

Semisyntese fluoreszenzmarkierter und prenylierter Rab7-Proteine

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

DISSERTATION

von
Diplom-Chemikerin

Anja Watzke

aus Münster

Dekan: Prof. Dr. N. Krause

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. R. S. Goody

Tag der mündlichen Prüfung: 27/04/05

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund in der Zeit von Juni 2001 bis Januar 2005 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Posttranslationale Lipidmodifikationen von Proteinen	3
2.1.1. Lipidmodifikationen der G-Proteine	3
2.1.2. Die Prenylierung	4
2.1.3. Die G-Proteine	6
2.2. Rab/Ypt-Proteine - Regulatoren des zellulären Vesikeltransportes	7
2.2.1. Vorkommen der Rab/Ypt-Proteine	7
2.2.2. Der vesikuläre Transportprozess in der Zelle	8
2.2.3. Posttranslationale Lipidmodifizierung der Rab/Ypt-Proteine	10
2.3. Strukturen der Rab/Ypt-Proteine	12
2.3.1. Strukturelle Charakteristika der Rab/Ypt-Proteine	12
2.3.2. Strukturelle Eigenschaften der Rab:Effektor/Regulator-Komplexe	14
2.4. Semisynthese modifizierter Proteine	16
2.4.1. Ligationsmethoden von Peptiden und Proteinen	16
2.4.2. Die <i>Expressed Protein Ligation</i> (EPL)	17
2.4.3. Synthese von lipidmodifizierten Proteinen	20
2.4.4. Strategien für die Lipopeptidsynthese	22
3. Ziel der Arbeit	24
4. Spezieller Teil	27
4.1. Semisynthese der penylierten und fluoreszenzmarkierten Rab-Proteine	27
4.1.1. Synthese des Rab7-C-Terminus in Lösung	27
4.1.1.1. Syntheseplan	27
4.1.1.2. Synthese der prenylierten und fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide	30
4.1.1.3. Synthese der N-terminalen Dipeptide	34
4.1.1.4. Synthese der Hexapeptide	36
4.1.2. Synthese des Rab7-C-Terminus für die EPL an der festen Phase	38

4.1.2.1. Synthesepplan	38
4.1.2.2. Synthese der prelipidierten Bausteine	41
4.1.2.3. Synthese der Hexapeptide	42
4.1.3. Vergleich der Synthese der Lipopeptide in Lösung und an der festen Phase	47
4.1.4. Ligation der Hexapeptide an verkürzte Rab7-Proteine	48
4.1.5. Semisynthese prenylierter Rab-Peptide im Multimilligramm Maßstab	51
4.1.5.1. Synthese der Peptide	51
4.1.5.2. Ligation der Peptide an verkürzte Ypt1-Proteine	54
4.1.5.3. Strukturaufklärung des prenylierten Ypt1:GDI Komplexes	56
4.1.6. Synthese und Ligation Pt-Pincer-modifizierter Peptide	58
4.2. Synthese eines vielseitig modifizierbaren Bausteins zur Einführung spezifischer Gruppen in Proteine	65
4.2.1. Konzept und Synthesepplan des Bausteins	65
4.2.2. Synthese und Ligation von fluoreszenzmarkierten Bausteinen	67
4.2.2.1. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur C-terminalen EPL	67
4.2.2.2. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur MIC-Ligation	74
4.2.2.3. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur N-terminalen EPL	76
4.2.3. Anwendung des Bausteins bei der Immobilisierung von Ras-Proteinen auf Glasoberflächen <i>via</i> Staudinger-Ligation	80
4.2.3.1. Konzept	80
4.2.3.2. Synthese der Azid- und Cy5-funktionalisierten Bausteine	81
4.2.3.3. Ligation der Azid- und Cy5-funktionalisierten Bausteine	86
4.2.3.4. Immobilisierungsversuche	89
5. Zusammenfassung und Ausblick	91
5.1. Zusammenfassung	91
5.2. Ausblick	100
6. Experimenteller Teil	101
6.1. Messgeräte und Hilfsmittel	101

6.2. Versuche zu Kapitel 4.1.1.	103
6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.1.1.2.	103
6.2.2. Versuche zu Kapitel 4.1.1.3.	116
6.2.3. Versuche zu Kapitel 4.1.1.4.	120
6.3. Versuche zu Kapitel 4.1.2.	126
6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.1.2.2.	126
6.3.2. Versuche zu Kapitel 4.1.2.3.	130
6.4. Versuche zu Kapitel 4.1.4.	134
6.5. Versuche zu Kapitel 4.1.5.	135
6.6. Versuche zu Kapitel 4.1.6.	138
6.7. Versuche zu Kapitel 4.2.2.	145
6.7.1. Versuche zu Kapitel 4.2.2.1.	145
6.7.2. Versuche zu Kapitel 4.2.2.2.	159
6.7.3. Versuche zu Kapitel 4.2.2.3.	163
6.8. Versuche zu Kapitel 4.2.3.	168
6.8.1. Versuche zu Kapitel 4.2.3.2.	168
6.8.2. Allgemeine Vorschrift für die <i>Expressed Protein Ligation</i> der Bausteine mit verkürzten Ypt/Rab-Proteinen	179
6.8.3. Versuche zu Kapitel 4.2.3.4.	180
7. Literaturverzeichnis	181
8. Abkürzungsverzeichnis	191
9. Anhang	194

1. Einleitung

Durch die zunehmende Verschmelzung der naturwissenschaftlichen Bereiche der Chemie, Biologie, Physik und Medizin sind neue, interdisziplinäre Forschungsgebiete entstanden, die sich heute vor allem in den *life sciences* präsentieren. Heute weiß man, dass Chemiker, Biologen und Mediziner aus verschiedenen Richtungen dieselben Gegenstände betrachtet haben, sich dabei jedoch unterschiedliche Forschungsansätze zu Nutze machten. Die Annäherung der unterschiedlichen Forschungsgebiete zeigt sich insbesondere in dem Einfluss, den die Chemie auf den ehemals phänomenologischen Forschungsansatz der Biologie und Medizin genommen hat, nämlich jeden Vorgang in einer Zelle als einen Vorgang auf molekularer Ebene zu begreifen. Dies führte zu einer raschen Emanzipation neuer Biowissenschaften. Die Aufklärung der Struktur der DNS durch Crick und Watson 1953 und das im Juni 2001 abgeschlossene Human-Genom-Projekt sind wohl die am meist beachteten Meilensteine in der Entwicklung dieser neuen Biowissenschaften. Auch für die Entwicklung neuer Konzepte zur Wirkstofffindung in der Pharmazeutischen Industrie ist das Zusammenspiel von synthetischer Chemie und den Biowissenschaften entscheidend. Sowohl der unumgängliche Einsatz synthetischer, chemischer Verbindungen in biologischen Studien als auch die Suche nach neuen Leitstrukturen stellen dabei neue Herausforderungen an den synthetisch arbeitenden Chemiker dar.

Auch der Bereich der Proteinbiosynthese erfuhr durch die Verknüpfung von Biologie und Chemie neue Impulse. Es gelang die Entwicklung der Protein-Semisynthese zur Herstellung von Proteinen, die nur schwer zu exprimieren sind. In der Protein-Semisynthese werden synthetische Peptide mit Hilfe eines Ligationssystems definiert an exprimierte Proteine gebunden. Diese Methode ermöglicht einen präzisen Zugang zu modifizierten Proteinen, die über die klassische Proteinexpression nicht oder nur schwer zugänglich sind. Dies gilt auch für die Mitglieder der Ras-Superfamilie, die eine Vielzahl von Zellfunktionen regulieren und deren Funktionsfähigkeit u.a. von ihrer Membranbindung über posttranslational eingeführte Lipidreste abhängt. In der vorliegenden Arbeit sollten die zu dieser Familie gehörenden Rab-Proteine durch den viel versprechenden, semisynthetischen Ansatz zugänglich gemacht werden und für biochemische Untersuchungen und Anwendungen wie die Proteinkristallisation eingesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beispiel dafür, wie die Verknüpfung der reinen organischen Synthese und der molekularen Biologie erfolgreich zu einem besseren Verständnis biochemischer Abläufe auf struktureller Ebene führen kann, und vor allem dafür, wie dieses Geben und Nehmen für beide Disziplinen fruchtbar gestaltet werden kann.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Posttranslationale Lipidmodifikationen von Proteinen

2.1.1. Lipidmodifikationen der G-Proteinen

Nahezu alle Mitglieder der Ras-Superfamilie werden posttranslational durch Isoprenylierung und/oder Acylierung modifiziert. Zu den Ras(rat-adeno-sarcoma)-Proteinen gehören neben den drei Isoformen H-, N- und K-Ras auch R-Ras, TC21, Rheb sowie die Rap und Ral-Proteine.^[1] Die GTP-bindenden Proteine sind an der Plasmamembran lokalisiert und unterscheiden sich vor allem im C-terminalen Bereich, der die Signalsequenz für die posttranslationale Modifizierung enthält. Die biologische Funktion der 3 Ras-Isoformen scheint sich jedoch nicht wesentlich zu unterscheiden. Bisher sind acht Unterfamilien Ras-homologer Proteine identifiziert worden, die aufgrund ihrer Größe von 20-30 kDa auch kleine GTPasen genannt werden. Zu der Ras-Superfamilie gehören ebenfalls die Proteine der Rho-Familie, die an der Organisation des Aktincytoskeletts beteiligt sind.^[2] Die Rab-Proteine stellen die größte Untergruppe mit mehr als 60 Mitgliedern dar, die am vesikulären Transport in verschiedenen Zellen beteiligt sind.^[3] Eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Kerntransportes spielen die Ran-Proteine, die einzigen Proteine der Ras-Superfamilie, die nicht posttranslational durch Isoprenylierung modifiziert werden.^[4] Die häufigsten drei vorkommenden Lipidmodifizierungen sind die n-Myristoylierung, bei der cotranslational ein N-terminales Glycin mit Myristinsäure acyliert wird^[5], die Palmitoylierung, bei der Palmitinsäure als Thioester an interne Cysteine gebunden wird,^[5,6] und die Prenylierung. Hierbei werden posttranslational ein oder mehrere Cysteine im C-terminalen Bereich mit dem isoprenoiden Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Rest alkyliert (Abbildung 1).^[7]

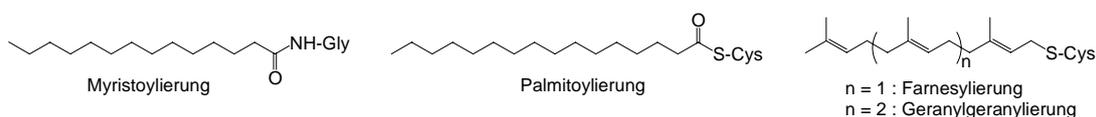


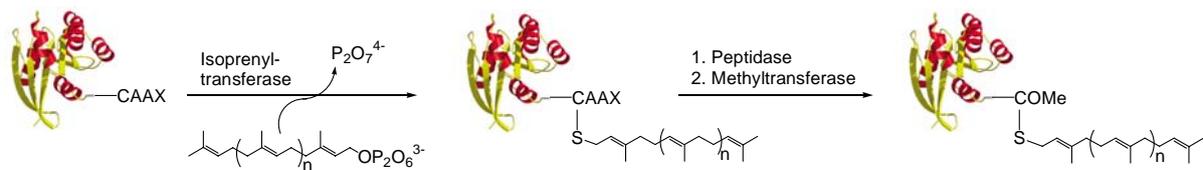
Abbildung 1: Lipidmodifikationen von Proteinen.

Isoprenylierung und Myristoylierung sind stabile Modifikationen, wohingegen die Palmitoylierung ein reversibler Prozess ist.^[8,9] Bis zu 2% der gesamten zellulären Proteine können prenyliert sein^[10], wovon wiederum 80% geranylgeranyliert sind.^[11]

2.1.2. Die Prenylierung

Ende der 80er Jahre wurde Lamin B, ein Kernhüllenprotein, als erstes posttranslational modifiziertes prenyliertes Protein entdeckt.^[12] Durch die Identifizierung der Ras- und Rab-Proteine als Lipoproteine wuchs das Interesse an prenylierten Peptiden aufgrund ihrer dominierenden Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen. Die Einteilung der prenylierten Proteine erfolgt in zwei Klassen. Die erste Gruppe beschreibt Proteine mit C-terminalen CAAX-Motiv. „C“ steht dabei für Cystein, „A“ für eine aliphatische Aminosäure und „X“ für eine beliebige Aminosäure. Die Eigenschaft von „X“ bestimmt die Art der Isoprenylierung. Ist „X“ ein Methionin, Serin oder Glutamin, wird das Protein von der Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert (Abbildung 2). Ist „X“ hingegen ein Leucin oder Phenylalanin, dann wird das Protein von der Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) geranylgeranyliert. Beide Isoprenyltransferasen sind Zink-bindende Proteine, die im Cytosol aller eukaryotischen Zellen vorkommen und aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Alle CAAX-Box enthaltene Proteine erfahren nach der Isoprenylierung weitere enzymatische Modifikationen, wobei kein Unterschied zwischen farnesylierten und geranylgeranylierten CAAX-Proteinen gemacht wird.^[7] Zunächst werden alle drei Aminosäuren (-AAX) proteolytisch abgespalten und anschließend das isoprenylierte Cystein an der Carboxygruppe methyliert. Diese Prozessierung wurde für Ras-Proteine zuerst beschrieben.^[13] Zur zweiten Gruppe der prenylierten Proteine zählen Proteine mit C-terminalem CC-, CXC-, CCXX- oder CCXXX-Motiven, die ausschließlich zur Rab-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine gehören. Beide Cysteine der Prenylierungsmotive werden von der Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) geranylgeranyliert (Abbildung 2). Die GGTase-II benötigt im Gegensatz zu beiden anderen Isoprenylierungen als drittes Protein das *rab escort protein* (REP).^[14] Die Rab-Proteine mit CXC-Motiv werden im Anschluss an die Prenylierung ebenfalls methyliert, bei CC- bzw. CCXX-enthaltenen Proteinen verbleibt der C-Terminus unverändert als Carboxylat.^[14,15]

(a)



(b)

Isoprenyltransferase	FTase	GGTase I	GGTas II
Zusammensetzung der Untereinheiten	48 kDa (α) 46 kDa (β)	48 kDa (α) 43 kDa (β)	60 kDa (α) 38 kDa (β)
Metalle	Zn^{2+} , Mg^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+} , Mg^{2+}
Isoprenylsubstrat	Farnesylpyrophosphat	Geranylgeranylpyrophosphat	Geranylgeranylpyrophosphat
Proteinsubstrat	Ras	Rho, Rac, Ral, Rap	Rab/REP
Sequenzmotiv	-CAAX, X = M, S, Q, A	-CAAX, X = L, F	Doppel-Cys-Motive -CC, -CXC, -CCX, -CCXX, -CCXXX

Abbildung 2: (a) Posttranslationale Modifikationsabfolgen von „CAAX- und CXC-Proteinen“; (b) Isoprenyltransferasen und ihre Substrate.

Die wichtigste Funktion der Prenylierung zeigt sich an der Tatsache, dass alle lipidierten Proteine Membranproteine sind, die über ihren Lipidrest an zelluläre Membranen gebunden sind.^[16] Die Membranbindung prenylierter Proteine erfolgt dabei über die Insertion der Prenylreste in die Lipiddoppelschicht. Dabei hängt die Stärke der Bindung von der Länge des Prenylrestes ab.^[17] Während ein Farnesylrest eine hohe Austauschrate aufweist, sind geranylgeranierte Proteine kinetisch stabil an eine Membran gebunden.^[17] Aus diesem Grund benötigen Ras-Proteine neben dem Farnesylrest ein zweites Membranbindungselement zur kinetischen Stabilisierung der Membranbindung. N-Ras und H-Ras sind am C-Terminus neben dem farnesylierten Cystein ein- bzw. zweifach palmitoyliert. Über den enzymatischen Mechanismus der Palmitoylierung ist bisher wenig bekannt.^[18,19] Der Sitz einer möglichen Palmitoyltransferase wird kontrovers diskutiert.^[20] Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ras-Proteine eine Membranaffinität aufweisen müssen, die durch den Farnesylrest gewährleistet wird, um palmitoyliert zu werden.

Neben der Membranassoziation ist die Vermittlung der Interaktion von Proteinen und ihre gegenseitige Erkennung eine weitere Funktion der Prenylierung. Durch die Membranlokalisation ist eine räumliche Annäherung von Proteinen und somit eine Protein-Protein-Wechselwirkung unter direkter Beteiligung der Prenylreste möglich. Im Falle des Ras2-Proteins konnte gezeigt werden, dass dessen farnesylierte Form eine 100fach höhere Affinität für die Adenylyl-Cyclase aufweist als das unmodifizierte Protein.^[21] Ebenso verläuft

die Wechselwirkung der Raf-1-Kinase mit Ras-Proteinen neben der Ras-Bindungsdomäne über eine Zink-Finger-Domäne, die nur an farnesyliertes Ras bindet.^[22] Auch die Notwendigkeit der Geranylgeranylreste bei Rab-Proteinen für die Interaktion mit Regulator-Proteinen wie RabGDI^[23], Rab3-GAP^[24] und Rab3-GEF^[25] konnte gezeigt werden.

2.1.3. Die G-Proteine

Die so genannten GTPasen, oder G-Proteine, werden in die Klasse der heterotrimeren G-Proteine und die der monomeren G-Proteine eingeteilt. Die Proteine der Ras-Superfamilie gehören zu den monomeren G-Proteinen, die in zellulären Funktionen, wie den Vesikeltransport, den Zellzyklus, den Kernimport und die Signaltransduktion involviert sind^[26], während die heterotrimeren G-Proteine im Wesentlichen an der Signalweiterleitung über cAMP und Ca²⁺ beteiligt sind.^[27] Die G-Proteine durchlaufen einen Zyklus, der den Wechsel zwischen der aktiven GTP-gebundenen Form und der inaktiven GDP-gebundenen Form mittels GTP-Hydrolyse bzw. GDP/GTP-Austausch beschreibt (Abbildung 3).^[26] Die aktive Form eines G-Proteins beeinflusst die Aktivität von Effektoren und wirkt damit stimuliernd oder inhibierend auf zelluläre Prozesse. Durch Hydrolyse des GTPs zu GDP wird das G-Protein in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand überführt.^[28] Weitere am Zyklus beteiligte Proteine sind die *GTPase activating proteins* (GAPs)^[29,30], die *GDP dissociation inhibitors* (GDIs), die den Austausch von GDP gegen GTP verhindern^[31,32], und die *guanodin nucleotide exchange factors* (GEFs), die die Freigabe von GDP oder GTP stimulieren.^[33,34] Die besondere Wichtigkeit dieser molekularen Schalter zeigt sich in der Tatsache, dass Fehlregulationen der G-Proteine mit schwerwiegenden Folgen verbunden sind. In Krebszellen findet man dauerhaft angeschaltete Ras-Proteine, die unfähig sind GTP zu hydrolysieren, und somit zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen.^[35]

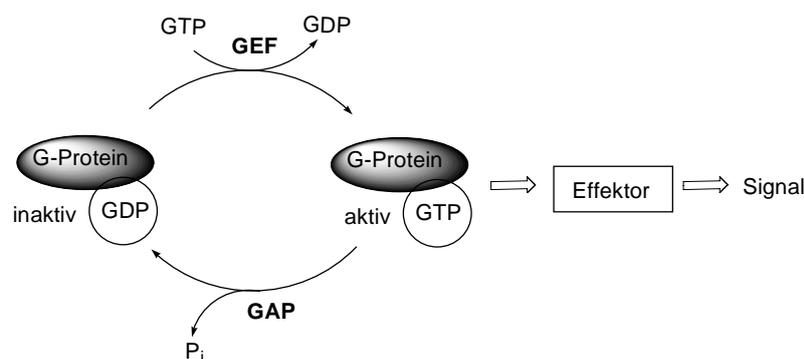


Abbildung 3: G-Proteine als molekulare Schalter.

2.2. Rab/Ypt-Proteine - Regulatoren des zellulären Vesikeltransportes

2.2.1. Vorkommen der Rab/Ypt-Proteine

Rab-Proteine bzw. Ypt-Proteine (Hefeanaloga der menschlichen Rab-Proteine) spielen bei fast allen vesikulären Transportprozessen in eukaryotischen Zellen eine entscheidende Rolle.^[36] Sie gehören zur Superfamilie der Ras-Guanosintriphosphat-Phosphatasen (GTPases) und bilden die größte Untergruppe mit mehr als 60 Mitgliedern bei Säugern und 11 Mitgliedern in Hefe.^[3] Während die meisten Rab-Proteine in allen Zellen vorkommen, sind einige Rab-Proteine Zelltyp- oder Gewebe-spezifisch lokalisiert. Bisher wurden fünf spezifische Sequenzen (RabF Motive) und vier spezifische Regionen (RabSF) definiert, und somit weitere Mitglieder der Familie der Rab-Proteine identifiziert.^[37] Viele Proteine dieser Familie sind in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen und endocytotischen Signalweges lokalisiert. Rab/Ypt-Proteine kontrollieren dabei als zentrale Schalter die Zielsteuerung der Vesikel, die Membrananlagerung und die anschließende Membranfusion des Transportvesikels mit der Akzeptormembran. Tabelle 1 zeigt das Vorkommen von Rab/Ypt-Proteinen in unterschiedlichen endo- und exocytotischen Transportprozessen. Nicht jedem Rab/Ypt-Protein konnte bisher eine definierte Rolle zugewiesen werden.^[38,39]

Ypt	Rab	Transportprozess
		Exocytose
Ypt1	Rab1, Rab2 Rab1b Rab6, Rab6b	ER – Golgi Cis-Golgi – medial-Golgi Golgi – ER
Ypt1 Ypt31, Ypt32, Sec4	Rab1, Rab6, Rab6b Rab11a, b	Intra-Golgi TGN – PM
		Endocytose
Ypt51/Vps21, Ypt52, Ypt53 Ypt6	Rab7 Rab9, Rab11a, b Rab5a, b, c	EE – LE; LE – TGN PM – EE TGN – LE
Ypt51/Vps21, Ypt52, Ypt53 Ypt7	Rab7 Rab4, Rab15, Rab18 Rab3a, b, c, d	LE – Vakuole/Lysosom EE – PM Fusion synapt. Vesikel mit der PM

EE = Frühes Endosom; ER = Endoplasmatisches Retikulum; LE = Spätes Endosom; PM = Plasmamembran; TGN = Trans-Golgi-Netzwerk.

Tabelle 3: Beispiele von Rab/Ypt-Proteinen in Transportereignissen.

2.2.2. Der vesikuläre Transportprozess in der Zelle

Während ihres Transportes zwischen Donor- und Akzeptormembran durchlaufen die Rab/Ypt-Proteine einen Zyklus zwischen einer aktivierten, GTP-gebundenen und membranverankerten Form und einer cytosolischen nach GTP-Hydrolyse inaktiven, an spezifische Proteine der GDI-Genfamilie gebundenen Form.^[33,40,41] Der Wechsel von der aktiven in die inaktive Form ist mit einer drastischen Änderung der dreidimensionalen Struktur des Rab-Proteins verbunden. Diese Eigenschaft stellt neben dem GTP/GDP-Zyklus eine weitere Gemeinsamkeit mit den Eigenschaften anderer Mitglieder des Ras-Familie dar.^[42,43]

Eine wichtige Rolle innerhalb des Rab/Ypt-Zyklus spielen der *GDP dissociation inhibitor* (GDI) und der *GDI dissociations factor* (GDF). Prenylierte Rab-Proteine werden zwischen der intrazellulären Membran und dem Cytosol vom GDI ausschließlich in der GDP-gebundenen Form transportiert, wobei GDI den Austausch des GDP für GTP verhindert (Abbildung 4).^[40,41] GDI transportiert Rab zurück zur Donormembran und ist somit für die Zurückgewinnung der Rab-Proteine verantwortlich.^[33,42] Bisher ist noch unklar, ob alle bekannten GDI-Proteine die gleichen Funktionen in Säugetier-Zellen besitzen.^[44] Angesichts der zentralen Rolle der RabGTPasen und ihrer Interaktionspartner einschließlich REP (*Rab escort protein*) und GDI in der zellulären Biogenese ist es nicht überraschend, dass der Verlust oder die Beeinträchtigung ihrer Funktion zu Erkrankungen führen^[45] wie z.B. zu Choroideremia, einer genetischen Erkrankung, die von Netzhautdegeneration bis hin zu einer vollständigen Erblindung führt.^[46]

Entsprechend einem momentan geltenden Modell wird GDI im Rab-GDI Komplex durch GDF ersetzt und das Rab-Protein anschließend zum gewünschten zellulären Kompartiment eskortiert. Für die endosomalen Rab-Proteine, Rab5, Rab7 und Rab9, wurde ein solcher GDI-Dissoziations-Faktor identifiziert.^[47] Genaue Details der Mechanismen der spezifischen Lokalisierung der Rab-Proteine zu den unterschiedlichen Zielmembranen sind jedoch nicht bekannt, obgleich allgemein angenommen wird, dass der hypervariable C-Terminus der Rab-Proteine entscheidend beteiligt ist. Auf der Oberfläche sich abschnürender Vesikel sind neben den Rab-Proteinen Hüllproteine lokalisiert. Im GTP-gebundenen Zustand binden die Rab-Proteine vermutlich an Motorproteine: z.B. bindet Rab6 an Rabkinesin-6^[48] oder an andere Elemente des Cytoskletts, entlang dessen der Vesikel transportiert wird. Weitere regulatorische Proteine innerhalb des Rab-Zyklus sind die *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs)^[47], die beim Nukleotidaustausch eine große Rolle spielen, sowie die *GTPase activating proteins* (GAPs)^[49], die entscheidend für die GTP Hydrolyse sind. Der

Mechanismus des Nukleotidaustauschs ist sehr komplex, da GEFs Bestandteile großer Proteinkomplexe sind und in einigen Fällen in einem Komplex mit Effektor-Proteinen vorliegen.^[50,51] Derzeit bestehen unterschiedliche Modelle für die Rolle der GEF/Effektor Komplexe hinsichtlich ihrer Funktion der Überführung von Rab-Proteinen in den GTP-gebundenen aktiven Zustand.^[52] Die am Rab-Zyklus beteiligten Effektor-Proteine üben direkt oder durch das Binden weiterer Proteine verschiedene Funktionen aus. Zum Einen erhalten sie die Rab/Ypt-Proteine in der aktiven Form,^[53,54] zum Anderen binden sie an große Proteinkomplexe, die als Markierungen auf der Zielmembran liegen.^[55,56] Zusätzlich dienen sie als so genannte Anheftungsfaktoren (tether), über die ein Vesikel erstmals mit der Zielmembran über eine größere Distanz in Verbindung tritt (Abbildung 4).^[57,58] Außerdem nimmt man an, dass die Rab/Ypt-Effektoren ebenfalls die Paarung der komplementären SNARE-Proteine (SNAP receptors; SNAP = soluble NSF attachment proteins; NSF = N-ethyl-maleimide-sensitive factor) beeinflusst.^[53] Zahlreiche Studien zeigen, dass Rab/Ypt-Proteine sowohl beim Transport als auch bei der Zielsteuerung der Vesikel zur Zielmembran eine große Rolle spielen. Allerdings gibt es nur sehr wenige Beweise, dass Rab/Ypt-Proteine bei der Vesikelbildung beteiligt sind.^[59]

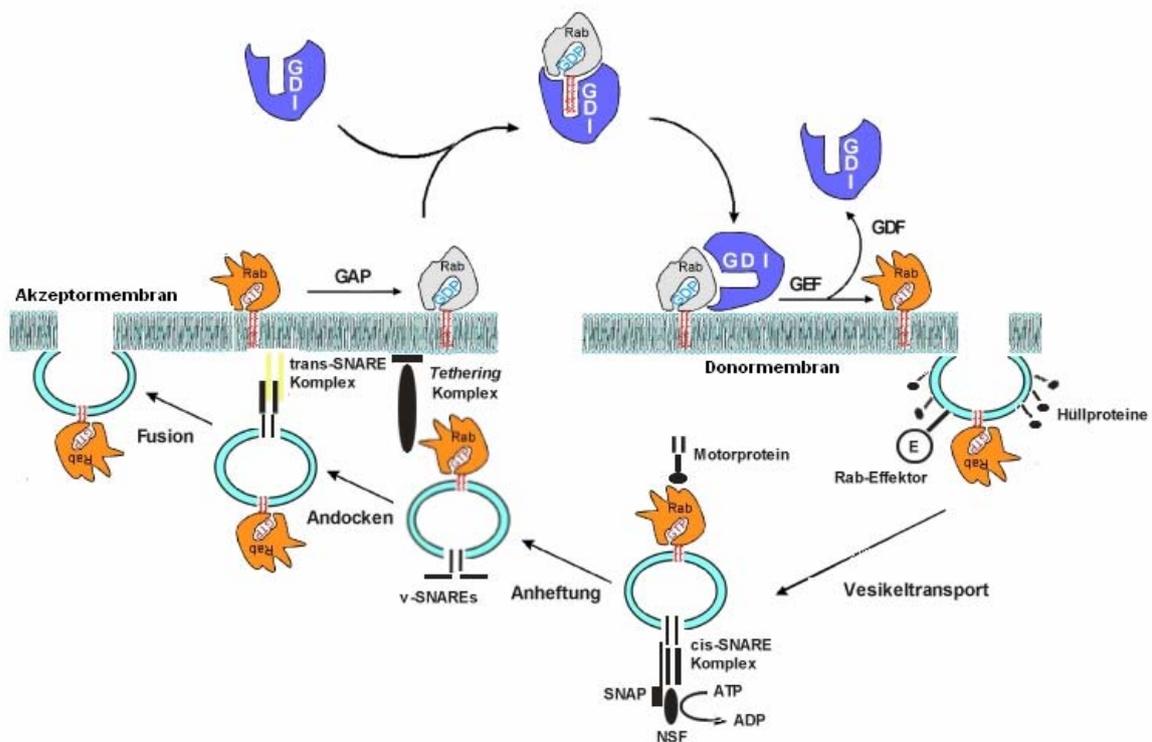


Abbildung 4: Rab-Zyklus und vesikulärer Transport zwischen der Donor- und Akzeptor-membran: Rab durchläuft einen Zyklus zwischen einer aktiven GTP-gebundenen (orange) und einer inaktiven GDP-gebundenen (grau) Form; GDI (blau) bindet Rab im GDP-gebundenen Zustand; GAP und GEF regulieren den Nukleotidaustausch; SNAREs spielen eine große Rolle beim Anlagerungs- und Fusionsprozess.

Der abschließende Schritt des vesikulären Transportes, die Fusion der Vesikel mit der Akzeptormembran, wird den SNAREs zugewiesen, die zur Familie der Membranproteine gehören. Für den Fusionsprozess ist die Erkennung der vesikulären v-SNAREs (SNAREs, die auf Vesikel liegen) und t-SNAREs (SNAREs, die auf der Ziellmembran liegen) wesentlich. Im Anfangsstadium wird der vesikuläre cis-SNARE-Komplex durch die ATPase NSF und dessen Cochaperon α -SNAP (soluble NSF attachment protein) aktiviert, was zur Ausbildung des trans-SNAREs-Komplexes führt.^[60] Bevor jedoch die finale Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran stattfinden kann, kommt es zu einer schwachen Wechselwirkung zwischen dem trans-SNARE-Komplex und dem so genannten Anheftungs (*Tethering*)-Komplex, der wiederum durch Rab-Proteine kontrolliert wird. Die Kompartimentspezifität der beiden komplementären SNAREs lässt vermuten, dass diese für die Zielsteuerung der Vesikel verantwortlich sind.^[61,62] Obwohl die verschiedenen v- und t-SNAREs auf spezifischen Zellkompartimenten gefunden werden, geht man davon aus, dass sie zwar eine wichtige Rolle in der Membranfunktion spielen, für die Zielsteuerung und Anheftung der Vesikel aber die Rab-GTPasen verantwortlich sind.^[53] Die Komplementarität der v- und t-SNAREs ist die Voraussetzung für das anschließende Andocken des Vesikels. Der extrem stabile Komplex aus komplementären v- und t-SNAREs, der aus einem Bündel von verknäulten Helices besteht, bringt den Vesikel in die Nähe des Zielkompartiments, so dass die Membranen entgegen der elektrostatischen Abstoßung miteinander verschmelzen.^[63] Die Wechselwirkung mit NSF und α -SNAP löst anschließend den Komplex und reaktiviert die SNARE-Proteine.^[64] Erst dann hydrolysieren die Rab/Ypt-Proteine ihr gebundenes GTP und gehen so in den inaktiven Zustand über.

2.2.3. Posttranslationale Lipidmodifizierung der Rab/Ypt-Proteine

Die posttranslationale Lipidmodifizierung der Rab/Ypt-Proteine ist die strukturelle Voraussetzung für die Membraninsertion und die damit verbundene Funktionsfähigkeit.^[65-67] Die GGTase-II ist ein Heterodimer mit einem Molekulargewicht von 100 kDa, das aus einer α - und β -Untereinheit besteht, und für dessen Aktivität ein Zn- und Mg-Ion notwendig ist.^[68,69] Die unprenylierten Rab/Ypt-Proteine bilden mit dem REP einen binären Komplex, der von der RabGGTase erkannt wird.^[46,68,70-73] Nach Ausbildung des ternären Komplexes findet die konsekutive Übertragung der Geranylgeranylgruppen auf das Rab-Protein statt, wobei das einfach prenylierte Intermediat stark am Enzym gebunden ist.^[74,75] Nach der Übertragung des zweiten Geranylgeranylrestes zerfällt der ternäre Komplex und REP geleitet

das nun wasserunlösliche Rab-Protein durch das Cytosol zum jeweiligen Ziel-Kompartiment (Abbildung 5).^[7,76,77]

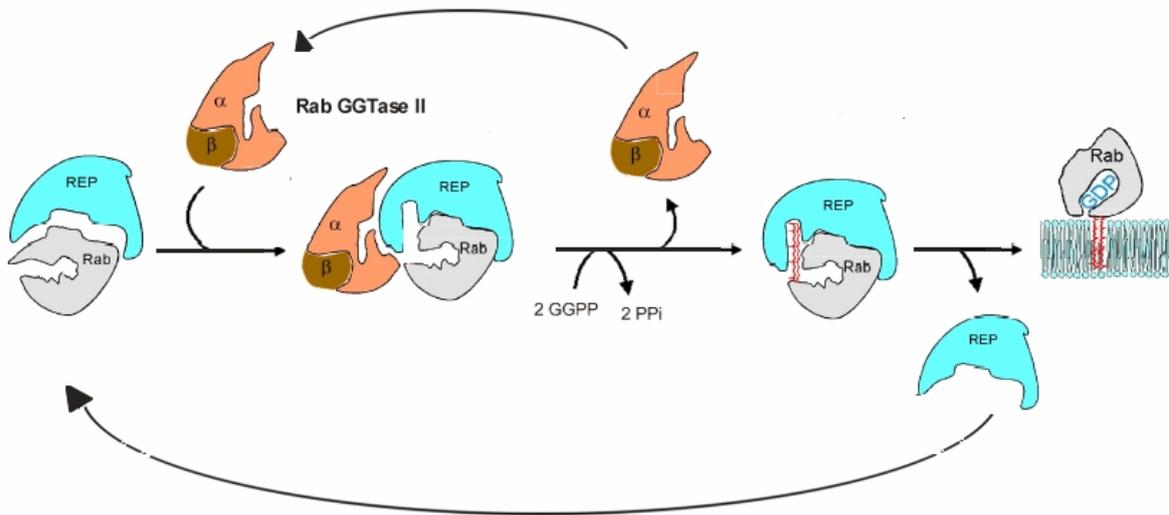


Abbildung 5: Prenylierung und Membranbindung von Rab-Proteinen.

In einem alternativen Modell wird beschrieben, dass REP in der Gegenwart von Geranylgeranylpyrophosphat an die GGTase-II bindet und dieser binäre Komplex anschließend das neusynthetisierte Rab-Protein bindet.^[78] Sicher ist jedoch, dass der Rab/REP-Komplex über REP von der GGTase-II erkannt wird.^[73] Die GGTase-II unterscheidet sich von der FTase und der GGTase-I in zwei wichtigen Punkten. Zum Einen sind keine kurzen Peptide trotz geeignetem C-terminalen Motiv Substrate der GGTase-II, sondern nur mit REP komplexierte Proteine. Zum Anderen katalysiert sie den Transfer zweier Prenylgruppen, deren Prozessierung noch nicht im Detail geklärt ist.^[69-79] Umstritten ist die Frage, ob eine doppelte Prenylierung der Rab-Proteine für ihre korrekte Lokalisierung notwendig ist. Einfach pränylierte Rab-Proteine erwiesen sich als nicht funktional^[80,81], während von Overmeyer *et al.* eine korrekte zielgesteuerte Membranassoziation von einfach pränylierten Rab1-Proteinen berichtet wurde.^[82]

Interessanterweise weisen REP und RabGDI starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf.^[83,70] Beide Proteine binden vorzugsweise pränyliertes Rab im GDP-gebundenen Zustand, inhibieren den GDP-Austausch und geleiten das Rab-Protein zur Zielmembran. Dennoch kann GDI aufgrund seiner geringen Affinität zu pränyliertem Rab nicht REP ersetzen, während REP nicht die Aufgaben von GDI übernehmen kann, wie in Hefezellen gezeigt werden konnte.^[84,85]

2.3. Strukturen der Rab/Ypt-Proteine

2.3.1. Strukturelle Charakteristika der Rab/Ypt-Proteine

Die große Anzahl der Rab-Proteine und der auf Rab einwirkenden Proteine reflektieren die Komplexität der intrazellulären Rab-kontrollierten Prozesse.^[38] In Bezug auf die Rab-Proteine und deren unterschiedlichen Effektor- und Regulator-Proteinen gibt es in Hinblick auf Funktionsweise, Lokalisierung und Spezifizierung noch viele offene Fragen.

Zur Aufklärung des Mechanismus des vesikulären Transportes in den Zellen auf molekularem Niveau ist eine genaue Kenntnis über den strukturellen Aufbau der Rab/Ypt-Proteine und der auf sie einwirkenden Proteine in hohem Maße erforderlich. Rab GTPasen enthalten Motive, die aus konservierten Sequenzen bestehen und für entscheidende Prozesse, wie die Bindung von GTP/GDP, die Erkennung von Effektor-Proteinen und die zelluläre Lokalisierung verantwortlich sind. Zu diesen konservierten Motiven gehören unter anderen das so genannte PM-Motiv, das an der Bindung des Phosphat- bzw. Magnesiumions beteiligt ist, und das G-Motiv, das für die Bindung des Nucleotids verantwortlich ist (Abbildung 6).^[86] Proteine der Rab-Familie weisen ähnliche Strukturen auf, die ebenfalls der Gesamtstruktur der Ras-Proteine ähneln. Sie bestehen im allgemeinen aus einem von fünf α -Helices umgebenen sechs-strängigem β -Faltblatt.^[87,88] Die Konformationsänderung, die mit der Hydrolyse von GTP zu GDP verbunden ist, wurde zuerst für Ras-Proteine beschrieben^[89,90] und für Rab-Proteine bestätigt.^[91-93] Die Konformationsänderung beruht hauptsächlich auf den konformativen Änderungen der flexiblen Switch I- und Switch II-Regionen, die zusammen mit der P-Schleife die β,γ -Phosphat/Magnesiumion-Bindungstasche bilden (Abbildung 6).

Abbildung 6: Strukturelle Charakteristika der Rab-Proteine; Rab3 im GTP-gebundenen Zustand (zwei verschiedene Ansichten): GppNHp (orange), Switch I- (gelb), Switch II- (blau) Region und P-Schleife; Lokalisierung der PM- und G-Motive (grün), RabF-Motive (rot) und RabSF-Motive (blau).

Während der zahlreichen intrazellulären Prozesse, an denen Rab-Proteine beteiligt sind, interagieren die Rab/Ypt-Proteine mit verschiedenen Effektor- und Regulator-Proteinen. Damit es zwischen ihnen zu einer Interaktion kommen kann, müssen diese wiederum den Nukleotid-gebundenen Zustand der Rab-Proteine erkennen. Da die Konformation der Switch I-Region von der Art des gebundenen Nukleotids abhängig ist, nimmt man an, dass die mit Rab interagierenden Proteine mit der Switch I-Region (auch Effektor-Region genannt) in Wechselwirkung treten. Dies wurde an verschiedenen Beispielen durch genetische Studien gezeigt.^[94-95] Weitere Sequenzanalysen zeigen, dass alle Rab-Proteine fünf Motive der Rab-Familie (RabF1-5) und vier Motive der Rab-Unterfamilie (RabSF1-4) in der näheren Umgebung zur Switch I- und Switch II-Region aufweisen, die in hohem Maße konserviert sind.^[29,30] Die fünf konservierten RabF-Motive werden vorwiegend von Rab-Regulator-Proteinen wie GDI und REP erkannt, während spezifische Interaktionen mit Rab-Proteinen zusätzlich RabSF-Regionen erfordern.

Ein weiteres wichtiges, strukturelles Charakteristikum der Rab/Ypt-Proteine ist die von Chavier *et al.* identifizierte hypervariable Region, die etwa 30 Aminosäuren des C-Terminus umfasst, und die für die korrekte subzelluläre Lokalisation der Rab-Proteine verantwortlich ist.^[96,97]

2.3.2. Strukturelle Eigenschaften der Rab:Effektor/Regulator-Komplexe

Für das Verstehen der Funktionsweise der Rab-Proteine ist die Aufklärung der Proteinstruktur notwendig. Bisher wurden die Strukturen von Rab3A, Rab6, ^[98] Ypt51, Sec4, Ypt7^[92] und Rab7^[99] aufgeklärt. Für die Interaktionen der Rab-Proteine mit ihren zahlreichen Regulator- und Effektor-Proteinen sind die strukturellen Eigenschaften der Proteinkomplexe von großer Bedeutung. Die Struktur des Komplexes aus Rab3A und seinem Effektor-Protein Rabphilin-3A ist die erste Rab:Effektor-Struktur, die aufgeklärt werden konnte.^[100] Das aktivierte Rab3A-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Neurotransmitterfreigabe und der reversiblen Rekrutierung des Rabphilin-3A zu den synaptischen Vesikeln. Die Struktur des Rab3A:Rabphilin-3A-Proteinkomplexes offenbarte die grundlegende Besonderheit, dass nahezu alle Rab-Proteine ihre Effektor- bzw. Regulator-Proteine auf eine ähnliche Weise binden. Die Kristallstruktur des Komplexes im aktiven Zustand zeigt, dass Rabphilin-3A mit Rab3A in zwei eindeutigen Bereichen in Verbindung tritt: erstens in den bereits erwähnten Switch I- und Switch II-Regionen und zweitens in der *Rab complementary-determining region* (RabCDR). Die Tatsache, dass sich die Sequenzen der RabCDR-Regionen verschiedener Rab-Proteine stark unterscheiden, unterstreicht die hohe Spezifität der Rab/Effector Interaktionen. Auch die Struktur des Komplexes von Rab5 mit seinem Effektor-Protein Rabaptin-5 konnte kürzlich aufgeklärt werden.^[101] Die Strukturen der mit Ypt/Rab interagierenden Proteine, wie GDI^[28], Rab Geranylgeranyl-Transferase (RabGGTase)^[69], REP-1^[102] und GAP, die katalytische Domäne von Gyp1p^[103] sind bereits gelöst worden. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Komplexes zwischen RabGGTase und REP-1^[104] und des ternären Komplexes von monoprenyliertem Rab7:REP-1:RabGGTase^[105] tragen dabei zu einem besseren Verständnis der Interaktion von RabGGTase mit REP, Rab7 und dem Lipid Substrat bei.^[106] Außerdem ist die Struktur des monoprenylierten Rab7:REP-1 Komplexes gelöst worden.^[107] Die Struktur enthält wichtige Informationen über die Art und Weise, wie prenyliertes Rab7-Protein mit REP in Wechselwirkung tritt. Rab7 tritt mit der *Rab binding platform* von REP-1 in Verbindung. Bei der Komplexbildung gehen die Switch I- und Switch II-Regionen in einen geordneten Zustand über, im Gegensatz zu ihrem ungeordneten Zustand, der vorliegt, wenn Rab im GDP-gebundenen Zustand ohne Wechselwirkung mit anderen Proteinen ist (Abbildung 7). Ein hydrophober Bereich auf der Oberfläche des REP-1 koordiniert den C-Terminus des Rab-Proteins.

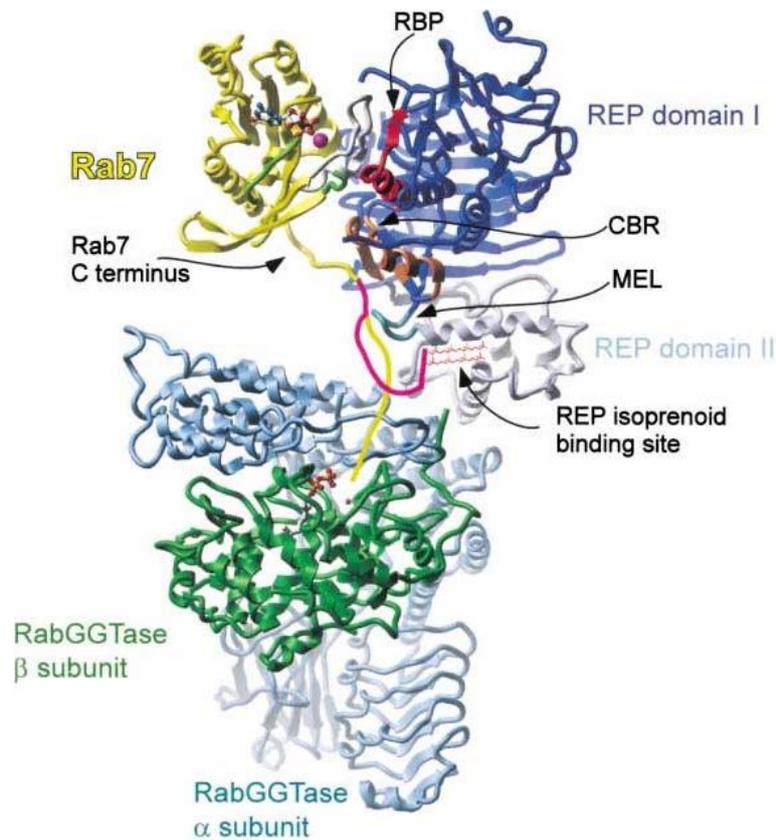


Abbildung 7: Struktur des ternären Komplexes von monoprenyliertem Rab7:REP-1:RabGGTase; Rab7 (gelb) tritt mit der *Rab binding platform* (RBP, rot) der Domäne I von REP-1 (dunkel blau) in Verbindung.

Ogleich alle Mitglieder der Familie der RabGTPasen geranylgeranyliert sein müssen, um ihre biologische Rolle zu erfüllen, waren die Strukturen der prenylierten Rab-Proteine bis vor kurzem nicht bekannt. Dies spiegelt die Komplexität des Prenylierungsmechanismus der Rab-Proteine und die technischen Probleme wieder, die mit der Herstellung der prenylierten Rab-Proteine verbunden sind. Die meisten Methoden zur Herstellung von posttranslational modifizierten Proteinen weisen geringe Ausbeuten und vor allem Inflexibilität in Bezug auf die Lipidmodifikationen auf. Um die Mechanismen der Prenylierung der Rab-Proteine auf molekularer Ebene zu verstehen, sind leistungsfähige Methoden notwendig, die es ermöglichen größere Mengen an prenylierten Rab-Proteinen zu erzeugen, die für ihre Kristallisation notwendig sind.

2.4. Semisynthese modifizierter Proteine

2.4.1. Ligationsmethoden von Peptiden und Proteinen

Der Fortschritt im Bereich der Proteinligationsmethoden ermöglicht ein breites Spektrum an Herstellungsmöglichkeiten von posttranslational modifizierten Proteinen auf semi-synthetischem Weg.^[108-112] Die Kombination der organischen Synthese und der *in vitro* Proteinligation ermöglicht den Zugang zu modifizierten Proteinen, die im Allgemeinen nicht leicht über andere z.B. enzymatische Prozesse zugänglich sind.^[36,45,113-116]

Mit Hilfe der Festphasensynthese können Polypeptide mit einer maximalen Größe von 100 Aminosäuren hergestellt werden, womit sich eine reine chemische Synthese nicht zur Herstellung häufig größerer Proteine eignet. Das große Ziel von Emil Fischer Ende des 19ten Jahrhunderts, die Totalsynthese eines Enzyms, konnte erst ein halbes Jahrhundert später realisiert werden. Die großen Fortschritte in der chemischen Synthese von Peptiden und kleinen Proteinen und vor allem in der Festphasensynthese von Peptiden^[117] führten schließlich zur Synthese des ersten Enzyms, der Ribonuclease S.^[118,119]

Die von Wieland *et al.* entwickelte Thiol-Thioester-Austausch Reaktion^[120] und die Realisierung der Bildung eines Thioesters an der Festphase durch Blake^[121] und Yamashiro^[122] legten die Grundsteine der *Native Chemical Ligation* (NCL), die von Kent *et al.* entwickelt wurde.^[123] Die NCL ist die erste Ligationmethode, die ohne Schutzgruppen auskommt und die Synthese von Proteinen mit einem durchgängigen, nativen Peptidrückgrat über die Verknüpfung von synthetischen Polypeptidsegmenten ermöglicht. Frühe entwickelte Ligationmethoden führen über die chemoselektive Reaktion zweier funktioneller Gruppen am N- bzw. C-Terminus der Peptidfragmente zur Ausbildung einer nichtamidischen Bindung (Abbildung 8). Es gibt eine Vielzahl verschiedener Ligationmethoden, die sich in Imin- und Thioesterligationen gliedern lassen.^[124] Die *Native Chemical Ligation* findet, basierend auf dem Thioester-Abfang nach Kemp *et al.*^[125], in zwei Schritten statt. Dabei kommt es zwischen dem Cystein und dem Thioester zu einem Thiol-Thioesteraustausch, der nach spontanem S-N Acylshift zu einer amidischen Bindung führt.

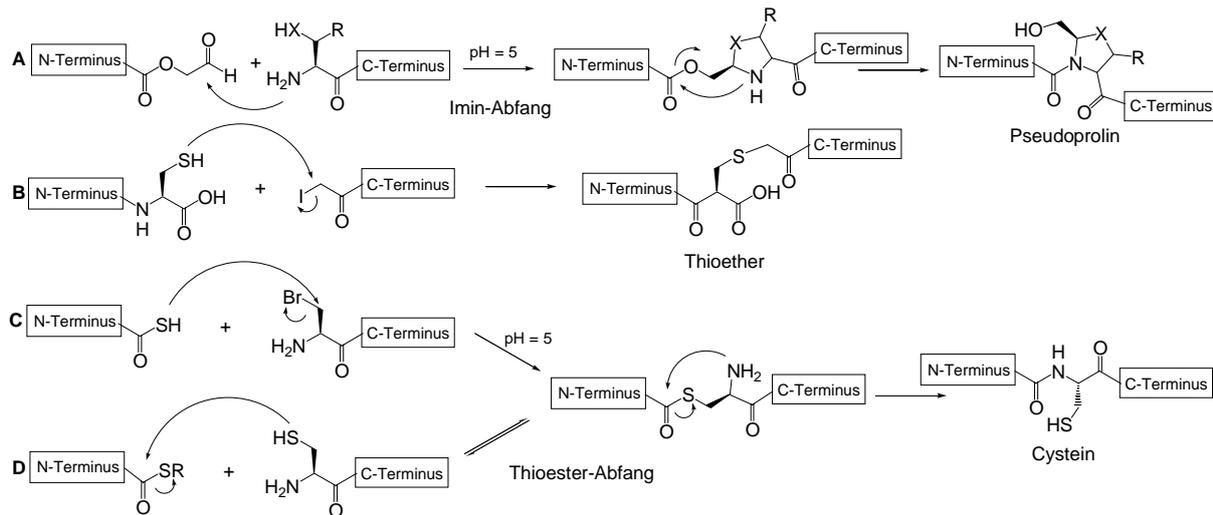


Abbildung 8: Methoden zur Herstellung verschiedener Polypeptid-Konjugate: nichtamidische Ligation (A, B), amidische Ligation (C, D).

2.4.2. Die Expressed Protein Ligation (EPL)

Durch Fortschritte in der Proteinmanipulation können beide reaktiven Gruppen der NCL auch in rekombinante Proteine eingebaut werden, womit eine Verknüpfung aus synthetischen und rekombinanten Bausteinen über eine native Peptidbindung in einem semisynthetischen Prozess möglich geworden ist.

Die *Expressed Protein Ligation* ist eine von Chong *et al.* entwickelte, breit anwendbare *in vitro*-Methode zur chemoselektiven Addition von Peptiden an rekombinante Proteine.^[126] Sie ermöglicht die gezielte Einführung von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine. Diese Methode der Protein-Ligation beruht auf der Fähigkeit bestimmter Proteindomänen (Intein) beim Prozess des Proteinspleißens Thioester zu bilden.^[127,128] Das Proteinspleißen ist ein autokatalysierter Prozess, der dem RNA-Spleißen auf Proteinebene entspricht, aber weder Cofaktoren noch andere Enzyme erfordert.^[129] Beim Spleißen werden interne Polypeptidsequenzen (Inteine) posttranslational aus einer Proteinvorstufe durch eine autokatalysierte Reaktion entfernt. Inteine katalysieren das Spleißen und lösen ohne exogene Cofaktoren die Spaltung der Peptidbindung an den intramolekularen N- und C-terminalen Spleißstellen aus.^[130,131] Gleichzeitig katalysieren sie die Bildung einer neuen Peptidbindung zwischen den flankierenden Polypeptiden, den Exteinen (Abbildung 9). Es wurden bisher über 100 verschiedene Inteine identifiziert, die zusammen mit der ersten Extein-Aminosäure an der C-terminalen Spleißstelle alle notwendigen Informationen für den Spleißvorgang enthalten.^[130,131-136]

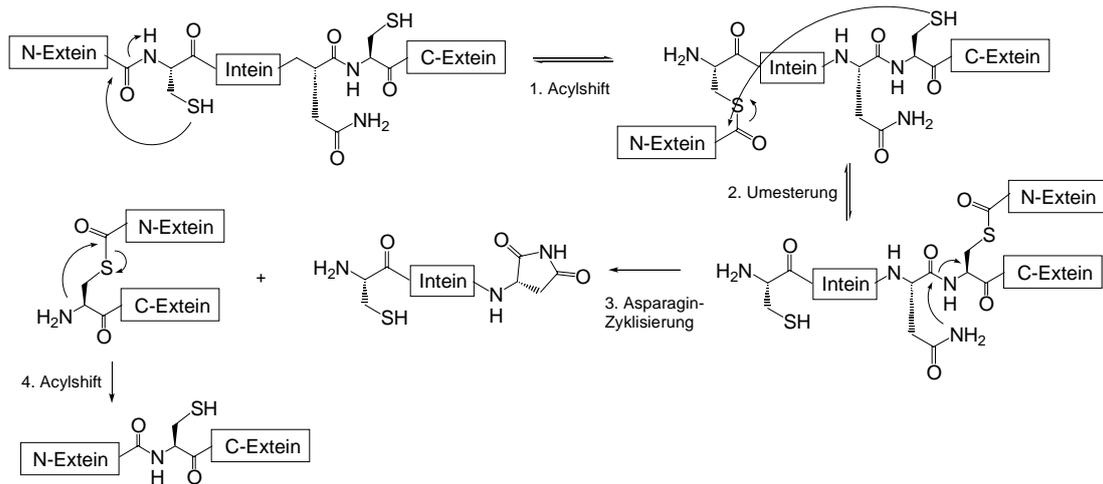


Abbildung 9: Mechanismus des Proteinspleißens.

Das Proteinspleißen verläuft im Wesentlichen in vier Schritten ab:

- (1) *N,O* bzw. *N,S*-Acylshift: Das Proteinspleißen wird durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxy- bzw. Thiolgruppe der N-terminalen Aminosäure des Inteins (Ser, Thr oder Cys) auf die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des N-Exteins eingeleitet.
- (2) Umesterung: Die Thioesterbindung kann nun nucleophil von der Seitengruppe der N-terminalen Aminosäure des C-Exteins (Ser, Thr oder Cys) angegriffen werden, wodurch das N-Extein auf die C-terminale Spleißstelle übertragen wird.
- (3) Asparagin-Zyklisierung: Die Amidbindung am C-Terminus des Inteins wird durch die Zyklisierung seines C-terminalen Asparagins unter Freisetzung des Inteins gespalten.
- (4) *O,N*- bzw. *S,N*-Acylshift: Das Ligationsprodukt aus N- und C-Extein lagert sich zum entsprechenden stabilen Amid um.

Für den Vorgang des Proteinspleißens ist neben der Intein-Domäne die erste benachbarte Aminosäure der N-Extein-Sequenz notwendig. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bestimmte N-Extein-Reste den Spleißvorgang hemmen oder sogar blockieren können.^[132,134,137-139]

Die Firma New England Biolabs entwickelte mit Hilfe derartiger Inteine kommerziell erhältliche Systeme (z.B. IMPACTTM) für die Einführung der funktionellen Gruppen (Abbildung 8).^[140,141] Diese Intein-generierten Thioester bilden einen effizienten Zugang zu Proteinligationsreaktionen, mit dessen Hilfe synthetische Peptide an den C-Terminus des rekombinanten Proteins gebunden werden können.^[142] Grundprinzip ist die bakterielle Expression der Proteine als Fusionsprotein mit dem jeweilig einseitig spleißenden Intein und einer Chitin-bindenden Domäne. Bei dem Proteinligationssystem ist das gewünschte Protein

über den C-Terminus an ein Intein-Protein gebunden, das wiederum C-terminal an eine Chitin-Bindungsdomäne geknüpft ist (Abbildung 10). Dieses Fusionsproteinsystem, das für jedes beliebige Protein in Bakterien exprimiert werden kann, wird anschließend an ein Chitin-Harz gebunden. Das gebundene Protein kann dann durch Zugabe eines Thiolreagenzes unter Bildung eines Thioesters isoliert werden. Nach der Isolierung des gewünschten Proteinfragments mit einem C-terminalen Thioester kann dieses schließlich mit einem synthetisierten Peptid oder mit anderen Proteinen in der *Native Chemical Ligation* zu semisynthetischen Proteinen umgesetzt werden. Bei der Addition findet zuerst der Thiol-Thioesteraustausch statt, der durch anschließenden S-N Acylshift in eine native Peptidbindung überführt wird.^[143,144]

Seit ihrer Einführung wurde die EPL für die Synthese zahlreicher semisynthetischer Proteine angewendet.^[145] Im allgemeinen ist die Semisynthese von Proteinen mit gewünschten Modifikationen wie Fluoreszenzmarkern, Isotopen oder unnatürlichen Aminosäuren in den ersten 50 Aminosäuren des C- bzw. N-Terminus über die EPL möglich. Des Weiteren konnten mit Hilfe der EPL semisynthetische Proteine aus drei oder mehreren Fragmenten zusammengesetzt werden, so dass die Möglichkeit, ein Protein innerhalb der gesamten Proteinsequenz an definierter Stelle zu modifizieren, gegeben ist.^[146,147]

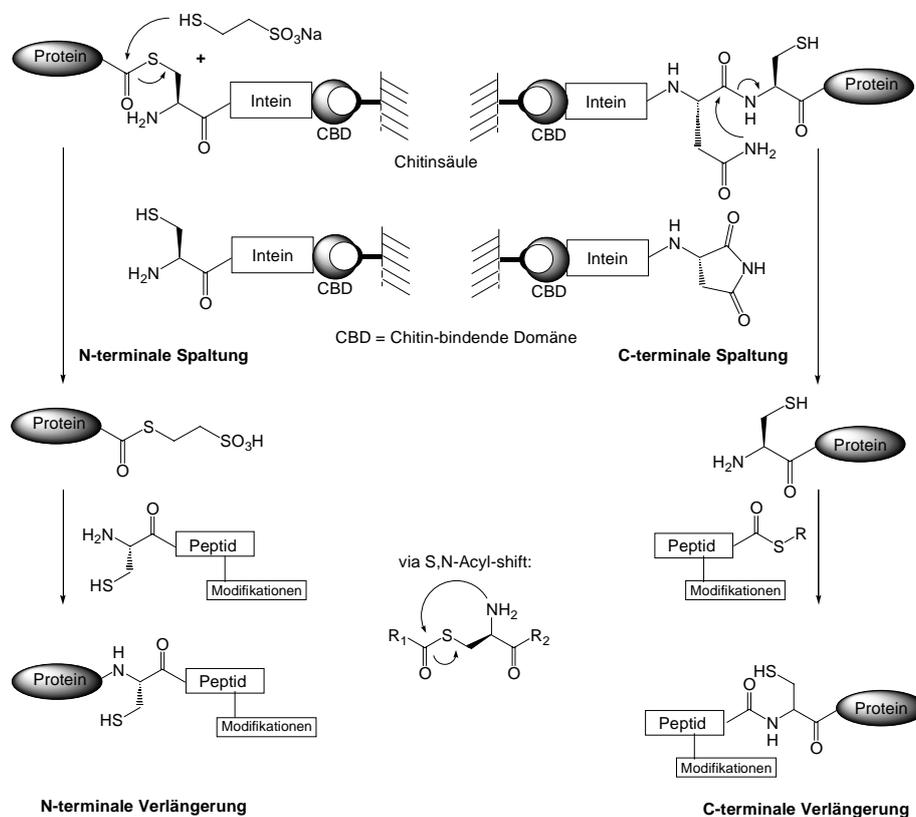


Abbildung 10: Semisynthese modifizierter Proteine.

Der einzige Nachteil der *Native Chemical Ligation* ist die Notwendigkeit eines Cysteinrestes oder eines homologen Restes an der Ligationsschnittstelle, so dass die native Aminosäuresequenz unverändert bleibt. Da Cysteine durch die Ausbildung von Disulfidbrücken die Proteinstruktur beeinflussen und auf unerwünschte Weise verändern können, wurden auch homologe Reste wie Homocystein^[148], Selenocystein^[149,150], Thiaprolin^[151] und Selenohomocystein^[152] bei der EPL eingesetzt. Weitere Erweiterungen der NCL führten zu abspaltbaren Auxiliargruppen, die zwar gute Ligationmethoden darstellen, jedoch für ihre Abspaltung oft harte Bedingungen benötigen (Abbildung 11, A).^[153-155]

Zur Vermeidung der Cystein-abhängigen Ligation wurde unter anderen die Staudinger Ligation als chemische Ligationmethode untersucht (Abbildung 11, B). Als Intermediat entsteht das Iminophosphoran, dessen nucleophiler Stickstoff die Amidbindung formt. Die Staudinger Ligation wurde jedoch bisher nur für die Synthese von kleinen Peptiden eingesetzt.^[156] Bei der *Expressed Enzymatic Ligation* (EEL) wird die EPL mit einer Protease vermittelten Ligrationsreaktion verbunden. Die Glu/Asp-spezifische Serin-Protease von *Staphylococcus aureus* (V8 Protease) katalysiert die Bildung der Amidbindung zwischen den zu ligierenden Fragmenten.^[157]

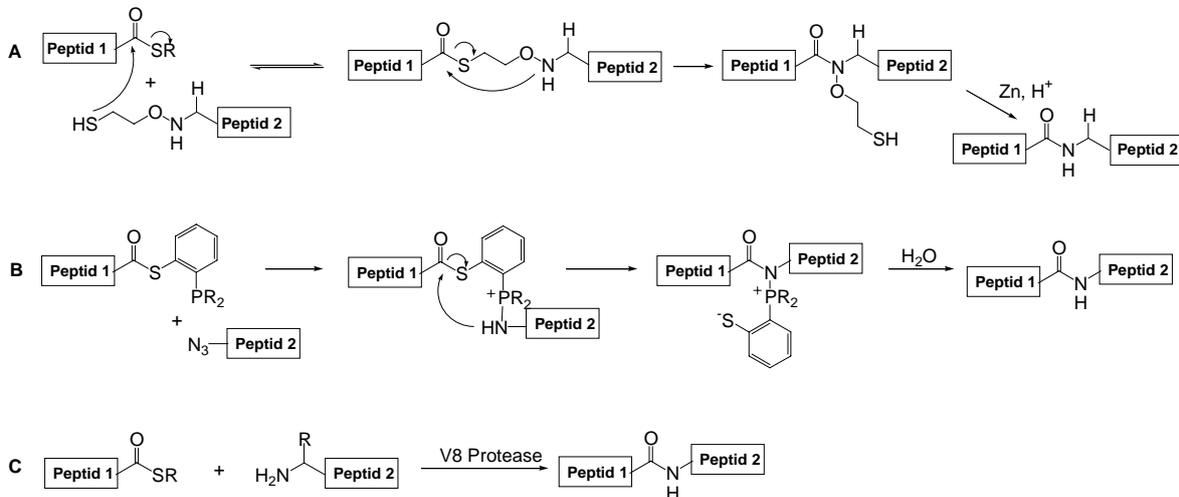


Abbildung 11: Alternative Ligationmethoden.

2.4.3. Synthese von lipidmodifizierten Proteinen

Die biologische Funktion eines Proteins ist nicht allein durch die Aminosäuresequenz, sondern oftmals erst durch die posttranslationalen Modifikationen bestimmt. Die Einführung posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glycosylierungen, Isopreny-

lierungen oder Acylierungen ist ein Charakteristikum eukaryotischer Organismen. Da in Prokaryonten, wie *E. coli.*, diese Form der Modifizierung selten auftritt, müssen rekombinante Proteine mit posttranslationalen Modifikationen in eukaryotischen Expressionssystemen expremiert werden.^[158] Diese Herstellungweise ist jedoch mit einem enormen Arbeitsaufwand für die Aufreinigung der empfindlichen Produkte, geringen Ausbeuten und sehr hohen Kosten verbunden. Der semisynthetische Ansatz bietet einen Ausweg zur Synthese von posttranslational modifizierten Proteinen. Zur Einführung künstlicher Lipopeptide in Proteine wurden bisher drei Möglichkeiten gefunden (Abbildung 12). Modifizierte Lipide können über eine *in vitro* Prenylierung von der entsprechenden Isoprenyltransferase katalysiert eingeführt werden. Sowohl Ras-^[159,160] als auch Rab-Proteine^[161,162] konnten *in vitro* mit artifiziellen Isoprenoiden modifiziert werden. Die ersten semisynthetischen lipidierten Proteine wurden über die Maleinimidocaproyl (MIC)-vermittelte Ligation unter Verwendung eines C-terminal auf Cystein endenden verkürzten H-Ras-Protein synthetisiert.^[163] Dabei wurde der C-terminale Teil des Proteins samt seiner Modifikationen zunächst über die organische Peptidsynthese aufgebaut. Der dritte Weg nutzt das Prinzip der *Expressed Protein Ligation*.

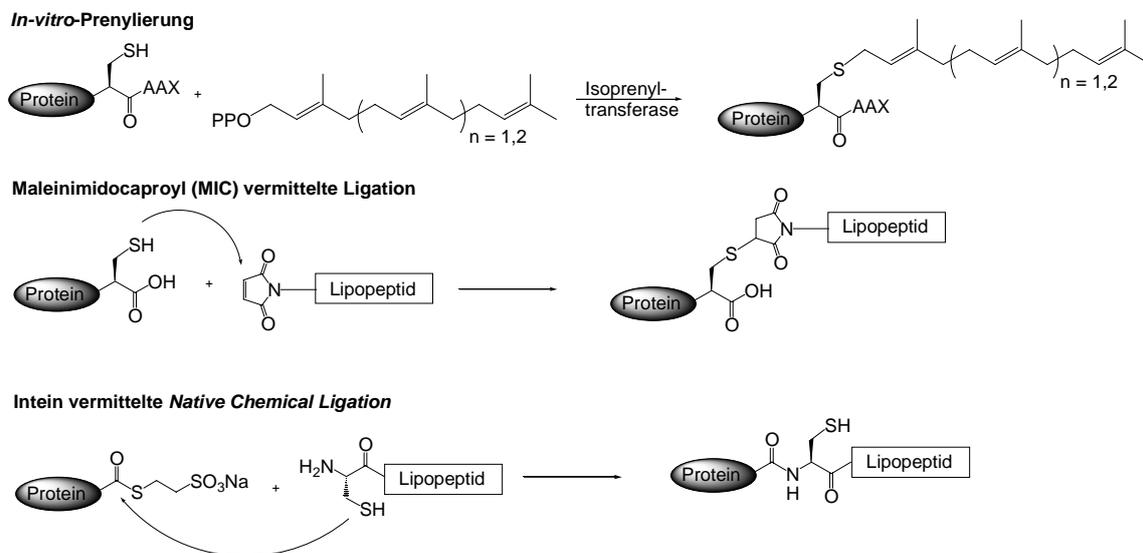


Abbildung 12: Strategien zur Synthese lipidiertes Peptid-Protein-Konjugate.

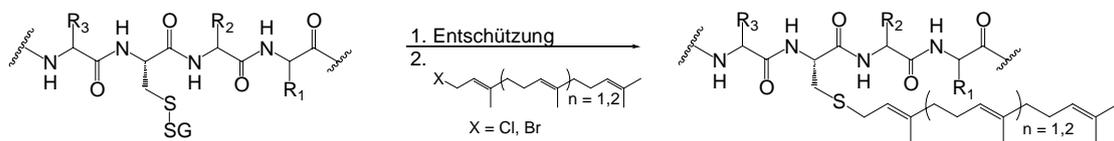
Der große Vorteil des semisynthetischen Ansatzes ist, dass auch nicht-native Modifikationen über das synthetisierte Peptid in das Protein eingebracht werden können, wie beispielsweise Fluoreszenzmarker^[163] oder Photoaffinitätsmarker^[164] und unnatürliche Aminosäuren.^[153,165] Die Kombination der strukturell flexiblen, aber größenlimitierten chemischen Peptidsynthese mit der rekombinanten DNA-Expression und die Verknüpfung zweier rekombinanter Proteine

ermöglichen ebenfalls die Darstellung von cytotoxischen^[166], cyclischen bzw. polymeren^[167] Proteinen.

