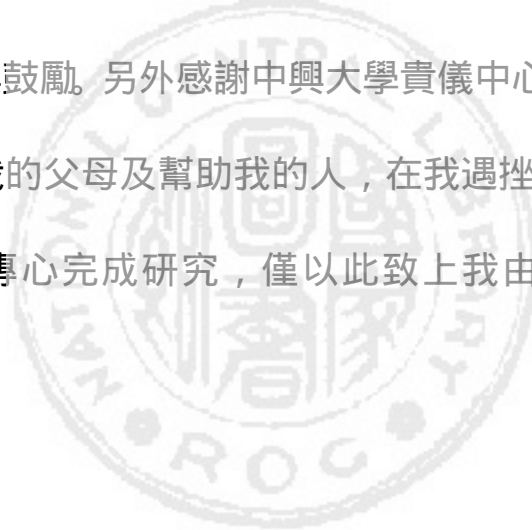


## 誌 謝

本論文承蒙指導老師 佘亮教授悉心的指導與教誨，以及楊定亞老師和錢偉鈞老師指教，使得本論文得以順利完成。佘亮老師對研究的態度以及處世的原則深深影響了學生，對於老師給予的細心指導極為感謝。

感謝佘亮教授研究室的學長莊博均、周炳任、魯程泰、楊佳洪、學姊洪佳君和陳瑜陵，同學駱振隆和林佩璇，以及學弟妹周依君和張榮成，專題生羅羽華和蔡靜如，在研究期間給予我知識上的指導與生活上的幫助。感謝楊定亞教授研究室孫揚盛、建霖、定威、鴻基和佩玉學長姐們，同學苑秀和忍妃，以及學弟妹人豪、靜燦和永和，給予我精神上的支持與鼓勵。另外感謝中興大學貴儀中心許麗美小姐代測。

最後要感謝我的父母及幫助我的人，在我遇挫折時不斷地支持及鼓勵我，使我能專心完成研究，僅以此致上我由衷的感謝。



# 目 錄

授權書	
推薦書	
審定書	
致謝	
目 錄	1
中文摘要	3
英文摘要	5
圖 目	6
表 目	10
縮 寫 目	11
一、緒 論	13
1.1 SPXX 序 列	13
1.2 含 <i>N</i> -methylpyrrole amino acid (Py) 結構之直鏈胜?	15
1-3 環狀胜?	17
二、實 驗 部 分	19
2.1 實 驗 流 程	19
2.2 藥 品 與 儀 器	20
2.3 儀 器 操 作	25

2.4	Kaiser test	26
2.5	直鏈胜? 合成步驟	26
2.6	環狀胜? 合成步驟	29
2.7	合成 Fmoc-4-amino-1-methylpyrrole-2-carboxylic acid (Fmoc-Py)	29
2.8	高效能液相層析 (HPLC) 純化	30
2.9	凝膠電泳實驗	30
2.10	足跡實驗 (DNase I Footprinting )原理	33
	三、結果與討論	35
3.1	直鏈胜?	36
3.2	含 Py 結構之直鏈胜?	48
3.3	環狀胜?	66
	四、結論	116
	五、參考文獻	117

# 摘要

XPRK 單元為本實驗室近年所提出的一種新 DNA 結合單元，由 DNA 足跡法研究發現此單元對 DNA 序列有選擇性結合。因此本論文的研究主要以 XPRK 單元為模板，修飾內部胺基酸的序列，利用固相合成法合成對 DNA 有結合或切割性之下列三大類胜？：

一、直鏈胜？（5 種）

如 Met-Pro-Arg-Lys-Met-Pro-Arg-Lys-Met-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub> (MR-12)

二、含 Py 結構之直鏈胜？（8 種）

如 His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Pro-His-NH<sub>2</sub> (RPyH-12)

三、環狀胜？（17 種）

如  $\text{Cyclo}[\text{CH}_2\text{-CO-Gly-His-Hyp-Arg-Lys-Tyr-Pro-Arg-Lys-His-Hyp-Arg-Lys-Cys-}] \text{NH}_2$  (CHyY-12)

以凝膠電泳實驗初步得知含 Py 結構之直鏈胜？對 DNA 有切割性，將序列中 Pro 改為 Hyp 也提高了胜？對 DNA 的切割能力；環狀胜？對 DNA 有良好結合能力，其中十四？的環狀胜？比十？的環狀胜？結合能力好。由足跡實驗更進一步得知環狀胜？ CRHY-14、CH2Y-14、CHyD-14、CHyY-14 和 CMY-14 對 DNA 序列有選擇性結合，主要結合位在 5'-TATTT-3'、5'-TTTTCT-3' 和 5'-TATTT-3'，推測可能是 Lys 和 Arg 側鏈 NHs 易與 T 的 O2 位置形成氫鍵。未來我們期望針對 XPRK

單元胜？內部胺基酸序列作更進一步的修飾，可獲得對 DNA 有專一性  
結合及切割作用之胜？而成為一種基因控制試劑。

# Abstract

The XPRK motif as a novel DNA binding motif is studied by our laboratory in recent years. This thesis reports on the solid-phase synthesis of three series of peptides containing the XPRK motif :

1. Five linear peptides containing repeating XPRK motifs.
2. Eight linear peptides containing *N*-methylpyrrole residues (Py).
3. Seventeen cyclic peptides containing repeating XPRK motifs.

Agarose gel electrophoresis showed that peptides containing Py residues have some DNA nicking activities. Similarly, if the Pro residues of the peptide is replaced with Hyp residues, the DNA nicking activities of the peptides are increased. A number of cyclic peptides synthesized possess good DNA binding activities, and gel retardation studies by agarose gel electrophoresis showed that the 14-mer cyclic peptides possess better DNA binding activities than the 10-mer cyclic peptides. Footprinting studies by Lin Pei-Hsuan showed that the cyclic peptides CRHY-14, CH<sub>2</sub>Y-14, CH<sub>y</sub>D-14, CH<sub>y</sub>Y-14 and CMY-14 possess DNA sequence selective binding, with major selectivity on 5'-TATTT-3', 5'-TTTTCT-3' and 5'-TATTT-3' sequences.

# 圖 目

圖 1. 基因調節蛋白 SPXX 序列	13
圖 2. SPRK 形成 $\alpha$ -turn 結構	14
圖 3. Netropsin 與 Distamycin 之結構	15
圖 4. <i>N</i> -methylpyrrole amino acid (Py), 3-hydroxylpyrrole amino acid (Hp) 和 <i>N</i> -methylimidazole amino acid (Im)之結構	16
圖 5. 選擇切除樹脂之條件	28
圖 6. Footprinting 技術	34
圖 7. HKS-14 純化後之 HPLC 層析圖	37
圖 8. HKS-14 質量分析光譜圖	37
圖 9. Ex-12 純化後之 HPLC 層析圖	39
圖 10. Ex-12 質量分析光譜圖	39
圖 11. Ex-15 純化後之 HPLC 層析圖	41
圖 12. Ex-15 質量分析光譜圖	41
圖 13. SP-12 純化後之 HPLC 層析圖	43
圖 14. SP-12 質量分析光譜圖	43
圖 15. MR-12 純化後之 HPLC 層析圖	45
圖 16. MR-12 質量分析光譜圖	45
圖 17. 直鏈胜? 之凝膠滯留效應比較	47

圖 18.	PyH-8 純化後之 HPLC 層析圖	49
圖 19.	PyH-8 分析光譜質譜圖	49
圖 20.	PyH-10 純化後之 HPLC 層析圖	51
圖 21.	PyH-10 分析光譜質譜圖	51
圖 22.	PyH-12 純化後之 HPLC 層析圖	53
圖 23.	PyH-12 分析光譜質譜圖	53
圖 24.	RPyH-12 純化後之 HPLC 層析圖	55
圖 25.	RPyH-12 分析光譜質譜圖	55
圖 26.	PyHyp-12 純化後之 HPLC 層析圖	57
圖 27.	PyHyp-12 分析光譜質譜圖	57
圖 28.	RHyp-12 純化後之 HPLC 層析圖	59
圖 29.	RHyp-12 分析光譜質譜圖	59
圖 30.	RPyY-12 純化後之 HPLC 層圖	61
圖 31.	RPyY-12 分析光譜質譜圖	61
圖 32.	PyX-12 純化後之 HPLC 層析圖	63
圖 33.	PyX-12 分析光譜質譜圖	63
圖 34.	含 Py 結構之直鏈胜? 凝膠滯留效應比較圖	65
圖 35.	含 Py 結構之直鏈胜? 切割百分率比較圖	65
圖 36.	CN-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	67
圖 37.	CN-14 分析光譜質譜圖	67



