

Synthese und biologische Evaluierung
von
Lipo-, Glyco- und Phosphopeptiden

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

Dissertation

von Diplom-Chemikerin

Stefanie Schlummer

aus Werl-Büderich

Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Engelhard

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2005

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, in der Zeit von Oktober 2000 bis Dezember 2004 angefertigt.

Meiner Familie

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Allgemeiner Teil.....	3
2.1	Posttranslationale Modifikationen von Proteinen	3
2.1.1	Lipidierte Proteine.....	4
2.1.2	Glycosylierte und phosphorylierte Proteine	6
2.2	Zelluläre Transportmechanismen.....	9
2.2.1	Kernimport	9
2.2.2	Transfersysteme.....	14
2.3	Das virale Jun Protein.....	18
2.4	Ras Proteine	19
2.5	Peptidsynthese an der festen Phase	23
2.5.1	Synthese lipidierter Peptide.....	24
2.5.2	Synthese phosphorylierter und glycosylierter Peptide	25
2.6	Bioorganische Synthese von Protein-Peptid-Konjugaten.....	27
3	Ziel der Arbeit.....	30
4	Ergebnisse und Diskussion	33
4.1	Semisynthetische N-Ras-Proteine	33

4.1.1	Synthese Fluoreszenz-markierter Ras-Peptide	35
4.1.2	Kupplung des MIC-modifizierten Lipopeptids an verkürztes N-Ras-Protein	49
4.1.3	Biophysikalische Evaluierung der Wechselwirkung von lipidierten, Bodipy-markierten Proteinen mit Modellbiomembranen.....	52
4.2	Posttranslational modifizierte NLS-Konjugate.....	55
4.2.1	Synthese der Bausteine	58
4.2.2	Synthese der NLS-Peptide.....	63
4.2.3	Synthese der NLS-Avidin-Konjugate	68
4.2.4	Biologische Evaluierung der NLS-Avidin-Konjugate	69
4.3	PTD-NLS-Konjugate.....	75
4.3.1	Synthese des Fluorescein-markierten PTD-NLS-Konjugates 84	77
4.3.2	Synthese des NBD-markierten PTD-NLS-Konjugates 85	79
4.3.3	Biologische Evaluierung der PTD-NLS-Konjugate.....	86
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	88
6	Experimenteller Teil.....	95
6.1	Allgemeines	95
6.2	Versuche zu Kapitel 4.1	99
6.2.1	Synthese von N-Ras Peptiden.....	99
6.2.2	MIC-Ligation	114
6.3	Versuche zu Kapitel 4.2	116

6.3.1	Synthese der Bausteine	116
6.3.2	Synthese der NLS-Peptide	128
6.3.3	Synthese der NLS-Avidin-Konjugate	136
6.3.4	Biologische Evaluierung der NLS-Avidin-Konjugate.....	136
6.4	Versuche zu Kapitel 4.3	138
6.4.1	Synthese des Fluorescein-markierten PTD-NLS-Konjugates 84	138
6.4.2	Synthese des NBD-markierten PTD-NLS-Konjugates 85	141
6.4.3	Biologische Evaluierung des PTD-NLS-Konjugates 84	147
7	Literatur	148
8	Abkürzungsverzeichnis	157

I Einleitung

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.*

-ARISTOTELES-

Der Antrieb unzähliger Naturwissenschaftler ist die Neugier, komplexe Vorgänge in der Natur zu verstehen. Gerade das *Leben* ist von einer außerordentlichen Komplexität und stellt eine der größten Herausforderungen dar. Selbst einfachste Lebewesen wie Bakterien verfügen schon über verschiedene Wege, mittels Stoffwechsel Energie zu produzieren, Biosynthese zu betreiben und Zustandsänderungen ihrer Umwelt zu registrieren. Mit der Entdeckung der DNA wurde das neue Gebiet der Molekularbiologie begründet, dessen zentrales Dogma die Speicherung und Weitergabe genetischer Information von der DNA in die RNA und anschließend in das Protein ist. Obwohl durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms eine Fülle an möglichen Genprodukten bekannt ist, ist der Mensch noch weit davon entfernt, die Vielzahl der darin enthaltenen Informationen richtig interpretieren zu können.

Das Wechselspiel von Reaktionen auf molekularer Ebene, die in ihrer Gesamtheit das Phänomen *Leben* bilden, ist der Schlüssel zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge in lebenden Organismen. Chemische Ansätze werden schon in vielen Bereichen eingesetzt, um biologische Fragestellungen zu untersuchen. Kleine Moleküle oder speziell modifizierte Makromoleküle stellen wichtige Hilfsmittel dar, um biologische Prozesse zu unterdrücken, einzuleiten, zu modifizieren oder sichtbar zu machen.

Ein interessanter Bereich dieser biologischen Zusammenhänge ist der Einfluss posttranslativeller Modifikationen auf die Funktion der Proteine. Die spezifische Modifikation von Molekülen, um biologische Vorgänge *in vivo* beobachten zu können, ist dabei ein wichtiger Aspekt. Semisynthetische Proteine mit maßgeschneiderten

Funktionalitäten sind solche chemischen Sonden zur Untersuchung des *Lebens* auf molekularer Ebene.

Der erste Teil dieser Arbeit handelt von der Entwicklung speziell modifizierter Ras-Proteine als Werkzeuge für biophysikalische und biologische Untersuchungen. Ras-Proteine sind lipidierte Proteine, deren Mutation eng mit der Transformation einer Zelle in eine Krebszelle verknüpft ist. Das molekulare Verständnis für diesen zentralen Schalter in der Krebsentstehung könnte letztlich die Entwicklung neuer Medikamente ermöglichen.

Ein weiterer Teil untersucht die komplexen Transportsysteme in lebenden Zellen. Ein genaues Verständnis dieser Vorgänge und der Regulation durch posttranslationale Modifikationen ermöglicht den Zugang zu peptidischen Transportern, die gezielt Zellkompartimente wie z. B. den Zellkern adressieren können. Solche Transporter bieten die Möglichkeit, Methoden zu entwickeln, um durch nicht-invasive Techniken zelluläre Prozesse zu untersuchen. Zusätzlich können sie zu neuen therapeutischen Ansätzen bei der Gentherapie führen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen

Bei vielen Proteinen ist die Synthese an Ribosomen nicht der letzte chemische Schritt zum vollständigen funktionsfähigen Protein. Eine Art der Modifikation besteht in der kovalenten Verknüpfung mit anderen Biomolekülen. Die meisten Proteine werden co- oder posttranslational modifiziert, da tRNAs nur unmodifizierte Aminosäuren erkennen (eine Ausnahme ist Selenocystein) und nur diese in die wachsende Peptidkette einbauen. So werden z. B. Zuckerreste oder Lipide im Endoplasmatischen Retikulum (ER) angehängt oder bestimmte Aminosäuren des Proteins chemisch verändert. Enzyme, die diese chemischen Modifikationen durchführen, modifizieren immer nur selektiv eine oder wenige Aminosäuren und erkennen ihr Substrat an einem bestimmten Aminosäure-Motiv. Viele Modifikationen sind nur temporär und müssen wiederholt werden bzw. können wieder rückgängig gemacht werden. Gerade die Phosphorylierung ist hierfür ein sehr gutes Beispiel, viele Proteine werden durch selektive Phosphorylierung aktiviert oder deaktiviert.

Kenntnisse über diese Modifikationen sind besonders wichtig, da sie die physischen und chemischen Eigenschaften, wie z. B. Faltung, Konformation, Stabilität, Aktivität und demzufolge auch die Funktion von Proteinen verändern. Zusätzlich kann die Modifikation selbst als funktionale Gruppe agieren. Beispiele für wichtige biologische Effekte verschiedener posttranslatinaler Modifikationen sind die Proteolyse als Folge der Ubiquitinierung, Membranassoziation durch Fettsäuren, die Auswirkungen von Phosphorylierung auf Signaltransduktion und der Einfluss von Glycosylierung auf Proteinhalbwertszeit, Lokalisation und Zell:Zell- bzw. Zell:Matrix-Wechselwirkungen.

2.1.1 Lipidierte Proteine

Die Existenz von Proteinen mit kovalent gebundenen Lipiden wurde vor über dreißig Jahren entdeckt,^[1] ihre Bedeutung wurde aber erst einige Zeit später festgestellt. Es sind vier Klassen von Lipiden bekannt, mit denen Proteine kovalente Bindungen formen (Abb. 1):

- Fettsäureester, z. B. a) *N*-Myristoylierung (C_{14}), bei der Myristinsäure als Amid an ein N-terminales Glycin gebunden ist; b) *S*-Palmitoylierung (C_{16}), bei der Palmitinsäure als Thioester an ein Cystein gebunden ist, aber auch als *O*-acyliertes oder *N*-acyliertes Protein vorliegen kann.
- Isoprenoide, wie Farnesyl (C_{15})- oder Geranylgeranyl (C_{20})-Reste, die als Thioether an ein Cystein gebunden sind.
- Veresterung der C-terminalen Aminosäure eines Proteins mit Cholesterol.
- Glycosylphosphatidyl-Inositol (GPI), C-terminale Verknüpfung von Proteinen mit der Phosphoethanolamin-Einheit eines GPI-Ankers.

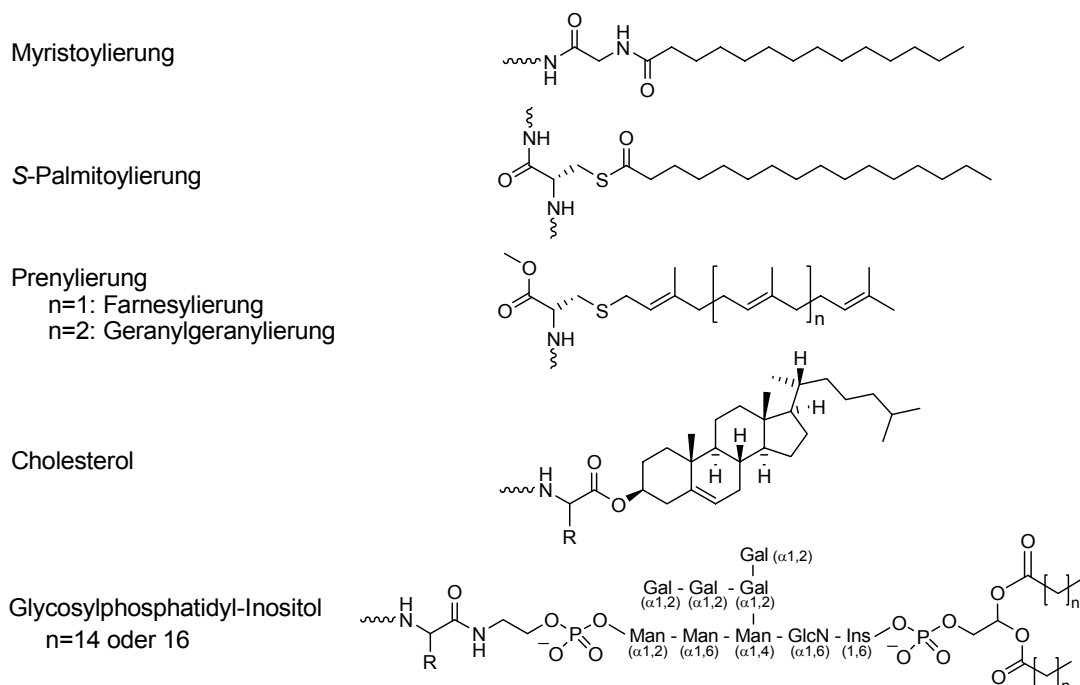


Abb. 1 Lipidmodifikationen von Proteinen.

Die kovalent gebundenen Lipide dienen hauptsächlich als Membrananker der modifizierten Proteine, außerdem spielen sie eine wichtige Rolle beim subzellularen Transport von Proteinen zwischen Membranen oder Membranmikrodomänen sowie bei der Modulation von Protein-Protein-Interaktionen.^[2]

Da die Thioacetylierung als einzige dieser Modifikationen ein reversibler Prozess ist, wird für die Palmitoylierung auch eine regulatorische Funktion angenommen. Der molekulare Mechanismus der Palmitoylierung ist nur wenig verstanden, sowohl spontane wie auch enzymkatalysierte Palmitoylierungen werden diskutiert. Aufgrund der Vielfalt der palmitoylierten Proteine wäre es jedoch nicht erstaunlich, wenn verschiedene Mechanismen involviert wären. Die Myristoylierung ist dagegen sehr gut untersucht. An Proteine mit dem N-terminalen Motiv Met-Gly wird unter Abspaltung des endständigen Methionins Myristinsäure durch N-Myristoyltransferase transferiert.^[3]

Viele Proteine besitzen kovalent gebundene Prenylgruppen, hauptsächlich Farnesyl- und Geranylgeranyl-Gruppen. Die häufigste Erkennungsstelle für enzymatische Proteinprenylierung durch Farnesyl- bzw. Geranylgeranyltransferase ist die C-terminale Sequenz CaaX. Dabei ist C das Cystein, an dessen Schwefelatom der Prenylrest gebunden wird, a ist eine aliphatische Aminosäure und X kann jede beliebige Aminosäure sein. Wenn X gleich Ala, Met, Cys, Gln oder Ser ist, wird das Protein farnesyliert, ist X ein Leu oder Phe wird es geranylgeranyliert.^[4] Das aaX Tripeptid wird proteolytisch angespalten und das nun C-terminale Cystein wird anschließend durch die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase (Icmt) zum Methylester umgesetzt.

Für die irreversible Membranbindung von Proteinen sind zwei Signale notwendig. Ist das Protein nur einfach lipidiert assoziiert es an die Membran und kann diese durch den so genannten Flip-Flop-Mechanismus durchdringen, allerdings kann das Protein ebenso wieder von der Membran dissoziieren. Ein zweites Signal stabilisiert die Membranbindung. Ein solches Signal kann entweder eine weitere Lipidmodifikation oder eine benachbarte Aminosäuresequenz, bestehend aus basischen Aminosäuren, sein. Alternativ kann die Membranbindung einzelner Proteine auch durch Protein-

Protein-Wechselwirkungen mit anderen membrangebundenen Proteinen gesteigert werden (Abb. 2).^[3]

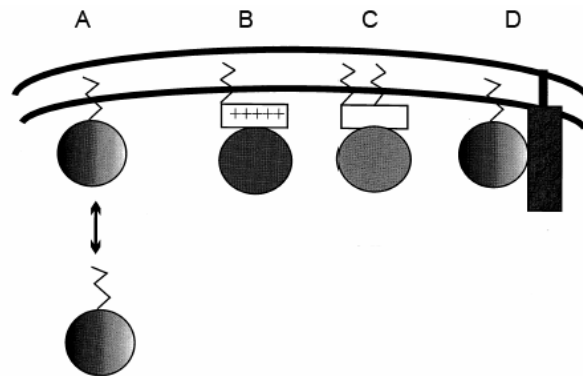


Abb. 2 Model für die Membranbindung lipidiertener Proteine. Reversible Membranassoziation: A) einfach lipidiertes Protein; irreversible Membranassoziation: B) einfach lipidiertes Protein + basische Aminosäuresequenz; C) doppelt lipidiertes Protein; D) einfach lipidiertes Protein + weiteres membrangebundenes Protein.

2.1.2 Glycosylierte und phosphorylierte Proteine

Ein großer Prozentsatz der zellulären Prozesse wird durch Phosphorylierung von Proteinen reguliert, indem z.B. Struktur, Löslichkeit, biologische Aktivität, Zelllokalisierung oder Interaktionspartner verändert werden. Es wird angenommen, dass etwa ein Drittel der zellulären Proteine phosphoryliert vorliegt. Die reversible Phosphorylierung ist eine der wichtigsten und am besten untersuchten posttranslationalen Modifikationen. Sie beeinflusst viele zelluläre Prozesse, einschließlich Zellzyklus, Zellwachstum, Apoptose und Signaltransduktionswege, durch Regulation der biologischen Aktivität eines Proteins. Die Mehrheit der Phosphorylierungen erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenketten durch spezifische Kinasen, die Dephosphorylierung wird durch Protein-Serin/Threonin- oder Protein-Tyrosin-Phosphatasen katalysiert.

Die Glycosylierung von Proteinen ist ebenfalls eine wichtige dynamische Proteinmodifikation mit erheblichem Effekt auf Konformation, Stabilität und Aktivität von Proteinen. Kohlenhydrate in Form von an Asparagin (N-verknüpft) oder Serin/

Threonin (O-verknüpft) gebundenen Oligosacchariden haben einen besonders großen Anteil an Zelloberflächen und sezernierten Proteinen. Das Vorkommen von O-gebundenem N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) als Proteinmodifikation wurde zuerst 1984 bei Zellmembranproteinen beschrieben.^[5] Im Folgenden wurde allerdings schnell erkannt, dass ein Großteil der O-GlcNAc-Modifikationen intrazellulär vorkommt.^[6] Es wurden bisher diverse O-GlcNAc-modifizierte Proteine gefunden, darunter RNA Polymerase II und viele assoziierte Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Cytoskeletproteinen, nukleare Hormonrezeptoren, Kernporenproteine, Signaltransduktionsmoleküle und Aktin-regulierende Proteine. Glycoproteine mit N-Acetylglucosamin kommen in hoher Konzentration im Kernporenkomplex (NPC) sowie bei Komponenten der Transkriptionsmaschinerie vor. Änderungen des O-GlcNAc-Grades wirken sich auf das Verhalten bestimmter Proteine in Bezug auf die Enzymaktivität oder Regulierung, Protein-Protein-Wechselwirkungen, DNA-Bindung, subzelluläre Lokalisierung und die Halbwertszeit und das proteolytische Verarbeiten von Proteinen aus.^[7] Als verantwortlich für die Addition und Abspaltung von O-GlcNAc wurden die Enzyme O-GlcNAc-Transferase (OGT)^[8] und O-GlcNAcase^[9] identifiziert.

