratory Centrifuges

Tischkühlzentrifuge Sigma 6-16K

40 x 50 ml culture ; max. 4.800 x g
6 x 500 ml ; max. 17.000 x g

Sigma Laborzentrifugen GmbH

An der Unteren Söse 50 Postfach 1713
37520 Osterode 37507 Osterode
Germany

Tel.: 05522 5007 0 Fax : 05522 5007 12
info@sigma-zentrifugen.de
www.sigma-zentrifugen.de



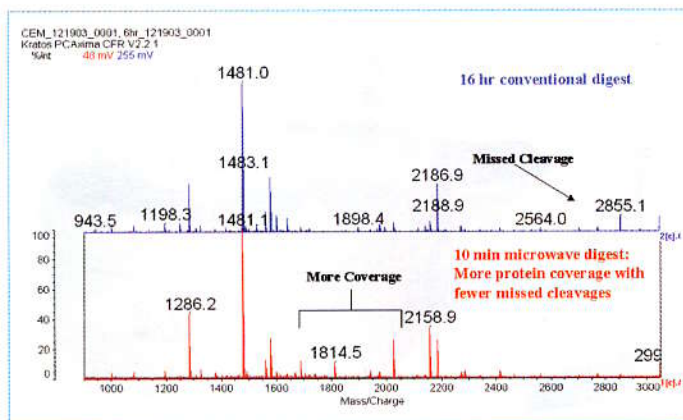


Abb. 5: Transferrin Verdau im Discover

Mit steigender Peptidlänge macht die Anwendung eines automatisierten Systems Sinn – nicht zuletzt aufgrund der höheren Zuverlässigkeit. Hierfür steht mit dem Liberty (Abb. 2) ein voll automatisiertes System zur Verfügung, das in den letzten Jahren software- und hardwaretechnisch so weit optimiert wurde, dass mittlerweile praktisch jede Art von Chemie auf einfache Art und Weise implementiert werden kann. Das Gerät ermöglicht die Verwendung von bis zu 25 verschiedenen building blocks (die gängigen Reagentien sind bei CEM bereits fertig abgewogen kommerziell erhältlich) und verfügt über 12 Harzpositionen, d.h. es können bis zu 12 Peptide nacheinander synthetisiert werden. Die Ansatzgrös-

se ist dabei im Bereich von 0,1mmol–5,0mmol frei wählbar. Für die weiteren benötigten Reagentien (Aktivator, Base, Capping, Lösungsmittel) stehen 5 weitere Ports zur Verfügung, die genau wie die Positionen der building blocks frei vom Anwender definiert werden können, so dass das System an Flexibilität kaum zu überbieten ist. In der Regel genügen zwar die mit der Software mitgelieferten Syntheseprotokolle, allerdings hat der Anwender die Möglichkeit eine individuelle Optimierung der Reaktionsbedingungen durchzuführen. So ist z.B. eine Anpassung der Stärke der Mikrowelleneinstrahlung per Mausclick möglich und auch kompliziertere Reaktionen wie z.B. die zwischenzeitliche Abspaltung orthogonaler



Abb. 6: Das CEM Discover ausgerüstet zur beschleunigten Protein-Hydrolyse

Schutzgruppen (z.B. Allyl) ist ohne großen Aufwand realisierbar.

In der Regel sind jedoch auch ohne aufwendige Optimierungen mit den Standardprotokollen sehr gute Ergebnisse realisierbar. Ein gutes Beispiel für ein „schwieriges Peptid“ stellt das β -Amyloid dar, welches ein aus der Alzheimer Forschung bekanntes 42mer darstellt. Unter konventionellen Bedingungen wird das Peptid in einer Reinheit von nur 10% gewonnen, während mit dem Liberty und Verwendung von Standardprotokollen (d.h. ohne Optimierung) bereits eine Rohprodukt-Reinheit von 69% erreicht wird.

Zur Komplettierung des Angebotes im Bereich der Peptidsynthese steht seit einigen Monaten auch ein System zur Verfügung, welches die Abspaltung und Entschützung der synthetisierten Peptide mit Mikrowellenunterstützung ermöglicht. Das Accent-Modul (Abb. 4) ermöglicht die normalerweise Stunden dauernde Abspaltung des Peptides vom Harz in 15 Minuten, wobei aufgrund der kurzen Reaktionszeit deutlich weniger Nebenprodukte auftreten.

In kleineren Ansätzen ist auch ein Microcleavage in nur 2 Minuten realisierbar, so dass eine fortlaufende Synthese damit praktisch in Echtzeit monitorierbar ist. Nicht nur die reine Synthese, sondern auch der Prozess der Syntheseoptimierung ist damit in der Mikrowelle deutlich beschleunigt. Eine Anwendung der beschriebenen Systeme ermöglicht gerade im Bereich der Wirkstoffentwicklung und -optimierung eine Beschleunigung

der sonst oft sehr zeitraubenden Prozesse um ein Vielfaches.