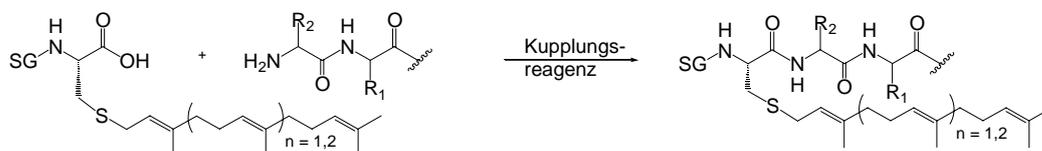
2.4.4. Strategien für die Lipopeptidsynthese

Die Strategien für die Synthese von lipidmodifizierten Peptiden hängt im Wesentlichen von der Peptidsequenz und der Anzahl der einzuführenden Prenylgruppen ab. Die Anzahl der Schutzgruppenstrategien reduziert sich zum Einen aufgrund der Säurelabilität des Prenylrestes, der schon unter schwach sauren Bedingungen zu Additions- und Umlagerungsreaktionen neigt.^[168,169] Zum Anderen muss die erhöhte Racemisierungsanfälligkeit von Cysteinen in der Festphasensynthese unter basischen Bedingungen berücksichtigt werden.^[170] Neben der bereits erwähnten enzymatischen Einführung der Prenylreste unter Verwendung der entsprechenden Prenylpyrophosphate und der FTase bzw. der GGTase-I lassen sich im Allgemeinen zwei unterschiedliche Synthesestrategien sowohl für die Festphasensynthese als auch für die Synthese von Lipopeptiden in Lösung unterscheiden. Die beiden Strategien unterscheiden sich dabei im Wesentlichen in der Einführung der Lipidreste in die Seitenkette des Peptids (Abbildung 13).

1. Prenylierung am vollständig synthetisiertem Peptid



2. Verwendung prenylierter Bausteine



SG = Schutzgruppe

Abbildung 13: Möglichkeiten der Synthese von Lipopeptiden.

Bisher wurden für die Synthese von Lipopeptiden in Lösung beide Synthesestrategien angewendet. Die Synthese selektiv entschützter Peptide führte nach ihrer anschließenden Umsetzung mit dem entsprechenden Prenylbromid unter basischen^[171,168], neutralen^[44] oder sauren^[97] Bedingungen, d.h. unter Zugabe von Diisopropylethylamin, Kaliumfluorid-dihydrat bzw. Zinkacetat zu den entsprechenden Lipopeptiden. Die Festphasensynthese von

prenylierten Peptiden ermöglicht ebenfalls die Verwendung der beiden beschriebenen Synthesestrategien.^[172]

3. Ziel der Arbeit

Aufgrund des zunehmenden Interesses an der Aufklärung des vektoriiellen intrazellulären Vesikeltransports, an dem die Rab/Ypt-Proteine als Regulatoren eine entscheidende Rolle spielen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein flexibler Zugang zu den im C-terminalen Bereich geranylgeranierten Rab-Proteinen gefunden werden. Über einen semisynthetischen Ansatz sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. S. Goody vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund der modifizierte C-Terminus mit ligationsfähigen bakteriell expremierten Rab7-Proteinen verknüpft werden. Hierzu sollte zunächst die Synthese der geranylgeranierten und zusätzlich mit einem Fluoreszenzmarker ausgestatteten Peptide mit einer dem Rab7-C-Terminus entsprechenden Sequenz ausgearbeitet werden. Um die biologisch tolerierten Positionen für die Einführung des Fluoreszenzmarkers am C-Terminus der Rab-Proteine zu identifizieren, könnte dieser zum Einen direkt am C-Terminus anstelle des nativen Methylesters und zum Anderen an eine Prenyl-Seitenkette eingeführt werden. (Abbildung 14).

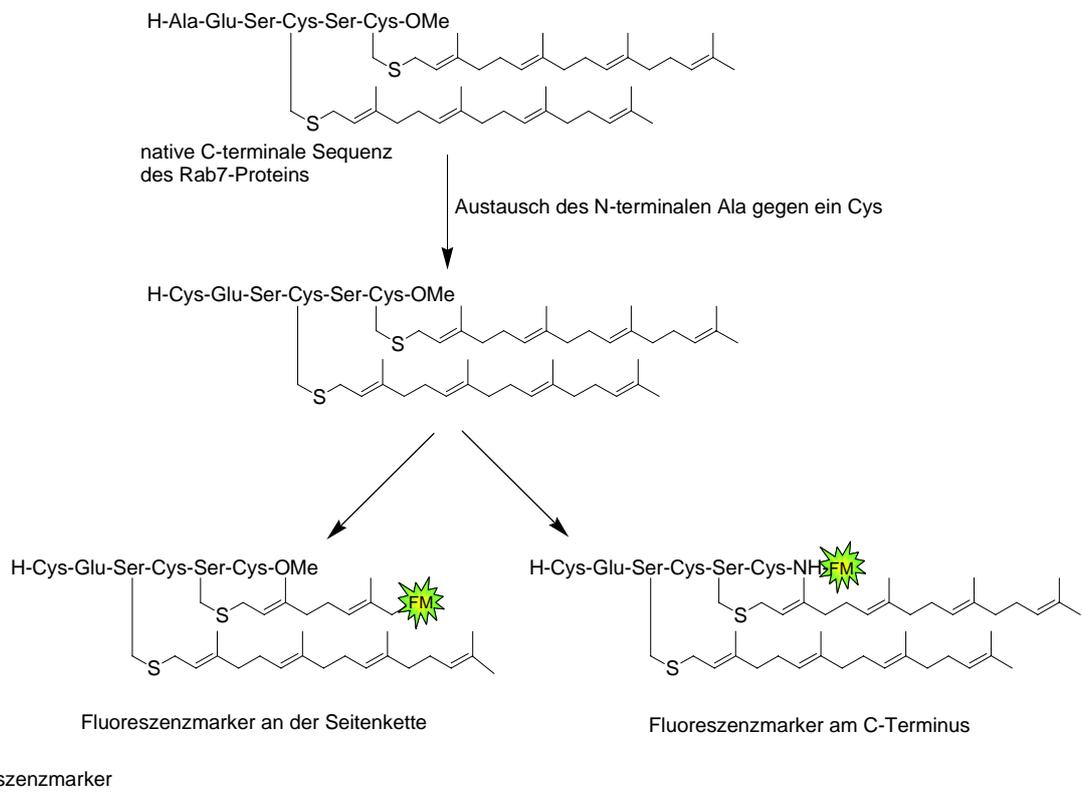


Abbildung 14: Zielpeptidstrukturen mit unterschiedlich positionierten Fluoreszenzmarkern.

Um ein optimales Protokoll zur Synthese der C-terminalen Rab-Peptide zu erstellen, wurde eine Synthese sowohl in Lösung als auch an der festen Phase angestrebt, wobei letztere einen schnelleren und flexibleren Zugang zu den gewünschten Peptiden ermöglichen sollte.

Die lipidierten Peptide und Proteine sollten über die *Expressed Protein Ligation* (EPL)^{126]} verknüpft werden, um den Vorteil dieser Ligationsmethode, der Ausbildung einer nativen Amidbindung zwischen Peptid und Protein zu nutzen (Abbildung 15). Hierbei wird das Rab-Protein als Thioester aktiviert, der dann selektiv mit einem N-terminalen Cystein des modifizierten Peptids in einer zur *Native Chemical Ligation* analogen Reaktionssequenz reagiert.^[143, 144]

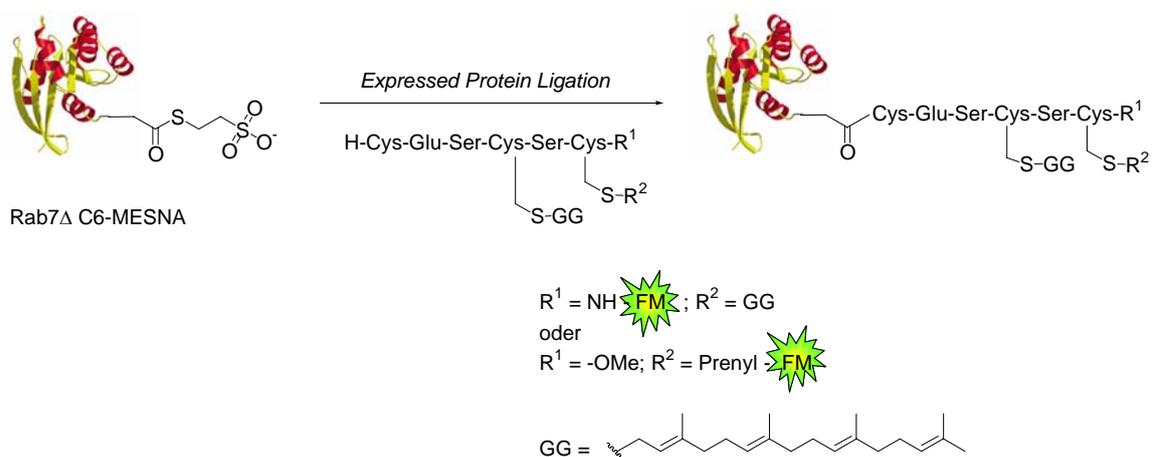


Abbildung 15: Geplante Ligationen der zu synthetisierenden Peptide mit dem verkürzten Rab7-Protein.

Die Festphasensynthese ist bisher zur Darstellung der lipidierten Rab-Peptide nicht angewandt worden. Über ihre Entwicklung wäre erstmalig ein äußerst flexibler Zugang zu den unterschiedlich modifizierten Rab-Lipopeptiden möglich.

Außerdem sollte im Rahmen dieser Dissertation die Festphasensynthese eines dreifach orthogonal substituierten Benzolderivat ausgearbeitet werden, welches selektiv über einen Cysteinrest bzw. eine Maleinimidocaproyl(MIC)-Gruppe am C-Terminus oder über einen Thioester am N-Terminus der Proteine mittels *EPL* bzw. MIC-Ligation eingeführt werden könnte. Solch ein Baustein würde eine flexible Einführung von Fluoreszenzmarkern oder anderen funktionellen Gruppen an definierte Stellen in ein Protein ermöglichen (Abbildung 16). Die modifizierten Proteine ständen für anschließende biologische Anwendungen zur Verfügung.

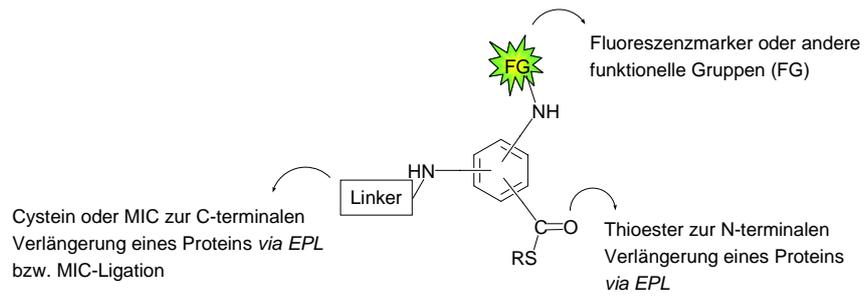


Abbildung 16: Zielstruktur des dreifach orthogonal substituierten Benzolderivats zur Einführung verschiedener funktioneller Gruppen in ein Protein.

4. Spezieller Teil

4.1. Semisynthese der prenylierten und fluoreszenzmarkierten Rab-Proteine

4.1.1. Synthese des Rab7-C-Terminus in Lösung

4.1.1.1. Syntheseplan

Posttranslational modifizierte Rab7-Proteine tragen zwei Geranylgeranylreste, die kovalent als Thioether an die Thiolgruppen der Cysteine ²⁰⁵Cys und ²⁰⁷Cys des C-terminalen CXC-Motivs gebunden sind. Zusätzlich liegt das ²⁰⁷Cys als Methylester vor.^[15;16]

Der zu synthetisierende C-Terminus der Rab-Proteine sollte dem nativen vollständig modifizierten C-Terminus der Rab-Proteine weitestgehend entsprechen. Änderungen im C-terminalen Bereich sollten dabei nur durch die Anbindung des Fluoreszenzmarkers wie auch durch das für die EPL benötigte N-terminale Cystein bedingt sein. In einem semisynthetischen Ansatz könnten die zu synthetisierenden Peptide mit C-terminal verkürzten Rab-7-Proteinen zu den entsprechend modifizierten semisynthetischen Ziel-Proteinen umgesetzt werden (Abbildung 17). Zur Herstellung ligationsfähiger Rab-Proteine kann der C-Terminus des verkürzten Rab7-Proteins über das IMPACT™-System^[140,141] der Firma New England Biolabs als Thioester aktiviert werden. Bei der Ligationsreaktion kann die Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins des zu synthetisierenden Peptids mit einer *S-tert*-Butyl-Gruppe geschützt vorliegen, da sich diese unter den reduktiven Bedingungen der Ligationsreaktion *in situ* abgespalten läßt.^[173]

Als Position des einzuführenden Fluoreszenzmarkers wurde zum Einen die Stelle des nativen Methylesters und zum Anderen die Prenylgruppe des ²⁰⁷Cys in Betracht gezogen. Somit sollte nach der Ligation der Peptide eine Aussage über den Einfluss des nicht nativen Fluoreszenzmarkers an den beiden ausgewählten Positionen sowohl auf die Ligationreaktion und als auch auf die spätere Interaktion des semisynthetischen Proteins mit seinen Chaperonen wie GDI oder REP möglich sein.

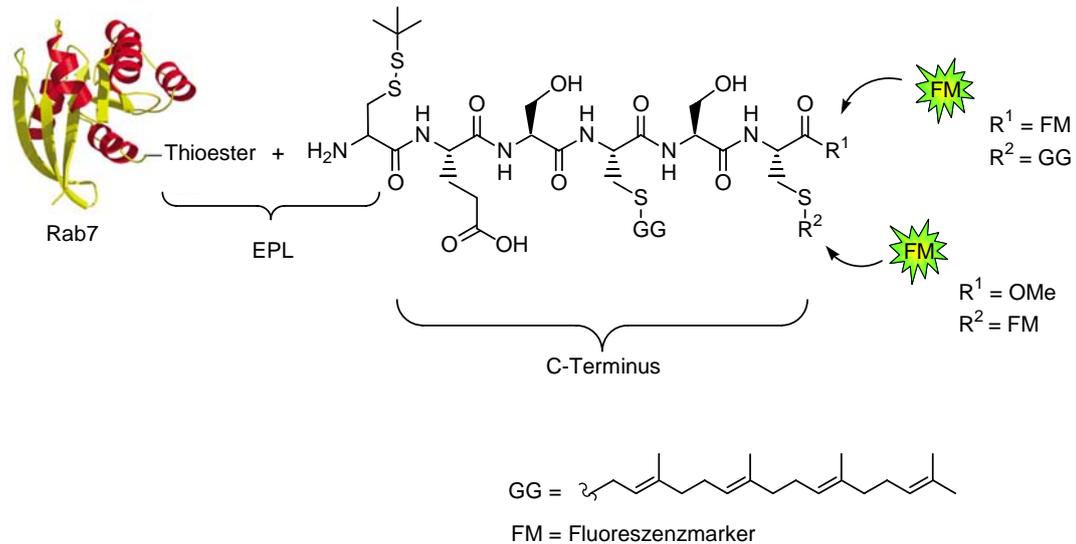


Abbildung 17: Zielproteine mit unterschiedlich positionierten Fluoreszenzmarkern.

Bei der Synthese der fluoreszenzmarkierten Rab7-C-terminalen Peptide mussten folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- 1) Um Nebenreaktionen wie Zyklisierungen zu vermeiden, sollten die prenylierten Peptide vom C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut werden, wobei berücksichtigt werden musste, dass Dipeptide mit einem C-terminalen Methyl ester bei deren N-terminaler Entschützung zum entsprechenden Diketopiperazin zyklisieren können.^[174]
- 2) Mögliche Racemisierungen könnten bei der Kupplung von Dipeptiden und Cysteinen durch die Wahl der richtigen Kupplungsreagenzien und Lösungsmitteln unterdrückt werden.
- 3) Bei der Wahl der Schutzgruppen musste die Säure- und Basenlabilität der Geranylgeranylreste berücksichtigt werden, wobei die β -Eliminierung des Thioethers unter basischen Bedingungen und der Säureangriff auf die Doppelbindung der Geranylgeranylreste zu vermeiden waren.^[175,176]
- 4) In der Peptidsynthese könnten die Hydroxylgruppen der Serine unter Verwendung milder Kupplungsreagenzien^[177,178] ungeschützt bleiben, auch wenn bei ihrer Kupplung häufig niedrigere Ausbeuten beobachtet wurden.^[179] Dadurch würde jedoch die Anzahl der benötigten Reaktionsschritte reduziert werden.
- 5) Als Fluoreszenzmarker sollte eine möglichst kompakte und damit wenig störende Gruppe eingesetzt werden.

entsprechen. Tetrapeptid **A** könnte schließlich über die Kupplung zweier Dipeptide und Tetrapeptids **B** über die Kupplung eines Tripeptids mit den entsprechend modifizierten Cysteinmethylestern aufgebaut werden. Bei diesen beiden Syntheserouten der Tetrapeptide würde Dipeptid **A** eine Schlüsselrolle spielen. Dieses könnte mit dem Ethylendiaminderivat des Dansyl-Fluorophors C-terminal modifiziert werden und anschließend erneut für die Verlängerung des so erhaltenen fluoreszenzmarkierten Dipeptids zum Tetrapeptid **A** eingesetzt werden. Auch das für die Synthese des Tetrapeptids **B** benötigte Tripeptid könnte aus dem Dipeptid **A** aufgebaut werden.

4.1.1.2. Synthese der prenylierten und fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide

Zuerst wurde die benötigte Geranylgeranylgruppe über eine fünfstufige Synthese aufgebaut. In der Literatur sind für den stereoselektiven Aufbau dieses C₂₀-Isoprens eine Vielzahl von Methoden beschrieben.^[180-187] Die Synthese ausgehend von kommerziell erhältlichem all-*trans*-Farnesylbromid versprach die geringste Anzahl an Reaktionsschritten (Abbildung 19).^[188]

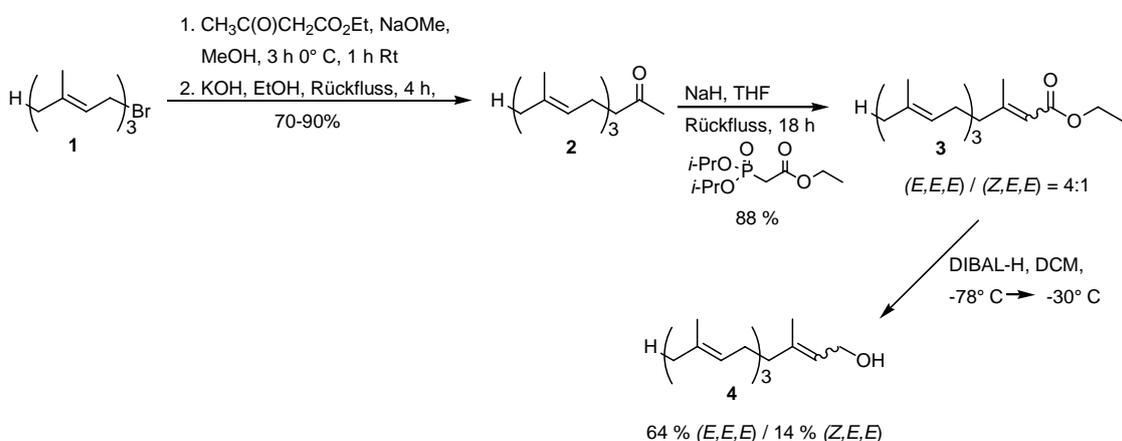


Abbildung 19: Synthese von all-*trans*-Geranylgeraniol **4**.

All-*trans*-Farnesylbromid **1** wurde zunächst mit Acetessigsäureethylester unter basischen Bedingungen umgesetzt. Die anschließende Verseifung und Decarboxylierung des Rohprodukts führte in hoher Ausbeute zu all-*trans*-Farnesylacetone **2**. Die Einführung der vierten Doppelbindung erfolgte über eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit Diisopropylethylphosphonoacetat. Das gewünschte all-*trans*-Isomer wurde in einem Überschuss von 4:1 zum (Z,E,E)-Isomeren gewonnen. Nach der Reduktion der Ester mit

Diisobutylaluminiumhydrid zu den Alkoholen erfolgte die Trennung der Isomeren durch wiederholte Säulenchromatographie.

Für die Prenylierung von *L*-Cystein wurde der Alkohol in ein Halogenid überführt. Auf Grund der Tatsache, dass das Geranylgeranyl bromid verhältnismäßig instabil ist^[189], sollte stattdessen das wesentlich stabilere Prenylchlorid, analog zu einem Prenylierungsverfahren nach Poulter *et al.*^[190], eingesetzt werden.

Das all-*trans*-Geranylgeranylchlorid konnte in einer Corey-Kim-Reaktion durch Umsetzung des Geranylgeraniol **4** mit *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid^[191] in hohen Ausbeuten hergestellt werden (Abbildung 20).

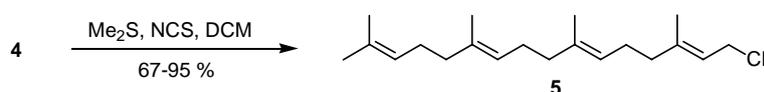


Abbildung 20: Darstellung von all-*trans*-Geranylgeranylchlorid **5**.

Zur Synthese des geranylgeranylierten *L*-Cysteins sollte die Disulfidbrücke des Aloc-Cystins **6**^[192] mit Natriumborhydrid reduziert werden, um anschließend die Mercaptogruppe mit Geranylgeranylchlorid **5** umzusetzen (Abbildung 21). Die Synthese des geranylgeranylierten Aloc-Cysteins **7** konnte jedoch auf diesem Wege nicht realisiert werden. Unter den für die *S*-Alkylierung benötigten basischen Bedingungen wurde eine Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe beobachtet.

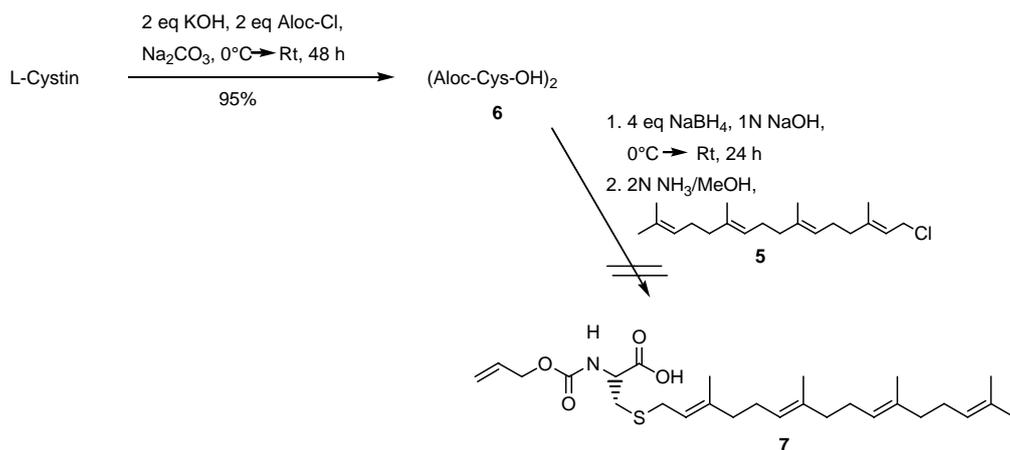


Abbildung 21: Versuch der Synthese des geranylgeranylierten und N-terminal geschützten Cysteins **7**.

Stattdessen konnte *L*-Cystein-hydrochlorid mit Geranylgeranylchlorid **5** zum prenylierten Cystein **8** erfolgreich umgesetzt werden (Abbildung 22).^[190] Trotz der geringen Löslichkeit

des prenylierten Cysteins in allen gängigen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen gelang die Prenylierung mit einer Ausbeute von 87 %.

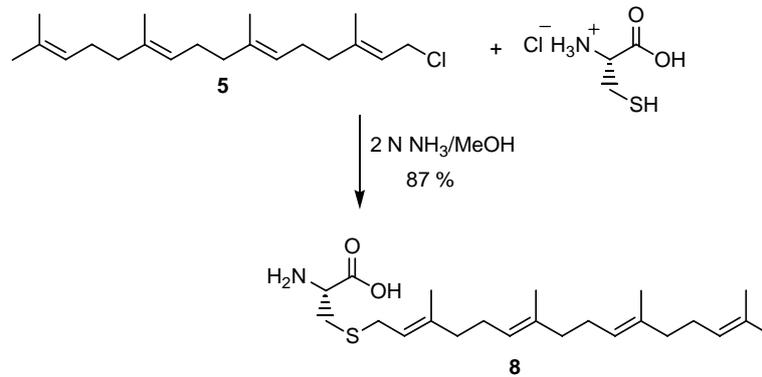


Abbildung 22: Synthese des geranylgeranylierten Cysteins **8**.

Mit dem geranylgeranylierten *L*-Cystein stand ein allgemein verwendbarer prenylierter Baustein für die weiteren Synthesen zur Verfügung.

Um eine möglichst hohe Effizienz in Bezug auf das eingesetzte Geranylgeraniol zu erzielen, wurde eine Blockkupplung zur Synthese der geranylgeranylierten Tetrapeptide in Betracht gezogen. Über die *N*-Hydroxysuccinimid-Methode konnte je nach Ansatzgröße in unterschiedlichen Ausbeuten aus Fmoc-geschütztem Serin und dem prenylierten Cysteinderivat **8** das entsprechende Dipeptid **9** hergestellt werden (Abbildung 23).

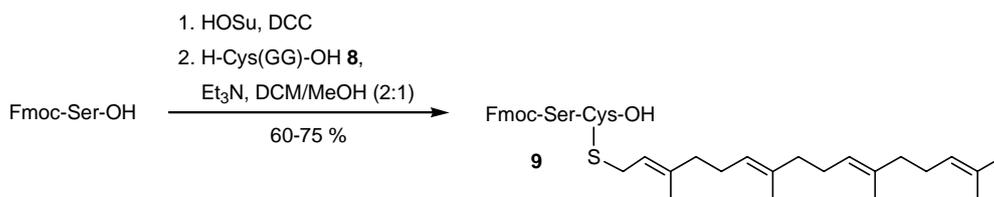


Abbildung 23: Synthese des prenylierten Dipeptids **9**.

Zur Einführung des Fluoreszenzmarkers wurde Dipeptid **9** anschließend mit dem Ethylendiaminderivat des Dansyl-Fluorophors **10** umgesetzt (Abbildung 24). Die Synthese des Dansylderivats ist in der Literatur beschrieben und verlief mit sehr hoher Ausbeute.^[193] Über eine Kupplung mit HOBt und HBTU konnte das fluoreszenzmarkierte und geranylgeranylierte Dipeptid **11** erhalten werden, welches somit für die Synthese des Rab7-C-Terminus, der anstelle des nativen Methylsters einen Fluoreszenzmarker trägt, einsetzbar war.

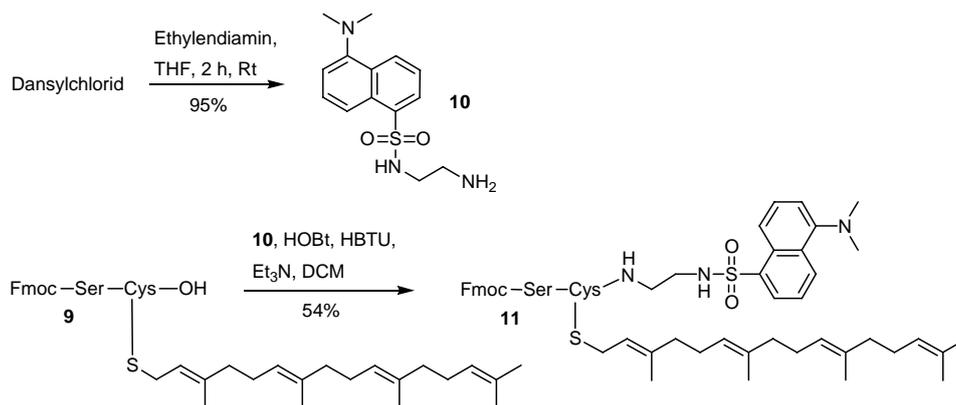


Abbildung 24: Synthese des fluoreszenzmarkierten Dipeptids **11**.

Für die anschließende Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe des Dipeptids **11** wurde die leicht flüchtige Base Diethylamin eingesetzt, die nach vollständiger Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Toluol coevaporiert wurde, um eine Aufkonzentrierung der Base zu vermeiden (Abbildung 25). Die Aufreinigung des N-terminal ungeschützten Dipeptids war mit einem großen Substanzverlust verbunden. Deshalb wurde nach Wiederholung der Reaktion das ungeschützte Dipeptid ohne weitere Aufreinigung für die Kupplungsreaktion mit Dipeptid **9** eingesetzt. Diese führte schließlich zum Tetrapeptid **12**, das säulenchromatographisch aufgereinigt und mit einer guten Ausbeute erhalten werden konnte.

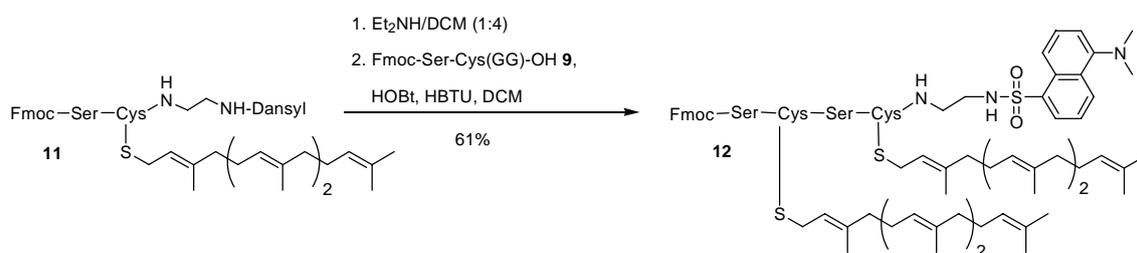


Abbildung 25: Synthese des zweifach prenylierten, fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids **12**.

Die Synthese der Tetrapeptide, deren C-terminaler Cysteinrest einen fluoreszenzmarkierten Geranyl- bzw. Farnesylrest trägt, begann mit dem Tripeptid **13**^[194], welches mit dem entsprechenden Cysteinmethylester, der einen Geranyl- bzw. Farnesyl-Dansyl-Thioether enthält, zu den gewünschten Tetrapeptiden **14** und **15** umgesetzt wurde. Die Cysteinmethylester^[177] standen dabei für die Synthese der Peptide in dem Arbeitskreis von Prof. H. Waldmann zur Verfügung.

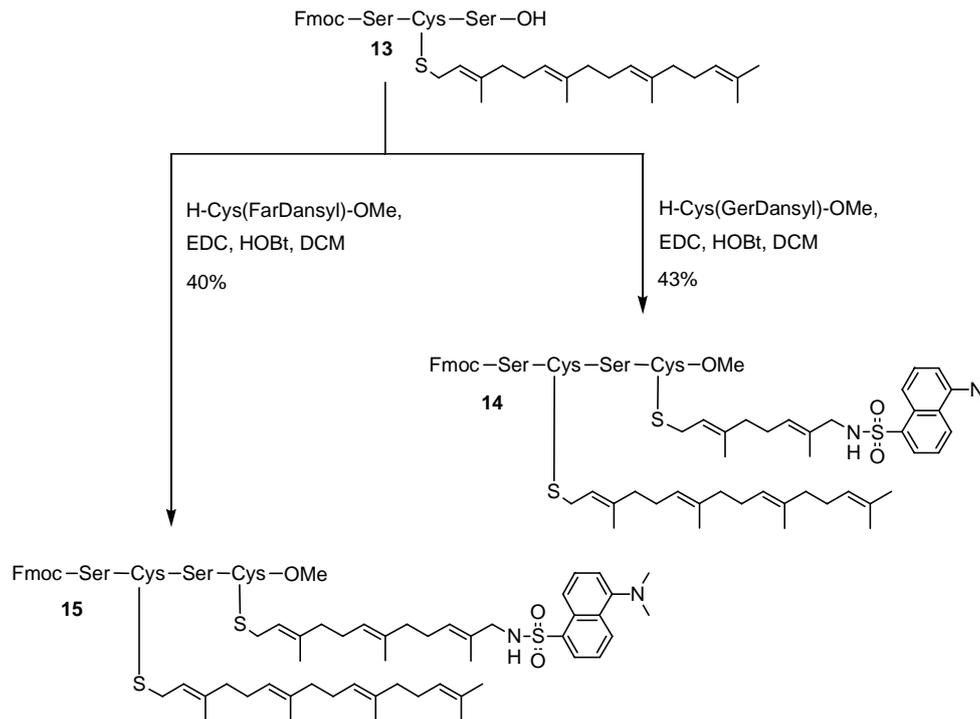


Abbildung 26: Synthese der Tetrapeptide **14** und **15**.

4.1.1.3. Synthese der N-terminalen Dipeptide

Aufgrund der Säurelabilität der Geranylgeranylreste wurden für die Synthese der N-terminalen Dipetide basenlabile und unter neutralen Bedingungen abspaltbare Schutzgruppen in Betracht gezogen. Zur Verlängerung der synthetisierten Tetrapeptide zu den entsprechenden Zielpetiden wurde unter anderem Dipeptid **17** synthetisiert (Abbildung 27). Die Einführung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe für das N-terminale Amin und der 9-Fluorenylmethyl (Fm)-Schutzgruppe für die Säurefunktion der Glutaminsäure würde bei der späteren Peptidsynthese eine gleichzeitige Abspaltung beider Schutzgruppen unter basischen Bedingungen erlauben.

Die Glutaminsäure wurde nach Literatur bekannten Verfahren^[195] in der Seitenkette mit dem 9-Fluorenylmethylester geschützt. Um Nebenreaktionen zu verhindern, die beim Kuppeln einer N- und C-terminal ungeschützten Aminosäure auftreten können, wurde Fmoc-Cys(*t*Bu)-OH über die *N*-Hydroxysuccinimid-Methode zum Aktivester umgesetzt, und anschließend mit dem ungeschützten Glutaminderivat **16** zum Dipeptid **17** verlängert.

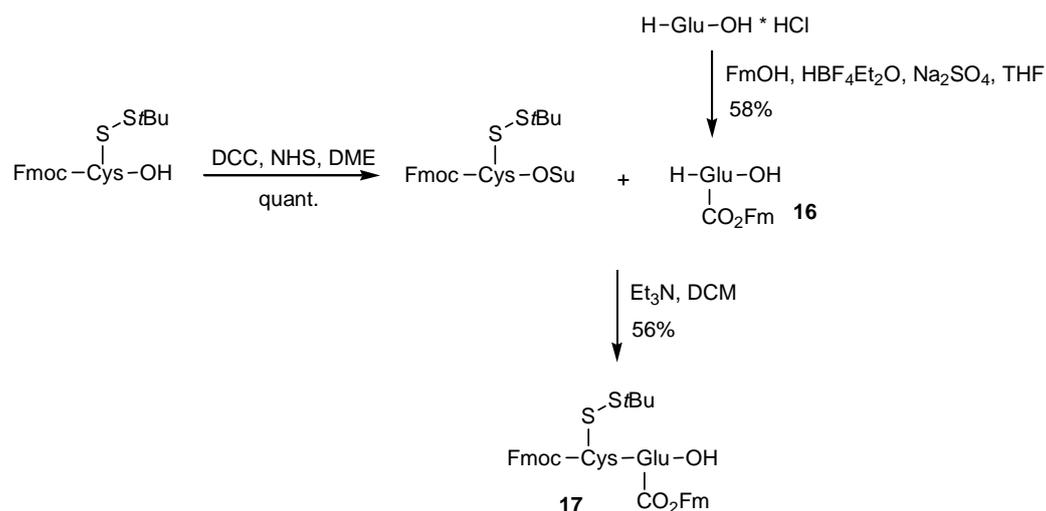


Abbildung 27: Synthese des N-terminalen Dipeptids **17**.

Alternativ sollten bei der Synthese des N-terminalen Dipeptids auch die unter neutralen Bedingungen abspaltbare Aloc- und Allyl-Schutzgruppe eingesetzt werden. Hierzu wurde die Aminofunktionen des H-Cys(SiBu)OH mit Chlorameisensäureallylester in ein Allylcarbamat überführt (Abbildung 28). Das Cysteinderivat **19** konnte anschließend nach Voraktivierung mit *N*-Hydroxysuccinimid mit γ -Allyl-L-glutaminsäure **18**^[196] zum Dipeptid **20** umgesetzt werden.

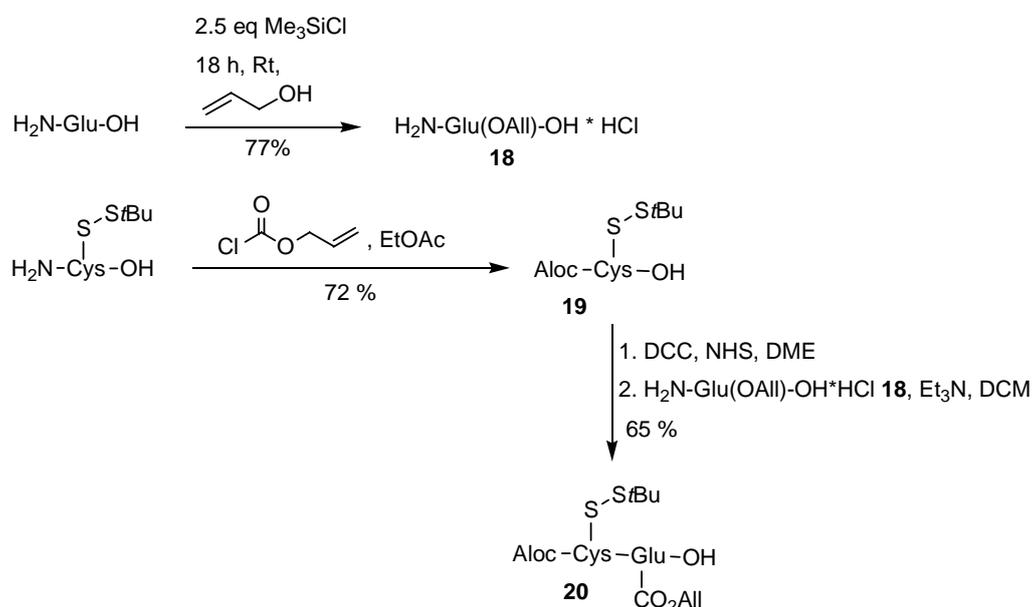


Abbildung 28: Synthese des N-terminalen Dipeptids **20**.

4.1.1.4. Synthese der Hexapeptide

Beide N-terminalen Dipeptide **17** und **20** wurden für die Verlängerung der Tetrapeptide **12**, **14** und **15** zu den gewünschten Hexapeptiden eingesetzt. Für die Synthese des Hexapeptids **21** wurde Tetrapeptid **12** zunächst unter basischen Bedingungen N-terminal entschützt (Abbildung 29). Die vollständige Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde dabei über Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Das so freigesetzte Amin wurde mit Toluol coevaporiert, um eine Aufkonzentrierung der Base zu vermeiden, und das Rohprodukt in der Kupplungsreaktion mit dem N-terminalen Dipeptid **20** umgesetzt. Das Hexapeptid konnte säulenchromatographisch aufgereinigt werden und wurde mit einer Ausbeute von 61% erhalten.

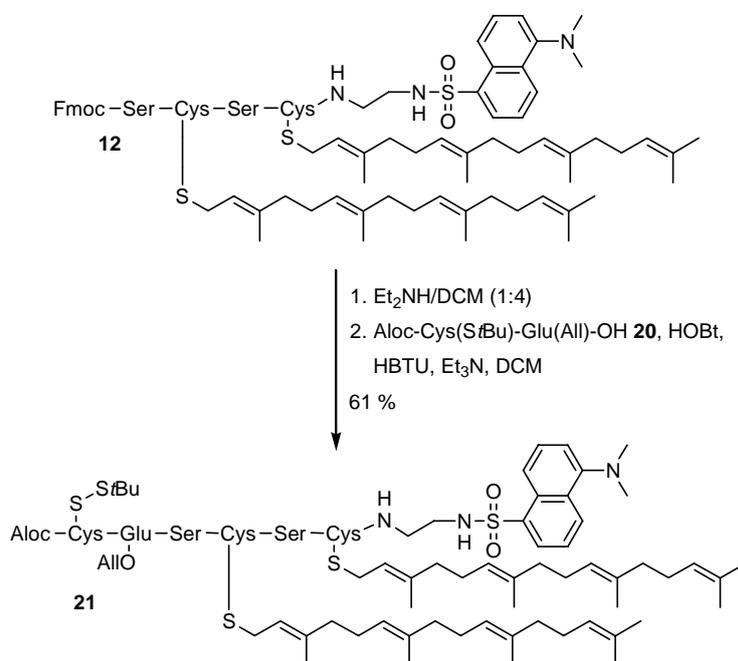


Abbildung 29: Synthese des Hexapeptids **21**.

Analog konnten unter Verwendung des N-terminalen Dipeptids **17** die Tetrapeptide **14** und **15** zu den gewünschten Hexapeptiden **22** und **23** verlängert werden (Abbildung 30). Dazu wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und die freien Amine mit Dipeptid **17** gekuppelt. Beide Hexapeptide konnten säulenchromatographisch aufgereinigt und mit guten Ausbeuten erhalten werden.

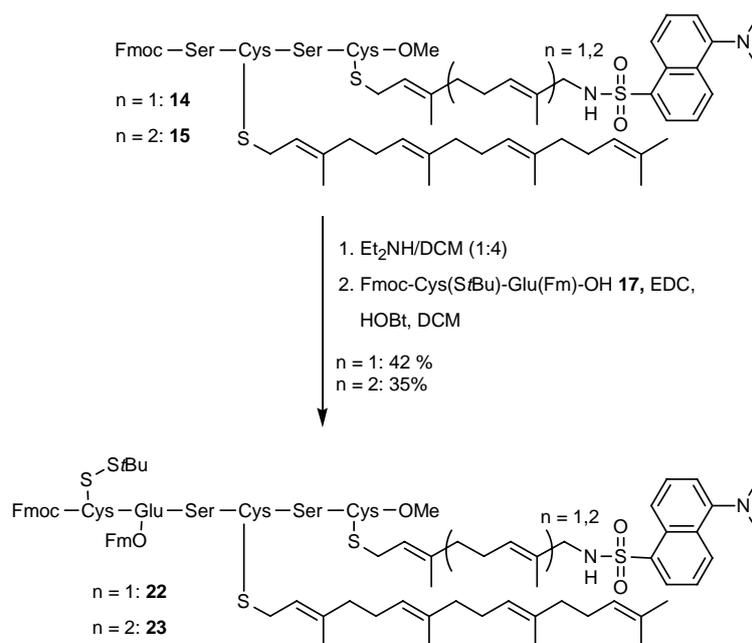


Abbildung 30: Synthese der Hexapeptide **22** und **23**.

Für die *Expressed Protein Ligation* der synthetisierten Hexapeptide musste im letzten Schritt der Synthese die N-terminale Schutzgruppe des Cysteins und die Schutzgruppe der Seitenkette der Glutaminsäure entfernt werden (Abbildung 31). Im Falle des Hexapeptids **22** wurde die Fmoc-Schutzgruppe zusammen mit der Fm-Schutzgruppe der Glutaminsäure unter basischen Bedingungen entfernt. Die Abspaltung der Alloc- und Allyl-Schutzgruppe des Hexapeptids **21** verlief dabei Pd(0)-vermittelt unter neutralen Bedingungen unter Verwendung von Phenylsilan und katalytischen Mengen Palladiumtetrakis(triphenylphosphin).

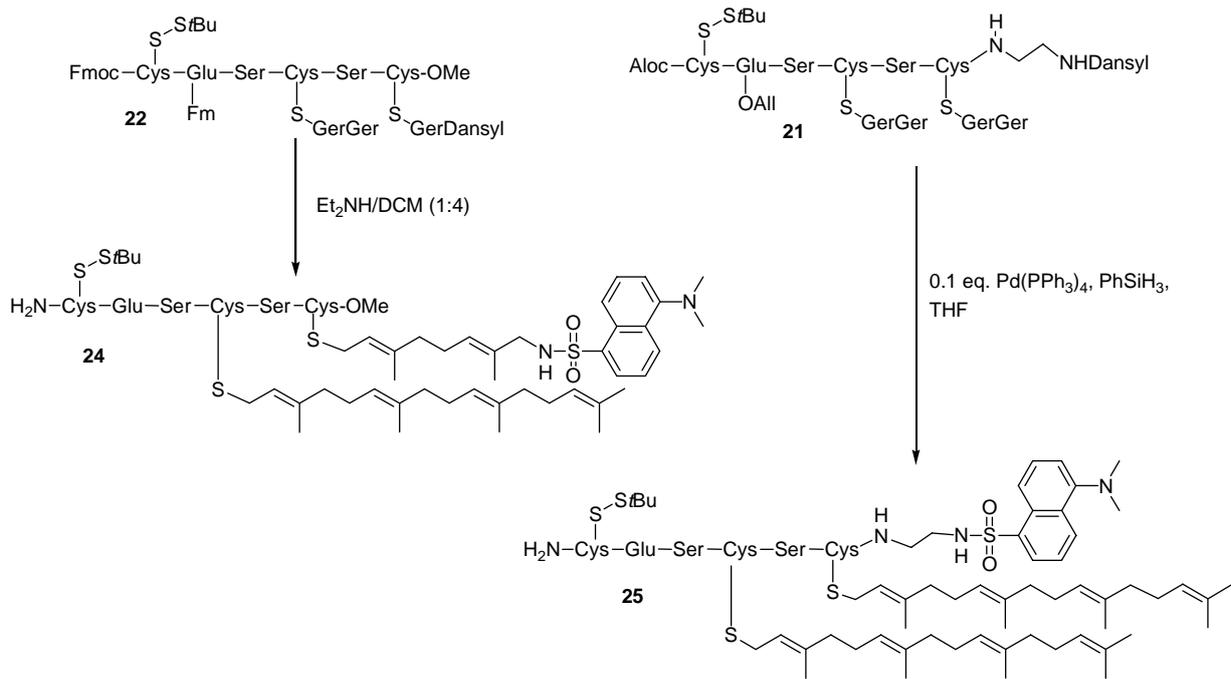


Abbildung 31: N-terminale Entschützung der Hexapeptide **21** und **22**.

Die so generierte Hexapeptide **24** und **25**, dessen Sequenzen dem posttranslational modifizierten C-Terminus der Rab7-Proteine entsprechen und zusätzlich einen Fluoreszenzmarker an unterschiedlichen Positionen tragen, standen somit für die EPL zur Semisynthese der prenylierten, fluoreszenzmarkierten Rab-Proteine zur Verfügung.

4.1.2. Synthese des Rab7-C-Terminus für die EPL an der festen Phase

4.1.2.1. Syntheseplan

Für die Entwicklung einer Strategie für die Synthese der prenylierten und fluoreszenzmarkierten Rab-Peptide an der festen Phase mussten ähnliche Gesichtspunkte wie für die Synthese der Zielmoleküle in Lösung berücksichtigt werden (Abbildung 32):

A) Der Linker, mit dem die Peptide an die feste Phase gebunden würden, sollte zum Einen aufgrund der labilen Prenylreste eine Abspaltung der Peptide unter sehr milden Bedingungen erlauben. Zum Anderen sollte mit der Abspaltung der Peptide vom Harz das Anbinden unterschiedlicher funktioneller Gruppen an den C-Terminus gewährleistet sein.

B) Für die Durchführung der Prenylierung wären generell zwei Strategien möglich. Zum Einen könnte die Prenylierung am Harz durchgeführt werden wie es bei der Festphasensynthese von Ras-Peptiden beschrieben wurde^[172]. Zum Anderen sollte auch eine Verwendung von lipidierten Bausteinen eine Festphasensynthese der Lipopeptide ermöglichen. Das Einsetzen lipidierter Bausteine fand vor allem bei der Synthese von Lipopeptiden in Lösung Verwendung.^[169]

C) Für die Serine, die Glutaminsäure und das N-terminale Cystein sollten orthogonale Schutzgruppen gefunden werden, wobei außerdem die Labilität der Prenylreste und die Linker-Eigenschaften berücksichtigt werden mussten.

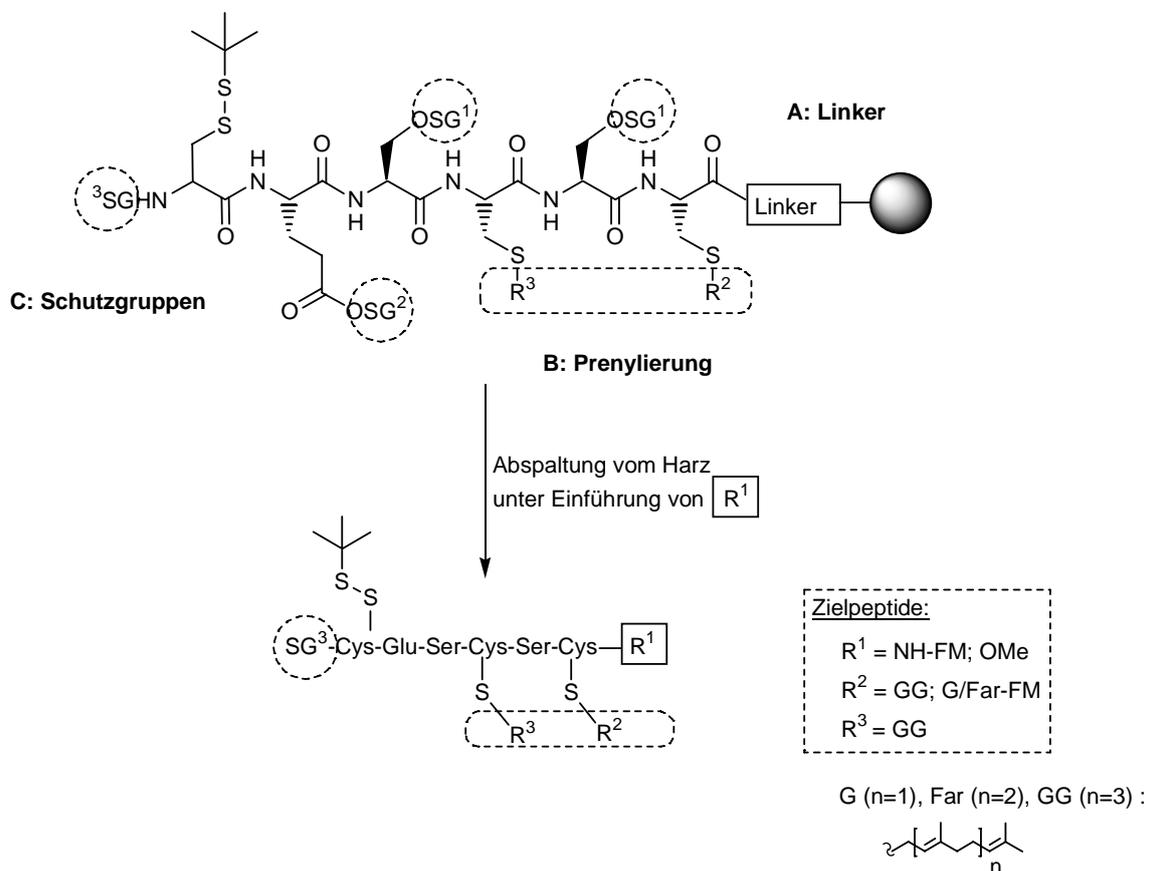


Abbildung 32: Syntheseroute der Hexapeptide für eine Festphasensynthese.

Zu **A: Linker**

Für die Synthese der fluoreszenzmarkierten Peptide an fester Phase bot sich als Ankergruppe der von F. Stieber und U. Greter entwickelte oxidationsempfindliche Hydrazid-Linker an.^[197] Dieser ermöglicht die relativ leichte Anbindung der Ausgangsverbindung über eine freie

Carbonsäuregruppe, die bei der Abspaltung vom Linker wahlweise in den Methylester oder in ein Amid überführt werden kann.

Die Abspaltung des Hydrazid-Ankers erfolgt dabei oxidativ unter sehr milden Reaktionsbedingungen. Das Hydrazid wird in ein intermediäres Acyldiazon überführt, das durch Angriff eines Nucleophils unter Abspaltung von Stickstoff zu einem Carbonsäurederivat reagiert (Abbildung 33).

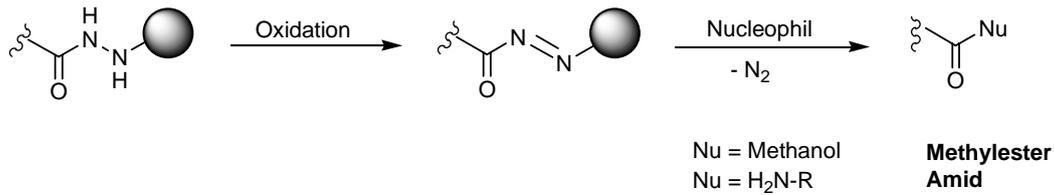


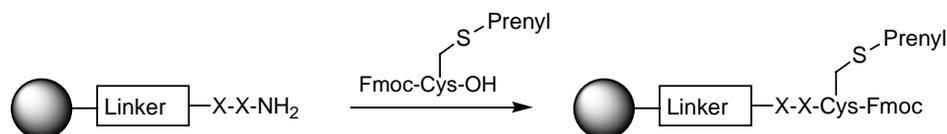
Abbildung 33: Abspaltung der Peptide vom Hydrazid-Harz durch oxidative Hydrazidsplaltung.

Die am Harz immobilisierten Peptide könnten somit wahlweise unter Verwendung einer methanolischen Kupferacetat-Lösung als Methylester, oder im Falle der Rab-Peptide, die anstelle des nativen Methylesters eine Amidbindung zum Fluoreszenzmarker aufweisen, unter Verwendung des entsprechend modifizierten Amins unter Ausbildung der Amidbindung von der festen Phase abgespalten werden.

Zu B: Prenylierung

Für die Durchführung der Prenylierung waren wie bereits erwähnt zwei Strategien möglich. Zum Einen könnten die Peptide mit einer geeigneten Wahl an Schutzgruppen vollständig am Harz aufgebaut werden und anschließend nach Abspaltung der Cystein-Schutzgruppen über eine Alkylierung der Thiolgruppen prenyliert werden (Abbildung 34 A). Bei dieser am Harz prozessierten Prenylierung würden allerdings größere Mengen an Prenylhalogenid für eine vollständige Umsetzung zum Lipopeptid benötigt werden.^[172] Das sehr teure und aufwendig zu synthetisierende Geranylgeraniol und das fluoreszenzmarkierte Geraniol bzw. Farnesol sprachen jedoch gegen eine Durchführung der Prenylierung an der festen Phase. Außerdem müsste bei einer Synthese der Peptide mit unterschiedlichen Prenylierungsmustern eine aufwendige Schutzgruppenstrategie für die Prenylierung am Harz realisiert werden.

Zum Anderen würde die Verwendung von prelipidierten Cysteinderivaten eine selektive Einführung der Prenylreste an beliebiger Stelle des C-Terminus ermöglichen, und somit einen flexiblen Zugang zu den unterschiedlich modifizierten Rab7-C-Termini bieten (Abbildung 34 B).

A Prenylierung am Harz:**B Verwendung lipidierter Cystein-Derivate:**

X = beliebige Aminosäure
SG = Schutzgruppe

Abbildung 34: Mögliche Strategien zur Durchführung der Prenylierung.

Zu C: Schutzgruppen

Als orthogonale Schutzgruppen der Seitenketten der Serine wurde die *para*-Methoxytrityl (Mmt)-Schutzgruppe in Betracht gezogen, da diese unter schwach sauren Bedingungen abgespalten werden kann, die von den Prenylresten toleriert werden. Für die Seitenkette der Glutaminsäure würde die unter neutralen Bedingungen abspaltbare Allyl-Schutzgruppe oder die unter basischen Bedingungen abspaltbare Fluorenylmethyl-Schutzgruppe in Frage kommen. Das N-terminale Cystein sollte in der Seitenkette die *S-tert*-Butyl-Gruppe tragen, da diese *in situ* während der Ligationsreaktion unter den reduktiven Bedingungen entfernt werden kann^[173], und als Amino-Schutzgruppe die Fmoc- oder Alloc-Schutzgruppe tragen.

4.1.2.2. Synthese der prelipidierten Bausteine

Für die Synthese der funktionalisierten Rab-C-Termini an der festen Phase wurden zunächst die prenylierten, Fmoc-geschützten Cysteinderivate synthetisiert (Abbildung 35). Die Synthese beruhte auf der Alkylierung der Thiolgruppe des Cysteins mit dem entsprechenden Prenylchlorid und der anschließenden Fmoc-Schätzung der Aminofunktion mit Fmoc-Succinimid. Die Prenylchloride wurden nach bekannten Vorschriften synthetisiert.^[190] Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit dem Einsetzten von Cys*HCl erreicht, das im Gegensatz zu Cys*H₂O*HCl in Methanol löslich war. Im Falle von **27** und **28** wurden die prenylierten Cysteine vor der Umsetzung mit Fmoc-OSu nicht aufgereinigt, da die chromatographische Aufreinigung der amphiphilen Moleküle mit einem hohen Substanzverlust verbunden war. Die Fmoc-Schätzung wurde in einer Lösung aus Methanol und Dichlormethan durchgeführt, in der sich die prenylierten Cysteine problemlos lösten. Die

Fmoc-geschützten, prenylierten Cysteine konnten säulenchromatographisch aufgereinigt werden und wurden in guten Ausbeuten erhalten.

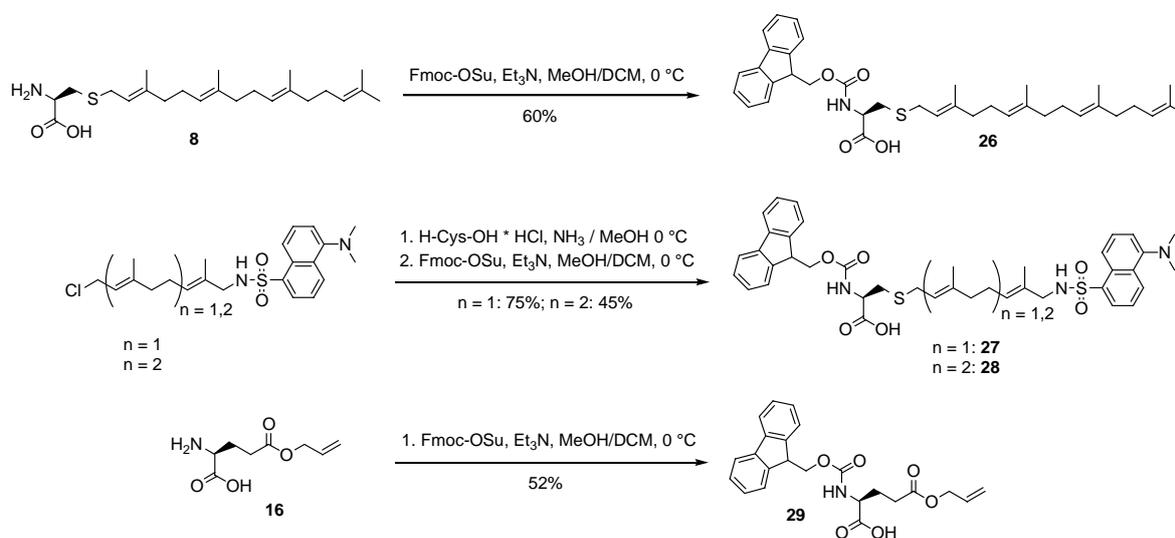


Abbildung 35: Synthese der für die Peptidsynthese an der festen Phase benötigten prenylierten Cysteinderivate **26-28** und Fmoc-Glu(OAll)-OH **29**.

Zur Untersuchung verschiedener Schutzgruppenstrategien wurde die γ -Carbonsäure der Glutaminsäure mit der Allylschutzgruppe versehen^[196] und im Anschluss die Aminofunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützt. Das so erhaltene Glutaminderivat **29** erlaubt die Pd(0)-vermittelte Entschützung der γ -Carbonsäure, wobei der Fmoc-geschützte N-Terminus intakt bleibt.

4.1.2.3. Synthese der Hexapeptide

Bei der Synthese der Rab-Peptide an der festen Phase wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren linear am Harz immobilisiert, wobei die Fmoc-Schutzgruppen nach jeder Kupplung durch Behandlung des Harzes mit einer 30%-iger Piperidin-Lösung in DMF entfernt wurden (Abbildung 36).

Im Allgemeinen wurden drei Äquivalente an Fmoc-geschützten Aminosäuren für die Festphasensynthese verwendet. Im Fall der aufwendig synthetisierten und teuren Cysteinderivate wurde die Menge auf zwei Äquivalente reduziert.

Ausgehend von 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel **30** wurde zunächst die Fmoc-Gruppe entfernt und anschließend die erste Aminosäure **26** nach ihrer Aktivierung mit DIC/HOBt in DMF/DCM zum Harz gegeben. Die Wahl des Kupplungsreagens und des

Lösungsmittels sollte dabei die Racemisierung des Cysteins unterdrücken. Die zweite Aminosäure Fmoc-Ser(Trt)-OH wurde mit einer Kombination aus HBTU und HOBT als Kupplungsreagenz an **31** gekuppelt, so dass das am Harz gebundene Dipeptid **32** erhalten wurde. Beide Kupplungsschritte wurden wiederholt und führten somit zum immobilisierten Tetrapeptid **33**. Die beiden letzten N-terminalen Aminosäuren wurden nach ähnlichen Vorschriften wie zuvor beschrieben ans Harz gebunden, so dass Hexapeptid **34** vollständig an der festen Phase aufgebaut werden konnte (Abbildung 36). Anschließend wurden die Trityl-Schutzgruppen der Serine mit 1%-iger TFA und der Allylester der Glutaminsäure mit katalytischen Mengen Palladiumtetrakis(triphenylphosphin) entfernt, so dass ausschließlich das N-terminale Cystein geschützt blieb.

Die Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde zunächst am Harz durchgeführt, allerdings war dieser Ansatz weniger erfolgreich. Das N-terminal entschützte Peptid konnte nach dessen Abspaltung vom Harz weder mit Hilfe der präparativen HPLC noch säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Deshalb wurde das N-terminale Cystein des Weiteren erst nach der Abspaltung des Peptids vom Harz in Lösung entschützt.

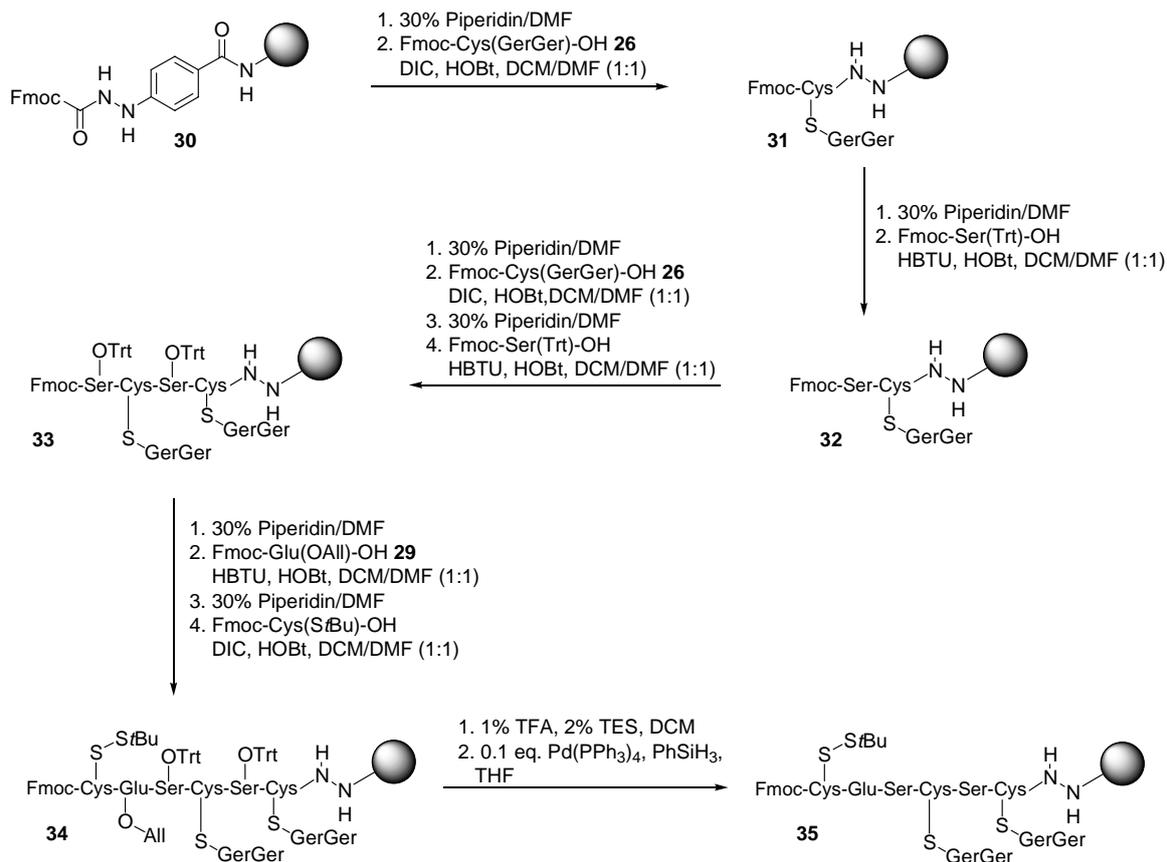


Abbildung 36: Synthese des Rab7-C-Terminus an der festen Phase.

Das an der festen Phase aufgebaute Hexapeptid **35** konnte durch die spätere Abspaltung vom Harz weiter modifiziert werden. Durch eine geeignete Wahl des Nucleophils konnte die Funktionalisierung des C-Terminus kontrolliert werden. Im Falle des Hexapeptids **37**, das einen nativen Methylester am C-Terminus aufweist, wurde eine methanolische Cu(OAc)₂-Lösung verwendet (Abbildung 37). Nach der Abspaltung konnte das Kupferacetat säulenchromatographisch entfernt werden. Die Abspaltung des Hexapeptids **36**, das anstelle des nativen Methylesters eine nicht native Amidbindung zum Dansyl-Fluorophor aufweist, konnte unter Verwendung einer Lösung des Ethylendiaminderivats der Dansylgruppe realisiert werden. Da das Kupferacetat in Abwesenheit von Methanol nicht in Dichlormethan löslich war, wurde hierbei THF als geeignetes Lösungsmittel für die Abspaltungsreaktion gefunden. Auch in diesem Fall konnte der Überschuss des Ethylendiaminderivats und das Kupferacetat säulenchromatographisch entfernt werden. Die Ausbeuten in Bezug auf die Fmoc-Beladung des Harzes lagen in einem moderaten Bereich zwischen 40-50%. Im Allgemeinen führte die Abspaltung mit Methanol zu besseren Ausbeuten als die Abspaltung mit dem Amin.

Eine andere Abspaltungsmethode für den Hydrazid-Linker beruht auf der Verwendung von *N*-Bromsuccinimid (NBS).^[198] Hierbei wird der Linker in dem ersten Schritt mit NBS oxidiert und kann anschließend in einem zweiten Schritt mit einem Nucleophil umgesetzt werden. Diese Abspaltungsstrategie konnte jedoch für die Rab-Peptide nicht eingesetzt werden, da die Prenylreste unter diesen oxidativen Bedingungen nicht stabil waren.

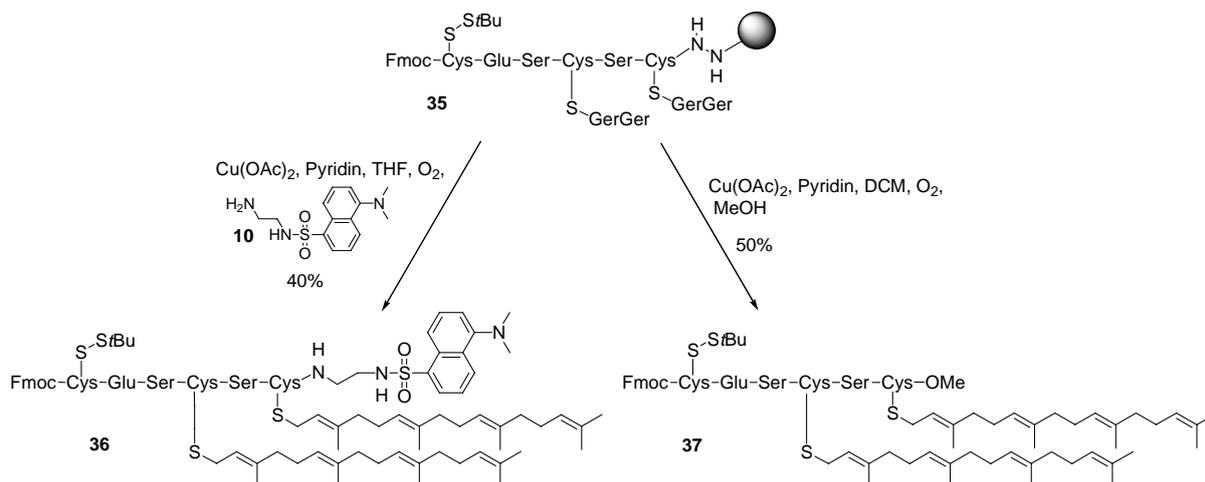


Abbildung 37: Abspaltung der Hexapeptide **36** und **37** von der festen Phase.