Die Entdeckung von O-GlcNAc vor 20 Jahren liegt im Vergleich zur Entdeckung der Phosphormodifikation vor 70 Jahren noch nicht lange zurück. Obwohl die O-GlcNAc-Modifizierung ähnlich der Phosphorylierung eine häufig vorkommende und dynamische Modifikation ist, ist sie bislang wenig charakterisiert.^[10] Bisher sind alle bekannten O-GlcNAc-modifizierten Proteine ebenfalls Phosphoproteine. Ob umgekehrt auch alle Phosphoproteine O-GlcNAc-modifiziert vorliegen, ist nicht bekannt, da bei weitem noch nicht alle O-GlcNAc-modifizierten Proteine identifiziert wurden. Es wird ein allgemeiner reziproker Zusammenhang zwischen diesen beiden Modifikationen beobachtet, und ebenfalls ein dynamisches Verhältnis an spezifischen Positionen. Beispiele für den reziproken Zusammenhang, bei dem O-GlcNAc und O-Phosphat dieselbe Aminosäure besetzen, sind unter anderem der Östrogen-Rezeptor β (ER β),^[11] Simian Virus 40 large T Antigen (SV40 Tag),^[12] das Proto-Oncogen c-Myc^[13] und die RNA Polymerase II (RNA Pol II).^[14] O-GlcNAc und O-Phosphat können aber

auch um benachbarte Positionen, bei denen die Aminosäuren nur wenige Bausteine voneinander entfernt liegen, konkurrieren, wie z. B. bei der Casein Kinase II (CKII)^[10] und RNA Pol II.^[14] Erst kürzlich konnte z. B. für das Mikrotubuli-assoziierte Tau Protein (tau) gezeigt werden, dass es im Gehirn O-GlcNAc-modifiziert vorliegt.^[15] An spezifischen Positionen reguliert O-GlcNAc die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins, welche kritisch für die molekulare Pathogenese von Alzheimer und verwandten neurodegenerativen Krankheiten ist. In diesem Fall liegt das Protein folglich in unterschiedlichen Glycosylierungs- / Phosphorylierungs-Kombinationen vor (Abb. 3 C), wobei O-GlcNAc die Phosphorylierung bestimmter Positionen verhindert. Dies zeigt, dass Serin- und Threonin-Seitenketten in mindestens drei Zuständen vorliegen können: unmodifiziert, phosphoryliert und glycosyliert (Abb. 3).^[6, 10, 16]

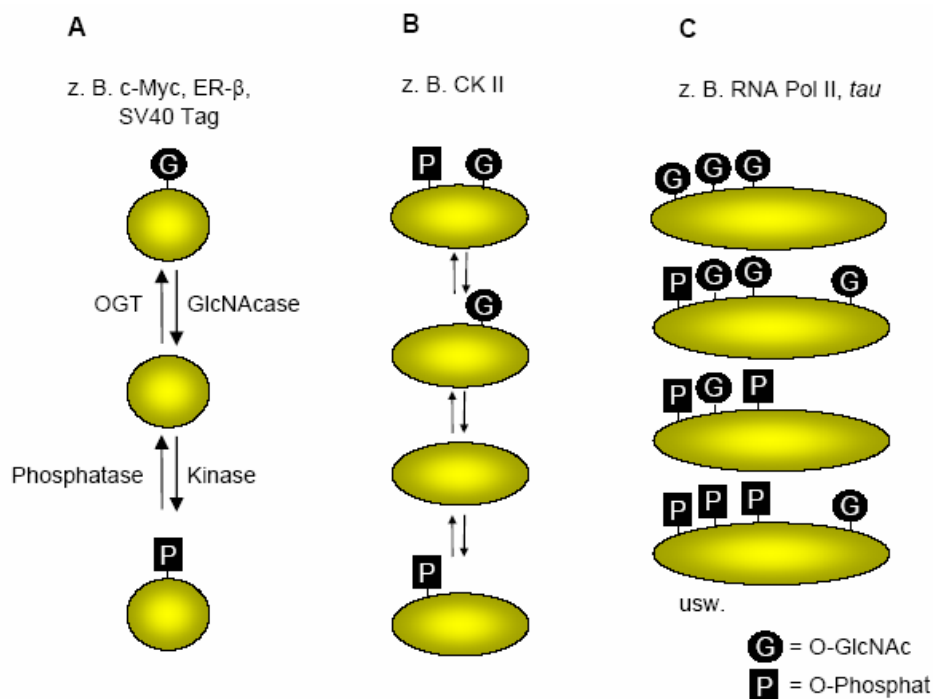


Abb. 3 Dynamisches Gleichgewicht zwischen Proteinphosphorylierung und O-GlcNAc-Addition. O-GlcNAc kann als einzelne Modifikation, an einer Phosphorylierungsstelle (A), in Nachbarschaft zu einer Phosphorylierungsstelle (B) oder an mehreren Positionen in verschiedenen Kombinationen (C) auftreten.^[6, 10]

Der Zusammenhang zwischen O-GlcNAc-Addition und O-Phosphorylierung ist sehr komplex und bisher noch nicht ausführlich untersucht. Glycosylierung kann die Phosphorylierung an derselben (z. B. c-Myc) und auch benachbarten Position (z. B.

CK II) verhindern, wahrscheinlich durch sterische Hinderung oder Veränderung der lokalen Proteinstruktur. Dieses führt zu der Annahme, dass O-GlcNAc und O-Phosphat sich gegenseitig nach dem so genannten Ying-Yang-Modell modulieren.^[7] In diesem Modell kann O-GlcNAc nicht nur die *spezifische* Funktion sondern auch die *zelluläre* Funktion eines Proteins beeinflussen, indem das Muster der freien Hydroxylgruppen, die als Antwort auf Signaltransduktionsereignisse phosphoryliert werden können, verändert wird.

2.2 Zelluläre Transportmechanismen

In der letzten Zeit wurde eine wachsende Anzahl von potentiellen Protein- oder DNA-Therapeutika entwickelt. Deren Anwendung ist bisher durch den schlechten Transfer von Makromolekülen in Zellen und den weiteren zielgerichteten Transport limitiert. Die wachsende Bedeutung der Gentherapie zeigt die Notwendigkeit, die zellulären Transportsysteme genauer zu untersuchen und die natürlichen Barrieren in der Zelle gezielt zu überwinden.

2.2.1 Kernimport

Eukariotische Zellen sind in unterschiedliche Kompartimente unterteilt, welche durch Lipiddoppelmembranen voneinander getrennt sind und so unterschiedliche Reaktionsräume bilden. Der Zellkern, umgeben von einer sich bis in das Cytoplasma erstreckenden doppelten Lipiddoppelmembran, die dort das Endoplasmatische Retikulum bildet, ist einer der bemerkenswertesten Reaktionsräume. Im Zellkern befindet sich die genomische DNA, die demnach vom Cytoplasma getrennt vorliegt. Diese räumliche Trennung hat zur Folge, dass biologische Makromoleküle (*transfer* RNA, *ribosomale* RNA, *messenger* RNA und nukleare Proteine wie Histone und Transkriptionsfaktoren) durch die Kernhülle importiert und exportiert werden müssen. Der Transport von Makromolekülen wurde intensiv untersucht, der genaue Mechanismus des Kernimports ist aber immer noch unklar. Der gesamte nukleo-

cytoplasmische Transport erfolgt durch den Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC), ein Multiproteinkomplex in der Lipiddoppelmembran der Kernhülle.

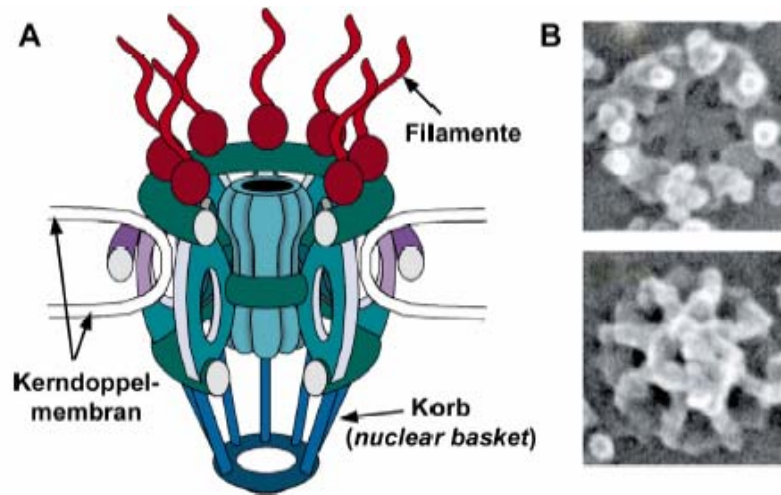


Abb. 4 Kernporenkomplex (NPC). A) Schematische Darstellung des NPCs aus *S. cerevisiae*, Seitenansicht;^[17] B) Ansicht des *X. laevis* NPCs aus dem Cytoplasma (oben) bzw. aus dem Nukleoplasma (unten).^[18]

Der NPC besteht aus zwei konzentrischen Ringstrukturen auf der cytoplasmischen und der nuklearen Seite der Kernhülle, die in einer oktagonalen rotationssymmetrischen Struktur die Kernpore mit ~9 nm Durchmesser einschließen (Abb. 4). Moleküle können durch passive Diffusion durch diese Pore gelangen, jedoch wird die Diffusion ab einer bestimmten Größe sehr ineffizient.^[19] Signal-abhängiger Transport von Makromolekülen ist allerdings bis zu einer Größe von 35-40 nm im Durchmesser möglich.^[20]

Der Import von Makromolekülen in den Kern ist ein streng regulierter Prozess, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist. Entscheidend für den Import eines Proteins in den Zellkern ist die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localisation sequence*, NLS), welche von Transportfaktoren erkannt wird. Das erste Importsignal konnte 1984 im Simian Virus 40 T Antigen (SV40 T ag) identifiziert werden.^[21] Die klassische NLS besteht typischerweise aus Clustern von vier oder mehr kationischen Aminosäuren und ist häufig von den α -Helix-Brechern Prolin oder Glycin flankiert. Diese Sequenzen können auch zweiteilig, bestehend aus zwei Clustern, die durch ein Zwischenstück aus 10-12 Aminosäuren getrennt sind, vorliegen. Sie sind

charakterisiert als die kleinstmögliche Sequenz, die für die Kernlokalisierung notwendig ist (Tab. 1).^[22, 23]

Protein	minimale NLS	
<i>einteilige NLS</i>		
SV40 Tag	PKKKRKY ¹³²	[21]
vJun	RKRKL ²⁵³	[24]
Maus <i>c-abl</i> IV	KKKKK ⁶²⁸	[25]
Humanes <i>c-myc</i>	PAAKRVKL ³²⁷	[26]
<i>zweiteilige NLS</i>		
Poly(ADP-Ribose) Polymerase	KRKGDEVDGVDEVAKKKS ²²⁶	[27]
<i>Xenopus</i> Nucleoplasmin	VKRPAAATKKAGQAKKKL ¹⁷¹	[28]

Tab. 1 Beispiele für klassische Kernlokalisierungssequenzen.

Die Kernlokalisierungssequenzen werden von dem Adapter-Protein Importin (auch Karyopherin) erkannt. Importin ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. An Importin β gebundenes Importin α bindet an die NLS eines Proteins und leitet damit den durch Importin β vermittelten Import des Heterotrimer durch den NPC ein. Im Zellkern dissoziiert der Komplex, initiiert durch die Bindung von RanGTP (GTP gebundenes Ran, Ras-related nuclear protein), und setzt somit das Protein frei. Die Importin-Untereinheiten werden unabhängig voneinander durch Exportfaktoren (z. B. CAS für Importin α) in das Cytoplasma zurückgeführt, um dort den Importzyklus erneut zu beginnen (Abb. 5).^[29, 30]

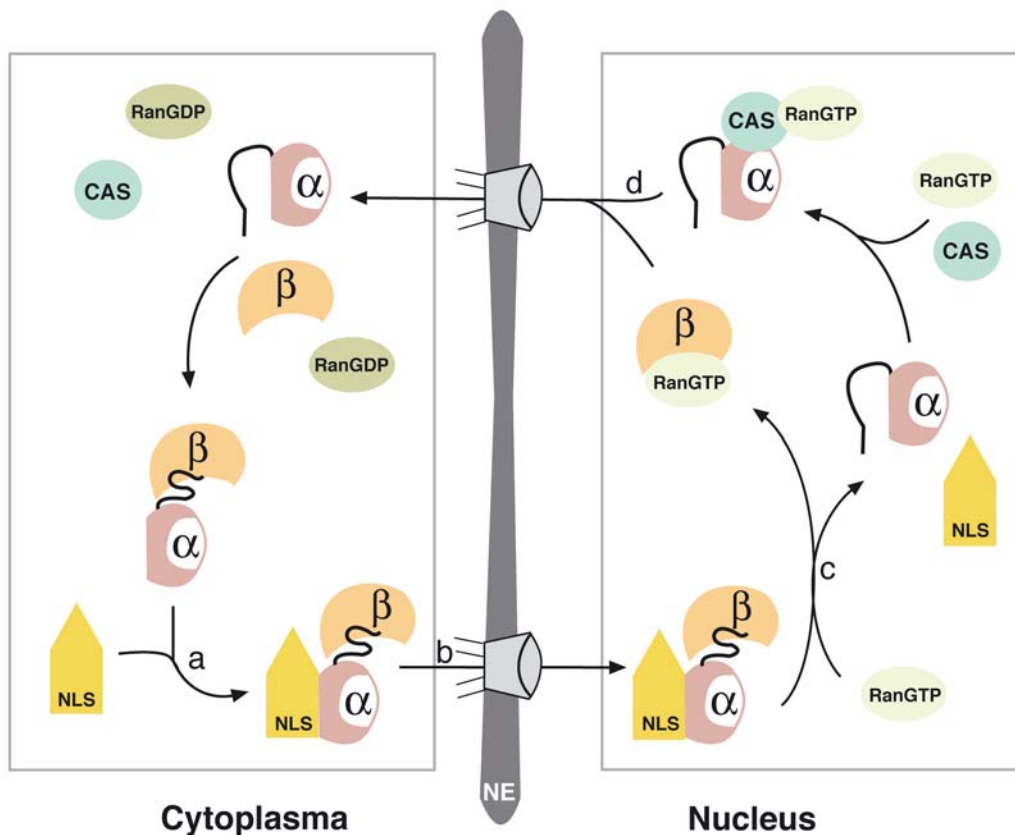


Abb. 5 NLS vermittelter Kernimport. **(a)** Importin α (α) bildet einen ternären Komplex mit Importin β (β) und NLS-Protein (NLS). **(b)** Der ternäre Komplex translokalisiert durch den NPC in den Zellkern. **(c)** Ran-GTP leitet die Dissoziation des Komplexes ein. **(d)** Importin α bindet an Exportin CAS-Ran-GTP und wird in das Cytoplasma exportiert.

Viele Proteine, die eine NLS aufweisen, können sich im Cytoplasma befinden, wenn die NLS maskiert ist. Auf diese Weise wird die Funktion des Proteins im Zellkern reguliert. Die Maskierung der Sequenz kann auf unterschiedliche Arten erfolgen: Bekannt sind Protein-Protein-Wechselwirkungen, Konformationseffekte oder Modifikationen der NLS. Dabei ist die Phosphorylierung eines der NLS benachbarten Serin- oder Threonin-Restes eine weit verbreitete Methode, um den Kernimport zu regulieren. Es sind mindestens drei Wege bekannt, mit denen Phosphorylierungen die NLS beeinflusst:

1. Die Phosphorylierung erzwingt eine Konformationsänderung des Proteins, welche die NLS zugänglich macht oder maskiert.
2. Die Phosphorylierung ermöglicht die Dissoziation oder Assoziation eines NLS-maskierenden Proteins.
3. Die Phosphorylierung beeinflusst direkt die Affinität der NLS zu dem Importrezeptor Importin α .

Proteine mit einer durch Phosphorylierung regulierter NLS (prNLS) können in zwei Gruppen eingeteilt werden: solche, bei denen der Kernimport durch Phosphorylierung gefördert wird, und andere, bei denen die Phosphorylierung inhibierend auf den Kernimport wirkt.^[23, 31, 32] Die prNLS des vJun wird zum Beispiel negativ durch Phosphorylierung des Ser²⁴⁸ reguliert,^[24] im Gegensatz zu der prNLS von NF- κ B, bei der die Phosphorylierung die Dissoziation eines NLS-maskierenden Proteins initiiert^[33]. Die bestuntersuchte prNLS ist die des SV40 Tag und gehört zu einer dritten Gruppe von Proteinen, die zwei Phosphorylierungsstellen nahe der NLS besitzen.^[34] Wird SV40 Tag-Ser¹¹² durch Casein-Kinase II (CK II) phosphoryliert, führt dies zu einem verstärkten Import von SV40 Tag. Im Gegensatz hierzu wird durch Phosphorylierung des Thr¹²⁴ durch die Cyclin-abhängige Kinase (cdk) cdc2 die Importaktivität stark reduziert.^[34] Dieses CcN Motiv (CK II, cdk, NLS) ist auch von anderen Proteinen bekannt.^[33] Häufig werden prNLS durch hormonale Stimulation, die Phase des Zellzyklus oder gewebsspezifische Bedingungen beeinflusst und so die zelluläre Lokalisation bestimmt.^[35]

Es wird angenommen, dass neben der Phosphorylierung auch die O-GlcNAc-Glycosylierung in den Kernimport von Proteinen involviert ist. Obwohl die Verbindung von Phosphorylierungsgrad und Kernlokalisierung für eine Vielzahl von Proteinen beschrieben wurde,^[23, 36] wurde der Zusammenhang zwischen Phosphorylierung, O-GlcNAc-Addition und Kernimport noch nicht intensiv untersucht. Erste Studien am tau-Protein zeigen ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und O-GlcNAc-Modifikation. O-GlcNAc blockiert Phosphorylierungsstellen im tau-Protein. Ist dieses Gleichgewicht gestört, d. h. tau ist deglycosyliert, wird das Protein

hyperphosphoryliert. Hyperphosphoryliertes tau kann nicht mehr glycosyliert werden und wird weniger effektiv in den Zellkern transportiert. Das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und O-GlcNAc-Glycosylierung kann folglich den Kernimport des tau-Proteins kontrollieren.^[37]

Neben dem Importmechanismus über peptidische NLS nutzt ein anderer Weg Kohlenhydrate als Importsignal. Es konnte gezeigt werden, dass die Anknüpfung bestimmter Zucker, insbesondere β -Di-N-acetylchitobiosid (GlcNAc β 4GlcNAc)-Modifikationen, an cytosolische Proteine zu deren Kernimport führen kann.^[38] Dieser Kernimport erfolgt allerdings nicht über den klassischen NLS-Weg, sondern ist unabhängig von Importin.^[39]

2.2.2 Transfersysteme

Die undurchdringliche Natur der Zellmembran für Peptide, Proteine, DNA und Oligonukleotide limitiert deren therapeutisches Potential. Um Moleküle verschiedenster Art gezielt in Zellen zu bringen, die dort dann z. B. in den Zellkern transportiert werden, sind einige Methoden bekannt.^[40] Zu den häufig benutzten Hilfsmitteln zählt unter anderem die Mikroinjektion, bei der eine Substanz mithilfe einer Glaskapillare direkt in das Cytoplasma einer Zelle injiziert wird. Außerdem kann die Zellmembran einer Zelle gezielt permeabilisiert werden, so dass das Cytoplasma mit Puffer ausgewaschen und durch Zugabe von speziellen Importlösungen die zu importierende Substanz eingebracht werden kann. Diese Methoden bedeuten allerdings einen großen Eingriff in die Zellstruktur und sind nicht für mehrzellige Organismen geeignet. Als weitere invasive Methoden, um DNA, Proteinen oder Wirkstoffen den Zugang zum Zellkern zu ermöglichen, werden virale Transportsysteme und der Transport durch Liposome^[41] oder kationische Polymere^[42] genutzt. Bei diesen Methoden wird eine Schutzhülle um die zu transportierende Substanz (meist DNA) gebildet, die die Zellmembran durchdringt und im Cytoplasma das Transportgut freilässt.