Mikrowellenunterstützter enzymatischer Verdau

Der enzymatische Verdau ist ein wichtiger Schritt in der Probenvorbereitung zur Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden mittels Massenspektrometrie. Dabei werden die Proteine oder Peptide durch verschiedene selektive Enzyme (z.B. Glu-C) an bestimmten Schnittstellen gespalten und ein großes Polymer dabei in einige kleinere Fragmente geschnitten, die sich deutlich leichter sequenzieren lassen. Auch dieser Prozess wird durch Einsatz der Mikrowelle deutlich beschleunigt [9].

Ein klassisches Beispiel ist der Transferrin-Verdau. Der konventionelle Verdau dauert je nach Qualität des schneidenden Enzyms bis zu 16 Stunden. Der Verdau mit Mikrowellenunterstützung im Discover dauert demgegenüber nur 10 min. Zudem sind in der Mikrowelle Schnitte realisierbar, die konventionell praktisch gar nicht stattfinden, so dass z.B. beim Transferrin-Verdau die Qualität des mikrowellenunterstützten Verdau um 10% besser ist als auf dem konventionellem Wege [10].

Mikrowellentechnik beschleunigt die Protein-Hydrolyse

Die Protein-Hydrolyse ist eine altbewährte Aufschlussprozedur aus den Fünfziger Jahren zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung

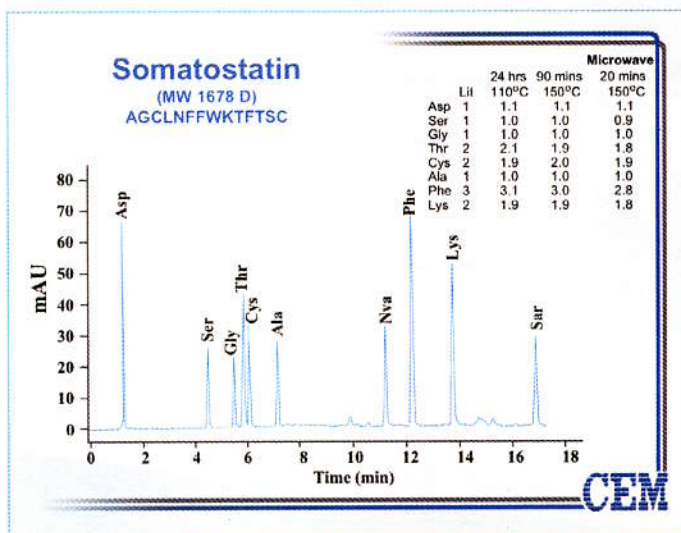


Abb. 7: Ein gutes Beispiel zur beschleunigten Protein-Hydrolyse binnen 20 – 25 min.

von Peptiden und Proteinen. Mittels einer Aminosäuren-Analyse (AAA) des Hydrolysates erfolgt die Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren der jeweiligen Probe – eine Methode die mittlerweile neben der Sequenzierung mittels MS/MS zum Standard bei der Analytik von Peptiden und Proteinen zählt. Auch hier liefert der Einsatz der Mikrowellentechnik enorme Vorteile:

1. Der Zeitgewinn durch den Einsatz der Mikrowellentechnik ist auch bei der Protein-Hydrolyse erstaunlich. Anstatt die Zersetzungsreaktionen über Nacht zu betreiben, vermag die Mikrowelle in nur 15 min. vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.
2. Die Aufschlusseffizienz wird erhöht. Speziell bei hydrophoben Proteinen wird der Aufschluss unter Mikrowellenaktivierung deutlich verbessert.
3. Es können in einem Lauf bis zu 10 Standard HPLC Autosampler Vials (100 - 300 µl) eingesetzt werden. Alle 15 min. können erneut 10 Proben hydrolysiert werden und somit ein extrem hoher Probendurchsatz realisiert werden.

Zusammenfassung

Die Einwirkung von Mikrowellenenergie auf organische bzw. biochemische Reaktionen hat eine Reihe von unterschiedlichen Vorteilen. Neben den verbesserten Ergebnissen und schnelleren Reaktionszeiten ist vor allem der Aspekt der einfachen und sicheren Handhabung zu berücksichtigen. Dieses zusammen ist auch der Grund für die rasante Verbreitung der Mikrowellen-Synthesizer in den unterschiedlichsten Einsatzbereichen. Um das Grundgerät Discover als Geräteplattform der Mikrowellen-Synthesizer Familie wurde umfangreiches Zubehör entwickelt: Pumpstation für Aminosäuren zur Peptid-Synthese, Kühlmodul für „kalte“ Reaktionsbedingungen, Reaktionsgefäß-

Einsätze für Kleinstansätze im Mikro-Maßstab, Ventilmodule für Reaktionen unter Inertgas, Autosampler für unterschiedlich große Druckgefäße und Zubehör für Festphasenreaktionen. All dies gibt den Forschungslaboratorien die maximale Flexibilität für unterschiedlichste Anwendungen ohne langwieriges Umbauen der Mikrowellengeräte.