圖 38.	CRHY-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	69
圖 39.	CRHY-14 分析光譜質譜圖	69
圖 40.	CH <sub>2</sub> Y-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	71
圖 41.	CH <sub>2</sub> Y-14 分析光譜質譜圖	71
圖 42.	CH <sub>y</sub> Y-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	73
圖 43.	CH <sub>y</sub> Y-14 分析光譜質譜圖	73
圖 44.	CH <sub>y</sub> D-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	75
圖 45.	CH <sub>y</sub> D-14 分析光譜質譜圖	75
圖 46.	CYS-13 環化後純化之 HPLC 層析圖	77
圖 47.	CYS-13 質量分析光譜圖	77
圖 48.	CYS-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	79
圖 49.	CYS-14 質量分析光譜圖	79
圖 50.	CMY-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	81
圖 51.	CMY-14 質量分析光譜圖	81
圖 52.	CTH-14 環化後純化之 HPLC 層析圖	83
圖 53.	CTH-14 質量分析光譜圖	83
圖 54.	CY-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	85
圖 55.	CY-10 質量分析光譜圖	85
圖 56.	CF-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	87
圖 57.	CF-10 質量分析光譜圖	87

圖 58.	CNN-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	89
圖 59.	CNN-10 質量分析光譜圖	89
圖 60.	CDN-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	91
圖 61.	CDN-10 質量分析光譜圖	91
圖 62.	CNY-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	93
圖 63.	CNY-10 質量分析光譜圖	93
圖 64.	ChH-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	95
圖 65.	ChH-10 質量分析光譜圖	95
圖 66.	ChQ-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	97
圖 67.	ChQ-10 質量分析光譜圖	97
圖 68.	ChY-10 環化後純化之 HPLC 層析圖	99
圖 69.	ChY-10 質量分析光譜圖	99
圖 70.	十四? 之環狀胜? 凝膠滯留效應比較圖	102
圖 71.	十? 之環狀胜? 凝膠滯留效應比較圖	102
圖 72.	環狀胜? 切割百分率比較圖	103
圖 73.	CRHY-14 之聚丙醯電泳圖	106
圖 74.	CH2Y-14 之聚丙醯電泳圖	107
圖 75.	CHyY-14 之聚丙醯電泳圖	108
圖 76.	CHyD-14 之聚丙醯電泳圖	109
圖 77.	CMY-14 之聚丙醯電泳圖	110

# 表 目

表 1. 直鏈胜? 的物理化學性質	111
表 2. 含 Py 結構之直鏈胜? 物理化學性質	112
表 3. 環狀胜? 的物理化學性質- 1	113
表 4. 環狀胜? 的物理化學性質- 2	114
表 5. 凝膠電泳圖結果	115

## 縮寫目

英文縮寫	英文全名
A.A.	Amino Acid
ACN	Acetonitrile
AcOH	Acetic acid
ACT	Activation
Ahx	6-aminohexanoic acid
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
DCM	Dichloromethane
DEP	Deprotection
DNA	deoxyribonucleic acid
DMF	N,N-Dimethylformamide
Dst	distamycin
EDT	1,2-Ethanedithiol
EtOH	Ethanol
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
Hp	3-hydroxylpyrrole amino acid

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	4-hydroxyproline
Im	<i>N</i> -methylimidazole amino acid
MeOH	Methanol
Net	Netropsin
NMM	<i>N</i> -methylnmorpholine
Py	<i>N</i> -methylpyrrole amino acid
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-trispyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate
R <sub>t</sub>	Retention time
TFA	Trifluoroacetic acid
UV	Ultra Violet

# 一、緒論

## 1.1 SPXX 序列

Ser-Pro-X-X (SPXX), X 為 Lys 或 Arg, 是一種 DNA 結合單元, 由海膽組織蛋白(Sea urchin spermatogenous histon H1)中分離出的一段蛋白質<sup>1</sup>, 在 1989 年 Suzuki 指出此段蛋白質中含有重複六次 Ser-Pro-X-X 單元(S6 Peptide)為一基因調節蛋白(gene regulatory proteins) (圖 1), 可促使調節基因(regulatory gene)表現出來<sup>2</sup>; 1984 年 von Holt 等人決定出海膽組織蛋白 H1 的結構<sup>3</sup>, SPXX 單元結構上因 Ser 在 *i*-th 的位置以及 Pro 處於 *i*+ 1-th 的位置限制了 角的彎曲, 加上胺基酸內部有兩氫鍵而形成一穩定的  $\beta$ -turn 有利於與 DNA 結合(圖 2)<sup>4</sup>, 其一氫鍵是由 *i*-th 側鏈與 *i*+2-th 胺基化合物所形成, 另一氫鍵的形成則是由 *i*-th 胺基酸上羧基端的氧與 *i*+ 3-th 胺基化合物所提供<sup>5</sup>。1989 年 Suzuki 和 Churchill 更進一步提出 SPKK 單元對 DNA 富含 A/T 位置有結合的現象<sup>6</sup>。

H1 (N-terminal Dart)												
1	S. nudus	PA	SPOK	RAA	SPRR	SPKK	SPRR	SPKK	KSS	SPRR	K (AKRARASTHPPVAQH)	
2	P. angulosus	NH-	SPQK	RAA	SPRK	SPRK	SPKK	SPRK	ASA	SPRR	K AKRARASTHPPVLEM	
3	S. granulosus		SPQK	RAA	SPRK	G SPRP	SPKK	SP_	-			
4	E. crassa		SPQK	RAA	SPRK		SPRK	SPKK	K	SPRK	R K ARSAAHPPVIDM	
H2B (N-terminal Dart)												
5	L. dictus	NH-PR	SPSK	S	SPKR	G	SPRK	SPRK	G	SPSK	KA	SPKR
6	P. angulosus	1	SPAK	T	SPKR	G	SPRK	SPRK	R	SPSR	KA	SPKR
7		2	SPAK	T	SPKR	G	SPRK	SPRK				SPKR
8		3	S QK		SPTK	R	SPTK	SPTK				SPQK
9	P. milialis	P	S QK		SPTK	R	SPTK					SPQK

圖 1. 基因調節蛋白 SPXX 序列

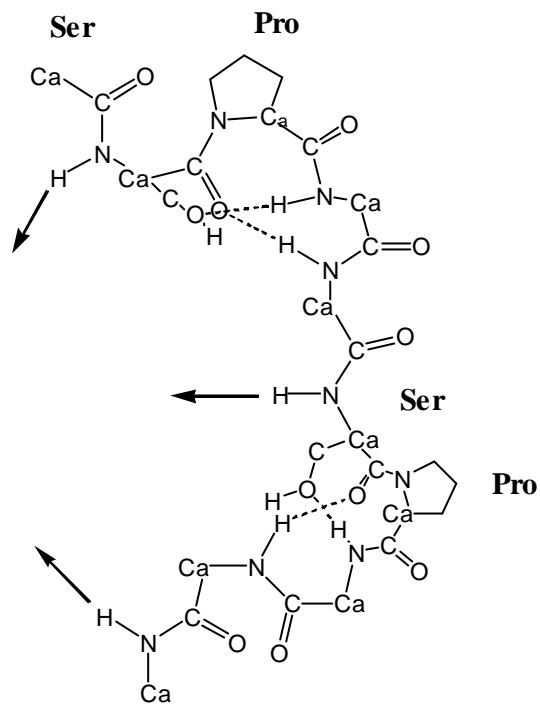


圖 2. SPRK 形成  $\beta$ -turn 結構，  
 ← 代表與 DNA 結合作用位。

近年來本實驗小組針對 SPXX 序列修飾其內部胺基酸做研究，於 2003 年提出一種新的 DNA 結合單元 XPRK<sup>7</sup>，此單元對 DNA 序列有選擇性結合，所以本文以 XPRK 序列為主，合成下列直鏈胜？期望可對 DNA 有切割或結合作用：

HKS-14

His-Pro-Arg-Lys-Trp-Lys-Ser-Pro-Lys-His-Ser-Pro-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>

Ex-12

His-Pro-Arg-Lys-Glu-Ser-Arg-Asp-His-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

Ex-15

Arg-Ala-Arg-Pro-His-Gln-Ser-Ser-His-Ser-Asp-His-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

SP-12

Ser-Pro-Arg-Lys-Ser-Pro-Arg-Lys-Ser-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

MR-12

Met-Pro-Arg-Lys-Met-Pro-Arg-Lys-Met-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