PTD	Sequenz	
<i>Proteine</i>		
Antennapedia	RQIKIWFQNRRMKWKK ⁵⁸	[43]
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD	[44]
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP ¹⁵³	[31]
HIV-I gag MA	Myr-GARASVL ⁷	[45]
HIV-I Tat	RKKRRQRRR ⁵⁷	[46]
hCT	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP ³²	[47]
<i>Synthetische Peptide</i>		
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	[48]
Loligomer	(TPPKKKRKVEDPKKKKK) ₈ ⁻	[49]
Polyarginin	RRRRRRR	[50]
KALA	KLALKLALKALKAALKLA	[51]

Tab. 2 Beispiele für Proteintransduktionsdomänen.

Die Ausnutzung natürlicher zellulärer Transfersysteme ist ein nicht-invasiver Ansatz. Ähnlich der NLS gibt es auch für den Zellimport bestimmte Peptidsequenzen, die fähig sind, durch die Zellmembran zu translokieren (Tab. 2). Unter diesen Proteintransduktionsdomänen (PTD) sind die des HIV-I Tat (Transaktivierungsfaktor des Humanen Immundefizienz-Virus), Drosophila Antennapedia und Herpes Simplex Virus (VP22) die bekanntesten und wurden seit ihrer Entdeckung intensiv untersucht. Viele der natürlich vorkommenden PTD sind aus Aminosäuren mit lipophilen Seitenketten aufgebaut. Unter anderem wird auch der Einfluss von Lipidseitenketten diskutiert, z. B. ist die myristoylierte C-terminale Domäne des HIV-I gag MA für dessen Zellimport verantwortlich. Synthetische PTD sind dagegen oft Chimäre und bestehen aus Sequenzen mit verschiedenen Funktionen, um optimale Effektivität der Translokation zu erreichen. Transportan ist z. B. eine Kombination des N-terminalen Fragments des Neuropeptides Galanin und Mastoparan, ein Membraninteraktions-

peptid im Wespengift. Ein weiteres Beispiel ist das verzweigte Peptid Loligomer, welches ein Hybrid aus der SV40 NLS und einem Lysin-Pentapeptid ist. Homooligopeptide mit mehr als sieben Argininen oder Lysinen, aber weniger als fünfzehn, sind ebenfalls effektive PTD, ebenso wie das amphiphilische Modellpeptid KALA. Eine weitere Familie der Zellpenetrationspeptide stammt von dem C-terminalen Fragment des humanen Calcitonin (hCT) und sind größtenteils kationischer Natur mit einer hydrophoben C-terminalen Domäne.

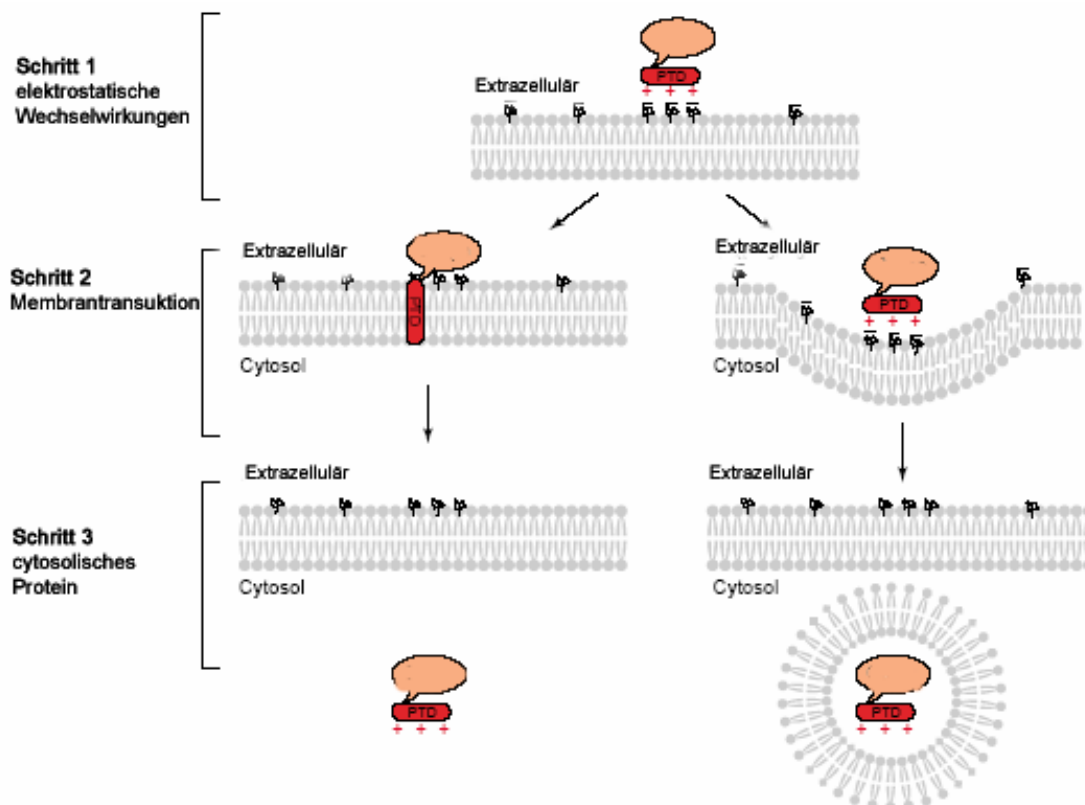


Abb. 6 Modell für die Membrantransduktion durch kationische Peptide. Schritt 1: elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen PTD und den negativen Ladungen auf der Zellmembran; Schritt 2: die PTD durchdringt die Plasmamembran durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (links) oder durch Endocytose (rechts); Schritt 3: der PTD-Komplex wird in das Cytosol entlassen.^[52]

Bis jetzt ist der Mechanismus, über den Membran-durchdringende Proteine und peptidische Transporter in das Cytoplasma gelangen, noch nicht vollständig geklärt. Frühere Vermutungen, dass diese Peptide nicht den konventionellen Weg der Endocytose nutzen, wurden durch neuere Untersuchungen widerlegt. Import von

kationischen Sequenzen, wie Tat, Polyarginin und Antennapedia, erfolgt zumindest teilweise über Endocytose (Abb. 6). Amphiphatische PTD wie Transportan werden wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus in Zellen transportiert.^[52, 53] Der durch Lipide induzierte Import folgt vermutlich dem oben genannten Flip-Flop-Mechanismus.

Durch die Kombination von Proteintransduktionsdomänen und Kernlokalisierungssequenzen wurden neue Ansätze entwickelt um DNA und andere Makromoleküle in den Zellkern einzuschleusen. Erfolgreicher Kernimport eines PTD-NLS-Konjugates konnte z. B. für die Kombination K-FGF/ NF-κB p50 oder HIV-I gp41/ SV40 Tag gezeigt werden (Tab. 3). Die Signalpeptide sind dabei kovalent verknüpft und mit dem Transportgut ebenfalls kovalent oder über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden. Zusätzlich können die beiden Sequenzen cytosolisch getrennt werden: das Antennapedia-NLS-Peptidnukleinsäure- (PNA-) Konjugat zeigte die höchste Importaktivität von NLS-PNA in den Zellkern, wenn die PTD durch Spalten einer Disulfidbrücke im Cytoplasma abgetrennt wird.^[54]

PTD	NLS	Funktion	
K-FGF	NF-κB p50	Inhibiert Kernimport von NF-κB	[31]
h Integrin β ₃	NF-κB p50	Inhibiert Kernimport von NF-κB	[55]
HIV-I gp41	SV40 Tag	Kernimport von DNA, siRNA	[56]
W-reiche Sequenz	SV40 Tag	Kernimport von Proteinen / Pepiden	[57]
Antennapedia	SV40 Tag	Kernimport von PNA	[54]

Tab. 3 Beispiele für funktionelle PTD-NLS-Konjugate.

Solche modularen Transportsysteme sind flexibel einsetzbar, indem z. B. die einzelnen Sequenzen ausgetauscht werden können. Dadurch können individuelle Transporter für verschiedene intrazelluläre Ziele zur Struktur-Funktionsanalyse von Signaltransduktionswegen oder Gentranskriptionskontrolle entwickelt werden. Außerdem ermöglichen diese Peptide den selektiven Transport verschiedener

Wirkstoffe, unter anderem PNAs, Antisenseoligonukleotide und Peptide oder Proteine mit pharmakologischem Interesse.

2.3 Das virale Jun Protein

Das Jun Protein ist ein Transkriptionsfaktor des Aktivator Protein I Komplexes (AP-1), Es bildet Homodimere oder Heterodimere mit anderen AP-1 Transkriptionsfaktoren oder mit transkriptionalen Regulatoren der ATF- und Steroid-Familie. Diese Dimere binden an spezifische Enhancer-DNA-Sequenzen und regulieren positiv oder negativ die Transkription. Neben dem zellulären Jun Protein (cJun) ist auch das oncogene virale Jun Protein (vJun) bekannt. vJun ist ein 65 kDa großes Fusionsprotein, abgeleitet aus dem Avian Sarcoma Virus.

Das zelluläre Jun Protein wird Zellzyklus-unabhängig in den Nukleus transportiert und akkumuliert im Zellkern. Dagegen gelangt das vJun sehr schnell während der G2- und nur langsam während der G1- und S-Phase in den Zellkern (Abb. 7). Verantwortlich für diese Abhängigkeit des Imports vom Zellzyklus ist eine Cystein²⁴⁸ zu Serin²⁴⁸ Mutation nahe der Kernlokalisierungssequenz des Jun Proteins.^[24] Die NLS befindet sich in der DNA-Bindungsdomäne und besteht aus den fünf Aminosäuren R²⁴⁹KRKL²⁵³, sie ist identisch im zellulären und viralen Jun Protein. Phosphorylierung des Ser²⁴⁸ im vJun inhibiert den Kernimport, das vJun liegt folglich im Cytoplasma phosphoryliert und im Zellkern unphosphoryliert vor.^[24, 58]

Der Phosphorylierungsgrad eines Proteins wird bestimmt durch die Konkurrenz zwischen Phosphorylierung durch Proteinkinasen (z. B. PKA, PKC, CaM Kinase) und Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Die für die Dephosphorylierung von Ser²⁴⁸ des vJun verantwortliche Phosphatase wurde bisher noch nicht identifiziert, muss aber abhängig vom Zellzyklus sein, d. h. aktiv während der G2-Phase. Phosphorylierung des Ser²⁴⁸ im Zellkern führt dagegen zu einem Export des vJun (Abb. 7).

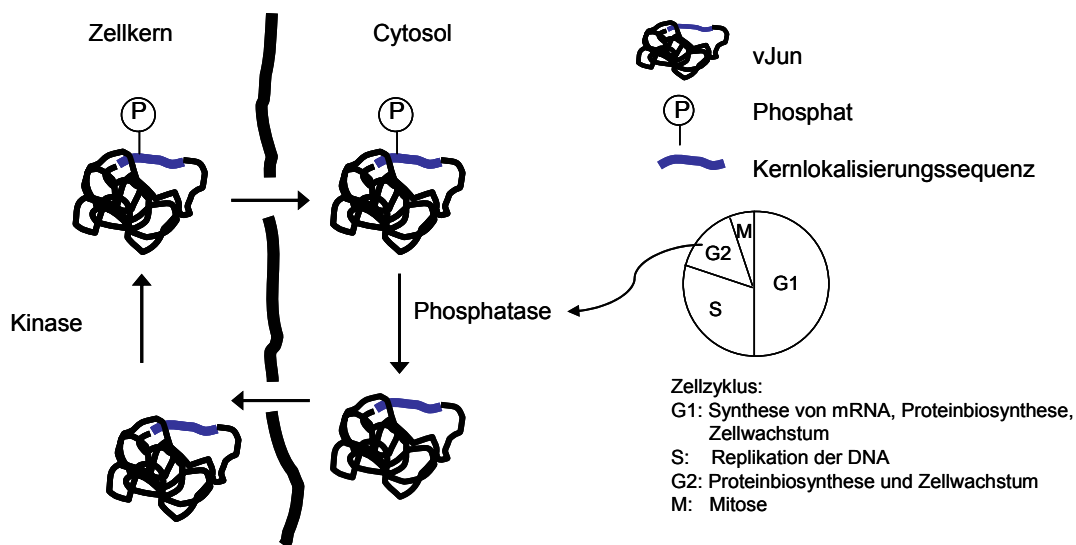


Abb. 7 Kernimport des vJun in Abhängigkeit vom Zellzyklus.

2.4 Ras Proteine

Zu den menschlichen Ras-Proteinen (*rat adeno sarcoma*) werden die H-, N- und K-Ras Proteine gezählt, von denen letzteres in den zwei Varianten K-Ras4A und 4B vorkommt. Sie gehören zu der Ras-Superfamilie, zu welcher außerdem noch die Rho, Ran, Rab, Arf und Kir/Rem/Rad Subfamilien gerechnet werden. Die Ras-Proteine haben ein Molekulargewicht von 21 kDa und unterscheiden sich nur in den letzten 25 C-terminalen Aminosäuren, der so genannten hypervariablen Domäne. Ras zählt zu den GTP-bindenden Proteinen (GTPasen) und reguliert verschiedene Signaltransduktionsprozesse. Es durchläuft dabei zyklisch einen GTP-gebundenen aktiven und einen GDP-gebundenen inaktiven Zustand und übersetzt so Wachstumssignale in die Expression von Genen (Abb. 8).^[59, 60]

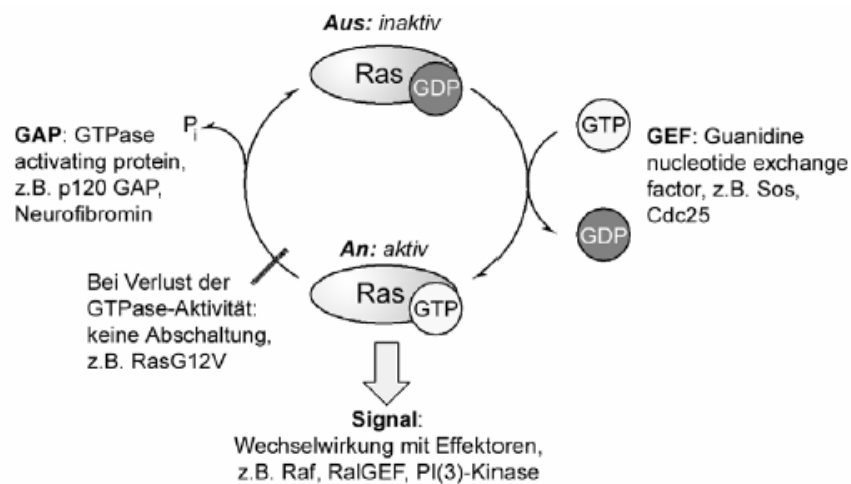


Abb. 8 Der Aktivierungszyklus von Ras.

Ras ist in verschiedene Signaltransduktionskaskaden eingebunden und hat somit regulatorischen Einfluss auf vielfältige Prozesse, einschließlich Zellwachstum und Zelldifferenzierung und die Steuerung von Zellzyklus und Apoptose.^[61] In Abb. 9 sind einige Signalkaskaden aufgezeigt, die durch Ras stimuliert werden. Inzwischen weiß man, dass nicht nur Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) Ras aktivieren, sondern auch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Tyrosinkinase wie Src. Ebenso stimuliert Ras seinerseits nicht nur das Raf-Protein und damit den MAPK-Signalweg (Mitogen Activated Protein Kinase), sondern auch die PI3-Kinase und den Ral-Signalweg. Die Ras-Proteine sind also in mehrere Signalkaskaden eingebunden und nehmen eine Schlüsselstellung in der Regulierung der zellulären Abläufe ein.

Aufgrund der vielfältigen regulatorischen Funktion von Ras-Proteinen hat eine Mutation in den *ras*-Genen, die dazu führt, dass die Proteine unfähig sind, GTP zu hydrolysieren und folglich im aktiven Zustand verbleiben, entscheidende Auswirkungen auf die Zelle. In 30% der menschlichen Tumore liegt Ras ausschließlich in der mutierten, aktivierten Form vor und bietet somit einen wichtigen Angriffspunkt in der Krebstherapie.^[60, 61] Um in dieses sensible System gezielt einzugreifen, ist es wichtig, die molekularen Vorgänge zu verstehen.

