

## **Biochemie in der Mikrowelle**

**Schnelle Herstellung von reinen Peptiden mit schwierigen Sequenzen in der Mikrowelle mit manuellen und vollautomatischen Systemen**

**Proteomics: Enzymatische Aufschlüsse und Proteinhydrolyse mit Mikrowellenunterstützung**

### **CEM GmbH**

Carl-Friedrich-Gauß-Str. 9, 47475 Kamp-Lintfort

Postfach 10 11 63, 47456 Kamp-Lintfort

Tel: 02842/9644-0

Fax: 02842/9644-11

[www.cem.de](http://www.cem.de)

[info@cem.de](mailto:info@cem.de)

### **Einleitung:**

Während in der organischen Chemie (z. B. Heterocyclen-Chemie) die mikrowellenunterstützte organische Synthese längst Einzug in die Labors gehalten hat, werden nun immer mehr Anwendungen für die Mikrowelle in der Biochemie entdeckt. So wird der vorteilhafte Mikrowellen-Einsatz beispielsweise bei den Proteinen und Peptiden im Rahmen der Synthese und bei der Analyse/Qualifizierung der Proteine zu Nutze gemacht.

Proteine bzw. Peptide spielen für die physiologischen und biochemischen Funktion lebender Organismen eine herausragende Rolle. Peptide und Peptidomimetika 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 deutlich schneller als unter konventioneller Erwärmung im

klassischen Ölbad. 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. 1 Discover CoolMate für organische/biochemische Reaktionen bei gleichzeitiger Mikrowellen-Bestrahlung und Kühlung

## Peptid-Synthese

Bei der Synthese von Peptiden unter Mikrowelleneinwirkung ist eine erhöhte Reinheit sowie eine Unterdrückung von Racemisierungen zu beobachten. Es konnte auch gezeigt werden, dass besonders schwierige Sequenzen und insbesondere langkettige Peptide gut in der Mikrowelle herzustellen sind. So wurde in Australien von einem Peptid mit einer Kettenlänge von 111 mer berichtet, welches ausschließlich im Mikrowellen-Peptid-Synthesizer hergestellt wurde. In der Mikrowelle ist eine Eliminierung der Aggregationstendenz zu beobachten.



Abb. 2: CEM Discover mit Spezialausrüstung für die Festphasen-Peptid-Synthese nach Merrifield

Für die Peptid-Synthese in der Mikrowelle stehen ein manuelles Gerät, das Discover SPS und ein vollautomatisches System, das Liberty zur Auswahl. 20 Aminosäuren, 5 weitere Aminosäuren, 12 Harze und die weiteren Reaktionskomponenten wie Aktivierungsreagenzien und Basen, die wie die Aminosäuren kommerziell auch über CEM erhältlich sind, werden vollautomatisch in den Reaktor dosiert und das Peptid in schnellen Schritten synthetisiert. Hier werden die Reaktionsbedingungen der Festphasen-Synthese nach Merrifield mit der Mikrowellenaktivierung gekoppelt.

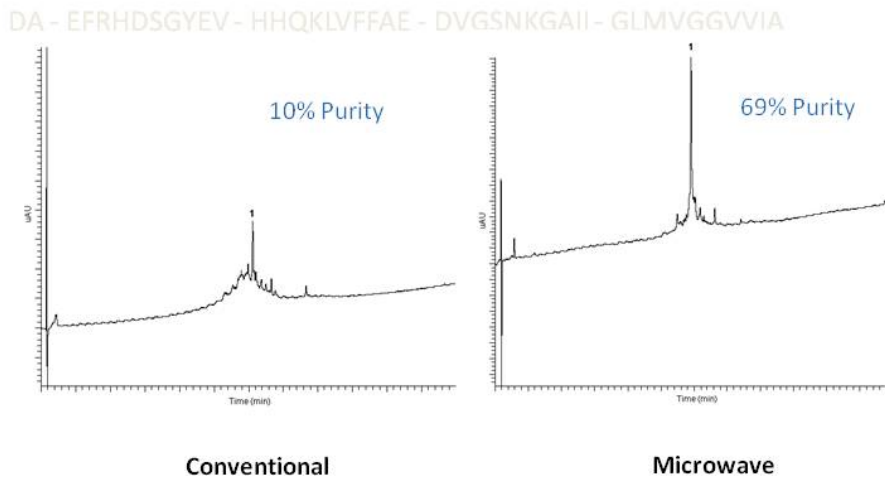


Abb. 3: Dualer Peptid-Synthesizer Liberty im Einsatz:  
Wahlweise mit Mikrowelle oder ohne Mikrowellenaktivierung