## 1.2 含 *N*-methylpyrrole amino acid (Py) 結構序列

天然抗生素 netropsin (Net) 和 distamycin (Dst) 是由鏈黴菌 (*Streptomyces*) 提煉出<sup>8</sup>，是第一個被發現對小凹槽(minor groove)中富含 AT 序列有選擇性鍵結的藥物 (圖 3)<sup>9-13</sup>。Dickerson<sup>14</sup> 和 Wemmer<sup>15</sup> 分別證實 Net 和 Dst 的結構，Net 含有兩個 Py，Dst 含有三個 Py<sup>16,17</sup>，化合物中羧基胺的 NHs 會與 DNA 小凹槽中 A 的 N3 和 T 的 O2 形成氫鍵；後來 Dickerson 設法把 Py 用 imidazole (Im) 取代<sup>18-21</sup>，Dervan 以 hydroxypyrrole (Hp) 取代 Py<sup>22-24</sup> (圖 4)，利用改變結構中單一原子提高了天然化合物對 DNA 小凹槽序列專一性和親和性<sup>25,26</sup>。

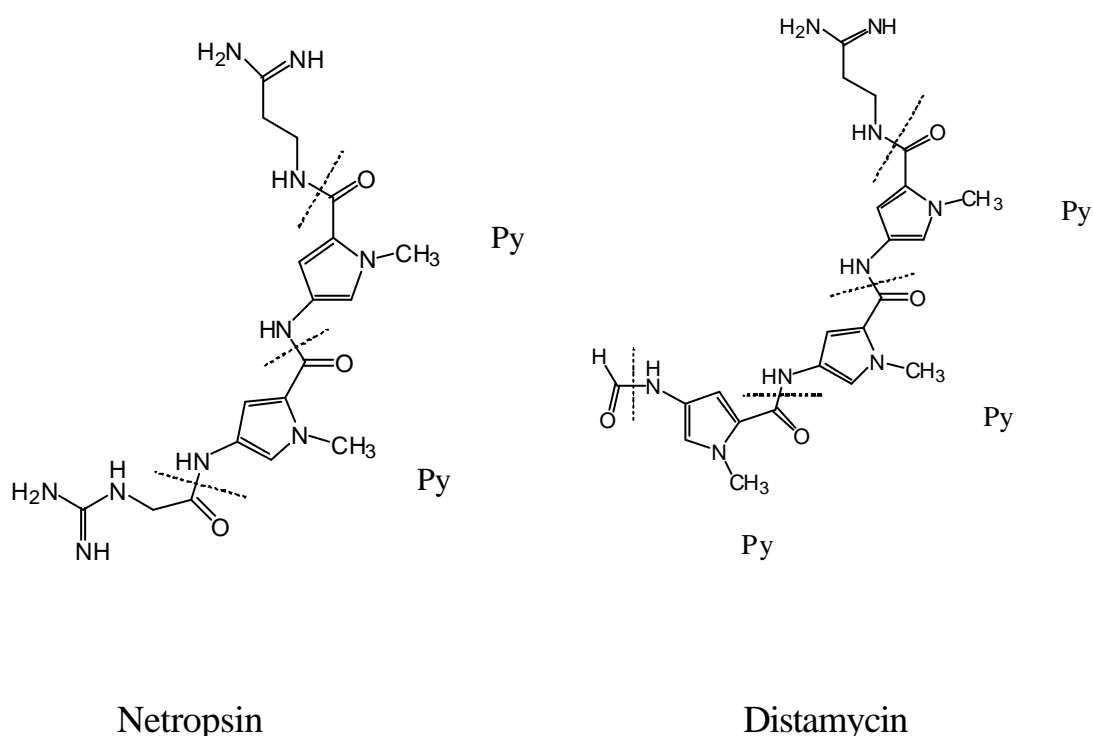


圖 3. Netropsin 與 Distamycin 之結構



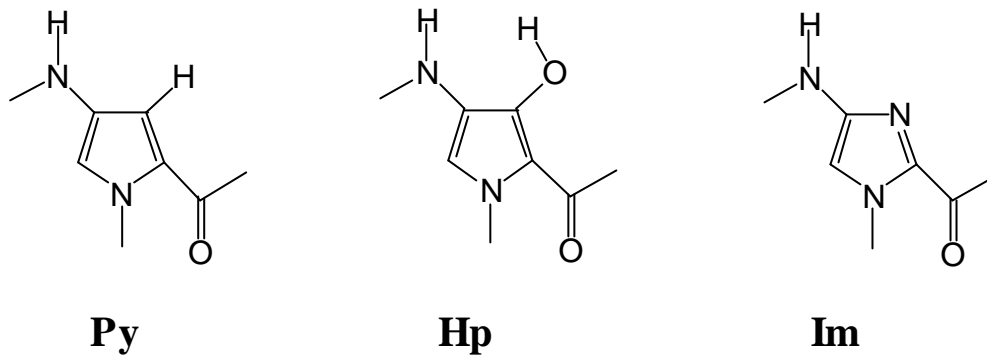


圖 4. *N*-methylpyrrole amino acid (Py)、3-hydroxypyrrole amino acid (Hp) 和 *N*-methylimidazole amino acid (Im)之結構

以下為本實驗室合成含 Py 結構之直鏈胜？期望可增加對 DNA 的

結合作用：

### PyH-8

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-NH<sub>2</sub>

### PyHK-10

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-NH<sub>2</sub>

### PyH-12

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-His-Pro-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

### RPyH-12

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Pro-His-NH<sub>2</sub>

### PyHyp-12

His-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-His-Hyp-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

### RHyp-12

His-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-His-NH<sub>2</sub>

### RPyY-12

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Pro-Tyr-NH<sub>2</sub>

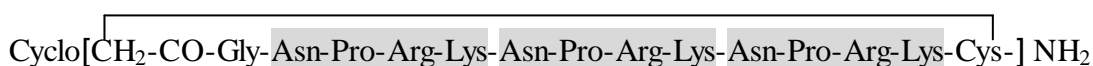
### PyX-12

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Ahx-Py-Py-Py-NH<sub>2</sub>

### 1-3 環狀胜?

許多細菌和真菌自身都能產生如青黴素(β-Lactam)等的抗生素，作為抵抗對其有破壞性或與之有存在競爭的微生物的防禦系統<sup>27</sup>。它們產生的天然抗生素往往是多? 大型環狀分子，如鏈黴菌屬(*Streptomyces aureus*)會產生 Echinomycin、Triostin A、TANDEM 等? ? 抗生素(Quinoxaline antibiotic)<sup>28-38</sup>，以及 Tetracycline 等四環素類抗生素(Tetracyclines antibiotic)<sup>27</sup>。以往 L. Sheh 曾針對環狀胜? 合成方法作研究<sup>39</sup>，近年來本實驗室合成各種環狀天然抗生素及其衍生物，並探討環狀胜? 與 DNA 的結合/切割作用<sup>40-45</sup>，發現環狀胜? 在構形上較直鏈胜? 固定，其結構較為穩定，而直鏈胜? 則無一定構形，? 鍵容易擺動，所以我們將環狀胜? 用來研究和 DNA 之結合性。因此本文合成下列環狀胜?：