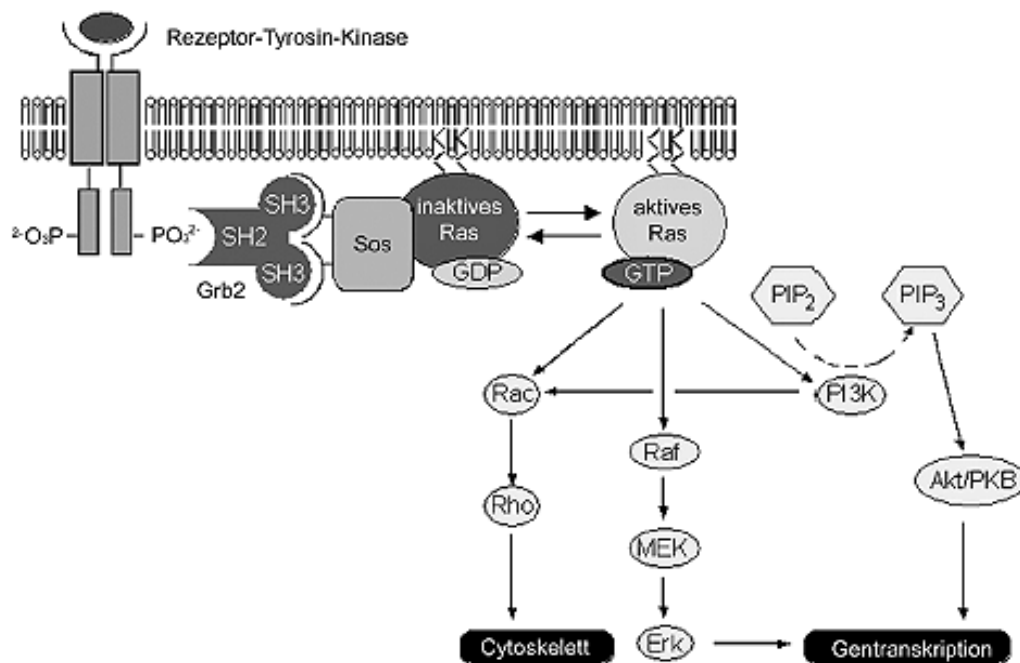


Abb. 9 Die Ras Signaltransduktionskaskade.

Die Ras-Proteine durchlaufen eine Reihe posttranslatieller Modifikationen der hypervariablen Domäne. Ohne diese Modifikationen sind die Proteine nicht an der Plasmamembran, sondern im Cytosol lokalisiert und nicht aktiv. Alle Ras-Proteine besitzen ein CaaX-Motiv, welches von Farnesyl- oder Geranygeranyltransferasen erkannt wird, die die entsprechenden Isoprenoide übertragen. Nach der Prenylierung wird das aaX-Tripeptid von einer Protease entfernt und das freie Cystein durch eine Methyltransferase verestert (Abb. 10). Daher tragen alle Ras-Proteine an ihrem C-Terminus einen farnesylierten Cysteinmethylester, in den folgenden Modifikationen unterscheiden sie sich allerdings. K-Ras4B erfüllt durch eine polybasische Sequenz in der Nähe des C-Terminus schon alle Bedingungen für eine irreversible Membranbindung und wird nicht weiter modifiziert. Die anderen Isoformen werden mit einem oder mehreren Palmitoylresten versehen (Abb. 10).^[62] Als eine Möglichkeit zur Lokalisation von N- und H-Ras an der Plasmamembran wird das sogenannte *kinetic trapping*-Modell diskutiert (Abb. 10). Tragen Ras-Proteine nur einen Farnesylrest, ist die Assoziation von Ras an die Membran nicht stabil, erst durch einen zweiten Lipidrest wird eine irreversible Bindung an die Membran erreicht.^[63, 64] Findet die

Einführung eines zweiten Lipidrestes durch enzymatische oder spontane Palmytoylierung eines weiteren Cystein von N- oder H-Ras an der Plasmamembran statt, so bleiben die Proteine dort lokalisiert. Ein alternatives Modell nimmt an, dass H- und N-Ras nach der Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi durch vesikulären Transport zur Plasmamembran gelangen.^[65] Der genaue Mechanismus der Bindung von Ras an die Transportvesikel ist nicht bekannt. Erfolgt er über stabile Verankerung durch vorherige Palmytoylierung der Proteine würde eine Palmytoyltransferase (PAT) im ER oder Golgi vorliegen. Als möglicher Kandidat für eine PAT wurde kürzlich Erf2p identifiziert.^[66]

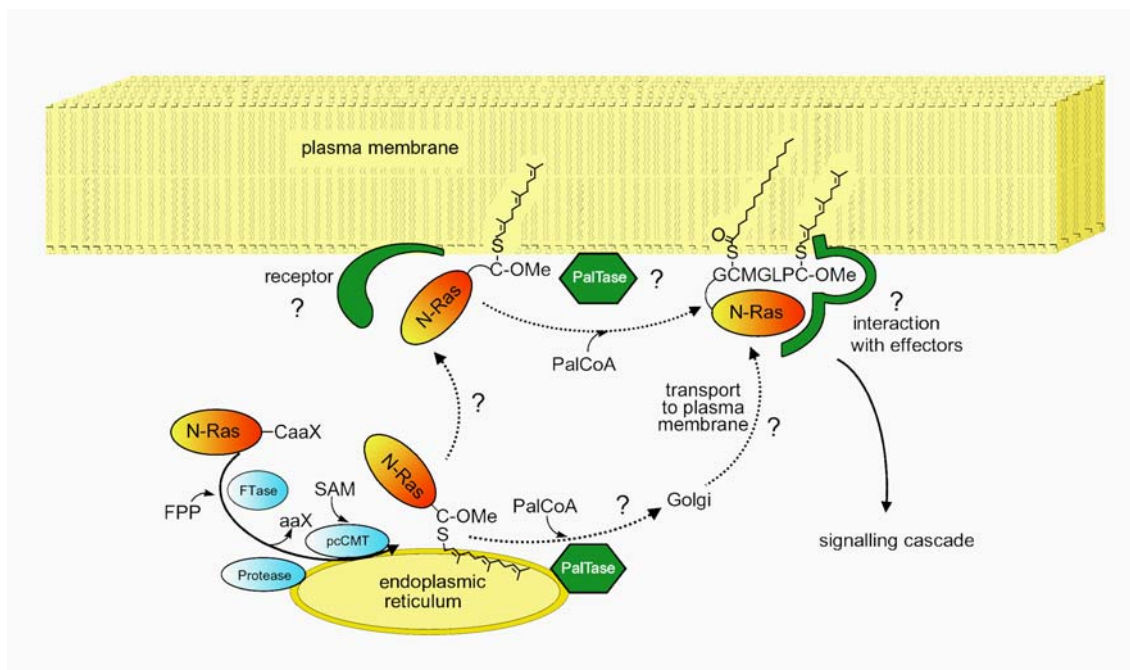


Abb. 10 Posttranslationale Modifikationen und Membranlokalisation von K-Ras4B und N-Ras. Abkürzungen: FPP: Farnesylpyrophosphat, FTase: Farnesyl Transferase, pcCMT: proteocytosolische Carboxymethyltransferase, SAM: S-Adenosyl-Methionin, PalCoA: Palmytoyl-Coenzym A, PalTase: Palmytoyltransferase.

Seit einiger Zeit wird die Plasmamembran nicht mehr als gleichförmige Lipiddoppelschicht angesehen, sondern als ein komplexes Mosaik einzelner Mikrodomänen. *Lipid rafts* sind solche Domänen in der Zellmembran, die sich durch eine veränderte Lipid- und Protein-Zusammensetzung von der restlichen Membran unterscheiden. Sie sind einerseits fluid, andererseits aber durch ihre laterale

Organisation auch geordneter und enger gepackt als die umgebende Lipiddoppelschicht. Der Unterschied in der Packungsform liegt darin begründet, dass die in den *rafts*-Strukturen vorkommenden Sphingo- und Phospholipide mehr gesättigte Kohlenwasserstoffketten aufweisen als die Phospholipide in der flüssig-kristallinen Phase der übrigen Lipidschicht.^[67] Es wird vermutet, dass sich einerseits *rafts* mit einer kurzen Lebensdauer ständig bilden und wieder auflösen, aber andererseits auch stabile Bereiche existieren. Dort findet zwar ein ständiger Fluss von individuellen Proteinen und Lipiden statt, doch auf der makroskopischen Ebene bleibt das *raft* stabil.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der *lipid rafts* ist die Fähigkeit, Proteine in unterschiedlichem Maß ein- bzw. auszuschließen und somit eine asymmetrische Verteilung an der Membran zu erzeugen. Hierbei übernehmen sie die Funktion von separaten Reaktionsräumen, in denen die Reaktionspartner in hoher Konzentration vorliegen und von umgebenden potentiellen Reaktionspartnern getrennt sind. So konnten *lipid rafts* bisher in einer Vielzahl von Signalprozessen identifiziert werden, wie zum Beispiel dem Ras-Signalweg.^[68] Ras-Proteine wechselwirken unterschiedlich mit Mikrodomänen, und diese Wechselwirkungen sind neben der Art und Anzahl der Lipidreste ebenfalls davon abhängig, ob die Proteine GTP- oder GDP-gebunden vorliegen. Dieses wird als mögliche Erklärung dafür diskutiert, dass sich die strukturellen Variationen in der hypervariablen Domäne tatsächlich in unterschiedlichem Signalverhalten bemerkbar machen.^[65, 69]

2.5 Peptidsynthese an der festen Phase

Synthetisch hergestellte Peptide stellen bei der Analyse von natürlichen Peptiden und Proteinen wichtige Hilfsmittel dar. Seit der Begründung der Peptidchemie durch Emil Fischer Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts^[70] wurden die Methoden zur synthetischen Herstellung von Peptiden kontinuierlich verbessert. Die Peptidsynthese an fester Phase (*solid-phase peptide synthesis, SPPS*), welche von R. B. Merrifield entwickelt wurde,^[71] zeigt sich als die Methode der Wahl zur Synthese von Peptiden und kleineren Proteinen mit spezifischer Sequenz. Diese Fortschritte führten zur

Synthese von großen Polypeptiden, bestehend aus bis zu 140 Aminosäuren. Nach wie vor stellt die Synthese von Peptiden ein herausforderndes Unterfangen dar. Einen guten Überblick über den Kenntnisstand der Peptidsynthese bietet die aktuelle Literatur,^[72, 73] hier sollen lediglich einige für diese Arbeit relevante Aspekte aufgezeigt werden.

2.5.1 Synthese lipidierter Peptide

Für die Synthese von modifizierten Peptiden gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: entweder kann die Modifikation durch Ankupplung modifizierter Bausteine oder durch nachträgliche Modifikation des selektiv geschützten Peptids eingeführt werden. Lipidierte Peptide sind sowohl in Lösung als auch an der festen Phase erfolgreich dargestellt worden, es gibt eine Reihe von Übersichtsartikeln über die zugrunde liegenden Synthesestrategien.^[74, 75] Dabei wurden einerseits lipidierte Bausteine verwendet, die sowohl in der Synthese an der festen Phase gekuppelt wurden oder auch im finalen Schritt in Lösung an ein unmodifiziertes Peptid kondensiert wurden. Andererseits ist sowohl die Palmitoylierung^[75-77] als auch die Farnesylierung^[77, 78] an der festen Phase möglich.

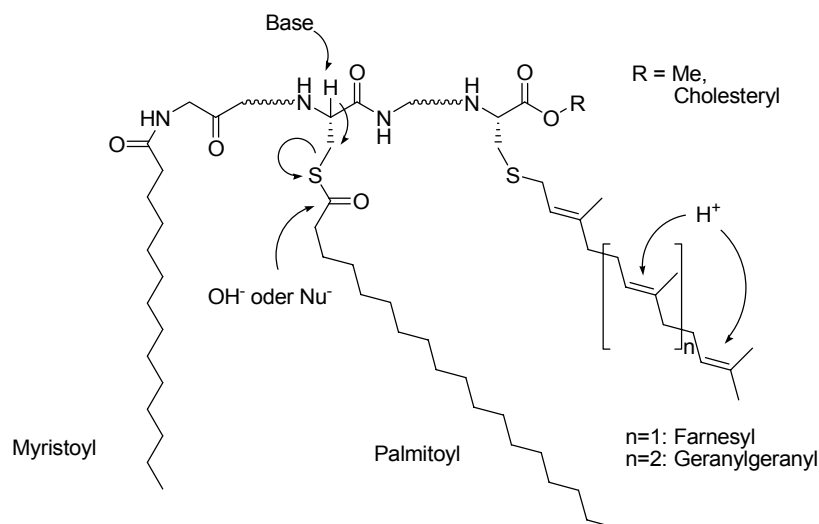


Abb. 11 Posttranslationale Lipidmodifikationen und ihre Labilität gegen Säuren und Basen.

Die Synthese lipidierter Peptide wird durch die ausgeprägte Labilität der einzelnen Lipidmodifikationen erschwert (Abb. 11). So sind die beiden Isoprenylgruppen Farnesyl und Geranylgeranyl empfindlich gegenüber Säuren, so dass sich der Einsatz säurelabiler Boc-Schutzgruppen genauso verbietet wie der hydrogenolytisch abzusplattendes Funktionalitäten, z. B. Z- oder Benzylgruppen. Eine Alternative können hingegen extrem säurelabile Schutzgruppen vom Trityl-Typ bieten, da zumindest farnesylierte Peptide Abspaltbedingungen mit verdünnter TFA (bis zu 5 % in CH_2Cl_2 v/v) für 1 Stunde tolerieren.^[79]

Im Gegensatz zu Isoprenylgruppen wird die Thioesterfunktion palmitoylierter Cysteine von Nucleophilen angegriffen und unter basischen Bedingungen kommt es unter Eliminierung zum Dehydroalanin.^[80] Insbesondere ist daher die Verwendung von Piperidin zur Abspaltung von Fmoc-Gruppen ausgeschlossen. Bei N-terminal freiem S-palmitoyliertem Cystein tritt als Nebenreaktion eine S,N-Acywanderung auf, wonach die terminale Aminfunktion für die weitere Synthese irreversibel blockiert wird.^[81] Dipeptid-Ester neigen ferner bei ihrer Entschützung zur Bildung von Diketopiperazinen. Bei der Synthese lipidierter Peptide ist es aus diesen Gründen oft schwierig, eine geeignete Schutzgruppenstrategie zu finden, besonders, wenn unterschiedliche Lipide eingebaut werden.

2.5.2 Synthese phosphorylierter und glycosylierter Peptide

Die Synthese phosphorylierter und glycosylierter Peptide ist oft nicht mit den Standardprozeduren der Peptidsynthese in Lösung und an fester Phase möglich, da die zusätzliche Komplexität und Labilität berücksichtigt werden müssen (Abb. 12). Glyco- und Phosphopeptide neigen bei pH-Werten über 9 zur β -Eliminierung unter Ausbildung von Dehydroalaninderivaten.^[82] Zu acide Bedingungen können bei Glycopeptiden hingegen zur Anomerisierung oder zum Verlust des Zuckerrestes führen.^[83] Daher ist besonders die Wahl der Schutzgruppen wichtig, um ein selektives Entfernen dieser Gruppen zu ermöglichen, ohne die säure- oder basenlabile Bindungen

zu gefährden. Auf Grund der hohen biologischen Relevanz dieser Peptidkonjugate wurden in den letzten Jahren zahlreiche Verfahren zu ihrer Synthese etabliert.^[73, 84, 85]

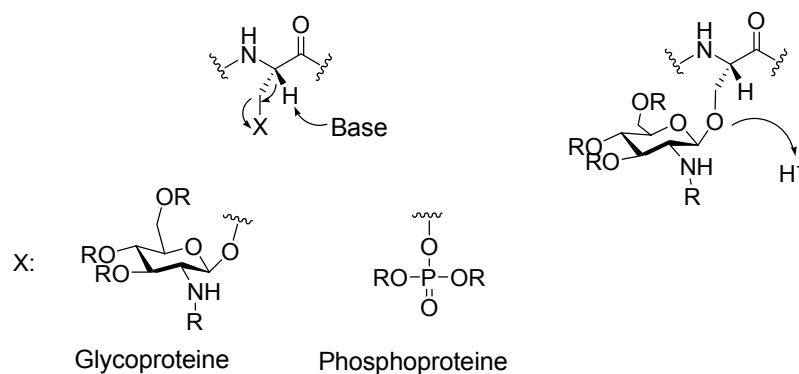
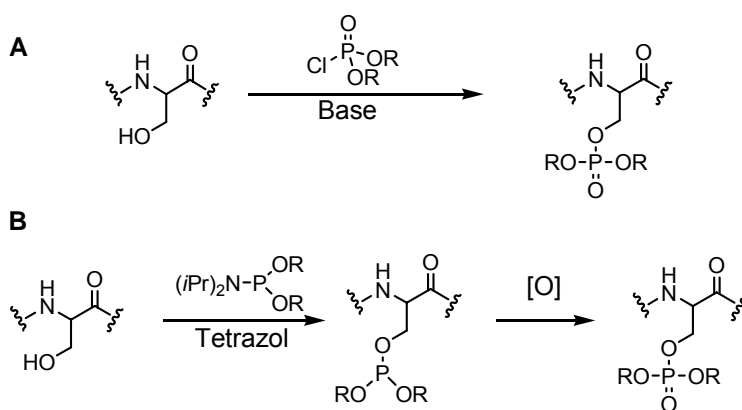


Abb. 12 Basen- und Säurelabilität von Glyco- und Phosphopeptiden.