Falls bei speziellen Aminosäure-Kupplungen lieber langwierig ohne Mikrowellenaktivierung gearbeitet werden soll, ist dieses auch kein Problem. Per Mausklick wird die Mikrowelleneinstrahlung deaktiviert und es kann eine klassische Aminosäure-Kupplung durchgeführt werden.

Ein gutes Beispiel für ein „schwieriges Peptid“ stellt das  $\beta$ -Amyloid dar, welches aus der Alzheimer Forschung bekannt ist. Unter konventionellen Bedingungen wurden nur 10 % Reinheit erzielt, während mit dem Liberty die Ausbeute um das 7fache gesteigert wurde.

# 1-42 $\beta$ -amyloid



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

Abb. 4: Vorteile der mikrowellenaktivierten SPPS im Liberty

## Mikrowellenunterstützter Enzymatischer Aufschluss

Der enzymatische Aufschluss ist ein wichtiger Schritt in der Probenvorbereitung zur Sequenzanalyse von Proteinen. Mit verschiedenen Enzymen (z. B. Trypsin) kann die Zersetzung von Proteinen in kleinere Peptide selektiv nach bestimmten Aminosäurebindungen erfolgen [4].

Ein bekanntes Beispiel ist der Transferrin-Aufschluss. Der klassische Aufschluss dauert 16 Stunden. Der Aufschluss mit Mikrowellenunterstützung im Discover dauert nur 10 min. Zudem ist die Qualität des mikrowellenunterstützten Aufschlusses um 10% besser als auf dem konventionellem Wege [5].

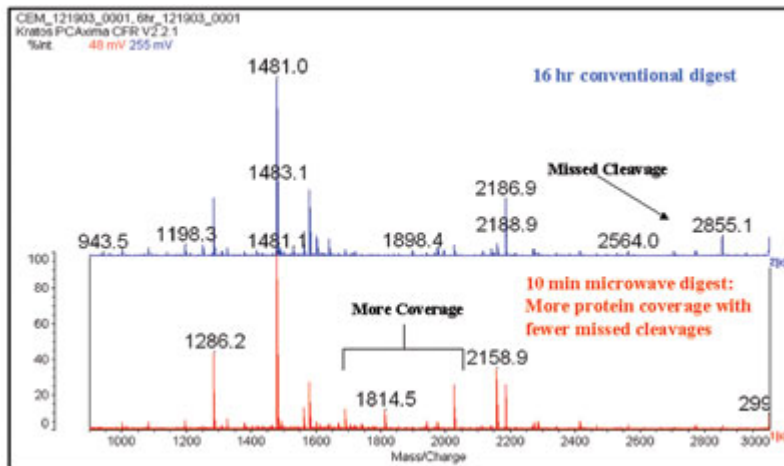


Abb. 5: Transferrin Aufschluss im Discover

### Mikrowellentechnik beschleunigt die Protein-Hydrolyse

Die Protein-Hydrolyse ist eine altbewährte Aufschlussprozedur aus den Fünfziger Jahren zur Analyse der Aminosäuren. Mit der Aminosäuren-Analyse (AAA) erfolgt die Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren der jeweiligen Probe. Die AAA stellt eine Voraussetzung zur Identifikation der Aminosäuresequenz des Proteins/Peptids dar. Mit Hilfe der Mikrowellentechnik können einige Vorteile bei dieser etablierten Arbeitsweise erzielt werden:

1. Der Zeitgewinn durch den Einsatz der Mikrowellentechnik ist auch bei der Protein-Hydrolyse enorm. 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.