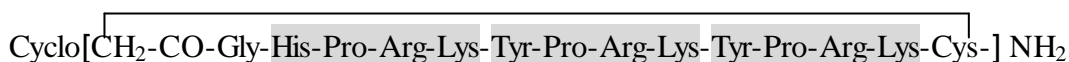
#### CN-14



#### CRHY-14



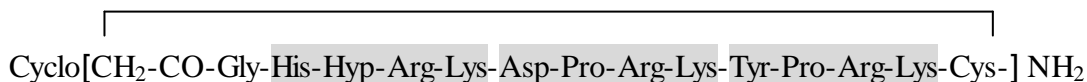
#### CH2Y-14



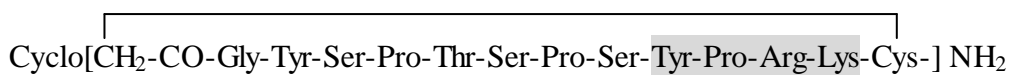
#### CHyY-14



#### CHyD-14



### **CYS-13**



### **CYS-14**



### **CMY-14**



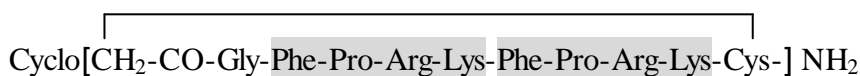
### **CTH-14**



### **CY-10**



### **CF-10**



### **CNN-10**



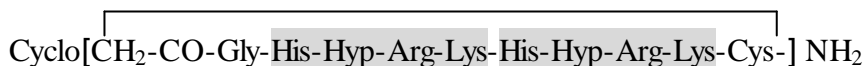
### **CDN-10**



### **CNY-10**



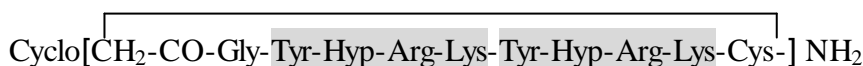
### **ChH-10**



### **ChQ-10**

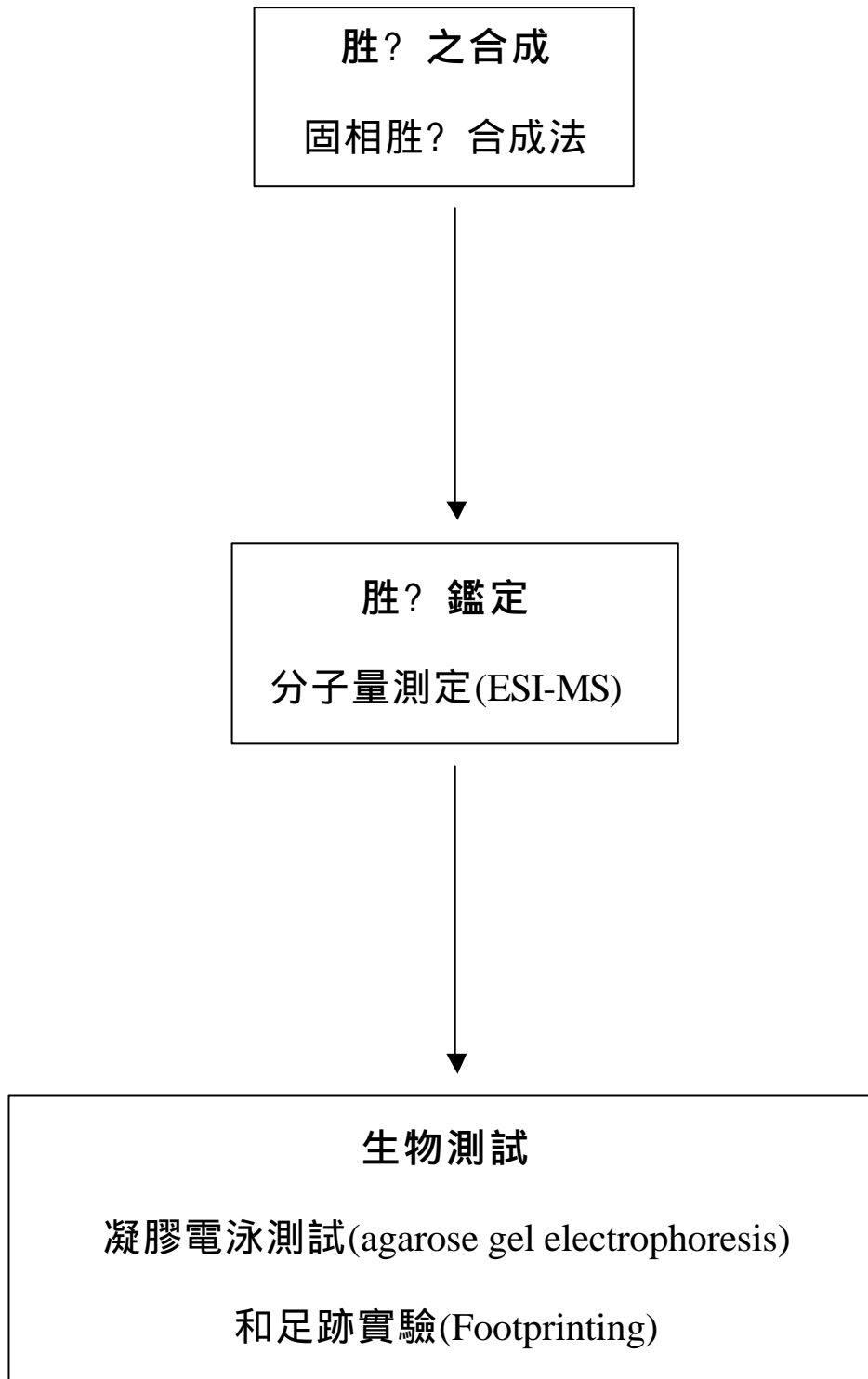


### **ChY-10**



## 二、實驗部份

### 2.1 實驗流程



## 2.2 藥品與儀器

### 2.2.1 藥品

藥品名稱	藥品來源
1. Acetic Acid	TEDIA
2. Acetone	景明
3. Acetonitrile	TEDIA
4. agarose	SeaKem
5. Ammonium carbonate	SHOWA
6. Boric Acid	TEDIA
7. Boc-4-amino-1-Mepyrrol-carboxylic acid	NEOSYSTEM
8. Dichloromethane	TEDIA
9. 1,4-Dioxane	皓峰
10. Disodium Ethylenediamine Tetraacetate	Fisher
11. DNA (PBR322)	榮東計劃實驗小組提供
12. 1,2-Ethanedithiol	Fluka
13. Ethanol 99.5%	NASA
14. Ethidium Bromide	SIGMA
15. Ethyl Ether Anhydrous	TEDIA
16. Fmoc- -Ahx-OH	ANASPEC

17.Fmoc-Ala-OH	BACHEM
18.Fmoc-Arg(Pmc)-OH	BACHEM
19.Fmoc-Asn(Trt)-OH	ANASPEC
20.Fmoc-Asp(tBu)-OH	ANASPEC
21.Fmoc-chloride	BACHEM
22.Fmoc-Cys(Trt)-OH	ANASPEC
23.Fmoc-Gln(Trt)-OH	ANASPEC
24.Fmoc-Glu(tBu)-OH	ANASPEC
25.Fmoc-Gly-OH	BACHEM
26.Fmoc-His(Trt)-OH	ANASPEC
27.Fmoc-Hyp-OH	ANASPEC
28.Fmoc-Lys(Boc)-OH	ANASPEC
29.Fmoc-Met-OH	ANASPEC
30.Fmoc-Phe-OH	ANASPEC
31.Fmoc-Pro-OH	ANASPEC
32.Fmoc-Ser(tBu)-OH	ANASPEC
33.Fmoc-Thr(tBu)-OH	ANASPEC
34. Fmoc-Trp-OH	ANASPEC
35.Fmoc-Tyr(tBu)-OH	ANASPEC

36.Hydrochloric acid	和光
37.Methyl Alcohol	TEDIA
38.N-Methylmorpholin 99%	Lancaster
49.N <sub>2</sub>	大統
40.NaOH	MERCK
41.N-Chloroacetyl glycine	SIGMA
42.Ninhydrin	Lancaster
43.N,N-Dimethylformamide	SIGM
44.Phenol	SHOWA
45.Piperidine	TEDIA
46.PyBOP	NOVA
47.Pyridine	聯工
48.Rink Amide AM resin	NOVA
49.Sodium bicarbonate	TEDIA
50.Trifluoroacetic acid	ACROS
51.Thioanisole	Fluka
52.Tris(hydroxymethyl)aminomethane	TEDIA

## 2.2.2 儀器

1. 固相肽合成儀：PS3 , AUTOMATED SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIZER , Rainin
2. 高效能液相層析儀 (HPLC) :  
層析管柱：Reverse Phase (Vydac C18 , 0.4×25 cm ; 1×25 cm)  
幫浦：HITACHI , L-7100 型  
紫外光偵測器：Soma UV-VIS detector/S-3702 , Range : 180~610 nm  
紀錄器：PC 個人電腦內裝 D-7000 軟體
3. 冷凍乾燥機：Virtis 10-323 型
4. 抽真空濃縮儀：  
旋轉濃縮器 Buchi RE  
抽真空幫浦 Eyela Aspirator A-3S
5. 高真空幫浦：東元單向感應電動機 BSGV 型
6. 氮氣產生器：NITROX , VHP nitrogen generator
7. 熔點測定儀：Mel-temp (Laboratory devices)
8. 旋光度測定儀：AUTOPOL (Automatic polarimeter)
9. 凝膠電泳分析：  
電泳槽 HYBAID  
電源供應器 Ps500XT DC  
照像機 DS34 , POLAROID (Direct screen instant camera)



底片 Polaroid , Polapan 667

10. 積分軟體：Bio1D Software (Version 6.32)

11. 分子量測定：中興大學貴重儀器中心代測 (ESI-MS)