Analog konnten die am Harz gebundenen Tetrapeptide **40** und **41** unter Verwendung von Fmoc-Cys(GerGer)-OH **24**, Fmoc-Cys(Ger-Dansyl)-OH **25** und Fmoc-Cys(Far-Dansyl)-OH **26** aufgebaut werden (Abbildung 38). In einem weiteren Reaktionsschritt wurde Dipeptid **17** als N-terminaler Baustein verwendet, der ebenfalls bei der Synthese der Peptide **22** und **23** in Lösung eingesetzt wurde. Im letzten Schritt der Synthese der Hexapeptide an der festen Phase wurden die Trityl-Schutzgruppen der Serine unter schwach sauren Bedingungen abgespalten.

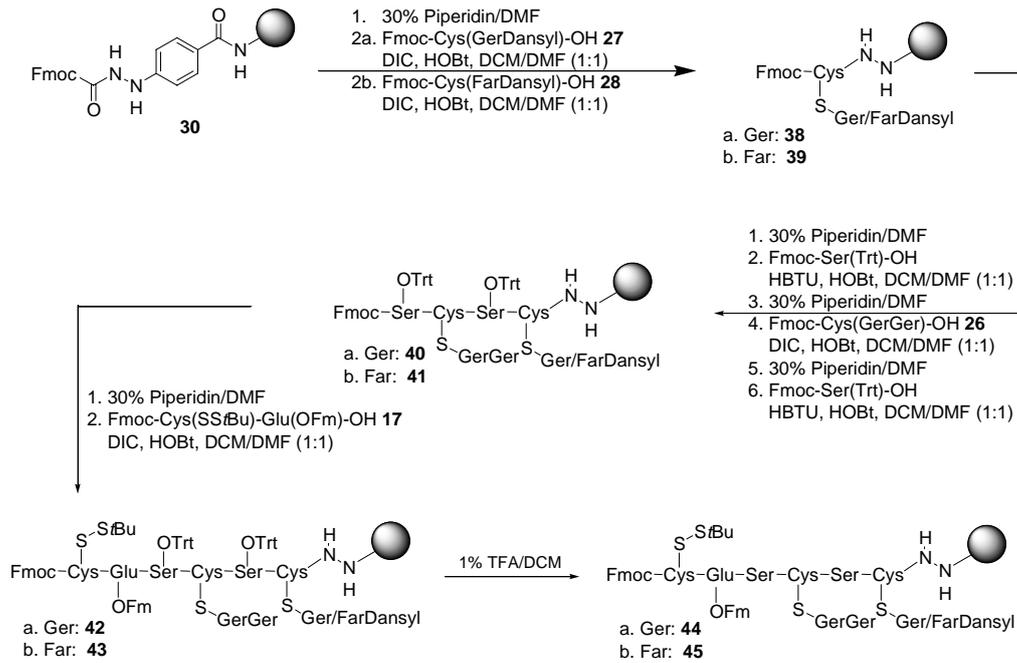


Abbildung 38: Synthese der Rab7-C-Termini an der festen Phase.

Die Hexapeptide **22** und **23** konnten unter Verwendung der methanolischen $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ -Lösung von der festen Phase abgespalten werden (Abbildung 39). Durch diese Synthesestrategie blieben das N-terminale Cystein und die Seitenkette der Glutaminsäure Fmoc- bzw. Fm-geschützt. Die Ausbeuten der Festphasensynthese bezogen auf die Fmoc-Beladung des Harzes **30** waren im Allgemeinen sehr hoch, vor allem wenn größere Mengen an Harz (> 50 mg) eingesetzt wurden.

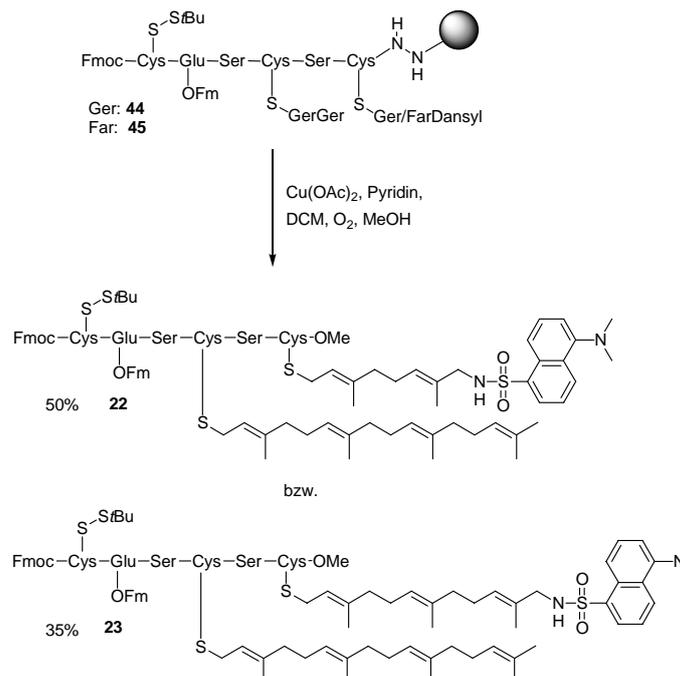


Abbildung 39: Abspaltung der Hexapeptide **22** und **23** von der festen Phase.

4.1.3. Vergleich der Synthese der Lipopeptide in Lösung und an der festen Phase

Bei der Festphasensynthese konnten die Peptide durch Verwendung verschieden modifizierter Aminosäuren auf sehr einfachem Wege mit den unterschiedlichen Modifizierungen ausgestattet werden. Die modifizierten Bausteine wurden in Lösung vorsynthetisiert, so dass sie bei der Synthese der Peptide am Harz flexibel eingesetzt werden konnten. Die gewünschten Lipopeptide (**22**, **23**, **37** und **38**) wurden mit Hilfe der Festphasensynthese mit Ausbeuten von 30-50% erhalten. Die einzelnen Kupplungsschritte verliefen mit sehr hohen Ausbeuten, da die Festphasensynthese das Einsetzen der zu kuppelnden Aminosäuren in einem hohen Überschuss ermöglicht. Insbesondere zeichnete sich die Festphasensynthese durch einen einzigen Aufreinigungsschritt der gewonnenen Peptide nach dessen Abspaltung vom Harz aus. Dies ermöglichte im Vergleich zur Lösungssynthese einen erheblich schnelleren und effizienteren Zugang zu den lipidierten Peptiden. Die Synthese der Hexapeptide benötigte einen Zeitraum von nur zwei Tagen. Die Festphasensynthese bot des Weiteren eine weitere Modifizierung der Peptide im letzten Schritt der Synthese, bei der Abspaltung der Peptide vom Harz. Dieses Ausmaß an Flexibilität in Bezug auf das Anbinden verschiedener funktioneller Gruppen an die C-Termini der Peptide könnte durch eine Lösungssynthese nicht erreicht werden.

Jedoch bot auch die Lösungssynthese durch die Verwendung von modifizierten Bausteinen einen flexiblen Zugang zu den unterschiedlich modifizierten Peptiden. Allerdings waren hierbei im Vergleich zur Festphasensynthese wesentlich längere Synthesenzeiten von mehreren Wochen und aufwendigere Synthesestrategien notwendig.

Der große Nachteil der Lösungssynthese beruhte im Wesentlichen auf der Tatsache, dass alle auftretenden Zwischenstufen einen Aufreinigungsschritt benötigten. Die zahlreichen Aufreinigungsschritte führten zum Einen zu den langen Synthesenzeiten der Peptide und waren zum Anderen mit einem hohen Substanzverlust verbunden. Die Gesamtausbeute über alle Reaktionsstufen bei der Lösungssynthese lag zwischen 6 und 8 %.

Vergleicht man die Strategie der Synthese der fluoreszenzmarkierten Peptide in Lösung und an der festen Phase, so zeigt sich, dass die Festphasensynthese der Lösungssynthese vor allem in Hinblick auf Flexibilität und Schnelligkeit überlegen ist.

4.1.4. Ligation der Hexapeptide an verkürzte Rab7-Proteine

Für Kupplungen über die *Expressed Protein Ligation* war unter Verwendung des IMPACT™-CN Systems (*Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) der Firma New England Biolabs von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody ein um sechs Aminosäuren C-terminal verkürztes Rab7-Protein als Thioester aktiviert worden.^[141]

In der Ligrationsreaktion reagiert das N-terminale Cystein des Peptids mit dem aktivierten C-Terminus des ¹⁻²⁰¹Rab7-Proteins zunächst reversibel zum entsprechenden Thioester, der anschließend über eine S, N-Acyltransfer zum stabilen Amid umlagert (Abbildung 40).

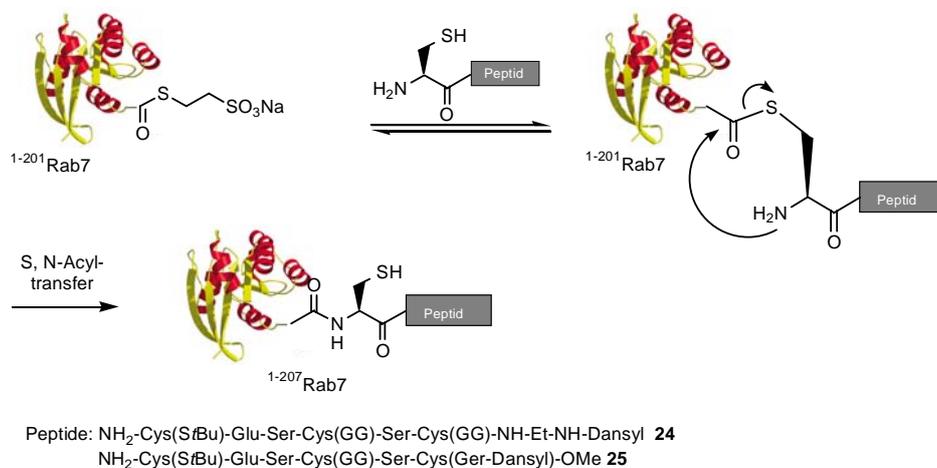


Abbildung 40: Reaktionsequenz zum semisynthetischen ¹⁻²⁰⁷Rab7.

Die *Expressed Protein Ligation* wurde insbesondere von Dr. Thomas Durek und Dr. Kirill Alexandrov ausgeführt. Zur Untersuchung der Fähigkeit der funktionalisierten semisynthetischen Proteine zur Komplexbildung mit dessen interagierenden Proteinen, wurden die synthetisierten Peptide **24** und **25** in den *in vitro* Ligationen eingesetzt. Dazu wurden die Peptide in Acetonitril/Methanol gelöst und in einem 10-fachen Überschuss zu einer Lösung des ¹⁻²⁰¹Rab7-Thioesters in Ligationspuffer (pH = 7.5) unter Zusatz von 50 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gegeben. Der Ansatz wurde dann 12 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Wie frühere Ligrationsversuche zeigten ist eine erfolgreiche Ligrationsreaktion von dem Vorhandensein des Detergenzes CTAB abhängig.^[52] Anschließend wurden die semisynthetischen Proteine mit RabGDI oder REP-1 komplexiert. Hierzu wurden die Lösungen aufkonzentriert und das eingesetzte Detergenz mit Hilfe von Größenausschluss-Chromatographie auf einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule entfernt.

Der Erfolg der Ligationen wurde über ein SDS-PAGE Gel durch UV-Detektion des Fluoreszenzmarkers nachgewiesen (Abbildung 41).

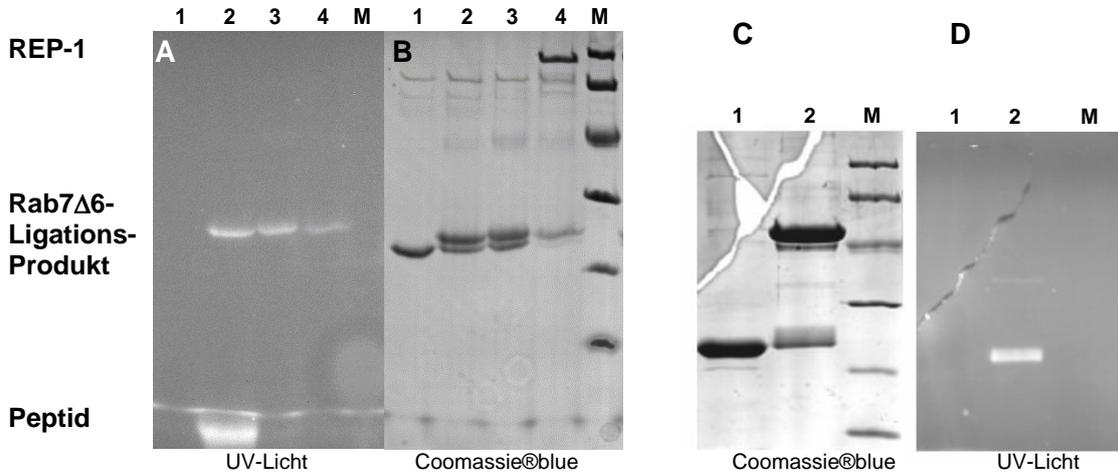


Abbildung 41: A und B: SDS-PAGE Gel von $^{1-201}$ Rab7 Δ C6-MESNA (1), nach der Ligation mit H-Cys-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(Ger-Dansyl)-OMe **25** (2) nach der Aufreinigung des Ligationsproduktes (3) und nach der Komplexieung mit REP-1 und Aufreinigung des Komplexes mit Superdex-200 Gelfiltration (4); C und D: SDS-PAGE Gel von Rab7 Δ C6-MESNA (1), nach der Ligation mit H-Cys-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)-NH-Et-NH-Dansyl **24** und Aufreinigung des Ligationsprodukts (2); M = Marker (kDa): 94, 67, 43, 30, 20, 14.

Wie Abbildung 41 zeigt wurde in allen Fällen ein fluoreszierendes Produkt erhalten, dessen Molekulargewicht mit dem semisynthetischen Rab-Protein übereinstimmt. Dies zeigt, dass die zusätzlich eingeführten Fluoreszenzmarker nicht mit der Ligationenreaktion interferieren. Der Erfolg der Ligationen konnte ebenfalls mit einem Massenspektrum der semisynthetischen Proteine nachgewiesen werden. Abbildung 42 zeigt das LC/MS-Spektrum des semisynthetischen $^{1-201}$ Rab7 Δ C6-Cys-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(Ger-Dansyl)-OMe-Proteins.

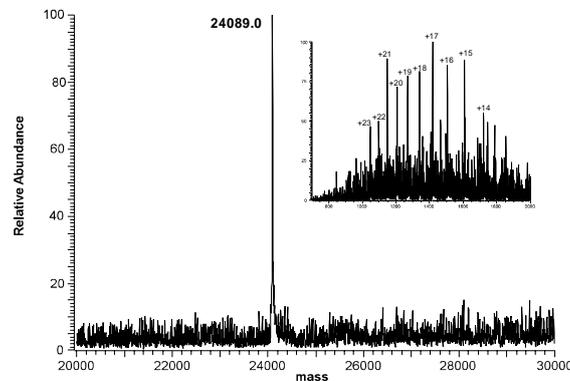


Abbildung 42: LC/MS-Spektrum des semisynthetischen $^{1-201}$ Rab7 Δ C6-Cys-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(Ger-Dansyl)-OMe (berechnete Masse = 24 090 Da).

In einem späteren Komplexierungsversuch konnte gezeigt werden, dass das semisynthetische $^{1-201}\text{Rab7}\Delta\text{C6-CECSC(GerGer)SC(Ger-Dansyl)-OMe}$ mit REP-1 einen stöchiometrischen Komplex formte. Abbildung 43 zeigt den Erfolg der Komplexierung. Der Rab7:REP-1 Komplex eluierte unter Verwendung einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule bei der zu erwartenden Position von 100 kDa.

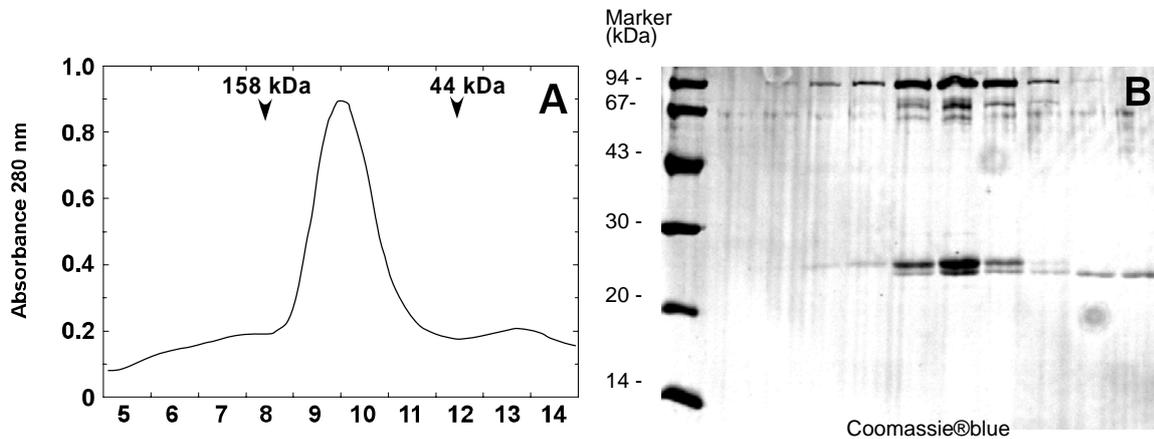


Abbildung 43: A: Superdex-200 Gelfiltrationschromatogramm von $^{1-201}\text{Rab7}\Delta\text{C6-CECSC(GerGer)SC(Ger-Dansyl)-OMe:REP-1}$ Komplex; B: SDS-PAGE Gel der gewonnenen Fraktionen.

Das semisynthetische $^{1-201}\text{Rab7}\Delta\text{C6-CECSC(GerGer)SC(GerGer)-NH-Et-NH-Dansyl}$ konnte dagegen mit seinen molekularen Chaperonen REP-1 oder GDI weniger erfolgreich komplexiert werden. Die Einführung der sterisch anspruchsvollen Dansyl-Gruppe anstelle des nativen Methylesters schien die Komplexbildung des semisynthetischen Rab-Proteins mit REP-1 oder GDI zu verhindern. Aus diesem Grund wurde unter Zuhilfenahme von bekannten strukturellen Daten die Interaktion eines lipidierten C-Terminus des Ypt1-Proteins mit dem Lipid-bindenden Bereich des GDI Moleküls dargestellt. Abbildung 44 zeigt ein Modell der Interaktion des Dipeptids $\text{Cys-Cys(GerGer)-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-Dansyl}$ mit der Domäne II des GDI Moleküls. Die C-terminale Geranylgeranylgruppe des Dipeptids wird von einer hydrophoben Tasche umschlossen, die durch die Domäne II des GDIs geformt wird. Durch diese Koordination des Lipidrestes ist die Konformation des C-terminalen Cysteins vorgegeben, so dass die Dansylgruppe als sterisch anspruchsvoller Substituent am C-Terminus mit der Domäne II in Konflikt gerät. Dies könnte das beobachtete Ergebnis, dass das semisynthetische $\text{Rab7}\Delta\text{C6-CECSC(GerGer)SC(GerGer)-NH-Et-NH-Dansyl}$ keinen stöchiometrischen Komplex mit seinen Chaperonen REP-1 oder GDI formt, erklären.

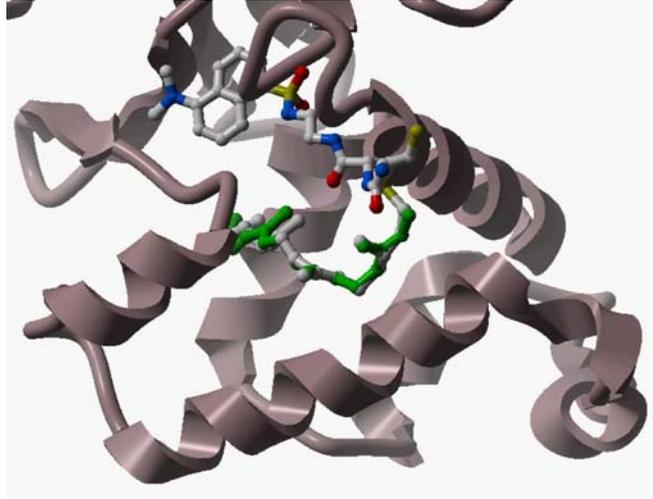


Abbildung 44: Modell zur Darstellung der Interaktion des Dipeptids Cys-Cys(GerGer)-NH-(CH₂)₂-NH-Dansyl mit der Domäne II des GDIs.

4.1.5. Semisynthese prenylierter Rab-Proteine im Multimilligramm Maßstab

4.1.5.1. Synthese der Peptide

Um die semisynthetischen Rab/Ypt-Proteine für die Untersuchung der noch weitgehend ungeklärten biochemischen, zellulären Vorgänge, an denen die Proteine beteiligt sind, auf molekularer Ebene zu nutzen, sollten diese in der kristallographischen Strukturaufklärung eingesetzt werden. Für eine Kristallisation müssen die entsprechenden Proteine bzw. Protein-Komplexe in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen.

Um eine Herstellung prenylierter, semisynthetischer Rab-Proteine im Multimilligramm-Maßstab zu erleichtern, sollten verkürzte, einfach zugängliche Peptide synthetisiert werden, die einen Zugang zu größeren Mengen des lipidierten Peptids ermöglichen. Aus diesem Grund wurden verkürzte Peptide synthetisiert, die ausschließlich aus den notwendigen Cysteinen aufgebaut sind, die zum Einen die Prenylreste tragen und zum Anderen für die EPL notwendig sind.

Hierzu wurde das N-terminale Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH mit *N*-Hydroxysuccinimid voraktiviert und anschließend mit geranylgeranyliertem Cystein **8** zum Dipeptid **46** verlängert (Abbildung 45). Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe konnte Dipeptid **47** nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 70% erhalten werden. Die Lösungssynthese bot somit unter Verwendung des lipidierten Bausteins **8** einen sehr

einfachen und effizienten Zugang zu dem gewünschten Lipopeptid. Dipeptid **47** stand in Multimilligramm-Mengen für die EPL zur Verfügung.

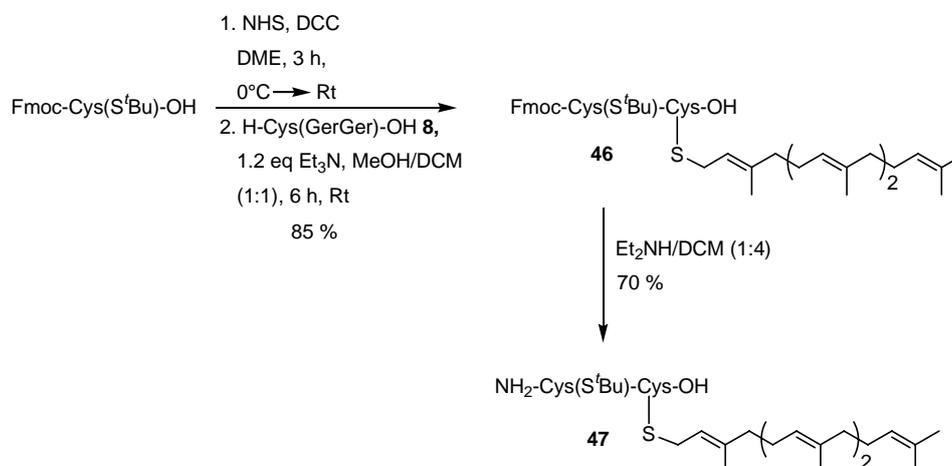


Abbildung 45: Synthese des Dipeptids **47** in Lösung.

Die Verlängerung des Dipeptids **46** zu dem entsprechenden Tripeptid unter Verwendung des prenylierten Cysteins **8** konnte in Lösung nur mit einer geringen Ausbeute realisiert werden, da die Aufreinigung des Produkts schwierig war. Aus diesem Grund wurde eine Festphasensynthese des gewünschten Tripeptids anvisiert. Für die Festphasensynthese wurde das 2-Chlorotriethylchlorid-Harz verwendet, das eine Abspaltung des gebundenen Peptids unter sehr milden sauren Bedingungen ermöglichte, die von den Prenylgruppen toleriert wurden (Abbildung 46). Außerdem ließ das Harz eine sehr leichte Anbindung der ersten Aminosäure (**26**) unter schwach basischen Bedingungen zu, die eine mögliche Racemisierung des Cysteins unterdrückten. Das Harz konnte unter Verwendung von 3 Äquivalenten der Aminosäure **26** quantitativ beladen werden. Die vollständige Beladung des Harzes wurde dabei durch eine Testabspaltung der ersten Aminosäure vom Harz bestimmt. Im zweiten Schritt wurde unter erneuter Verwendung des Cysteinderivats **26** Dipeptid **49** an der festen Phase aufgebaut. Anschließend wurde Dipeptid **49** mit dem für die EPL benötigten N-terminalen Cystein zum Tripeptid **50** verlängert. Das N-terminal geschützte Tripeptid **51** konnte im Anschluss mit 1%-iger TFA-Lösung mit einer Ausbeute von 95 % (bezogen auf die Beladung des Harzes) abgespalten werden. Eine Aufreinigung des Peptids war nach dessen Abspaltung nicht notwendig.

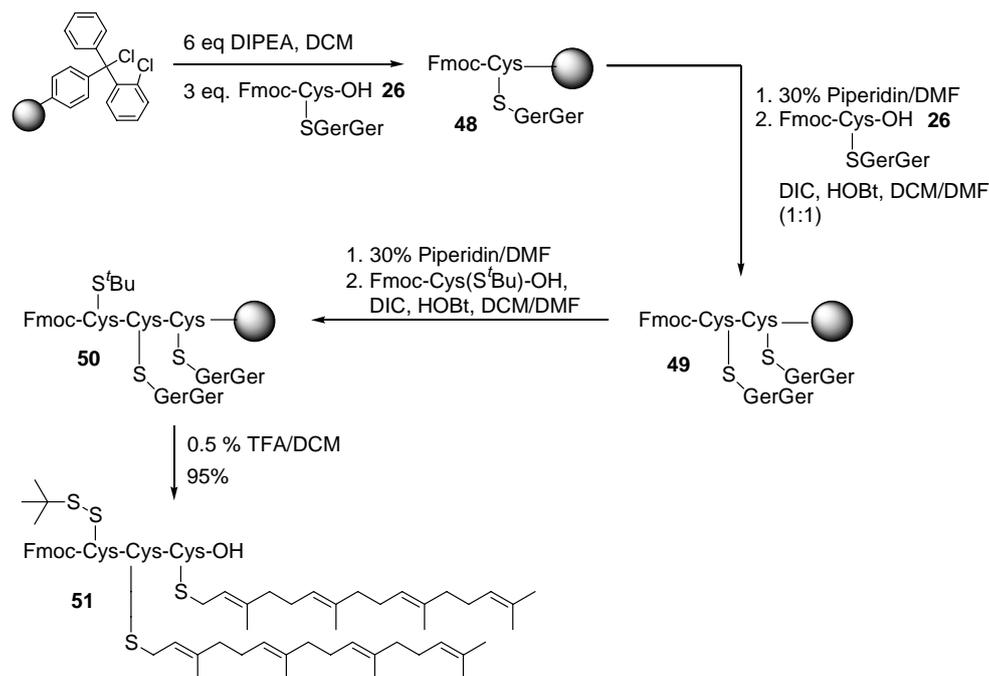


Abbildung 46: Synthese des Tripeptids **51** an der festen Phase unter Verwendung des lipidierten Bausteins **26**.

In einem ersten Versuch wurde das Tripeptid **50** an der festen Phase N-terminal entschützt. Das entschützte Tripeptid konnte jedoch anschließend nicht erfolgreich von der festen Phase abgespalten werden. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde daher nach der Abspaltung des Peptids **51** vom Harz in Lösung unter Verwendung der flüchtigen Base Diethylamin durchgeführt (Abbildung 47). Da die Aufreinigung des ungeschützten Tripeptids **52** mit einem großen Substanzverlust verbunden war, wurde des Weiteren auf eine Aufreinigung verzichtet. Tripeptid **52** stand somit in größeren Mengen für die spätere EPL zur Verfügung.

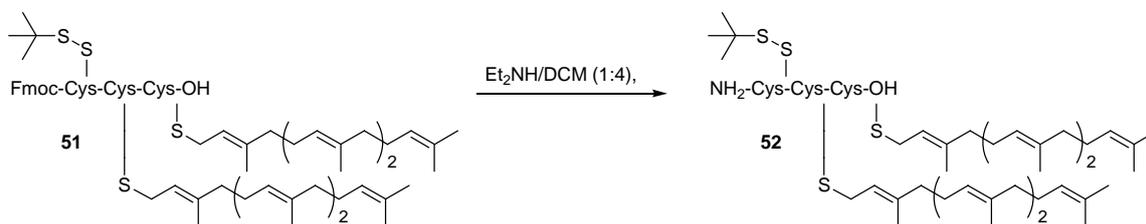


Abbildung 47: Entschützung des Tripeptids **51**.

4.1.5.2. Ligation der Peptide an verkürzte Ypt1-Proteine

Für die Herstellung der einfach und zweifach prenylierten, semisynthetischen Ypt1-Proteine wurden von Thomas Durek aus dem Arbeitskreis von Prof. R. S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie die C-terminal verkürzten Proteine in *E. coli* exprimiert, auf einer Chitinsäule immobilisiert und anschließend mit einem Überschuss an Thiolreagenz von der Säule eluiert. Der so erhaltene C-terminale Aktivester wurde mit dem N-terminal ungeschützten Dipeptid **47** und Tripeptid **52** zur Ligation gebracht (Abbildung 48). Dies führte zu einer vollständigen Umsetzung der um zwei bzw. drei Aminosäuren verkürzten Ypt1-Proteine zu den entsprechenden prenylierten, semisynthetischen Ypt1-Proteinen.

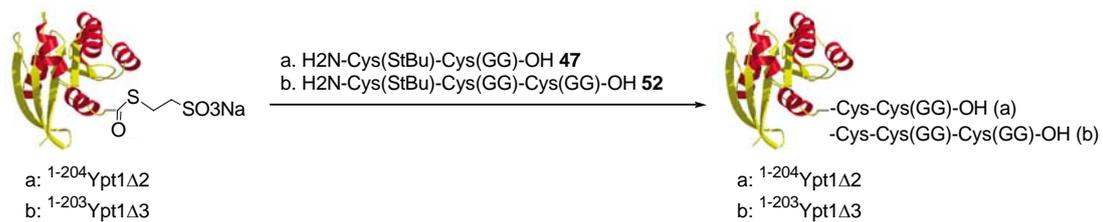


Abbildung 48: Ligation der synthetisierten Peptide **47** und **52** mit $^{1-204}$ Ypt1Δ2- bzw. $^{1-203}$ Ypt1Δ3-Thioester.

Nach erfolgreicher Ligation des Dipeptids **47** zum $^{1-204}$ Ypt1Δ2-CC(GG)-OH konnte durch die anschließende Zugabe von GDI der einfach prenylierte, stöchiometrische Ypt1Δ2-CC(GG):GDI Komplex erhalten und über eine Superdex-200 Gelfiltrationssäule aufgereinigt werden. Abbildung 49 zeigt das SDS-PAGE Gel des Ypt1Δ2-CC(GG)-OH :GDI Komplexes und das MALDI-TOF-Massenspektrum des semisynthetischen Protein-Komplexes.

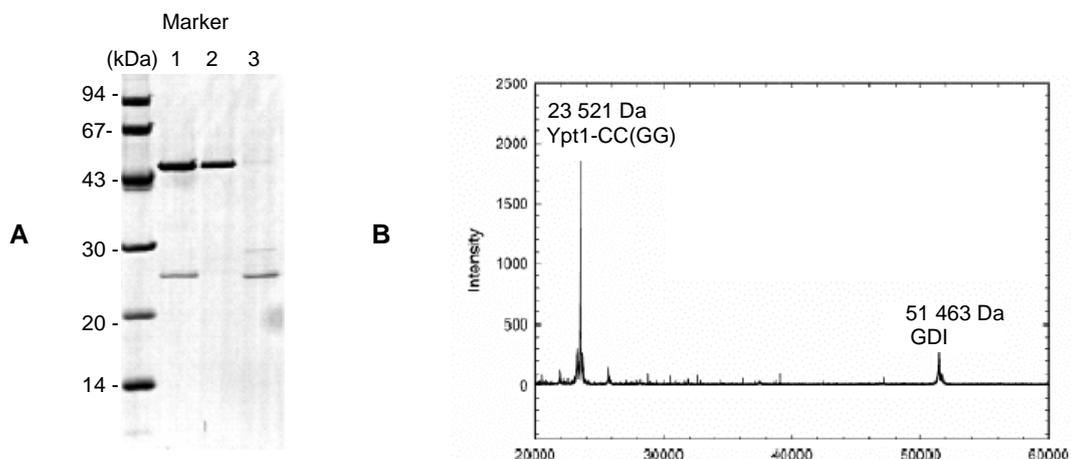


Abbildung 49: **A:** SDS-PAGE Gel vom Ypt1Δ2-CC(GG)-OH :GDI Komplex (1), von GDI (2) und vom $^{1-204}$ Ypt1Δ2-Thioester (3); **B:** MALDI-TOF-Spektrum des stöchiometrischen Komplexes Ypt1-CC(GG) :GDI (berechnete Massen: $^{1-204}$ Ypt1-CC(GG) = 23 486 Da; GDI = 51 401 Da).

Auch Tripeptid **52** wurde erfolgreich mit $^{1-203}\text{Ypt1}\Delta 3$ -Thioester zur Ligation gebracht. Das semisynthetische Protein wurde anschließend mit GDI stöchiometrisch komplexiert. Abbildung 50 zeigt das MALDI-TOF-Massenspektrum des zweifach prenylierten Ypt1-CC(GG)-C(GG):GDI Komplexes. Die berechnete Masse des $^{1-203}\text{Ypt1-CC(GG)-C(GG)}$ -Proteins beträgt 23 841 Da und die des GDIs 51 401 Da. Die Abweichungen sind dabei auf Ungenauigkeiten des MALDI-Massenspektrometers zurückzuführen.

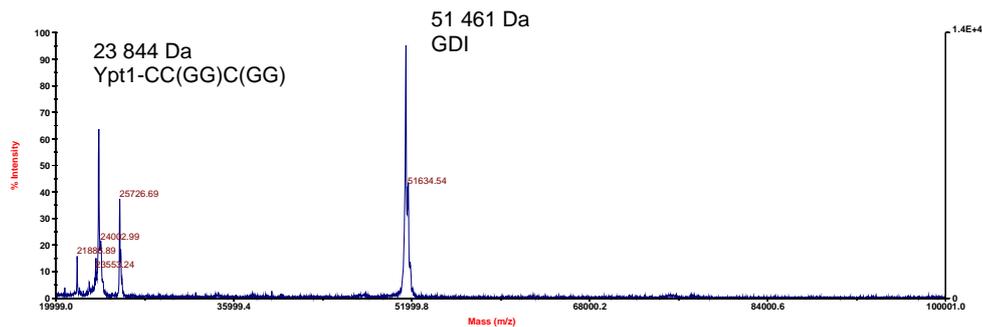


Abbildung 50: MALDI-TOF-Spektrum des stöchiometrischen Komplexes $^{1-203}\text{Ypt1-CC(GG)-C(GG)}:\text{GDI}$.

Nach der vollständigen Umsetzung des Ypt1 $\Delta 2/3$ -Thioester zu den einfach bzw. zweifach geranylgeranyierten Ypt1-Proteinen wurde in beiden Fällen durch Zugabe von GDI die prenylierten Ypt1:GDI Komplexe erhalten. Die semisynthetischen Protein-Komplexe wurden anschließend von Dr. Alexey Rak am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie erfolgreich kristallisiert. Es wurden Kristalle mit einer Auflösung von 1.5 Å bzw. 1.8 Å erhalten (Abbildung 51).

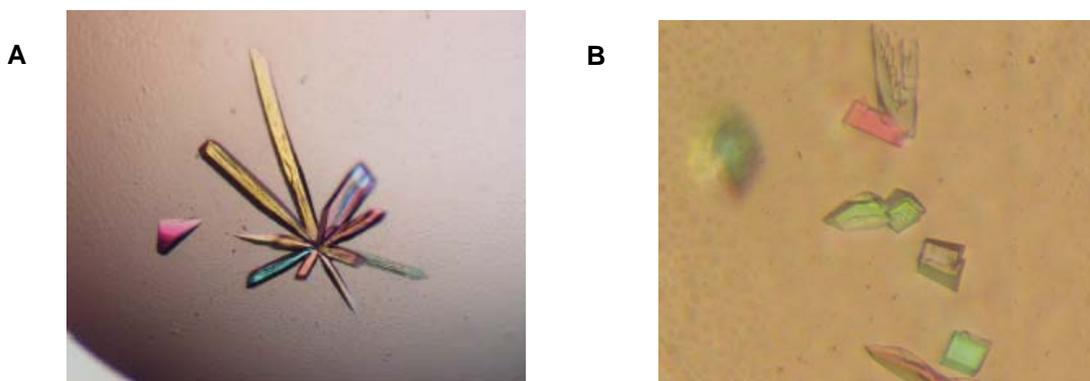


Abbildung 51: **A:** Kristalle mit einer Auflösung von 1.5 Å des $^{1-204}\text{Ypt1-CC(GG):GDI}$ Komplexes; **B:** Kristalle mit einer Auflösung von 1.8 Å des $^{1-203}\text{Ypt1-CC(GG)C(GG):GDI}$ Komplexes.

4.1.5.3. Strukturaufklärung des prenylierten Ypt1:GDI Komplexes

Die Kristalle des einfach prenylierten Ypt1-CC(GG):GDI Komplexes wurden von Dr. Alexey Rak am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie für eine erfolgreiche Strukturaufklärung des Komplexes mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse genutzt (Abbildung 52).^[199] Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, dass bei der Komplexbildung des Ypt1-Proteins und GDI nur eine geringe Konformationsänderung vorliegt. Ypt1 tritt hauptsächlich mit den Switch I- und Switch II-Regionen mit der *Rab binding site* des GDIs in Kontakt. Die Switch I- und Switch II-Regionen sind bei allen Rab/Ypt-Proteinen hochkonservierte und stark flexible Regionen, deren Position und Flexibilität vom gebundenem Nukleotid abhängen. Nur in der GDP-gebundenen Form weisen die Switch-Regionen eine Konformation auf, die eine Interaktion mit der *Rab binding site* des GDIs ermöglicht, so dass es zu einer Komplexbildung zwischen Ypt1 und GDI kommen kann. Dies erklärt die beobachtete nukleotidabhängige Erkennung der Rab/Ypt-Proteine durch Mitglieder der GDI/REP Familie (Abbildung 52).^[199]

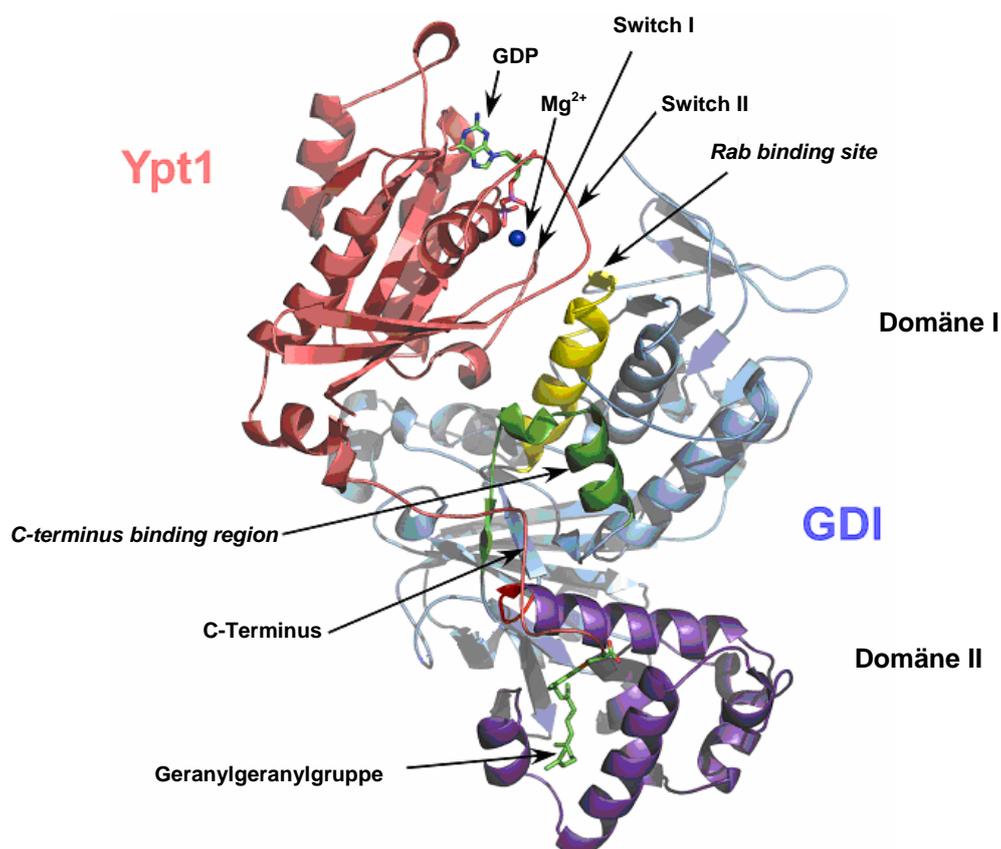


Abbildung 52: Struktur des prenylierten ¹⁻²⁰⁴Ypt1-CC(GG):GDI Protein-Komplexes: Ypt1-Proteins (rot); GDI (blau) ist aus der Domäne I (hell blau) und der Domäne II (dunkel blau) aufgebaut; Domäne II besteht aus 4 α -Helices, die eine hydrophobe Tasche bilden, die den Geranylgeranylrest (grün) umschließt.

Die Interaktion von Ypt1 und GDI beruht hauptsächlich auf dem Kontakt der letzten 20 C-terminalen Aminosäuren des Ypt1-Proteins einschließlich des hydrophoben Isoprenoids mit der Domäne I und II des GDIs. Die Domäne II endet in einer hydrophoben Tasche, welche die Geranylgeranyl Gruppe einschließt. Diese hydrophobe Tasche wird durch vier α -Helices in der Domäne II des GDIs während der Komplexbildung mit Ypt1 geformt. Sie enthält zahlreiche hydrophobe Reste in der inneren Umgebung (Abbildung 52 und 53).

Abbildung 53 zeigt die so genannte *C-terminus binding region* (gold-braun), die eine 90°-Drehung des C-Terminus des Ypt1-Proteins verursacht. Diese 90°-Drehung ermöglicht dem geranylgeranyliertem C-Terminus, mit der hydrophoben Tasche der Domäne II des GDI-Proteins in Wechselwirkung zu treten.

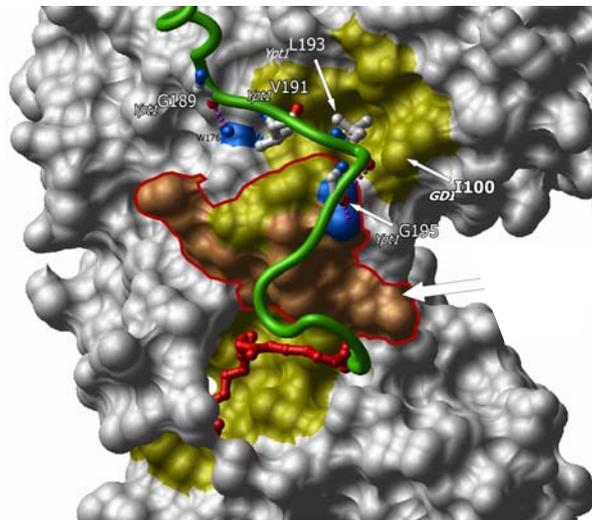


Abbildung 53: Lokalisierung des prenylierten C-Terminus von Ypt1 im Komplex mit GDI: die Domäne II des GDIs enthält die so genannte *C-terminus binding region* (gold-braun), die eine 90°-Drehung des C-Terminus des Ypt1-Proteins (grün) verursacht; diese endet in einer hydrophoben Tasche, die den Prenylrest (rot) umschließt.

Der C-Terminus der Rab/Ypt-Proteine ermöglicht die Zielsteuerung der Rab/Ypt-Proteine zu bestimmen subzellulären Kompartimenten und ihre Erkennung durch membrangebundene Rezeptoren, die für die Anlieferung bzw. das Herausziehen der Rab/Ypt-Proteine an bzw. aus den unterschiedlichen Membranen verantwortlich sind.^[97,200]

Verschiedene Studien zeigen, dass Mutationen des GDI_{I100} zu einer fehlerhaften Membranextraktion und Anlieferung der Rab-Proteine an die Zielmembranen durch das GDI-Protein führen.^[201,202] Die Strukturaufklärung des einfach prenylierten Ypt1:GDI Komplexes zeigt, dass GDI_{I100} in der C-Terminus koordinierenden Region liegt (Abbildung 53). Dies erklärt das Fehlverhalten der mutierten GDI-Proteine: Die Mutation in der C-Terminus

koordinierenden Region führt zu einer fehlerhaften Koordination des C-Terminus der Rab-Proteine, so dass dieser nicht in die Richtung der hydrophoben Tasche gelenkt wird. Dies wiederum führt dazu, dass die Prenylgruppe von der hydrophoben Tasche nicht koordiniert werden kann, was schließlich zu einer fehlerhaften Extraktion der Rab-Proteine aus den Membranen führt.

Mutationen des GDIs manifestieren sich in Krankheiten wie z.B. einer mentalen Zurückgebliebenheit.^[202] Im allgemeinen führen Mutationen bei Mitgliedern der RabGDI/REP Familie zu Krankheiten, wie z.B. der Choroidremia (CHM), einer degenerativen Netzhauterkrankung, die im mittleren Alter zur Erblindung führen kann.^[203]

4.1.6. Synthese und Ligation Pt-Pincer-modifizierter Peptide

Durch die Kristallstruktur des monoprenylierten Ypt1-Proteins konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des Rab-Proteins durch die Komplexierung des Prenylrestes in einer hydrophoben Tasche in der Domäne II des GDIs fixiert wird. Trotz erfolgreicher Kristallisation des zweifach prenylierten, semisynthetischen Ypt1-Proteins ist jedoch bisher keine Strukturaufklärung des zweifach prenylierten Protein-Komplexes gelungen. Dies lässt die Frage offen, wo sich in dem Protein-Komplex der zweite Geranylgeranylrest befindet.

Die Einführung eines Schwermetalls in den C-terminalen Bereich des Rab-Proteins würde zu einer lokalen Erhöhung der Elektronendichte im C-Terminus führen, und somit möglicherweise eine Röntgenstrukturanalyse erleichtern. Aus diesem Grund sollte die gezielte Einführung eines Schwermetalls in den C-Terminus des Rab-Proteins über den semisynthetischen Ansatz realisiert werden. Die gezielte Einführung eines Metalls in den C-Terminus eines Proteins könnte des Weiteren in Zellokalisierungsstudien mit Hilfe der Elektronenmikroskopie oder in NMR-Studien Anwendung finden. Aus einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. G. Van Kooten an der Universität in Utrecht stand ein Platin-komplexierender Pincer-Baustein zur Verfügung. Der semisynthetische Ansatz unter Verwendung eines mit dem Platin-Pincer modifizierten Peptids sollte eine direkte Einführung des Metalls in den C-Terminus der Rab-Proteine ermöglichen.

Für die Einführung des Pincers in den C-Terminus der Rab7-Proteine wurde der Lysinrest in der Seitenkette mit dem Platin-Pincer modifiziert (Abbildung 54). Hierbei wurde der Pincer-Baustein als Aktivester unter basischen Bedingungen erfolgreich an die Seitenkette des *N*^ε-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*L*-lysins gekuppelt.

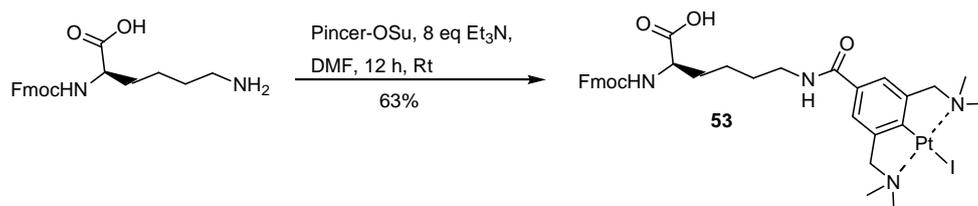


Abbildung 54: Synthese des Pincer-modifizierten Lysin Derivats **53**.

Die Aminosäuresequenz des gewünschten Peptids sollte weitestgehend der nativen Sequenz des Rab-Proteins entsprechen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass der Methylester für eine erfolgreiche Ligationsreaktion des Rab-C-Terminus nicht notwendig war. Daher sollte für die Synthese des Pincer-Peptids das 2-Chlorotrylchlorid-Harz verwendet werden, das eine Abspaltung des Peptids als freie Säure ermöglichen würde. Das Hydrazid-Harz wurde bei der Synthese des Pincer-modifizierten Peptids nicht verwendet werden, da das für die Abspaltungsreaktion benötigte Kupferacetat mit dem Platin-Pincer unerwünschte Komplexe bildete.

Abbildung 55 zeigt die Synthese des zweifach geranylgeranylierten und mit dem Pincer-modifizierten Hexapeptids **58**. Das Harz wurde hierzu mit dem prenylierten Cystein **26** beladen und anschließend an der festen Phase mit dem Trt-geschützten Serin zum Dipeptid **55** umgesetzt. Durch Wiederholung der beiden Reaktionsschritte konnte das Tetrapeptid **56** aufgebaut werden. Anstelle der nativen Glutaminsäure wurde das Pincer-modifizierte Lysinderivat **53** zur Verlängerung des immobilisierten Peptids zum Pentapeptid **57** eingesetzt. Das für die EPL benötigte Cystein wurde im letzten Schritt der Synthese eingeführt. Hexapeptid **58** konnte schließlich mit 0.5%-iger TFA unter gleichzeitiger Abspaltung der Trityl-Schutzgruppen der Serine von der festen Phase abgespalten werden. Bezogen auf die Beladung des Harzes wurde Peptid **58** mit einer Ausbeute von 70% erhalten, wobei kein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig war.

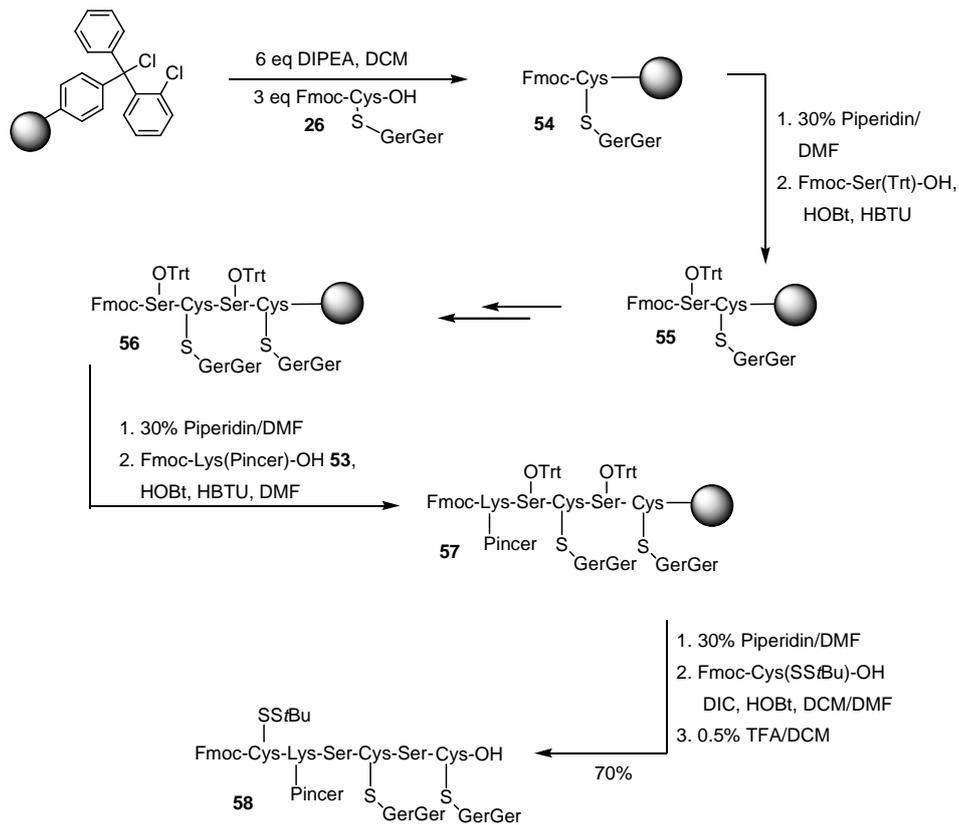


Abbildung 55: Synthese des Pincer-modifizierten Hexapeptids **58** an der festen Phase.

Als nächstes wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und das erhaltene Peptid mit $^{1-201}$ Rab7 Δ 6-Thioester umgesetzt (Abbildung 56). Die Ligation wurde im Ligationspuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH=7.5) unter Zugabe von Mesna (50 mM) durchgeführt. Bedauerlicherweise konnte jedoch kein Ligrationsprodukt erhalten werden. Trotz langen Reaktionszeiten und Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40°C wurde keine Umsetzung des um 6 Aminosäuren verkürzten Rab-Proteins beobachtet.

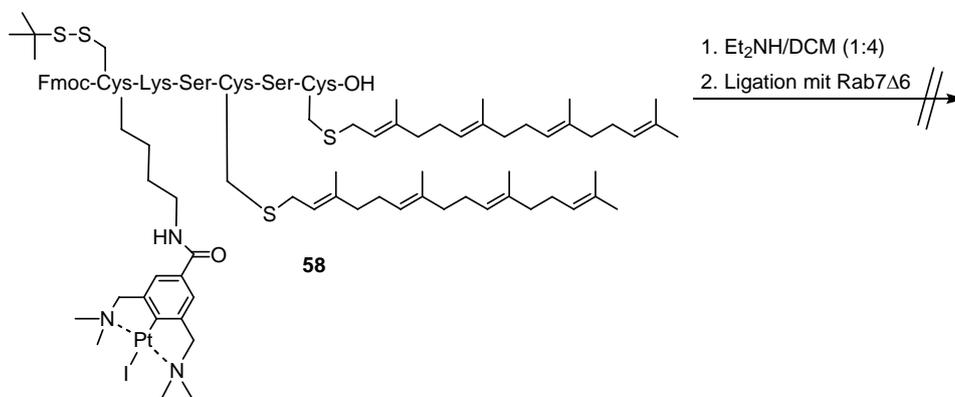


Abbildung 56: Entschützung und versuchte Ligation des Hexapeptids.

Um die Ligrationsreaktion eines Pincer-modifizierten Peptids weiter zu untersuchen, wurde zunächst das einfach zugängliche, Pincer-modifizierte Tripeptid **61** an der festen Phase aufgebaut (Abbildung 57 **B**). Analog wurde das entsprechende NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-modifizierte Peptid **60** synthetisiert. Hierzu wurde Fmoc-geschütztes Lysin zuerst mit NBD-Chlorid in der Seitenkette fluoreszenzmarkiert (Abbildung 57 **A**) und anschließend für die Festphasensynthese verwendet. Beide Peptide **60** und **61** wurden im Anschluss N-terminal entschützt.

Um einen direkten Vergleich zwischen dem Pincer-modifizierten Peptid (Tripeptid **61**) und dem NBD-modifizierten Peptid (Tripeptid **60**) zu haben, wurden beide synthetisierten Peptide unter den gleichen Bedingungen mit Rab7Δ3-Thioester zur Ligation gebracht. Die Ligation des Tripeptids **62** verlief mit einem vollständigen Umsatz des Rab-Proteins zu dem semisynthetischem, fluoreszenzmarkierten Ligrationsprodukt. Im Gegensatz dazu konnte jedoch bei der Ligation des Pincer-Peptids **63** kein Umsatz zum gewünschten Ligrationsprodukt beobachtet werden.

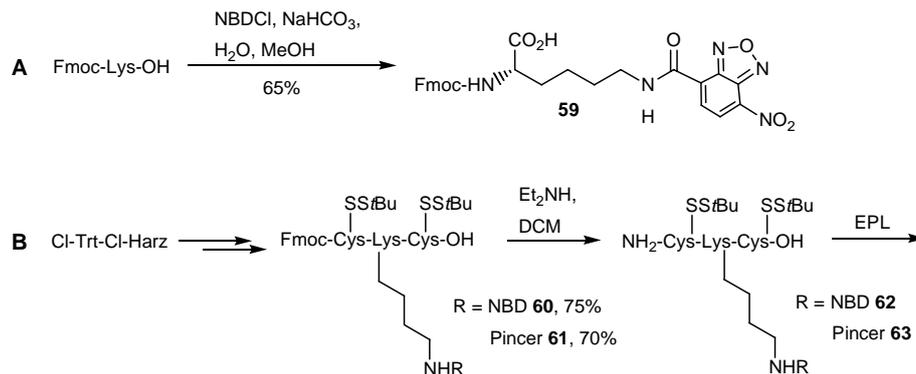


Abbildung 57: Synthese des NBD- (**60**) und Pincer- (**61**) modifizierten Tripeptids.

Da die *Expressed Protein Ligation* mit den Pincer-Peptiden nicht realisiert werden konnte, sollte als nächstes die MIC-Ligation mit verkürztem $^{1-181}\text{N}$ -Ras-Protein untersucht werden, das von der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zur Verfügung gestellt wurde. Für die ersten Untersuchungen der MIC-Ligation des $^{1-181}\text{N}$ -Ras-Proteins mit einem Pincer-modifizierten Modellpeptid wurde Peptid **64** an der festen Phase ebenfalls unter Verwendung des 2-Chlorotrylchlorid-Harzes synthetisiert (Abbildung 58). Das Peptid konnte mit einer Ausbeute von 65% sauber von der festen Phase abgespalten werden, und wurde anschließend mit $^{1-181}\text{N}$ -Ras ligiert. Die Ligation verlief dabei erfolgreich mit nur einem geringen Überschuss an Peptid **64** unter vollständigem Umsatz des $^{1-181}\text{N}$ -Ras zu dem semisynthetischen Pincer-modifizierten Ras-Protein.

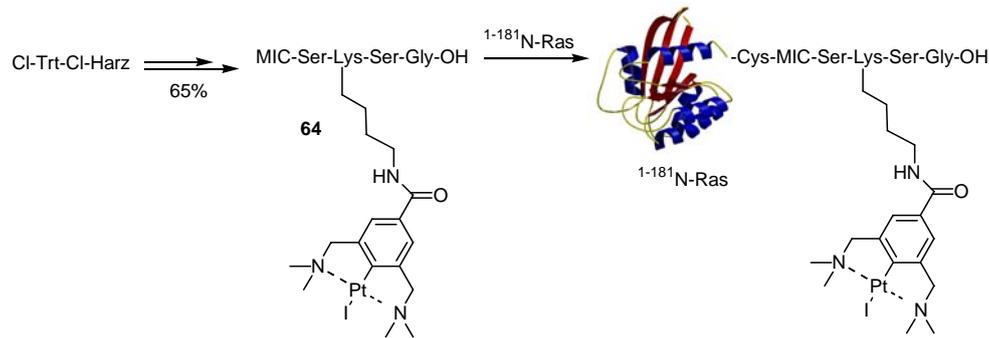


Abbildung 58: Synthese und Ligation des Pincer-modifizierten Peptids **64**.

Das Ligationsprodukt konnte anschließend über eine DEAE-Gelfiltrationssäule aufgereinigt werden. Abbildung 59 zeigt das LC/MS-Spektrum des aufgereinigten Ligationsproduktes N-Ras-MIC-SK(Pincer)SG (berechnete Masse von [$^{1-181}\text{N-Ras-MIC-SK(Pincer)SG} - \text{I}$] = 21 380 Da)

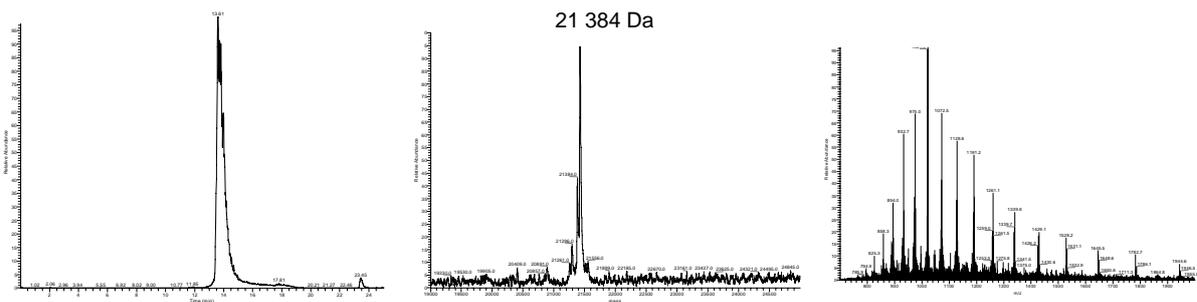


Abbildung 59: LC/MS-Spektrum des aufgereinigten Ligationsproduktes $^{1-181}\text{N-Ras-MIC-SK(Pincer)SG}$.

Auf Grund der erfolgreichen MIC-Ligation des MIC-SK(Pincer)SG **64** mit $^{1-181}\text{N-Ras}$ sollte des Weiteren der vollständig funktionalisierte C-Terminus des N- bzw. H-Ras-Proteins mit dem Pincer modifiziert werden. Die Lokalisierung solcher vollständig prozessierter und mit dem Pincer ausgestatteter Ras-Proteine in den Zellmembranen könnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Dies würde eine zur Fluoreszenz alternative und attraktive Visualisierungsmethode darstellen.

Die native Sequenz des vollständig prozessierten H-Ras $^{181}\text{C(Pal)KC(Far)VLS-OMe}$ würde eine Anbindung des Pincers an dem nativen $^{182}\text{Lysinrest}$ ermöglichen. Der C-Terminus der H-Ras-Proteine $^{181}\text{CKCVLS}$ wird *in vivo* in einem posttranslationalen Prozess zuerst am $^{183}\text{Cysteinrest}$ farnesyliert, anschließend wird der Methylester eingeführt und daraufhin ^{181}Cys palmitoyliert.

Aus diesem Grund sollte ein C-Terminus mit folgender Sequenz synthetisiert werden: MIC-Cys(*StBu*)-Lys(Pincer)-Cys(Far)-Val-Leu-Ser-OH. Dieser würde nach dessen Ligation und

späterer Mikroinjektion des semisynthetischen Ras-Proteins in eine Zelle zur Erkennung des CAAX-Motifs durch die Protease führen. Nach proteolytischer Abspaltung der letzten drei Aminosäuren (-AAX) würde der Methyl ester schließlich *in vitro* durch die Methyltransferase eingeführt werden. Der C-terminale Cysteinrest sollte mit einer *S*-*tert*-butyl-Schutzgruppe geschützt sein. Diese würde später in der Zelle *in situ* entfernt und ^{181}Cys anschließend palmitoyliert werden.

Abbildung 60 zeigt die Synthese des gewünschten Peptids **65**. Die Aminosäuren wurden unter Standardbedingungen gekuppelt. Unter Verwendung des Fmoc-Cys(Far)-OH, das für die Synthese des Peptids in dem Arbeitskreis von Prof. H. Waldmann zur Verfügung stand, und Fmoc-Lys(Pincer)-OH **53** konnte der Pincer-modifizierte C-Terminus des H-Ras-Proteins an der festen Phase aufgebaut werden. Zuletzt wurde die MIC-Gruppe in das Peptid eingeführt und Peptid **65** mit einer bezogen auf die Beladung des Harzes ermittelten Ausbeute von 65% von der festen Phase abgespalten.

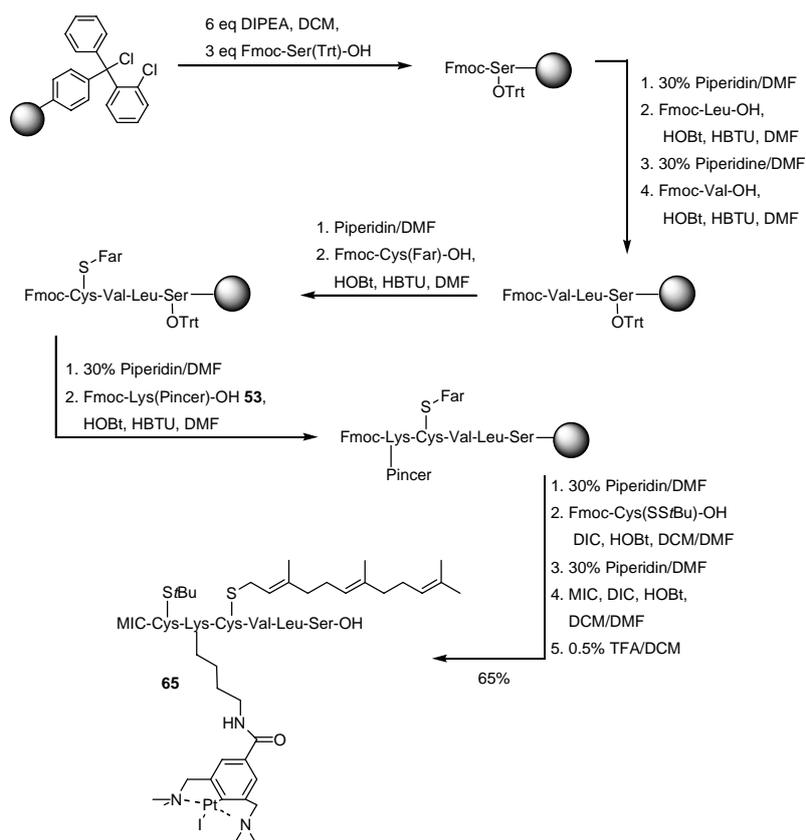


Abbildung 60: Synthese des prenylierten und Pincer-modifizierten H-Ras C-Terminus **65**.

Hexapeptid **65** wurde anschließend mit $^{1-181}\text{N}$ -Ras ligiert. Die Ligation verlief dabei trotz des großen Überschusses an Peptid **64** mit einem nicht vollständigen Umsatz des $^{1-181}\text{N}$ -Ras zu

dem semisynthetischen Pincer-modifizierten Ras-Protein. Abbildung 61 zeigt das LC/MS-Spektrum des Ligationsansatzes.

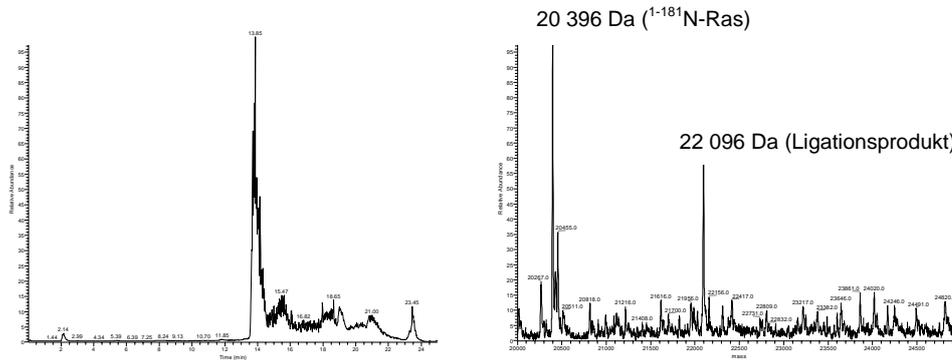


Abbildung 61: LC/MS-Spektrum des Ligationsansatzes: berechnete Masse des semisynthetischen $^{1-181}\text{N-Ras-MIC-C(S}t\text{Bu)K(Pincer)-C(Far)VLS} = 22\,073\text{ Da}$.

Nach einer Aufreinigung des Ligationsansatzes könnte schließlich das Pincer-modifizierte semisynthetische H-Ras-Protein über eine Mikroinjektion in die Zelle gebracht werden. Das pränylierte Protein sollte dann mit Hilfe der Elektronenmikroskopie über den Pt-Pincer in der Zellmembran lokalisiert werden können.

4.2. Synthese eines vielseitig modifizierbaren Bausteins zur Einführung spezifischer Gruppen in Proteine

4.2.1. Konzept und Syntheseplan des Bausteins

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein dreifach orthogonal substituiertes Benzolderivat synthetisiert werden, welches selektiv über einen Cysteinrest bzw. eine MIC-Gruppe am C-Terminus eines Proteins oder über einen Thioester am N-Terminus eines Proteins mittels *Expressed Protein Ligation* (EPL) bzw. MIC-Ligation eingeführt werden kann. Solch ein Baustein würde die selektive Einführung verschiedener funktioneller Gruppen in Proteine ermöglichen und könnte z.B. für die Einführung von Fluoreszenzmarkern in ein Protein eingesetzt werden. Um eine flexible Modifizierung des Bausteins zu ermöglichen sollte die Synthese an der festen Phase erfolgen.

Ausgehend von einem geeigneten Benzolderivat sollte der Baustein zwei Aminogruppen enthalten, die für die Anknüpfung eines spezifischen Markers und des Weiteren für die Anbindung eines für die EPL notwendigen Cysteinderivats oder einer für die MIC-Ligation benötigten MIC-Gruppe genutzt werden könnten. Außerdem sollte der Baustein eine Carboxy-Gruppe aufweisen, die wahlweise in einen Thioester umgesetzt werden kann (Abbildung 62). Solch ein dreifach funktionalisiertes Molekül könnte dann über den Thioester an einen freien Cysteinrest eines Proteins gebunden werden. Läge dagegen das Protein mit einem C-terminalen Thioester vor, würde ein etwaig gebundener Cysteinrest die Möglichkeit der Anbindung an das Protein bieten.