Literatur

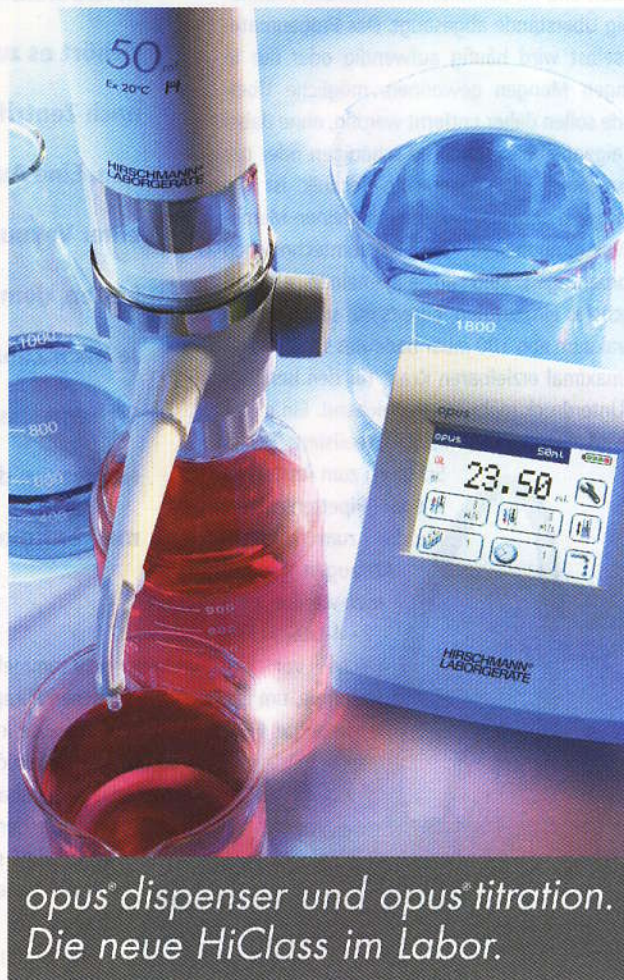
- [1] Murray J. K. Organic Letters Vol. 7, No. 8, 1517–1520 (2005)
- [2] Singh B. J. et al., Organic Letters, Vol. 8, No. 9, 1863–1866 (2006)
- [3] Bereman M. S. et al., J. o. Proteome Res. 2009
- [4] Park M.-S. Tetrahedron Letters 48/6 1053–1057 (2007)
- [5] Olivos H.J. Organic Letters 4/23 4057–4059 (2002)
- [6] Papini A.M. Chemistry Today 26/4 36–38 (2008)
- [7] Rizzolo F. International Journal of Peptide Research 13/1-2, 203–208, (2007),
- [8] Palasek S.A. Journal of Peptide Science 13/3 143–148 (2007)
- [9] Shan Lin S. et al., Am. Soc. Mass Spectrom 16, 581–588 (2005)
- [10] Rutherford J. et al., High Throughput Protein Identifications Utilizing Microwave Protein Digests and Off-line Nano-spray Chip Technology (Poster Presentation) Oct 8 (2004)

KONTAKT

Dr. Andreas Rybka
Aplagen GmbH
Baesweiler
Tel.: 02401/805570
Fax: 02401/805574
info@aplagen.com
www.aplagen.com

Ulf Sengutta
CEM GmbH
Kamp-Lintfort
Tel.: 02842/9644-0
Fax: 02842/9644-11
info@cem.de
www.cem.de

Noch sicherer, und opus® wäre ein Tresor.



*opus® dispenser und opus® titration.
Die neue HiClass im Labor.*

Elektronische Steuerung und motorische Volumenabgabe garantieren reproduzierbare Ergebnisse – Ungenauigkeiten durch manuelles Bedienen ausgeschlossen.

- Bedienerunabhängigkeit bringt Ergebnissicherheit
- Höchste Richtigkeit und Präzision – Abgabevolumina ab 10 µl
- hochwertige inerte Materialien garantieren chemische Beständigkeit
- intuitive Bedienung via Touchscreen

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG,
74246 Eberstadt, Tel. 07134 511-0,
info@hirschmannlab.de, www.hirschmannlab.de