## 2.3 儀器操作

本實驗室合成肽序列所使用的方法為固相肽合成法(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)<sup>46</sup>, 採用儀器為固相肽合成儀(PS3, Peptide Synthesizer), 其中的操作簡稱分別為:

	FILL	MIX	DISP	REP
SOLV	05	00:00:30	10	3
DEP	05	00:10:00	10	3
ACT	00	00:40:00	10	1

FILL: 溶劑注入反應瓶的單位時間(sec)

MIX: 打入氮氣的單位時間(hr:min:sec)

DISP: 抽除反應瓶內溶劑的單位時間(sec)

REP: 重複反應的次數

SOLV (清洗步驟):清洗樹脂時注入 DMF 5 單位時間的量(1 單位時間約 1mL), 以 N<sub>2</sub>攪動 30 秒, 抽除溶劑時間為注入時間的 2 倍(10 秒)以確定完全抽除。此步驟重複三次。

DEP (去除保護基步驟):反應中注入去保護基溶劑 20% piperidine/DMF 5 單位時間, 以 N<sub>2</sub>攪動 10 分鐘, 抽除溶劑時間為 10 秒。此步驟重複三次。

ACT (耦合步驟):將胺基酸與耦合劑溶於 5mL 0.4M NMM/DMF, 加入反應瓶中, 故 FILL 指令不需注入溶劑。耦合時間為 40 分鐘, 抽除溶劑 10 秒。

## 2.4 Kaiser test

首先取出極少量的未完成胜? 置於 10×75 mm 的試管中,再加入 100  $\mu$  L Pyridine、75  $\mu$  L (8g phenol/2mL EtOH)、75  $\mu$  L (0.2g Ninhydrin /2mL EtOH), 於酒精燈下烘烤, 即可觀察溶液顏色的變化來判斷陽性或陰性反應。

## 2.5 直鏈胜? 合成步驟

### 2.5.1 樹脂(Resin)與胺端具 Fmoc 保護基的連接(Linkage)

#### a. 切除樹脂 Fmoc 保護基

取樹脂(50 mg, 0.0315 mmol)於反應瓶中, 注入 5 單位時間的 DMF, 靜置 20 分鐘使樹脂膨脹以利反應。抽除 DMF 之後進行下述清洗步驟三次, 注入 5 單位時間的 DMF、 $N_2$  攪動 30 秒、流除 DMF 10 單位時間。清洗完樹脂後, 注入 20 % piperidine / DMF 溶液 5 單位時間,  $N_2$  攪動反應 10 分鐘、流除溶液 10 單位時間, 此步驟進行二次為切除保護基。再進行清洗步驟三次。Kaiser test (+)

#### b. 樹脂與胺基酸的連接(Fmoc-A.A.-Resin)

樹脂以 1 當量來計算, 取 4 當量含 Fmoc 保護之胺基酸與 4 當量耦合試劑(coupling reagent) PyBOP 於樣品瓶中, 加入 5mL 0.4M NMM/DMF (8.9mL NMM/191.9mL DMF)溶液溶解, 再加入含樹脂的反應瓶中,  $N_2$  攪動 40 分鐘, 流除溶液 10 單位時間, 進行清洗步驟三次。

Kaiser test ( - )

### 2.5.2 去除胺端 Fmoc 保護基(Deprotection)

注入 5 單位時間 20 % piperidine / DMF 溶液，N<sub>2</sub> 攪動反應 10 分鐘，流除溶液 10 單位時間，上述步驟進行二次。進行清洗步驟三次。

Kaiser test ( + )

### 2.5.3 耦合(Coupling)

稱取 4 當量胺基酸與 4 當量耦合試劑溶於 5mL 0.4M NMM/DMF 溶劑加入反應瓶中，N<sub>2</sub> 攪動反應 40 分鐘，流除溶液 10 單位時間。進行清洗步驟三次。 Kaiser test ( - )

### 2.5.4 切除(Cleavage)

a. 待所要的直鏈胜? 完全合成完畢，去除側鏈保護基並將直鏈胜 由樹脂上切除(圖 5)。

b. 製備樹脂切除試劑(cleavage reagent)

phenol : 0.75g、 TFA : 10mL、 D.I.W. : 0.5mL、 Thianisole : 0.5mL、  
EDT : 0.25mL。

以二氯甲烷將反應瓶中的樹脂洗出，過濾並抽除 DCM，將抽乾的樹脂置於圓底瓶中，將製備的切除試劑緩緩加入圓底瓶，室溫下攪拌反應 2 小時。冷凍乾燥除去切除試劑，即可得胜? + 樹脂 + 側鏈保護基的粗產物 再利用 Ethyl Ether Anhydrous (4×20mL)洗去殘餘的反應試劑以及切除下的保護基，保留固體利用 5% AcOH 水溶液將吸附於樹脂上的胜