Der entscheidende Schritt bei der Glycopeptidsynthese, die Einführung des Zuckers, kann, wie schon erwähnt, durch Glycosylierung des unmodifizierten Peptids oder über Kupplung glycosylierter Bausteine erfolgen.^[73, 86] Stereoselektive Kondensation von komplexen Glycosyldonoren oder -akzeptoren ist aufgrund der schlechten Löslichkeit unter O-Glycosylierungsbedingungen schwierig, wurde aber vereinzelt erfolgreich durchgeführt.^[87] Die Synthese mit geschützten glycosylierten Bausteinen dagegen ist verlässlicher und effizienter für sowohl N- als auch O-glycosylierte Peptide. Diese Bausteine müssen allerdings zuerst in Lösung synthetisiert werden.^[88] Die glycosidische Bindung häufig vorkommender Zucker, wie z. B. GalNAc, GlcNAc, Gal, Glc und Man, besonders wenn sie acetyliert sind, ist für kurze Zeit stabil gegenüber TFA, so dass die in der SPPS üblichen säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen genutzt werden können. Allerdings ist die Stabilität der O-glycosidischen Bindung auch abhängig von der Struktur des Glycopeptides und dem Überschuss an Scavenger, der bei der Abspaltung eingesetzt wird.^[86]

Analog der Glycopeptidsynthese gibt es auch für die Phosphopeptidsynthese die Möglichkeit der globalen Phosphorylierung als finalen Schritt der Synthese, oder der Einsatz von phosphorylierten Aminosäuren als Bausteine. Bei der globalen Phosphorylierung werden Peptide mit ungeschützten Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenketten entweder noch an der festen Phase oder in Lösung phosphoryliert. Die

Bausteinmethode ist hier der unkompliziertere Ansatz und mittlerweile die Standardmethode für die Synthese von Phosphopeptiden. Für die Synthese von phosphorylierten Aminosäuren und auch für die Phosphorylierung von Peptiden gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, die Phosphorchloridat- und die Phosphoramidit-Methode. Bei der Phosphorchloridat-Methode wird das geschützte Peptid bzw. die Aminosäure mit dem Phosphorsäureesterchlorid unter alkalischen Bedingungen direkt zum entsprechenden Phosphat umgesetzt. Bei Synthesen nach der Phosphoramidit-Methode wird das geschützte Peptid bzw. die Aminosäure zuerst mit dem Phosphoramidit zum Phosphit umgesetzt, welches dann *in situ* zum Phosphat oxidiert wird (Schema I).^[85]



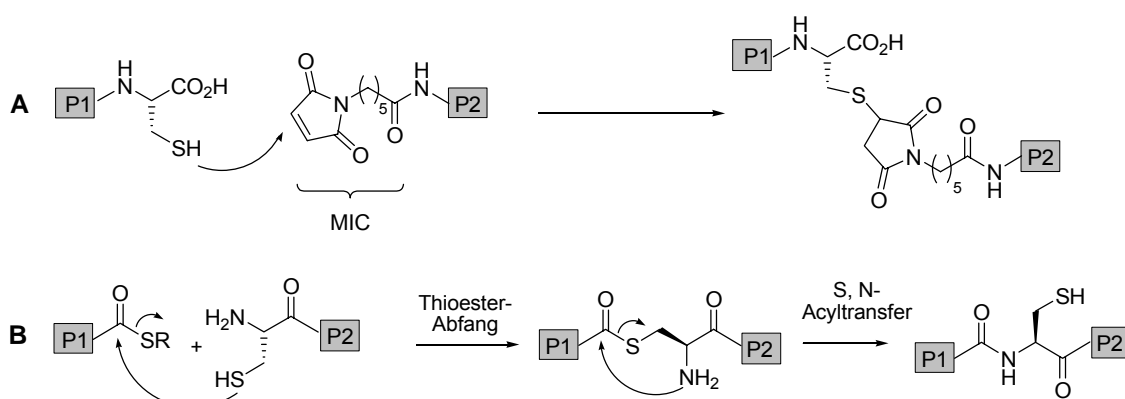
Schema I Phosphorylierungsmethoden. A) Phosphorchloridat-Methode; B) Phosphoramidit-Methode.

2.6 Bioorganische Synthese von Protein-Peptid-Konjugaten

Proteine mit definierten Modifikationen sind wichtige Hilfsmittel bei vielen biologischen Fragestellungen. Die Synthese von Proteinen mit natürlichen posttranslationalen oder auch unnatürlichen Modifikationen kann über die Verknüpfung von Peptidsequenzen erreicht werden. So können unnatürliche Aminosäuren in Proteine eingebaut werden, welche dadurch ein ganzes Spektrum an Anwendungen erlauben. Möglichkeiten sind z. B. der ortsspezifische Einbau von Aminosäureseitenketten mit Reportergruppen für spektroskopische Methoden (Chromophore, Isotopen für NMR und FTIR), von Resten mit einer veränderten

Rückgratchemie, oder von Resten mit Funktionalitäten für Quervernetzung oder für Immobilisierung auf Oberflächen. Ein zusätzliches Anwendungsgebiet ist die Herstellung von Proteinen mit natürlichen posttranslationalen Modifikationen, die durch Proteinexpression nicht oder nur schwer zugänglich sind, wie z. B. lipidierte oder phosphorylierte Proteine.

Ein wichtiges Kriterium für solche Fragmentkupplungen ist die hohe Selektivität und Effizienz der Reaktion unter wässrigen Bedingungen, nur wenige Reaktionen erfüllen diese Anforderungen. Eine Möglichkeit der Verknüpfung von Peptiden und Proteinen ist die Verwendung der Maleinimidocaproyl- (MIC-) Gruppe. Hierbei wird durch die Reaktion der Thiol-Gruppe eines am Protein befindlichen Cysteins mit dem am N-Terminus des Peptids befindlichen MIC an der Ligationstelle eine stabile Thioetherbindung erzeugt (Schema 2 A).^[89] Allerdings ist diese Methode im Hinblick auf das Protein eingeschränkt, da gewährleistet sein muss, dass nur das endständige Cystein reagiert und weitere vorhandene Cysteine entweder als Disulfide vorliegen oder aufgrund ihrer räumlichen Anordnung nicht reagieren können. Ein erfolgreiches Beispiel für eine solche Ligation stellt die Synthese von Ras-Proteinen dar, die in hoher Reinheit im Multimilligramm-Maßstab erhalten werden können.^[90, 91] Die so erzeugten Proteine zeigten trotz der nicht nativen Verknüpfungsstelle eine biologische Aktivität, die mit der von natürlichen Proteinen übereinstimmte.



Schema 2 Synthese von Protein-Peptid Konjugaten. A) MIC-Kupplung; B) native chemical ligation (NCL).

Neben einigen weiteren Verknüpfungsmethoden bei denen ebenfalls nichtartifizielle Peptidbindungen erhalten werden,^[92] werden die Fragmente bei der nativen chemischen Ligation (*native chemical ligation*, NCL)^[93] über eine Amidbindung verknüpft. Ein C-terminaler Proteinthioester reagiert mit der Thiolgruppe des zweiten Fragments zu einem Thioester, welcher sich über einen intramolekularen S,N-Acyltransfer zu einem Amid umlagert (Schema 2 B). Das Prinzip der NCL wird bei der als Verknüpfung exprimierter Proteine (*expressed protein ligation*, EPL)^[94] bzw. der als Intein-vermittelten Proteinverknüpfung (*intein-mediated protein ligation*, IPL)^[95] bezeichneten Methoden genutzt. Ein Vorteil der Produkte besteht darin, dass sie im Gegensatz zu MIC-Konjugaten eine native Peptidstruktur aufweisen, zumindest wenn der Verknüpfungspunkt der Ligation an einem natürlich vorkommenden Cystein liegt. Die auf der NCL aufbauende Methodik ist vielseitig einsetzbar, beschrieben sind mittlerweile unter anderem die Synthese von Lipo-^[96] Glyco-^[97] und Nucleopeptiden^[98].

3 Ziel der Arbeit

Um Aussagen über komplexe molekularbiologische Vorgänge zu treffen, werden an diesen Prozessen beteiligte Proteine bzw. Partialstrukturen dieser Proteine als wichtige Hilfsmittel eingesetzt. Viele dieser Proteine sind posttranslational modifiziert und gerade diese Modifikationen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins. Der Zugang zu diesen posttranslational modifizierten Proteinen ist über Proteinexpression nicht oder nur schwer möglich. Die chemische Synthese von posttranslational modifizierten Peptiden und Proteinen bietet die Möglichkeit Modifikationen gezielt einzubringen. Zusätzlich können neben den natürlich vorkommenden Modifikationen beliebige Gruppen wie z. B. Fluorophore eingeführt werden.

Das N-Ras-Protein ist ein zentraler Schalter in der Wachstumskontrolle von Zellen. Der C-Terminus des N-Ras ist doppelt lipidiert und diese Lipidierungen sind ausschlaggebend für die Aktivität des Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Synthese entwickelt werden, um Fluoreszenz-markierte, und doppelt lipidierte N-Ras Proteine darzustellen (Abb. 13). Diese Fluoreszenz-markierten Proteine sollen in biophysikalischen und molekularbiologischen Untersuchungen Auskunft über den Einfluss der Modifikationen auf die Lokalisation und Aktivität des Proteins geben.

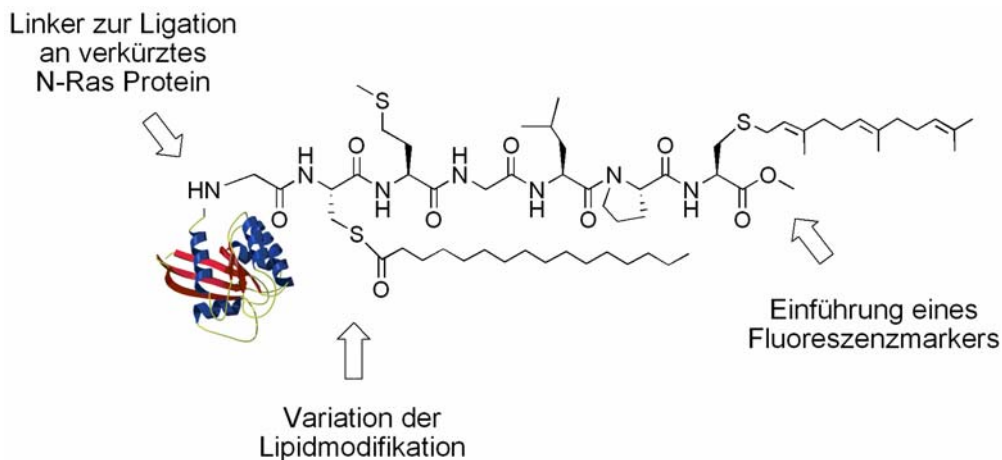


Abb. 13 Das N-Ras-Protein und möglichen synthetischen Variationen.

Zunächst soll die Festphasensynthese modifizierter Peptide, welche dem C-Terminus des N-Ras entsprechen, ausgearbeitet werden, um diese anschließend über eine Linkergruppe mit verkürztem N-Ras-Protein zu verknüpfen. Die Synthese soll die Möglichkeit bieten, flexibel verschiedene Lipidmodifikationen einzuführen. Ein Fluoreszenzmarker soll weder die Eigenschaften des Proteins beeinflussen, noch in dem intensiven Licht des Lasermikroskops rasch ausbleichen.

In dem zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf den Kernimport untersucht werden. Am Beispiel der Kernlokalisierungssequenz des vJun-Proteins soll die Fähigkeit eines NLS-Peptides untersucht werden, ein beliebiges Transportgut in den Zellkern zu adressieren. Zusätzlich sollen die Regulationsmöglichkeiten des Transportes durch Phosphorylierung und Glycosylierung untersucht werden.

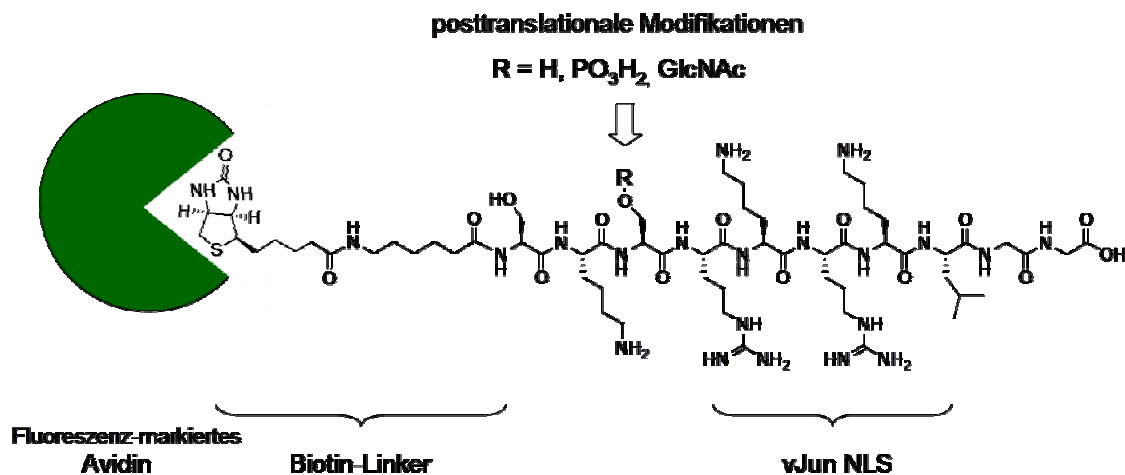


Abb. 14 Verschieden modifizierte vJun-NLS-Peptide mit einem Biotin-Linker zur Konjugation an Fluoreszenz-markiertes Avidin.

Peptide mit einer an die vJun-NLS angelehnten Sequenz sollen über Festphasensynthese so aufgebaut werden, dass verschiedene Modifikationen in Nachbarstellung zur NLS eingebracht werden können (Abb. 14). Ferner soll ein Linker zur Verknüpfung mit einem Protein eingebaut werden. Dieses Protein dient einerseits

als Transportgut, andererseits verhindert es auch eine unselektive Diffusion in den Zellkern.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung peptidischer Transporter, die in der Lage sind die Plasmamembran zu durchdringen und in den Zellkern zu translokieren (Abb. 15). Konjugate aus einer hydrophoben Proteintransduktionsdomäne (PTD) und einer hydrophilen Kernlokalisationssequenz (NLS) sollten diese Eigenschaften besitzen. Eine Synthesestrategie an der festen Phase soll einen Zugang zu diesen amphiphilen Peptiden schaffen. Für die anschließende zellbiologische Evaluierung über Fluoreszenzmikroskopie soll ein Fluorophor, der im Laserlicht des Mikroskops stabil ist, eingeführt werden.

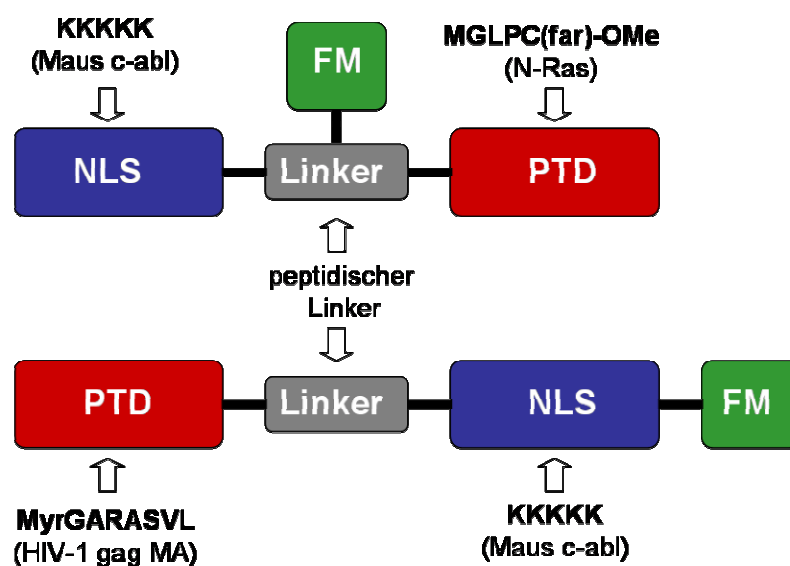


Abb. 15 Aufbau Fluoreszenz-markierter PTD-NLS-Konjugate. FM = Fluoreszenzmarker.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Semisynthetische N-Ras-Proteine

Dieser Teil der Arbeit behandelt die Synthese von fluoreszenzmarkierten N-Ras-Proteinen für biophysikalische und biologische Untersuchungen an Modellmembranen sowie *in vivo* unter Verwendung der Laserfluoreszenzmikroskopie.

Das menschliche N-Ras-Protein besteht aus 186 Aminosäuren und ist an der C-terminalen hypervariablen Region zweifach lipidiert: Cys¹⁸¹ ist mit einer Palmitinsäure verestert und an das endständige Cys¹⁸⁶ ist ein Farnesylrest als Thioether gebunden. Die terminale Carboxylgruppe ist als Methyl ester geschützt (Abb. 16).

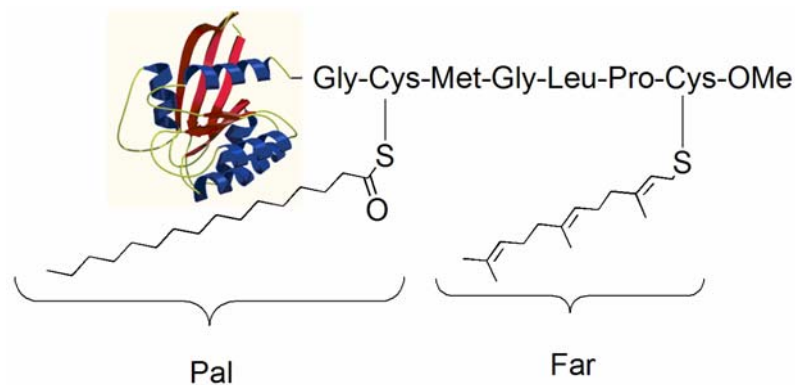


Abb. 16 C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins.

Die Synthese von fluoreszenzmarkierten Ras-Proteinen muss folgende Bedingungen berücksichtigen:

- Die Synthesestrategie sollte flexibel das Einführen verschiedener Lipidreste und Fluorophore ermöglichen.
- Der Linker für die Verknüpfung des synthetischen C-terminalen Fragments mit dem verkürzten Ras-Protein sollte nicht die biologische Aktivität des Proteins beeinflussen, und die Kupplung sollte in hohen Ausbeuten und ohne irreversible Denaturierung der Proteinstruktur durchführbar sein.