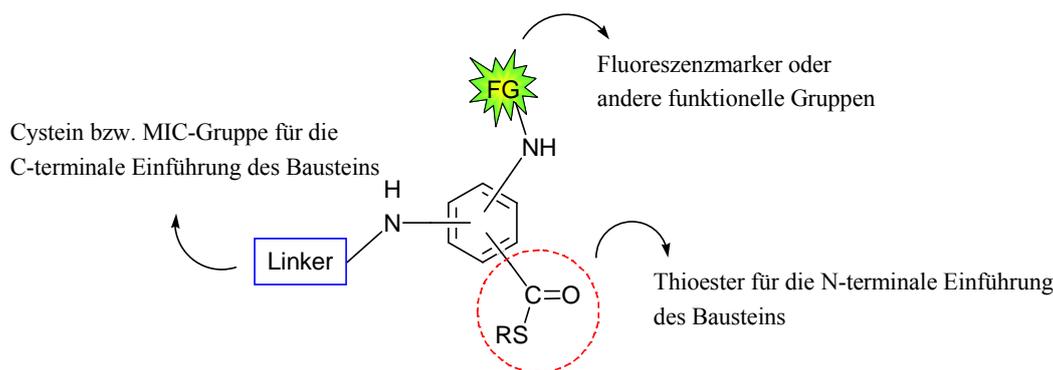


Abbildung 62: Konzept des Bausteins.

Zunächst sollte eine Strategie für die Synthese eines fluoreszenzmarkierten Benzolderivats an der festen Phase entwickelt werden. Als Ankergruppe bietet sich der oxidationsempfindliche Hydrazid-Linker an, da dieser die leichte Anbindung der Ausgangsverbindung über eine freie

Carbonsäuregruppe ermöglicht, dessen Überführung in einen Thioester durch die Abspaltung vom Linker geprüft werden sollte.

Abbildung 63 zeigt eine mögliche Strategie für die Synthese eines fluoreszenzmarkierten Benzol-derivats. Ausgangsverbindung sollte dabei der 5-Nitro-benzol-1,3-dicarbonsäure-dimethylester sein, der sich zum Aldehyd bzw. Alkohol reduzieren lässt. Die gewünschte Aminofunktion zur Anbindung des Fluoreszenzmarkers wäre im Fall des Aldehyds über eine reduktive Aminierung zugänglich. Dazu müsste der Aldehyd geschützt werden und anschließend nach der Methylesterverseifung die freie Säure-Gruppe an das Hydrazidharz gebunden werden. Nach der Abspaltung der Schutzgruppe würde durch reduktive Aminierung ein primäres Amin erzeugt werden. Alternativ könnte der Alkohol in ein Azid überführt werden. Dazu müsste dieser zunächst geschützt und der Baustein anschließend an das Hydrazidharz gebunden werden. Durch Substitution des Alkoholats wäre ein Azid zugänglich, welches sich anschließend zu dem gewünschten Amin reduzieren lässt. Die Oxidation des polymergebundenen Hydrazids mit $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ und die anschließende Abspaltung durch den nucleophilen Angriff eines Thiols sollten zum gewünschten Thioester führen (Weg A). Dieser könnte schließlich über ein freies *N*-terminales Cystein am *N*-Terminus eines Proteins gebunden werden.

Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin und dessen anschließende Kupplung mit einer für die spätere Ligation benötigten Linker-Gruppe würde schließlich zu einem bifunktionalisierten Baustein führen, der nach seiner Abspaltung vom Harz über den semisynthetischen Ansatz zur Einführung eines Fluoreszenzmarkers in ein Protein zur Verfügung stehen würde (Weg B).

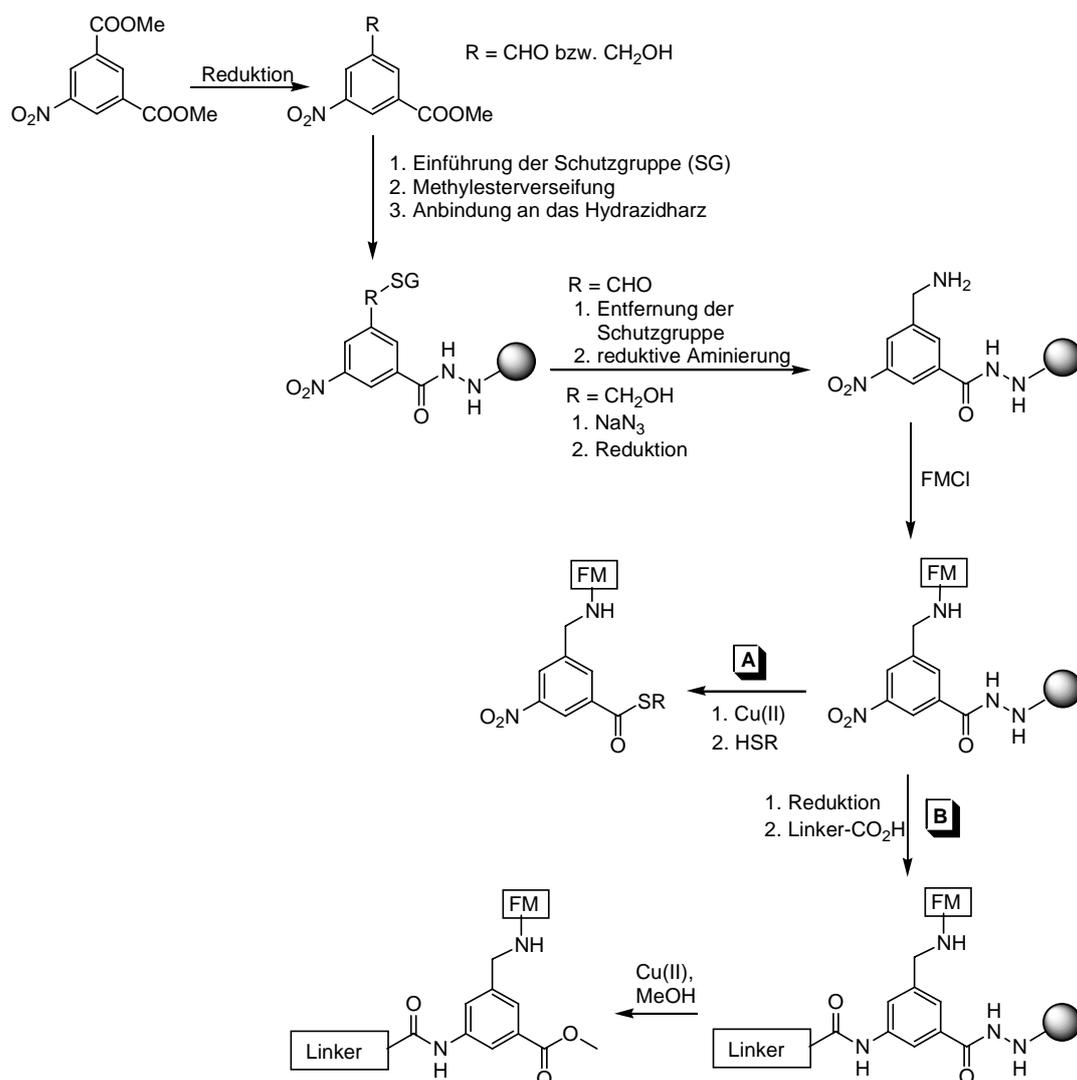


Abbildung 63: Synthesepfad des fluoreszenzmarkierten Benzaldehyds.

4.2.2. Synthese und Ligation von fluoreszenzmarkierten Bausteinen

4.2.2.1. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur C-terminalen EPL

Die Synthese des Bausteins begann mit der Reduktion der Ausgangsverbindung 5-Nitro-1,3-dicarbonylacetat **66** mit Diisobutylaluminiumhydrid zum entsprechenden Alkohol **67** (Abbildung 64). Der Aldehyd **68** konnte anschließend durch Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat quantitativ erhalten werden. Nach der Schützung des Aldehyds zum Acetal **69** konnte der Methylseife verseift und die freie Säuregruppe unter Standardbedingungen an das Hydrazidharz gebunden werden. Es wurde eine vollständige

Beladung des Harzes beobachtet (1.5 mmol/g), welche durch eine anschließende Testabspaltung des Acetals vom Harz bestimmt wurde.

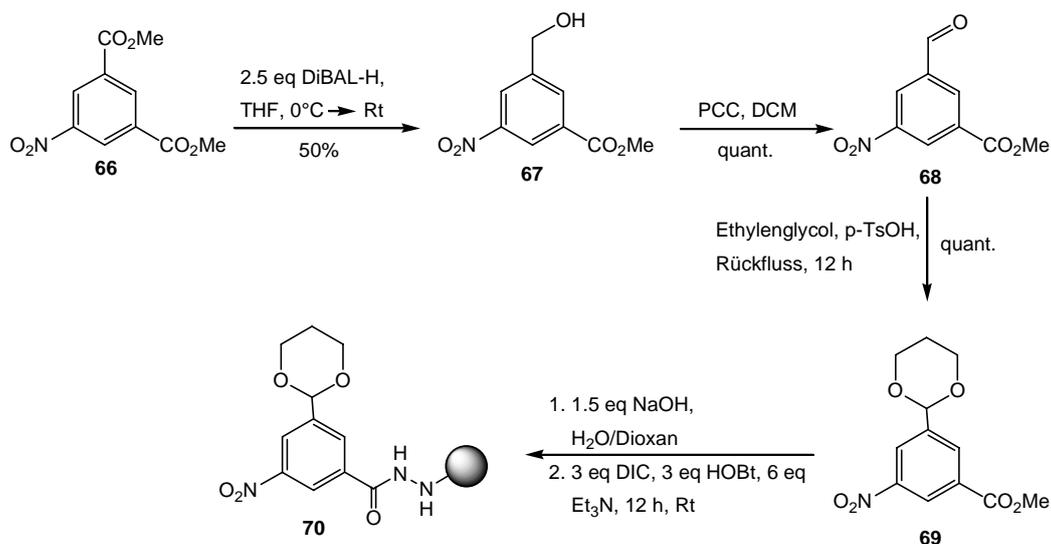


Abbildung 64: Immobilisierung des Benzolderivats an der festen Phase.

Die saure Abspaltung des Acetals an der festen Phase verlief mit 1N HCl in THF erfolgreich. Dies ließ sich durch eine anschließende Testabspaltung des Imins **71a** unter Verwendung von *N*-Propylamin zeigen (Abbildung 65). Die Einführung der Aminogruppe durch eine reduktive Aminierung sollte über literaturbekannte Verfahren, die für eine Lösungssynthese beschrieben wurden,^[204,205] am Harz realisiert werden. Hierbei sollte der Aldehyd zunächst mit Hydroxylamin zum Oxim umgesetzt werden, welches im nächsten Schritt acetyliert werden könnte. Die Reduktion des acetylierten Oxims würde schließlich mit 1M Boran-Lösung zum gewünschten Amin führen. Bedauerlicherweise konnte diese dreistufige Transformation des Aldehyds zum Amin an der festen Phase nicht realisiert werden.

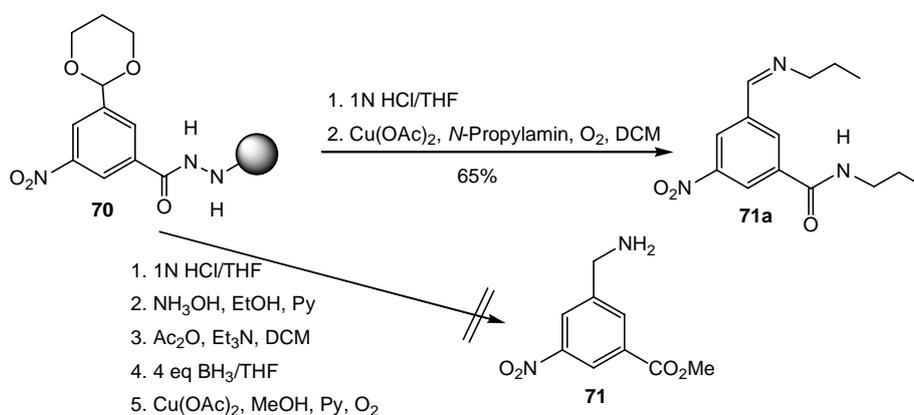


Abbildung 65: Versuch der Einführung der ersten Aminogruppe mit Hilfe der reduktiven Aminierung an der festen Phase.

Um geeignete Reaktionsbedingungen für die Baustein-Synthese zu finden, wurde der fluoreszenzmarkierte Baustein zunächst in Lösung synthetisiert. Dieser sollte ein Cysteinrest für die spätere EPL tragen. Um eine breite Anwendbarkeit zu gewährleisten, sollte dabei das Cystein Schutzgruppen tragen, die sich unter milden Bedingungen abspalten lassen.

Aus diesem Grund wurde das säurelabile *S-para*-Methoxytrityl-geschützte Cysteinderivat **73** synthetisiert (Abbildung 66). Dieses wurde ausgehend von Mmt-geschütztem Cystein **72** generiert, das temporär in den Trimethylsilylester überführt wurde.^[206-208] Anstelle von TMSCl wurde aufgrund der Säureempfindlichkeit des Mmt-geschützten Cysteins Bistrimethylsilylacetamid (BSA) eingesetzt. Die anschließende Reaktion mit Tritylchlorid und die Verseifung des Silylesters mit Methanol führten schließlich zu **73**.

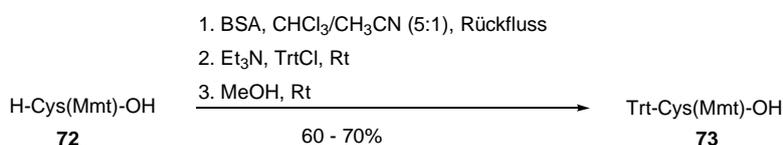


Abbildung 66: Synthese des Mmt-geschützten Cysteinderivats **73**.

Bei der Lösungssynthese konnte der Alkohol **67** mit sehr hoher Ausbeute in das primäre Amin **71** überführt werden (Abbildung 67). Dazu wurde dieser als Mesylat geschützt und anschließend durch Substitution ins Azid **75** überführt. Nach dessen Reduktion zum Amin mit Propandithiol konnte Trt-Cys(Mmt)-OH **73** an den Baustein geknüpft werden (**76**). Die Einführung der zweiten Aminogruppe wurde über die Reduktion der Nitrogruppe mit Palladium auf Aktivkohle realisiert (**77**). Somit konnte im nächsten Schritt der Fluoreszenzmarker, das Dansyl-Fluorophor, an die freie Aminogruppe gebunden werden.

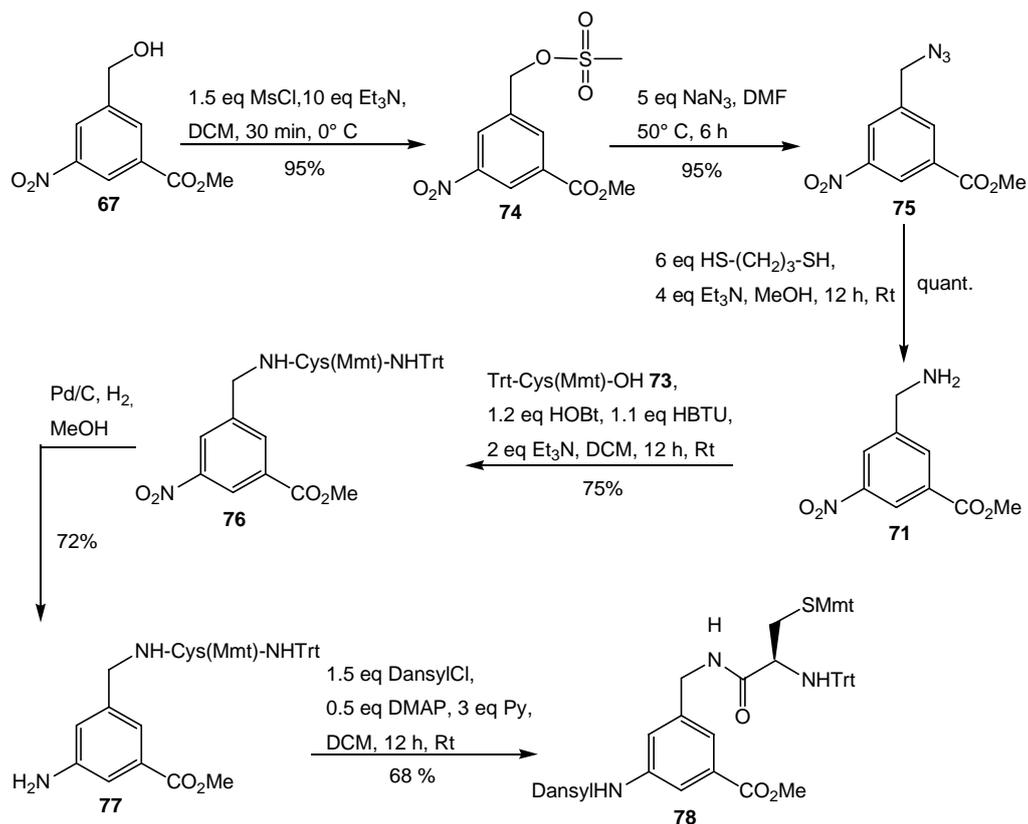


Abbildung 67: Synthese des fluoreszenzmarkierten Bausteins **78** in Lösung.

Da der bifunktionalisierte Baustein **78** über eine einfache Syntheseroute in Lösung, mit sehr hohen Ausbeuten in den einzelnen Reaktionsschritten, synthetisiert werden konnte, wurden die Reaktionsbedingungen der Lösungssynthese auf eine Festphasensynthese übertragen (Abbildung 68). Das Azid **75** wurde hierzu nach Verseifung des Esters mit 1N Natronlauge über die freie Carbonsäure an das Hydrazidharz gebunden. Das Mmt-geschützte Cysteinderivat **73** wurde mit HOBt und DIC zum Aktivester umgesetzt und anschließend unter Zugabe von Tributylphosphin an das Azid **79** geknüpft. Baustein **76** konnte schließlich unter Verwendung einer methanolischen Cu(OAc)₂-Lösung von der festen Phase abgespalten und säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Bezogen auf die Beladung des Harzes wurde **76** mit einer Ausbeute von 65% erhalten.

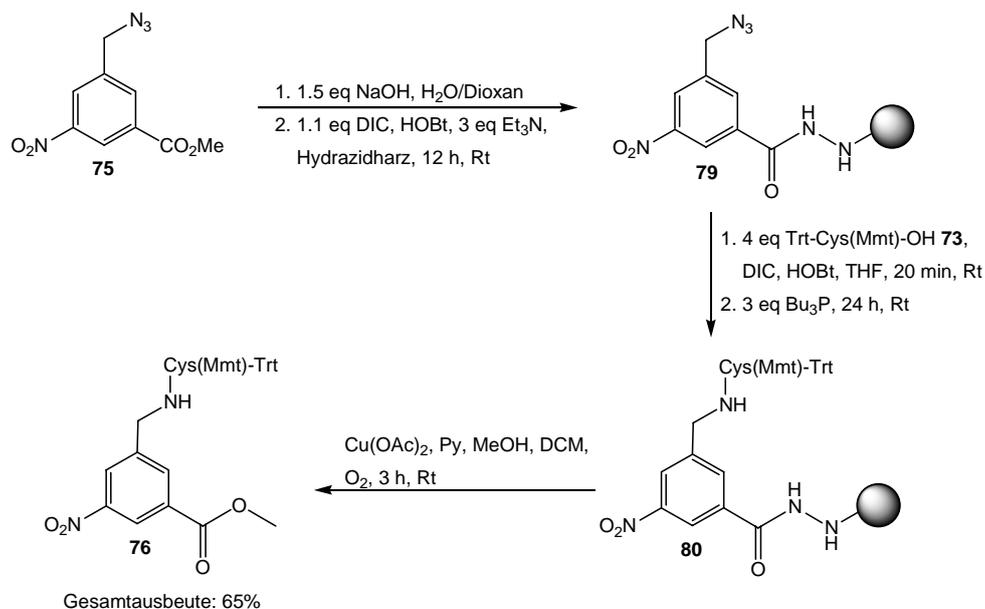


Abbildung 68: Synthese des Bausteins **76** am Harz.

Die weitere Reduktion der Nitrogruppe an der festen Phase sollte zunächst analog zur Lösungssynthese durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden Poly-(*N*-vinyl-2-pyrrolidon) (PVP)-stabilisierte Palladium-Nanopartikel **81** synthetisiert (Abbildung 69 A).^[209-211] Hierzu wurde Palladium(II)chlorid mit 0.2 M HCl zu einer H₂PdCl₄-Lösung umgesetzt. Die Bildung der Nanopartikel verlief anschließend in zwei Schritten. Zuerst bildet sich unter Zugabe von PVP (8000 g/mol) aufgrund dessen Koordination mit den Palladiumionen ein polymerer Komplex. Im zweiten Schritt der Synthese wurden die Palladiumionen schließlich mit Ethanol zu Pd(0) reduziert.

Der immobilisierte Baustein **80** wurde mit den Pd-Nanopartikeln **81** unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt und anschließend mit Dansylchlorid umgesetzt (Abbildung 69 B). Die Abspaltung des Bausteins vom Harz wurde im Anschluss unter Verwendung einer methanolischen Cu(OAc)₂-Lösung erreicht. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei **78** nur mit einer Ausbeute von 8% erhalten werden konnte. Die geringe Ausbeute beruhte dabei auf einer nicht vollständigen Reduktion der Nitrogruppe durch die Palladium(0)-vermittelte Hydrierung der Nanopartikel zum Amin. Auch bei der Verwendung der Palladium-Nanopartikel für die Reduktion der Nitrogruppe in Lösung wurde nur ein geringer Umsatz zum Amin **77** beobachtet.

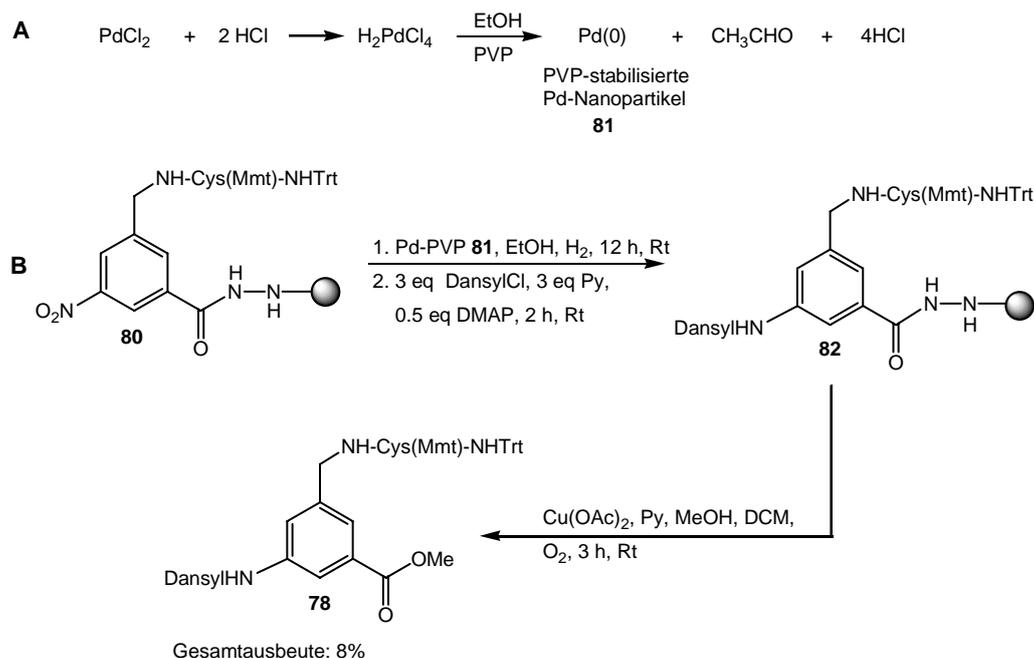


Abbildung 69: A: Synthese der Pd-Nanopartikel **81**; B: Einführung der zweiten Aminofunktion des Bausteins an der festen Phase.

Aus diesem Grund sollte die Reduktion der Nitrogruppe an der festen Phase des Weiteren mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ realisiert werden.^[212-214] Da sich jedoch die Mmt-Schutzgruppe des Cysteins unter diesen reduktiven Bedingungen als nicht stabil erwies, wurde anstelle des Mmt- und Trt-geschützten Cysteinderivats **73** Fmoc-Cys(*StBu*)-OH eingesetzt. Abbildung 70 zeigt die Synthese des Bausteins **85** in Lösung. Nach der Reduktion der Nitrogruppe des Bausteins **85a** mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zum Amin (**85b**) konnte anschließend die Dansylgruppe an das freie Amin geknüpft werden. **85** wurde in Lösung mit einer Gesamtausbeute von 31% erhalten.

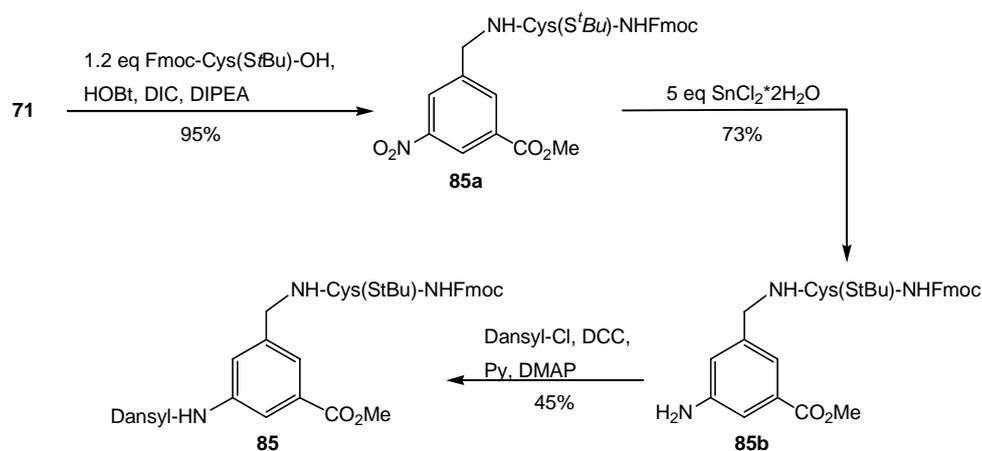


Abbildung 70: Synthese des Bausteins **85** in Lösung.

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde der Baustein **85** an der festen Phase aufgebaut (Abbildung 71). Zunächst wurde das Cysteinderivat mit DIC und HOBT zum

Aktivester umgesetzt und anschließend mit Tributylphosphin zum Harz gegeben. Für die Reduktion der Nitrogruppe des Bausteins wurde das Harz anschließend mit einer 1M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung versetzt und später mit Dansylchlorid umgesetzt. **85** konnte über die drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 55% erhalten werden.

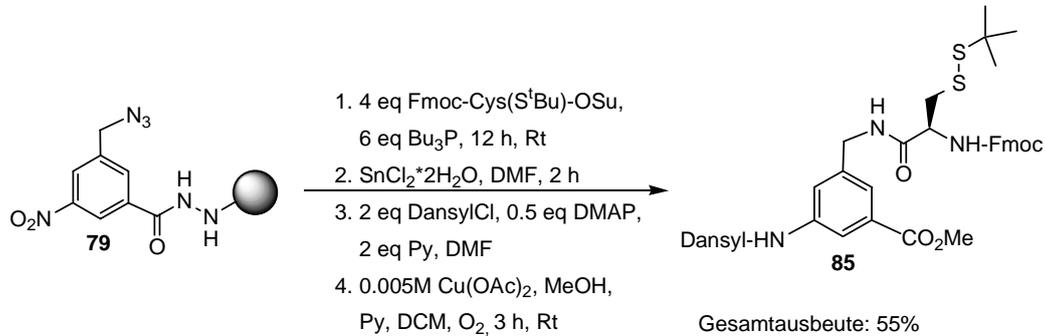


Abbildung 71: Synthese des Bausteins **85** an der festen Phase.

Im letzten Schritt der Synthese wurde die Fmoc-Schutzgruppe des Bausteins **85** unter basischen Bedingungen entfernt (Abbildung 72). Für die Ligation des fluoreszenzmarkierten, ligationsfähigen Bausteins **86** stand der um drei Aminosäuren verkürzte ¹⁻²⁰³Ypt1Δ3-Thioester zur Verfügung.

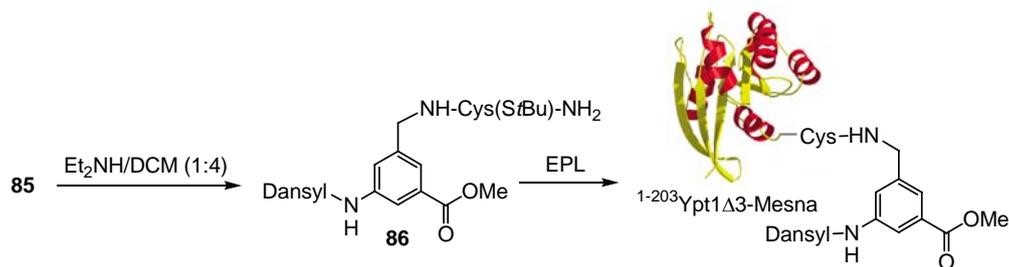


Abbildung 72: Entschützung und anschließende Ligation des Bausteins mit ¹⁻²⁰³Ypt1Δ3-Thioester.

Bei der Ligrationsreaktion wurden 5 Äquivalente des Bausteins **86** mit Ypt1Δ3-Thioester in Ligationspuffer (50 mM Na₂HPO₄, pH = 7.5) unter Zugabe von Mesna (20 mM) für 12 Stunden inkubiert. Abbildung 73 zeigt das Ergebnis der erfolgreichen Ligationreaktion zum semisynthetischen, fluoreszenzmarkierten Ypt1-Protein. Das SDS-PAGE Gel zeigt eine fluoreszierende Bande in der zu erwartenden Position. Das LC/MS-Spektrum des Ligrationsansatzes zeigt die Masse des semisynthetischen Ypt1-Proteins (berechnete Masse = 23 453 Da).

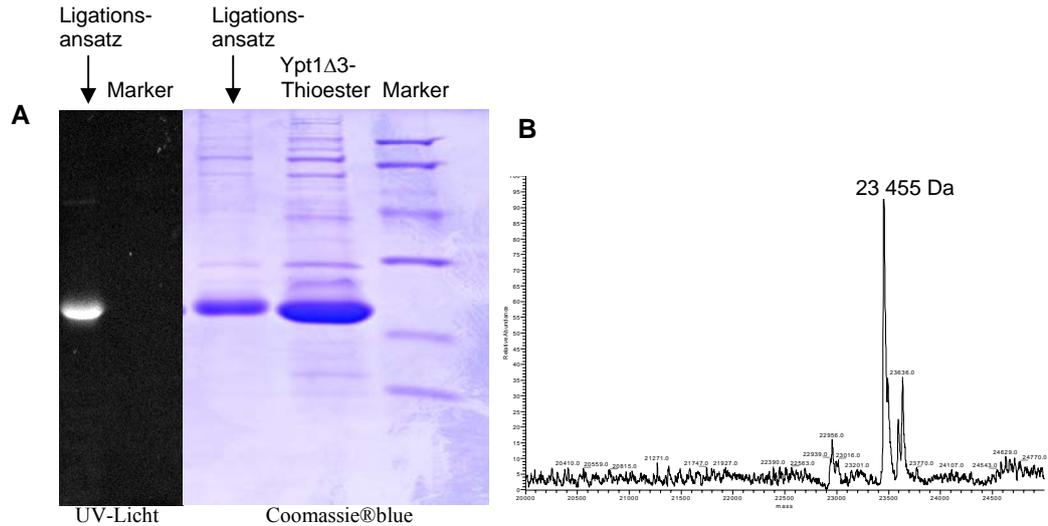


Abbildung 73: A: SDS-PAGE Gel des Ligationsansatzes; B: LC/MS Spektrum des fluoreszenzmarkierten semi-synthetischen Ypt1-Proteins (berechnete Masse = 23 454 Da $[M+H]^+$).

Der fluoreszenzmarkierte Baustein, der auf einfachem Wege an der festen Phase dargestellt wurde, konnte somit erfolgreich zur Einführung des Dansyl-Fluorophors in den C-Terminus des Ypt1-Proteins verwendet werden.

4.2.2.2. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur MIC-Ligation

Um eine breite Anwendung des Bausteins zur gezielten Einführung von Fluoreszenzmarkern oder anderen spezifischen Markern in Proteine zu ermöglichen, sollten neben der C-terminalen *Expressed Protein Ligation* auch die MIC-vermittelte Ligation realisiert werden. Hierzu wurde der bifunktionalisierte Baustein **91** an der festen Phase synthetisiert (Abbildung 74). Die Aminogruppe der Ausgangsverbindung **71** wurde mit der Boc-Schutzgruppe geschützt und nach der Verseifung des Methylesters zur freien Säure **88** an das Hydrazidharz gebunden. Anschließend konnte der Fluoreszenzmarker nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe an die Aminogruppe gebunden werden (**90**). Nach der Reduktion der Nitrogruppe mit 1M SnCl_2 -Lösung wurde die MIC-Gruppe in den Baustein eingeführt. **92** wurde vom Harz abgespalten, anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt und mit einer bezogen auf die Beladung des Harzes ermittelten Ausbeute von 63% erhalten.

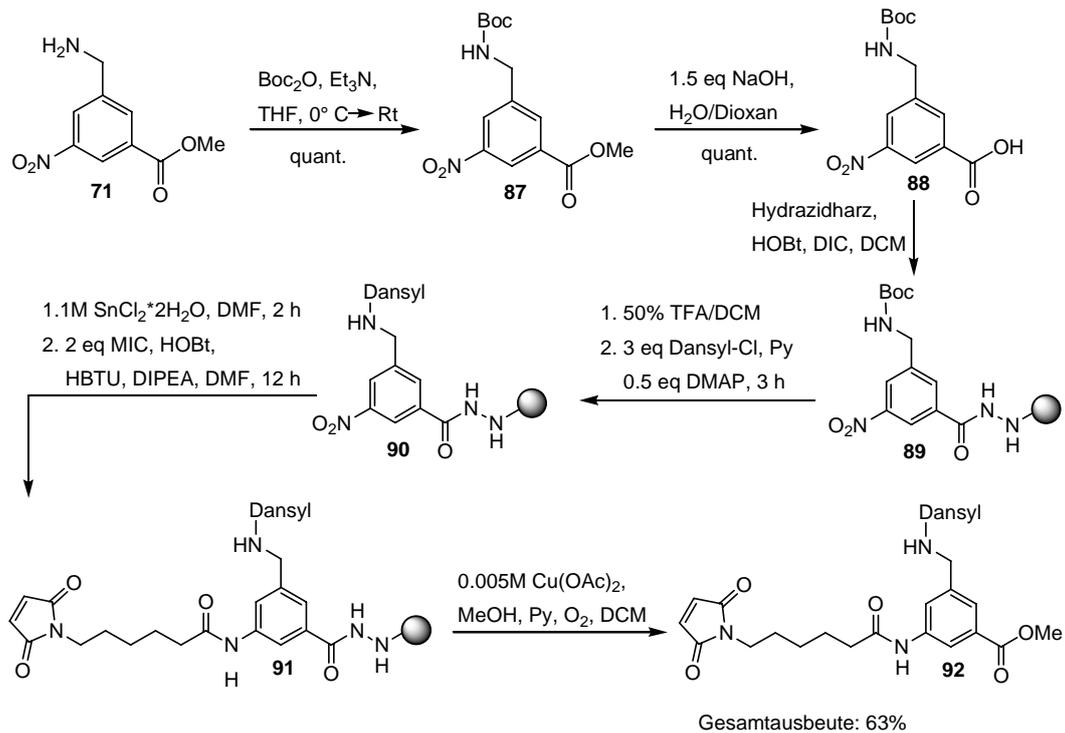


Abbildung 74: Synthese des fluoreszenzmarkierten und MIC-modifizierten Bausteins **92** an der festen Phase.

Vergleicht man hierbei die Festphasensynthese mit der Lösungssynthese (Abbildung 75), so zeichnet sich diese durch eine höhere Gesamtausbeute aus. In Lösung konnte der Baustein **92** nur mit einer Gesamtausbeute von 26 % erhalten werden.

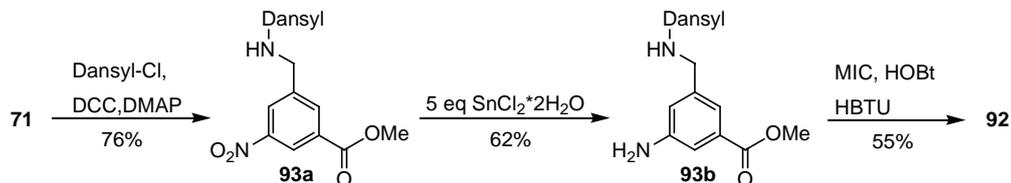


Abbildung 75: Synthese des MIC-modifizierten Bausteins **92** in Lösung.

Für die MIC-Ligation stand das verkürzte $^{1-181}\text{N}$ -Ras in dem Arbeitskreis von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zur Verfügung. Der fluoreszenzmarkierte Baustein **92** wurde in einem geringen Überschuss mit $^{1-181}\text{N}$ -Ras umgesetzt (Abbildung 76 A). Hierbei konnte das Protein vollständig zum semisynthetischen, fluoreszenzmarkierten $^{1-181}\text{N}$ -Ras-Protein überführt werden, welches über eine DEAE-Gelfiltrationssäule aufgereinigt wurde. Das MALDI-TOF-Spektrum zeigt die Masse des semisynthetischen Proteins (berechnete Masse = 21 004 Da).

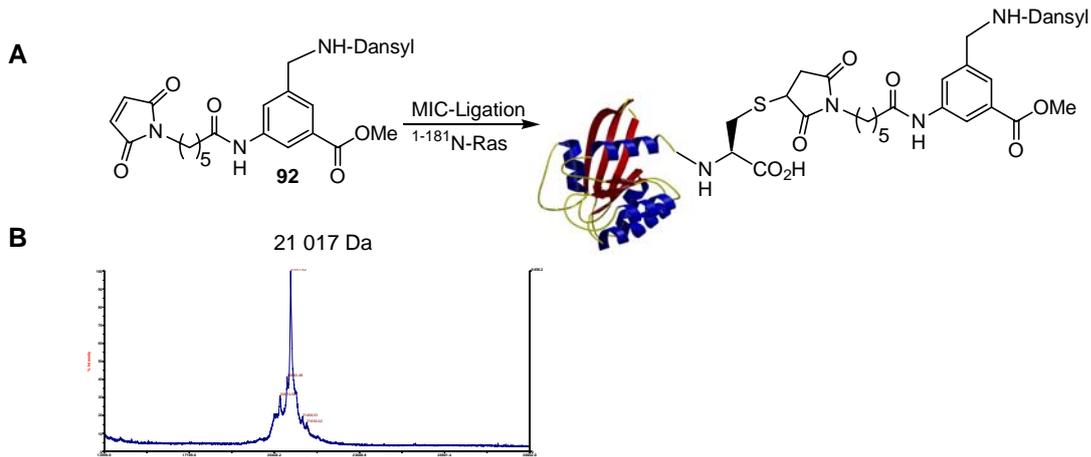


Abbildung 76: A: MIC-Ligation des fluoreszenzmarkierten Bausteins **92** mit ¹⁻¹⁸¹N-Ras; B: MALDI-TOF-Spektrum des über eine DEAE-Gelfiltrationssäule aufgereinigten Ligationsproteins (berechnete Masse = 21 005 Da [M+H]⁺).

4.2.2.3. Synthese eines fluoreszenzmarkierten Bausteins zur N-terminalen EPL

Für die N-terminale Einführung eines Bausteinthioesters über die *Expressed Protein Ligation* in ein Protein muss das Protein mit einem N-terminalen Cystein modifiziert sein. Im Arbeitskreis von Prof. R. S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie standen verschiedene Rab-Proteine mit einem N-terminalen freien Cystein zur Verfügung. Die Ausstattung des Bausteins mit dem Thioester sollte dabei an der festen Phase erfolgen. Zuerst wurde die Synthese einer Modellverbindung in Lösung realisiert (Abbildung 77). Dazu wurde der Methylester **93a** in zwei Schritten in den Phenylthioester **94** überführt.

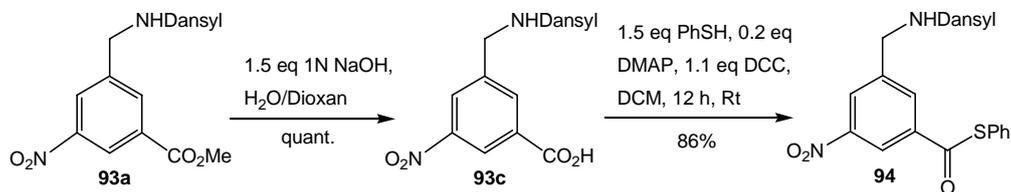


Abbildung 77: Synthese des Bausteinthioesters **94** in Lösung.

Die Generierung des Bausteinthioesters mit Hilfe der Festphasensynthese sollte über die Abspaltung des am Hydrazidlinker gebundenen Bausteins **90** mit einem Thiol erfolgen (Abbildung 78). Für die Abspaltung wurde der Hydrazid-Linker zunächst mit NBS (*N*-Bromsuccinimid) zum Diazen **90a** oxidiert, so dass im nächsten Schritt die

Abspaltungsreaktion mit einem Thiol als Nucleophil erfolgen konnte. Hierzu wurden verschiedene Thiol-Lösungen eingesetzt. Der gewünschte Thioester konnte jedoch bei keinem der Versuche erfolgreich von der festen Phase abgespalten werden. Das Harz zeigte sich nach versuchter Abspaltung fluoreszierend. Dies ließ die Vermutung zu, dass der Baustein noch an der festen Phase gebunden war. Daher wurde nach der versuchten Abspaltung mit einer 1M Thiophenol-Lösung das Harz erneut gewaschen und mit einer 1M Methanol-Lösung umgesetzt. Jedoch konnte auch hierbei der Methylester nicht von der festen Phase abgespalten werden. Dies war erst nach erneuter Oxidation des Harzes mit NBS möglich. Dieser Befund ließ darauf schließen, dass der Diazen-Linker, während der Umsetzung mit dem Thiol als Nucleophil, zurück zum Hydrazid reduziert wurde und somit keine Abspaltung des Bausteins mehr möglich war. Tatsächlich wurde nach versuchter Abspaltung mit einem Thiol eine größere Menge Disulfid in der Thiol-Abspaltungslösung vorgefunden.

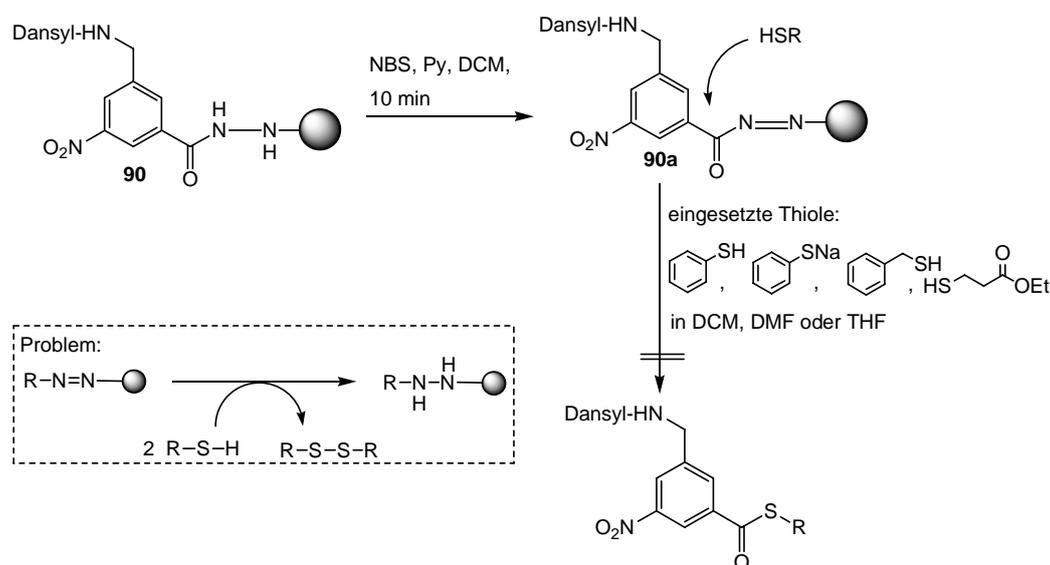


Abbildung 78: Versuche der Abspaltung des Bausteinthioesters von der festen Phase unter Ausbildung des Thioesters.

Um die Polarität zu erhöhen wurde bei der Synthese des Thioesters ebenfalls Mercaptoethansulfonsäure eingesetzt (Abbildung 79). Hierzu wurde der Methylester **93** verseift und anschließend mit NHS zum Aktivester umgesetzt, der unter Zugabe von Mesna zum Thioester **95** führte. Die Darstellung des *N*-Hydroxysuccinimid-Aktivesters wurde daraufhin ebenfalls an der festen Phase untersucht. Jedoch konnte auch hier keine erfolgreiche Aktivestersynthese durch die Abspaltungsreaktion mit NHS als Nucleophil erzielt werden.

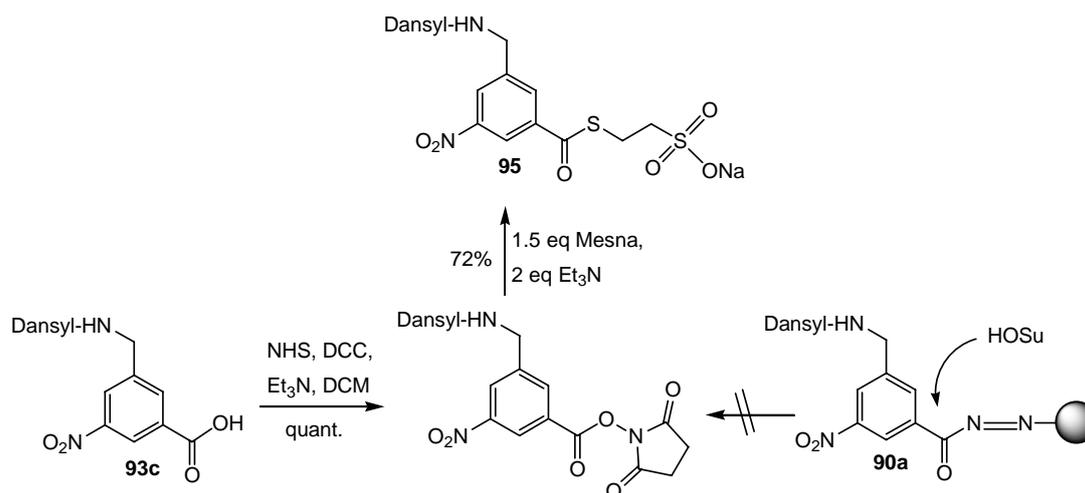


Abbildung 79: Synthese des Mesna-Thioesters **95** in Lösung und durch versuchte Abspaltung des Bausteins als Aktivester von der festen Phase.

Um eine Thioester-Synthese an der festen Phase zu realisieren, wurde schließlich der Glycinthioethylester **97** synthetisiert (Abbildung 80 A). Der Einsatz des Glycinthioethylesters **97** bei der Generierung von Peptidthioestern unter Verwendung des Hydrazid-Linkers ist in der Literatur beschrieben.^[215] Die freie Aminogruppe des Glycinthio-ethylesters dient bei der Abspaltung der Peptide vom Harz als Nucleophil, und ermöglicht somit eine indirekte Einführung des Thioesters ins Peptid.

Bei der Festphasensynthese des gewünschten Bausteinthioesters wurde ausgehend vom immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Baustein **90** zunächst die Nitrogruppe mit SnCl₂*2H₂O zur Aminogruppe reduziert, um die Polarität zu erhöhen, die für die spätere Ligationsreaktion notwendig ist (Abbildung 80 B). Thioester **98** konnte nach Oxidation des Linkers mit NBS unter Verwendung des Glycinderivats **97** als Nucleophil mit einer Ausbeute von 43% von der festen Phase abgespalten werden.

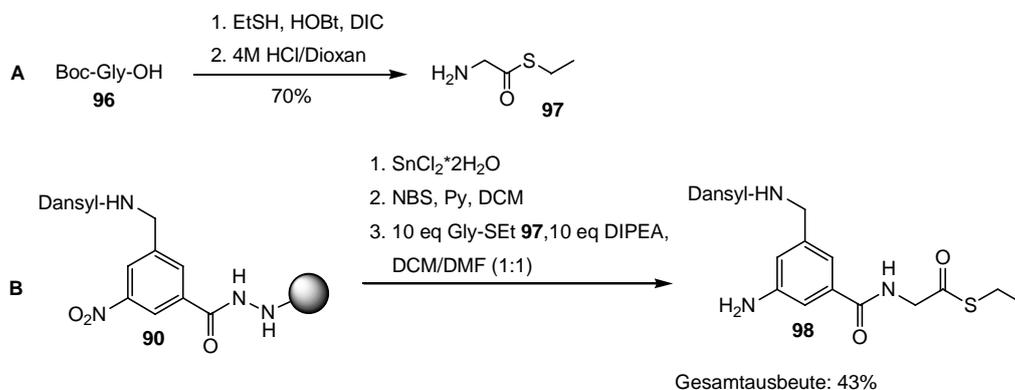


Abbildung 80: A: Synthese des Glycinthioethylesters **97**; B: Synthese des Bausteinthioesters **98** an der festen Phase.

Die Verwendung des Glycinthioesters **97** ermöglichte somit eine erfolgreiche Synthese des Bausteinthioesters **98** an der festen Phase.

Für die EPL wurden die synthetisierten Thioester **94**, **95** und **98** untersucht und dabei mit Rab6A-Protein, welches am N-Terminus ein freies Cystein enthält, zur Ligation gebracht (Abbildung 81). Der Thiophenylester **94** ließ sich bei der Ligationsreaktion auch nicht durch die Zugabe von Detergenzien und organischen Lösungsmitteln in dem Ligationspuffer lösen. Die Thioester **95** und **98** konnten dagegen in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch gelöst und anschließend mit dem Rab6A-Protein ohne Zugabe eines Detergenzes zur Ligation gebracht werden.

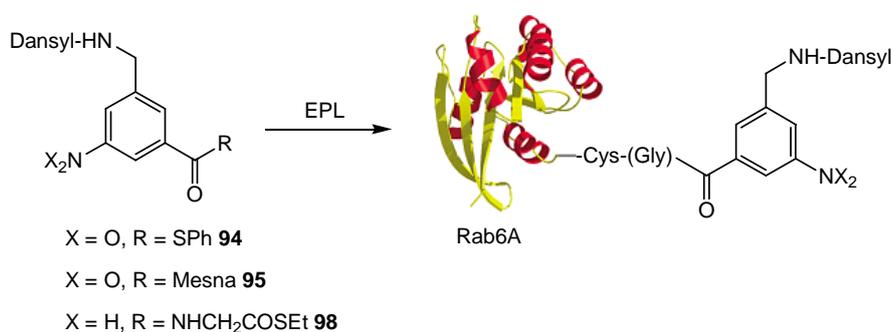


Abbildung 81: Ligation der Thioester **94**, **95** und **98**.

Die Ligationen der Thioester **95** und **98** verlief jedoch bedauerlicherweise mit einer geringen Ausbeute (5-10%). Abbildung 82 zeigt das Ergebnis der Ligation des Thioesters **98**. Das SDS-PAGE Gel zeigt an der gewünschten Position eine schwach fluoreszierende Bande, die dem semi-synthetischen fluzoreszenzmarkierten Rab6A-Protein zugeordnet werden kann, und dessen Masse von 24 137 Da (berechnete Masse: 24 139 Da) das LC/MS-Spektrum zeigt. Trotz Zugabe von 10-100 Äquivalenten Thioester konnte die Ausbeute des Ligationsproduktes nicht erhöht werden. Aus diesem Grund wurde das Protein Rab6A ebenfalls mit dem fluoreszenzmarkierten MIC-modifizierten Baustein **92** umgesetzt. Die MIC-Ligation des Bausteins **92** verlief mit $^{1-181}\text{N}$ -Ras quantitativ (siehe Kapitel 4.2.2.2.) und benötigte nur einen geringen Überschuss des zu ligierenden MIC-modifizierten Bausteins. Bedauerlicherweise wurde jedoch bei der MIC-Ligationsreaktion von **92** mit Rab6A keine Umsetzung zum semisynthetischen Rab6A-Protein beobachtet. Dies ließ die Vermutung zu, dass das N-terminale Cystein des Rab6A-Proteins nur in einem geringen Maß als freies Cystein vorlag und somit nur begrenzt für die EPL mit dem Thioester zur Verfügung stand.

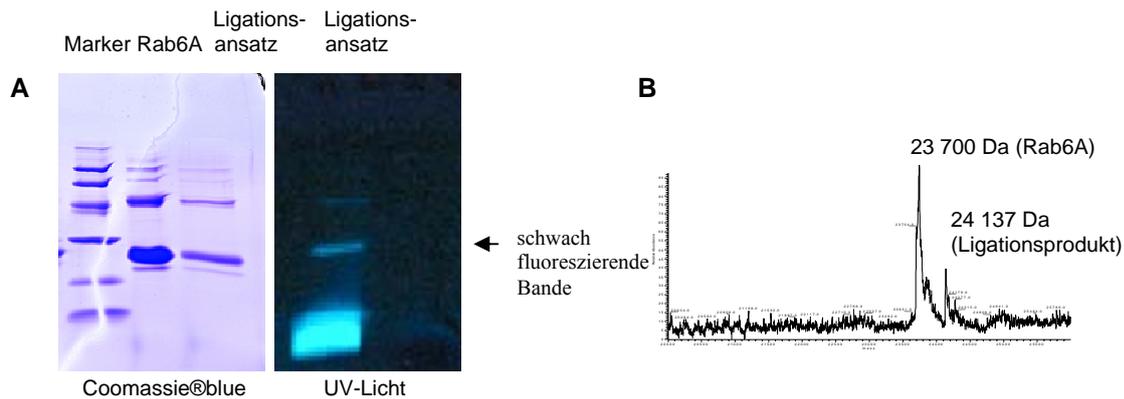


Abbildung 82: A: SDS-PAGE der Ligation von **98** mit Rab6A; B: Massenspektrum des Ligationsansatzes (berechnete Masse = 24 140 Da $[M+H]^+$).

4.2.3. Anwendung des Bausteins bei der Immobilisierung von Ras-Proteinen auf Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation

4.2.3.1. Konzept

Mit Hilfe des Bausteins sollte es möglich sein auf einfachem Wege in ein Protein zwei verschiedene funktionelle Gruppen einzuführen. Dafür wäre ein dreifach orthogonal substituierter Baustein notwendig, der neben den beiden funktionellen Gruppen zusätzlich mit einer MIC-Gruppe oder einem Cystein für die Ligrationsreaktion mit dem Protein ausgestattet sein müsste. Solch ein dreifach substituierter Baustein könnte z.B. bei der Immobilisierung von Proteinen auf Glasoberflächen Anwendung finden. Von Maja Köhn wurde eine Immobilisierung kleiner Moleküle auf Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen entwickelt.^[216] Hierbei wurden die Moleküle mit einem Azid modifiziert und anschließend über eine Staudinger-Ligation an die Glasoberfläche gebunden.

Unter Verwendung des beliebig modifizierbaren Bausteins sollte die gleichzeitige Einführung eines Azids und eines Fluoreszenzmarkers in ein Protein auf einfachem Wege möglich sein. Solch ein modifiziertes Protein stände anschließend für eine chemoselektive Immobilisierung auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen zur Verfügung (Abbildung 83).

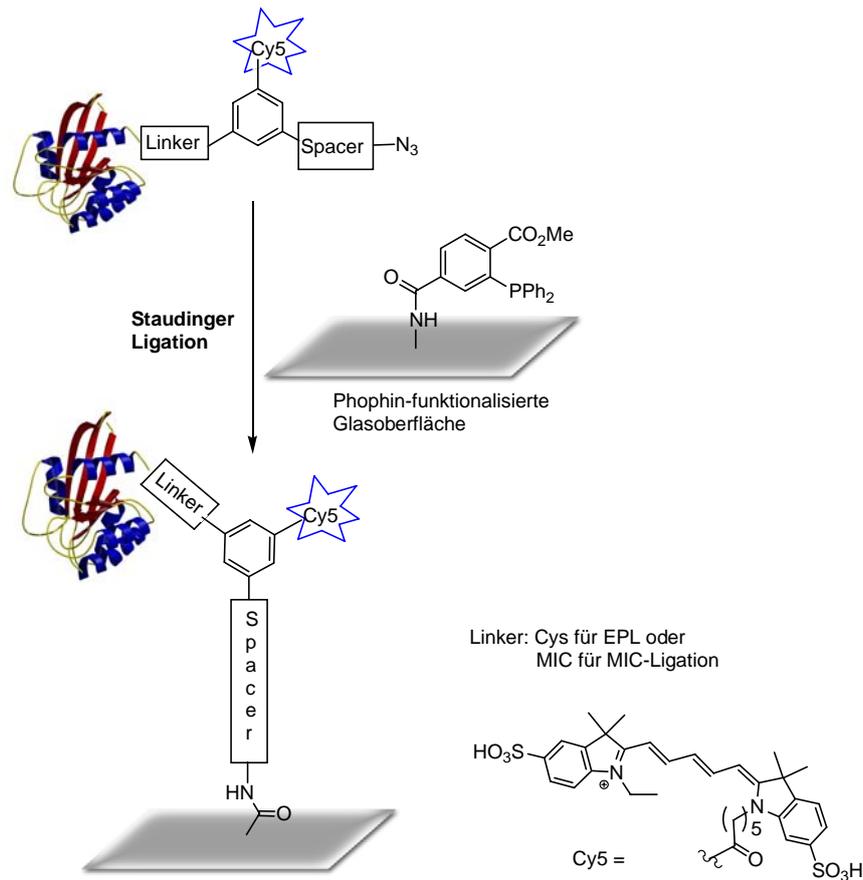


Abbildung 83: Konzept der Immobilisierung Azid-modifizierter Proteine auf Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation.

Um eine Visualisierung der Proteine auf der Oberfläche der Glaträger zu ermöglichen, sollte Cy5 als Fluoreszenzmarker Verwendung finden. Für die Immobilisierung standen die $^{1-180/181}$ N-Ras-Proteine in dem Arbeitskreis von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zur Verfügung.

4.2.3.2. Synthese der Azid- und Cy5-funktionalisierten Bausteine

Für die Immobilisierungsversuche sollten folgende Bausteine zur Verfügung stehen (Abbildung 84):

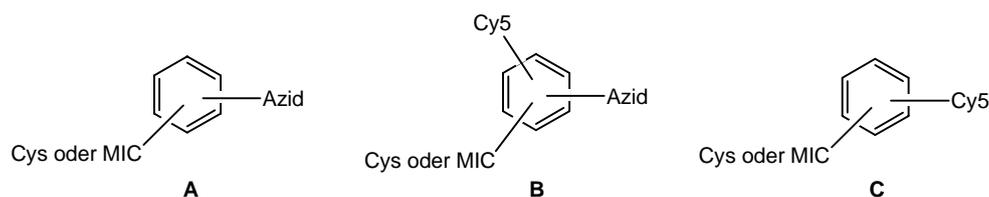


Abbildung 84: Für die Immobilisierungsexperimente benötigte Bausteine **A**, **B** und **C**.

Zur Einführung eines Azids in das Ras-Protein sollte zunächst Baustein **A** synthetisiert werden. Das über **A** zugängliche Azid-modifizierte Ras-Protein könnte nach der Immobilisierung mit einem Cy5-modifizierten Ras-Antikörper auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Baustein **B** sollte dagegen eine direkte Einführung des Fluoreszenzmarkers zur späteren Visualisierung der immobilisierten Proteine ermöglichen. Baustein **C** sollte bei den Immobilisierungsexperimenten als Negativkontrolle zu Baustein **B** Anwendung finden.

Für die Festphasensynthese des Azid-modifizierten Bausteins **A** wurde Benzolderivat **88** an die feste Phase gebunden (Abbildung 85). Im nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA entfernt, und das freie Amin mit Trt-Cys(Mmt)-OH **73** unter Verwendung von HOBt und HBTU gekuppelt. Im nächsten Schritt wurde der Baustein unter Einführung des Azids von der festen Phase abgespalten. Hierzu wurde der Hydrazidlinker mit NBS zum Diazen oxidiert und das Harz anschließend mit 4 Äquivalenten 6-Azido-hexylamin in THF versetzt. **102** konnte säulenchromatographisch aufgereinigt und mit einer Ausbeute von 58% erhalten werden, und stand somit für die Einführung eines Azids in den C-Terminus des ^{180}N -Ras-Proteins *via* EPL zur Verfügung.

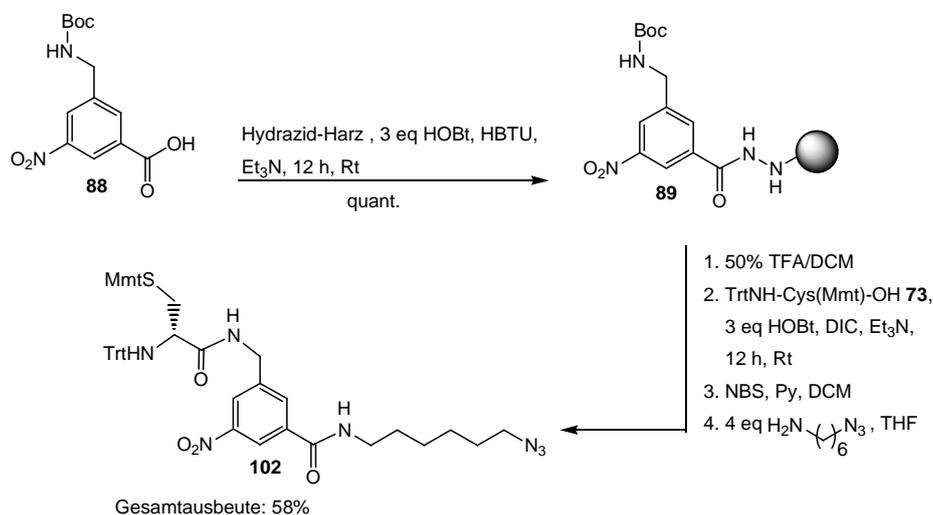


Abbildung 85: Synthese des Azid-funktionalisierten Bausteins **102** an der festen Phase.

Zur Synthese des Cy5-modifizierten Bausteins **B** sollte anstelle des für die EPL benötigten Cysteins die MIC-Gruppe eingesetzt werden, da die MIC-Ligation im Allgemeinen mit besseren Ausbeuten verläuft. Das beladene Harz **89** wurde hierzu im ersten Reaktionsschritt zur Reduktion der Nitrogruppe mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ umgesetzt (Abbildung 86 A). Anschließend wurde die Maleinimidocaproylsäure an den Baustein gekuppelt. Im nächsten Schritt der

Festphasensynthese wurde der Fluoreszenzmarker eingeführt. Dazu wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und Cy5 mit einem großen Überschuss an die Aminogruppe gekuppelt. Der MIC- und Cy5-modifizierte Baustein wurde in zwei Schritten vom Harz abgespalten und anschließend mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. **104** konnte nur mit einer geringen Ausbeute von 5% erhalten werden.

Mit einer analog durchgeführten Lösungssynthese konnte der Cy5-markierte Baustein **104** jedoch mit einer Gesamtausbeute von 23 % synthetisiert werden (Abbildung 86 B), und stand somit für die Einführung der Cy5-Gruppe ins Ras-Protein *via* MIC-Ligation zur Verfügung.

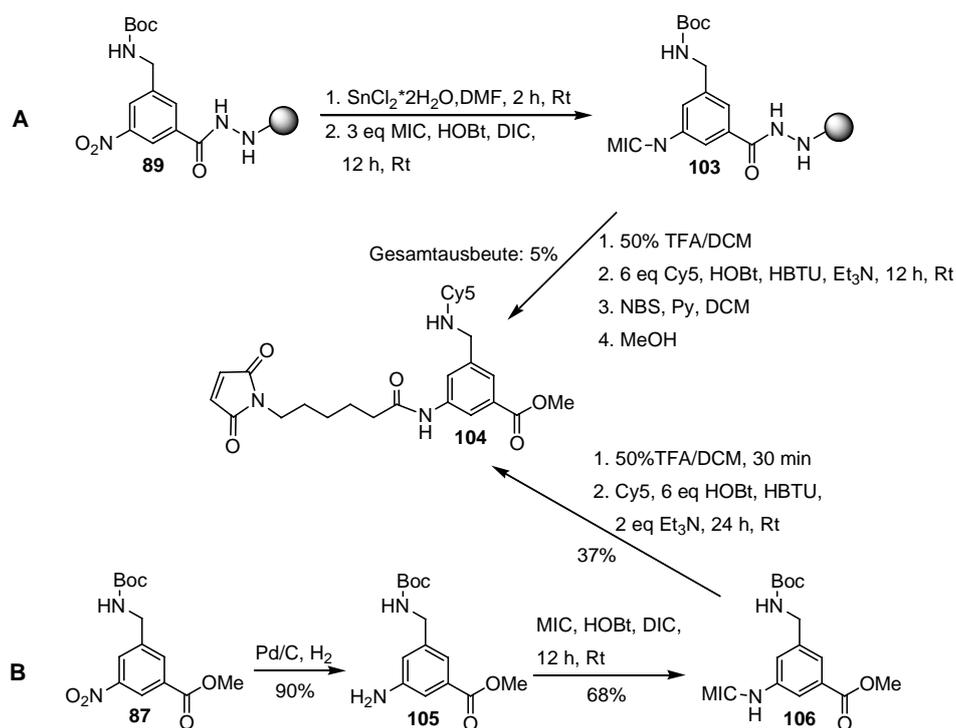


Abbildung 86: Synthese des Cy5-markierten Bausteins **104** an der festen Phase (A) und in Lösung (B).

Die Festphasensynthese des dreifach funktionalisierten Bausteins **C** begann ausgehend von **89** mit der Reduktion der Nitrogruppe zum Amin, welches im nächsten Schritt mit 6-Azidohexansäure zum immobilisierten Azid **107** modifiziert wurde (Abbildung 87). Der Methyl ester **108** konnte im Anschluss in zwei Schritten von der festen Phase abgespalten werden. Aufgrund des Azids musste auf die Verwendung von $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ -Lösung bei der Abspaltungsreaktion verzichtet werden. **108** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 45% erhalten.

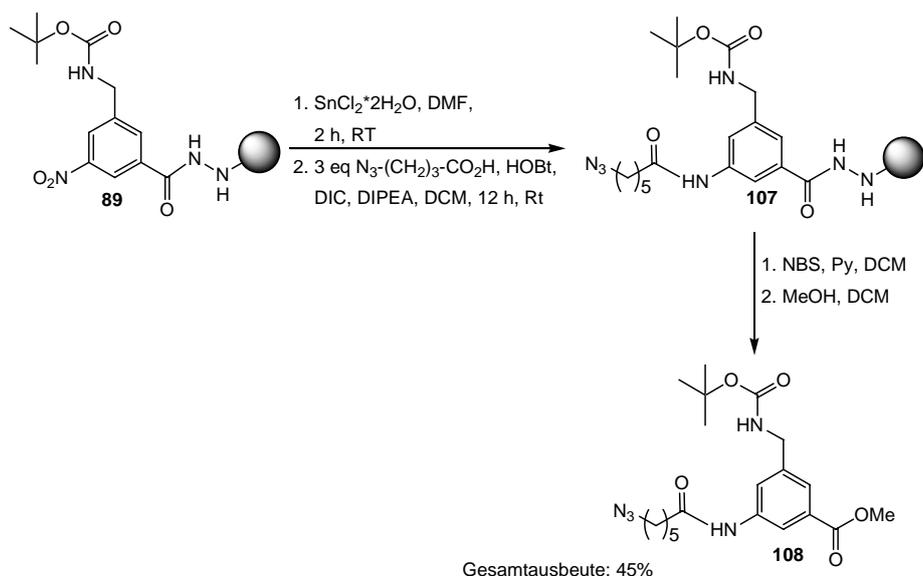


Abbildung 87: Synthese des Azid-funktionalisierten Bausteins **108** an der festen Phase.

Für die weitere Einführung des Cysteinrestes wurde die Boc-Schutzgruppe von **107** mit 50%iger TFA abgespalten und anschließend das Harz mit Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH unter Verwendung von HOBT und HBTU als Kupplungsreagenzien zu **109** umgesetzt (Abbildung 88).

Zur Abspaltung des Bausteins vom Hydrazidlinker wurde dieser zuerst mit NBS oxidiert. Die Carboxygruppe wurde zum Einen bei der anschließenden Abspaltung mit methanolischer DCM-Lösung in den Methyl ester **110** überführt. Zum Anderen konnte sie unter Verwendung von wäßriger THF-Lösung in die Carbonsäure **111** überführt werden.