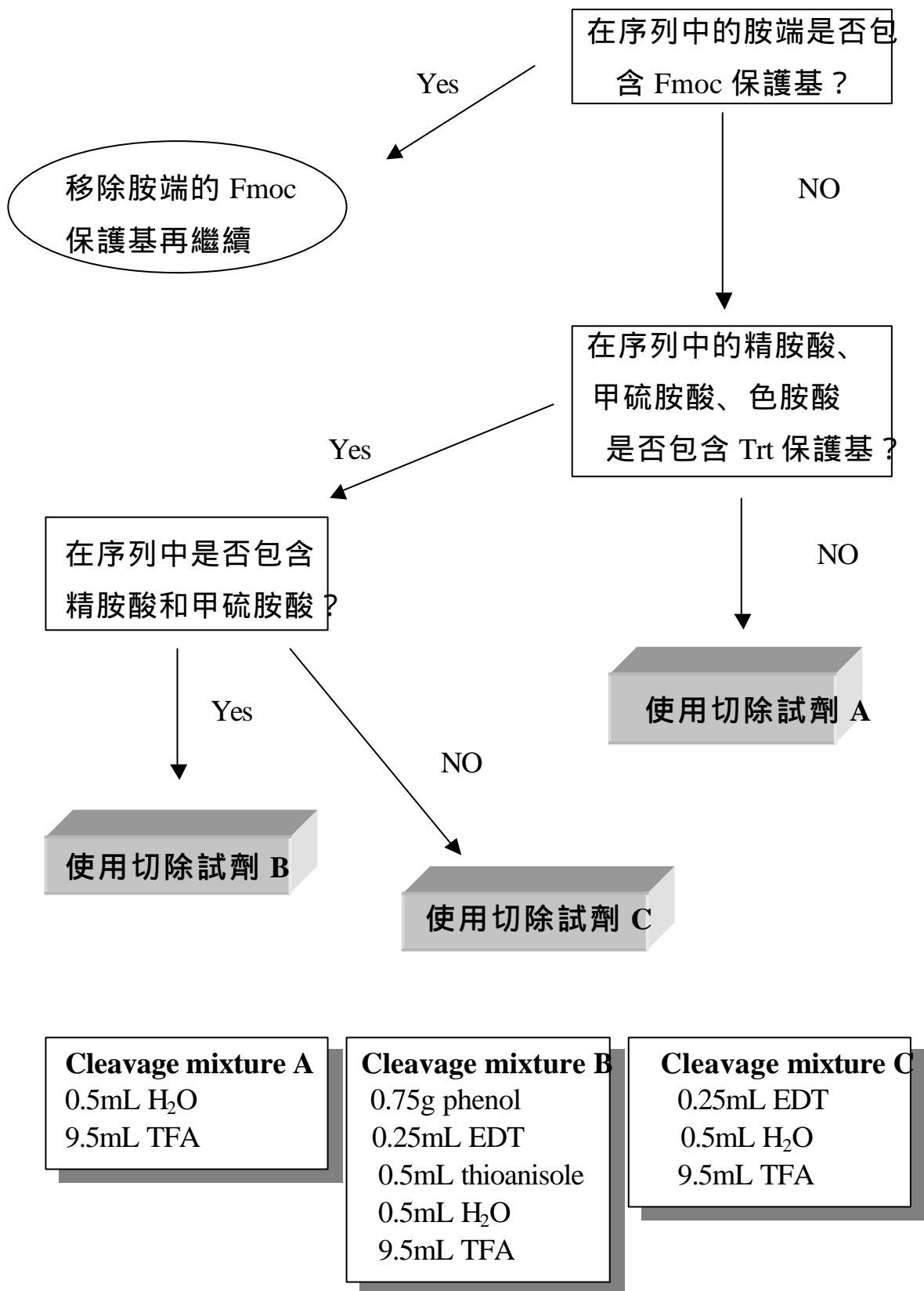


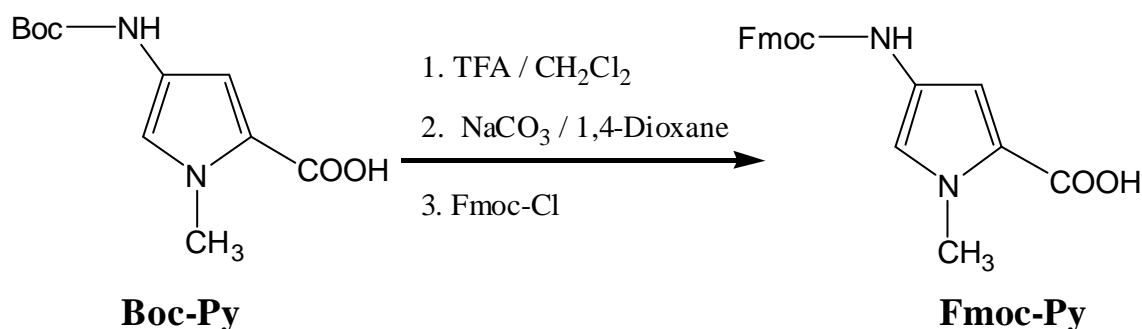
圖 5. 選擇切除樹脂之條件

? 洗下，將溶有胜? 的 AcOH 水溶液冷凍抽乾，即可得直鏈胜? 初產物。再以 HPLC 純化，冷凍抽乾得最終直鏈胜?。

## 2.6 環狀胜? 合成步驟<sup>47</sup>

依照 2.5 直鏈胜? 合成步驟先合成所需要的直鏈胜?，將直鏈胜? (~ 10 mg) 置入圓底燒瓶，加入 50mL 0.1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.48g/50mL D.I.W.)，利用 3N NaOH 溶液調 PH 至 9.0 左右，於室溫下(25~30 )攪拌反應 8 小時，冷凍抽乾除去溶劑，再以 HPLC 純化之，冷凍抽乾得環狀胜?。

## 2.7 合成 Fmoc-4-amino-1-methylpyrrole-2-carboxylic acid (Fmoc-Py)<sup>48-50</sup>



取 100mg Boc-Py 置於圓底反應瓶中，加入 1.1 mL TFA 和 1 mL DCM，室溫下(20~25 )攪拌反應 1 小時，抽真空水幫浦抽除試劑得到淡黃色粉末狀粗產物；加入 2 mL 10% NaCO<sub>3</sub>和 2 mL 1,4-Dioxane 使粗產物完全溶解，再加入 100mg Fmoc-Cl 冰浴反應 4 小時，再於室溫下

反應 8 小時；加入 200mL 去離子水/150mL 乙醚分離萃取，取水層至入 4 冰箱冷卻 30 分鐘，再利用 6N HCl 滴定至 PH 2 左右，靜置 4 冰箱一晚使產物沉澱，過濾即得淡褐色產物，產率 75%。

## 2.8 高效能液相層析 (HPLC) 純化

層析管柱：reverse phase C<sub>18</sub> (0.4×25 cm；1×25 cm) column

紫外光偵測波長： = 214 nm

沖提速度： 1 mL/min (0.4×25 cm column)

2.5mL/min (1×25cm column)

電腦記憶軟體：D-7000 軟體

沖提液系統：A 液：5% CH<sub>3</sub>CN、95% H<sub>2</sub>O、0.1% TFA

B 液：95% CH<sub>3</sub>CN、5% H<sub>2</sub>O、0.1% TFA

C 液：CH<sub>3</sub>CN

梯度設定：B 液%： 0-40-80-100-100%

時間設定： 0-10-20-25-30 min

## 2.9 凝膠電泳實驗<sup>43</sup>

### 2.9.1 製備 0.5% gel

稱 agarose gel 0.369g 溶於 74mL 0.5×TBE 中，至於微波爐加熱 3 分鐘，將膠液倒入電泳槽中待凝結。

## 2.9.2 胜? 與 DNA 反應條件

視條件加入胜? 濃度、DNA ( $0.225 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 體積、去離子水 等於各小管(tubes)中；胜? 濃度利用  $0.5\times\text{PBS}$  配製。

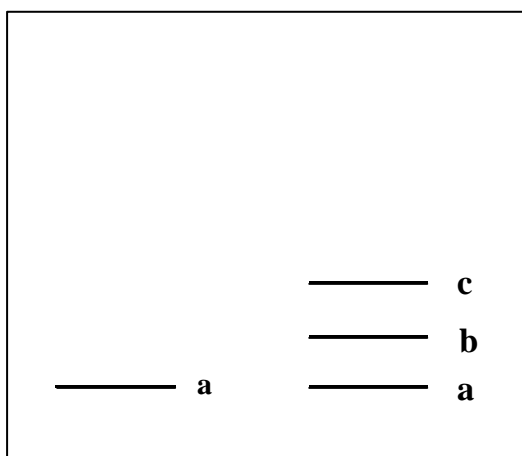
反應溫度  $65^\circ\text{C}$ ，反應時間 25 分鐘，取出小管置於冰水浴中 3 分鐘終止反應，再加入  $2 \mu\text{L}$  dye 和  $2 \mu\text{L}$   $0.5\times\text{TBE}$  於各 tubes 中均勻混合，凝膠中加入  $0.5\times\text{TBE}$  完全覆蓋凝膠，再將 tubes 依序打入凝膠中，電壓  $100 \text{V}$ ，電流  $30 \text{A}$ ，時間約 2 小時。

## 2.9.3 顯像

取出凝膠浸於  $500\text{mL}$   $0.5\times\text{TBE}$  (含  $50 \mu\text{L}$  Ethidium Bromide  $1 \text{mg}/\text{mL}$ ) 30 分鐘，取出凝膠再浸於  $0.5\times\text{TBE}$  中 10 分鐘，取出凝膠於 UV 燈上顯影並照相，即得電泳膠片圖。

Lane 1  $\longrightarrow$  DNA cleavage  $\longrightarrow$  Lane 2

Lane 1                      Lane 2



Lane 1 : supercoiled form DNA

Lane 2 : a – supercoiled form DNA

b – linear form DNA

c – open-circular form DNA



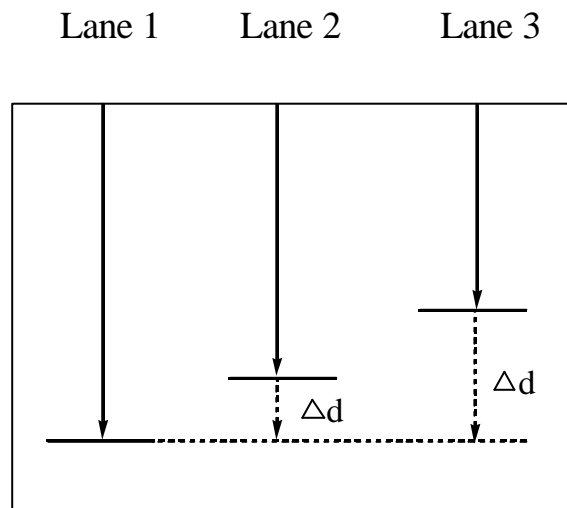
## 2.9.4 Buffer 製備

5×TBE : 54g Tris、 27.5g Boric acid、 3.7g EDTA 溶於去離子水中至 1 升

10×PBS : 8.5g NaCl、 0.2g KCl、 1.15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶於去離子水至 1 升

## 2.9.5 凝膠位移分析(gel shift assay)<sup>45</sup>

將凝膠置於 UV 燈上顯影, 測量各帶(bands)與基準帶(standard band)之間的差距。方法: 僅 DNA 的情況下所呈現的帶為基準帶, 於不同條件下與胜? 作用後所呈現的帶與基準帶作位置差別上的測量, 所得的位移差, 單位為 mm, 即凝膠位移(gel shift)。探討各胜? 與 DNA 作用後的凝膠滯留效應(gel retardation effect)。



$d$  : 基準帶與帶之間的凝膠位移, 單位 mm。

Lane 1 : 僅 DNA 時反應後帶在凝膠上的位置, 為基準帶。

Lane 2,3 : 各反應條件下胜? 對 DNA 作用後帶於凝膠上的位置。

## 2.9.6 凝膠電泳切割百分比公式：

$$\% \text{ cleavage} = \frac{(\text{band c} + \text{band b}) / 1.4}{\text{band a} + [(\text{band c} + \text{band b}) / 1.4]} \times 100 \%$$