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

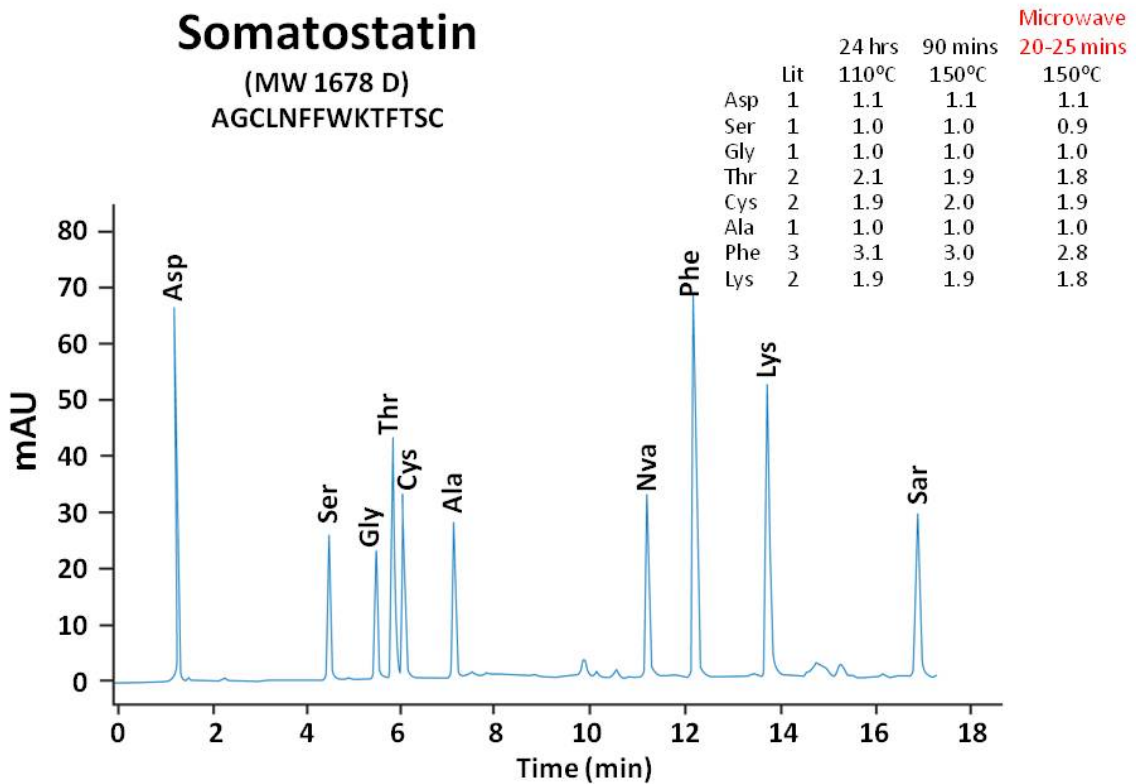


Abb. 7: Ein gutes Beispiel zur beschleunigten Protein-Hydrolyse binnen 20 – 25 min.

## 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 Mini-Maßstab, Ventilmodule für Reaktionen unter Inertgas, Autosampler für unterschiedlich große Druckgefäße und Zubehör für Festphasenreaktionen. Dieses zusammen gibt den Forschungslaboratorien die maximale Flexibilität für unterschiedlichste Anwendungen ohne langwieriges Umbauen der Mikrowellengeräte.

## Literatur:

- [1] Application of Microwave Irradiation to the Synthesis of 14-Helical  $\beta$ -Peptides by Justin K. Murray and Samuel H. Gellman\*, Department of Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA. Organic Letters 2005, Vol. 7, No. 8, 1517-1520
- [2] Copper Mediated Cross-Coupling of Arylboronic Acids and 2(1H)-Pyrazinones Facilitated by Microwave Irradiation with Simultaneous Cooling, Organic Letters, 2006 Vol. 8, No. 9, 1863-1866
- [3] Development of a Robust and High Throughput Method for Profiling N-Linked Glycans Derived from Plasma Glycoproteins by NanoLC-FTICR Mass Spectrometry, J. o. Proteome Res
- [4] Development of a Robust and High Throughput Method for Profiling N-Linked Glycans Derived from Plasma Glycoproteins by NanoLC-FTICR Mass Spectrometry, J. o. Proteome Res

[5] Jennifer Rutherford, Joe Bonapace, Mai-Loan Ngyen, Tonya Pekar, and John Pirro of Charles River Proteomic Services, Worcester, MA. High Throughput Protein Identifications Utilizing Microwave Protein Digests and Off-line Nano-spray Chip Technology (Poster Presentation) Oct 8, 2004