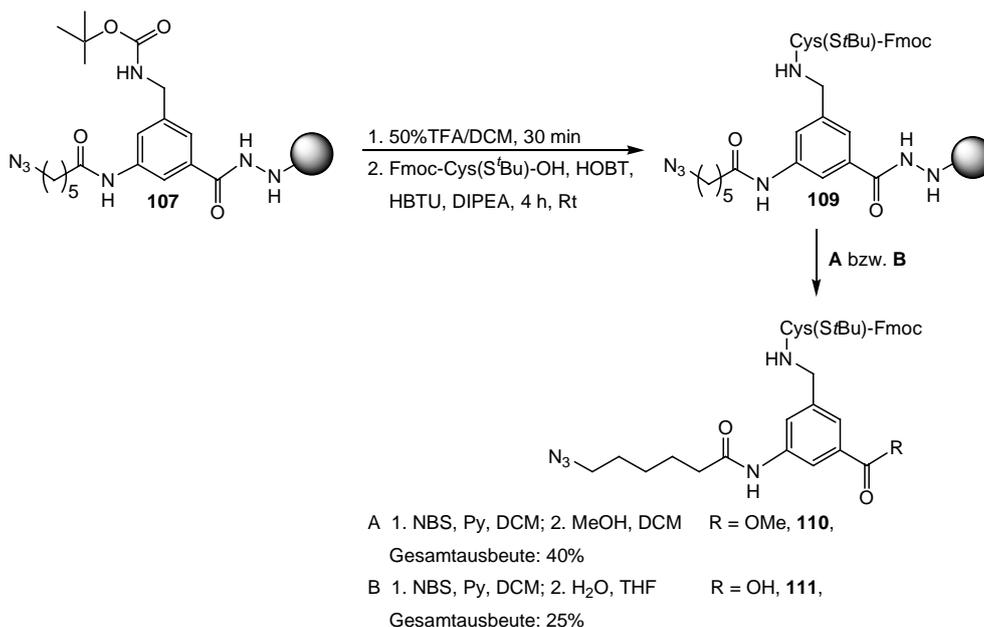


Abbildung 88: Synthese der Azid- und Cystein-modifizierten Bausteine **110** und **111** an der festen Phase.

Die Einführung der Cy5-Gruppe sollte nach der Abspaltung des funktionalisierten Bausteins **111** als Carbonsäure von der festen Phase durch die Verwendung eines Amin-funktionalisierten Cy5-Derivats realisiert werden.

Hierzu wurde das Boc-geschützte Ethylendiaminderivat mit Fmoc-OSu zum zweifach geschützten Ethylendiaminderivat **113** umgesetzt (Abbildung 89). Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe konnte Cy5 mit dem Fmoc-geschützten Ethylendiamin zu **114** umgesetzt werden, welches mit Hilfe präparativer HPLC gereinigt und mit einer Gesamtausbeute von 29% erhalten wurde. Die Fmoc-Gruppe des Cy5-Ethylendiaminderivats **114** wurde anschließend mit 10%-iger Piperidin-Lösung entfernt und das Amin-funktionalisierte Cy5-Derivat **115** nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC mit einer Ausbeute von 85% erhalten.

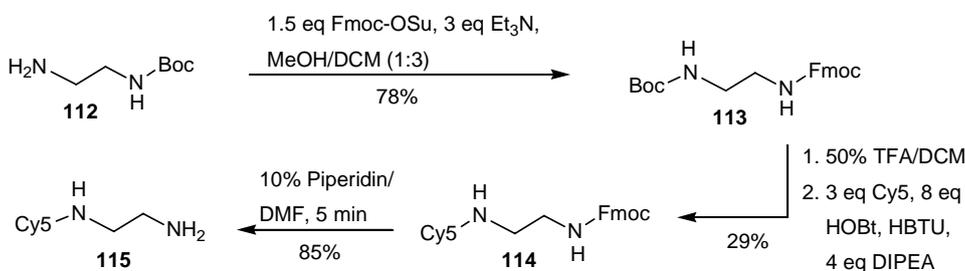


Abbildung 89: Synthese des Amin-funktionalisierten Cy5-derivats **115**.

115 wurde mit dem von der festen Phase abgespaltenen Baustein **111** zur Reaktion gebracht. Der erhaltene Azid-, Cy5- und Cystein-modifizierte Baustein **116** wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mit einer Ausbeute von 45% erhalten.

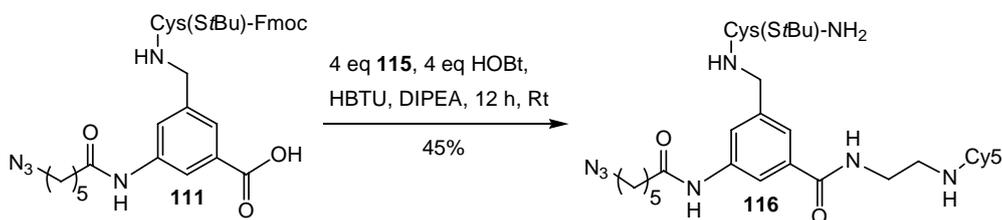


Abbildung 90: Synthese des trifunktionalisierten Bausteins **116**.

Mit Hilfe der Festphasensynthese konnten alle Bausteine synthetisiert werden, die für die Immobilisierung der N-Ras-Proteine auf den Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation notwendig sind. Die synthetisierten Bausteine standen somit für die weitere *Expressed*

Protein Ligation bzw. MIC-Ligation für dessen Einführung in den C-Terminus der N-Ras-Proteine zur Verfügung.

4.2.3.3. Ligation der Azid- und Cy5-funktionalisierten Bausteine

Für die EPL mussten zuerst die beiden Cystein-Reste der Azid-modifizierten Bausteine **110** und **102** entsprechend entschützt werden (Abbildung 91). Die vollständige Entschützung wurde über Dünnschichtchromatographie kontrolliert und mit Hilfe von HPLC/MS verifiziert. **117** und **118** konnten für die Ligrationsreaktion mit $^{1-180}\text{N-Ras}$ -Thioester eingesetzt werden.

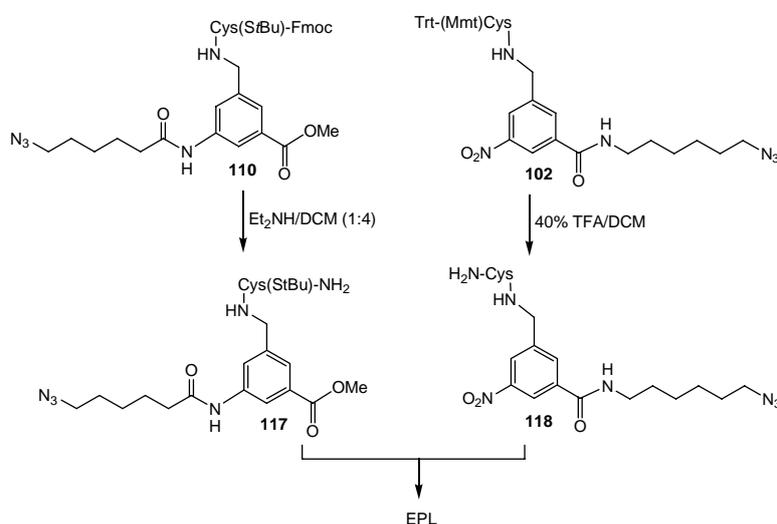


Abbildung 91: Entschützung der Azid- und Cystein-modifizierten Bausteine **110** und **103**.

117 fiel während der Ligrationsreaktion im wässrigen Ligrationspuffer aus und konnte auch durch die Zugabe von Detergenzien wie Triton-X100 nicht in der wässrigen Lösung gelöst werden. Die Ligrationsreaktion von **118** verlief dagegen erfolgreich. Mit einem fünffachen Überschuss an **118** wurde quantitativ das semisynthetische, Azid-funktionalisierte $^{1-180}\text{N-Ras}$ -Protein erhalten. Abbildung 92 zeigt das LC/MS-Spektrum des säulenchromatographisch aufgereinigten semisynthetischen $^{1-180}\text{N-Ras}$ -Proteins (berechnete Masse = 20 746 Da). Dieses stand somit für die späteren Immobilisierungsversuche des Ras-Proteins *via* Staudinger-Ligation in ausreichenden Mengen zur Verfügung.

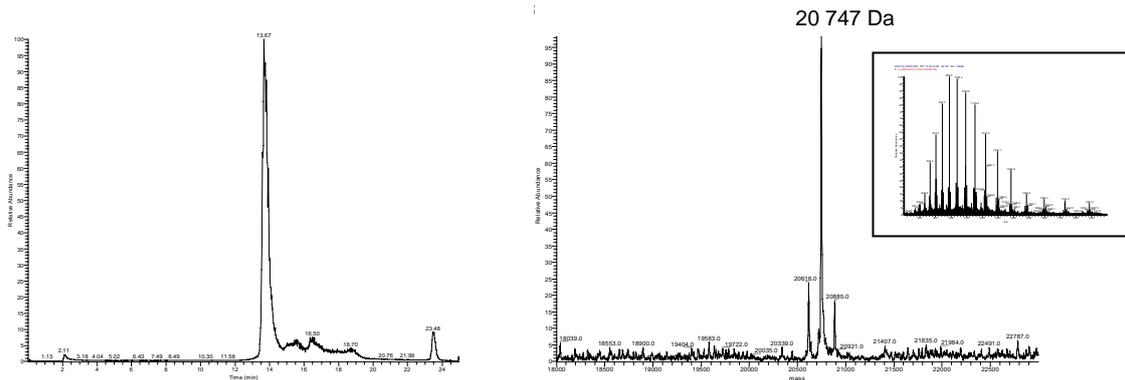


Abbildung 92: LC/MS-Spektrum des aufgereinigten Ligationsansatzes des Bausteins **118** mit $^{1-180}$ N-Ras-Thioester (berechnete Masse = 20 747 Da $[M+H]^+$).

Auch die MIC-Ligation des Bausteins **108** und $^{1-181}$ N-Ras verlief mit nur einem geringen Überschuss von **108** erfolgreich. Das semisynthetische, Cy5-markierte N-Ras-Protein wurde mit einer DEAE-Gelfiltrationssäule gereinigt und nahezu quantitativ erhalten (Abbildung 93).

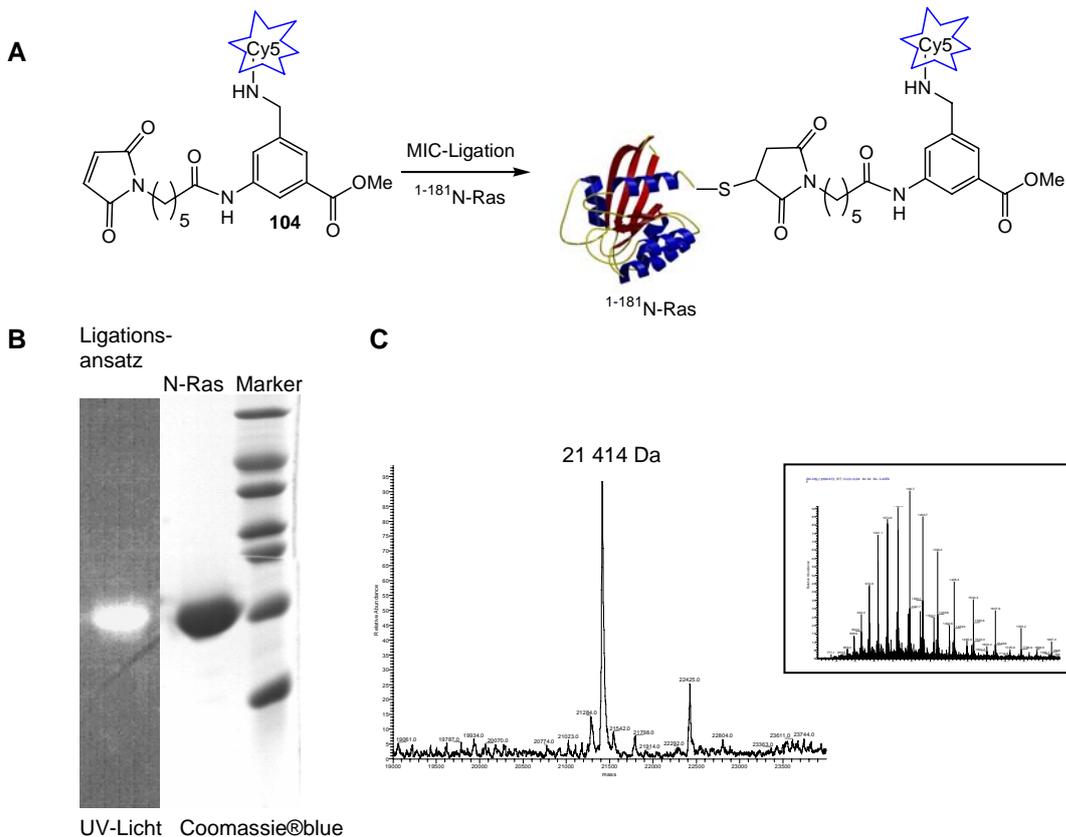


Abbildung 93: **A:** MIC-Ligation des Cy5-modifizierten Bausteins; **B:** SDS-PAGE Gel des Ligationsansatzes, **C:** LC/MS-Spektrum des aufgereinigten, Cy5-markierten N-Ras-Protein (berechnete Masse = 21 411 Da $[M+H]^+$).

Der dreifach funktionalisierte Baustein **116** wurde mit 10%-iger Piperidin-Lösung Fmoc-entschützt und anschließend mit $^{1-180}\text{N}$ -Ras-Thioester zur Ligation gebracht (Abbildung 94). Die Ligation verlief erfolgreich, jedoch war die Aufreinigung des Ligationsansatzes über eine DEAE-Gelfiltrationssäule mit einem großen Verlust des semisynthetischen Proteins verbunden, da Cy5 stark an das Säulenmaterial gebunden wurde und sich das Cy5-modifizierte Protein somit nicht vollständig von der Säule eluieren ließ. Daher konnte das semisynthetische, Cy5- und Azid-modifizierte N-Ras-Protein nur mit einer Ausbeute von 25% erhalten werden.

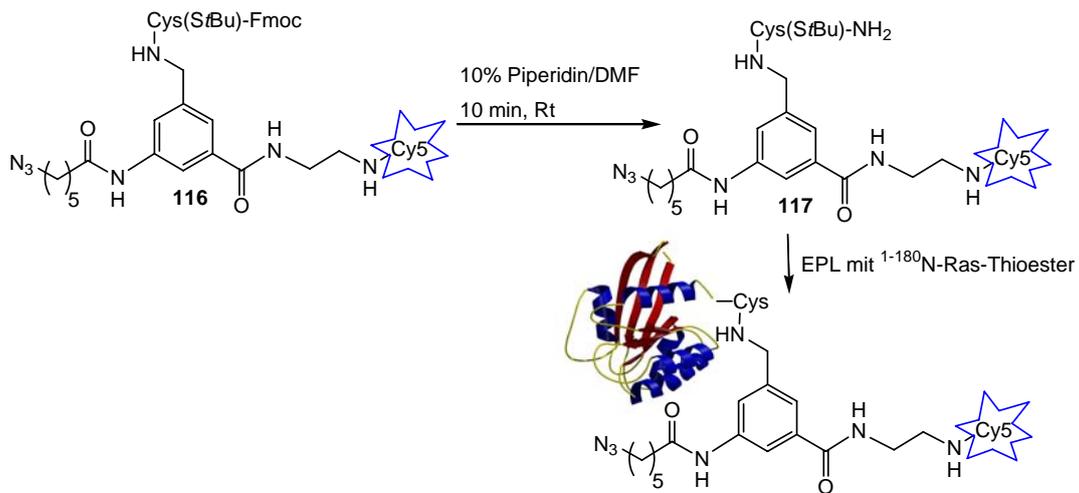


Abbildung 94: Ligation des trifunktionalisierten Bausteins **117** mit $^{1-180}\text{N}$ -Ras-Thioester.

Das SDS-PAGE Gel des Ligationsansatzes zeigt, dass sich nicht umgesetztes N-Ras vom Ligationsprodukt über die DEAE-Gelfiltrationssäule nicht trennen ließ (Abbildung 95 A). Das LC/MS-Spektrum zeigt sowohl die Masse des semisynthetischen $^{1-180}\text{N}$ -Ras-Proteins als auch die Masse des nicht umgesetzten $^{1-180}\text{N}$ -Ras-Thioesters (Abbildung 95 B). Für die spätere Immobilisierung sollte jedoch nicht umgesetztes N-Ras die Immobilidierungsreaktion nicht stören, da nur Azid-modifizierte Proteine über die Staudinger-Ligation an die Glasoberfläche binden sollte.

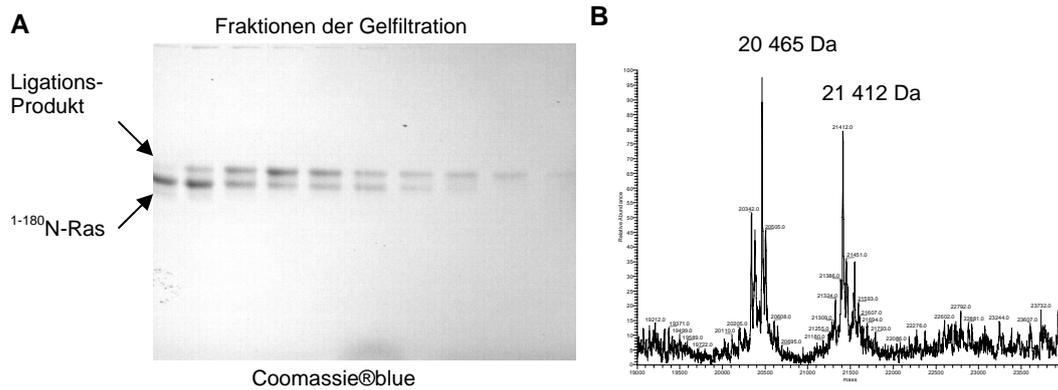


Abbildung 95: A: SDS-PAGE Gel des Ligationsansatzes ; B: LC/MS-Spektrum des aufgereinigten Ligationsansatzes (berechnete Masse des semisynthetischen $^{1-180}\text{N-Ras-Proteins} = 21\,413\text{ Da } [M+H]^+$).

4.2.3.4. Immobilisierungsversuche

Für die chemoselektive Immobilisierung der Azid-modifizierten Proteine auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation standen die semisynthetischen Proteine A-C (Abbildung 96) zur Verfügung.

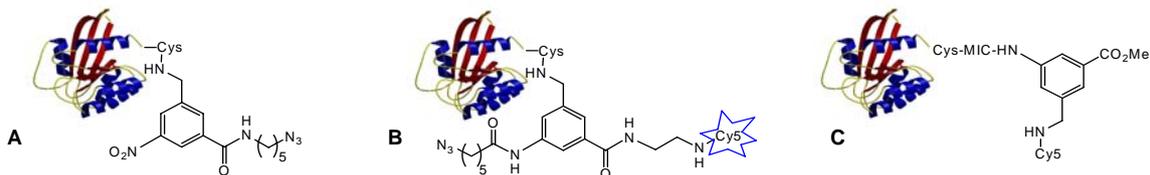


Abbildung 96: Für die Immobilisierungsversuche synthetisierte Proteine.

Außerdem wurde ein Teil des GDP-gebundenen, semisynthetischen Proteins A von Christine Novack im Arbeitskreis von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie unter Verwendung von GppNHP, einem GTP-Hydrolyse beständigen GTP-Analogen, in den GTP-gebundenen aktiven Zustand überführt. Bei der Immobilisierung wurden die Proteine in Konzentrationen von 1 bis 500 μM auf die Glasoberfläche gebracht. Das Spotten der Protein-Lösungen auf den Glaträgern wurde dabei von der Firma Chimera Biotech durchgeführt. Zur Visualisierung des Proteins A wurde die Oberfläche anschließend mit Cy5-markiertem Ras-Antikörper inkubiert. Zum Nachweis des GTP-gebundenen aktiven Zustands des semisynthetischen Ras-Proteins wurde der Glaträger mit Cy5-markierter RBD (*Ras binding domain*) versetzt. RBD bindet ausschließlich an Ras-Proteine im aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Als Negativkontrolle zum Azid-modifizierten Protein A wurde nicht

funktionalisiertes N-Ras eingesetzt. Als Negativkontrolle zu dem Cy5-modifizierten Protein **B** wurde Protein **C**, welches kein Azid enthielt und somit nicht auf der Glasoberfläche binden sollte, verwendet.

Abbildung 111 zeigt das Ergebnis der Immobilisierung des Proteins **A**. Zwischen dem Azid-funktionalisierten Protein **A** und der Negativkontrolle ist ein deutlicher Unterschied in den Fluoreszenzsignalen zu beobachten. Es ist außerdem eine Abnahme der Fluoreszenz mit abnehmender Konzentration der jeweiligen Protein-Lösungen zu erkennen. Dieses Ergebnis weist auf eine erfolgreiche Ligationsreaktion zwischen dem semisynthetischen Ras-Protein **A** und den Phosphingruppen auf der Oberfläche des Glaträgers hin.

Bedauerlicherweise wurden die Cy5-modifizierten Proteine **B** und **C** auf der funktionalisierten Glasoberfläche unspezifisch gebunden, so dass in diesem Fall keine Aussage über eine erfolgreiche Staudinger-Ligation zwischen Protein und Oberfläche gemacht werden konnte. Auch der Nachweis des aktiven Zustand des GTP-bindenden Ras-Proteins mit Hilfe der RBD führte zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.

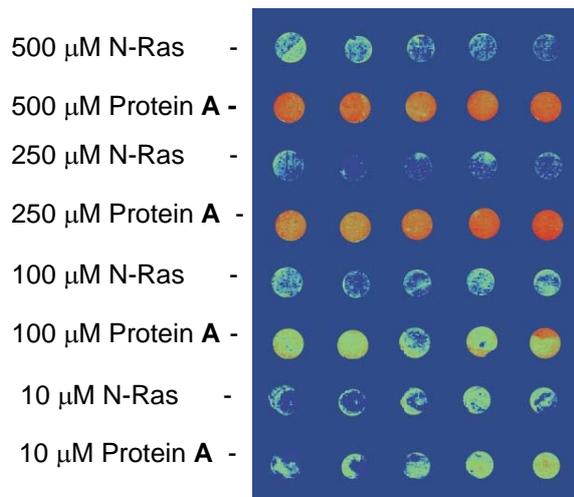


Abbildung 97: Ergebnis der Immobilisierung des Azid-modifizierten N-Ras-Proteins **A** auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation (Negativkontrolle: nicht funktionalisiertes N-Ras).

Die chemoselektive Anbindung der Ras-Proteine auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen über die Staudinger-Ligation konnte somit erstmalig realisiert werden. Aufbauend auf den erfolgreichen Ergebnissen dieser Immobilisierung könnten des Weiteren neuartige Studien zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickelt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Der intrazelluläre Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen ist ein relativ neues Untersuchungsgebiet der „Chemischen Biologie“, der entscheidend von den Rab-Proteinen reguliert wird. Fast jedes der über 60 unterschiedlichen menschlichen Rab-Proteine ist zur essentiellen Membrananbindung an zwei C-terminalen Cysteinen mit einem C₂₀-Isopren geranylgeranyliert. Der Mechanismus des intrazellulären Vesikeltransports und die genaue Rolle der Rab-, seiner Effektor- und Regulator-Proteine in dem GTPase-Zyklus sind bisher noch weitgehend ungeklärt. Zur Untersuchung der Funktion lipidmodifizierter Regulatoren werden Peptid- bzw. Lipopeptidstrukturen benötigt. Diese sind vielfach über die Methoden der Gentechnik nicht oder nur in geringen Mengen zugänglich und müssen daher auf chemischem Wege hergestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind daher entsprechende Synthesemethoden zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten und prenylierten Rab-C-Terminus ausgearbeitet worden. Dieser konnte anschließend mit C-terminal verkürztem Rab7-Protein über die *Expressed Protein Ligation* (EPL)^[124-126] zu semisynthetischen Proteinen verknüpft werden. Über diesen Ansatz wurde ein flexibler Zugang zu unterschiedlich modifizierten Rab-Proteinen gefunden, der über die klassischen molekularbiologischen Methoden nicht realisierbar ist.

Die Sequenz der zu synthetisierenden Peptide sollte weitestgehend der C-terminalen Sequenz des menschlichen Rab7 (²⁰²AESCSC-OMe) entsprechen. Zur Untersuchung der biologisch tolerierten Positionen für die Einführung des Fluoreszenzmarkers wurde dieser zum Einen direkt am C-Terminus und zum Anderen an eine Prenyl-Seitenkette eingeführt. Die Darstellung der Peptide begann mit der Synthese der C-terminal geranylgeranylierten und fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide **12**, **14** und **15** (Abbildung 98). Dipeptid **9** spielte als lipidierter Baustein bei der Peptidsynthese der gewünschten Tetrapeptide eine Schlüsselrolle. Für die Synthese des Tetrapeptids **12** wurde das prenylierte Dipeptid **9** am C-Terminus mit dem Ethylendiamin-modifizierten Dansylderivat verlängert, und anschließend erneut mit dem so erhaltenen fluoreszenzmarkierten Dipeptid **11**, nach dessen N-terminaler Entschützung, zum gewünschten Tetrapeptid **12** umgesetzt. Die beiden Tetrapeptide **14** und **15**, die den Fluorezenzmarker in der Seitenkette der C-terminalen Isoprenylgruppe tragen, konnten

dagegen ausgehend von dem prenylierten Tripeptid **13** und dem entsprechend modifizierten Cysteinderivat erfolgreich aufgebaut werden.

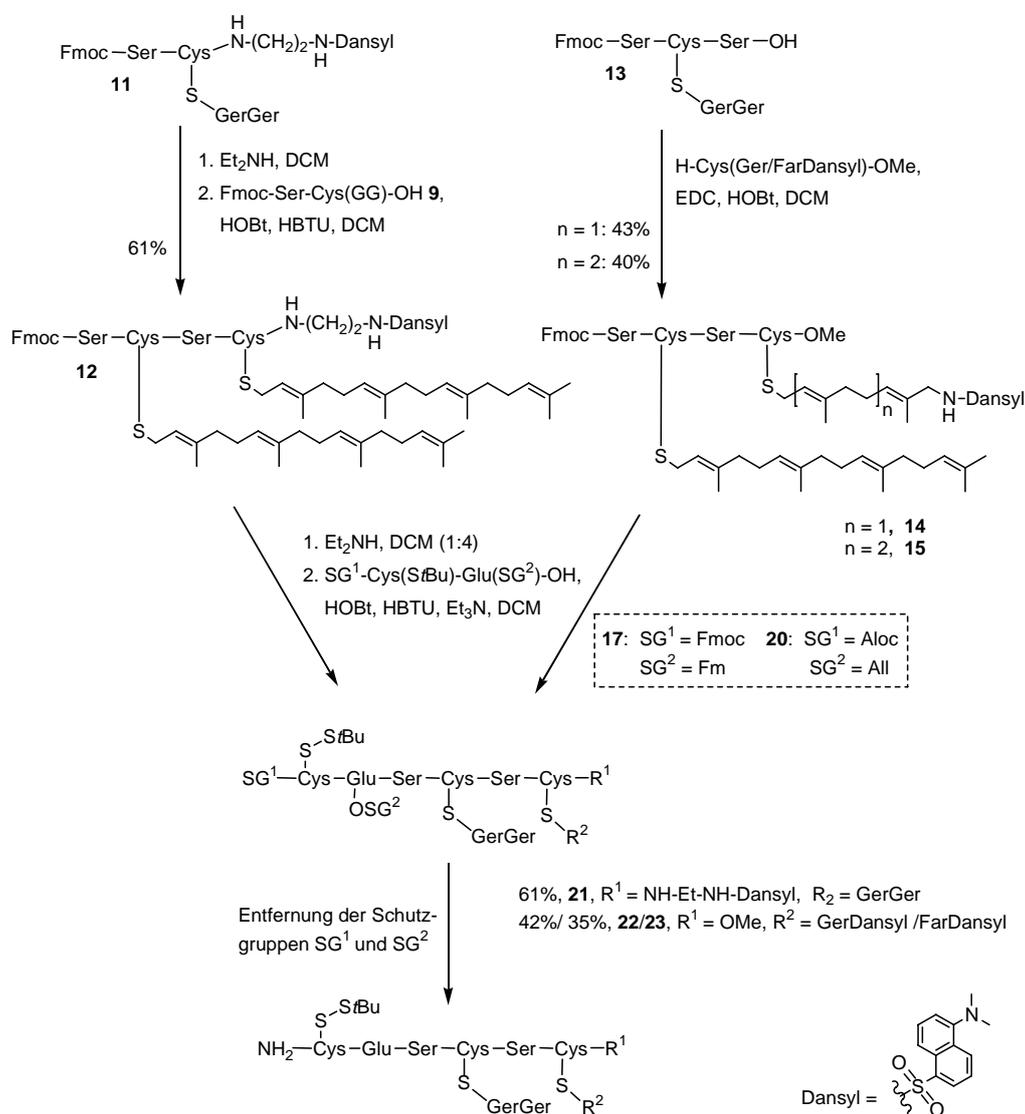


Abbildung 98: Synthese der Hexapeptide in Lösung.

Die synthetisierten Tetrapeptide wurden anschließend nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgreich unter Verwendung der entsprechenden Dipeptide zu den gewünschten Hexapeptiden **21-23** N-terminal verlängert. Bei der Synthese der N-terminalen Dipeptide wurden unter Berücksichtigung der ausgeprägten Säurelabilität der Geranylgeranylreste die basenlabile Fmoc- bzw. Fm-Schutzgruppe (Dipeptid **17**), und alternativ dazu die unter neutralen Bedingungen abspaltbare Aloc- bzw. Allyl-Schutzgruppe (Dipeptid **20**) verwendet. Die Abspaltung der Schutzgruppen zu den vollständig entschützten Zielpetiden verlief in beiden Fällen erfolgreich in einem einzigen Reaktionsschritt.

Mit Hilfe der Lösungssynthese konnten die fluoreszenzmarkierten und prenylierten Rab-C-Termini erfolgreich aufgebaut werden. Um jedoch einen noch flexibleren Zugang zu diesen Lipopeptiden zu finden, wurde die Peptidsynthese an die feste Phase übertragen. Bei der Entwicklung einer adäquaten Strategie für die Festphasensynthese musste vor allem die Einführung der Prenylreste diskutiert werden. Eine Durchführung der Prenylierung an einem bereits an der festen Phase aufgebauten Peptid wurde aus ökonomischen Gründen vermieden, da die Prenylierung an der festen Phase im Allgemeinen einen großen Überschuss an Prenylhalogenid erfordert. Aus diesem Grund wurden lipidierte und Fmoc-geschützte Cysteinderivate synthetisiert, die schließlich bei der Festphasensynthese als lipidierte Bausteine eingesetzt wurden (Abbildung 99).

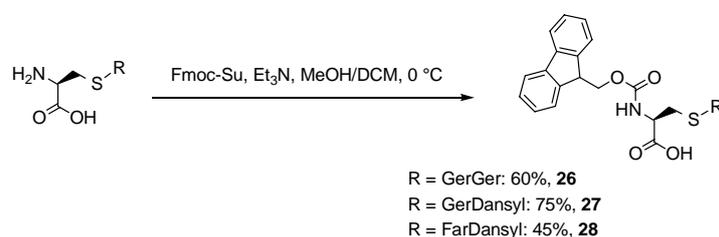


Abbildung 99: Synthese der prelipidierten Bausteine **26-28** für die Festphasensynthese.

Ausgehend vom 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel **30** wurden schließlich die Hexapeptide **34**, **44** und **45** unter Verwendung der lipidierten Cysteinderivate erfolgreich an der festen Phase aufgebaut (Abbildung 100). Es wurde hierbei eine Fmoc-Strategie verfolgt, wobei die Seitenketten der eingesetzten Aminosäuren entsprechend geschützt bzw. modifiziert vorlagen.

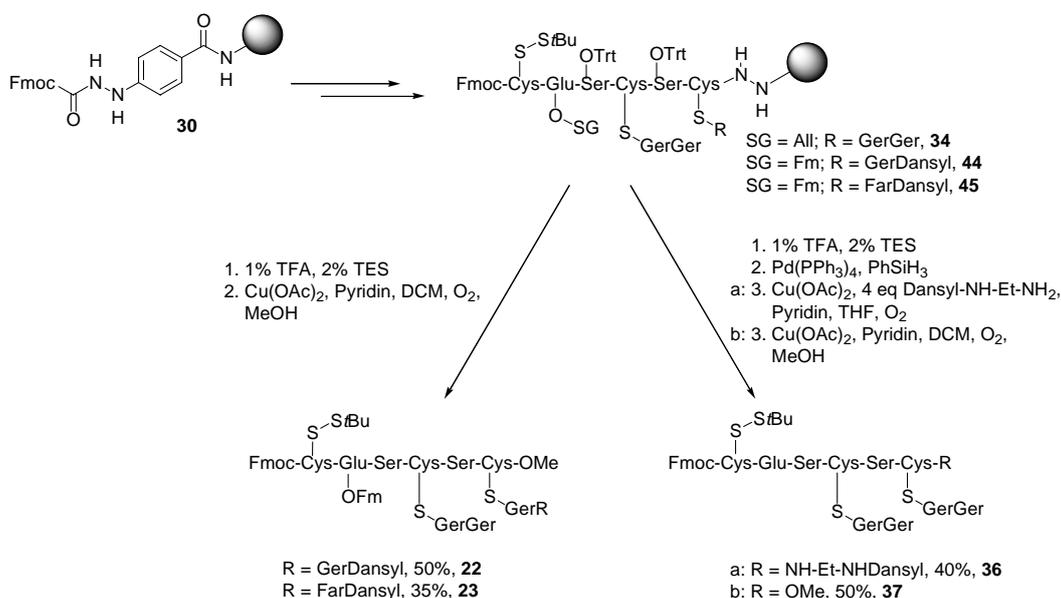


Abbildung 100: Synthese der Hexapeptide an der festen Phase.

Nach der Entfernung der Trityl-Schutzgruppen der Serine unter milden, sauren Bedingungen konnten schließlich die Zielpeptide **22** und **23** unter Verwendung von Kupferacetat in einer methanolischen Dichlormethan-Lösung von der festen Phase abgespalten werden. Die Abspaltung der Peptide erlaubte gleichzeitig das Anbinden unterschiedlicher funktioneller Gruppen an den C-Terminus der Peptide. Für die Abspaltung des Peptides **36** von der festen Phase konnte somit das Ethylendiaminderivat der Dansylgruppe eingesetzt werden. Dies ermöglicht die Einführung des Fluoreszenzmarkers im letzten Schritt der Festphasensynthese in den C-Terminus des Peptids.

In Zusammenarbeit mit Dr. T. Durek und Dr. K. Alexandrov aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund wurden die Hexapeptide **24** und **25** mit $^{1-201}$ Rab7-Thioester in einer zu der von KENT et al. etablierten *Native Chemical Ligation*^[123] analogen Reaktionssequenz erfolgreich verknüpft.^[126] Der Erfolg der Ligation ließ sich unmittelbar über die Fluoreszenz des semisynthetischen Proteins im SDS-PAGE Gel und über ein LC/MS Spektrum bestimmen (Abbildung 101).

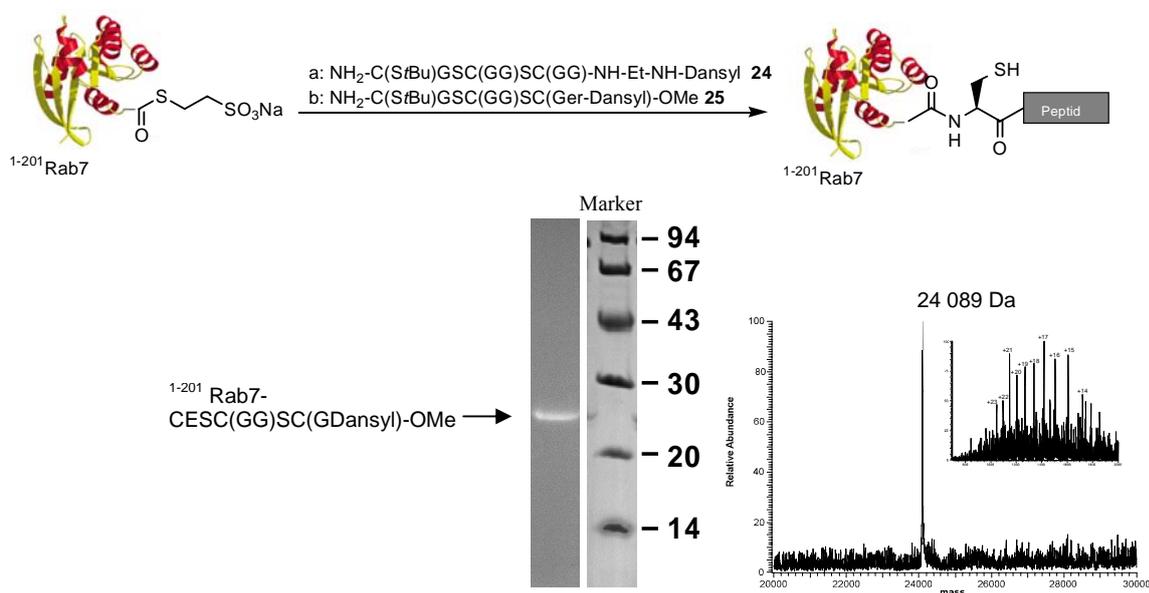


Abbildung 101: Ligation der Hexapeptide mit verkürztem Rab7 Δ 6-Protein; SDS-PAGE Gel und LC/MS-Spektrum des semisynthetischen Rab7 Δ 6-CESC(GG)SC(GDansyl)OMe (berechnete Masse = 24 089 Da).

Der Einsatz synthetisierter Peptid-Protein-Konjugate in der kristallographischen Struktur- aufklärung ist besonders viel versprechend. Die Kristallstrukturen von Proteinen oder Proteinkomplexen bieten häufig die Möglichkeit eines Einblicks in molekulare Abläufe auf

struktureller Ebene. Da für eine Kristallisation die entsprechenden Proteine in einem Multimilligramm Maßstab zugänglich sein müssen, wurden des Weiteren die verkürzten Peptide **47** und **52** synthetisiert, die nachfolgend über die *Expressed Protein Ligation* an das verkürzte $^{1-204}$ Ypt1 Δ 2- bzw. $^{1-203}$ Ypt1 Δ 3-Protein gebunden wurden (Abbildung 102).

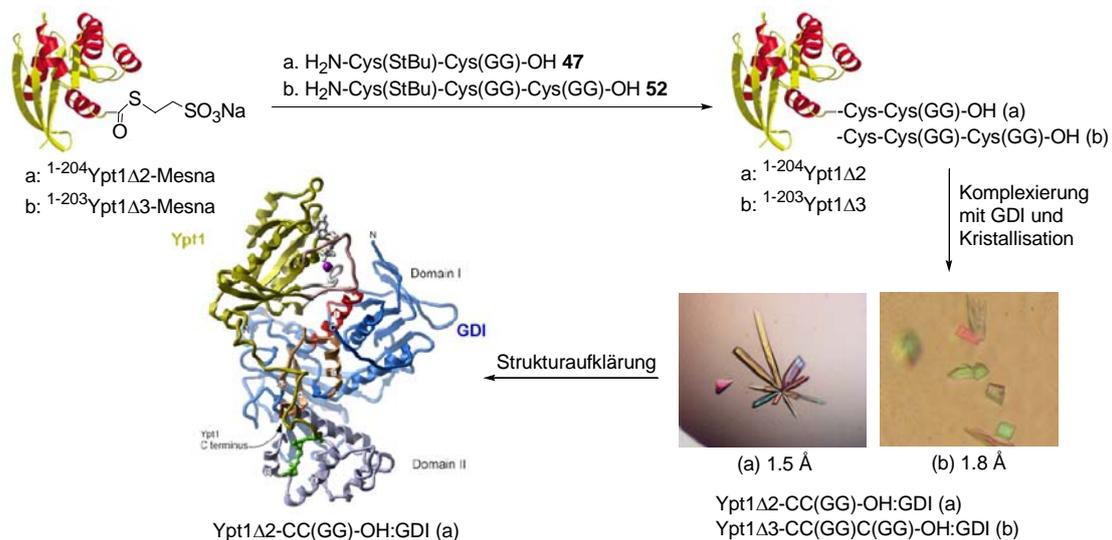


Abbildung 102: Ligation der Peptide **47** und **52**, Komplexierung des semisynthetischen Ypt1 Δ 2CC(GG) bzw. Ypt1 Δ 3CC(GG)C(GG) mit GDI und Kristallisation der Protein-Komplexe Ypt1 Δ 2CC(GG):GDI bzw. Ypt1 Δ 3CC(GG)C(GG):GDI.

Die semisynthetischen Ypt1 Δ 2CC(GG)- und Ypt1 Δ 3CC(GG)C(GG)-Proteine konnten im Anschluss mit ihrem molekularen Chaperon GDI komplexiert werden. Die molekularen Protein-Komplexe wurden von Dr. A. Rak am Max-Planck Institut für molekulare Physiologie kristallisiert, wobei Kristalle mit hohen Auflösungen erhalten wurden. Im Fall des einfach prenylierten Ypt1 Δ 2CC(GG):GDI Protein-Komplexes wurde eine kristallographische Strukturaufklärung erreicht.^[199]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte des Weiteren ein vielseitig modifizierbares Benzolderivat dargestellt werden, welches selektiv über einen Cysteinrest oder eine Maleinimidocaproyl(MIC)-Gruppe am C-Terminus oder über einen Thioester am N-Terminus in Proteine mittels EPL bzw. MIC-Ligation eingeführt werden könnte. Solch ein Baustein würde im Allgemeinen ermöglichen, Proteine auf einfachem Weg mit Fluoreszenzmarkern oder anderen funktionellen Gruppen an definierten Stellen zu modifizieren. Um eine breite Anwendbarkeit zu gewährleisten, sollte eine flexible Einführung verschiedener Modifikationen in den Baustein bzw. nach dessen Ligation in ein Protein gegeben sein. Aus

diesem Grund wurde dieser Baustein ausgehend von einem dreifach orthogonal substituierten Benzolderivat an der festen Phase unter Verwendung des Hydrazid-Harzes aufgebaut (Abbildung 103).

Ausgehend von 5-Nitro-benzol-1,3-dicarbonsäuredimethylester **66** wurde der Methylester in drei Stufen zum Azid umgesetzt und der Baustein anschließend über die zweite Carboxylgruppe an die feste Phase gebunden (**75**). Über das Azid konnte schließlich der gewünschte Cysteinrest unter Ausbildung einer Amidbindung eingeführt werden. Zur Anbindung der zweiten funktionellen Gruppe wurde zunächst die Nitrogruppe mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zum Amin reduziert und das Harz anschließend mit Dansylchlorid umgesetzt. Der fluoreszenzmarkierte Baustein **85** konnte daraufhin erfolgreich von der festen Phase abgespalten werden.

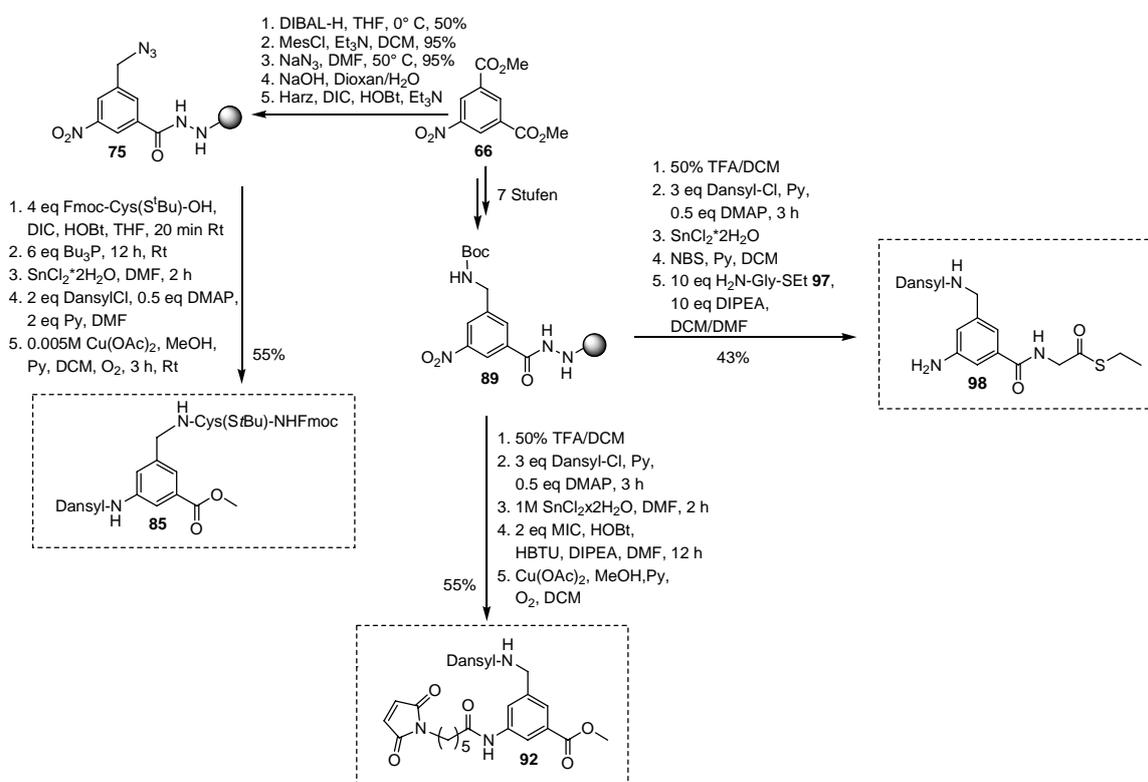


Abbildung 103: Synthese der fluoreszenzmarkierten Bausteine **85**, **92** und **98** an der festen Phase.

Des Weiteren wurde ein Boc-geschütztes Baustein-derivat an die feste Phase gebunden (**89**). Dies ermöglichte nach der Entfernung der Boc-Schutzgruppe die Einführung des Dansyl-Fluorophors. Nach der Reduktion der Nitrogruppe konnte die MIC-Gruppe an den Baustein gekuppelt werden. Der fluoreszenzmarkierte und MIC-funktionalisierte Baustein **92** wurde daraufhin mit einer Ausbeute von 55% vom Harz abgespalten werden. Der gewünschten Bausteinthioester **98** konnte durch die Verwendung des Glycinthioethylster **97** bei der Abspaltungsreaktion erfolgreich dargestellt werden.

Die synthetisierten Bausteine wurden nachfolgend mit verkürztem Ypt1- bzw. N-Ras-Protein ligiert. Abbildung 104 zeigt die Ergebnisse der erfolgreichen MIC-Ligation des Bausteins **92** mit $^{1-181}\text{N-Ras}$ (A) und der EPL des fluoreszenzmarkierten Bausteins **85** nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit Ypt1 Δ 3-Thioester (B).

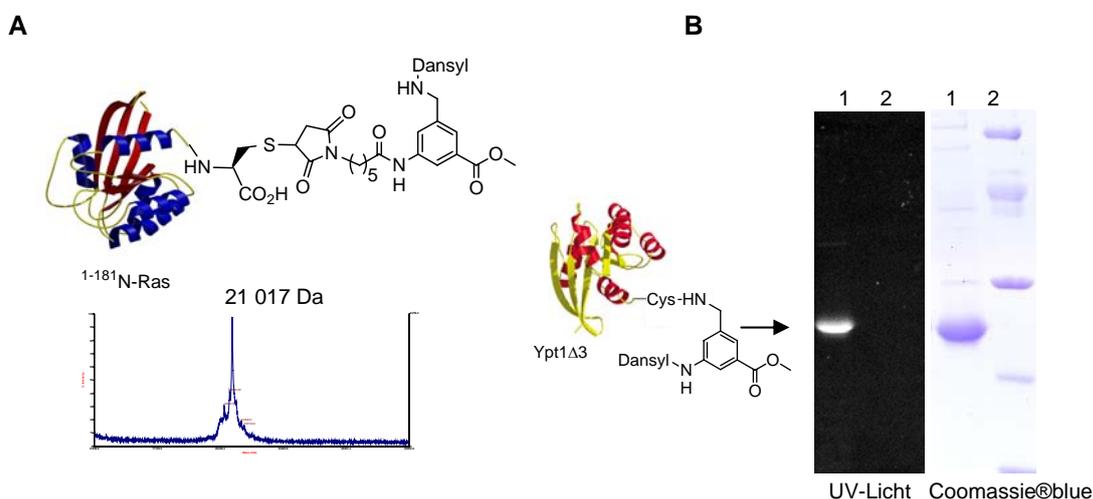


Abbildung 104: A: MALDI-TOF-Spektrum des aufgereinigten semisynthetischen $^{1-181}\text{N-Ras}$ -Proteins (berechnete Masse = 21 005 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$); B: SDS-PAGE Gel des semisynthetischen, fluoreszenzmarkierten Ypt1 Δ 3-Proteins (1 = Ligationsansatz; 2 = Marker).

Aufgrund der erfolgreichen Synthese und Ligation der fluoreszenzmarkierten Bausteine wurde der Baustein weiterhin für die folgende Anwendung eingesetzt: Azid-modifizierte Ras-Proteine sollten auf Phosphin-funktionalisierten Glaträgern, die in dem Arbeitskreis von Prof. H. Waldmann zur Verfügung standen, chemoselektiv über die Staudinger-Ligation immobilisiert werden. Der Baustein sollte infolgedessen zur Einführung des benötigten Azids und eines geeigneten Fluoreszenzmarkers für die Visualisierung der Proteine auf den Oberflächen in den C-Terminus der Ras-Proteine Verwendung finden.

Ausgehend vom Harz **89** bot die Festphasensynthese einen schnellen Zugang zu den für die Immobilisierung benötigten Bausteine (Abbildung 105). Zum Einen wurde Baustein **102** synthetisiert, der nach der Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen des Cysteinrestes mit Hilfe der EPL in das $^{1-180}\text{N-Ras}$ -Protein eingeführt wurde, und somit die Einführung eines Azids in den C-Terminus des Proteins ermöglichte. Zum Anderen erlaubte die Festphasensynthese die Darstellung des Cy5-markierten Bausteins **104**, der anschließend über eine MIC-Ligation in den C-Terminus des $^{1-181}\text{N-Ras}$ -Protein eingeführt wurde. Der dreifach funktionalisierte Baustein **116** konnte durch Kupplung des Bausteins **111** mit einem

Ethylendiamin-modifizierten Cy5-derivat (**115**) dargestellt werden. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde dieser ebenfalls erfolgreich mit N-Ras ligiert.

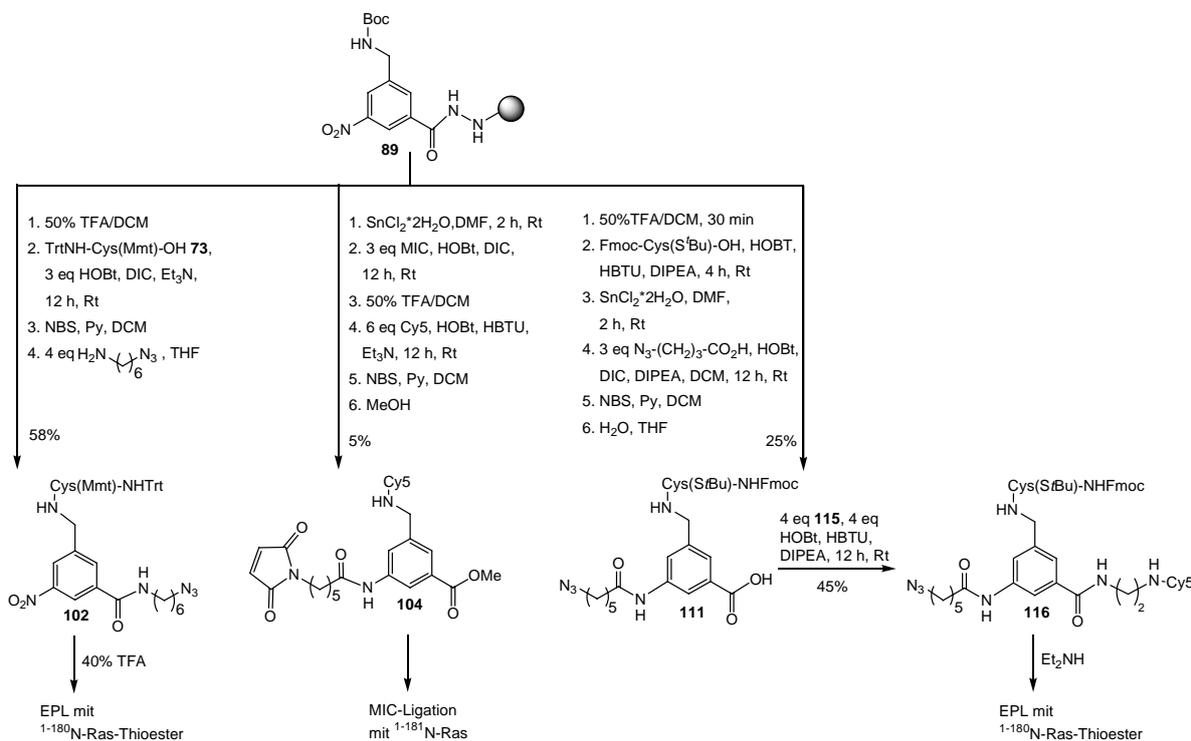


Abbildung 105: Synthese der Bausteine **102**, **104** und **116** für die Immobilisierungs-Experimente.

Die folglich über die Semisynthese erhaltenen Proteine **A**, **B** und **C** (Abbildung 106) wurden jeweils über eine Gelfiltrationssäule aufgereinigt, und standen für die nachfolgenden Experimente in ausreichenden Mengen zur Verfügung.

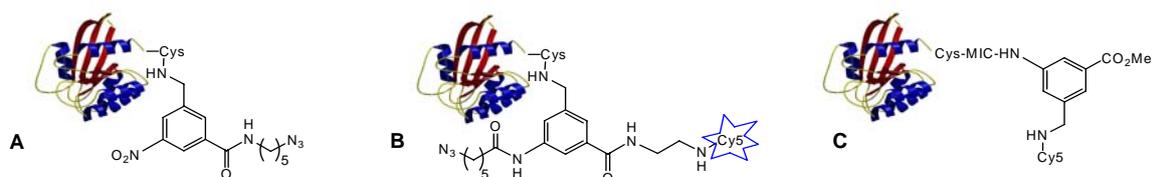


Abbildung 106: Für die Immobilisierung synthetisierte, semisynthetische N-Ras-Proteine.

Die ersten Immobilisierungsversuche zeigten bedauerlicherweise, dass die Cy5-modifizierten Proteine **B** und **C** unspezifisch auf der unpolaren Glasoberfläche gebunden wurden, so dass in diesem Fall keine Aussage über eine erfolgreiche Staudinger-Ligation zwischen Protein und Oberfläche gemacht werden konnte.

Abbildung 107 zeigt indessen das Ergebnis der erfolgreichen Immobilisierung des Proteins **A**. Bei der Immobilisierung wurden die Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen in Phosphatpuffer auf die Glasoberflächen gebracht. Zur Visualisierung des Proteins **A** wurde

die Oberfläche anschließend mit Cy5-markierten Ras-Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente nicht modifiziertes N-Ras. Zwischen dem Azid-funktionalisierten Protein A und N-Ras ist ein deutlicher Unterschied in den Fluoreszenzsignalen zu beobachten. Außerdem ist eine Abnahme der Fluoreszenz mit abnehmender Konzentration der Protein-Lösungen zu erkennen.

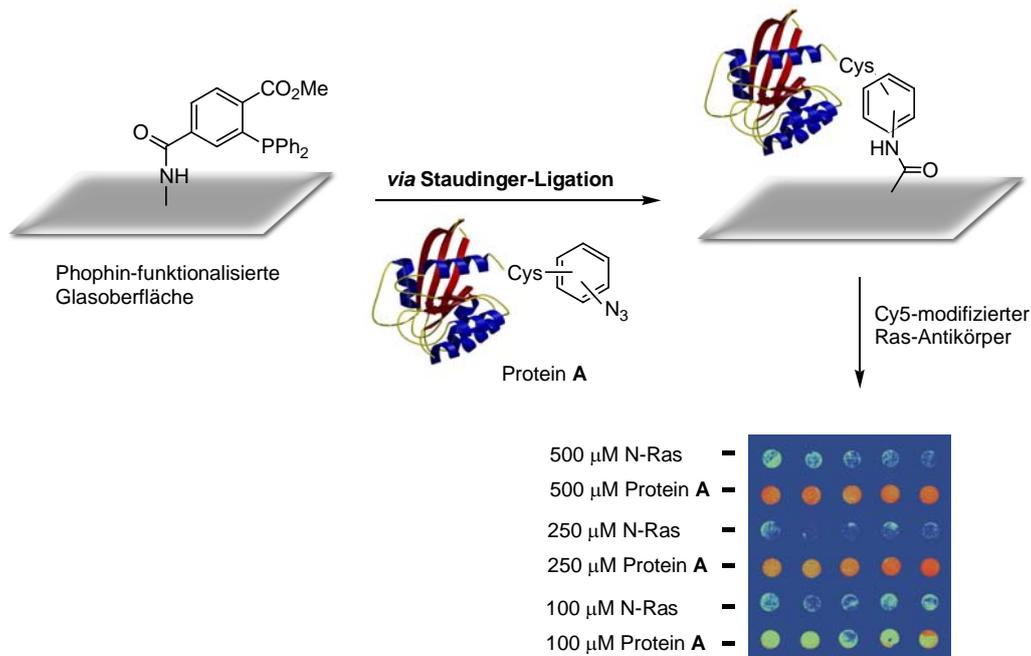


Abbildung 107: Ergebnis der Immobilisierung des semisynthetischen N-Ras-Proteins A auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen.

Die chemoselektive Anbindung der Ras-Proteine auf den Phosphin-funktionalisierten Glasoberflächen über die Staudinger-Ligation konnte hiermit erstmalig realisiert werden.

5.2. Ausblick

Es ist gelungen die bisher verwendete Lösungssynthese der modifizierten C-Termini der Rab-Proteine an die feste Phase zu übertragen. Die Festphasensynthese bot unter Verwendung der lipidierten Bausteine einen äußerst flexiblen Zugang zu den prenylierten und fluoreszenzmarkierten Rab-Peptiden. Mit ihrer Hilfe sollten des Weiteren verschiedenste Lipopeptide zugänglich sein, die in den unterschiedlichsten biochemischen Untersuchungen wie kinetische Studien, Zellokalisationsstudien oder *cross-linking*-Versuche zur weiteren Identifizierung von Rab-Effektoren oder Rezeptoren Einsatz finden könnten. Die Übertragung der Peptidsynthese an die feste Phase sollte zu einer noch flexibleren Anpassung der semisynthetischen Proteine an diese einzelnen Experimente führen.

Das dreifach orthogonal substituierte Benzolderivat könnte weiterhin für die Einführung verschiedener Fluoreszenzmarker sowohl am C- als auch am N-Terminus der Rab-Proteine eingesetzt werden, wodurch FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*)-Studien möglich wären, die für eine weitere Aufklärung der Prenylierungsmaschinerie der Rab-Proteine genutzt werden könnten.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Synthese der hier dargestellten Proteinkonstrukte der weiteren Erforschung von Prozessen, in denen die Rab-Proteine involviert sind, neue Impulse geben wird.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Immobilisierung der Azid-modifizierten Ras-Proteine auf den Glasoberflächen *via* Staudinger-Ligation könnten neuartige Studien zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickelt werden. Diese könnten z.B. zur Evaluierung der Wirksamkeit von Raf-Inhibitoren eingesetzt werden (Abbildung 108): Versetzt man immobilisiertes Ras-Protein mit einem potentiellen Inhibitor und Cy5-modifizierten Raf-Protein, so sollte anhand der Fluoreszenz-Signale auf der Oberfläche eine Aussage über die Inhibitor-Wirksamkeit möglich sein.

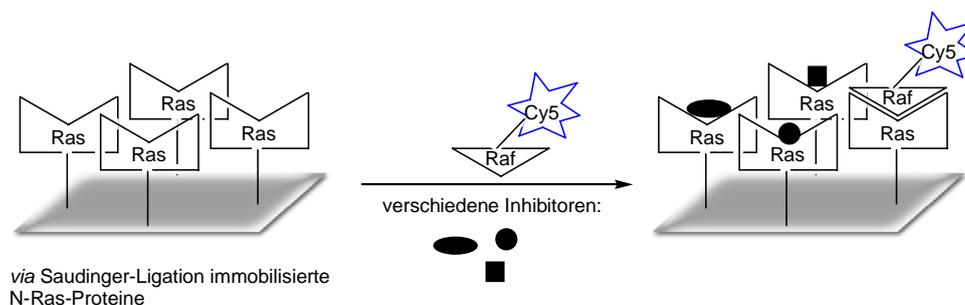


Abbildung 108: Mögliche Durchführung eines Ras-Raf-Inhibitoren Assays auf den Glasoberflächen.

6. Experimenteller Teil

6.1. Messgeräte und Hilfsmittel

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker AM 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR
Varian Mercury 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR
Bruker DRX 500	500 MHz ^1H -NMR, 125.8 MHz ^{13}C -NMR
Varian Inova 600	600 MHz ^1H -NMR, 150.9 MHz ^{13}C -NMR

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, = 0 ppm) als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben, und die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br s = breites Signal.

Die 70 eV EI- und die FAB-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Angegeben sind die m/z -Werte. Die FAB-Spektren wurden im positiven Modus in einer 3-Nitrobenzylalkohol(3-NBA)-Matrix gemessen.

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem ThermoQuest-Finnigan LCQ Deca bzw. LCQ Classic Spektrometer gemessen. Bei LC/MS-Messungen wurde vor das ESI-Massenspektrometer eine analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit einem Gerät der Firma Hewlett Packard (Agilent 1100 *series*) und einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4-Säule der Firma Macherey und Nagel vorgeschaltet. Zur Bestimmung der Retentionszeiten (t_R) wurde, wenn nicht anders angegeben, ein stufenloser Gradient von 50 % A (Wasser/Ameisensäure 99.9:0.1 (v/v)) und 50 % B (Acetonitril/Ameisensäure 99.9:0.1 (v/v)) (0 min) auf 0 % A und 100 % B (30 min) und nachfolgend 10 min 100 % B (40 min) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die ESI-Massenspektren wurden im positiven Modus gemessen.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Voyager-DE™ Pro Biospectrometry Workstation Spektrometer der Firma PerSeptive Biosystems unter Verwendung von 2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHB) gemessen.

Die Elementaranalysen wurden mit einem Verbrennungsautomaten CHN-Rapid der Firma Heraeus durchgeführt.

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktmessapparatur 530 oder 540 der Firma Büchi ermittelt und sind unkorrigiert.

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 oder 241 oder mit einem Schmidt + Haensch Polarimeter HH8 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie bei einer Wellenlänge von 589 nm. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in g / 100 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumplatten beschichtet mit Kieselgel 60_{F254} der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_f -Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet: 1) 2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser; 2) 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml abs. Ethanol; 3) 0.5 %-ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser.

Die präparative Säulenchromatographie^[138] erfolgte mit Flash-Kieselgel (Korngröße 40-64 μm) der Firma Merck in geschlossenen Säulen bei einem Überdruck von 0.3-1.0 bar. Laufmittel und R_f -Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Alle Chemikalien wurden bei den Firmen Fluka, Aldrich, Novabiochem oder Acros erworben mit Ausnahme der eingesetzten Aminosäuren, die aus Schenkungen der Degussa AG stammen. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch nach Standardvorschriften destilliert und bei Bedarf absolutiert.^[217]

6.2. Versuche zu Kapitel 4.1.1.

6.2.1. Versuche zu Kapitel 4.1.1.2.

(*E,E*)-Farnesylaceton (2)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 13.4 ml (105.2 mmol) frisch destillierter Acetessigsäureethylester und 4.71 g (87.2 mmol) Natriummethanolat in 110 ml Methanol abs. unter Argonatmosphäre 9.05 g (31.7 mmol) Farnesylbromid gegeben, und das Reaktionsgemisch wird 3 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N Salzsäure bis zur Neutralisation beendet. Die wässrige Phase wird mit 200 ml Cyclohexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 ml Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Zu einer Suspension von 4.80 g (85.5 mmol) Kaliumhydroxid in 40 ml Ethanol werden 10.61 g (31.7 mmol) 2-Farnesylacetessigsäureethylester gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h zum Rückfluss erhitzt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 ml Wasser und 120 ml Cyclohexan versetzt. Die organische Phase wird je zweimal mit je 50 ml 5%-iger Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 60:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 6.47 g (24.6 mmol, 75 %) eines farblosen Öls

R_F-Wert: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat 30:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 5.03-5.03 (m, 3H, 3 * CH); 2.40 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, CH₂C=O); 2.22 (t, ³J₁ = 7.3 Hz, 1H, CH₂CH₂C=O); 2.10 (s, 3H, CH₃C=O); 2.01-1.99 (m, 4H, 2 * CH₂); 1.92 (t, ³J₁ = 7.5 Hz, 4H, 2 * CH₂); 1.65 (s, 3H, CH₃); 1.58 (s, 3H, CH₃); 1.54 (s, 3H, CH₃); 1.53 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 208.49 (C=O); 136.19, 134.85, 131.03 (3 * quart. C), 124.09, 123.94, 122.30 (3 * CH);

43.50 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 39.59, 39.51 (2 * $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 29.73 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$); 26.39, 26.18 (2 * CH_2CH); 25.53 ($\omega\text{-CH}_3$ trans); 22.34 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 17.51 ($\omega\text{-CH}_3$ cis); 15.82 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[188]

(*E,E,E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester (3)

Zu 0.83 g (19.6 mmol) einer 60%-igen Natriumhydrid-Dispersion in 22 ml Tetrahydrofuran abs. wird eine Lösung von 4.45 ml (18.9 mmol) Diisopropylethyl-phosphonoacetat in 22 ml Tetrahydrofuran abs. getropft und die Mischung 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 3.30 g (12.5 mmol) (*E,E*)-Farnesylaceton **2** in 30 ml Tetrahydrofuran abs. über 30 min zugegeben und das Gemisch 20 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen und mit 35 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 70:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 3.65 g (11.0 mmol, 88 %), eines farblosen Öls
 (*E,E,E*)-Isomer:(*Z,E,E*)-Isomer = 4.3:1

R_f -Wert: 0.21 (*n*-Hexan/Ethylacetat 70:1 (v/v)), (*E,E,E*)-Isomer
 [0.25 (*n*-Hexan/Ethylacetat 70:1 (v/v)), (*Z,E,E*)-Isomer]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ = 5.65 (br, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$); 5.10-5.06 (m, 3H, 3 * CH); 4.13 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2); 2.15-2.14 (m, 7H, 2 * CH_2 , CH_3); 2.12-2.03 (m, 4H, 2 * CH_2); 2.02-1.95 (m, 4H, 2 * CH_2); 1.67 (s, 3H, CH_3); 1.60 (br s, 9H, 3 * CH_3); 1.27-1.22 (m, 3H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

δ = 166.78 [166.13] ($\text{C}=\text{O}$); 159.55 [159.95] ($\text{C}=\text{CHCO}$); 136.00, 134.86, 131.04 (3 * quart. C); 124.33 [124.30], 124.13 [123.12], 123.44 [122.83] (3 * CH); [116.17] 115.66 (CHCO); 59.28 [59.25] (OCH_2); 40.88, 39.64, 39.51 (3 * $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$); 26.77 [26.73], 26.50 [26.43], 25.90 [25.56] (3 * CH_2CH); 25.22 ($\omega\text{-CH}_3$ trans); 18.65 ($\omega\text{-CH}_3$ cis); 17.54, 15.98, 15.85 (3 * CH_3); 14.41 (OCH_2CH_3).

* In eckigen Klammern sind Signale des (*Z,E,E*)-Isomeren angegeben.

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[183]

(*E,E,E*)-Geranylgeraniol (4)

Zu 140 ml -78° C kaltem Dichlormethan abs. werden 27 ml (27.1 mmol) einer 1M Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung in *n*-Hexan gegeben. Nach 30 min werden 3.65 g (11.0 mmol) einer Mischung von (*E,E,E*) und (*Z,E,E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäure-ethylester **3** im Verhältnis 4:1 tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 45 min bei -15° C gerührt und anschließend bei -78° C mit 30 ml Methanol versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur werden 100 ml einer gesättigten Natriumkaliumtartrat-Lösung zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan(*n*-Hexan)/Ethylacetat 30:1 (v/v), dann 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt und dabei in das (*E,E,E*)- und das (*Z,E,E*)-Isomer und eine Mischfraktion getrennt.