- Ein kleiner Fluorophor mit hoher Quantenausbeute sollte eingesetzt werden, der nicht im Laserlicht ausbleicht und *in vivo* detektierbar ist. Er sollte so wenig wie möglich die biologische Aktivität von Ras und dessen Wechselwirkungen mit der Plasmamembran beeinflussen.

Aufbauend auf die Arbeiten von R. REENTS,^[99] in denen erfolgreich einfach lipidierte und fluoreszenzmarkierte Ras-Proteine hergestellt wurden, soll diese Methodik auf doppelt lipidierte Proteine erweitert werden. In einer konvergenten Strategie wird ein C-terminales, fluoreszenzmarkiertes und lipidiertes Peptid über Festphasensynthese aufgebaut, und an bakteriell überexprimiertes, nicht-prozessiertes, C-terminal verkürztes Ras-Protein gekoppelt. Zur Verknüpfung des synthetischen Peptids mit dem verkürzten Ras-Protein dient der schon in früheren Synthesen erfolgreich eingesetzte Maleimidocaproyl- (MIC-) Linker.^[90, 91, 100]

Der Fluoreszenzmarker soll an Stelle des C-terminalen Methylesters eingeführt werden, welcher vermutlich nur der Erhaltung der Lipophilie des Ras C-Terminus dient.^[101] Wie in NMR-Untersuchungen gezeigt werden konnte, liegt das Peptidrückgrat bei Membran-gebundenen N-Ras-Peptiden außerhalb der Membran, während die Lipidseitenketten in die Phospholipidschicht der Membran eingelagert sind.^[102] So ist gewährleistet, dass ein C-terminaler Fluorophor nicht die Wechselwirkungen des Proteins mit der Plasmamembran beeinflusst, im Gegensatz zu einem Fluorophor, der in einer Aminosäureseitenkette eingebracht wird. Aufgrund der Tatsache, dass durch Inhibierung der zur humanen Isoprenylcystein Carboxymethyltransferase (pcCMT) homologen Hefetransferase STE14 nur geringfügige Auswirkungen auf die Funktion und Lokalisation von Ras entstehen, kann vermutet werden, dass die Methylestergruppe kein Erkennungsmotiv für spätere Effektoren darstellt.^[103] Um mögliche sterische Interaktionen des Proteins durch die fluorophore Gruppe zu verhindern, wurde zur Anknüpfung an das C-terminale Ras-Peptid ein Ethylendiaminlinker verwendet. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ein solches semisynthetisches Ras-Protein tatsächlich weiterhin biologisch aktiv ist.^[104]

4.1.1 Synthese Fluoreszenz-markierter Ras-Peptide

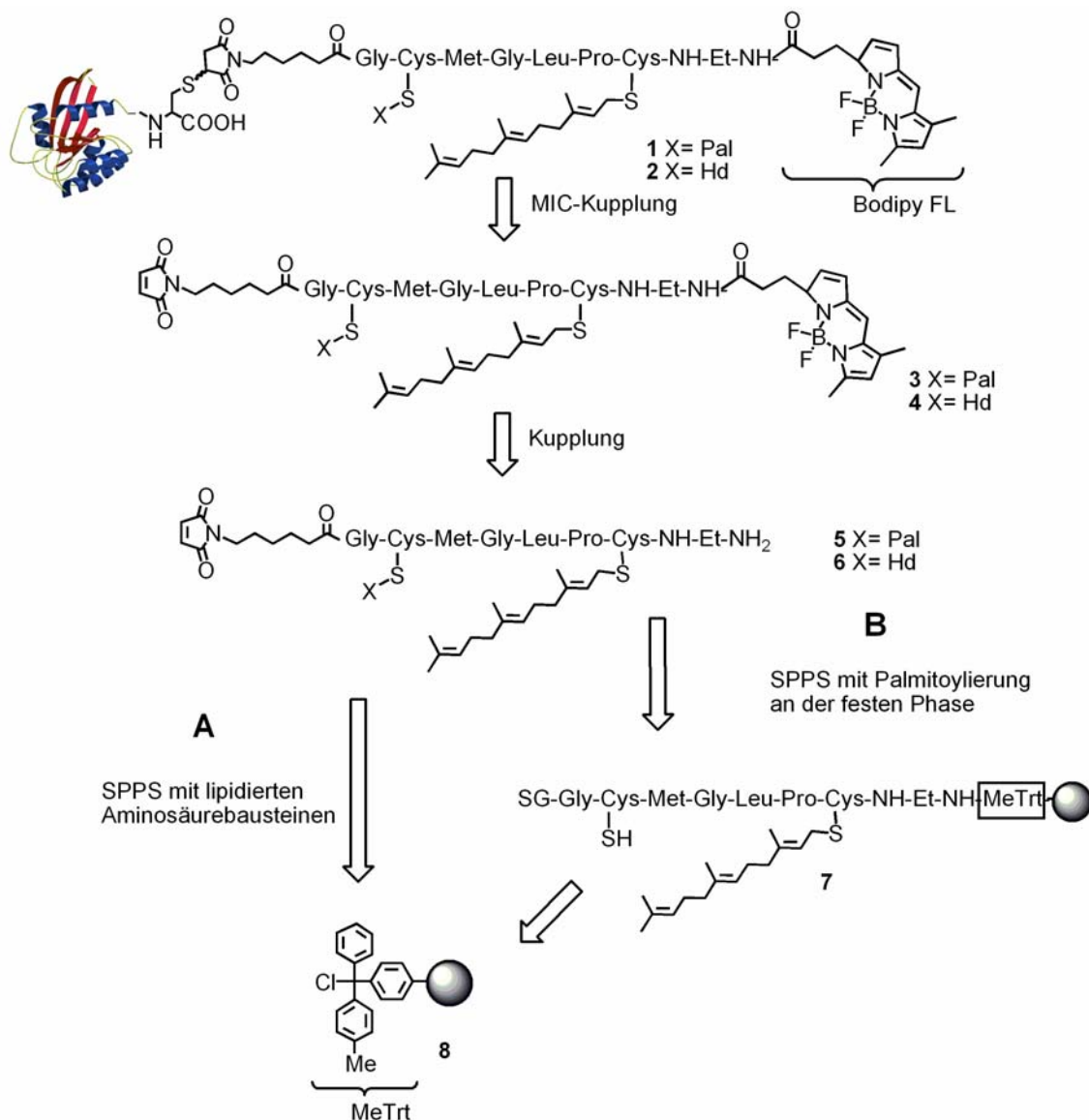
Das C-terminale N-Ras-Heptapeptid weist folgende Merkmale auf:

- ein basenempfindlicher Palmitoylrest, welcher als Thioester an Cys¹⁸¹ gebunden ist;
- ein säurelabiler Farnesylrest, welcher als Thioether an Cys¹⁸⁶ gebunden ist;
- ein C-terminaler Cysteinmethylester.

Die Kombination von säure- und basenempfindlichen Gruppen erschwert die Synthese von Peptiden, welche dem C-Terminus von N-Ras entsprechen, erheblich. Für die Synthese der Peptide musste daher besondere Sorgfalt auf die Wahl der Schutzgruppen gelegt werden. Als Linker für die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) wurde deshalb der extrem säurelabile 4-Methyl-trityl-Linker verwendet, der die Möglichkeit bietet, eine Farnesylgruppe zu Beginn der Synthese einzuführen, ohne die isolierten Doppelbindungen der Isoprenylgruppe zu gefährden. Hierbei wurde die Ethylendiamineinheit, die später als Abstandhalter bei der Verankerung der fluorophoren Gruppe diente, zur Anknüpfung an den Linker verwendet. Als Amin-Schutzgruppe wurde entsprechend die 9-Fluorenyl-methoxycarbonyl- (Fmoc-) Gruppe, die sich unter milden basischen Bedingungen abspalten lässt, ausgewählt.

Das Zielpeptid sollte an Cys¹⁸¹ mit dem natürlichen Palmitoylthioester (**3**) sowie einem stabilen Hexadecylthioether (**4**) synthetisiert werden (Schema 3). Einen Schlüsselschritt bei der Synthese stellt die Einführung der basenlabilen Palmitoylgruppe dar. Für die Festphasensynthese standen zwei Strategien zur Verfügung. Zum einen konnten die lipidierten Aminosäurebausteine direkt beim Aufbau der Peptidkette eingesetzt werden (Schema 3 **A**), oder alternativ als Seitenketten-geschütztes Cystein eingeführt werden, welches im folgenden an der festen Phase modifiziert werden konnte (Schema 3 **B**). Ein Vorteil des ersten Ansatzes ist die flexible Anwendung und die Möglichkeit der Automatisierung der Synthese. Allerdings besteht bei der Synthese palmitoylierter Peptide das Problem der *S,N*-Acylwanderung^[81] und zusätzlich müssen

die erforderlichen Aminosäurebausteine zuvor in Lösung synthetisiert werden. Diese Probleme werden bei der Lipidierung am Harz umgangen, andererseits ist dieser Weg durch die zusätzlichen Schritte an der festen Phase nicht für automatisierte, kombinatorische Synthesen geeignet. In dieser Arbeit wurden aufgrund der flexibleren Anwendungsmöglichkeiten hauptsächlich lipidierte Aminosäurebausteine eingesetzt, für die Synthese des palmitoylierten Peptides wurde aber zusätzlich die Palmitoylierung am Harz untersucht (Schema 3).

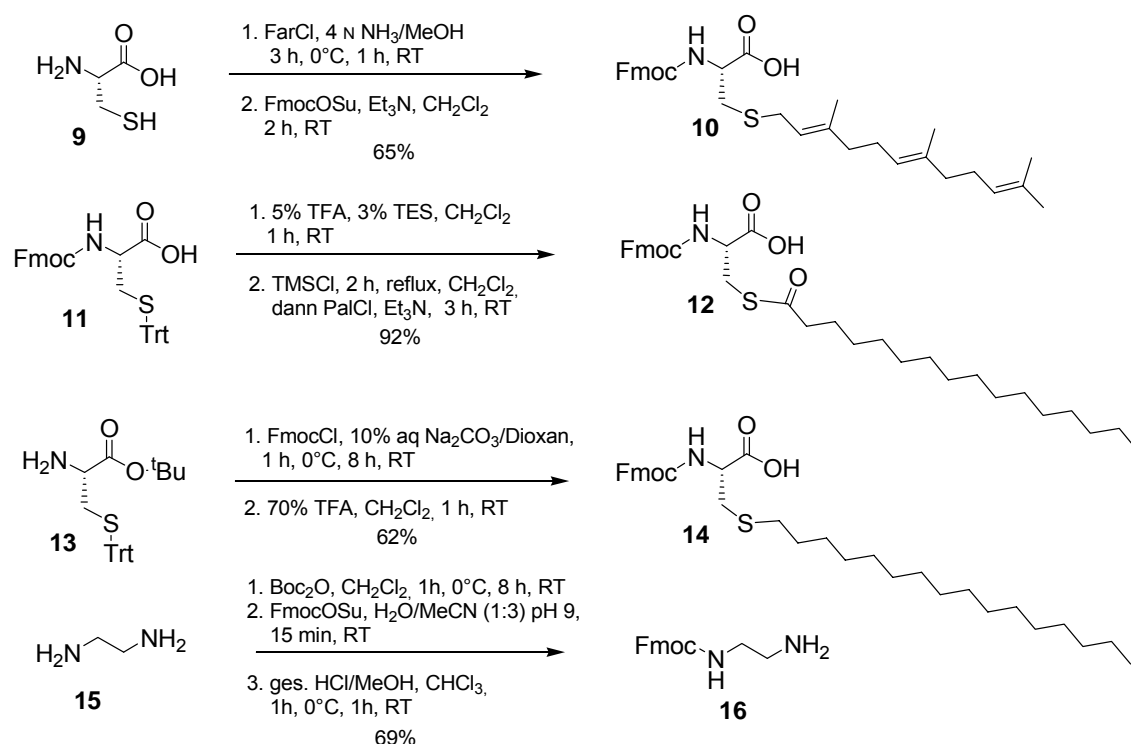


Schema 3 Retrosynthese der doppelt lipidierten, fluoreszenzmarkierten N-Ras Peptide. SG=Schutzgruppe.

Die MIC-markierten Peptide **5** und **6** können unter mild sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und in einem letzten Schritt in Lösung mit dem Fluorophor verknüpft werden. Als Fluorophor diente in diesem Fall aufgrund seiner günstigen Eigenschaften Bodipy FL. Bodipy FL wurde 1988 von R. Haugland *et al.* für Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) als optimiertes Analogon in der 1968 entwickelten Klasse der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen Farbstoffe synthetisiert.^[105] Es weist Emissionsmaxima im Bereich von Fluorescein (515 nm) auf und gilt bei hoher Quantenausbeute als besonders photostabil.^[106]

Zur Herstellung der Heptapeptide sollte Polystyrolharz mit einem 4-Methyl-Trityl-Linker **8** verwendet werden. Dieser Linker ist extrem säurelabil und erlaubt das Abspalten der Produkte mit nur 1% TFA in Dichlormethan. Eine noch mildere Variante ist das Abspalten mit 30% Hexafluoroisopropanol (HFIP).

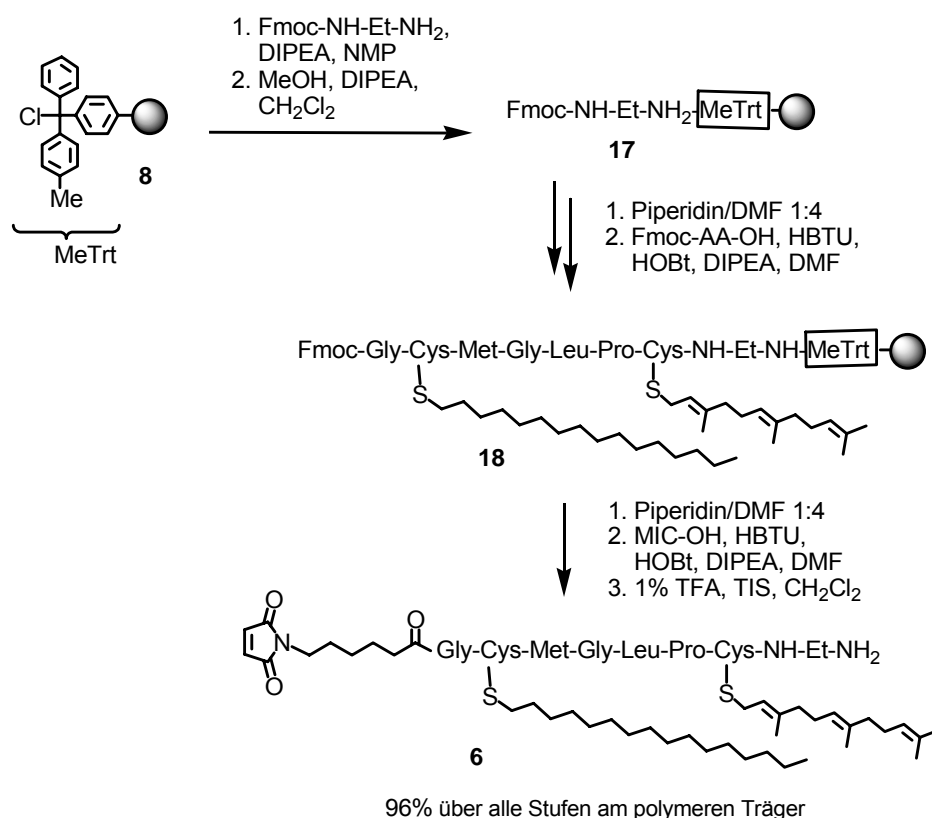
Die erforderlichen Fmoc-geschützten Bausteine N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-farnesyl-L-cystein Fmoc-Cys(far)-OH (**10**), N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-palmitoyl-L-cystein Fmoc-Cys(pal)-OH (**12**), N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-hexadecyl-L-cystein Fmoc-Cys(hd)-OH (**14**) und Fluorenylmethoxycarbonyl-ethylendiamin (**16**) wurden nach Optimierung der Synthesen in guten Ausbeuten in Lösung dargestellt (Schema 4). Besonders bei der Synthese von Fmoc-Cys(far)-OH (**10**) konnte die Ausbeute durch Umkehr der Syntheseschritte im Vergleich zu früheren Synthesen auf 65% gesteigert werden.



Scheme 4 Synthese Fmoc-geschützter Synthesebausteine.