## 2.10 足跡實驗 (DNase I Footprinting) 原理<sup>51</sup>

在 1978 年 Galas 和 Schmitz 發展出足跡實驗的技術，利用足跡實驗可以找出蛋白質結合在 DNA 的專一結合序列。將一個特定的 DNA 斷片(例如:由限制酶的作用所產生)之一股末端，首先以 <sup>32</sup>P 加以標記。蛋白質被加到此標定的 DNA 上，然後此複合物被 DNase I 或化學試劑切割，而其恰好足夠長以使平均每一鏈上有一缺口。一個沒有蛋白質結合的 DNA 也是以相同方法處理以作為對照組，結果造成的 DNA 斷片用凝膠電泳法依其大小而分離，此凝膠的形式高度地顯示：對照組會出現一系列的帶 (bands)，但在含蛋白質的序列位置則不出現，這些帶的消失是因為蛋白質遮蔽了 DNA，而避免了 DNA 某些位置不被切割成相對應的斷片。

Footprinting 技術是將 DNA 片段一端以 <sup>32</sup>P 標示，此標示的 DNA 隨後被 DNase I 在少數的位置上進行切割，以相同實驗在有結合到 DNA 特定位置上的蛋白質之情形下完成。結合的蛋白質保護 DNA 之一段免於 DNase I 之切割作用。因此特定的斷片將不存在，所以在直

立式凝膠上的遺失帶 (missing bands) 可用來辨明 DNA 上的結合位置(圖 6)。

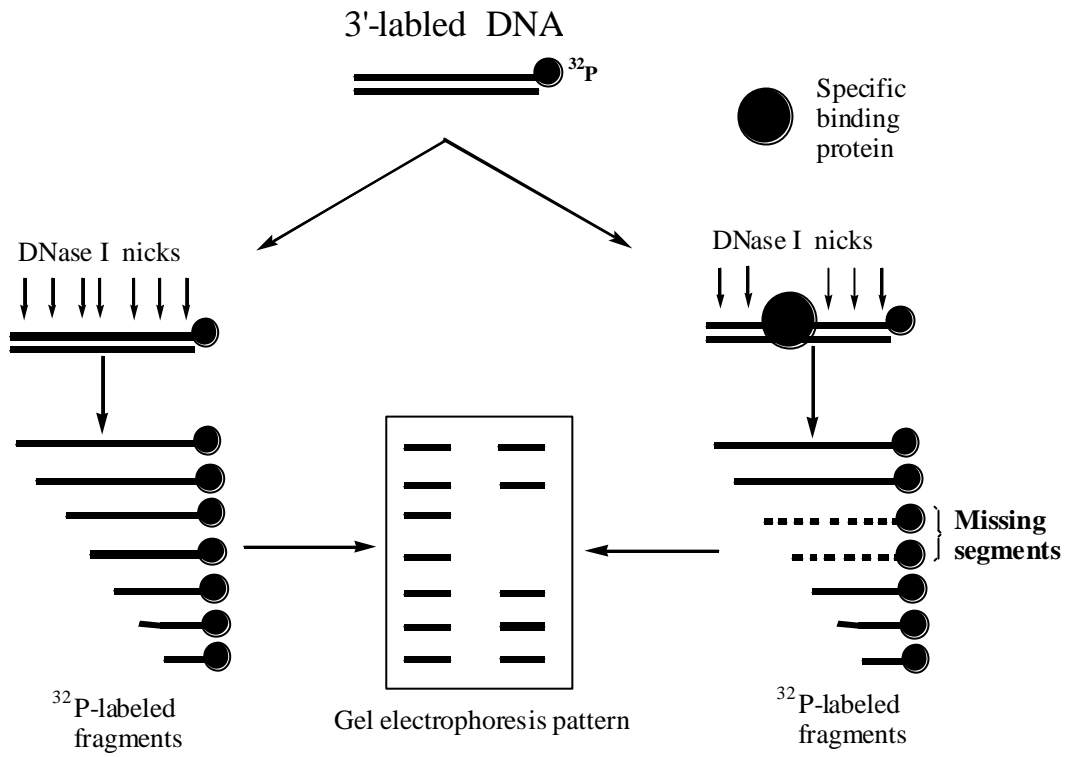


圖 6. Footprinting 技術

### 三、結果與討論

本論文利用胜? 固相合成的胜? 有三大類直鏈胜? (表 1)、含 Py 結構之直鏈胜? (表 2)和環狀胜? (表 3、表 4), 其利用高解析色層分析儀(層析管柱: reverse phase C<sub>18</sub>, 0.4×25cm 1×25cm column)純化胜? , 旋光測定儀測量各胜? 的旋光度, 熔點測定儀測量熔點, 胜? 結構鑑定利用分子量測定(ESI-MS, 中興大學貴重儀器中心許麗美小姐代測)分析結果。由凝膠電泳實驗我們能初步判斷胜? 對 DNA 是否有結合或切割作用, 有凝膠滯留現象即表示有結合作用, 有亮度比變化即表示有切割作用(表 5), 再運用電腦積分軟體計算出胜? 對 DNA 的切割程度(表 6), 利用足跡實驗探討胜? 與 DNA 的結合位置。

由凝膠電泳實驗結果得知所合成的直鏈胜? 中 HKS-14 凝膠滯留效應(gel retardation coefficient)為 11.1mm band shift /  $\mu$ M peptide (圖 17), 與 DNA 結合作用最強, 可能是序列中的胺基酸側鏈大多含 NHs 可以增加與 DNA 形成氫鍵的機會提高結合作用。以 XPRK 為模板(X 為 Ser 和 Met)合成 SP-12 和 MR-12, 由凝膠電泳實驗結果得知 SP-12 對 DNA 有切割和結合作用, 而 MR-12 僅有結合作用, 由凝膠滯留效應顯示 MR-12 對 DNA 的結合能力比 SP-12 高了一倍。

由凝膠電泳實驗得知含 Py 結構的胜? 對 DNA 大多有切割作用, 原本計畫在直鏈胜? 胜? 中加入 Py 結構會提高對 DNA 的結合性, 但由凝膠電泳圖結果顯示其凝膠滯留效應皆小於 5 mm band shift /  $\mu$ M peptide, 與 DNA 結合性並沒有很好 (圖 34)。本研究小組曾合成 PyH-12 發現此胜? 對 DNA 有很優異的切割效應, 因此本論文藉由修飾 PyH-12 內部胺基酸序列合成出一系列含 Py 結構之胜?, 將第一至第四位置的胺基酸順序逆轉(KRPH HPRK)合成 RPyH-12; 將 PyH-12 和 RPyH-12 內部胺基酸 Pro 以 Hyp 取代合成 PyHyp-12 和 RHyp-12, 結果顯示 RPyH-12 切割性比 PyH-12 高(圖 35), 推斷可能是由於序列顛倒導致結構構形(conformation)改變提高了對 DNA 的切割性; 亦發現將 Hyp 取代 Pro 切割性明顯提升 1~2 倍, Dervan 曾將一聚醯胺(polyamide)中以 Hp 取代 Py, 提高了聚醯胺對 DNA 專一性結合性<sup>22-24</sup>, 所以本文推論

可能是 Hyp 結構中側鏈的 OH 加強了胜? 對 DNA 的結合能力,進一步有助於提高其切割性。由 Dervan 合成一系列聚醯胺中引用  $\gamma$ -Ala 使結構形成髮夾型(hairpin)<sup>55</sup>, 提高了聚醯胺對 DNA 序列有專一性結合, 本文在胜? 中引入 Ahx 合成 PyX-12, 預期能形成髮夾型 Py/Py 配對增加胜? 對 DNA 的專一結合性, 結果顯示沒有提高對 DNA 結合作用。

由表 5 得知環狀胜? 與 DNA 的作用行為大多是結合作用。本研究小組曾合成 CY-10, 由凝膠電泳實驗結果顯示對 DNA 有微弱的切割/結合作用, 此發現對本實驗室合成環狀胜? 研究有進一步的發展, 因此本文以 CY-10 作內部胺基酸修飾合成出一系列環狀胜?, 將 XPRK 單元 X 為 Phe、Asn 合成 CF-10 和 CNN-10, 結果顯示 CF-10 對 DNA 有結合作用, CNN-10 對 DNA 皆無任何作用現象(圖 71), 進一步將 XPRK 單元 X 為 His、Gln 和 Tyr, Pro 置換成 Hyp, 合成 ChH-10、ChQ-10 和 ChY-10, 結果顯示 ChY-10 對 DNA 有結合作用, ChH-10 和 ChQ-10 對 DNA 皆無任何作用現象, 之後以 CNN-10 為模板, 將第九位置的胺基酸以 Asp 和 Tyr 取代合成 CDN-10 和 CNY-10, 結果顯示 CDN-10 對 DNA 有結合作用, CNY-10 對 DNA 有結合/切割性(圖 72), 由以上推論可能是 CY-10、CNY-10 和 ChY-10 中含芳香環胺基酸 Tyr 對 DNA 有微弱的作用; 將 NPRK 單元重複三次合成 CN-14, 結果顯示 CN-14 提高了與 DNA 的結合作用與切割性, ; 在同時魯程泰學長合成以 YPRK