Gesamtausbeute: 2.90 g (10.0 mmol, 92 %)

(*E,E,E*)-Isomer:

Ausbeute: 2.03 g (7.0 mmol, 64 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.15 (*n*-Hexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

(*Z,E,E*)-Isomer:

Ausbeute: 0.45 g (1.6 mmol, 14 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.21 (*n*-Hexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 5.38 (br s, 1H, CHCH₂OH); 5.08-5.06 (m, 3H, CH); 4.10 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, α-CH₂); 2.09-2.02 (m, 8H, 4 * CH₂); 1.97-1.92 (m, 4H, 2 * CH₂); 1.65 (s, 6H, 2 * CH₃); 1.57 (s, 9H, 3 * CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 139.55, 135.28, 134.88, 131.15 (4 * quart. C); 124.36, 124.05, 123.56, 123.41 (4 * CH); 59.27 (α-CH₂); 39.70, 39.67, 39.55 (3 * C(CH₃)CH₂); 26.89, 26.60, 26.50 (3 * CH₂CH); 25.58 (ω-CH₃ trans); 17.55 (ω-CH₃ cis); 16.15, 15.88 (2 * CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekanntesten Daten überein.^[218]

(*E,E,E*)-Geranylgeranylchlorid (5)

Zu einer Lösung von 253 mg (1.89 mmol) *N*-Chlorsuccinimid (umkristallisiert aus Wasser) in 5 ml Dichlormethan abs. werden unter Argonatmosphäre bei -40 bis -35° C 150 ml (2.06 mmol) Dimethylsulfid gegeben. Nach fünfminütigem Erwärmen auf 0° C wird das Reaktionsgemisch erneut auf -40 bis -35° C gekühlt und eine Lösung von 500 mg (1.72 mmol) (*E,E,E*)-Geranylgeraniol **4** in 2 ml Dichlormethan abs. zugegeben. Die resultierende weiße Suspension wird 1 h bei -10 bis -5° C und 1 h bei -4 bis -2° C gerührt, danach auf 20 ml 0° C kalter gesättigter NaCl-Lösung gegeben und mit 30 ml Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird dreimal mit je 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Ausbeute: 504 mg (1.63 mmol, 95 %) eines farblosen Öls

R_F-Wert: 0.73 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 5.45 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, CHCH₂Cl); 5.09-5.06 (m, 3H, CH); 4.06 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, α-CH₂); 2.12-2.02 (m, 8H, 4 * CH₂); 1.96-1.91 (m, 4H, 2 * CH₂); 1.76 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 3H, CH₃); 1.71 (d, ⁴J = 0.8 Hz, 3H, CH₃); 1.58 (s, 9H, 3 * CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 142.60, 135.53, 134.87, 131.13 (4 * quart. C); 124.36, 124.09, 123.26, 120.33 (4 * CH); 39.97 (α-CH₂); 39.71, 39.65, 39.43 (3 * C(CH₃)CH₂); 26.74, 26.55, 26.09 (3 * CH₂CH); 25.62 (ω-CH₃ trans); 17.59 (ω-CH₃ cis); 16.01, 15.95, 15.91 (3 * CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekanntesten Daten überein.^[119]

***N,N*-Bis-allyloxycarbonyl-*L*-cystins**

((Aloc-Cys-OH)₂) (6)

Zu einer Lösung von 5 g (21 mmol) *L*-Cystin in 80 ml halbgesättigter Na₂CO₃-Lösung werden 3 g (42 mmol) Kaliumhydroxid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 0° C unter Argon mit 5.3 ml (50.4 mmol) Allylchloroformat versetzt. Es wird 2 Tage bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung zweimal mit je 40 ml Diethylether extrahiert und der pH-Wert der wässrigen Phase mit 4N HCl auf pH = 1 eingestellt. Nach sechsfacher Extraktion mit je 50 ml Dichlormethan werden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 8.14 g (39.9 mmol, 95 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.7 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, DMSO):

δ = 7.57 (d, ³J = 10.5 Hz, 2H, OH); 5.91-5.83 (ddd, ³J₁ = 21.5 Hz, ³J₂ = 13.4 Hz, ³J₃ = 6.6 Hz, 2H, CH); 5.29-5.14 (m, 4H, CH₂); 4.46 (d, ³J = 6.4 Hz, 4H, =CH₂); 4.26-4.20 (m, 2H, α-CH); 3.16-3.11 (m, 2H, β-CH₂); 2.92-2.86 (m, 2H, β-CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO):

δ = 172.9 (CO₂H); 156.5 (CONH); 134.1 (CH), 117.7 (CH₂); 65.3 (OCH₂); 53.7 (α-CH); 31.3 (β-CH₂).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[192]

S-Geranylgeranyl-L-cystein

(H-Cys(GerGer)-OH) (8)

Unter Eiskühlung werden zu 500 mg (3.17 mmol) HCl * H-Cys-OH unter Argonatmosphäre 10 ml einer 2 N NH₃/Methanol-Lösung gegeben. Anschließend wird bei 0° C eine Lösung von 979 mg (3.17 mmol) GerGerCl **5** in 2 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol (100 ml) coevaporiert. Das verbleibende Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet, und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 15:1 (v/v), 10:1 (v/v) und 5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.08 g (2.75 mmol, 87 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 164-166° C

R_f-Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 7:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -12.0 (c = 0.2, Methanol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD):

$\delta = 5.25$ (q, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, $\text{SCH}_3\text{CH=}$); 5.08-5.06 (m, 3H, 3 C=CH); 3.83-3.80 (dd, $^3J_1 = 10.9$ Hz, $^3J_2 = 4.8$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$); 3.31-3.28 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$); 3.26 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}_{2b}$); 3.17-3.13 (dd, $^2J = 18.0$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, SCH_{2a}); 2.77 (dd, $^2J = 18.0$ Hz, $^3J = 11.2$ Hz, 1H, SCH_{2ab}); 2.09-2.02 (m, 12H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=}$); 1.69 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ trans); 1.64 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 1.58 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 1.56 (s, 6H, 2 * $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD):

$\delta = 138.8, 133.9, 133.5$ (4 * C=CH); 123.2, 123.1, 122.8 (3 * C=CH); 52.7 ($\alpha\text{-CH}$); 38.6, 38.5 (3 * $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$); 31.0 ($\beta\text{-CH}_2$); 28.2 ($\text{SCH}_2\text{C=}$); 25.5, 25.4, 25.3 (3 * $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=}$); 23.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=}$); 15.0 ($=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 14.3, 14.2, 14.1 (3 * $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis).

$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{S}$ (393.63)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 394.2780 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 394.2809 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cystein (Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-OH) (9)**

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 3.00 g (9.17 mmol) Fmoc-Ser-OH und 1.05 g (9.17 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 15 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 1.99 g (9.62 mmol) DCC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Harnstoffs und der Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und für die weitere Umsetzung verwendet.

In 100 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 3:1 (v/v) werden 300 mg (0.76 mmol) H-Cys(GerGer)-OH **8** gelöst. Unter Eiskühlung werden 1.3 Äquivalente Et_3N (0.14 ml, 0.99 mmol) und anschließend eine Lösung von 1.5 Äquivalenten Fmoc-Ser-OSu (482 mg, 1.14 mmol) in 2 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 3:1 (v/v) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol (50 ml) coevaporiert. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	404-326 mg (0.57-0.46 mmol, 60-75 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	100-101° C
R _f -Wert:	0.30 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-26.0 (c = 1.2, Methanol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.72 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.65-7.60 (m, 2H, Fmoc); 7.34 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.27 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, Fmoc); 5.16 (m, 1H, SCH₃CH= GerGer); 5.06 (m, 3H, C=CH, GerGer); 4.63 (t, ³J = 8.6 Hz, 1H, α-CH Cys); 4.20 (m, 1H, α-CH Ser); 4.34-4.30 (m, 3H, Fmoc); 4.34 (d, ³J = 6.5 Hz, 4H, β-CH₂ Ser); 3.20-3.10 (m, 4H, 2* SCH₂ GerGer); 3.01-2.97 (dd, ²J = 17.3 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H; β-CH_{2a} Cys); 2.85-2.79 (dd, ²J = 17.4 Hz, ³J = 9.3 Hz, 1H; β-CH_{2b} Cys); 2.02-1.93 (m, 12H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.63 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.62 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.55 (s, 9H, =C(CH₃)CH₃ cis).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

173.0 (CO₂H); 171.5 (C=O); 157.2 (CH₂NHC=O); 144.1, 144.0, 141.4, 141.4, 139.5 (C-8a, C-9a, C-4a, C-4b Fmoc); 135.0, 134.7 (2x C=CH); 131.0 (C=CH); 127.7, 127.1 (C=CH, C-3, C-6, C-2, C-7 Fmoc); 125.2, 125.1 (C-1, C-8 Fmoc); 124.5, 124.4 (2x C=CH); 124.3 (C=CH); 124.1 (C=CH); 124.0, 119.8 (C-4, C-5 Fmoc); 67.2 (C-10 Fmoc); 62.3 (β-CH₂ Ser); 57.0 (α-CH Cys); 52.6 (α-CH Ser); 46.7 (C-9 Fmoc); 39.7, 39.7 (2x =C(CH₃)CH₂CH₂); 39.6 (=C(CH₃)CH₂CH₂); 32.7 (β-CH₂ Cys); 29.5 (SCH₂C=); 26.7, 26.5 (2x CH₂CH₂CH=); 26.4 (=C(CH₃)CH₃ trans); 25.0 (CH₂CH₂CH=); 16.9 (=C(CH₃)CH₃ cis); 15.4, 15.3, 15.3 (3x =(CH₂)CH₃ cis).

C₄₁H₅₄N₂O₆S (702.94)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 701.3624 [M-H]⁻
gef.: 701.3635 (in 3-NBA-Matrix)

2-[N-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)]amino-ethyl-amin (Dansyl-NH-CH₂-CH₂-NH₂) (10)

Zu einer Lösung von 4.36 ml Diethylamin in 150 ml THF werden bei 0° C 1.78 g (6.6 mmol) Dansylchlorid in 100 ml THF langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei 0° C gerührt und anschließend mit 18 ml 1N KOH-Lösung versetzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand viermal mit je 50 ml

Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Ethanol gelöst und das Produkt anschließend durch Zugabe von Wasser auskristallisiert.

Ausbeute: 1.48 g (5.61 mmol, 85 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 57° C
 R_f -Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.41$ (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-4); 8.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-8); 8.06 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, H-2); 7.60 - 7.53 (m, 2H, H-3, H-7); 7.20 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H-6 Dansyl); 2.78 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.70 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2); 2.46 (d, $^3J = 2.0$ Hz, 2H, NH_2); 2.41 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3):

$\delta = 51.7$ (C-5); 136.4 (C-1); 129.7 (C-8); 129.7 , 129.4 , 129.3 (C-2, C-4a, C-8a); 128.6 (C-3); 124.0 (C-7); 119.4 (C-4); 115.4 (C-6); 46.5 (CH_2); 45.4 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 41.8 (CH_2).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[193]

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino]-ethyl-amid
(Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-NH-CH₂-CH₂-NHDansyl) (11)**

Bei 0° C werden zu einer Lösung von 50 mg (0.071 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-OH **9**, 12 mg (0.171 mmol) HOBt, 27 mg (0.171 mmol) HBTU und 20 μl (0.285 mmol) Et_3N in 5 ml Dichlormethan 3 mg (0.156 mmol) Dansyl-NH(CH₂)₂NH₂ **10** gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:2.5 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (0.054 mmol, 76 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 155-157° C
 R_f -Wert: 0.56 (Dichlormethan/Methanol 10:0.5 (v/v))
 $[\alpha]_D^{20}$: -9.6 (c = 1.2, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3):

δ = 8.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-4 Dansyl); 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-8 Dansyl); 8.12 (d, 3J = 7.3 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.70 (d, 3J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc); 7.58 (br s, 1H, NH); 7.54 (t, 3J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc); 7.52 (t, 3J = 7.4 Hz, 1H, Fmoc); 7.42 (t, 3J = 8.0 Hz, 1H, H-3, Dansyl); 7.32 (t, 3J = 8.3 Hz, 1H, H-7 Dansyl); 7.22 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.20 (d, 3J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc); 7.10 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H, H-6 Dansyl); 6.51 (t, 3J = 7.1 Hz, 1H, NH); 6.28 (d, 3J = 7.0 Hz, 1H, NH); 5.13 (t, 3J = 7.2 Hz, 1H, $\text{SCH}_3\text{CH}=\text{GerGer}$); 5.05 (m, 3H, $\text{C}=\text{CH}$, GerGer); 4.56 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Cys); 4.39 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Ser); 4.34 (d, 3J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc); 4.14 (t, 3J = 7.2 Hz, 1H, Fmoc); 4.01 (m, 1H, CH_{2a} Ser); 3.82 (m, 1H, CH_{2b} Ser); 3.33 (m, 1H, CH_{2a} Cys); 3.29 (m, 1H, CH_{2b} Cys); 3.08 (d, 3J_1 = 5.5 Hz, 2H, SCH_2 GerGer); 2.93 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.80 (m, 8H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ Dansyl); 2.02-1.92 (m, 12H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 1.63 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ trans); 1.57 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 1.55 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 1.53 (s, 3H, $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3):

δ = 171.1 ($\text{CH}_2\text{NHC}=\text{O}$); 170.8 (CONH); 154.4 (CH_2OCNH); 151.8 (C-5 Dansyl); 143.6, 143.5, 141.1, 140.0 (C-8a, C-9a, C-4a, C-4b Fmoc); 135.2, 134.8 (2x $\text{C}=\text{CH}$); 134.7, 131.1 ($\text{C}=\text{CH}$, C-1 Dansyl); 130.3 (C-8 Dansyl); 129.8, 129.4, 129.0 (C-2, C-4a, C-8a Dansyl); 128.4 ($\text{C}=\text{CH}$, C-3 Dansyl); 128.2 (C-3, C-6 Fmoc); 127.6 (C-2 Fmoc); 127.0 (C-7 Fmoc); 125.1, 125.0 (C-1, C-8 Fmoc); 124.3 (2x $\text{C}=\text{CH}$); 124.1 ($\text{C}=\text{CH}$); 123.7 (C-7 Dansyl); 123.0 ($\text{C}=\text{CH}$); 119.8, 119.1 (C-4, C-5 Fmoc); 118.8 (C-4 Dansyl); 115.1 (C-6 Dansyl); 67.3 (C-10 Fmoc); 62.9 ($-\text{CH}_2$ Ser); 56.2 ($\alpha\text{-CH}$ Cys); 53.1 ($\alpha\text{-CH}$ Ser); 46.9 (C-9 Fmoc); 45.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 42.2 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 39.8, 39.6 (2x $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$); 39.5 ($=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$); 32.5 ($-\text{CH}_2$ Cys); 29.6 ($\text{SCH}_2\text{C}=\text{}$); 26.6, 26.5 (2x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 26.4 ($=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ trans); 25.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$); 17.6 ($=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis); 16.0, 15.9, 15.9 (3x $=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ cis).

$\text{C}_{55}\text{H}_{71}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ (978.49)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 978.4864 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 978.4863 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino]-ethyl-amid**

(Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)NH-CH₂-CH₂-NHDansyl) (12)

Bei 0°C werden zu einer Lösung von 23 mg (0.024 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-NH-(CH₂)₂-NHDansyl **11** in 800 µl Dichlormethan 200 µl Diethylamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol coevaporiert und der Rückstand in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit einem Eisbad gekühlt. Zu der Lösung werden bei 0° C 16.5 mg (0.024 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-OH **10**, 3.8 mg (0.028 mmol) HOBt, 9 mg (0.028 mmol) HBTU und 6.5 µl (0.047 mmol) Et₃N gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol coevaporiert und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:0.2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	18.7 mg (0.013 mmol, 54 %) eines schwach gelben Feststoffs
Schmelzpunkt:	160-162° C
R _f -Wert:	0.73 (Dichlormethan/Methanol 10:0.5 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-18.5 (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ = 8.53 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-4 Dansyl); 8.28 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-8 Dansyl); 8.22 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.76 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.59 (br s, 1H, NH); 7.58-7.51 (m, 4H, H-3, H-7 Dansyl, 2H Fmoc); 7.41 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.38 (br s, 1H, NH); 7.34-7.30 (m, 2H, Fmoc); 7.28 (br s, 1H, NH); 7.21 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-6 Dansyl); 6.56 (br s, 1H, NH); 6.34 (br s, 1H, NH); 5.69 (br s, 1H, NH); 5.28-5.18 (m, 2H, SCH₃CH= GerGer); 5.09 (m, 6H, C=CH, GerGer); 4.48-4.35 (m, 4H, 2x α-CH Cys, 2H Fmoc); 4.25-4.15 (m, 3H, 2x α-CH Ser, 1H Fmoc); 3.67 (m, 4H, 2x β-CH₂ Ser); 3.21-3.08 (m, 8H, 2x β-CH₂ Cys, 2x SCH₂ GerGer); 3.01 (m, 2H, NHCH₂CH₂NH); 2.91 (s, 6H, N(CH₃)₂ Dansyl); 2.84 (m, 2H, NHCH₂CH₂NH); 2.10-1.85 (m, 24H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.67 (s, 6H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.59 (s, 30H, =C(CH₃)CH₃ cis).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

δ = 170.7 (CH₂NHCO); 167.0, 166.8, 165.3 (3x C=O); 157.3 (CH₂OCNH); 151.8 (C-5 Dansyl); 143.5 (C-8a, C-9a Fmoc); 141.2, 140.3 (C-4a, C-4b Fmoc); 135.4, 135.3 (2x C=CH); 134.9 (2x C=CH); 134.9 (C-1 Dansyl); 131.3, 131.2 (4x C=CH), 130.6 (C-8 Dansyl); 129.8

(C-2, C-4a Dansyl); 129.2 (C-8a Dansyl); 128.3 (C-3 Dansyl); 127.8 (2x C=CH); 127.7 (C-3, C-6 Fmoc); 127.1 (C-2 Fmoc); 127.0 (C-7 Fmoc); 126.6, 126.1 (C-1, C-8 Fmoc); 124.4, 124.2 (2x C=CH); 124.1 (2x C=CH); 123.8 (C-7 Dansyl); 123.6, 123.1 (2x C=CH); 119.9 (C-4, C-5 Fmoc); 117.4 (C-4 Dansyl); 111.1 (C-6 Dansyl); 67.7 (C-10 Fmoc); 62.0 (-CH₂ Ser); 46.8 (C-9 Fmoc); 45.3 (N(CH₃)₂); 42.4 (NHCH₂CH₂NH); 39.7 (6x =C(CH₃)CH₂CH₂); 39.6 (2x -CH₂ Cys); 29.6 (2x SCH₂C=); 26.7, 26.6, 26.5 (6x CH₂CH₂CH=); 25.7 (2x =C(CH₃)CH₃ trans); 17.6 (2x =C(CH₃)CH₃ cis); 16.2, 16.0, 16.0 (6x =(CH₂)CH₃ cis).

ESI-MS + m/z: ber. für C₈₁H₁₁₄N₇O₁₀S₃ [M+H] 1440.8, gef.: 1440.7

MALDI-TOF (DHB): ber. für C₈₁H₁₁₃N₇O₁₀S₃Na [M+Na] 1462.7, gef.: 1462.4

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-seryl-S-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-L-cysteinmethylester
(Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerDansyl)-OMe) (14)**

Zu einer Lösung von 26 mg (33 μmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-OH in 5 ml Dichlormethan werden bei 0° C 15.4 mg (30 μmol) NH₂-Cys(Ger-Dansyl)-OMe gegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit 8.9 mg (66 μmol) HOBT, 9.5 mg (49 μmol) EDC*HCl und 7.0 μl (49 μmol) Et₃N versetzt und 1 h bei 0° C und weiter 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml Dichlormethan versetzt und die organische Phase mit Ammoniumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) und 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (12 μmol, 40 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 162-164° C

R_F-Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol 25:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -15.6 (c = 0.25, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.62 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.39 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 8.24 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.80-7.20 (br s, 2H, NH); 7.75 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc); 7.58 (m, 4H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl, 2H Fmoc); 7.39 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.30 (m, 3H, 2H Fmoc, H-6 Dansyl); 7.1 (br s, 1H, NH); 5.90 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, NH Fmoc); 5.50 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H, NH-Dansyl);

5.19 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, C=CH); 5.15 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, C=CH); 5.11 (m, 4H, C=CH); 4.79 (m, 1H, α -CH Cys); 4.62 (m, 2H, α -CH Cys, α -CH Ser); 4.41 (m, 1H, α -CH Ser); 4.35 (m, 2H, H-10 Fmoc); 4.17 (m, 1H, H-9 Fmoc); 4.13 (m, 1H, β -CH_{2a} Ser); 4.03 (m, 1H, β -CH_{2a} Ser); 3.76 (m, 2H, 2 x β -CH_{2b} Ser); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.39 (d, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.17 (m, 4 H, SCH₂ GerGer, SCH₂ Ger-Dansyl); 3.01-2.84 (m, 10H, N(CH₃)₂, 2 x β -CH₂ Cys); 2.09-1.84 (m, 16H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.67 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.64, 1.60, 1.59, 1.59, 1.58 (5 x s, 15H, 5 x CH₃ cis); 1.40 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

$\delta = 170.4$ (CH₃OC=O); 152.2 (C-5 Dansyl); 143.6 (C-8a, C-9a Fmoc); 140.8 (C-4a, C-4b Fmoc); 140.2 (C=CH); 138.9 (C=CH); 136.7 (C=CH); 135.2 (C-1 Dansyl); 134.8 (C=CH); 130.8 (C=CH); 130.7 (C=CH); 130.1 (C-8 Dansyl); 130.0 (C-2 Dansyl); 129.7, 129.3 (C-4a, C-8a Dansyl); 127.6 (C-3 Dansyl); 127.3 (C=CH); 127.5 (C-3, C-6 Fmoc); 126.9 (C-2, C-7 Fmoc); 124.8 (C-1, C-8 Fmoc); 124.1, 124.0, 124.0, 123.9 (4 x C=CH); 124.2 (C-7 Dansyl); 119.7 (C-4, C-5 Fmoc); 120.4 (C-4 Dansyl); 118.9 (C=CH); 115.8 (C-6 Dansyl); 67.3 (C-10 Fmoc); 62.9, 62.8 (2 β -CH₂ Ser); 55.9, 55.0, 54.8, 51.5 (4 x α -CH); 52.7 (OCH₃); 50.8 (C=CHCH₂NH); 47.1 (C-9 Fmoc); 46.4 (N(CH₃)₂); 40.1, 29.9, 29.5, 29.5 (2 x β -CH₂ Cys, 2 x SCH₂CH=); 39.7, 39.4, 39.4, 39.3 (4 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 26.9, 26.7, 26.5, 25.6 (3 x CH₂CH₂CH=); 25.6 (=C(CH₃)CH₃ trans); 17.8 (=C(CH₃)CH₃ cis), 16.4, 16.0, 15.8, 15.8 (4 x =C(CH₂)CH₃ cis); 14.2 (=C(CH₃)CH₂NH).

ESI-MS + m/z: ber. für C₇₀H₉₅N₆O₁₁S₃ [M+H] 1291.6, gef.: 1291.5; ber. für C₇₀H₉₄N₆NaO₁₁S₃ [M+Na] 1313.6, gef.: 1313.6

MALDI-TOF (DHB) ber. für [M+Na] 1313.6, gef.: 1314.3; ber. für [M+K] 1329.6, gef.: 1330.3

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cystein-S-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-L-cysteinmethyl-ester**

(Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(FarDansyl)-OMe) (15)

Zu einer Lösung von 70 mg (89 μ mol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-OH in 5 ml Dichloromethan und 5 ml DMF werden 52 mg (89 μ mol) NH₂-Cys(Ger-Dansyl)-OMe gegeben. Zu dem Reaktionsgemisch werden bei 0° C 18 mg (133 μ mol) HOBt, 26 mg (133 μ mol) EDC*HCl und 12.5 μ l (89 μ mol) Et₃N gegeben. Man lässt die Lösung 1 h bei 0° C und

5 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 10 ml Dichlormethan versetzt und die organische Phase mit Ammoniumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	15 mg (12 µmol, 40 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	162-164° C
R _f -Wert:	0.35 (Dichlormethan/Methanol 19:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-17.7 (c = 1.00, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.56 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.34 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 8.23 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.74 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc); 7.55 (m, 4H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl, 2H Fmoc); 7.4-7.2 (br s, 3H, NH); 7.38 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.29 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, Fmoc) 7.21 (br s, 1H, H-6 Dansyl); 5.90 (d, ³J = 6.5 Hz, 1H, NH Fmoc); 5.20 (br s, 1H, NH-Dansyl); 5.17 (m, 3H, C=CH); 5.09 (m, 3H, C=CH); 5.00 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, C=CH); 4.75 (m, 1H, -CH Cys); 4.68 (m, 2H, -CH Cys, α-CH Ser); 4.43 (m, 1H, α-CH Ser); 4.37 (d, ³J = 6.7 Hz, 2H, H-10 Fmoc); 4.19 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H, H-9 Fmoc); 4.09 (m, 1H, β-CH_{2a} Ser); 4.00 (m, 1H, β-CH_{2a} Ser); 3.75 (m, 2H, 2 x β-CH_{2b} Ser); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 3.39 (d, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.16 (m, 4 H, SCH₂ GerGer, SCH₂ Ger-Dansyl); 2.99-2.84 (m, 4H, 2 x β-CH₂ Cys); 2.90 (br s, 6H, N(CH₃)₂); 2.07-1.82 (m, 20H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.67 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.64, 1.63, 1.59, 1.58, 1.58, 1.52 (6 x s, 15H, 5 x CH₃ cis); 1.40 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

δ = 170.4 (CH₃OC=O); 152.4 (C-5 Dansyl); 143.6 (C-8a, C-9a Fmoc); 140.7 (C-4a, C-4b Fmoc); 140.1 (C=CH); 138.8 (C=CH); 135.7 (C= 7 (C=CH); 134.6 (C=CH); 131.7 (C=CH); 130.7 (C=CH); 130.1 (C-8 Dansyl); 130.1 (C-2 Dansyl); 129.5, 129.0 (C-4a, C-8a Dansyl); 128.8 (C-3 Dansyl); 128.7 (C=CH); 128.3 (C-3, C-6 Fmoc); 127.6 (C-2, C-7 Fmoc); 125.4 (C-1, C-8 Fmoc); 125.2, 124.8, 124.3, 124.3, 124.2 (5 x C=CH); 123.8 (C-7 Dansyl); 120.4 (C-4, C-5 Fmoc); 120.3 (C-4 Dansyl); 119.8 (C=CH); 115.6 (C-6 Dansyl); 67.7 (C-10 Fmoc); 63.3, 63.2 (2 -CH₂ Ser); 56.1, 55.1, 53.7, (3 x α-CH); 53.2 (OCH₃); 52.0 (α-CH); 51.8 (C=CHCH₂NH); 47.4 (C-9 Fmoc); 45.7 (N(CH₃)₂); 33.1, 33.0, (2 x β-CH₂); 29.9, 29.9 (2 x

SCH₂CH=); 39.8, 39.8, 39.7, 39.5, 39.4 (5 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 27.2, 26.9, 26.6, 26.6, 26.1 (5 x CH₂CH₂CH=); 26.2 (=C(CH₃)CH₃ trans); 17.7 (=C(CH₃)CH₃ cis), 16.5, 16.0, 16.0, 15.9, 15.0 (5x =C(CH₂)CH₃ cis); 14.3 (=C(CH₃)CH₂NH).

ESI-MS + m/z: ber. für C₇₅H₁₀₃N₆O₁₁S₃ ([M+H]) 1359.7, gef.: 1359.6; ber. für C₇₅H₁₀₂N₆NaO₁₁S₃ [M+Na] 1381.7, gef.: 1381.7

MALDI-TOF (DHB) ber. für [M+Na] 1381.7, gef.: 1382.5; ber. für [M+K] 1397.6, gef.: 1398.4

6.2.2. Versuche zu Kapitel 4.1.1.3.

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutaminsäure**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-OH) (17)

Zu einer Lösung von 750 mg (1.74 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu) und 200 mg (1.74 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 10 ml Dimethoxyethan werden 376 mg DCC (1.82 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 1 h gerührt. Anschließend wird der ausgefallene Harnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in 20 ml Dichlormethan mit 678 mg (2.09 mmol) NH₂-Glu(Fm)-OH versetzt. Die Lösung wird bei 0° C mit 293 µl (2.09 mmol) Et₃N versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 ml Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird mit 1M HCl gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan-Dichlormethan/Ameisensäure 9:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 720 mg (0.974 mmol, 56 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 78-80° C

R_f-Wert: 0.25 (Dichlormethan/Methanol 10:0.5 (v/v))

[α]_D²⁰: +37.8 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.50 (br s, 1H, NH); 7.72 (d, ³J = 2H, Fmoc); 7.72 (d, ³J = 2H, Fm); 7.54 (d, ³J = 2H,

Fmoc); 7.54 (d, $^3J = 2\text{H}$, Fm); 7.37 (t, $^3J = 2\text{H}$, Fmoc); 7.37 (t, $^3J = 2\text{H}$, Fm); 7.27 (t, $^3J = 2\text{H}$, Fmoc); 7.27 (t, $^3J = 2\text{H}$, Fm); 5.92 (br d, 1H, NH); 4.60 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Cys); 4.41-4.31 (m, 5H, H-10 Fmoc, H-10 Fm, $\alpha\text{-CH}$ Glu); 4.19, 4.17 (2 x t, $^3J = 2\text{H}$, H-9 Fmoc, H-9 Fm); 3.11 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2a}$ Cys); 3.07 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_{2b}$ Cys); 2.58 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_{2a}$ Glu); 2.53 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_{2b}$ Glu); 2.29 (m, 1H, -CH_{2a} Glu); 2.11 (m, 1H, -CH_{2b} Glu); 1.31 (s, 9H, $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3):

$\delta = 174.0, 173.2, 170.6$ (COOH, C=O Fm, C=O Cys); 156.3 (C=O Fmoc); 143.6, 143.5 (C-8a, C-9a Fmoc; C-8a, C-9a Fm); 141.1, 141.1 (C-4a, C-4b Fmoc; C-4a, C-4b Fm); 127.8, 127.7 (C-3, C-6 Fmoc; C-3, C-6 Fm); 127.1, 127.1 (C-2, C-7 Fmoc; C-2, C-7 Fm); 125.1, 125.0 (C-1, C-8 Fmoc; C-1, C-8 Fm); 120.0, 120.0 (C-4, C-5 Fmoc; C-4, C-5 Fm); 67.6, 66.9 (C-10 Fmoc, C-10 Fm); 54.6 ($\alpha\text{-CH}$ Cys); 52.1 ($\alpha\text{-CH}$ Glu); 48.5 ($\text{SC}(\text{CH}_3)_3$); 46.9, 46.6 (C-9 Fmoc, C-9 Fm); 42.1 (-CH_2 Cys); 30.3 ($\gamma\text{-CH}_2$ Glu); 29.8 ($\text{SC}(\text{CH}_3)_3$); 26.6 (-CH_2 Glu).

ESI-MS + m/z: ber. für $\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$ [M+H] 739.2, gef.: 739.1

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 739.2433 [M+H]⁺
gef.: 739.2491 (in 3-NBA-Matrix)

γ -Allylester-L-glutaminsäure-hydrochlorid

(H-Glu(OAll)-OH * HCl) (18)

Zu einer Lösung von 4.43 g (0.03 mol) L-Glutaminsäure in 150 ml Allylalkohol werden 2.5 Äquivalente (9.5 ml, 0.075 mol) Chlortrimethylsilan tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 1 l Diethylether zum Reaktionsgemisch gegeben, der weiße Niederschlag abfiltriert und mit Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 5.8 g (0.02 mmol, 77 %) eines weißen Feststoffs

R_f -Wert: 0.2 (Dichlormethan/Essigsäure 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: +57.0 (c = 1.0, CHCl_3)

^1H -NMR (400MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.48$ (br s, 1H, CO_2H); 5.99-5.89 (ddd, $^3J_1 = 22.7$ Hz, $^3J_2 = 10.5$ Hz, $^3J_3 = 5.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH=}$); 5.34-5.29 (dd, $^3J_1 = 21.0$ Hz, $^3J_2 = 1.5$ Hz, 1H, CH=CH_{2a}); 5.23-5.20 (dd, $^3J_1 =$

13.0 Hz, ${}^3J_2 = 1.5$ Hz, 1H, -CH_{2b}); 5.07 (br s, NH₂); 4.60 (d, ${}^3J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CH=); 4.07 (t, ${}^3J_1 = 6.4$ Hz, 1H, α-CH); 2.70-2.57 (m, 2H, γ-CH₂); 2.29-2.15 (m, 2H, β-CH₂).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

δ = 172.2 (COOH); 170.2 (C=O); 132.4 (=CHCH₂); 117.4 (CH₂=CH); 65.3 (OCH₂CH=); 52.0 (α-CH); 29.4 (γ-CH₂); 25.4 (β-CH₂).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[196]

***N*-Allyloxcarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein**

(Aloc-Cys(*St*Bu)-OH) (19)

Zu einer Lösung von 500 mg (2.61 mmol) H₂N-Cys(*St*Bu)-OH in 50 ml Ethylacetat werden 487 µl (4.57 mmol) Allylchloroformat langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 12 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan-Dichlormethan/Ameisensäure 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 551 mg (1.88 mmol, 72 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.44 (Dichlormethan/Essigsäure 20:1 (v/v))

[α]_D²⁰: +66.0 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ = 8.60 (br s, 1H, COOH); 7.89 (d, ${}^3J = 8.3$ Hz, 1H, NH); 6.30-6.24 (ddd, ${}^3J_1 = 17.1$ Hz, ${}^3J_2 = 11.8$ Hz, ${}^3J_3 = 5.3$ Hz, 1H, CH₂CH=); 5.70-5.54 (dd, ${}^3J_1 = 13.6$ Hz, ${}^3J_2 = 1.0$ Hz, 2H, CH=CH₂); 4.85 (d, ${}^3J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂CH=); 4.59-4.54 (m, 1H, α-CH); 3.49-3.45 (dd, ${}^3J_1 = 9.0$ Hz, ${}^3J_2 = 4.1$ Hz, 1H, -CH_{2a}); 3.37-3.31 (dd, ${}^3J_1 = 9.8$ Hz, ${}^3J_2 = 3.3$ Hz, 1H, -CH_{2b}); 1.68 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

δ = 173.1 (COOH); 156.5 (OCONH); 134.3 (=CHCH₂); 117.7 (CH₂=CH); 54.3 (α-CH); 48.5 (OCH₂CH=, C(CH₃)₃); 42.3 (-CH₂); 29.9 (C(CH₃)₃).

$C_{11}H_{19}NO_4S_2$ (294.08)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 294.0834 $[M+H]^+$
gef.: 294.0842 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-Allyloxcarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-allyl-*L*-glutaminsäure
(Aloc-Cys(*St*Bu)-Glu(*All*)-OH) (20)**

Zu einer Lösung von 450 mg (1.53 mmol) Aloc-Cys(*St*Bu)-OH **19** und 176 mg (1.53 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 10 ml Dichlormethan werden bei 0° C 348 mg (169 mmol) DCC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0° C gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird die Lösung in einem Eisbad auf 0°C gekühlt und der ausgefallene Harnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in 20 ml Dichlormethan gelöst und bei 0° C mit 443 mg (1.53 mmol) H_2N -Glu(*All*)-OH *HCl **18** versetzt. Anschließend werden 425 μ l (3.07 mmol) Et_3N langsam zum Reaktionsgemisch getropft. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 ml Dichlormethan versetzt. Die organische Phase wird mit 1M HCl und ges. Na_2CO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan-Dichlormethan/Ameisensäure 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 461 mg (0.997 mmol, 65 %) eines farblosen Öls

R_f -Wert: 0.15 (Dichlormethan/Essigsäure 20:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: -30.2 (c = 1.0, $CHCl_3$)

1H -NMR (400MHz, $CDCl_3$):

δ = 9.66 (br s, 1H, COOH); 7.36 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, NH); 6.00 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, NH); 5.99-5.79 (ddd, $^3J_1 = 17.0$ Hz, $^3J_2 = 10.6$ Hz, $^3J_3 = 5.3$ Hz, 2H, 2x $CH_2CH=$); 5.26-5.12 (m, 4H, 2x $CH=CH_2$); 4.60-4.40 (m, 2H, α -CH Glu, α -CH Cys); 4.50 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 4H, 2x $CH_2CH=$); 3.02 (m, 2H, $-CH_2$ Cys); 2.41-2.39 (m, 2H, γ - CH_2 Glu); 2.21-2.18 (m, 1H, $-CH_{2a}$ Glu); 2.08-1.99 (m, 1H, $-CH_{2b}$ Glu); 1.24 (s, 9H, $SC(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$):

δ = 173.9 (CHCONH); 172.7 (COOH); 171.3 (CH_2CO_2); 156.0 (CH_2OCO); 132.4, 131.8 (2x

CH=CH₂); 118.3, 117.7 (2x CH₂=CH); 65.3 (α-CH Cys); 51.9 (α-CH Glu); 48.2, 48.1 (2x OCH₂CH=, C(CH₃)₃); 42.1 (-CH₂ Cys); 30.2 (γ-CH₂ Glu); 29.6 (C(CH₃)₃); 26.8 (-CH₂ Glu).

C₁₉H₃₀N₂O₇S₂ (462.14)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 485.1392 [M+Na]⁺
gef.: 485.1409 (in 3-NBA-Matrix)

6.2.3. Versuche zu Kapitel 4.1.1.4.

***N*-Allyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-allyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino]-ethyl-amid
(Aloc-Cys(*St*Bu)-Glu(All)-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)NH-CH₂-CH₂-NHDansyl)
(21)**

Zu einer Lösung von 35 mg (0.024 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)-NH-(CH₂)₂-NHDansyl **12** in 1.6 ml Dichlormethan werden bei 0° C 400 µl Diethylamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und die Lösung auf 0° C gekühlt. Zu der Lösung werden 11.2 mg (0.024 mmol) Aloc-Cys(*St*Bu)-Glu(All)-OH **20**, 3.9 mg (0.029 mmol) HOBt, 9.2 mg (0.029 mmol) HBTU und 6.6 µl (0.048 mmol) Et₃N zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:0.2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 24 mg (0.015 mmol, 61 %) eines schwach gelben Festoffs
Schmelzpunkt: 170-173° C
R_F-Wert: 0.16 (Dichlormethan/Methanol 10:0.5 (v/v))
[α]_D²⁰: -23.7 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ = 8.50 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H-4 Dansyl); 8.24 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-8 Dansyl); 8.15 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.49-7.46 (m, 2H, H-3, H-7 Dansyl); 7.15 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-6 Dansyl); 5.92-5.82 (m, 2H, 2x OCH₂CH=); 5.30-5.18 (m, 4H, 2x OCH₂CH=CH₂); 5.06 (m,

8H, 2x SCH₃CH=, 6x C=CH GerGer); 4.60-4.30 (m, 11H, 3x α-CH Cys, 2x α-CH Ser, 2x CH_{2a} Ser, 2x OCH₂CH=); 3.60 (m, 2H, β-CH_{2b} Ser); 3.35 (m, 3H, 3x β-CH_{2b} Cys); 3.25-2.95 (m, 10H, 3x β-CH_{2b} Cys, α-CH Glu, 2x SCH₂ GerGer, NHCH₂CH₂NH); 2.85 (s, 6H, N(CH₃)₂ Dansyl); 2.78 (m, 2H, NHCH₂CH₂NH); 2.47 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H, γ-CH₂ Glu); 2.03-1.93 (m, 24H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.75 (m, 2H, β-CH₂ Glu); 1.65 (s, 6H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.57 (s, 30H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.30 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

δ = 157.2 (C-5 Dansyl); 135.3, 134.9 (2 x CH=CH₂ Alloc, All); 131.2 (C-8 Dansyl); 129.9, 129.8 (2 x SC=CH); 129.4 (C-2 Dansyl); 128.5 (C-3 Dansyl); 124.3, 124.1 (6 x C=CH); 123.9 (C-7 Dansyl); 118.4 (C-4 Dansyl); 117.9, 117.8 (2 x CH₂=CH, Alloc, All); 115.8 (C-6 Dansyl); 55.3 (2 x OCH₂CH=, 2 -CH₂ Ser); 43.3 (N(CH₃)₂); 42.3 (NHCH₂CH₂NH); 39.7 (6 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 38.6 (NHCH₂CH₂NH); 36.6 (3 x -CH₂ Cys); 31.4 (γ-CH₂ Glu); 29.6 (SC(CH₃)₃); 29.2 (2 x SCH₂C); 27.1 (-CH₂ Glu); 26.7, 25.6 (6 x CH₂CH₂CH=); 23.2 (2 x =C(CH₃)CH₃ trans); (18.4 (2 x =C(CH₃)CH₃ cis); 16.9, 17.0 (6 x =C(CH₂)CH₃ cis).

ESI-MS + m/z: ber. für C₈₅H₁₃₂N₉O₁₄S₅ [M+H] 1662.8, gef.: 1662.7

MALDI-TOF (DHB): ber. für C₈₅H₁₃₁N₉O₁₄S₅Na [M+Na] 1684.8, gef.: 1684.5

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-*L*-cysteinmethylester**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerDansyl)-OMe) (22)

Zu einer Lösung von 12.3 mg (0.024 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerDansyl)-OMe **14** in 1.6 ml Dichlormethan werden bei 0° C 400 µl Diethylamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und die Lösung auf 0° C gekühlt. Zu der Lösung werden 10.6 mg (0.024 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-OH **17**, 3.9 mg (0.029 mmol) HOBt, 9.2 mg (0.029 mmol) HBTU and 6.6 µl (0.048 mmol) Et₃N gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	50 mg (0.028 mmol, 50 %) eines schwach gelben Festoffs
Schmelzpunkt:	171-174° C
R _f -Wert:	0.19 (Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-25.3 (c = 0.3, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.82 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.59 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 8.33 (br s, 1H, NH); 8.28 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.80-7.20 (br s, 4H, NH); 7.74 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.70 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.65 (br m, 2H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.56 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.50 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.39 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.35 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc or Fm); 7.27 (m, 4H, 2H Fmoc, 2H Fm); 7.22 (br s, 1H, H-6 Dansyl); 5.97 (br s, 1H, NH); 5.55 (br s, 1H, NH-Dansyl); 5.19 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, SCH₂CH= GerGer); 5.13 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H, C=CH); 5.09 (m, 4H, C=CH); 4.71 (m, 1H, α-CH Cys); 4.60 (m, 1H, α-CH Cys); 4.55 (m, 1H, α-CH Ser); 4.46 (m, 1H, α-CH Ser); 4.37 (m, 4H, H-10 Fmoc, H-10 Fm); 4.31 (m, 1H, α-CH Cys-SS_tBu); 4.27 (m, 1H, α-CH Glu); 4.17 (m, 2H, H-9 Fmoc, H-9 Fm); 4.06 (m, 2H, 2 x -CH_{2a} Ser); 3.82 (m, 2H, 2 x -CH_{2b} Ser); 3.72 (s, 3H, OCH₃); 3.41 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.25-2.99 (m, 14 H, SCH₂ GerGer, SCH₂ Ger-Dansyl, N(CH₃)₂, 2 x -CH_{2a} Cys, -CH₂ Cys-SS_tBu); 2.93 (m, 1H, -CH_{2b} Cys); 2.86 (m, 1H, -CH_{2b} Cys); 2.67 (m, 1H, γ-CH_{2a} Glu); 2.56 (m, 1H, γ-CH_{2b} Glu); 2.12 (br m, 2H, -CH₂ Glu); 2.10-1.85 (m, 16H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.67 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.66 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.59 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.58-1.57 (3 x s, 9H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.41 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl); 1.30 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃):

δ = 171.4 (CH₃OC=O); 152.5 (C-5 Dansyl); 143.8 (C-8a, C-9a Fmoc; C-8a, C-9a Fm); 141.5 (C-4a, C-4b Fmoc; C-4a, C-4b Fm); 140.6 (C=CH); 139.3 (C=CH); 135.7 (C=CH); 135.4 (C-1 Dansyl); 135.3 (C=CH); 131.5 (C=CH); 131.0 (C=CH); 130.2 (C-8 Dansyl); 129.9 (C-2 Dansyl); 129.9, 129.5 (C-4a, C-8a Dansyl); 128.3 (C-3 Dansyl); 128.1 (C=CH); 128.1, 128.0 (C-3, C-6 Fmoc; C-3, C-6 Fm); 127.4, 127.4 (C-2, C-7 Fmoc; C-2, C-7 Fm); 125.4, 125.2 (C-1, C-8 Fmoc; C-1, C-8 Fm); 124.6 (2 x C=CH); 124.1 (C=CH); 123.9 (C-7 Dansyl); 120.7 (C=CH); 120.4, 120.3 (C-4, C-5 Fmoc; C-4, C-5 Fm); 120.3 (C-4 Dansyl); 119.7 (C=CH); 115.9 (C-6 Dansyl); 68.2, 67.6 (C-10 Fmoc, C-10 Fm); 63.0, 62.2 (2 -CH₂ Ser); 57.7, 56.3, 56.1, 55.9, 53.9, 52.4 (6 x α-CH); 53.0 (OCH₃); 51.3 (C=CHCH₂NH); 49.3 (SC(CH₃)₃); 47.4, 47.0 (C-9 Fmoc, C-9 Fm); 46.8 (N(CH₃)₂); 41.0, 33.1, 33.3, 33.0, 29.9 (3 x -CH₂ Cys, 2 x

SCH₂CH=); 40.1 (3 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 38.9 (=C(CH₃)CH₂CH₂); 31.5 (γ -CH₂ Glu); 30.0 (SC(CH₃)₃); 27.1 (3 x CH₂CH₂CH=); 26.0 (=C(CH₃)CH₃ trans); 25.9 (CH₂CH₂CH=); 25.8 (-CH₂ Glu); 18.1 (=C(CH₃)CH₃ cis), 16.5, 16.3, 16.3, 16.3 (4 x =C(CH₂)CH₃ cis); 14.7 (=C(CH₃)CH₂NH).

ESI-MS + m/z: ber. für C₉₆H₁₂₆N₈O₁₅S₅ [M+H] 1789.8, gef.: 1789.4; ber. für C₉₆H₁₂₅N₈NaO₁₅S₅Na [M+Na] 1811.8, gef.: 1811.5

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₉₆H₁₂₅N₈NaO₁₅S₅ [M+Na] 1811.8, gef.: 1811.8; ber. für C₉₆H₁₂₅N₈NaO₁₅S₅K [M+K] 1827.7, gef.: 1828.1

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-farnesyl]-*L*-cysteinmethylester
(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm) -Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(FarDansyl)-OMe) (23)**

Zu einer Lösung von 18.7 mg (0.024 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(FarDansyl)-OMe **15** in 1.6 ml Dichlormethan werden bei 0° C 400 μ l Diethylamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und die Lösung auf 0° C gekühlt. Zu der Lösung werden 10.6 mg (0.024 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-OH **17**, 3.9 mg (0.029 mmol) HOBt, 9.2 mg (0.029 mmol) HBTU und 6.6 μ l (0.048 mmol) Et₃N zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 9.1 mg (0.005 mmol, 35 %) eines schwach gelben Festoffs

Schmelzpunkt: 172-175° C

R_f-Wert: 0.21 (Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -24.7 (c = 0.25, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 9.15 (br s, 1H, NH); 8.90 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.38 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 7.85 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.80-7.40 (br s, 4H, NH); 7.75-7.65 (m, 6H, 2H Fmoc, 2H Fm, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.58 (m, 4H, 2H Fmoc, 2H Fm); 7.37 (m, 4H, 2H Fmoc, 2H Fm);

7.27 (m, 5H, 2H Fmoc, 2H Fm, H-6 Dansyl); 6.18 (br s, 1H, NH); 5.40 (br s, 1H, NH-Dansyl); 5.22 (m, 2H, C=CH); 5.10 (m, 4H, C=CH); 4.99 (m, 1H, C=CH); 4.75-4.00 (m, 14H, 3 x α -CH Cys, 2 x α -CH Ser, H-10 Fmoc, H-10 Fm, α -CH Glu, H-9 Fmoc, H-9 Fm 2 x -CH_{2a} Ser); 3.85-3.50 (m, 7H 2 x -CH_{2b} Ser, OCH₃ CH₂NH-Dansyl); 3.45-2.85 (m, 16 H, SCH₂ GerGer, SCH₂ Ger-Dansyl, N(CH₃)₂, 2 x -CH₂ Cys, -CH₂ Cys-SS_tBu); 2.66-2.10 (m, 4H, γ -CH Glu, -CH₂ Glu); 2.15-1.80 (m, 20H, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.68 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.62 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.59 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.58-1.57 (3 x s, 9H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.33 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl); 1.28 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

ESI-MS + m/z: ber. für C₁₀₁H₁₃₃N₈O₁₅S₅ [M+H] 1857.9, gef.: 1857.6; ber. für C₉₆H₁₃₂N₈NaO₁₅S₅ [M+Na] 1879.8, gef.: 1879.6

MALDI-TOF (DHB) ber. für [M+Na] 1879.8, gef.: 1879.8

***S*-tert-butylthio-L-cysteyl-L-glutamyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-[N-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-L-cysteinmethylester (H-Cys(*S*tBu)-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerDansyl)-OMe) (24)**

Zu einer Lösung von 12 mg (6.7 μ mol) des Hexapeptids **22** in 1.5 ml Dichloromethan werden 0.5 ml Diethylamin gegeben. Die Lösung wird 45 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 60 ml Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Methanol/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 7.8 mg (5.6 mol, 84 %) eines schwach gelben Festoffs

R_f-Wert: 0.48 (Methanol/Ethylacetat 1:4 (v/v))

[α]_D²⁰: -17.3 (c = 0.3, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.51 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.32 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 8.19 (br s, 1H, H-2 Dansyl); 7.54, 7.49 (2 x br s, 2H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.18 (br s, 1H, H-6 Dansyl); 5.09 (m, 6H, C=CH); 4.75-4.45 (m, 1H, 2 x α -CH Cys, 2 x α -CH Ser); 4.28 (m, 1H, α -CH Cys-SS_tBu); 4.25 (m, 1H, α -CH Glu); 4.05 (m, 2H, 2 x -CH_{2a} Ser); 3.83 (m, 2H, 2 x -CH_{2b} Ser); 3.72 (br s, 3H, OCH₃); 3.38 (br s, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.18-2.80 (m, 14 H, 2 x SCH₂, N(CH₃)₂, 3 x -CH₂); 2.65-1.85 (m, 20 H γ -CH₂ Glu, -CH₂ Glu, =C(CH₃)CH₂CH₂, CH₂CH₂CH=); 1.70 (s,

3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.65 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.60 (br s, 12H, 4 x =C(CH₃)CH₃ cis); 1.41 (br s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl); 1.30 (br s, 9H, SC(CH₃)₃).

ESI-MS + m/z: ber. für C₆₇H₁₀₄N₈O₁₃S₅ [M] 1388.6, gef.: 1388.5; ber. für C₆₇H₁₀₃N₈NaO₁₃S₅ [M+Na-H] 1410.6, gef.: 1410.5

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₆₇H₁₀₃N₈O₁₃S₅Na [M+Na-H] 1410.6, gef.: 1410.6; ber. für [M+K-H] 1426.6, gef.: 1426.5

S-tert-butylthio-L-cysteyl-L-glutamyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-[N-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino]-ethylamid

(H-Cys(*StBu*)-Glu-Ser-Cys(*GerGer*)-Ser-Cys(*GerGer*)NH-CH₂-CH₂-NHDansyl) (25)

Zu einer Lösung von 4 mg ($2.41 \cdot 10^{-3}$ mmol) des Hexapeptids **21** in 1 ml THF werden 2.4 Äquivalente Morpholin ($5.78 \cdot 10^{-3}$ mmol; 0.5 µl) und 0.1 Äquivalente Pd(Ph₃)₄ ($0.24 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.28 mg) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) und 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3.0 mg ($1.95 \cdot 10^{-3}$ mmol, 81 %) eines gelben Festoffs

R_f-Wert: 0.48 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -20.1 (c = 0.25, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃ + 1% MeOD):

δ = 8.56 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.24 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 7.67 (m, 1H, H-2 Dansyl); 7.55, 7.48 (2 x m, 2H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.19 (br s, 1H, H-6 Dansyl); 5.35 (t, ³J = 4.9 Hz, 2H, SCH₂CH GerGer); 5.30 (br s, 6H, C=CH); 5.06 (m, 3H, 3 x α-CH Cys); 4.69 (m, 2H, 2 x α-CH Ser); 4.08 (m, 1H, α-CH Glu); 3.65 (m, 4H, 2 x -CH₂ Ser); 3.65, 3.57-3.49 (2 x m, 6H, 3 x -CH₂ Cys); 3.40-3.35 (m, 4H, 2 x SCH₂ GerGer); 3.04 (m, 2H, γ-CH₂ Glu); 2.89 (br s; 10H, N(CH₃)₂, CH₂CH₂NHDansyl); 2.35 (t, ³J = 9.5 Hz, 2H, -CH₂ Glu); 2.03-1.99 (br m, 12 H, 6 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 1.67-1.59 (m, 24 H, 2 x =C(CH₃)CH₃ trans, 2 x =C(CH₂)CH₃ cis, 6 x CH₂CH₂CH=); 1.30-1.25 (br s, 27 H, 6 x =C(CH₃)CH₃ cis, SC(CH₃)₃).

ESI-MS + m/z: ber. für C₇₈H₁₂₄N₉O₁₂S₂ [M+H] 1538.8, gef.: 1538.7

MALDI-TOF (DHB) ber. für $C_{78}H_{124}N_9NaO_{12}S_2$ [M+Na+H] 1561.8, gef.: 1561.9

6.3. Versuche zu Kapitel 4.1.2.

6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.1.2.2.

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-geranylgeranyl-L-cystein

(Fmoc-Cys(GerGer)-OH) (26)

Zu einer Lösung von 596 mg (1.77 mmol) Fmoc-OSu und 580 mg (1.47 mmol) NH_2 -Cys(GerGer)-OH **8** in 3 ml Dichlormethan/Methanol (1:1) werden langsam 206 μ l (1.47 mmol) Et_3N zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei 0° C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	720 mg (1.17 mmol, 80 %) eines weißen Festoffs
Schmelzpunkt:	67-70° C
R_f -Wert:	0.14 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))
$[\alpha]_D^{20}$:	+44.2 (c = 1.0, $CHCl_3$)

1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$):

δ = 7.74 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, Fmoc); 7.60 (d, $^3J=7.2$ Hz, 2H, Fmoc); 7.38 (t, $^3J=7.5$ Hz, 2H, Fmoc); 7.29 (t, $^3J=7.4$ Hz, 2H, Fmoc); 5.80 (br s, 1H, NH); 5.21 (t, $^3J=7.7$ Hz, 1H, C=CH); 5.08 (m, 3H, C=CH); 4.55 (m, 1H, α -CH Cys); 4.38 (d, $^3J=7.0$ Hz, 2H, H-10 Fmoc); 4.22 (t, $^3J=7.1$ Hz, 1H, H-9 Fmoc); 3.19 (m, 2H, $SCH_2CH=$); 2.99 (m, 1H, $-CH_{2a}$ Cys); 2.92 (m, 1H, $-CH_{2b}$ Cys); 2.10-1.95 (m, 12H, $=C(CH_3)CH_2CH_2CH=$); 1.67, 1.64, 1.59, 1.58, 1.58 (5 x s, 15H, CH_3).

^{13}C -NMR (125MHz, $CDCl_3$):

δ = 173.2 (COOH); 156.1 (C=O Fmoc); 143.8 (C-8a, C-9a Fmoc); 141.1 (C-4a, C-4b Fmoc); 139.6 (C=CH); 135.0 (C=CH); 134.6 (C=CH); 130.9 (C=CH); 127.4 (C-3, C-6 Fmoc); 126.8 (C-2, C-7 Fmoc); 124.8 (C-1, C-8 Fmoc); 124.1 (C=CH); 123.9 (C=CH); 123.5 (C=CH); 119.6 (C-4, C-5 Fmoc); 119.4 (C=CH); 66.8 (C-10 Fmoc); 53.5 (α -CH); 46.8 (C-9 Fmoc);

39.4, 39.4, 39.3 (3 x =C(CH₃)CH₂CH₂); 33.1 (-CH₂ Cys); 29.7 (SCH₂CH=); 26.4, 26.3, 26.2 (3 x CH₂CH₂CH=); 25.3 (=C(CH₂)CH₃ *trans*); 17.2, 15.7, 15.6, 15.6 (4 x CH₃).

C₃₈H₄₉NO₄S (615.33)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 638.3280 [M+Na]⁺
gef.: 638.3302 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-*L*-cystein**

(Fmoc-Cys(Ger-Dansyl)-OH) (27)

Zu einer Lösung von 148 mg (0.439 mmol) Fmoc-OSu und 185 mg (0.366 mmol) NH₂-Cys(Ger-Dansyl)-OH in 3 ml Dichlormethan/Methanol (1:1) werden bei 0° C langsam 51 µl (0.366 mmol) Et₃N zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 12.5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 260 mg (0.357 mmol, 97 %) eines gelben Öls
R_F-Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 17:1 (v/v))
[α]_D²⁰: +64.1 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.47 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, H-4 Dansyl); 8.31 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-8 Dansyl); 8.19 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.70 (br d, 2H, Fmoc); 7.57 (br d, 2H, Fmoc); 7.52-7.44 (2 x t, ³J = 8.0 Hz, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.33 (br t, 2H, Fmoc); 7.23 (br t, 2H, Fmoc); 7.12 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-6 Dansyl); 5.95 (br s, 1H, NH); 5.37 (br s, 1H, NH-Dansyl); 5.06 (m, 2H, C=CH); 4.50 (m, 1H, α-CH Cys); 4.32 (m, 2H, H-10 Fmoc); 4.17 (m, 1H, H-9 Fmoc); 3.36 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.19-3.01 (m, 3H, SCH₂CH=, -CH_{2a} Cys); 2.92-2.78 (m, 1H, -CH_{2b} Cys); 2.83 (s, 6H, N(CH₃)₂); 1.84 (m, 4H, =C(CH₃)CH₂CH=); 1.50 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ *cis*); 1.33 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

δ = 174.3 (COOH); 153.3 (C=O); 151.7 (C-5 Dansyl); 143.8 (C-8a, C-9a Fmoc); 141.1 (C-4a, C-4b Fmoc); 139.4 (C=CH); 135.2 (C-1 Dansyl); 130.5 (C=CH); 130.1 (C-8 Dansyl); 129.9,

129.5 (C-4a, C-8a Dansyl); 129.4 (C-2 Dansyl); 128.2 (C-3 Dansyl); 127.6 (C-3, C-6 Fmoc); 127.0 (C=CH); 127.0 (C-2, C-7 Fmoc); 125.2 (C-1, C-8 Fmoc); 123.1 (C-7 Dansyl); 120.4, 119.8 (C-4 Dansyl, C-4, C-5 Fmoc); 119.0 (C=CH); 115.1 (C-6 Dansyl); 67.0 (C-10 Fmoc); 52.8 (α -CH); 50.9 (C=CHCH₂NH); 47.0 (C-9 Fmoc); 45.3 (N(CH₃)₂); 39.7, 38.6 (-CH₂ Cys, =C(CH₃)CH₂CH₂); 29.8 (SCH₂CH=); 25.7 (CH₂CH₂CH=); 15.9 (=C(CH₂)CH₃ cis); 14.1 (=C(CH₃)CH₂NH).

C₄₀H₄₅N₃O₆S₂ (726.27)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 727.2750 [M+H]⁺
gef.: 727.2762 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-farnesyl]-*L*-cystein**

(Fmoc-Cys(Far-Dansyl)-OH) (28)

Zu einer Lösung von 8.2 mg (0.024 mmol) Fmoc-OSu und 11.5 mg (0.02 mmol) NH₂-Cys(Far-Dansyl)-OH in 1 ml Dichlormethan/Methanol (1:1) werden bei 0° C langsam 51 μ l (0.366 mmol) Et₃N zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 12 mg (0.015 mmol, 74 %) eines gelben Öls

R_f-Wert: 0.24 (Dichlormethan/Methanol 17:1 (v/v))

[α]_D²⁰: +56.7 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃ + CD₃OD):

δ = 8.52 (br s, 1H, H-4 Dansyl); 8.30 (br s, 1H, H-8 Dansyl); 8.15 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.70 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.55-7.46 (m, 4H, 2 x Fmoc, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.33 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc); 7.24 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.18 (br s, 1H, H-6 Dansyl); 5.10 (m, 2H, C=CH); 4.95 (m, 1H, C=CH); 4.46 (m, 1H, α -CH Cys); 4.32 (d, J=7.2 Hz, 2H, H-10 Fmoc); 4.17 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H, H-9 Fmoc); 3.32 (br d, 2H, CH₂NH-Dansyl); 3.28-3.06 (m, 3H, SCH₂CH=, -CH_{2a} Cys); 2.92-2.78 (m, 1H, -CH_{2b} Cys); 2.87 (s, 6H, N(CH₃)₂); 2.05-1.72 (m, 8H, =C(CH₃)CH₂CH₂CH=); 1.57 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.46 (s, 3H, =C(CH₂)CH₃ cis); 1.33 (s, 3H, CH₃CCH₂-Dansyl).

MALDI-TOF (DHB) ber. für $C_{45}H_{53}N_3O_6S_2$ $[M+H]$ 796.3, gef.: 796.3; ber. für $C_{45}H_{52}N_3O_6S_2Na$ $[M+Na]$ 818.3, gef.: 818.4

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 796.3454 $[M+H]^+$
gef.: 796.3480 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-allyl-*L*-glutaminsäure
(Fmoc-Glu(OAll)-OH) (29)**

Zu einer Lösung von 500 mg (1.49 mmol) Fmoc-OSu und 334 mg (2.99 mmol) NH_2 -Glu(OAll)-OH **18** in 3 ml Dichlormethan/Methanol (3:1) werden bei 0° C langsam 414 μ l (2.99 mmol) Et_3N zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 318 mg (0.775 mmol, 52 %) eines weißen Öls

R_f -Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: +66.0 (c = 1.0, $CHCl_3$)

1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$):

δ = 7.75 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc); 7.57 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc); 7.38 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, Fmoc); 7.30 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc); 5.89-5.86 (ddd, $^3J_1 = 17.0$ Hz, $^3J_2 = 11.5$ Hz, $^3J_3 = 5.2$ Hz, 1H, $CH_2CH=$); 5.63 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, NH); 5.31-5.21 (dd, $^3J_1 = 13.6$ Hz, $^3J_2 = 1.0$ Hz, 2H, $CH=CH_2$); 4.56 (d, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, H-10 Fmoc); 4.40-4.39 (m, 3H, H-9 Fmoc, $OCH_2CH=$); 4.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, α -CH); 2.51-2.44 (m, 2H, γ - CH_2); 2.29-2.26 (m, 1H, - CH_{2a}); 2.06-2.04 (m, 1H, - CH_{2b}).

^{13}C -NMR (125MHz, $CDCl_3$):

δ = 170.4 (COOH); 160.8 (CH_2OCNH); 143.6, 141.3 (C-8a, C-9a, C-4a, C-4b Fmoc); 131.8 ($=CHCH_2$); 127.7 (C-2 Fmoc); 127.1 (C-7 Fmoc); 125.1 (C-1, C-8 Fmoc); 120.0 (C-4, C-5 Fmoc); 118.5 ($CH_2=CH$); 67.1 (C-10 Fmoc); 65.5 (α -CH); 50.7 ($COCH_2C=$); 47.1 (C-9 Fmoc); 30.9 (- CH_2); 27.2 (γ - CH_2).

C₂₃H₃₁NO₆ (409.16)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 410.1603 [M+H]⁺
gef.: 410.1613 (in 3-NBA-Matrix)

6.3.2. Versuche zu Kapitel 4.1.2.3.

Allgemeine Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide unter Verwendung des Phenylhydrazid-Linkers:

Für alle Peptide wird das Fmoc-4-hydrazinobenzoyl NovaGel Harz von Novabiochem mit einer Beladung von 0.56 mM/g verwendet. Alle Reaktionen werden unter einer Argonatmosphäre in Polyethylenspritzenreaktoren durchgeführt. Bewegung wird mit einem Schüttler erzielt.

Bei der Fmoc-Spaltung wird das Harz zweimal für 15 Minuten mit entgaster 35%-iger Piperidin/DMF-Lösung versetzt. Anschließend wird das Harz dreifach mit DMF und dreifach mit Dichlormethan gewaschen. Die Aminosäuren werden gewöhnlich mit HBTU und HOBt geknüpft. Dabei werden 4 Äquivalente der Aminosäure für 5 Minuten mit 3.6 Äquivalenten HBTU, 4 Äquivalenten HOBt und 8 Äquivalenten DIPEA in DMF/Dichlormethan (1:1) voraktiviert. Die Lösung wird anschließend zum Harz gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Cystein-derivate und Dipeptide werden unter Verwendung von DIC und HOBt geknüpft, um eine mögliche Racemisierung zu unterdrücken. Gewöhnlich werden 4 Äquivalente Aminosäure oder Dipeptid für 15 Minuten mit 3 Äquivalenten DIC und 6 Äquivalenten HOBt in DMF/Dichlormethan (1:1) aktiviert. Die Lösung wird anschließend zum Harz gegeben und 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird anschließend dreimal mit Dichlormethan und dreimal mit DMF gewaschen. Für die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppen des Serins wird das Harz zweimal 30 Minuten mit einer Lösung von 1 % TFA/ 2 % TES in Dichlormethan versetzt. Das Harz wird anschließend fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des Allylesters der Glutaminsäure wird das Harz zweimal 1 h mit einer Lösung von 0.1 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ und 10 Äquivalenten PhSiH₃ in THF versetzt. Das Harz wird anschließend fünfmal mit Dichlormethan gewaschen.

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino]-ethyl-amid**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)-NHCH₂-CH₂NH-Dansyl) (36)

Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26** wird mit DIC/HOBt und dem Fmoc-entschützten Fmoc-4-hydrazineobenzoyl NovaGelTM Harz (50 mg, 0.56 mmol/g, 28 μ mol) versetzt. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26**, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH **29** und Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH unter Verwendung von HBTU/HOBt oder DIC/HOBt gekuppelt. Die Trt-Schutzgruppen der Serine und die Allyl-Schutzgruppe der Glutaminsäure werden entfernt. Das Harz wird anschließend mit einer 0.005 M Cu(OAc)₂-Lösung und 3 Äquivalenten Dansyl-NH-(CH₂)₂-NH₂ **10** (84 μ mol, 22 mg) in 5 ml THF versetzt und unter Sauerstoffatmosphäre bei Raumtemperatur 4 h geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1N HCl gewaschen. Die organische Phase wird über Mg(SO₄) getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) und 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	19.7 mg (11.2 μ mol, 40 %) eines schwach gelben Festoffs
Schmelzpunkt:	165-170° C
R _f -Wert:	0.46 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-23.7 (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.45 (br d, ³J = 10.5 Hz, 1H, H-4 Dansyl); 8.23 (d, ³J = 10.5 Hz, 1H, H-8 Dansyl); 8.11 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-2 Dansyl); 7.71 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, Fmoc); 7.57-7.45 (m, 4H, 2H Fmoc, H-3 Dansyl, H-7 Dansyl); 7.34 (m, 4H, Fmoc); 7.11 (m, 2H, H-6 Dansyl, NH); 6.76 (br d, 1H, NH); 5.26 (m, 2H, 2 x SCH₂=CH); 5.15 (m, 6H, C=CH); 4.63-4.18 (m, 9H, 3 x α -CH Cys, 2 x α -CH Ser, α -CH Glu, 3H Fmoc); 3.64-3.51 (m, 4H, 2 x -CH₂ Ser); 3.50 (m, 10 H, SCH₂ GerGer, 3 x -CH₂ Cys); 2.80 (m, 10H, CH₂CH₂NHDansyl, N(CH₃)₂); 2.26 (m, 4H, γ -CH₂ Glu, -CH₂ Glu); 2.05-1.85 (m, 24H, 6 x =C(CH₃)CH₂CH₂, 6 x CH₂CH₂CH=); 1.60 (s, 6H, 2 x =C(CH₃)CH₃ *trans*); 1.52 (s, 6H, 2 x =C(CH₂)CH₃ *cis*); 1.24-1.18 (m, 27H, 6 x =C(CH₂)CH₃ *cis*, SC(CH₃)₃).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{93}H_{134}N_9O_{14}S_5$ [M+H] 1760.9, gef.: 1761.5; ber. für $C_{93}H_{133}N_9NaO_{14}S_5$ [M+Na] 1782.8, gef.: 1783.9

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteinmethylester
(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)-OMe) (37)**

Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26** wird mit DIC/HOBt und 50 mg (0.56 mmol/g, 28 μ mol) des Fmoc-entschützten Harzes versetzt. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26**, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH **29** und Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH unter Verwendung von HBTU/HOBt oder DIC/HOBt gekuppelt. Die Trt-Schutzgruppen der Serine und die Allyl-Schutzgruppe der Glutaminsäure werden entfernt. Man spaltet mit einer 0.005 M $Cu(OAc)_2$ - (5.4 mg, 29 μ mol), 0.01 M Pyridin- (48 L, 588 μ mol) und methanolischen (240 μ L, 5.9 mmol) Lösung in 7 ml Dichlormethan unter Sauerstoffatmosphäre ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) und 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	21 mg (14 μ mol, 50 %) eines schwach gelben Festoffs
Schmelzpunkt:	169-171° C
R_f -Wert:	0.48 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
$[\alpha]_D^{20}$:	-58.0 (c = 1.0, $CHCl_3$)

1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$):

δ = 7.67 (d, $^3J = 10.0$ Hz, 2H, Fmoc); 7.57-7.54 (m, 4H, Fmoc); 7.35 (m, 2H, Fmoc); 5.25 (m, 1H, NH); 5.13 (m, 2H, $SCH_2CH=$ GerGer); 5.02 (m, 6H, $C=CH$); 4.63-4.58 (m, 3H, 3 x α -CH Cys); 4.35-4.45 (m, 5H, 2 x α -CH Ser, 3H Fmoc); 4.14 (m, 1H, α -CH Glu); 3.65 (m, 4H, 2 x $-CH_2$ Ser); 3.57 (s, 3H, OCH_3); 3.50 (m, 6 H, 3 x $-CH_2$ Cys); 3.32 (m, 4H, 2 x SCH_2 GerGer); 3.09 (m, 2H, γ - CH_2 Glu); 2.00-1.87 (br m, 26H, $-CH_2$ Glu, 6 x $=C(CH_3)CH_2CH_2$, 6 x $CH_2CH_2CH=$); 1.60 (s, 6H, $=C(CH_3)CH_3$ *trans*); 1.55 (s, 6H, $=C(CH_3)CH_3$ *cis*); 1.24-1.18 (2 x s, 27H, 6 x $=C(CH_2)CH_3$ *cis*, $SC(CH_3)_3$).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{80}H_{119}N_6O_{13}S_4$ [M+H] 1499.7, gef.: 1499.5

MALDI-TOF (DHB): ber. für $C_{80}H_{118}N_6O_{13}S_4Na$ [M+Na] 1521.8, gef.: 1521.6

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-geranyl]-*L*-cysteinmethylester**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerDansyl)-OMe) (22)

Fmoc-Cys(GerDansyl)-OH **27** wird mit DIC/HOBt und 100 mg (0.56 mmol/g, 56 μ mol) des Fmoc-entschützten Harzes versetzt. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26**, Fmoc-Ser(Trt)-OH, und Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-OH **17** unter Verwendung von HBTU/HOBt oder DIC/HOBt gekuppelt. Die Trt-Schutzgruppen der Serine werden entfernt. Man spaltet mit 0.005 M Cu(OAc)₂- (5.4 mg, 29 mol), 0.01 M Pyridin- (48 μ L, 588 mol) und methanolischen (240 μ L, 5.9 mmol) Lösung in 7 ml Dichlormethan unter Sauerstoffatmosphäre ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Das gewünschte Produkt wird mit einer Ausbeute von 50 % (50 mg, 28 μ mol) erhalten.