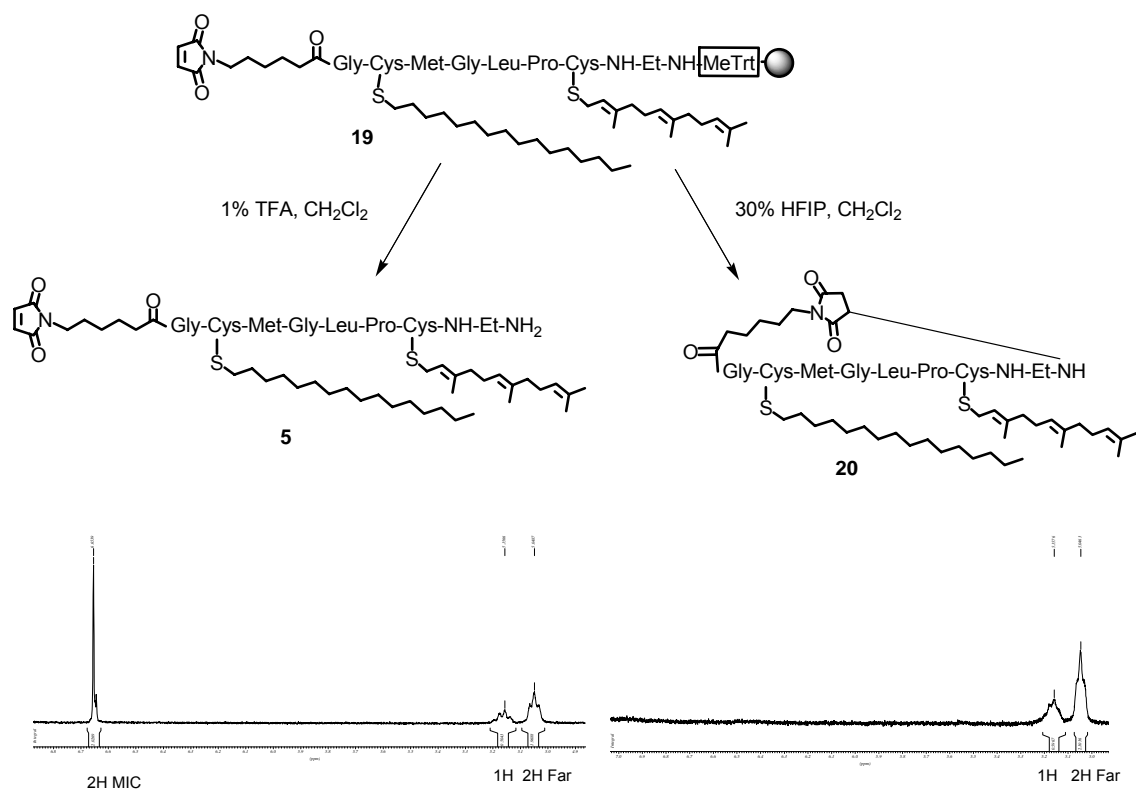
Synthese des hexadecylierten und farnesylierten Peptids 4

Für die Synthese des Hexadecyl- und Farnesyl-modifizierten Heptapeptids **6** wurde zunächst Fmoc-Ethylendiamin unter basischen Bedingungen an das 4-Methyl-Tritylharz gebunden und die überschüssigen Anknüpfstellen abgesättigt, indem das Harz mit MeOH / DIPEA behandelt wurde. Die Fmoc-Gruppen wurden mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten, die Kettenverlängerung erfolgte unter Aktivierung mit HBTU und HOBt. Durch anschließendes *Capping* mit 10 % Ac₂O in Pyridin können ungekuppelte Aminofunktionen acyliert werden; hier war dieses *Capping* aufgrund der quantitativen Kupplungen jedoch überflüssig. Nach der Darstellung des Hexapeptids wurde das terminale Amin entschützt und das polymergebundene Peptid **18** mit Maleimidocaprinsäure (MIC-OH) verlängert. Die Abspaltung des Produktes vom Harz mit 1 % TFA in CH₂Cl₂ liefert das Peptid **6** in hoher Reinheit und sehr guten Ausbeuten von 96% (Schema 5).



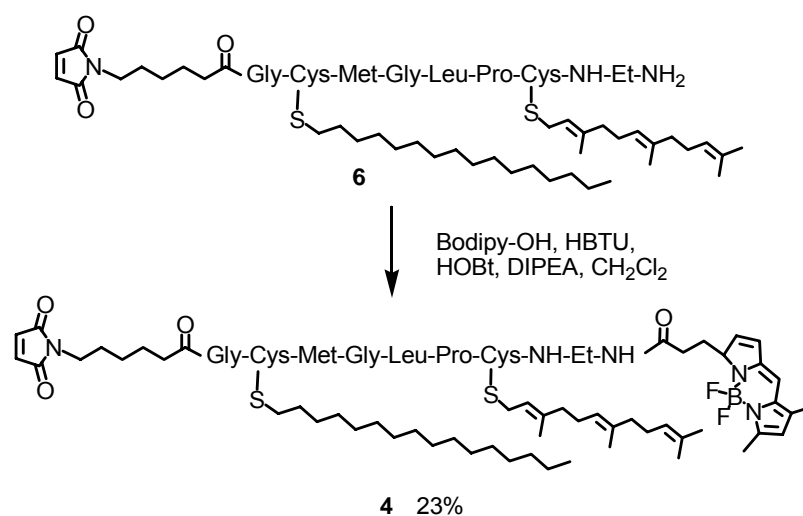
Schema 5 Synthese des Hexadecyl- und Farnesyl-modifizierten Heptapeptides **6** am polymeren Träger.

Unter diesen sehr milden Abspaltbedingungen bleibt die säurelabile Farnesylgruppe intakt. Versuche, das Peptid mit 30% HFIP in CH₂Cl₂ als noch mildere Alternative abzuspalten, führten allerdings zu einem zyklischem Produkt. Bei pH > 7 reagieren Maleimide mit primären Aminen in einer Michael-artigen Reaktion. Unter den schwach sauren Bedingungen der HFIP-Abspaltung führt vermutlich die besondere Konformation zu dem zyklischen Peptid **20**, indem die N-terminale MIC-Gruppe mit dem C-terminalen freien Amin reagiert. Da beide Peptide die gleiche Masse besitzen, kann dieses ungewünschte Reaktionsprodukt nur über NMR-Analyse des charakteristischen Signals der MIC-Doppelbindung nachgewiesen werden (Schema 6).



Schema 6 Untersuchung der Abspaltung von dem MeTrt-Linker.

Die Sequenz MIC-Gly-Cys(S-hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(S-far)-NH-Et-NH₂ **6** konnte ohne Aufreinigung an das Fluorophor Bodipy FL gekuppelt werden. Hierbei wurde mit den Kupplungsreagenzien HBTU / HOBt die besten Ausbeuten erzielt (Schema 7). Das Zielpeptid MIC-Gly-Cys(S-hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(S-far)-NH-Et-NH-Bodipy FL **4** konnte nach chromatographischer Aufreinigung in 23% Ausbeute erhalten werden.



Schema 7 Synthese des Bodipy-markierten Peptid 4.

Die Analyse doppelt lipidierter Peptide ist mit Standardmethoden nicht immer möglich. Massenspektrometrische Untersuchungen mit MALDI-TOF-MS können nur mit Peptiden ohne Fluorophor, wie z. B. Bodipy, durchgeführt werden, da Fluorophore im Laserlicht des MALDI-Spektroskops fragmentieren. Alternativ bietet sich Analytik mittels ESI-MS an, hier sind allerdings die Bedingungen für die Messung entscheidend, besonders, wenn die RP-HPLC-MS-Kopplung genutzt wird um die Reinheit des Produktes zu bestimmen. Ist das Peptid mit zwei Lipidresten modifiziert, und dadurch sehr lipophil, und besitzt es zusätzlich noch ein freies Amin, kann es unter Standardbedingungen nicht auf einer C4-Säule gemessen werden. Um dennoch verwertbare Spektren zu bekommen, wurde eine spezielle Methode entwickelt: Das Lösemittelgemisch für die HPLC wurde mit 10 mM NH₄OH leicht basisch eingesetzt, so dass freie Amine nicht protoniert sind. Dadurch bekommt man eine gute Auftrennung in der HPLC, allerdings ist die Intensität der Signale im Massenspektrum relativ schwach, da im Massenspektrometer positiv geladene Molekülonen detektiert werden. Auf diese Weise konnten die Zwischenprodukte und auch das Endprodukt charakterisiert werden.

Synthese des palmitoylierten und farnesylierten Peptids 3

Die Synthese des palmitoylierten und farnesylierten Peptides **5** gestaltet sich deutlich schwieriger, da hier durch die Labilität des Palmitoylthioester gegenüber Basen und Nucleophilen ein zusätzlicher Faktor für die Wahl der Schutzgruppen hinzukommt. Eine Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe nach der Standardmethode mit 20% Pyridin ist in diesem Fall nicht möglich. Eine sehr milde, nicht-nucleophile Variante der Fmoc-Entschützung kann mit 1% 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in DMF in wenigen Sekunden durchgeführt werden.^[107] Alternativ wurde zunächst die Allyloxycarbonyl- (Aloc-) Gruppe als weitere orthogonale Schutzgruppe genutzt, die sich unter neutralen Bedingungen katalytisch mit Pd(0) abspalten lässt. Zusätzlich muss beachtet werden, dass nach der N-terminalen Entschützung von S-palmitoyliertem Cystein der Palmitoylrest in einer S,N-Acylwanderung das N-terminale Amin für die weitere Synthese blockieren kann (Abb. 17).^[81]

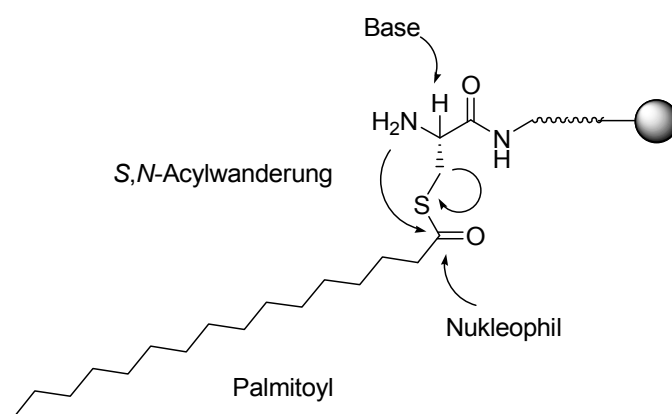
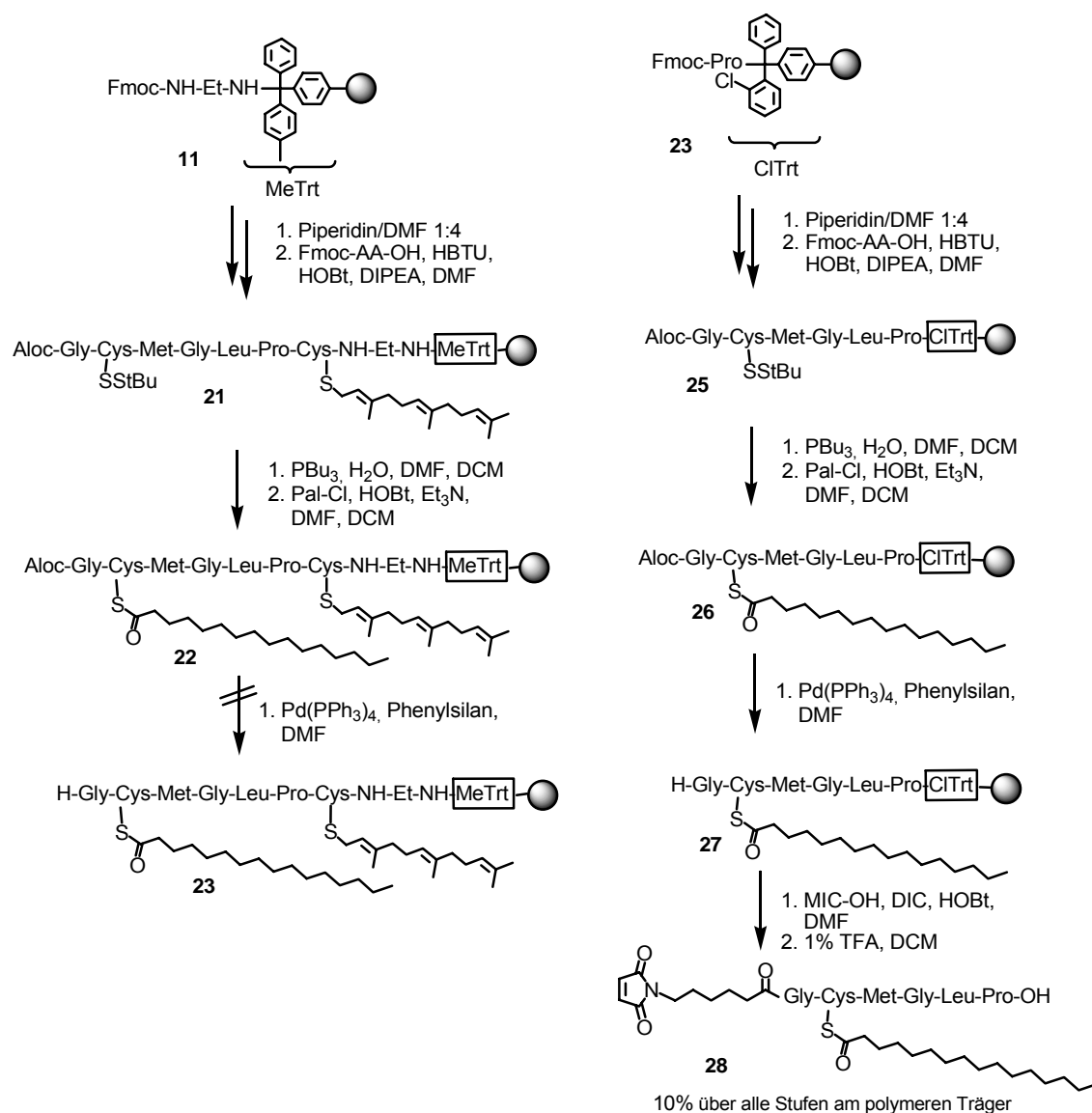


Abb. 17 Nebenreaktionen des basenlabilen Palmitoylthioesters.

Für die Synthese wurde bis zum Pentapeptid analog der Synthese des hexadecylierten und farnesylierten Peptides **6** verfahren. Für die folgende Einführung des palmitoylierten Cystein standen zwei Synthesestrategien zur Verfügung (Schema 3). Bei der Strategie **A** wurde das palmitoylierte Cystein als Bauein in der Synthese eingesetzt, hierbei ist besondere Vorsicht bei der nachfolgenden Kettenverlängerung geboten, um eine ungewollte S,N-Acylwanderung zu vermeiden. Alternativ wurde in

der Strategie **B** die Palmitoylgruppe an das verlängerte Peptid an der festen Phase eingeführt.

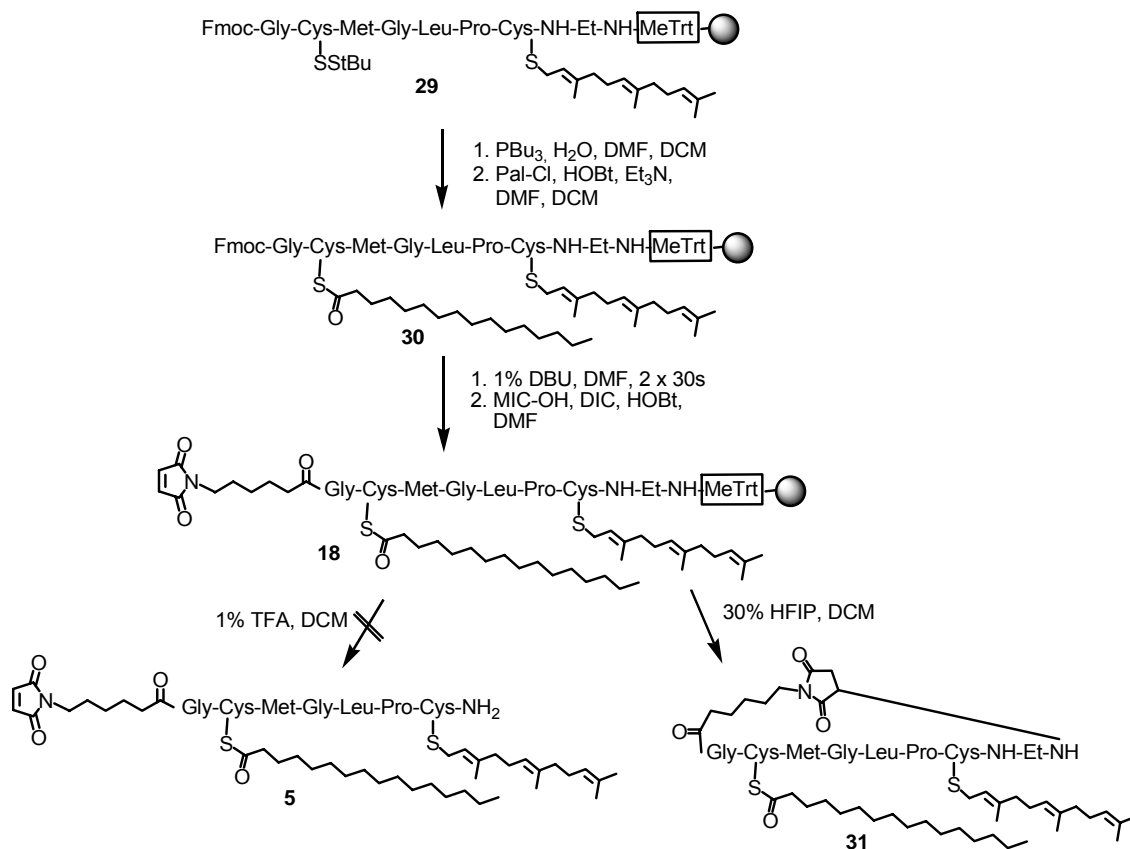
An das Heptapeptid am MeTrt-Harz wurde der Synthesestrategie **B** folgend zunächst ein mit der reduktiv spaltbaren *tert*-Buthylmercaptyl- (StBu-) Gruppe S-geschütztes Cystein eingeführt. Dieses wurde nach Kupplung der Aloc-geschützten nachfolgenden Aminosäure Glycin mit Tributylphosphan in Anwesenheit von Wasser in einem Lösemittelgemisch von DMF und CH₂Cl₂ entschützt. Die Palmitoylierung der freien Thiolgruppe am Harz konnte erfolgreich nach einer von B. LUDOLPH^[108] entwickelten Methode auf den säurelabilen MeTrt-Linker übertragen werden (Schema 8). Die Palmitoylierung erfolgte unter Argon mit 20 eq. Pal-Cl, 23 eq. HOBt und Triethylamin in einem Lösemittelgemisch von DMF und CH₂Cl₂. Das Produkt **22** konnte in einer Testabspaltung vom Harz mit 30% HFIP in CH₂Cl₂ massenspektrometrisch belegt werden. Die folgende Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe unter neutralen Bedingungen erwies sich allerdings als problematisch. Die milden Bedingungen mit Pd(PPh₃)₄ als Katalysator und Phenylsilan als Fänger führten an dem sehr labilen MeTrt-Linker zur vollständigen Abspaltung des Aloc-geschützten Heptapeptides von der festen Phase. Dieses war vor allem deshalb unerwartet, da eine analoge Syntheseroute an einem 2-Chlortrityl- (ClTrt-) Linker erfolgreich verlief (Schema 8). Dieser Linker ist durch den Chlorsubstituenten stabilisiert, allerdings wurde hier das Peptid anfangend mit der zweiten Aminosäure Prolin am Harz aufgebaut. Ein über die Säurefunktion an den ClTrt-Linker angeknüpftes Peptid lässt sich unter vergleichbaren Bedingungen wie ein als Amin an den MeTrt-Linker gebundenes Peptid mit 1% TFA in CH₂Cl₂ abspalten. Nach Palmitoylierung des Hexapeptides am ClTrt-Harz und erfolgreicher Aloc-Entschützung wurde die MIC-Gruppe mit DIC/ HOBt als Kupplungsreagenzien ohne Zusatz von Base angeknüpft. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 1% TFA in CH₂Cl₂ und führte nach säulenchromatographischer Aufreinigung zu dem MIC-markierten und palmitoylierten Hexapeptid **28** in 10% Gesamtausbeute (Schema 8).