單元為主的 CNY-14，由凝膠電泳結果顯示對 DNA 的結合性和切割性無差異(圖 70)。之後將 XPRK(X 為 His、Tyr、Asp、Met) 單元改變其順序位置，內部胺基酸 Pro 與 Hyp 置換，合成 CRHY-14、CH<sub>2</sub>Y-14、CH<sub>y</sub>Y-14、CH<sub>y</sub>D-14、CMY-14 和 CTH-14，結果顯示 CTH-14 對 DNA 無任何作用性，CRHY-14、CH<sub>2</sub>Y-14、CH<sub>y</sub>D-14 和 CMY-14 有凝膠滯留效應(圖 70)，CH<sub>y</sub>Y-14 有凝膠滯留效應和切割作用。

## 四、結論

本論文所合成的胜? 經由 ESI-MS 證實是正確的。由凝膠電泳實驗初步分析各胜? 與 DNA 結合情形，有結合作用的有 Ex-12、Ex-15、MR-12、CRHY-14、CH<sub>2</sub>Y-14、CH<sub>y</sub>D-14、CMY-14、CF-10、CDN-10 和 ChY-10；有結合作用與切割性的有 HKS-14、SP-12、PyH-10、PyH-12、RPyH-12、PyHyp-12、RHyp-12、RPyY-12、PyX-12、CN-14、CH<sub>y</sub>Y-14、CY-10 和 CNY-10。RPyH-12 的切割能力比 PyH-12 高，且含 Py 結構之直鏈胜? 中將 Hyp 取代 Pro 可提升胜? 對 DNA 的切割效應 1~2 倍；環狀胜? 中十四? 比十? 與 DNA 容易產生結合作用。由足跡實驗進一步得知環狀胜? CRHY-14、CH<sub>2</sub>Y-14、CH<sub>y</sub>D-14、CH<sub>y</sub>Y-14 和 CMY-14 會與 DNA 富含 T 的位置結合，其選擇的結合位有 5'-TATTT-3'、5'-TTTTCT-3' 和 5'-TATTT-3'。

未來我們期望針對 XPRK 單元胜? 內部胺基酸序列作更進一步的修飾，可獲得對 DNA 有專一性結合及切割作用之胜? 而成為一種基因控制試劑。



## 五、參考文獻

1. M. Suzuki. *J. Mol. Biol.* **1989**, 207, 61.
2. M. Suzuki. *The EMBO Journal.* **1989**, 8, 797.
3. von Holt, C., de Groot, P., Schwager, S. and Brandt, W. F. In Stein, G. S., Stein, J. L. and Marzluff, W. F. (eds), *Histone Genes*. Wiley-Interscience, New York. **1984**, pp. 65-105.
4. M. Suzuki. *Proc. Japan Acad.* **1988a**, 64B, 29.
5. M. Suzuki. *Proc. Japan Acad.* **1988b**, 64B, 33.
6. Churchill, E. A.; Suzuki, M. *The EMBO Journal* **1989**, 8, 4195.
7. Yang, C. H., Chou, P. J., Luo, Z. L., Chou, I. C., Chang, J. C., Cheng, C. C., Martin, C. R. H., Waring., M. J., and Sheh, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3279.
8. Bailly, C.; Chaires, B. C. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 513.
9. Ragnarsson, U.; Grehn, L. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3492.
10. Waring, M. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 159.
11. Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2027.
12. Patel, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 6424.
13. Kopka, M. L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., and Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1985**, 183, 553.
14. Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86,

- 5723.
15. Kopka, M. L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., and Dickerson, R, E.  
*Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1985**, 82, 1376.
  16. Klevit, R. E., Wemmer, D. E., and Reid, B. R. *Biochemistry* **1986**, 25,  
3296.
  17. Coll, M., Frederick, C. A., Wang, A. H. J., and Rich, A. *Proc. Natl. Acad.  
Sic. U.S.A.* **1987**, 84, 8385.
  18. Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114,  
8783.
  19. Lown, J. W.; Krowicki, K.; Bhat, U. G.; Skorobogaty, A.; Ward, B.;  
Dabrowiak, J. C. *Biochemistry* **1986**, 25, 7408.
  20. Wurtz, N. R.; Dervan, P. B. *Chemistry & Biology* **2000**, 7, 153.
  21. Swalley, S. E.; Bair, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119,  
6953.
  22. Ellervik, U.; Wang, C. C. C.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122,  
9354.
  23. Urbach, A. R.; Szewczyk, J. W.; white, S.; Turner, J. M; Baird, E E.;  
Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11621.
  24. Beal, P. A.; Dervan, P. B. *Science.* **1991**, 251, 1360.
  25. White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.

- Nature*. **1998**, 391, 468.
26. Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215.
27. Chu, T. W.; Plattner, J. J.; Katz, L. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3853.
28. Alfredson, T. V.; Maki, A. H.; Waring, M. J. *Biopolymers* **1991a**, 31, 1689.
29. Alfredson, T. V.; Maki, A. H.; Waring, M. J. *Biochemistry* **1991b**, 30, 9665.
30. Dell, A.; Williams, D. H.; Morris, H. R.; Smith, G. A.; Feeney, J.; Roberts, G. C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2497.
31. Fox, K. R.; Marks, J. N.; Waterloh, K. *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 6725.
32. Hossain, M. B.; van der Helm, D.; Olsen, R. K.; Jones, P. G.; Sheldrick, G. M.; Egert, E.; Kennard, O.; Waring, M. J.; Viswamitra, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 3401.
33. Lee, J. S.; Waring, M. J. *Biochem. J.* **1987a**, 173, 115.
34. Lee, J. S.; Waring, M. J. *Biochem. J.* **1987b**, 173, 129.
35. Low, C. M. L.; Fox, K. R.; Olsen, R. K.; Waring, M. J. *Nucleic Acids Res.* **1986a**, 14, 2015.
36. Low, C. M. L.; Fox, K. R.; Waring, M. J. *Anti-Cancer Drug Design* **1986b**, 1, 149.

37. McMurry, L.; Petrucci, R. E.; Jr.; Levy, S. B. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1980**, *77*, 3974.
38. Wang, H. J.; Ughetto, G.; Quigley, G. J.; Hakoshima, T.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Science* **1984**, *225*, 1115.
39. Sheh, L.; Cheng, C. Y.; Kuan, Y. H.; Chen, C. F. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 55.
40. Sheh, L.; Li, C. J.; Dai, H. Y.; Cheng, V.; Chiang, C. D.; Shen, N. K.; Yu, C. Y. *Anti-Cancer Drug Design* **1992**, *7*, 315.
41. Sheh, L.; Dai, H. Y.; Kuan, Y. H.; Li, C. J.; Chiang, C. D.; Cheng, V. *Anti-Cancer Drug Design* **1993a**, *8*, 237.
42. Sheh, L.; Lin, H. H.; Jeng, K. C. G.; Chen, C. F. *J. Med. Chem.* **1993b**, *36*, 4302.
43. Sheh, L.; Chang, H. W.; Ong, C. W.; Chen, S. L.; Bailly, C.; Linssen, R. C. M.; Waring, M. J. *Anti-Cancer Drug Design* **1995**, *10*, 373.
44. Chen, S. L.; Wong, R. N. S.; Lo, V.; Chang, S.; Chiang, C. D.; Sheh, L. *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, *13*, 501.
45. Cheng, C. T.; Lo, V.; Chen, J.; Chen, W. C.; Lin, C. Y.; Lin, H. C.; Yang, C. H.; Sheh, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1493.
46. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
47. Kleinman, H. K.; Graf, J.; Amoto, Y.; Saski, M.; Schasteen, C. S.;

- Yamada, Y.; Martin, G. R.; Robey, F. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1989**, *272*, 39.
48. Wutz, N. R.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1201.
49. Vazquez, E.; Caamaño, A. M.; Castedo, L.; Mascarenas, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3621.
50. Knig, B.; Rdel, M. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 943.
51. Schmitz, A.; Galas, D. J. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3157.
52. Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *118*, 6160.