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*O*-fluorenylmethyl-*L*-glutamyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-[*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-amino-farnesyl]-*L*-cysteinmethylester**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(FarDansyl)-OMe) (23)

Fmoc-Cys(FarDansyl)-OH **28** wird mit DIC/HOBt und 25 mg (0.56 mmol/g, 14 μ mol) des Fmoc-entschützten Harzes versetzt. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26**, Fmoc-Ser(Trt)-OH, und Fmoc-Cys(*St*Bu)-Glu(Fm)-OH **17** unter Verwendung von HBTU/HOBt oder DIC/HOBt gekuppelt. Die Trt-Schutzgruppen der Serine werden entfernt. Man spaltet mit 0.005 M Cu(OAc)₂- (5.4 mg, 29 mol), 0.01 M Pyridin- (48 μ L, 588 mol) und methanolischen (240 μ L, 5.9 mmol) Lösung in 7ml Dichlormethan unter Sauerstoffatmosphäre ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Das gewünschte Produkt wird mit einer Ausbeute von 35 % (9.1 mg, 4.9 μ mol) erhalten.

6.4. Versuche zu Kapitel 4.1.4.

Die synthetisierten Hexapeptide **24** und **25** konnten nach einem allgemeinen Verfahren für die *in vitro* Protein Ligation in die Rab-Proteine eingeführt werden und das semisynthetische Protein anschließend mit REP zur Komplexbildung gebracht werden.

Bei der Ligationsreaktion werden 450 μ M Rab7 Δ 6-Thioester mit 4 mM Peptid-Lösung in 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.5, 0.1 mM MgCl₂, 2 M GDP, 100 mM 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) und 50mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert, um ausgefallenes Protein und Peptid zu beseitigen. Der Überstand wird je viermal mit Methanol, Methylenchlorid und Wasser gewaschen.

Der Überstand wird anschließend in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1 mM EDTA, 100 mM DTE und 1% CHAPS aufgenommen (Konzentration des ligierten Proteins: 0.5 mg/ml). Die Proteinlösung wird anschließend mit einem 25-fachen Überschuss an Puffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 2.5 mM DTE, 2 mM MgCl₂, 10 M GDP, 1% CHAPS, 400 mM Arginin*HCl, 400 mM Trehalose, 0.5 mM PMSF und 1 mM EDTA) bei Raumtemperatur verdünnt. Nach der Zugabe von 1 Äquivalent REP-1 oder GDI-Protein wird die Proteinlösung 1 h auf Eis inkubiert und anschließend über Nacht mit Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 10% Glycerol, 0.5 mM PMSF, 2 mM MgCl₂, 2 M GDP, 1 mM EDTA und 2.5 mM DTE) dialysiert. Die Protein-Lösung wird mit einem Größenausschluss-Konzentrator (Amicon) zu der finalen Konzentration von 4 mg/ml eingengt. Unlösliches Material kann durch Zentrifugieren entfernt werden. Die Proteinlösung wird mit Hilfe einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) unter Verwendung von Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 10 μ M GDP, 2.5 mM DTE, 100 mM (NH₄)₂SO₄ und 10% Glycerol) gereinigt. Fraktionen, die sowohl REP als auch Rab7 enthalten, werden gesammelt und zu einer Proteinlösung mit einer finalen Konzentration von ca. 10 mg/ml eingengt und bei -80° C gelagert.

6.5. Versuche zu Kapitel 4.1.5.

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cystein (Fmoc-Cys(*S*^tBu)-Cys(GerGer)-OH) (46)

Zu einer Lösung von 11 mg ($2.51 \cdot 10^{-2}$ mmol) Fmoc-Cys(*S*^tBu)-OH in 1 ml Dimethoxyethan werden bei 0° C 2.89 mg ($2.51 \cdot 10^{-2}$ mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 5.2 mg ($2.51 \cdot 10^{-2}$ mmol) DCC gegeben. Die Lösung wird 2 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in einem Eisbad gekühlt und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in 1 ml Dichlormethan mit 10 mg ($2.51 \cdot 10^{-2}$ mmol) H₂N-Cys(GerGer)-OH **8** bei 0° C versetzt. Anschließend werden 3.5 µl ($3.01 \cdot 10^{-2}$ mmol) Et₃N langsam zum Reaktionsgemisch getropft. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 20 ml Dichlormethan verdünnt und mit 1M HCl und ges. Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	17.2 mg ($2.13 \cdot 10^{-2}$ mmol, 85 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	160-164° C
R _F -Wert:	0.33 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-87.0 (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, MeOD + 0.5%CDCl₃):

δ = 7.25 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc); 7.12 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc); 6.87 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc); 6.80 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc); 4.68 (t, ³J = 6.5 Hz, 1H, SCH₃CH= GerGer); 4.59-4.57 (m, 3H, C=CH, GerGer); 4.03-3.99 (m, 2H, Fmoc); 3.94-3.92 (m, 1H, Fmoc); 3.81 (m, 1H, α-CH); 3.75-3.74 (m, 1H, α-CH); 2.95 (m, 2H, SCH₂ GerGer); 2.70-2.65 (m, 2H, β-CH₂); 2.55-2.52 (m, 1H, β-CH_{2a}); 2.42-2.41 (m, 1H, β-CH_{2b}); 1.54-1.35 (m, 21H, 3* =C(CH₃)CH₂CH₂, 3* CH₂CH₂CH=, SC(CH₃)₃); 1.17 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.09 (s, 12H, =C(CH₃)CH₃ cis).

¹³C-NMR (125MHz, MeOD + 0.5%CDCl₃):

δ = 174.3 (CO₂H); 170.4 (CONH); 148.5 (CO₂NH); 143.4 (C-8a, C-9a Fmoc); 141.0, 139.5 (C-4a, C-4b Fmoc); 135.0 (C=CH); 134.8 (C=CH); 131.0 (2x C=CH), 127.5 (C=CH); 126.9

(C-3, C-6, C-2, C-7 Fmoc); 124.9 (C-1, C-8 Fmoc); 124.1 (C=CH); 124.0 (C=CH); 123.6 (C=CH); 119.7, 119.3 (C-4, C-5 Fmoc); 67.7 (C-10 Fmoc); 46.8 (C-9 Fmoc); 39.4 (3x =C(CH₃)CH₂CH₂); 39.4 (2x -CH₂ Cys); 29.8 (SCH₂C=); 26.5, 26.4, 26.3 (3x CH₂CH₂CH=); 25.3 (=C(CH₃)CH₃ trans); 17.3 (=C(CH₃)CH₃ cis); 15.7, 15.6 (3x =(CH₂)CH₃ cis).

C₄₅H₆₂N₂O₅S₃ (806.37)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 829.3719 [M+Na]⁺
gef.: 829.3732 (in 3-NBA-Matrix)

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl-S-geranylgeranyl-L-cystein**

(NH₂-Cys(StBu)-Cys(GerGer)-OH) (47)

Eine Lösung von 17.2 mg (2.13*10⁻² mmol) Fmoc-Cys(StBu)-Cys(GerGer)-OH **46** in 800 µl Dichlormethan wird bei 0° C mit 200 µl Diethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0° C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mit Toluol (10 ml) coevaporiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 8.7 mg (1.49*10⁻² mmol, 70 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt: 160-162° C
R_f-Wert: 0.13 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α]_D²⁰: -87.3 (c =1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, MeOD):

δ = 5.21 (t, ³J = 9.3 Hz, 1H, SCH₃CH= GerGer); 5.12-5.07 (m, 3H, C=CH, GerGer); 4.41-4.38 (m, 1H, α-CH); 4.34-4.31 (m, 1H, α-CH); 3.81-3.80 (m, 2H, SCH₂ GerGer); 3.25-3.20 (m, 2H, β-CH₂); 3.03-3.00 (m, 1H, β-CH_{2a}); 2.92-2.85 (m, 1H, β-CH_{2b}); 2.11-1.94 (m, 12H, 3* =C(CH₃)CH₂CH₂, 3* CH₂CH₂CH=); 1.66 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.64 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.58 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.57 (s, 6H, 2* =C(CH₃)CH₃ cis); 1.34 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

C₃₀H₅₂N₂O₃S₃ (584.30)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 607.3038 [M+Na]⁺
gef.: 607.3041 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteyl-*S*-geranylgeranyl-L-cystein**

(Fmoc-Cys(StBu)-Cys(GerGer)-Cys(GerGer)-OH) (51)

Für die Festphasen-Synthese des Tripeptids **51** wird das 2-Chlorotritylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 40 mg Harz (1.5 mmol/g, 0.06 mmol) in 1 ml Dichlormethan mit 3 Äquivalenten DIPEA (0.18 mmol, 32 μ l) und 1.5 Äquivalenten Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26** (0.09 mmol, 56 mg) versetzt. Das Harz wird 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Tripeptids **51** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26** und Fmoc-Cys(StBu)-OH unter Verwendung von DIC/HOBt gekuppelt. Man spaltet mit 2 ml 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Tripeptid wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute:	67.4 mg (0.057 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	155-160° C
R _f -Wert:	0.13 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-47.9 (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, MeOD + 0.5%CDCl₃):

δ = 7.75 (d, ³J = 9.1 Hz, 2H, Fmoc); 7.60 (m, 2H, Fmoc); 7.39 (t, ³J = 9.1 Hz, 2H, Fmoc); 7.30 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, Fmoc); 5.97 (br s, 1H, NH); 5.21-5.17 (m, 2H, SCH₃CH= GerGer); 5.09 (m, 6H, C=CH, GerGer); 4.64-4.58 (m, 3H, Fmoc); 4.40 (m, 1H, α -CH); 4.33-4.32 (m, 1H, α -CH); 4.23 (t, ³J = 8.5 Hz, 1H, α -CH); 3.18-3.11 (m, 8H, 3* β -CH₂, SCH₂ GerGer); 2.04-1.96 (m, 24H, 6* =C(CH₃)CH₂CH₂, 6* CH₂CH₂CH=); 1.67 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.64 (s, 3H, =C(CH₃)CH₃ trans); 1.58 (s, 9H, SC(CH₃)₃); 1.34 (s, 12H, =C(CH₃)CH₃ cis); 1.26 (s, 12H, =C(CH₃)CH₃ cis).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

δ = 174.5 (CO₂H); 172.3 (C=O); 170.7 (C=O); 164.9 (C=O); 143.7 (C-8a, C-9a Fmoc); 141.3 (C-4a, C-4b Fmoc); 133.3 (2* C=CH); 131.2 (2* C=CH); 129.1 (4x C=CH); 128.5 (2* C=CH); 127.8, 127.4, 127.2, 127.1 (C-3, C-6, C-2, C-7 Fmoc); 125.5, 125.2 (C-1, C-8 Fmoc);

124.4 (2* C=CH); 124.2 (2* C=CH); 123.8 (2* C=CH); 120.4, 119.4 (C-4, C-5 Fmoc); 66.3 (C-10 Fmoc); 48.7 (α -CH Cys); 47.0 (C-9 Fmoc); 39.7 (6x =C(CH₃)CH₂CH₂); 36.6 (3x -CH₂ Cys); 29.7, 29.3 (2* SCH₂C=); 26.6, 26.5, 26.4 (6x CH₂CH₂CH=); 25.7, 25.4 (2* =C(CH₃)CH₃ trans); 17.6, 17.0 (2x =C(CH₃)CH₃ cis); 16.2, 16.0, 15.9 (6x =(CH₂)CH₃ cis).

ESI-MS + m/z: ber. für C₆₈H₁₀₀N₃O₆S₄ [M+H] 1182.6, gef.: 1182.4

6.6. Versuche zu Kapitel 4.1.6.

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*^(ϵ)-{3,5-Di-(*N,N*-dimethyl-*N*-platinum-aminomethyl)-benzoyl}-L-lysin

(Fmoc-Lys(Pincer)-OH) (53)

Zu einer Lösung von 70 mg (0.107 mmol) Pincer-OSu in 5 ml DMF werden 79 mg (0.214 mmol) Fmoc-Lys-OH und 8 Äquivalente Et₃N (121.8 μ l, 0.856 mmol) gegeben. Die Suspension wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 61.1 mg (0.067 mmol, 63 %) eines braun-gelben Feststoffs

R_f-Wert: 0.44 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -17.7 (c = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 7.65 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.50 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, Fmoc); 7.30 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, Fmoc); 7.19 (t, ³J = 9.5 Hz, 2H, Fmoc); 7.17 (s, 2H, arom CH Pincer); 4.24 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, Fmoc); 4.12 (m, 1H, Fmoc); 4.10 (t, ³J = 8.5 Hz, 1H, α -CH); 3.88 (s, 4H, 2* NCH₂); 3.30-3.26 (m, 2H, ϵ -CH₂); 2.90 (s, 12H, 2* N(CH₃)); 1.80 (m, 1H, 2* β -CH_{2a}); 1.67-1.63 (m, 1H, β -CH_{2b}); 1.57-1.50 (m, 2H, δ -CH₂); 1.38-1.31 (m, 2H, γ -CH₂).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

δ = 170.0 (C=O); 168.9 (C=O); 156.7; 154.7; 143.7; 143.7; 143.6; 143.5; 141.1; 129.4; 127.7; 127.0; 125.0; 119.9; 118.6; 118.5 (14 *arom CH); 66.9 (CH₂ Fmoc); 56.1 (NCH₂); 54.6 (CH

Fmoc); 48.9 (α -CH Cys); 39.3 (ϵ -CH₂ Lys); 31.5 (2* N(CH₃)₂); 28.9 (β -CH₂); 25.2 (δ -CH₂); 22.5 (γ -CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₃₄H₄₁N₄O₅Pt [M-I+CH₃CN] 821.1, gef.: 821.1

MALDI-TOF (DHB): ber. für C₃₄H₄₂N₄O₅Pt [M-I+H] 781.2, gef.: 781.5; ber. für C₃₄H₄₁N₄O₅ [M-I-Pt] 585.4, gef.: 585.6

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(ϵ)-{3,5-Di-(*N,N*-dimethyl-*N*-platinum-aminomethyl)-benzoyl}-*L*-lysyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteyl-*L*-seryl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cystein**

(Fmoc-Cys(*S*^tBu)-Lys(Pincer)-Ser-Cys(GerGer)-Ser-Cys(GerGer)-OH) (58)

Für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **58** wird das 2-Chlorotriethylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 10 mg Harz (1.5 mmol/g, 0.015 mmol) in 1 ml Dichlormethan mit 3 Äquivalenten DIPEA (0.045 mmol, 8 μ l) und 1.5 Äquivalenten Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26** (0.023 mmol, 14 mg) versetzt und 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig geschütteln. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **58** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Cys(GerGer)-OH **26**, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Pincer)-OH **53** und Fmoc-Cys(*S*^tBu)-OH unter Verwendung von DIC/HOBt oder HOBt/HBTU gekuppelt. Man spaltet mit 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 21.2 mg (0.01 mmol, 70 %) eines schwach gelben Feststoffs

R_f-Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]_D²⁰: -66.9 (c = 0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 7.64 (d, ³J = 9.4 Hz, 2H, Fmoc); 7.50 (m, 2H, Fmoc); 7.28 (m, 2H, Fmoc); 7.17 (m, 4H, 2H Fmoc, 2 arom CH Pincer); 5.08 (m, 2H, SCH₃CH= GerGer); 4.98 (m, 6H, 6* C=CH, GerGer); 4.35-4.20 (m, 9H, 3H Fmoc, 6* α -CH); 4.10 (m, 2H, β -CH_{2a} Ser); 4.02 (m, 2H, β -CH_{2b} Ser); 3.90 (m, 4H, 2* β -CH₂ Cys); 3.26 (t, ³J = 1.9 Hz, 1H, ϵ -CH₂ Lys); 3.13-2.97 (m,

4H, 2*NCH₂); 2.77 (s, 12H, 2* N(CH₃)₂); 2.91 (m, 4H, 2* SCH₂ GerGer); 1.93-1.85 (m, 24H, 6* =C(CH₃)CH₂CH₂, 6* CH₂CH₂CH=); 1.56-1.48 (s, 34H, 2* =C(CH₃)CH₃ trans, 8* =C(CH₃)CH₃ cis, β-CH₂-Lys, δ-CH₂-Lys); 1.21 (m, 11H, SC(CH₃)₃, γ-CH₂-Lys).

ESI-MS + m/z: ber. für C₉₃H₁₃₉N₉O₁₂PtS₄ [M-I+H] 1896.9, gef.: 1896.5

MALDI-TOF (DHB): ber. für C₉₃H₁₃₉N₉O₁₂PtS₄ [M-I+H] 1896.9, gef.: 1896.7

***N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*^ε-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)-L-Lysin (Fmoc-Lys(NBD)-OH) (59)**

Zu einer Lösung von 500 mg (1.04 mmol) *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysin in 15 ml H₂O und 10 ml Methanol werden 310 mg (1.55 mmol) NBD-Cl gegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit 262 mg NaHCO₃ (3.12 mmol) versetzt und 3 h bei 55° C gerührt. Der pH-Wert der Lösung wird anschließend mit 1N HCl auf pH = 2 eingestellt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 360 mg (0.067 mmol, 65 %) orange-grünen Feststoffs

R_f-Wert: 0.23 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

Schmelzpunkt: 116° C

[α]_D²⁰: +14.0 (c = 3.5, CHCl₃)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃):

δ = 8.42 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, arom. C-H NBD); 7.76 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, C-H Fmoc); 7.66-7.61 (m, 2H, C-H Fmoc); 7.38-7.34 (m, 2H, Fmoc); 7.31-7.25 (m, 2H, C-H Fmoc); 6.26 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, arom. C-H NBD); 4.40-4.27 (m, 2H, -CH₂ Fmoc); 4.25-4.21 (m, 1H, α-CH); 4.18 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, C-H Fmoc); 3.51 (br s, 2H, ε-CH₂); 1.93 (m, 1H, β-CH_{2a}); 1.84-1.77 (m, 3H, β-CH_{2b}, δ-CH₂); 1.62-1.59 (m, 2H, γ-CH₂).

C₂₇H₂₅N₅O₇ (531.52)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 532.1832 [M+H]⁺

gef.: 532.1820 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*⁽⁶⁾-(7-nitro-benzo-[1,2,5]-oxadiazol-4-yl)-*L*-lysyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein**

(Fmoc-Cys(S^tBu)-Lys(NBD)-Cys(S^tBu)-OH) (60)

Für die Festphasen-Synthese des Tripeptids **60** wird das 2-Chlorotriptylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 9 mg Harz (1.5 mmol/g, $1.32 \cdot 10^{-5}$ mol) in 1 ml Dichlormethan mit 6 Äquivalenten DIPEA ($1.32 \cdot 10^{-5}$ mol, 13.8 μ l) und 3 Äquivalenten Fmoc-Cys(S^tBu)-OH ($3.96 \cdot 10^{-5}$ mol, 17.1 mg) 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **65** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Boc-Lys(NBD)-OH **59** und Fmoc-Cys(S^tBu)-OH unter Verwendung von DIC/HOBt oder HOBt/HBTU gekuppelt. Man spaltet mit 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 9.0 mg ($9.9 \cdot 10^{-6}$ mol, 75 %) eines gelb-braunen Feststoffs
 R_f-Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +70.8 (c = 0.5, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 8.31 (d, ³J = 10.7 Hz, 1H, NH); 7.65 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, Fmoc); 7.55 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, arom. CH NBD); 7.50 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, Fmoc); 7.32 (t, ³J = 9.3 Hz, 2H, Fmoc); 7.23 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, Fmoc); 5.98 (d, ³J = 10.1 Hz, 1H, arom. CH NBD); 4.74 (m, 1H, CH Fmoc); 4.54-4.48 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.36-4.29 (m, 2H, 2* α -CH Cys); 4.17-4.13 (m, 1H, α -CH Lys); 3.41-3.32 (m, 2H, ϵ -CH₂ Lys); 3.08-3.04 (m, 4H, 2* β -CH₂ Cys); 1.72-1.71 (m, 4H, 1.87-1.70 (m, 4H, β -CH₂, δ -CH₂ Lys); 1.47-1.46 (m, 2H, γ -CH₂ Lys); 1.29 (s, 9H, SC(CH₃)₃); 1.26 (s, 9H, SC(CH₃)₃).

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃):

δ = 172.3 (CO₂H); 172.0 (CONH); 171.2 (CONH); 156.3 (CO₂NH); 144.1; 144.0; 143.5; 143.5; 143.4; 141.1; 136.7; 127.7; 127.0; 125.0; 125.0; 124.9; 119.9 (13 *arom CH); 67.4 (CH₂ Fmoc); 54.7 (CH Fmoc); 52.7 (α -CH Cys); 51.9 (α -CH Lys); 46.9 (2* β -CH₂ Cys); 41.5 (ϵ -CH₂ Lys); 36.6 (β -CH₂ Lys); 31.5 (δ -CH₂ Lys); 29.7 (SC(CH₃)₃); 22.4 (γ -CH₂ Lys).

ESI-MS + m/z: ber. für C₄₁H₅₂N₇O₉S₄ [M+H] 914.3, gef.: 914.4; ber. für C₄₁H₅₁N₇O₉S₄Na [M+Na] 936.3, gef.: 936.2

MALDI-TOF (DHB): ber. für C₄₁H₅₁N₇O₈S₄Na [M+Na-O] 920.3, gef.: 920.5; ber. für C₄₁H₅₁N₇O₉S₄Na [M+Na] 936.3, gef.: 936.5

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*^(*ε*)-{3,5-Di-(*N,N*-dimethyl-*N*-platinum-aminomethyl)-benzoyl}-*L*-lysyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cystein
(Fmoc-Cys(*S*^tBu)-Lys(Pincer)-Cys(*S*^tBu)-OH) (61)**

Für die Festphasen-Synthese des Tripeptids **61** wird das 2-Chlorotriylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 9 mg Harz (1.5 mmol/g, 1.32*10⁻⁵ mol) in 1 ml Dichlormethan mit 6 Äquivalenten DIPEA (1.32*10⁻⁵ mol, 13.8 µl) und 3 Äquivalenten Fmoc-Cys(*S*^tBu)-OH (3.96*10⁻⁵ mol, 17.1 mg) 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **65** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Lys(Pincer)-OH **53** und Fmoc-Cys(*S*^tBu)-OH unter Verwendung von DIC/HOBt oder HOBt/HBTU gekuppelt. Man spaltet mit 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute:	11.9 mg (9.24*10 ⁻⁶ mol, 70 %) eines schwach gelben Feststoffs
R _f -Wert:	0.10 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-32.8 (c = 0.25, CHCl ₃)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃):

δ = 7.71 (m, 2H, Fmoc); 7.65 (d, ³J = 6.4 Hz, 2H, Fmoc); 7.39-7.38 (m, 4H, 2H Fmoc, 2 arom H Pincer); 7.32-7.28 (m, 2H, Fmoc); 4.71-4.68 (m, 1H, α-CH Cys); 4.49-4.43 (m, 2H, OCH₂ Fmoc); 4.29-4.21 (m, 7H, α-CH Cys, α-CH Lys, 1H Fmoc, 2* NCH₂); 3.44-3.40 (m, 2H, ε-CH₂ Lys); 3.21-3.13 (m, 1H, 2* β-CH_{2a} Cys); 2.98-2.85 (m, 1H, β-CH_{2b} Cys); 2.72 (br s, 12H, 2* N(CH₃)₂); 1.93 (m, 1H, 2* β-CH_{2a} Lys); 1.78-1.77 (m, 1H, β-CH_{2b} Lys); 1.65-1.60 (m, 2H, δ-CH₂ Lys); 1.51-1.49 (m, 2H, γ-CH₂ Lys); 1.38, 1.34, 1.31 (3*s, 18H, SC(CH₃)₃).

MALDI-TOF (DHB): ber. für $C_{48}H_{68}N_6O_7Pt$ [M-I+H] 1163.3, gef.: 1163.3; ber. für $C_{48}H_{67}N_6O_7$ [M-I-Pt] 697.3, gef.: 697.5

Maleinimidocaproyl-L-seryl- $N^{(6)}$ -{3,5-Di-(*N,N*-dimethyl-*N*-platinum-aminomethyl)-benzoyl}-L-lysyl-L-seryl-glycin

(MIC-Ser-Lys(Pincer)-Ser-Gly-OH) (64)

Für die Festphasen-Synthese des Tetrapeptids **64** wird das 2-Chlorotriylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 40 mg Harz (1.5 mmol/g, 0.06 mmol) in 1 ml Dichlormethan mit 6 Äquivalenten DIPEA (0.36 mmol, 63 μ l) und 3 Äquivalenten Fmoc-Gly-OH (0.18 mmol, 53.5 mg) 12 h bei Raumtemperatur versetzt und vorsichtig geschüttelt. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Tetrapeptids **64** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Pincer)-OH **53**, Fmoc-Ser(Trt)-OH und MIC unter Verwendung von DIC/HOBt oder HOBt/HBTU gekuppelt. Man spaltet mit 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 43.3 mg (0.04 mmol, 65 %) eines schwach gelben Feststoffs

R_f -Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$: -12.0 (c = 0.25, $CHCl_3$)

1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$):

δ = 6.77 (s, 2H, MIC); 4.47-4.46 (m, 2H, α -CH Ser); 4.35-4.34 (m, 1H, α -CH Lys); 3.94-3.92 (m, 2H, 2* β - CH_{2a} Ser); 3.81-3.79 (m, 2H, 2* β - CH_{2b} Ser); 3.47 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, ϵ - CH_2 MIC); 3.40-3.38 (m, 2H, ϵ - CH_2 Lys); 3.30 (m, 4H, 2* NCH_2); 2.85 (s, 12H, 2* $N(CH_3)_2$); 2.25-2.23 (m, 2H, CH_2 , Gly); 1.98-1.90 (m, 1H, α - CH_{2a} MIC); 1.78-1.77 (m, 2H, α - CH_{2a} MIC, β - CH_{2a} Lys); 1.63-1.57 (m, 7H, β - CH_2 MIC, δ - CH_2 MIC, β - CH_{2b} Lys, δ - CH_2 Lys); 1.29 (m, 4H, γ - CH_2 MIC, γ - CH_2 Lys).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{37}H_{55}N_8O_{11}Pt$ [M-I] 982.3, gef.: 982.5

MALDI-TOF (DHB): ber. für $C_{37}H_{56}N_8O_{11}Pt$ [M-I+H] 983.3, gef.: 983.7

**Maleinimidocaproyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*^(ε)-{3,5-Di-(*N,N*-dimethyl-*N*-platinum-aminomethyl)-benzoyl}-L-lysyl-*S*-farnesyl-L-cysteyl-L-valyl-L-leucyl-L-serin
(MIC-Cys(*S*^tBu)-Lys(Pincer)-Cys(Far)-Val-Leu-Ser-OH) (65)**

Für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **65** wird das 2-Chlorotriptylchlorid-Harz (Novabiochem) verwendet. Zur Beladung des Harzes werden 20 mg Harz (1.5 mmol/g, 0.03 mmol) in 1 ml Dichlormethan mit 6 Äquivalenten DIPEA (0.18 mmol, 32 µl) und 3 Äquivalenten Fmoc-Ser(Trt)-OH (0.09 mmol, 51.2 mg) 12 h bei Raumtemperatur versetzt und vorsichtig geschüttelt. Die Kupplungen der Aminosäuren und die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen für die Festphasen-Synthese des Hexapeptids **65** erfolgen nach dem im Kapitel 6.3.2. beschriebenen allgemeinen Verfahren für die Festphasen-Synthese der Rab-Peptide. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe werden Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Cys(Far)-OH, Fmoc-Lys(Pincer)-OH **53**, Fmoc-Cys(*S*^tBu)-OH und MIC unter Verwendung von DIC/HOBt oder HOBt/HBTU gekuppelt. Man spaltet mit 1%-iger TFA-Lösung ab. Das Harz wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit 5 ml Toluol coevaporiert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 32.7 mg (0.02 mmol, 65 %) eines schwach gelben Feststoffs
 R_f-Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))
 [α]_D²⁰: -52.0 (c = 0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (500MHz, MeOD + 0.5%CDCl₃):

δ = 5.23 (t, ³J = 8.5 Hz, 1H, SCH₂CH=); 5.09 (t, ³J = 7.9 Hz, 2H, SCH₂,); 4.58-4.42 (m, 6H, 6 * α-CH); 4.25-4.20 (m, 4H, 2* β-CH₂ Ser); 3.92-3.90 (dd, ³J₁ = 14.0 Hz, ³J₂ = 3.5 Hz, 2H, 2* β-CH_{2a} Cys); 3.82-3.79 (dd, ³J₁ = 14.0 Hz, ³J₂ = 4.0 Hz, 2H, 2* β-CH_{2b} Cys); 3.65 (m, 2H, ε-CH₂ MIC); 3.47 (m, 2H, ε-CH₂ Lys); 3.43-3.33 (m, 4H, 2* NCH₂); 3.20 (br s; 12H, 2* N(CH₃)₂); 2.43 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, CH Val); 2.14-2.05 (m, 9H, 2* CH₂CH₂CH=, γ-CH₂ Leu, α-CH₂ MIC); 1.98-1.96 (m, 4H, 2* =C(CH₃)CH₂CH₂); 1.67-1.58 (s, 16H, 3* =C(CH₃)CH₃ trans, =C(CH₃)CH₃ cis, β-CH₂ MIC, β-CH₂ Lys); 1.52 (m, 4H, δ-CH₂ MIC, δ-CH₂ Lys); 1.33-1.28 (m, 13H, γ-CH₂ MIC, γ-CH₂ Lys, SC(CH₃)₃); 0.94 (d, ³J = 7.5 Hz, 6H, 2* CH₃ Val); 0.91 (d, ³J = 6.5 Hz, 6H, 2* CH₃ Leu).

ESI-MS + m/z: ber. für C₆₈H₁₀₉N₁₀O₁₂PtS₃ [M-I] 1548.6, gef.: 1548.5

6.7. Versuche zu Kapitel 4.2.2.

6.7.1. Versuche zu Kapitel 4.2.2.1.

Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Festphasensynthese der Bausteine:

1. Beladung des Harzes (AAV1):

Das Fmoc-4-hydrazineobenzoyl NovaGel™ Harz (0.56 mmol/g) wird in Dichlormethan vorgequollen und zweimal mit 30%-iger Piperidin/DMF-Lösung für jeweils 15 min versetzt. Das Harz wird je fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen. Eine Lösung von 3 Äquivalenten der zu kuppelnden Carbonsäure wird mit 3 Äquivalenten HOBt, 3 Äquivalenten DIC und 6 Äquivalenten Et₃N in Dichlormethan zum Harz gegeben. Man lässt das Harz für 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Anschließend wird das Harz jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

2. Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (AAV2):

Das Harz wird mit 50%-iger TFA-Lösung für 5 Minuten versetzt. Das Harz wird anschließend jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

3. Reduktion der Nitrogruppe (AAV3):

Eine 1M SnCl₂*2H₂O/DMF-Lösung wird zum Harz gegeben. Man lässt das Harz vorsichtig für 2 h bei Raumtemperatur schütteln. Das Harz wird anschließend jeweils fünfmal mit Dichlormethan, Ethylacetat und DMF gewaschen.

4. Kupplungen (AAV4):

Methode A: 3 Äquivalente Aminosäure, 3 Äquivalente HOBt, 3 Äquivalente HBTU und 3 Äquivalente DIPEA werden zum Harz gegeben. Man lässt das Harz für 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Im Anschluss wird das Harz jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen. Im Falle von Maleinimidocaproylsäure (MIC) werden HOBt und DIC als Kupplungsreagenzien eingesetzt.

Methode B: 3 Äquivalente Dansylchlorid, 3 Äquivalente Pyridin und 0.5 Äquivalente DMAP werden in DMF zum Harz gegeben. Man lässt das Harz 3 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln. Anschließend wird das Harz jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

5. Abspaltung von der festen Phase (AAV5):

Methode A: Das Harz wird mit einer 0.005 M Cu(OAc)₂- (1 Äquivalent), 0.01M Pyridin- (20 Äquivalente) und methanolischen (100 Äquivalente) Dichlormethan-Lösung unter Sauerstoffatmosphäre für 3 h bei Raumtemperatur versetzt. Das Harz wird anschließend abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Methode B: Das Harz wird mit einer 0.02 M NBS- (5 Äquivalente), und 0.02 M Pyridin- (5 Äquivalente) Dichlormethanlösung versetzt. Das Harz wird 45 min vorsichtig geschüttelt, abfiltriert und anschließend fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Im nächsten Schritt wird eine methanolische Dichlormethan-Lösung zum Harz gegeben. Das Harz wird 2 h vorsichtig geschüttelt und anschließend abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

3-Hydroxymethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester (67)

Zu einer Lösung von 7g (0.029 mmol) 5-Nitro-isophthalsäuredimethylester **66** werden in 200 ml THF abs. bei -78° C unter Argon 2.5 Äquivalente DIBAL-H (72.5 ml einer 1M-Lösung in Toluol) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch lässt man bis auf Raumtemperatur erwärmen, gibt 50 ml Methanol zu und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, mit 1N HCl und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 9:1, 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3.06 g (1.45 mmol, 50 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 75-76° C

R_f-Wert: 0.36 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.74 (s, 1H, arom CH-4), 8.43 (s, 1H, arom CH-6), 8.34 (s, 1H, arom CH-2), 4.88 (s, 2H, CH₂OH), 3.88 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.14 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 164.99 (CO₂CH₃), 148.60 (C-5), 143.60 (C-3), 133.05 (C-2), 131.88 (C-1), 125.24 (C-4), 123.44 (C-6), 63.49 (CH₂OH), 52.83 (CO₂CH₃).

C₉H₉NO₅ (211.05)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 212.0559 [M+H]⁺
gef.: 212.0576 (in 3-NBA-Matrix)

3-Formyl-5-nitro-benzoesäuremethylester (68)

Zu einer Lösung von 1.1 g (5.209 mmol) 3-Hydroxymethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **67** in 20 ml Dichlormethan abs. werden bei 0° C unter Argon 1.5 Äquivalente Pyridiniumchlorochromat (1.53 g, 7.814 mmol) mit Kieselgel gegeben. Man lässt das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und weitere 3 h rühren. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf eine Säule an Kieselgel gegeben und das Produkt mit Dichlormethan eluiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 1.0 g (4.785 mmol, 92 %) eines hell gelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 78-79° C

R_f-Wert: 0.48 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 10.15 (s, CHO), 9.06 (s, 1H, arom CH-6), 8.87 (s, 1H, arom CH-4), 8.83 (s, 1H, arom CH-2), 4.03 (s, 3H, CO₂CH₃).

³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 188.80 (CHO), 164.00 (CO₂CH₃), 148.60 (C-5), 137.79 (C-3), 135.56 (C-2), 133.25 (C-1), 129.24 (C-6), 127.41 (C-4), 53.25 (CO₂CH₃).

C₉H₇NO₅ (209.03)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 210.0403 [M+H]⁺
gef.: 210.0416 (in 3-NBA-Matrix)

3-[1,3]-Dioxolan-2-yl-5-nitro-benzoesäuremethylester (69)

Zu einer Lösung von 330 mg (1.578 mmol) 3-Formyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **68** in 20 ml Benzol werden 2.4 Äquivalente Ethylenglycol (211 µl, 3.787 mmol) und 0.2 Äquivalente para-Toluolsulfonsäure (60 mg, 0.316 mmol) gegeben. Man lässt das Reaktionsgemisch über Nacht unter Rückfluss rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase

wird mit H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 280 g (1.107 mmol, 70 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 77-78° C
R_f-Wert: 0.56 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.77 (s, 1H, arom CH-6), 8.45 (s, 1H, arom CH-4), 8.39 (s, 1H, arom CH-2), 5.86 (s, 1H, O₂CH-C-3), 4.10-4.08 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 4.06-4.04 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 3.93 (s, 3H, CO₂CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 164.63 (CO₂CH₃), 148.30 (C-5), 141.14 (C-3), 133.27 (C-2), 131.95 (C-1), 125.44 (C-4), 124.92 (C-6), 101.69 (O₂CH-C-3), 65.53 (OCH₂CH₂O), 52.78 (CO₂CH₃).

C₁₁H₁₁NO₆ (253.06)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 254.0725 [M+H]⁺
gef.: 254.0695 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-Triphenylmethyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-*L*-cystein (73)**

Zu einer Suspension von 500 mg (1.27 mmol) H-Cys(Mmt)-OH **72** in 2.4 ml trockenem Chloroform/Acetonitril 5:1 (v/v) werden 156 µl (0.63 mmol) BSA zugetropft, und das Reaktionsgemisch 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 354 µl (2.54 mmol) trockenes Et₃N langsam zugetropft, so dass das Reaktionsgemisch leicht rückflusiert. Eine Lösung von 354 mg (1.27 mmol) Triphenylchlormethan in 1 ml trockenem Chloroform wird zum Reaktionsgemisch gegeben und man lässt 1 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend werden 260 µl Methanol zugegeben, und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird in 100 ml Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wird mit je 50 ml 1N NaOH und Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden im Anschluss über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	477-560 mg (0.75-0.88 mmol, 60-70 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	104-106° C
R _f -Wert:	0.2 (Hexan/Ethylacetat 4:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	+76.0 (c = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 7.45-7.15 (m, 7H, 15 * CH Trt, 12 * CH Mmt, NH), 6.72 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, Mmt), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (t, J₁ = 5.0 Hz, 1H, α-CH), 2.72-2.69 (dd, ²J = 11.5 Hz, ³J = 4.5 Hz, 1H, β-CH_{2a}), 2.35-2.32 (dd, ²J = 11.5 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1H, β-CH_{2b}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 158.13, 144.64 (arom. quart. C Mmt), 146.81, 144.97, 144.72 (3 * arom. quart. C), 144.64 (arom. quart. C Mmt), 130.82, 129.47, 129.45, 128.68, 127.97, 127.94, 127.88, 127.84, 127.80, 127.71, 127.21, 127.12, 126.87, 126.70 (14 * arom. CH), 113.21 (arom. CH Mmt), 71.37 (C(C₆H₅)₃), 66.36 (quart. C Mmt), 55.49, 55.15 (α-CH, OCH₃), 36.20 (β-CH₂).

C₄₂H₃₇NO₃S (635.81)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 636.2572 [M+H]⁺
gef.: 636.2592 (in 3-NBA-Matrix)

3-Methansulfonyloxymethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester (74)

Zu einer Lösung von 1.50 g (7.11 mmol) 3-Hydroxymehtyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **67** in 20 ml Dichlormethan abs. werden bei 0° C unter Argon 10 Äquivalente Et₃N (9.85 ml, 71.1 mmol) und anschließend 2 Äquivalente Mesylchlorid (1.10 ml, 14.22 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0° C gerührt und anschließend mit 10 ml NaCl versetzt. Die organische Phase wird mit 1N KHSO₄ und ges. Na₂CO₃-Lösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 9:1, 8:2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	1.95 g (6.75 mmol, 95 %) eines hell gelben Feststoffs
Schmelzpunkt:	82° C
R _f -Wert:	0.32 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.84$ (s, 1H, arom CH-6), 8.44 (s, 1H, arom CH-4), 8.37 (s, 1H, arom CH-2), 5.33 (s, 2H, CH_2O), 3.98 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.08 (s, 3H, O_2SCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):

$\delta = 164.35$ (CO_2CH_3), 136.38 (C-3), 134.61 (C-2), 132.59 (C-1), 126.84 (C-4), 125.01 (C-6), 68.17 (CH_2O), 53.04 (CO_2CH_3), 38.19 (O_2SCH_3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_7\text{S}$ (289.02)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 312.0154 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
gef.: 312.0142 (in 3-NBA-Matrix)

3-Azidomethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester (75)

Zu einer Lösung von 1.30 g (4.50 mmol) 3-Methansulfonyloxymethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **74** in 20 ml DMF werden 5 Äquivalente Natriumazid (1.46 g, 22.49 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 50° C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.06 g (4.5 mmol, 100 %) eines hell gelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 69-72° C

R_f -Wert: 0.83 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

$\delta = 8.75$ (s, 1H, arom CH-6), 8.35 (s, 1H, arom CH-4), 8.29 (s, 1H, arom CH-2), 4.57 (s, 2H, CH_2N_3), 3.97 (s, 3H, CO_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):

$\delta = 164.47$ (CO_2CH_3), 148.47 (C-5), 138.38 (C-3), 134.23 (C-2), 132.31 (C-1), 126.37 (C-4), 124.00 (C-6), 53.25 (CH_2N_3), 52.83 (CO_2CH_3).

$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$ (236.05)

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 194.05 $[M-N_3]^+$
gef.: 194.00 (in 3-NBA-Matrix)

3-Aminomethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester (71)

Zu einer Lösung von 200 mg (0.85 mmol) 3-Azidomethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **75** in 5 ml Methanol abs. werden 4 Äquivalente Et_3N (470 μ l, 3.39 mmol) und 6 Äquivalente Propandithiol (511 μ l, 5.08 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 151.7 mg (0.723 mmol, 85 %) eines hell gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 84° C
 R_f -Wert: 0.3 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

δ = 8.61 (s, 1H, arom CH-6), 8.30 (s, 1H, arom CH-4), 8.21 (s, 1H, arom CH-2), 3.91 (s, 2H, CH_2NH_2), 3.86 (s, 3H, CO_2CH_3).

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$):

δ = 164.97 (CO_2CH_3), 148.31 (C-5), 144.60 (C-3), 133.80 (C-2), 131.72 (C-1), 125.87 (C-4), 122.88 (C-6), 52.55 (CH_2NH_2), 44.57 (CO_2CH_3).

$C_9H_{10}N_2O_4$ (210.06)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 311.0719 $[M+H]^+$
gef.: 211.0730 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-monomethoxytrityl)-N-trityl]-methyl}-5-nitro-benzoesäuremethylester (76)

Zu einer Lösung von 1.57 g (2.54 mmol) Trt-Cys(Mmt)-OH **73** in 5 ml THF abs. werden 389 mg (2.54 mmol) HOBt und 320 μ l DIC (2.54 mmol) gegeben. Nach vollständiger Aktivierung wird das Reaktionsgemisch mit 500 mg (2.12 mmol) 3-Azido-methyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **75** in 5 ml THF abs. versetzt. Anschließend werden 3 Äquivalente Bu_3P (1.57 ml, 6.35 mmol) zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Man lässt 12 h bei

Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 8:2, 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	1.67 g (2.01 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	118-119° C
R _f -Wert:	0.5 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	+55.7 (<i>c</i> = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.83 (s, 1H, arom CH-6), 8.39 (s, 1H, arom CH-4), 8.33 (s, 1H, arom CH-2), 7.98 (m, 1H, NH), 7.45-7.51 (m, 6H, 6 * arom CH Trt, Mmt), 7.36-7.21 (m, 21H, 21 * arom CH Trt, Mmt), 6.81 (d, J= 5.0 Hz, 2H, 2 * arom CH Mmt), 4.57 (s, 2H, CH₂NH), 4.01 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.90 (m, 1H, α-CH), 3.78 (s, 3H, OCH₃ Mmt), 2.81-2.85 (m, 2H, β-CH₂), 2.65 (m, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 173.75 (CONH), 158.16, 148.43, 144.95, 144.59, 141.22, 136.41, 134.34, 131.76, 130.94, 129.49, 129.44, 128.83, 128.70, 128.01, 127.99, 127.92, 127.81, 127.78, 126.93, 126.77, 126.43, 123.3 (22 * arom CH), 113.23 (2 * arom CH Mmt), 71.44 (quart. C Trt), 66.75 (quart. C Mmt), 56.24 (OCH₃ Mmt), 55.12 (α-CH), 52.75 (CO₂CH₃), 42.26 (CH₂NH), 36.79 (β-CH₂).

ESI-MS + *m/z*: ber. für C₅₁H₄₅N₃O₆SNa [M+Na], 850.3 gef.: 850.4

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₅₁H₄₅N₃O₆SNa [M+Na] 850.3, gef.: 850.4

FAB/LR-MS (*m/z*): ber.: 828.30 [M+H]⁺
gef.: 828.00 (in 3-NBA-Matrix)

Synthese von 76 an der festen Phase

Zu einer Lösung von 104 mg (0.441 mmol) des Bausteins **75** in 2 ml H₂O/Dioxan (1:1) werden langsam mit 156 µl 1N NaOH gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisch wird mit 1N HCl auf pH = 2 eingestellt und die freie Säure dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, und im Vakuum eingengt. Nach AAV1 wird das Rohprodukt mit 150 mg Fmoc-4-hydrazineobenzoyl NovaGelTM (0.56 mmol/g, 0.147 mmol) versetzt. Anschließend werden 363 mg (0.588 mmol)

Trt-Cys(Mmt)-OH **73** in 2 ml THF abs. mit 90.1 mg (0.588 mmol) HOBt und 74 μ l DIC (0.588 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 3 Äquivalenten Bu₃P (363 μ l, 1.47 mmol) zum Harz gegeben. Man lässt 12 h bei Raumtemperatur vorsichtig schütteln und spaltet nach AAV5 (MethodeA) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 8:2, 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt und das Produkt **76** mit einer Ausbeute von 65 % (0.286 mmol, 236.9 mg) erhalten.

3-{Amino-[L-cystein-(S-monomethoxytrityl)-N-trityl]-methyl}-5-amino-benzoesäuremethylester (77)

Zu einer Lösung von 50 mg (0.06 mmol) 3-{Amino-[L-cystein-(SMmt)-N-trityl]-methyl}-5-nitro-benzoesäuremethylester **76** in 3 ml Methanol wird Palladium/Aktivkohle Hydrierkatalysator gegeben und das Reaktionsgemisch unter eine Wasserstoffatmosphäre versetzt. Man lässt 4 h bei Raumtemperatur rühren und filtriert anschließend den Palladium-Katalysator ab. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	47.8 mg (0.06 mmol, 100 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	124-126° C
R _F -Wert:	0.44 (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	+18.0 (<i>c</i> = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.95 (s, 1H, arom CH), 7.42-7.35 (m, 5H, 5 * arom CH), 7.27-7.24 (m, 3H, 3 * arom CH), 7.23-7.10 (m, 20H, 20 * arom CH), 7.03 (s, 1H, arom CH), 6.65 (d, ³*J* = 10.8 Hz, 2H, 2 * arom CH Mmt), 4.00-3.98 (dd, ³*J*₁ = 15.0 Hz, ³*J*₂ = 7.1 Hz, 2H, CH₂NH), 3.82 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃ Mmt), 3.66 (m, 1H, α -CH), 3.08 (m, 1H, β -CH_{2a}), 2.99 (m, 1H, β -CH_{2b}), 2.86 (br s, 2H, NH₂), 2.41-2.36 (m, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 173.24 (CONH), 158.15, 145.31, 144.92, 144.87, 136.58, 130.95, 129.49, 129.46, 128.86, 127.98, 127.92, 127.86, 126.93, 126.78, 126.74 (15 * arom CH), 113.44 (2 * arom CH Mmt),

71.67 (quart. C Trt), 66.58 (quart. C Mmt), 56.79 (OCH₃ Mmt), 55.27 (α -CH), 52.29 (CO₂CH₃), 43.21 (CH₂NH), 36.97 (β -CH₂).

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₅₁H₄₇N₃O₄SNa [M+Na] 820.3, gef.: 820.6; ber. für C₅₁H₄₇N₃O₄SK [M+K] 836.3, gef.: 836.6

FAB/LR-MS (*m/z*): ber.: 798.33 [M+H]⁺
gef.: 799.15 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-monomethoxytrityl)-N-trityl]-methyl}-5-(5-dimethylamino-naphthalen-1-sulfonylamino)-benzoesäuremethylester (78)

Zu einer Lösung von 770 mg (0.966 mmol) 3-{Amino-[L-cystein-(SMmt)-N-trityl]-methyl}-5-amino-benzoesäuremethylester **77** in 3 ml Dichlormethan werden 1.5 Äquivalente Dansylchlorid (7.6 mg, 0.028 mmol), 3 Äquivalente Pyridin (4.46 mg, 0.056 mmol) und 0.5 Äquivalente Dimethylaminopyridin (1.7 mg, 0.015 mmol) gegeben. Man lässt das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur rühren und entfernt das Lösungsmittel unter vermindertem Druck. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 8:2, 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 786.0 mg (0.763 mmol, 79 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 120-121 °C
R_f-Wert: 0.58 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α]_D²⁰: -46.1 (*c* = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.46 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.28 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 1H, H-4 Dansyl), 8.20 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.55-7.44 (m, 4H, 4 * arom CH), 7.40-7.35 (m, 7H, 7 * arom CH), 7.26-7.04 (m, 22H, 22 * arom CH), 6.65 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, 2 * arom CH Mmt), 6.30 (br s, 1H, NH), 3.88-3.92 (dd, ³*J*₁ = 14.9 Hz, ³*J*₂ = 6.0 Hz, 2H, CH₂NH), 3.72 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.66 (s, 3H, OCH₃ Mmt), 3.64 (m, 1H, α -CH), 3.12-3.05 (m, 2H, β -CH₂), 2.84 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.32 (dd, ³*J*₁ = 12.3 Hz, ³*J*₂ = 6.3 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 172.98 (CONH), 165.85 (CO₂CH₃), 151.72, 144.89, 144.50, 139.42, 137.10, 136.27, 133.87, 130.98, 130.66, 130.61, 129.93, 129.54, 129.25, 129.16, 128.55, 128.36, 127.70,

127.55, 126.51, 126.69, 124.49, 123.94, 122.76, 119.69, 118.17, 115.02 (26 * arom CH), 112.94 (2 * arom CH Mmt), 69.63 (quart. C Trt), 66.13 (quart. C Mmt), 56.12 (OCH₃ Mmt), 54.85 (α -CH), 51.94 (CO₂CH₃), 45.07 (CH₂NH), 42.47 (N(CH₃)₂), 36.45 (β -CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₆₃H₅₈N₄O₆S₂ [M] 1030.3, gef.: 850.4 [M-Mmt+2Na+H]

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₆₃H₅₈N₄O₆S₂ [M] 1030.3, gef.: 811.31 [M-Mmt+Na+H]

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 1013.3876 [M+H]⁺

gef.: 1013.3936 (in 3-NBA-Matrix)

Synthese der Palladium-Nanopartikel **81**

Zur Herstellung einer 2 mM H₂PdCl₄-Lösung werden 177 mg (0.6 mmol) PdCl₂ in 1 ml 0.2 M HCl und 49 ml H₂O dest. gelöst. 15 ml dieser 2 mM H₂PdCl₄-Lösung werden mit 21 ml H₂O dest., 14 ml Ethanol und 33 mg PVP (Poly-(*N*-vinyl-2-pyrrolidon); M_w = 8000, 3000 μ mol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 ml Ethanol aufgenommen.

Synthese von **78** an der festen Phase

Eine Suspension von 50 mg des beladenen Harzes **80** (0.05 mmol) in 1 ml der synthetisierten Palladium-Nanopartikel-Lösung **81** wird bei Raumtemperatur 12 h vorsichtig unter einer Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Man filtriert das Harz ab und wäscht es anschließend jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF. Anschließend wird das Harz nach AAV4 (Methode B) mit 40.7 mg (0.15 mmol) Dansylchlorid, 11.9 mg (0.15 mmol) Pyridin und 2.8 mg (0.025 mmol) DMAP versetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode A) von der festen Phase. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 8:2, 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Das Produkt **78** wird mit einer Ausbeute von 5-8% (2.0-1.25*10⁻⁶ mol, 2.0-1.3 mg) erhalten.

3-{Amino-[*L*-cystein-(*S*-*tert*-butyl)-*N*-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-nitro-benzoesäuremethylester (**85a**)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.476 mmol) 3-Aminomethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **71** in 2 ml Dichlormethan/DMF (1:1) werden 1.2 Äquivalente Fmoc-Cys(*S*'Bu)-OH (247 mg, 0.574 mmol), 1.2 Äquivalente HOBt (87 mg, 0.574 mmol), 1.2 Äquivalenten DIC (88 μ l, 0.574 mmol) und 1.2 Äquivalenten DIPEA (100 μ l, 0.574 mmol) gegeben. Das

Reaktionsgemisch wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 8:2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	282 mg (0.452 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	104-106° C
R _f -Wert:	0.75 (<i>c</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	+19.7 (<i>c</i> = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.64 (s, 1H, arom CH-2), 8.28 (s, 1H, arom CH-4), 8.21 (s, 1H, arom CH-6), 7.72 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.54 (d, ³J = 9.3 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.36 (t, ³J = 9.3 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.25 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.18 (br s, 1H, NH), 5.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 4.54 (m, 3H, H-9, H-10 Fmoc), 4.40 (m, 2H, CH₂NH), 4.17 (t, ³J = 8.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.90 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.15-3.05 (m, 2H, β-CH₂ Cys), 1.31 (s, 9H, S^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 170.60 (CONH), 164.65 (CO₂CH₃), 156.21 (CO₂NH), 148.41, 143.53, 143.48, 141.22, 141.20, 140.73, 133.87, 131.95, 127.73, 127.03, 125.97, 124.96, 123.38, 119.98 (14 * arom C), 67.37 (CH-10 Fmoc), 52.70 (α-CH Cys), 48.57 (CO₂CH₃), 46.99 (CH₂NH), 42.52 (β-CH₂ Cys), 41.63 (CH-9 Fmoc), 29.78 (S^tBu).

ESI-MS + *m/z*: ber. für C₃₁H₃₄N₃O₇S₂ [M+H] 624.2, gef.: 624.1, ber. für C₃₁H₃₃N₃O₇S₂Na [M+Na] 646.2, gef.: 646.3

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 624.1838 [M+H]⁺
gef.: 624.1820 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-amino-benzoesäuremethylester (85b)

Zu einer Lösung von 130 mg (0.209 mmol) 3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-nitro-benzoesäuremethylester **85a** in 2 ml DMF werden 5 Äquivalente SnCl₂·2H₂O (1.045 mmol, 235 mg) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und über Celite filtriert. Anschließend wird die

organische Phase mit je 50 ml H₂O und 1N HCl gewaschen und über NaSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 90 mg (0.152 mol, 73 %) eines weißen Feststoffs
 Schmelzpunkt: 101-102° C
 R_f-Wert: 0.31 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
 [α]_D²⁰: -35.8 (*c* = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.99 (s, 1H, arom CH-4), 7.74 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.56 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.36 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.26 (t, ³J = 8.5 Hz, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.18 (s, 1H, arom CH-2), 6.94 (br s, 1H, NH), 6.76 (s, 1H, arom CH-6), 4.54-4.34 (m, 5H, H-9, H-10 Fmoc, CH₂NH), 4.16 (t, ³J = 8.5 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.81 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.10 (m, 2H, β-CH₂ Cys), 1.31 (s, 9H, S^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 170.08 (CONH), 166.89 (CO₂CH₃), 162.55 (CO₂NH), 146.41, 143.63, 143.59, 141.20, 141.19, 139.12, 131.30, 127.69, 127.02, 125.03, 119.92, 118.87, 118.55, 115.23 (14 * arom C), 67.25 (CH-10 Fmoc), 51.99 (α-CH Cys), 48.40 (CO₂CH₃), 47.00 (CH₂NH), 42.21 (β-CH₂ Cys), 41.91 (CH-9 Fmoc), 29.78 (S^tBu).

ESI-MS + m/z: ber. für C₃₁H₃₆N₃O₅S₂ [M+H] 594.2, gef.: 594.3, ber. für C₃₁H₃₅N₃O₅S₂Na [M+Na] 616.2, gef.: 616.4

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 594.20 [M+H]⁺
 gef.: 594.80 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-(5-dimethylamino-naphthalen-1-sulfonylamino)-benzoesäuremethylester (85)

Zu einer Lösung von 40 mg (6.74 * 10⁻⁵ mol) 3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-amino-benzoesäure-methylester **85b** in 1 ml DMF werden 1.5 Äquivalente Dansylchlorid (27 mg, 1.01 * 10⁻⁴ mol), 0.5 Äquivalente DMAP (4 mg, 3.37 * 10⁻⁵ mol) und 1.0 Äquivalente Pyridin (5 µl, 6.74 * 10⁻⁵ mol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter

vermindertem Druck entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	25 mg ($3.03 \cdot 10^{-5}$ mol, 45 %) eines hell gelben Feststoffs
Schmelzpunkt:	112-113° C
R _F -Wert:	0.64 (<i>c</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-85.1 (<i>c</i> = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.46 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.20 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, H-4 Dansyl), 7.75-7.72 (m, 4H, H-8 Dansyl, H-1, H-8 Fmoc, arom CH-4), 7.58-7.50 (m, 4H, H-4, H-5 Fmoc, H-3 Dansyl, arom CH-6), 7.40-7.26 (m, H, H-6, H-7 Dansyl, H-2, H-3, H-6, H-7 Fmoc), 7.12 (s, 1H, arom CH-2), 4.42-4.18 (m, 5H, H-9, H-10 Fmoc, CH₂NH), 4.01 (t, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, α -CH); 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.15-3.03 (m, 8H, β -CH₂ Cys, N(CH₃)₃), 1.31 (s, 9H, S^tBu).

ESI-MS + *m/z*: ber. für C₄₃H₄₇N₄O₅S₃ [M+H] 827.2, gef.: 827.5, ber. für C₄₃H₄₆N₄O₅S₃Na [M+Na] 859.2, gef.: 859.5

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (*m/z*): ber.: 827.2606 [M+H]⁺
gef.: 827.2552 (in 3-NBA-Matrix)

Synthese von **85** an der festen Phase

Zu einer Suspension von 50 mg des beladenen Harzes **75** (0.05 mmol) in 2 ml THF abs. werden 126.2 mg (0.2 mmol) Fmoc-Cys(S^tBu)-OH, 30.6 mg (0.2 mmol) HOBt und 25.2 μ l DIC (0.2 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten vorsichtig geschüttelt, anschließend mit 6 Äquivalenten Bu₃P (74 μ l, 0.3 mmol) versetzt und weitere 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz **83** wird jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen. Die Nitrogruppe wird nach AAV3 reduziert. Anschließend wird das Harz nach AAV4 (Methode B) mit 27 mg (0.1 mmol) Dansylchlorid, 3 mg ($2.5 \cdot 10^{-5}$ mol) DMAP und 5 μ l (0.06 mmol) Pyridin umgesetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode A) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v) als Eluens gereinigt und das Produkt **85** mit einer Ausbeute von 55 % (0.027 mmol, 22.7 mg) erhalten.

6.7.2. Versuche zu Kapitel 4.2.2.2.

3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäuremethylester (**87**)

Zu einer Lösung von 340 mg (1.61 mmol) 3-Aminomethyl-5-nitro-benzoesäuremethylester **71** in 15 ml THF werden bei 0° C 2 Äquivalente Et₃N (446 µl, 3.22 mmol) und 1.5 Äquivalente Boc₂O (457 mg, 2.09 mmol) in 5 ml THF gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 499 mg (1.61 mmol, 100 %) eines farblosen Öls

R_F-Wert: 0.67 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.73 (s, 1H, arom CH-6), 8.32 (s, 1H, arom CH-4), 8.27 (s, 1H, arom CH-2), 5.13 (br s, 1H, NH), 4.45 (s, 2H, CH₂NH), 3.97 (s, 3H, CO₂CH₃), 1.46 (s, 9H, O^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 164.87 (CO₂CH₃), 148.55 (C-5), 142.18 (C-3), 133.77 (C-2), 132.03 (C-1), 125.81 (C-4), 123.33 (C-6), 52.78 (CO₂CH₃), 43.67 (CH₂NH), 28.29 (O^tBu).

C₁₄H₁₇N₂O₆ (310.12)

Hochaufgelöstes FAB/MS (*m/z*): ber.: 311.1243 [M+H]⁺

gef.: 311.1241 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäure (**88**)

Zu einer Lösung von 140 mg (0.45 mmol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäuremethyl-ester **87** in 2 ml H₂O/Dioxan (1:1) werden langsam 1.5 Äquivalente 1N NaOH (675 µl, 0.675 mmol) gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird mit 1N HCl auf pH = 2 eingestellt und anschließend mit Ethylacetat dreimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 133 mg (0.45 mmol, 100 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.2 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.56 (s, 1H, arom CH-6), 8.25 (s, 1H, arom CH-4), 8.20 (s, 1H, arom CH-2), 4.29 (s, 2H, CH₂NH), 3.21 (s, 3H, CO₂H), 1.37 (s, 9H, O^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 164.18 (CO₂CH₃), 148.68 (C-5), 143.18 (C-3), 133.71 (C-2), 132.82 (C-1), 125.46 (C-4), 122.37 (C-6), 43.05 (CH₂NH), 27.61 (O^tBu).

C₁₃H₁₆N₂O₅ (296.10)

Hochaufgelöstes FAB/MS (*m/z*): ber.: 319.0906 [M+Na]⁺
gef.: 319.0901 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-(maleinimidocaproyl-amino)-benzoesäuremethylester (92)

Nach AAV1 werden 150 mg Fmoc-4-hydrazineobenzoyl NovaGelTM (0.56 mmol/g, 0.147 mmol) mit Baustein **88** beladen. Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV2 entfernt. Das Harz wird anschließend nach AAV4 (Methode B) mit 94 mg (0.348 mmol) Dansylchlorid, 10.4 mg (0.085 mmol) DMAP und 17.4 µl (0.348 mmol) Pyridin umgesetzt. Die Nitrogruppe wird nach AAV3 reduziert und das Harz nach AAV4 mit 61.3 mg (0.294 mol) Maleinimidocaproylsäure, 91 mg (0.588 mol) HOBt, 336 mg (0.882 mol) HBTU und 52 µl (0.294 mol) DIPEA umgesetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode A) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulen-chromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 1:1, 4:6 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 49 mg (0.081 mol, 55 %) eines eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.22 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.40 (d, ³J = 10.5 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.22 (d, ³J = 10.8 Hz, 1H, H-4 Dansyl), 8.13 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.80 (s, 1H, arom CH-6), 7.53 (s, 1H, arom CH-4), 7.45 (t, ³J = 9.5 Hz, 1H, H-3 Dansyl), 7.40 (t, ³J = 10.3 Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.30 (s, 1H, arom CH-2), 7.09 (d, ³J = 10.0 Hz, 1H, H-6 Dansyl), 6.62 (s, 2H, CH=CH Mic), 5.27 (s, 1H, NH), 4.00 (s,

2H, CH₂NH), 3.76 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.44 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, ε-CH₂), 2.82 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.25 (t, ³J = 9.5 Hz, 2H, α-CH₂), 1.64 (m, 2H, β-CH₂), 1.55 (m, 2H, δ-CH₂), 1.28 (m, 2H, γ-CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 172.02 (CONH), 170.91 (CO₂CH₃), 166.55 (OCNCO), 157.70, 138.39, 137.61, 134.88 (4 * arom CH), 133.97 (C=C), 130.15, 130.01, 129.47, 129.39, 129.34, 128.01, 123.88, 123.49, 123.12, 119.77, 119.66, 115.09 (12 * arom CH), 51.98 (CO₂CH₃), 46.37 (CH₂NH), 45.26 (N(CH₃)₂), 41.57 (ε-CH₂), 37.40 (α-CH₂), 28.50 (δ-CH₂), 26.07 (β-CH₂), 24.71 (γ-CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₁₃H₃₅N₄O₇S [M+H] 607.2, gef.: 607.5

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₁₃H₃₄N₄O₇SNa [M+Na] 629.2, gef.: 629.6

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 607.21 [M+H]⁺
gef.: 607.84 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäuremethylester (93a)

Zu einer Suspension von 60 mg (0.286 mmol) 3-Aminomethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **71** in 5 ml Dichlormethan werden unter Argon 1.5 Äquivalente Dansylchlorid (133 mg, 0.486 mmol), 0.1 Äquivalente Dimethylaminopyridin (17 mg, 0.143 mmol) und 3 Äquivalente Pyridin (68 mg, 0.858 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 80.0 mg (0.181 mmol, 76 %) eines gelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 181-182° C

R_f-Wert: 0.39 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.49 (s, 1H, arom CH-6), 8.42 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.19 (d, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-4 Dansyl, arom CH-4), 7.96 (d, ³J = 10.0 Hz, 2H, H-8 Dansyl, arom CH-2), 7.55 (t, ³J = 11.0 Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.41 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.13 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-6

Dansyl), 5.37 (t, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, NH), 4.26 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2NH), 3.93 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.86 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 152.14$ (C-5 Dansyl), 138.71, 134.12, 133.99, 131.37, 130.84, 130.11, 128.78, 126.14, 123.43, 122.98, 118.08 (11 * arom CH), 115.31 (C-6 Dansyl), 52.72 (CH_2NH), 46.14 (CO_2CH_3), 45.26 ($N(CH_3)_2$).

$C_{21}H_{21}N_3O_6S$ (443.11)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 444.1229 $[M+H]^+$
gef.: 444.1240 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-amino-benzoesäuremethylester (93b)

Zu einer Lösung von 14 mg ($3.16 \cdot 10^{-5}$ mol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäuremethylester **93a** in 2 ml DMF werden 5 Äquivalente $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.158 mmol, 35.5 mg) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und über Celite filtriert. Die organische Phase wird mit je 50 ml H_2O und 1N HCl gewaschen und über $NaSO_4$ getrocknet, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 9:1, 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 8.0 mg ($1.95 \cdot 10^{-5}$ mol, 62 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 185-186° C
 R_f -Wert: 0.37 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 8.45$ (d, $^3J = 10.5$ Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.26 (d, $^3J = 11.0$ Hz, 1H, H-4 Dansyl), 8.17 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.48 (t, $^3J = 10.0$ Hz, 1H, H-3 Dansyl), 7.43 (t, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.11 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H-6 Dansyl), 7.02 (s, 1H, arom CH-2), 6.99 (s, 1H, arom CH-6), 6.54 (s, 1H, arom CH-4), 6.11 (br s, 1H, NH), 4.05 (s, 2H, CH_2NH), 3.75 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.84 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3):

$\delta = 171.33$ (CO_2CH_3), 166.91, 151.61, 146.54, 137.78, 134.72, 130.69, 130.24, 129.61, 129.53, 129.43, 128.16, 123.05, 118.80, 118.56, 115.03, 114.91 (16 * arom CH), 51.88 (CO_2CH_3), 46.51 (CH_2NH), 45.25 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

ESI-MS + m/z : ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]$ 414.1, gef.: 414.3

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 414.1488 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 414.1485 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-[maleinimidocaproyl-amino]-benzoesäuremethylester (92)

Zu einer Lösung von 10 mg ($2.42 \cdot 10^{-5}$ mol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-amino-benzoesäuremethylester **93b** in 2 ml Dichlormethan/DMF (1:1) werden 2 Äquivalente Maleinimidocaproylsäure (10 mg, $4.84 \cdot 10^{-5}$ mol), 4 Äquivalente HOBt (15 mg, $9.68 \cdot 10^{-5}$ mol), 6 Äquivalente HBTU (55 mg, $1.45 \cdot 10^{-4}$ mol) und 2 Äquivalente DIPEA (8.5 μl , $4.84 \cdot 10^{-5}$ mol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das verbleibende Reaktionsgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 1:1, 4:6 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 9.3 mg ($1.52 \cdot 10^{-5}$ mol, 63 %) eines hell gelben Öls

R_f -Wert: 0.22 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

6.7.3. Versuche zu Kapitel 4.2.2.3.

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäure (93c)

Zu einer Lösung von 50 mg (0.113 mmol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäuremethylester **93b** in 3 ml H_2O /Dioxane (1:1) werden 1.5 Äquivalente 1N NaOH (169 μl) über einen Zeitraum von einer Stunde hinzugegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird mit 1N HCl auf $\text{pH} = 2$ eingestellt und das Reaktionsgemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Produkt **93c** ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 48.5 mg (0.113 mmol, 100 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 180-182° C
R_f-Wert: 0.3 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.26 (d, ³J = 10.0 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.20 (s, 1H, arom CH-6), 8.19 (d, ³J = 10.5 Hz, 1H, H-4 Dansyl), 8.08 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.85 (s, 1H, arom CH-4), 7.80 (s, 1H, arom CH-2), 7.49 (t, ³J = 9.5 Hz, 1H, H-3 Dansyl), 7.34 (t, ³J = 11.0 Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.08 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, H-6 Dansyl), 4.25 (s, 2H, CH₂NH), 2.80 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 151.82, 134.29, 129.91, 128.20, 126.02, 122.96, 122.60, 118.98 (9 * arom CH), 115.39 (C-6 Dansyl), 45.41 (CH₂NH), 44.58 (N(CH₃)₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₂₀H₂₀N₃O₆S [M+H] 430.1, gef.: 430.3 [M+H]

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₂₀H₁₉N₃O₆S [M] 429.1, gef.: 413.7 [M-O]

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-thio-benzoesäure-S-phenylester (94)

Zu einer Lösung von 48.5 mg (0.113 mmol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäure **93c** in 4 ml Dichlormethan werden unter Argon 10 Äquivalente Thiophenol (116 µl, 1.13 mmol), 0.2 Äquivalente Dimethylaminopyridin (3 mg, 0.002 mmol) und 1.1 Äquivalente DCC (26 mg, 0.124 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 9:1, 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (0.096 mmol, 85 %) eines gelben Feststoffs
Schmelzpunkt: 184-186° C
R_f-Wert: 0.60 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.46 (s, 1H, arom CH-6), 8.43 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.21 (m, 2H, H-4, H-8

Dansyl), 8.00 (s, 1H, arom CH-4), 7.90 (s, 1H, arom CH-2), 7.57 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-3 Dansyl), 7.49 (s, 5H, arom S-Ph), 7.44 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.08 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, H-6 Dansyl), 4.31 (s, 2H, CH_2NH), 2.85 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$):

187.76 (COS), 157.28, 147.71, 139.48, 137.36, 134.81, 134.47, 131.73, 130.72, 130.06, 130.03, 129.47, 129.22, 128.74, 126.62, 126.03, 123.18, 121.04, 118.63, 115.52 (19* arom C), 45.34 (CH_2NH), 24.81 ($N(CH_3)_2$).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{26}H_{24}N_3O_5S_2$ [M+H] 522.1, gef.: 522.2

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 522.1157 [M+H]⁺
gef.: 522.1137 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-thio-benzoesäure-S-mercaptoethanolsulfonsäure-ester (95)

Zu einer Lösung von 50 mg (0.116 mmol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-nitro-benzoesäure **93c** in 2 ml Dimethoxyethan werden bei 0° C 24 mg (0.116 mmol) DCC und 13 mg (0.116 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 12 h gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und anschließend in 2 ml DMF gelöst und mit 41 mg (0.249 mmol) Mesna und 34 μ l Et_3N versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt mit Hilfe der präparativen HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel $CH_3CN + 0.1\%$ Ameisensäure/ $H_2O + 0.1\%$ Ameisensäure, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt.

Ausbeute: 48.0 mg (0.083 mmol, 72 %) eines gelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 188° C

R_f (HPLC): 5.25 min

1H -NMR (500 MHz, d-DMF):

$\delta = 8.57$ (s, 1H, arom CH-6), 8.45 (s, 1H, arom CH-4), 8.47 (s, 1H, arom CH-2), 8.26 (d, $^3J =$

8.3 Hz, 3H, H-2, H-4, H-8 Dansyl), 7.71 (t, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H-3 Dansyl), 7.66 (t, $^3J = 10.0$ Hz, 1H, H-7 Dansyl), 7.08 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, H-6 Dansyl), 4.62 (s, 2H, CH_2NH), 3.07 (m, 2H, SCH_2), 2.90 (m, 2H, SCH_2), 2.84 (s, 6H, $N(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (125 MHz, d-DMF):

$\delta = 173.03$ (SCO), 152.10, 147.66, 137.32, 136.81, 132.49, 130.09, 129.70, 129.54, 127.14, 123.80, 119.88, 119.61 (12 * arom CH), 115.85 (C-6 Dansyl), 48.43 (CH_2NH), 45.21 ($N(CH_3)_2$), 26.07 (SCH_2), 25.82 (SCH_2).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{22}H_{22}N_3O_8S_3$ [M-Na] 552.0, gef.: 552.4; ber. für $C_{44}H_{45}N_6O_{16}S_6$ [2M-2Na+H]⁻ 1105.1, gef.: 1105.1

Glycin-S-ethylthioester (97)

Zu einer Lösung von 5 g (28.5 mmol) Boc-Gly-OH in 100 ml Dichlormethan werden 4.36 g (28.5 mmol) HOBt, 4.41 ml DIC (28.5 mmol) und 5 ml DIPEA (28.5 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und mit 5 ml (67.5 mmol) Ethanthiol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wird mit 1N HCl, $NaHCO_3$ -Lösung und H_2O gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 ml 4M HCl-Dioxan-Lösung aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibene Rückstand wird in Ethylacetat und wenig Methanol aufgenommen. Nach der Zugabe von kaltem Diethylether wird der weiße Niederschlag abfiltriert.

Ausbeute: 2.5 g (21.2 mmol, 70 %) eines weißen Feststoffs

R_f -Wert: 0.1 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

1H -NMR (500 MHz, DMSO):

$\delta = 8.61$ (br s, 2H, NH_2), 3.99 (s, 2H, CH_2 Gly), 2.96-2.90 (q, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, SCH_2), 1.18 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO):

169.4 (CO), 47.6 (CH_2 Gly), 23.5 (SCH_2), 15.3 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten überein.^[215]

3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-amino-benzoesäure-(Glycin-S-ethylthioester)-amid (98)

Zu einer Lösung von 10 mg (0.025 mmol) 3-[Amino-(5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl)-methyl]-5-amino-benzoesäure **97** in 1 ml DMF werden 7.7 mg (0.05 mmol) HOBt, 19 mg (0.05 mmol) HBTU und 8.8 μ l Et₃N gegeben. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 6 mg (0.05 mmol) Glycin-S-ethylthioester **96** versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 und 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 16.3 mg (0.033 mol, 65 %) eines gelben Öls

R_f-Wert: 0.5 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))

Synthese von 98 an der festen Phase

Eine Suspension von 50 mg des beladenen Harzes **90** (0.05 mmol) in 2 ml Dichlormethan wird vorgelegt. Die Nitrogruppe wird nach AAV3 reduziert. Man spaltet nach AAV5 (Methode B) unter Verwendung von 10 Äquivalenten **96** (0.5 mmol, 250 mg) und 10 Äquivalenten DIPEA (0.5 mmol, 86 μ l) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 und 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt und das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 43 % (0.021 mmol, 10.8 mg) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.43 (d, ³J = 10.3 Hz, 1H, H-2 Dansyl), 8.21 (d, ³J = 11.5 Hz, 1H, H-4 Dansyl), 8.14 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H-8 Dansyl), 7.48 (t, ³J = 10.0 Hz, 1H, H-3, Dansyl), 7.43 (t, ³J = 10.5 Hz, 1H, H-3, Dansyl), 7.10 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H-6 Dansyl), 6.80 (s, 2H, arom CH-2), 6.72 (s, 2H, arom CH-6), 6.41 (s, 1H, arom CH-4), 6.30 (br s, 1H, NH), 4.17 (br s, 1H, NH), 3.91-3.87 (m, 2H, CH₂NH), 3.62-3.61 (m, 2H, CH₂ Gly), 3.41 (s, 2H, NH₂), 3.09-3.08 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.81 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.18 (s, 3H, CH₂CH₃).

ESI-MS + m/z: ber. für C₂₄H₂₈N₄O₄S₂ [M+H] 501.1, gef.: 501.4

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 501.1630 [M+H]⁺
gef.: 501.1644 (in 3-NBA-Matrix)

6.8. Versuche zu Kapitel 4.2.3.

6.8.1. Versuche zu Kapitel 4.2.3.2.

3-{Amino-[L-cystein-(S-monomethoxytrityl)-N-trityl]-methyl}-5-nitro-benzoesäure-(6-azido-hexyl)-amid (102)

Eine Suspension von 150 mg Fmoc-4-hydrazineobenzoyl NovaGelTM (0.56 mmol/g, 0.147 mmol) wird nach AAV1 mit Baustein **88** versetzt. Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV2 entfernt. Das Harz wird anschließend nach AAV4 (Methode A) mit 283.5 mg (0.441 mmol) Trt-Cys(Mmt)-OH, 68.3 mg (0.441 mmol) HOBT, 69.1 μ l (0.441 mmol) DIC und 66.0 μ l (0.441 mmol) Et₃N versetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode B) unter Verwendung von 4 Äquivalenten 6-Azido-hexylamin (0.588 mmol, 83.5 mg) in 3 ml THF von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 79.5 mg (0.085 mmol, 58 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt: 115-116° C
R_f-Wert: 0.60 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α]_D²⁰: +47.9 (*c* = 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.47 (s, 1H, arom CH-6), 8.15 (s, 1H, arom CH-4), 7.94 (s, 1H, arom CH-2), 7.35-7.10 (m, 27 H, 27 * arom CH Trt, Mmt), 6.45 (br s, 1H, NH), 4.14-4.11 (m, 2H, CH₂NH), 3.79-3.68 (m, 1H, α -CH Cys), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.34-3.22 (m, 6H, CH₂N₃, β -CH₂ Cys, CH₂NH), 2.33-2.22 (m, 2H, CH₂), 1.55 (t, ³J = 9.2 Hz, 2H, CH₂), 1.33-1.26 (m, 4H, 2 * CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 174.85 (CONH), 164.93 (CONH), 158.24, 148.45, 146.78, 144.93, 145.81, 144.61, 141.25, 136.39, 136.36, 131.92, 130.84, 129.43, 129.40, 129.19, 128.80, 128.73, 128.65, 128.50, 128.38, 128.13, 128.03, 128.00, 127.98, 127.90, 127.84, 127.82, 127.71, 127.55,

127.41, 127.26, 127.16, 127.08, 126.94, 126.85, 126.82, 124.75, 120.83, 113.28, 113.14 (39 * arom C), 71.47 (quart C Trt), 66.80 (quart C Mmt), 56.30 (OCH₃), 55.12 (α -CH Cys), 51.28 (CH₂NH), 42.35 (CH₂N₃), 40.14 (CH₂NH), 36.79 (β -CH₂ Cys), 28.66 (CH₂), 26.88 (CH₂), 26.41 (CH₂), 26.32 (CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₅₆H₅₅N₇O₅SNa [M+Na] 960.4, gef.: 960.3

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₅₆H₅₅N₇O₅S [M] 937.40, gef.: 704.1 [M-Mmt+H+K]

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 937.40 [M+H]⁺
gef.: 937.26 (in 3-NBA-Matrix)

3-(Cy5-aminomethyl)-5-(maleinimidocaproyl-amino)-benzoesäuremethylester (104)

Eine Suspension von 150 mg des beladenen Harzes **89** (0.56 mmol/g, 0.147 mmol) wird nach AAV3 umgesetzt. Das Harz wird anschließend nach AAV4 (Methode A) mit 93.0 mg (0.441 mmol) MIC, 68.3 mg (0.441 mmol) HOBt und 69.1 μ l (0.441 mmol) DIC versetzt. Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV2 entfernt. Das Harz wird nach AAV4 (Methode A) mit 576.8 mg (0.882 mmol) Cy5, 134.9 mg (0.882 mmol) HOBt, 330.8 mg (0.882 mmol) HBTU und 132.0 μ l (0.882 mmol) Et₃N versetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode B) von der festen Phase ab. Das Rohprodukt mit Hilfe präparativer HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel CH₃CN/H₂O, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt.

Ausbeute: 7.4 mg ($7.35 \cdot 10^{-5}$ mol, 5 %) eines blauen Feststoffs

R_f (HPLC): 5.97 min

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.32-8.26 (m, 2H, arom. CH Cy5), 8.05 (s, 1H, arom CH-6), 7.98-7.84 (m, 3H, H-4, 2 * arom CH Cy5), 7.67 (s, 1H, arom CH-2), 7.34-7.29 (dd, ³J₁ = 10.3 Hz, ³J₂ = 6.4 Hz, 2H, 2 * arom CH Cy5), 6.75 (s, 2H, HC=CH Mic), 6.67-6.60 (m, 1H, C=CH Cy5), 6.34-6.27 (t, ³J = 16.6 Hz, 2H, HC=CH Cy5), 4.38 (s, 2H, CH₂NH), 4.14-4.12 (m, 4H, ϵ -CH₂, N⁺=C-CH=, C_{quart}=CH Cy5), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.47 (t, ³J = 8.3 Hz, 2H, ϵ -CH₂ Mic), 2.35 (t, ³J = 8.5 Hz, 2H, α -CH₂ Cy5), 2.29 (t, ³J = 8.2 Hz, 2H, α -CH₂ Mic), 1.85-1.60 (m, 6H, β -CH₂, δ -CH₂ Mic, N-CH₂-CH₃ Cy5), 1.70 (s, 12H, 4 * CH₃ Cy5), 1.60 (t, ³J = 8.5 Hz, 2H, δ -CH₂ Cy5), 1.50 (m, 2H, γ -CH₂ Cy5), 1.37 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, γ -CH₂ Mic), 1.33-1.28 (m, 3H, NCH₂-CH₃ Cy5).

ESI-MS + m/z: ber. für $C_{52}H_{62}N_5O_{12}S^+$ $[M]^+$ 1012.4, gef.: 1012.4

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 1013.38 $[M+H]^+$
gef.: 1013.52 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-amino-benzoessäuremethylester (105)

Zu einer Lösung von 150 mg (0.484 mmol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-nitrobenzoessäuremethyl-ester **87** in 3 ml Methanol wird Palladium/Aktivkohle Hydrierkatalysator gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Wasserstoffatmosphäre 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Palladiumkatalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 122 mg (0.436 mol, 90 %) eines farblosen Öls

R_F-Wert: 0.51 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.29 (s, 1H, arom CH-2), 7.21 (s, 1H, arom CH-6), 6.77 (s, 1H, arom CH-4), 4.21 (m, 2H, CH₂NH), 3.84 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.78 (br s, 2H, NH₂), 2.91-2.85 (br s, 1H, NH), 1.43 (s, 9H, O^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 167.02 (CO₂Me), 155.88 (C-5), 146.48 (C-3), 140.47 (C-4), 131.28 (C-1), 118.56 (C-2), 114.92 (C-6), 52.10 (CO₂CH₃), 44.25 (CH₂NH), 28.49 (O^tBu).

C₁₄H₁₉N₂O₄ (280.15)

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 281.1501 $[M+H]^+$
gef.: 281.1482 (in 3-NBA-Matrix)

3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-(maleinimidocaproyl-amino)-benzoessäuremethylester (106)

Zu einer Lösung von 120.6 mg (0.571 mmol) Maleinimidocaproylsäure in 1 ml DMF werden 1.5 Äquivalente HOBt (131.1 mg, 0.857 mmol) und 1.5 Äquivalente DIC (132.7 µl, 0.857 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 80 mg (0.286 mmol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-amino-

benzoesäuremethylester **105a** in 1 ml Dichlormethan versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1, 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 91.2 mg (0.194 mol, 68 %) eines farblosen Öls

R_f-Wert: 0.17 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.10 (d, ³J = 10.0 Hz, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, arom CH-6), 7.91 (s, 1H, arom H-6), 7.78 (s, 1H, arom CH-4), 7.63 (s, 1H, arom CH-2), 6.66 (s, 2H, HC=CH), 5.28 (s, 1H, NH), 4.27 (s, 2H, CH₂NH), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.49 (t, ³J = 10.0 Hz, 2H, ε-CH₂), 2.35 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, α-CH₂), 2.29 (t, ³J = 9.3 Hz, 2H, β-CH₂), 1.60 (t, ³J = 9.3 Hz, 2H, δ-CH₂), 1.43 (s, 9H, O^tBu), 1.33 (t, ³J = 8.8 Hz, 2H, γ-CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 171.52 (CONH), 170.84 (CO₂Me), 166.57 (CONH), 162.81 (CONH), 156.02 (CO₂NH), 140.29 (C-5), 138.57 (C-3), 134.02 (C=C), 130.92 (C-4), 130.92 (C-1), 123.09 (C-2), 123.09 (C-4), 119.62 (C-6), 52.16 (CO₂CH₃), 44.25 (CH₂NH), 37.46 (ε-CH₂), 36.63 (α-CH₂), 31.56 (δ-CH₂), 28.44, 28.32, 28.13 (O^tBu), 26.12 (γ-CH₂), 24.72 (β-CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₂₄H₃₁N₃O₇ [M+Na] 496.2, gef.: 496.3 [M+Na]

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₁₃H₃₄N₄O₇SNa [M+Na] 496.2, gef.: 496.8 [M+Na]; ber. für C₁₃H₃₄N₄O₇SK [M+K] 512.2, gef.: 512.8 [M+K]

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 474.2240 [M+H]⁺
gef.: 474.2219 (in 3-NBA-Matrix)

Synthese von **104** in Lösung

Eine Lösung von 15 mg ($3.171 \cdot 10^{-5}$ mol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-(maleinimidocaproyl-amino)-benzoesäure-methylester **106** wird mit 1 ml 50 %-iger TFA/Dichlormethan-Lösung versetzt. Nach 5 Minuten wird das Lösungsmittel mit 2 ml Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet und anschließend in 1 ml DMF aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wird mit 27 mg ($4.123 \cdot 10^{-5}$ mol) Cy5, 25.2 mg ($1.65 \cdot 10^{-4}$ mol) HOBt, 29.3 µl DIC ($1.65 \cdot 10^{-4}$ mol) und 6.6 µl ($4.757 \cdot 10^{-5}$ mol) Et₃N

versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe präparativer HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel CH₃CN/H₂O, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt. Es werden 12 mg (1.186 * 10⁻⁵ mol, 37 %) Produkt **104** als blauer Feststoff erhalten.

3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-(6-azido-hexylamin)-benzoesäuremethylester (108)

Nach AAV3 werden 50 mg des beladenen Harzes **89** (0.05 mmol) umgesetzt. Das Harz wird anschließend nach AAV4 (Methode A) mit 7.8 mg (0.15 mmol) 6-Azido-hexyansäure, 15.3 mg (0.3 mmol) HOBt, 15.5 µl (0.3 mmol) DIC und 7 µl (0.3 mmol) Et₃N versetzt. Man spaltet nach AAV5 (Methode B) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 10 mg (0.022 mmol, 45 %) eines farblosen Öls

R_F-Wert: 0.44 (*c*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.09 (s, 1H, arom CH-6), 7.85 (br s, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, arom CH-4), 7.61 (s, 1H, arom CH-2), 5.20 (br s, 1H, NH), 4.23 (s, 2H, CH₂NH), 3.85 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.25 (t, ³J = 8.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.36 (t, ³J = 9.3 Hz, 2H, CH₂NCO), 1.74-1.70 (m, 2H, CH₂), 1.62-1.58 (m, 2H, CH₂), 1.44 (s, 9H, O^tBu), 1.38 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 171.50 (CONH), 166.55 (CO₂Me), 156.09 (CONH), 140.25 (C-3), 138.50 (C-5), 130.83 (C-1), 123.56 (C-2), 123.06 (C-4), 119.63 (C-6), 52.14 (CO₂CH₃), 51.15 (CH₂NH), 44.22 (CH₂N₃), 37.04 (CH₂NCO), 33.59 (CH₂), 28.47 (CH₂), 28.31 (O^tBu), 26.25 (CH₂), 26.83 (CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₂₀H₂₉N₅O₅Na [M+Na] 442.2, gef.: 442.2

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 420.2246 [M+Na]⁺
gef.: 420.2227 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-(6-azido-hexoyl-amino)-benzoesäuremethylester (110)

Eine Lösung von 50 mg (0.119 mmol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-(6-azido-hexoylamino)-benzoesäuremethylester **100** in 1 ml 50 %-iger TFA/Dichlormethan-Lösung wird 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 1ml Dichlormethan/DMF (1:1) aufgenommen und mit 154.1 mg (0.357 mmol) Fmoc-Cys(S^tBu)-OH, 72.8 mg (0.476 mmol) HOBt, 180 mg (0.476 mmol) HBTU und 83.1 μ l (0.476 mmol) DIPEA versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute:	60 mg (0.082 mmol, 69 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt:	90-91° C
R _f -Wert:	0.48 (<i>c</i> -Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))
[α] _D ²⁰ :	-17.7 (<i>c</i> = 1.0, CHCl ₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.04 (s, 1H, arom CH-6), 8.01 (s, 1H, arom CH-4), 7.71 (d, ³J = 9.2 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.60 (m, 3H, H-4, H-5 Fmoc, arom CH-2), 7.37-7.33 (m, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.26-7.23 (m, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 6.05 (br s, 1H, NH), 4.61 (m, 1H, H-9 Fmoc), 4.39-4.29 (m, 4H, H-10 Fmoc, CH₂NH), 4.14 (t, ³J = 8.6 Hz, 1H, α -CH Cys), 3.81 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.31 (m, 2H, β -CH₂ Cys), 3.22 (t, ³J = 8.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.30 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, α -CH₂), 1.71-1.64 (m, 2H, β -CH₂), 1.61-1.53 (m, 2H, δ -CH₂), 1.42-1.35 (m, 2H, γ -CH₂), 1.31 (s, 9H, S^tBu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 171.47 (CONH), 170.54 (CONH), 166.50 (CO₂CH₃), 143.60, 143.48, 141.18, 141.16, 138.72, 138.67, 130.90, 127.04, 125.00, 123.86, 122.89, 119.94, 119.86 (14 * arom C), 67.38 (OCH₂ Fmoc), 52.19 (α -CH Cys), 51.16 (CO₂CH₃), 48.40 (CH₂NH), 46.93 (CH₂N₃), 43.26 (β -CH₂ Cys), 42.30 (CH Fmoc), 37.01 (α -CH₂), 29.78 (S^tBu), 28.54 (δ -CH₂), 26.23 (γ -CH₂), 24.76 (β -CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₃₇H₄₅N₄O₆S₂ [M+H] 733.3, gef.: 733.1 [M+H], 755.2 [M+Na]

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₃₇H₄₄N₄O₆S₂Na [M+Na] 755.3, gef.: 755.1 [M+Na]

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 733.2842 $[M+H]^+$
gef.: 733.2858 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-(6-azido-hexoyl-amino)-benzoesäure (111)

Zu einer Lösung von 56 mg (0.119 mmol) 3-[Amino-(*tert*-butoxycarbonyl)-methyl]-5-(6-azido-hexoylamino)-benzoesäuremethylester **100** in 2 ml H₂O/Dioxan (1:1) werden langsam 1.5 Äquivalente 1N NaOH (178 μ l, 0.178 mmol) gegeben. Anschließend wird der pH-Wert der wässrigen Lösung mit 1N HCl auf pH = 2 eingestellt und das Reaktionsgemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und anschließend mit 1 ml 50%-iger TFA/Dichlormethan-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel mit 2 ml Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird anschließend in 2 ml Dichlormethan/DMF (1:1) aufgenommen und mit 3 Äquivalenten Fmoc-Cys(S^tBu)-OH (173.5 mg, 0.402 mmol) mit 4 Äquivalenten HOBt (82.0 mg, 0.536 mmol), 4 Äquivalenten HBTU (203.1 mg, 0.536 mmol) und 4 Äquivalenten DIPEA (93.6 μ l, 0.536 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1, 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 41 mg (0.057 mmol, 43 %) eines weißen Feststoffs
Schmelzpunkt: 92-93° C
R_f-Wert: 0.30 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))
[α]_D²⁰: -54.9 ($c = 1.0$, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

$\delta = 7.91$ (br s, 1H, NH), 7.73 (d, ³ $J = 9.6$ Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.69-7.63 (m, 3H, H-4, H-5 Fmoc, arom CH-6), 7.52 (m, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.39-7.30 (m, 4H, H-3, H-6 Fmoc, 2 * arom CH-4, CH-2), 4.49 (m, 1H, H-9 Fmoc), 4.39-4.29 (m, 4H, H-10 Fmoc, CH₂NH), 4.12 (m, 1H, α -CH Cys), 3.17 (t, ³ $J = 8.0$ Hz, 2H, CH₂N₃), 3.11-3.00 (m, 2H, β -CH₂ Cys), 2.26 (m, 2H, α -CH₂), 1.61 (m, 2H, β -CH₂), 1.51 (t, ³ $J = 8.8$ Hz, 2H, δ -CH₂), 1.33-1.28 (m, 2H, γ -CH₂), 1.24 (s, 9H, S^tBu).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3):

$\delta = 172.29$ (CONH), 143.54, 141.08, 140.71, 128.16, 127.58, 126.96, 126.51, 126.01, 124.96, 119.78, 117.12, 110.78 (12 * arom C), 66.34 (OCH_2 Fmoc), 51.07 (α -CH Cys), 48.09 (CH_2NH), 46.98 (CH_2N_3), 43. (β - CH_2 Cys), 42.64 (CH Fmoc), 36.71 (α - CH_2), 29.61 (S^tBu), 28.41(δ - CH_2), 26.15 (γ - CH_2), 24.82 (β - CH_2).

ESI-MS + m/z : ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$ [M+H] 719.3, gef.: 719.2, ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$ [M+Na] 741.3, gef.: 741.3

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 719.2675 [M+H]⁺
gef.: 719.2669 (in 3-NBA-Matrix)

Synthese von **110** und **111** an der festen Phase

Nach AAV2 werden 50 mg des beladenen Harzes **99** (0.05 mmol) umgesetzt. Das Harz wird nach AAV4 (Methode A) mit 126.2 mg (0.2 mmol) Fmoc-Cys(S^tBu)-OH, 30.6 mg (0.2 mmol) HOBt, 74.4 mg (0.2 mmol) HBTU und 34.5 μl (0.2 mmol) DIPEA versetzt. Man spaltet **110** nach AAV5 (Methode B) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v) als Eluens gereinigt. Das Produkt **110** wird mit einer Ausbeute von 40% (0.02 mmol, 14.6 mg) erhalten.

Außerdem spaltet man nach AAV5 (Methode B) unter Verwendung von 1 ml einer wäßrigen THF-Lösung (100 μl H_2O , 900 μl THF) von der festen Phase ab. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:2, 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Das Produkt **111** wird mit einer Ausbeute von 25% (0.012 mmol, 8.9 mg) erhalten.

1-N-Fluorenylmethoxy-2-N-(tert-butyloxy)-ethyl-1,2-diamin (113)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.625 mmol) **112** in 5 ml Dichlormethan/Methanol (1:1) werden bei 0°C 316.2 mg (0.938 mmol) Fmoc-OSu und 173.2 μl (1.25 mmol) Et_3N gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 1N NaHSO_4 -Lösung und NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Produkt ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Ausbeute: 186 mg (0.487 mmol, 78 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 158-159° C

R_f-Wert: 0.50 (Ethylacetat/cHexan 1:1 (v/v))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 7.76 (d, ³J = 9.5 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.58 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.40 (t, ³J = 9.5 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.31 (t, ³J = 9.0 Hz, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 4.40 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, OCH₂ Fmoc), 4.21 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, CH Fmoc), 3.27 (m, 4H, 2* NHCH₂), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 156.71 (CO₂NH), 143.90, 141.31, 127.76, 127.02, 119.94 (4* CH Fmoc), 66.68 (OCH₂ Fmoc), 47.26 (CH Fmoc), 41.60 (NCH₂), 40.56 (NCH₂), 28.35 (C(CH₃)₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₂₂H₂₆N₂O₄Na [M+Na] 405.2, gef.: 405.2

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₂₂H₂₆N₂O₄Na [M+Na] 405.2, gef.: 405.5

Hochaufgelöstes **FAB-MS** (m/z): ber.: 383.1893 [M+H]⁺
gef.: 383.1998 (in 3-NBA-Matrix)

1-N-Fluorenylmethoxy-2-N-(Cy5)-ethyl-1,2-diamin (114)

Eine Lösung von 43.5 mg (0.114 mmol) 1-N-Fluorenylmethoxy-2-N-(*tert*-butyloxy)-ethyl-1,2-diamin **113** in 50%-iger TFA/Dichlormethan-Lösung (500 µl TFA und 500 µl Dichlormethan) wird 10 min bei Raumtemperaturen gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol coevaporiert. Das verbleibene Rohprodukt wird in 2 ml DMF mit 50 mg (7.615 * 10⁻⁵ mol) Cy5, 8 Äquivalenten HOBt (93.2 mg, 0.5 mmol), 8 Äquivalenten DIC (94.4 µl, 0.610 mmol) und 4 Äquivalenten Et₃N (42.0 µl, 0.304 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe präparativer HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel CH₃CN/H₂O, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt.

Ausbeute: 20 mg (0.217 mmol, 29 %) eines blauen Feststoffs

R_f (HPLC): 6.21 min

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.30-8.23 (m, 2H, 2 * arom. CH), 7.97 (m, 4H, 4 * arom. CH), 7.74 (d, ³J = 9.1 Hz, 2H,

H-1, H-8 Fmoc), 7.60 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.36-7.26 (m, 4H, H-2, 3, 6, 9 Fmoc), 6.63 (m, 1H, C=CH), 6.28 (t, $^3J = 17.0$ Hz, 2H, HC=CH), 4.30 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, N⁺=C-CH=, C_{quart}=CH), 4.19-4.12 (m, 2H, H-10 Fmoc), 4.02 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, H-9 Fmoc), 3.28-3.20 (m, 6H, HN-CH₂-CH₂-NH, ε-CH₂), 2.18 (t, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, α-CH₂), 1.73 (m, 2H, δ-CH₂), 1.71 (s, 12H, 4 * CH₃), 1.65 (t, $^3J = 9.5$ Hz, 2H, δ-CH₂), 1.42-1.39 (m, 2H, γ-CH₂), 1.35 (t, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, NCH₂-CH₃).

ESI-MS + m/z: ber. für C₅₀H₅₇N₄O₉S₂ [M]⁺ 921.36, gef.: 921.7

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₅₀H₅₇N₄O₉S₂ [M]⁺ 921.36, gef.: 921.7; ber. für C₅₀H₅₇N₄O₉S₂Na [M+Na] 943.4, gef.: 943.7

Cy5-ethylamin (115)

Zu einer Lösung von 12 mg ($1.346 \cdot 10^{-5}$ mol) 1-N-Fluorenylmethoxy-2-N-(Cy5)-ethyl-1,2-diamin **114** in 700 µl DMF werden bei 0° C 300 µl Piperidin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mit Hilfe präparativer HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel CH₃CN/H₂O, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt.

Ausbeute: 8 mg ($1.144 \cdot 10^{-5}$ mol, 85 %) eines blauen Feststoffs

R_f (HPLC): 5.39 min

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.29-8.27 (m, 2H, 2 * arom. CH), 7.89-7.85 (m, 4H, 4 * arom. CH), 7.33 (t, $^3J = 12.5$ Hz, 1H, NH), 6.69 (t, $^3J = 15.1$ Hz, 1H, C=CH), 6.34 (t, $^3J = 18.8$ Hz, 2H, HC=CH), 4.58 (br s, 1H, NH), 4.18-4.14 (m, 2H, N⁺=C-CH=, C_{quart}=CH), 3.35 (m, 4H, HN-CH₂-CH₂-NH), 2.90 (m, 2H, ε-CH₂), 2.21 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, α-CH₂), 1.83 (m, 2H, δ-CH₂), 1.73 (s, 12H, 4 * CH₃), 1.65 (t, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, β-CH₂), 1.39-1.36 (m, 5H, NCH₂-CH₃, γ-CH₂).

ESI-MS + m/z: ber. für C₃₅H₄₇N₄O₇S₂ [M]⁺ 699.3, gef.: 699.7

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₃₅H₄₇N₄O₇S₂ [M]⁺ 699.3, gef.: 699.7; ber. für C₃₅H₄₇N₄O₇S₂Na [M+Na] 721.3, gef.: 721.6

FAB/LR-MS (m/z): ber.: 700.29 [M+H]⁺
gef.: 700.07 (in 3-NBA-Matrix)

3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-(6-azido-hexoyl-amino)-benzoesäure-(Cy5-ethyl)-amid (116)

Zu einer Lösung von 8.2 mg ($1.15 \cdot 10^{-5}$ mol) 3-{Amino-[L-cystein-(S-tert-butyl)-N-fluorenylmethoxyl]-methyl}-5-(6-azido-hexoyl-amino)-benzoesäure **111** 1 ml DMF werden 8 mg ($1.15 \cdot 10^{-5}$ mol) Cy5-ethylamin **115**, 7.0 mg HOBt ($4.58 \cdot 10^{-5}$ mol), 17.4 mg ($4.58 \cdot 10^{-5}$ mol) HBTU und 4 μ l ($2.29 \cdot 10^{-5}$ mol) DIPEA gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das verbleibende Rohprodukt mit Hilfe präparativer HPLC (Macherey-Nagel VP 125/21 Nucleosil 120-7 C4 Säule; Lösungsmittel CH₃CN/H₂O, Gradient: 0 min: 20/80, 8 min: 40/60, 10 min: 100/0; Flussrate: 20 ml/min; Detektion bei 210 nm) aufgereinigt.

Ausbeute: 7.2 mg ($5.18 \cdot 10^{-6}$ mol, 45 %) eines blauen Feststoffs

R_f (HPLC): 7.03 min

[α]_D²⁰: +32.6 (c = 0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 8.97 (s, 1H, arom CH-4), 8.29-8.27 (m, 2H, 2 * arom. CH Cy5), 7.87 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.82 (d, ³J = 10.4 Hz, 1H, NH), 7.75 (d, ³J = 9.3 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.65-7.60 (m, 4H, 4 * arom. CH Cy5), 7.42 (s, 1H arom. CH-2), 7.34-7.20 (m, 5H, H-2, H-3, H-6, H-7 Fmoc, arom CH-6), 6.63 (t, ³J = 15.4 Hz, 1H, C=CH Cy5), 6.27 (t, ³J = 21.0 Hz, 2H, HC=CH Cy5), 4.46-4.43 (m, 3H, H-9, H-10 Fmoc), 4.22 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, α -CH Cys), 4.13-4.10 (m, 2H, CH₂NH), 3.26-3.19 (m, 12H, β -CH₂ Cys, N⁺=C-CH= Cy5, C_{quart}=CH Cy5, HN-CH₂-CH₂-NH, ϵ -CH₂ Cy5, CH₂N₃), 2.31-2.27 (m, 2H, δ -CH₂ Cy5), 2.17 (t, ³J = 19.5 Hz, 2H, α -CH₂ Cy5), 1.70 (s, 12H, 4 * CH₃ Cy5), 1.67-1.59 (m, 6H, β -CH₂ Cy5, 2*CH₂), 1.40-1.28 (m, 9H, NCH₂-CH₃ Cy5, γ -CH₂ Cy5, 2*CH₂), 1.32 (s, 9H, S^tBu).

ESI-MS + m/z: ber. für C₇₁H₈₇N₁₀O₁₂S₄ [M]⁺ 1399.5, gef.: 1399.5 [M]⁺

MALDI-TOF (DHB) ber. für C₇₁H₈₇N₁₀O₁₂S₄ [M]⁺ 1399.5, gef.: 1399.3 [M]⁺

6.8.2. Allgemeine Vorschrift für die *Expressed Protein Ligation* der Bausteine mit verkürzten Ypt/Rab-Proteinen

Die synthetisierten Bausteine konnten nach einem allgemeinen Verfahren für die *in vitro* Protein Ligation in die Rab/Ypt-Proteine eingeführt werden:

Bei der Ligationsreaktion werden die Baustein-Lösungen (20-40 mM, in H₂O/Acetonitril (maximal 10% Acetonitril)) mit den Protein-Lösungen (10-30 mg/ml) in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.5, 0.1 mM MgCl₂, 2 M GDP und 100 mM 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Die Bausteine werden dabei jeweils mit einem Überschuss von 5-10 Äquivalenten eingesetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (1 min 13000 rpm), um ausgefallenes Protein und Peptid zu beseitigen.

Die synthetisierten MIC-modifizierten Bausteine konnten nach einem allgemeinen Verfahren für die MIC- Ligation in die N-Ras-Proteine eingeführt werden:

Bei der MIC-Ligationsreaktion werden die Baustein-Lösungen (20-40 mM, in H₂O/Acetonitril (maximal 10% Acetonitril)) mit den N-Ras-Protein-Lösungen (25-50 mg/ml) in 50 mM TRIS-Puffer pH 7.0, 0.1 mM MgCl₂, 1 M NaCl und 2 M GDP versetzt. Bildet sich bei der Zugabe der Baustein-Lösung zur Proteinlösung ein Niederschlag, so wird dieser durch die Zugabe von 2 vol% TritonX-100 gelöst. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Für einen Ligationsansatz werden jeweils 5-10 mg N-Ras-Protein und die Bausteine mit einem geringen Überschuss von 1.2 Äquivalenten eingesetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (1 min, 13000 rpm), um ausgefallenes Protein und Peptid zu beseitigen.

Der Ligationsansatz wird anschließend auf eine Niederdruck-DEAE-Gelfiltrationssäule (FPLC-System) aufgetragen und mit 20 mM TRIS/HCl, pH 7.4 und 5 mM MgCl₂ mit einem linearen Gradienten eluiert. Die Lösung des semisynthetischen Proteins wird anschließend auf eine Konzentration von 20-40 g/l gebracht.

Aufnahme von MALDI-TOF-Massenspektren der Protein-Lösungen:

Vor den Messungen der Proteine werden diese über Dyex-Säulen entsalzt. Für die Messungen wird eine Matrixlösung aus 10 mg 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure (Sinapinsäure) in 1 ml 0.1%-iger wässriger TFA/Acetonitril 1:1 (v/v) verwendet. Dabei wurden 1 µl Matrixlösung

und 1 μl Probenlösung gemischt. Die Messungen erfolgten im positiven linearen Modus (Beschleunigungsspannung: 25 000 V; Gitterspannung 93%; *extraction delay time* 750 ns).

6.8.3. Versuche zu Kapitel 4.2.3.4.

Das Spotten der Protein-Lösungen (1-500 μM) in Phosphatpuffer (50 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , pH = 7.5) auf den Phosphin-funktionalisierten Glaträgern wurde bei der Firma Chimera Biotec durchgeführt. Die Glaträger wurden für 12 h mit den Protein-Lösungen inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit Phosphatpuffer (50 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0.05 vol% Tween-20) jeweils 30 Minuten gewaschen. Zum Blocken der überschüssigen Phosphinreste wurden die Glasplatten im Anschluss mit BSA-Blocking-Puffer der Firma Chimera Biotec für 30 Minuten versetzt und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die *Target-Blocks* (3 oder 5 pro Glaträger) mit den folgenden Protein-Lösungen für 45 Minuten unter leichtem Schütteln versetzt:

1. Zum Nachweis des nicht fluoreszenzmarkierten Ras-Protein auf der Oberfläche wurde ein *Target-Block* mit Ras-Antikörper in 50nM TETBS (Tween, EDTA, Tris-Puffer) inkubiert.
2. Ein weiterer *Target-Block* wurde mit TETBS versetzt.
3. Zum Nachweis des aktiven, GTP-bindenden Ras-Proteins auf der Oberfläche wurde ein *Target-Block* mit Cy5-markierter RBD (*Ras binding domain*) versehen, die von Dr. C. Becker am dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zur Verfügung gestellt wurde.

Der Nukleotid-Austausch des GDP-gebundenen, semisynthetischen N-Ras-Protein zum GTP-gebundenen Protein wurde unter Verwendung von GppNHp, einem GTP-Hydrolyse beständigen GTP-Analogon, von Christine Novack im Arbeitskreis von Dr. J. Kuhlmann am dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Bos, J. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1333*, 19-31.
- [2] Mackay, D. J. G.; Hall, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20685-20688.
- [3] Bock, J. B.; Matern, H. T.; Peden, A. A.; Scheller, R. H. *Nature* **2001**, *409*, 839-841.
- [4] Moore, M. S. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22857-22860.
- [5] Resh, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16.
- [6] Dunphy, J. T.; Linder, M. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245-261.
- [7] Zhang, F. L.; Casey, P. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241-269.
- [8] Magee, A. I.; Guitierrez, L.; McKay, I. A.; Marshall, C. J.; Hall, A. *EMBO J.* **1987**, *6*, 3353-3357.
- [9] Duncan, J. A.; Gilman, A. G. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23594-23600.
- [10] Epstein, W. W.; Lever, D.; Leining, L. M.; Bruenger, E.; Rilling, H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9668-9670.
- [11] Meresse, S.; Gorvel, J.; Chavier, P. J. *Cell Sci.* **1995**, *108*, 3349-3358.
- [12] Wolda, S. L.; Glomset, J. A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5997-6000.
- [13] Fujiyama, A.; Matsumoto, K.; Tamanoi, F. *EMBO J.* **1987**, *6*, 223-228.
- [14] Farnsworth, C. C.; Seabra, M. C.; Ericsson, L. H.; Gelb, M. H.; Glomset, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11963-11967.
- [15] Smeland, T. E.; Seabra, M. C.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10712-10716.
- [16] Glomset, J. A.; Gelb, M. H.; Farnsworth, C. C. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 139-142.
- [17] Shahinian, S.; Silviu, J. R. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813-3822.
- [18] Gutierrez, L.; Magee, A. I. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1078*, 147-154.
- [19] Liu, L.; Dudler, T.; Gelb, M. H. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23269-23276.
- [20] Sinensky, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1484*, 93-106.
- [21] Kuroda, Y.; Suzuki, N.; Kataoka, T. *Science* **1993**, *259*, 683-686.
- [22] Buo, Z.; Diaz, B.; Marshall, M. S.; Avruch, J. *J. Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 46-53.
- [23] Araki, S.; Kaibuchi, K.; Sasaki, T.; Hata, Y.; Takai, Y. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 1438-1447.
- [24] Fukui, K.; Sasaki, T.; Imazumi, K.; Matsuura, Y.; Nakanishi, H.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4655-4658.

- [25] Wada, M.; Nakanishi, H.; Satoh, A.; Hirano, H.; Obaishi, H.; Matsuura, Y.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3875-3878.
- [26] Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 153-208.
- [27] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **1995**, S. 870-882.
- [28] Schalk, I.; Zeng, K.; Wu, S.; Stura, E.; Matteson, J.; Huang, M.; Tandon, A.; Wilson, I.; Balch, W. *Nature* **1996**, *381*, 42-48.
- [29] Kishida, S.; Shirataki, H.; Sasaki, T.; Kato, M.; Kaibuchi, K.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22259-22261.
- [30] Bernards, A. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* **2003**, *1603*, 47-82.
- [31] Sasaki, T.; Kikuchi, A.; Araki, S.; Hata, Y.; Isomura, M.; Kuroda, S.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2333-2337.
- [32] Araki, S.; Kikuchi, A.; Hata, Y.; Isomura, M.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13007-13015.
- [33] Soldati, T.; Shapiro, A. D.; Svejstrup, A. B. D.; Pfeffer, S. R. *Nature* **1994**, *369*, 76-78.
- [34] Ullrich, O.; Horiuchi, H.; Bucci, C.; Zerial, M. *Nature* **1994**, *368*, 157-160.
- [35] Levitzky, A. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1-13.
- [36] Schirmmüller, F.; Simon, I.; Pfeffer, S. R. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22161-22164.
- [37] Pereira-Leal, J. B.; Seabra, M. C. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 889-901.
- [38] Segev, N. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 500-511.
- [39] Seabra, M. C.; Mules, E. H.; Hume, A. N. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 23-30.
- [40] Gonzales, L.; Scheller, R. H. *Cell* **1999**, *96*, 755-758.
- [41] Wu, S.-K.; Luang, P.; Matteson, J.; Zeng, K.; Nishimura, N.; Balch, W. E. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26931-26938.
- [42] Bourne, H. R.; Sanders, A. D.; McCormick, F. *Nature* **1990**, *348*, 125-132.
- [43] Macara, I. G.; Lounsbury, K. M.; Richards, S. A.; McKiernan, C.; Bar-Sagi, D. *FASEB J.* **1996**, *10*, 625-630.
- [44] Pfeffer, S. R.; Dirac-Svejstrup, A. B.; Soldati, T. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17057-17059.
- [45] Guo, W.; Sacher, M.; Barrowman, J.; Ferro-Novick, S.; Novick, P. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 251-255.
- [46] Andres, D.; Seabra, M.; Brown, M.; Armstrong, S.; Smeland, T.; Cremers, F.; Goldstein, J. *Cell* **1993**, *73*, 1091-1099.
- [47] Dirac-Svejstrup, A. B.; Sumizawa, T.; Pfeffer, S. *EMBO J.* **1997**, *16*, 465-472.

- [48] Echard, A.; Jollivet, F.; Martinez, O.; Lacapère, J.; Rousselet, A.; Janoueix-Lerosey, I.; Goud, B. *Science* **1998**, *279*, 580-585.
- [49] Strom, M.; Vollmer, P.; Tan, T. J.; Gallwitz, D. *Nature* **1993**, *361*, 736-739.
- [50] Jones, S.; Newman, C.; Liu, F. L.; Segev, N. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 4403-4411.
- [51] Wurmser, A. E.; Sato, T. K.; Emr, S. D. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 551-562.
- [52] Horiuchi, H.; Lippe, R.; McBride, H. M.; Rubino, M.; Woodman, P.; Stenmark, H., Rybin, V.; Wilm, M.; Ashman, K.; Mann, M.; Zerial, M. *Cell* **1997**, *90*, 1149-1159.
- [53] Zerial, M.; McBride, H. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107-117.
- [54] Kishida, S.; Shirataki, H.; Sasaki, T.; Kato, M.; Kaibuchi, K.; Takai, Y. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22259-22261.
- [55] Guo, W.; Roth, D.; Walch-Solimena, C.; Novick, P. *Embo J.* **1999**, *18*, 1071-1080.
- [56] Sacher, M.; Jiang, Y.; Barrowman, J.; Scarpa, A.; Burston, J.; Zhang, L.; Schieltz, D.; Yates, J. R.; Abeliovich, H.; Ferro-Novick, S. *Embo J.* **1998**, *17*, 2494-2503.
- [57] Cao, X. C.; Ballew, N.; Barlowe, C. *Embo J.* **1998**, *17*, 2156-2165.
- [58] Ungermann, C.; Sato, K.; Wickner, W. *Nature* **1998**, *396*, 543-548.
- [59] Smythe, E. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 205-206.
- [60] Mayer, A.; Wickner, W.; Haas, A. *Cell* **1996**, *85*, 83-94.
- [61] McNew, J. A.; Parlati, F.; Fukuda, R.; Johnston, R. J.; Paz, K.; Paumet, F.; Sollner, T. H.; Rothman, J. E. *Nature* **2000**, *407*, 153-159.
- [62] Sollner, T.; Bennett, M. K.; Whiteheart, S. W.; Scheller, R. H.; Rothman, J. E. *Cell* **1993**, *75*, 409-418.
- [63] McNew, J. A.; Weber, T.; Parlati, F.; Johnston, R. J.; Melia, T. J.; Sollner, T. H.; Rothman, J. E. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 105-117.
- [64] Mayer, A.; Wickner, W.; Haas, A. *Cell* **1996**, *85*, 83-94.
- [65] Chavrier, P.; Gorvel, J.-P.; Stelzer, E.; Simons, K.; Gruenberg, J.; Zerial, M. *Nature* **1991**, *353*, 769-772.
- [66] Shen, F.; Seabra, M. C. *J. Biol. Chem.* **1995**, *271*, 3692-3698.
- [67] Alexandrov, K.; Horiuchi, H.; Streele-Mortimer, O.; Seabra, M. C.; Zerial, M. *EMBO J.* **1994**, *13*, 5262-5273.
- [68] Seabra, M. C.; Goldstein, J. L.; Sudhof, T. C.; Brown, M. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14497-14503.
- [69] Zhang, H.; Seabra, M. C.; Deisenhofer, J. *Struct. Fold. Des.* **2000**, *8*, 241-251.
- [70] Seabra, M. C.; Brown, M. S.; Slaughter, C. A.; Sudhof, T. C.; Goldstein, J. L. *Cell* **1992**, *70*, 1049-1057.

- [71] Alexandrov, K.; Simon, I.; Iakovenko, A.; Holz, B.; Goody, R. S.; Scheidig, A. J. *FEBS Lett.* **1998**, *425*, 460-464.
- [72] Alexandrov, K.; Simon, I.; Yurchenko, V.; Iakovenko, A.; Rostkova, E.; Scheidig, A. J.; Goody, R. S. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 160-170.
- [73] Anant, J. S.; Desnoyers, L.; Machius, M.; Demeler, B.; Hansen, J. C.; Westover, K. D.; Deisenhofer, J.; Seabra, M. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12559-12568.
- [74] Casey, P. J.; Seabra, M. C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5189-5192.
- [75] Thoma, N. H.; Niculae, A.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48631-48636.
- [76] Gelb, M. H.; Scholten, J. D.; Seboldt-Leopold, J. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 40-48.
- [77] Alexandrov, K.; Horiuchi, H.; Steelemortimer, O.; Seabra, M. C.; Zerial, M. *Embo J.* **1994**, *13*, 5262-5273.
- [78] Thomä, N. H.; Iakovenko, A.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48637-48643.
- [79] Desnoyers, L.; Seabra, M. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12266-12270.
- [80] Gomes, A. Q.; Ali, B. R.; Ramalho, J. S.; Godfrey, R. F.; Barral, D. C.; Hume, A. N.; Seabra, M. C. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 1882-1899.
- [81] Calero, M.; Chen, C. Z.; Zhu, W. Y.; Winand, N.; Havas, K. A.; Gilbert, P. M.; Burd, C. G.; Collins, R. N. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 1852-1867.
- [82] Overmeyer, J. H.; Wilson, A. L.; Maltese, W. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20379-20386.
- [83] Pylypenko, O.; Rak, A.; Reents, R.; Niculae, A.; Sidorovitch, V.; Vioaca, M. D.; Bessolitsyna, E.; Thoma, N. H.; Waldmann, H.; Schlichting, I.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 483-494.
- [84] Fujimura, K.; Tanaka, K.; Nakano, A.; Tohe, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 9205-9212.
- [85] Garrett, M. D.; Zahner, J. E.; Cheney, C. M.; Novick, P. J. *Embo J.* **1994**, *13*, 1718-1728.
- [86] Valencia, A.; Chardin, P.; Wittinghofer, A.; Sander, C. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4637-4648.
- [87] Dumas, J. J.; Zhu, Z. Y.; Connolly, J. L.; Lambright, D. G. *Struct. Fold. Des.* **1999**, *7*, 413-423.
- [88] Sprang, S. R. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 639-678.
- [89] Schlichting, I.; Almo, S. C.; Rapp, G.; Wilson, K.; Petratos, K.; Lentfer, A.;

- Wittinghofer, A.; Kabsch, W.; Pai, E. F.; Petsko, G. A.; Goody, R. S. *Nature* **1990**, *345*, 309-315.
- [90] Milburn, M. V.; Tong, L.; Devos, A. M.; Brunger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S. H. *Science* **1990**, *247*, 939-945.
- [91] Stroupe, C.; Brunger, A. T. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 585-598.
- [92] Constantinescu, A. T.; Rak, A.; Alexandrov, K.; Esters, H.; Goody, R. S.; Scheldig, A. *J. Structure* **2002**, *10*, 569-579.
- [93] Pasqualato, S.; Senic-Matuglia, F.; Renault, L.; Goud, B.; Salamero, J.; Cherfils, J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11480-11488.
- [94] Brennwald, P.; Novick, P. *Nature* **1993**, *362*, 560-563.
- [95] Dunn, B.; Stearns, T.; Botstein, D. *Nature* **1993**, *362*, 563-565.
- [96] Chavrier, P.; Gorvel, J. P.; Stelzer, E.; Simons, K.; Gruenberg, J.; Zerial, M. *Nature* **1991**, *353*, 769-772.
- [97] Stenmark, H.; Valencia, A.; Martinez, O.; Ullrich, O.; Goud, B.; Zerial, M. *Embo J.* **1994**, *13*, 575-583.
- [98] Chattopadhyay, D.; Langsley, G.; Carson, M.; Recacha, R.; DeLucas, L.; Smith, C. *Acta Cryst. Sec. D-Biol. Crystall.* **2000**, *56*, 937-944.
- [99] Rak, A.; Pylypenko, O.; Niculae, A.; Pyatkov, K.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Cell* **2004**, *117*, 749-760.
- [100] Ostermeier, C.; Brunger, A. T. *Cell*, **1999**, *96*, 363-374.
- [101] Zhu, G.; Zhai, P.; Liu, J.; Terzyan, S.; Li, G.; Zhang, X. C. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 975-983.
- [102] Cremers, F. P. M.; Armstrong, S. A.; Seabra, M. C.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2111-2117.
- [103] Rak, A.; Fedorov, R.; Alexandrov, K.; Albert, S.; Gallwitz, D.; Scheidig, A. *J. EMBO* **2000**, *19*, 5105-5113.
- [104] Iakovenko, A.; Merzliak, K.; Raskova, E.; Goody, R. S.; Thomae, N. H.; Alexandrov, K. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 155-158.
- [105] Rak, A.; Niculae, A.; Kalinin, A.; Thomae, N. H.; Sidarovitch, V.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Protein-Expression and Purification* **2002**, *25*, 23-30.
- [106] Dursina, B.; Thomae, N. H.; Niculae, A.; Iakovenko, A.; Rak, A.; Albert, S.; Clacareance, A. C.; Hermann, C.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Biochem.* **2002**, *41*, 6805-6816.
- [107] Rak, A.; Polypenko, O.; Niculae, A.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *J. Struct. Biol.*

- 2003**, 141, 93-95.
- [108] Hofmann, R. M.; Muir, T. W. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, 13, 297-303.
- [109] Blaschke, U. K.; Silberstein, J.; Muir, T.W. *Methods Enzymol.* **2000**, 328, 478-496.
- [110] Tolbert, T. J.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5421-5428.
- [111] Tam, J. P. ; Xu, J. X.; Eom, K.D. *Biopolymers* **2001**, 60, 194-205.
- [112] Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 665-671.
- [113] Zerial, M.; McBride, H. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 107-117.
- [114] Chavrier, P.; Goud, B. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, 11, 466-475.
- [115] Novick, P.; Zerial, M. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9, 496-504.
- [116] Kadereit, D.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *ChemBioChem* **2000**, 1, 144-169.
- [117] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 21.
- [118] Gutte, B.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 501.
- [119] Denkwalter, R. G.; Weber, D. F.; Holly, F. W.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 502.
- [120] Wieland, T.; Schafer, W. *Angew. Chem.* **1951**, 63, 146.
- [121] Blake, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, 17, 273.
- [122] Yamashiro, D.; Li, C. H. *J. Pept. Protein Res.* **1988**, 31, 322.
- [123] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [124] Tam, J. P.; Yu, Q.; Miao, Z. *Biopolymers* **1999**, 51, 311-332.
- [125] Kemp, D. S. *Biopolymers* **1981**, 20, 1793-1804.
- [126] Chong, S.; Mersha, F. B.; Comb, D. G.; Scott, M. E.; Landry, D.; Vence, L. M.; Perler, F. B.; Benner, J.; Ducera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; Xu, M.-Q. *Gene* **1997**, 192, 271-281.
- [127] Kane, P. M.; Yamashiro, C. T.; Wolczyk, D. F.; Neff, N.; Goebel, M.; Stevens, T. H. *Science* **1990**, 250, 651-657.
- [128] Hirata, R.; Nakano, A.; Kawasaki, H.; Suzuki, K.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 6726-6733.
- [129] Paulus, H. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 375-386.
- [130] Kawasaki, M.; Satow, Y.; Ohya, Y.; Anraku, Y. *FEBS Lett.* **1997**, 412, 518-520.
- [131] Xu, M. Q.; Southworth, M. W.; Mersha, F. B.; Hornstra, L. J.; Perler, F. B. *Cell* **1993**, 75, 1371-1377.
- [132] Chong, S. R.; Williams, K. S.; Wotkowicz, C.; Xu, M. Q. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10567-10577.

- [133] Chong, S. R.; Montello, G. E.; Zhang, A. H.; Cantor, E. J.; Liao, W.; Xu, M. Q.; Benner, J. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5109-5115.
- [134] Telenti, A.; Southworth, M.; Alcaide, F.; Daugelat, S.; Jacobs, W. R.; Perler, F. B. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6378-6382.
- [135] Cooper, A. A.; Chen, Y. J.; Lindorfer, M. A.; Stevens, T. H. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2575-2583.
- [136] Davis, E. O.; Jenner, P. J.; Brooks, P. C.; Colston, M. J.; Sedgwick, S. G. *Cell* **1992**, *71*, 201-210.
- [137] Nogami, S.; Satow, Y.; Ohya, Y.; Anraku, Y. *Genetics* **1997**, *147*, 73-85.
- [138] Kawasaki, M.; Nogami, S.; Satow, Y.; Ohya, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15668-15674.
- [139] Southworth, M. W.; Amaya, K.; Evans, T. C.; Xu, M. Q.; Perler, F. B. *BioTechniques* **1999**, *27*, 110.
- [140] Xu, M-Q.; Evans Jr., T. C. *Methods* **2001**, *24*, 257-277.
- [141] <http://www.neb.com/neb/products/pfp/6900.html>.
- [142] Cotton, G. J.; Muir, T. W. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R247-R256.
- [143] Perler, F. B.; Benner, J.; Ducera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; Xu, M.-Q. *Gene* **1997**, *192*, 271-281.
- [144] Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705-6710.
- [145] Muir, T. W. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249-289.
- [146] Cotton, G. J.; Ayers, B.; Xu, R.; Muir, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1100-1101.
- [147] Cotton, G. J.; Muir, T. W. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 253-261.
- [148] Tam, J. P.; Yu, Q. T. *Biopolymers* **1998**, *46*, 319.
- [149] Gieselman, M. D.; Zhu, Y. T.; Zhou, H.; Galonic, D.; Van der Donk, W. A. *Chembiochem* **2002**, *3*, 709.
- [150] Hondal, R. J.; Nilsson, B. J.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5140.
- [151] Tam, J. P.; Yu, Q. T.; Yang, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2487.
- [152] Roelfes, G.; Hilvert, D. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2377.
- [153] Roy, R. S.; Allen, O.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 789.
- [154] Zhang, L. S.; Tam, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3.
- [155] Low, D. W.; Hill, M. G.; Carrasco, M. R.; Kent, S. B. H.; Botti, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554-6559.
- [156] Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [157] Machova, Z.; Von Eggelkraut-Gottanka, R.; Wehofsky, N.; Bordusa, F.; Beck-

- Sickinger, A. G. *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 4916.
- [158] Page, M. J.; Hall, A.; Rhodes, S.; Skinner, R. H.; Murphy, V.; Sydenham, M.; Lowe, P. N. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19147-19154.
- [159] Dudler, T.; Gelb, M. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12434-12441.
- [160] McGeady, P.; Kuroda, S.; Shimizu, K.; Takai, Y.; Gelb, M. H. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26347-26351.
- [161] Owen, D. J.; Alexandrov, K.; Rostkova, E.; Scheidig, A. J.; Goody, R. S.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 509-512.
- [162] Thoma, N. H.; Iakovenko, A.; Owen, D.; Scheidig, A. S.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12043-12052.
- [163] Bader, B.; Kuhn, K.; Owen, D. J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J. *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [164] Kuhlmann, J.; Tebbe, A.; Volkert, M.; Wagner, M.; Uwai, K.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2546.
- [165] Ayers, B.; Blaschke, U. K.; Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Holford, M.; Muir, T. W. *Biopolymers* **2000**, *51*, 343-354.
- [166] Evans Jr., T. C.; Benner, J.; Xu, M.-Q. *Protein Sci.* **1998**, 2256-2264.
- [167] Evans Jr., T. C.; Benner, J.; Xu, M.-Q. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18359-18363.
- [168] Koppitz, M.; Spellig, T.; Kahmann, R.; Kessler, H. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *48*, 377-390.
- [169] Stöber, P.; Schelhaas, M.; Nägele, E.; Hagenbuch, P.; Rétey, J.; Waldmann, H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75-83.
- [170] Atherton, E.; Hardy, P. M.; Harris, D. E.; Matthews, B. H. *Peptides* **1990**, 243-244.
- [171] Xue, C.-B.; Ewenson, A.; Becker, J. M.; Naider, F. R. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *36*, 362-373.
- [172] Ludolph, B.; Eisele, F.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954-5955.
- [173] Bader, B. *Dissertation*, Universität Marburg **2000**.
- [174] Jones, J. *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, *Oxford Chemistry Primers*, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **1995**.
- [175] Van Tamelen, E. E.; Nadea, R. G. *Bioorg. Chemistry* **1982**, *11*, 219-249.
- [176] Klinger, S.; Demuth, M. *Synlett* **1984**, *11*, 783-784.
- [177] Kuhn, K.; Owen, D. J.; Bader, B.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023-1035.
- [178] Kadereit, D.; Deck, P.; Heinemann, I.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1184-

- 1193.
- [179] Eisele, F. *Dissertation*, Universität Dortmund **2000**.
- [180] Radetich, B.; Corey, E. J. *Org. Letters* **2002**, *4*, 3463-3464.
- [181] Radetich, B.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2430-2431.
- [182] Bouzbouz, S.; Kirschleger, B. *Synlett* **1994**, 763-764.
- [183] Klinge, S.; Demuth, M. *Synlett* **1993**, 783-784.
- [184] Corey, E. J.; Shieh, W.-C. *Tet. Lett.* **1992**, *33*, 6435-6438.
- [185] Trost, B. M.; Weber, L.; Strege, P.; Fullerton, T. J.; Dietsche, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3426-3435.
- [186] Coates, R. M.; Ley, D. A.; Cavender, P. L. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4915-4922.
- [187] Altman, L. J.; Ash, S.; Marson, S. *Synthesis* **1974**, 129-131.
- [188] Van Tamelen, E. E.; Nadeau, R. G. *Bioorg. Chem.* **1982**, *11*, 197-218.
- [189] Xie, H.; Shao, Y.; Becker, J. M.; Naider, F.; Gibbs, R. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8552-8563.
- [190] Brown, M. J.; Milano, D.; Lever, D. C.; Epstein, W. W.; Poulter, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176-3177.
- [191] Davisson, V. J.; Woodside, A. B.; Neal, T. R.; Stremmer, K. E.; Muehlbacher, M.; Poulter, C. D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4768-4779.
- [192] Schelhaas, M.; Nägele, E.; Kuder, N.; Bader, B.; Kuhlmann, J.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239-1252.
- [193] Ren, B. Y.; Gao, F.; Tong, Z.; Yan, Y. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *307*, 55-61.
- [194] Durek, T.; Alexandrov, K.; Goody, R. S.; Hildebrand, A.; Heinemann, I.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16368-16378.
- [195] Belshaw, P. J.; Adamson, J. G.; Lajoie, G. A. *Synth. Commun.* **1992**, *22*, 1001-1005.
- [196] Bavetsias, V.; Bisset, G. M. F.; Jarman, M. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 947-958.
- [197] Stieber, F.; Greter, U.; Waldmann, H. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1142-1145.
- [198] Millington, C. R.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7201-7204.
- [199] Rak, A.; Pylypenko, O.; Durek, T.; Watzke, A.; Kushnir, S.; Brunsveld, L.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Science* **2003**, *302*, 646-650.
- [200] Chavrier, P.; Gorvel, J. P.; Stelzer, E.; Simons, K.; Gruenberg, J.; Zerial, M. *Nature* **1991**, *353*, 769-772.
- [201] Gilbert, P. M.; Burd, C. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8014-8020.
- [202] D'Adamo, P.; Menegon, A.; Lo Nigro, C.; Grasso, M.; Gulisano, M.; Tamanini, F.;

- Bienvenu, T.; Gedeon, A. K.; Oostra, B.; Wu, S. K.; Tandon, A.; Valtorta, F.; Balch, W. E.; Chelly, J.; Toniolo, D. *Nature Genet.* **1998**, *19*, 134-139.
- [203] Rak, A.; Pylypenko, O.; Niculae, A.; Pyatkov, K.; Goody, R. S.; Alexandrov, K. *Cell* **2004**, *117*, 749-760.
- [204] Salerno, C. P.; Magde, D.; Patron, A. P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3971-3981.
- [205] Kitson, T. M. *Bioorg. Chem.* **2000**, *27*, 73-88.
- [206] Barlos, K.; Papaioannou, D.; Theodoropoulos, D. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1324-1326.
- [207] Mamos, P.; Barlos, K.; Sanida, C. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1083.
- [208] Barlos, K.; Mamos, P.; Papaioannou, D.; Patrianakou, S.; Sanida, C.; Schafer, W. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 1025.
- [209] Kanie, O.; Grotenbreg, G.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4545-4547.
- [210] Hirai, H.; Yakura, N.; Seta, Y.; Hodoshima, S. *Red. Func. Polymers* **1998**, *37*, 121-131.
- [211] Teranishi, T.; Miyake, M. *Chem. Mat.* **1998**, *10*, 594-600.
- [212] Ösapay, G.; Profit, A.; Taylor, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6121-6124.
- [213] McCollum, C.; Andrus, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4069-4072.
- [214] Peyman, A.; Weiser, C.; Uhlmann, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2469-2472.
- [215] Camarero, J. A.; Hackel, B. J.; Yoreo, J. J.; Mitchell, A. R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4145-4151.
- [216] Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schroder, H.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834.
- [217] Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Ed., Pergamon, Oxford, **1988**.
- [218] Eis, K.; Schmalz, H.-G. *Synthesis* **1996**, 202-206.

8. Abkürzungsverzeichnis

All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
CBD	Chitin-bindende Domäne
CBR	C-Terminus-bindende Region
CHM	Choroideremia
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
Da	Dalton
Dansyl	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DME	1,2-Dimethoxyethan
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> ethylcarbodiimidhydrochlorid
EI-MS	<i>electron impact</i> -Massenspektrometrie
EE	Frühes Endosom
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAB-MS	<i>fast atom bombardment</i> -Massenspektrometrie
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTase	Farnesyltransferase
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden

GEF	<i>Guanidin nucleotide exchange factor</i>
GG	Geranylgeranyl
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTaseI/GGTaseII	Geranylgeranyltransferase Typ I/II
ges.	gesättigt
GerGer	Geranylgeranyl
GppNHp	Guanosine-5'-(β,γ -imido)-triphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guaninetriphosphat Phosphatase
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HR/MS	Hochauflösende Massenspektroskopie
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
LC/MS	flüssig-chromatographische Massenspektroskopie
LE	Spätes Endosom
LR/Ms	Niedrigauflösende Massenspektroskopie
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i> Massenspektrometrie
Me	Methyl
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz
MIC	Maleinimidocaproyl
Mmt	<i>para</i> -Methoxytrityl
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NSF	<i>N-ethyl-maleimide sensitive fusion protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitoyl
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R_f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
Ras	Adenosarkom aus Ratten
REP	<i>rab escort protein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat

Sec	<i>Secretory protein</i>
SG	Schutzgruppe
SNAP	<i>Soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TMS-	Trimethylsilyl
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
verd.	verdünnt
wt	<i>wild type</i>
Ypt	<i>yeast protein transport</i>

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525.) und haben L-Konfiguration nach der FISCHER-Projektion.

Danksagung

Zu dem Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken möchte.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Herbert Waldmann für die Themenstellen, für alle Mittel und Freiheiten bei der Umsetzung und Entwicklung meiner Ideen, die im wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Besonderer Dank gebührt dem „alten Unilabor“ mit Maja Köhn, Miguel Sanz, Daniel Gottlieb, Luc Brunsveldt, Christian Dose, Stefan Sommer, Tobias Voigt, Svenja Röttger, Sandra Eichhorn und Christiane Vornweg für die tolle Arbeitsatmosphäre, die mich häufig trotz frustrierender Laborarbeit bei guter Laune hielt. Insbesondere danke ich Luc für die nette Zusammenarbeit.

Desweiteren danke ich unserem „Mädchenlabor D 3.14“ mit Nici, Sasi, Maja und Julia für die schöne Zeit, das Ertragen meiner Musik und die konstruktiven, durchaus fruchtbaren Zickereien. Ich werde Euch vermissen.

Die Kooperation mit der Abteilung von Prof. R. S. Goody gelang vor allem aufgrund der hervorragenden Zusammenarbeit mit Dr. Kirill Alexandrov und Thomas Durek, die im wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Christine Novak danke ich für die vielen Proteinaufreinigungen.

Dr. Ron Wacker und Dr. Hendrick Schroeder der Firma Chimera Biotech zusammen mit Maja Köhn und Dr. Rolf Breinbauer danke ich für die letzten wichtigen Ergebnisse dieser Arbeit.

Die umfangreiche Analytik der dargestellten Verbindungen gelang nur aufgrund der sorgfältigen Arbeit von C. Vornweg, S. Eichhorn, Dr. H. Prinz, Dr. P. Janning, A. Danzmann und Dr. B. Costisella.

Zuletzt bedanke ich mich bei den gewissenhaften Korrekturlesern dieser Arbeit, Nicola Bisek, Daniel Gottlieb, Maja Köhn, Dr. Thomas Durek und *last but not least* Melanie Hill.

Lebenslauf

Name: Anja Watzke
Geburtsdatum: 03.06.1976
Geburtsort: Münster
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

1983 – 1987 Grundschohle St. Magareta in Münster
1987 – 1996 Gymnasium St. Mauritz in Münster
6/ 1996 Erreichen der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium

10/ 1996 – 3/ 1999 Chemie-Grundstudium an der Westfälischen-Wilhelms
Universität in Münster
10/ 1998 Ablegen des Vordiploms
4/ 1999 – 3/ 2001 Chemie-Hauptstudium an der Ruprecht-Karls Universität in
Heidelberg
8/ 2000 – 3/ 2001 Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. U.
Kazmaier mit dem Thema “Synthese potentieller Inhibitoren
der Ras-Farnesyltransferase” an der Ruprecht-Karls
Universität in Heidelberg
3/ 2001 Ablegen der Diplomprüfung im 9. Semester

Promotion

6/ 2001 Beginn der Promotion unter Leitung von Prof. Dr. H.
Waldmann mit dem Thema „Semisynthese
fluoreszenzmarkierter und prenylierter Rab7-Proteine“ am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in
Dortmund
9/ 2003 Doktorandenkurs bei der Bayer AG in Leverkusen

Stipendien

- | | |
|-----------------|---|
| 3/ 2001 | Erhalt eines Stipendiums des Dr. Sophie-Bernthsen-Fonds als Annerkennung für hervorragende Studien-Leistungen |
| 9/ 2001–9/ 2003 | Erhalt eines Kékule- Stipendiums der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie |
| 12/ 2003 | Erhalt des Wyeth-Förderpreises des Vereins zur Förderung der biomedizinischen Wissenschaften in Dortmund e.V. |

Dortmund, im April 2005