Schema 8 Syntheseveruche zur Darstellung des Heptapeptids **5** nach Strategie **B** am MeTrt-Linker (**1**).

Da die Synthese des Heptapeptids bis zur Palmitoylierung am MeTrt-Linker erfolgreich verlief, wurde als alternative Methode anstelle eines Aloc-geschützten ein Fmoc-geschütztes Glycin eingesetzt (Schema 9). Die nachfolgende Palmitoylierung konnte unter den bewährten Bedingungen an der festen Phase durchgeführt werden. Das Peptid wurde nun *N*-terminal mit 1% DBU in DMF in 2 x 30s entschützt und die MIC-Gruppe unter den beschriebenen Bedingungen angeknüpft. Die abschließende Abspaltung des Peptid **18** vom Harz mit 30% HFIP in CH_2Cl_2 führte wie schon bei der Synthese von **6** zu dem zyklischen Peptid **31**. Während der Synthese durchgeführte

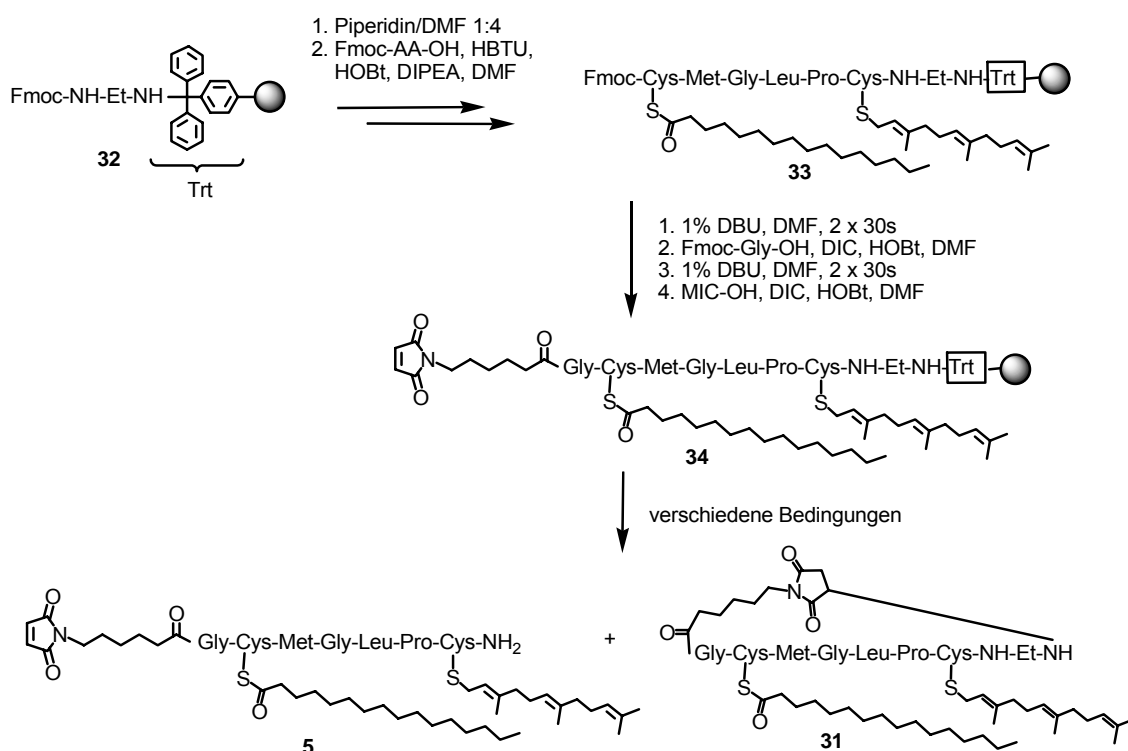
Testabspaltungen zeigten allerdings auch, dass nach Einführung der Palmitoylgruppe eine Abspaltung unter Einfluss von TFA zur Dekomposition des Peptides führt. Auf diesem Weg konnte auch nach Variation der Säurekonzentrationen nicht das gewünschte Zielpeptid **5** isoliert werden (Schema 9).



Schema 9 Syntheseveruche zur Darstellung des Heptapeptids **5** nach Strategie **B** am MeTrt-Linker (2).

Um das palmitoylierte und farnesylierte Heptapeptid **5** nach der Synthesestrategie **A** zu synthetisieren, wurde zunächst das Pentapeptid nach der Standardmethode am Trityl- (Trt-) Linker aufgebaut (Schema 10). Der Trityl-Linker ist ebenfalls schwach sauer zu spalten, allerdings etwas stabiler als der in den vorherigen Synthesen genutzte MeTrt-Linker. Anders als bei den vorangegangenen Synthesen wurde nun das Fmoc-geschützte und palmitoylierte Cystein als Baustein in die Synthese eingeführt. Durch eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode wird die Fmoc-Entschützung und Kupplung der nächsten Aminosäure ermöglicht und die Gefahr der *S,N*-Acylwanderung minimiert.^[109] Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Lösungsmittels während

der Kupplung einen großen Einfluss auf die *S,N*-Acylwanderung hat. Bei reinem DMF wird unter Standard-Kupplungsbedingungen 100% *S,N*-Acylwanderung beobachtet, wird das unpolare Lösungsmittelgemisch DMF/CH₂Cl₂ 1:1 verwendet, so sind es nur noch 45%, und bei einer Zusammensetzung von DMF/CH₂Cl₂ 1:4 wird noch 2% - 5% Acylwanderung beobachtet. Die Entschützung erfolgt wie vorher beschrieben mit 1% DBU in DMF in 2 x 30s. Entscheidend ist nun die schnelle Anknüpfung der nächsten Aminosäure Glycin, um der *S,N*-Acylwanderung vorzubeugen. Hierzu wird nur kurz mit DMF gewaschen und sofort mit der für 10 Minuten voraktivierten Aminosäure im Überschuss (10 eq.) und den Kupplungsreagenzien HATU (10 eq.) und DIPEA (40 eq.) in einem Lösemittelgemisch von DMF und CH₂Cl₂ (1:4) umgesetzt. Die Fmoc-Entschützung von Fmoc-Glycin erfolgt wiederum mit 1% DBU in DMF für 2 x 30s. Anschließend wird Malimidocaprinsäure an das N-terminale freie Amin gekuppelt um das festphasengebundene Peptid **34** zu ergeben (Schema 10).



Schema 10 Syntheseveruche zur Darstellung des Heptapeptids **5** nach Strategie **A** am Trt-Linker.

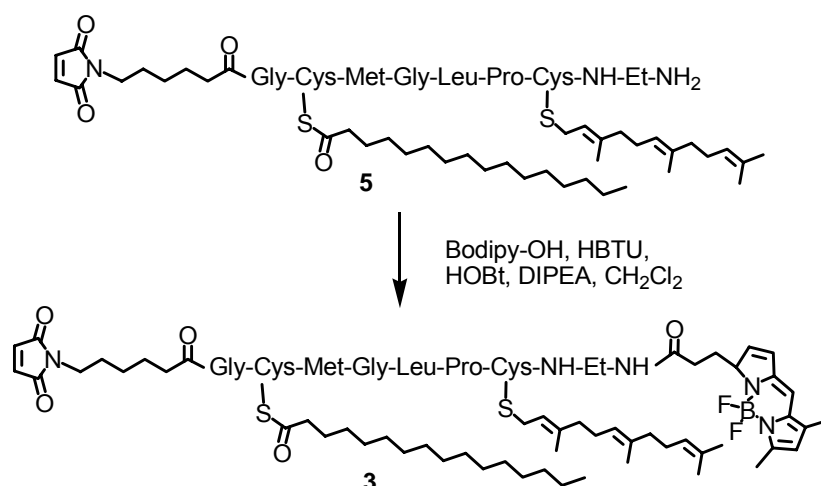
Abspaltbedingungen	Ausbeute [%]	5 : 3 I	MIC	Far
1% TFA / CH ₂ Cl ₂ , 0.5 h	4			
3% TFA / CH ₂ Cl ₂ , 0.5 h	86	1:0 - 0:1	✓	✓
5% TFA / CH ₂ Cl ₂ , 0.5 h	69	1:0	✓	-
30% HFIP + 1 eq. HCl / CH ₂ Cl ₂ , 1 h	8			
50% HFIP + 1 eq. HCl / CH ₂ Cl ₂ , 1 h	68	1:0 - 0:1	✓	✓

Tab. 4 Verschiedene getestete Bedingungen für die Abspaltung des Peptid **34** vom Trt-Linker.

Da aus den früheren Versuchen die Schwierigkeiten bei der Abspaltung bekannt waren, wurden hierfür verschiedene Bedingungen getestet (Tab. 4). Zum einem wurde die Konzentration der Säure variiert, zum anderen bei der Abspaltung mit HFIP zusätzlich ein Äquivalent HCl zugegeben, um zu gewährleisten, dass das C-terminale Amin protoniert ist und nicht mit dem Maleimid reagieren kann. Es zeigte sich, dass die für den MeTrt-Linker genutzten Konzentrationen von 1% TFA bzw. 30% HFIP in CH₂Cl₂ zu schwach sind, um das Peptid vollständig vom Harz abzuspalten. Dies gelang aber in guten Ausbeuten mit 3% TFA oder 50% HFIP (plus 1 eq. HCl). Bei beiden Methoden konnte durch ¹H-NMR-Analyse festgestellt werden, dass sowohl der Farnesylrest als auch die MIC-Doppelbindung vorhanden sind, wenn auch nicht quantitativ. Spaltet man dagegen mit 5% TFA ab, bleibt zwar die MIC-Doppelbindung vollständig erhalten, aber die Farnesylgruppe wird angegriffen. Für die weiteren Versuche wurde entweder mit 3% TFA oder 50% HFIP (plus 1 eq. HCl) in CH₂Cl₂ abgespalten, es zeigte sich allerdings, dass die Abspaltung nicht immer zum gewünschten Produkt führte. Besonders der Anteil des zyklisierten Nebenproduktes ist starken Schwankungen unterlegen und nicht vorherzusagen (Tab. 4).

Obwohl nur wenig von dem Peptid **5** isoliert werden konnte wurde es nach den Bedingungen, die zur Synthese von Peptid **4** optimiert wurden, ohne weitere Aufreinigung mit Bodipy FL umgesetzt (Schema 11). Allerdings konnte hierbei kein Produkt isoliert werden, ein Grund hierfür ist möglicherweise das teilweise zyklisierte Edukt, ebenso kann unter den leicht basischen Bedingungen während der Kupplung

eine weitere Zyklisierung des MIC-markierten Peptid **5** erfolgen. Verwunderlich ist in diesem Fall jedoch die weitaus größere Tendenz der MIC-Gruppe des palmitoylierten gegenüber der des hexadecylierten Peptides mit dem C-terminalen Amin zu reagieren. Zusätzlich kann die Basenlabilität des Palmitoylthioesters zu einer Reihe an Nebenreaktionen führen. Das entstandene Produktgemisch konnte aufgrund der erschwerten analytischen Bedingungen nicht aufgetrennt werden.



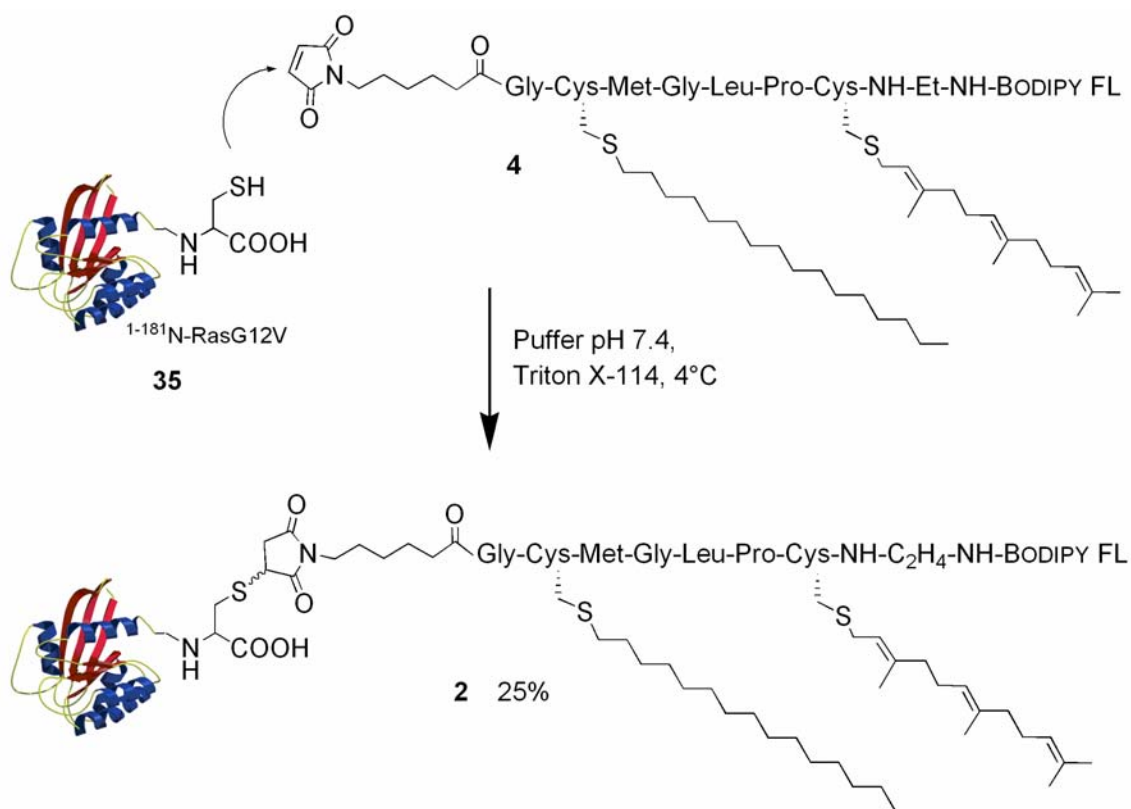
Schema 11 Synthese des Bodipy-markierten Peptid **3**.

Die Synthese MIC-markierter, doppelt lipidierter N-Ras-Peptide ist prinzipiell an der festen Phase mit einem Trt-Linker möglich. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die bisher nur für den Hydrazid-Linker eingesetzten Methoden zur Palmitoylierung am Harz und die Methode zur Minimierung der *S,N*-Acylwanderung auf einen Trt-Linker übertragen werden können. Erfolgreich kann die Synthese allerdings nur für das hexadecylierte und farnesylierte Peptid **6** mit nahezu quantitativer Ausbeute durchgeführt werden. Bei der Synthese des palmitoylierten und farnesylierten Peptid **5** erschwert dagegen die Labilität des Palmitoylthioesters und die gesteigerte Tendenz der MIC-Gruppe, mit dem freien Amin zu reagieren, die Synthese. Gleiches gilt für die folgende C-terminale Verknüpfung des Peptides mit dem Fluorophor Bodipy FL. Während die Kupplung des Peptid **5** erfolglos bleibt, kann das Peptid **4** in guten Ausbeuten hergestellt werden.

4.1.2 Kupplung des MIC-modifizierten Lipopeptids an verkürztes N-Ras-Protein

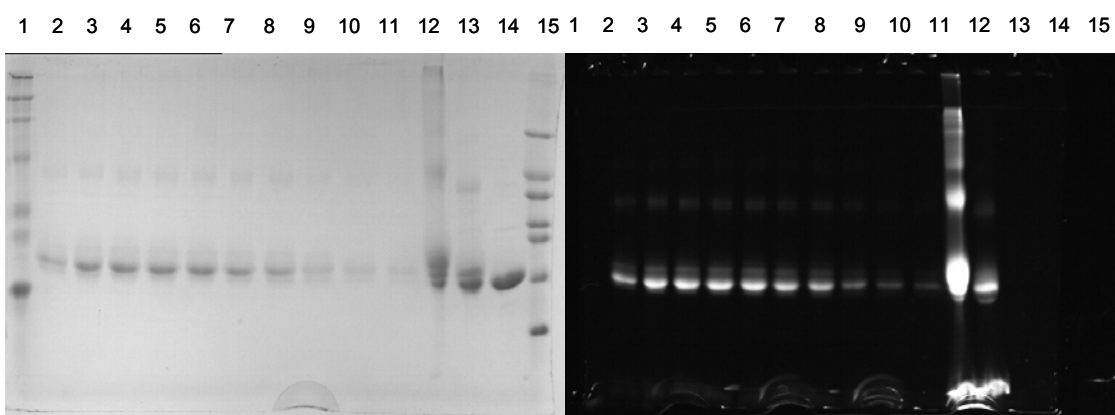
Das Prinzip der Maleinimidocaproyl- (MIC-) Linker vermittelten Ligation zwischen dem verkürzten, bakteriell überexprimierten N-Ras-Protein und fluoreszenzmarkierten C-terminalen N-Ras Peptiden wurde in den Abteilungen von H. WALDMANN und A. WITTINGHOFER entwickelt und bereits in der Synthese verschieden lipidmodifizierter und fluoreszenzmarkierter Proteine erfolgreich eingesetzt.^[90, 91, 100]

Maleinimide reagieren selektiv mit Thiolgruppen unter Ausbildung eines stabilen Thioethers, bei Proteinen also vorzugsweise mit dem Thiol der Seitengruppe von Cysteinen (Schema 12). In den von C. NOWAK (Abteilung A. WITTINGHOFER, MPI Dortmund) durchgeführten Kopplungen wurde verkürztes N-Ras verwendet, das als C-terminale Aminosäure Cystein¹⁸¹ aufweist. Die Thiolgruppe dieses Cysteins ist im wässrigen Puffer exponiert und für die Kopplung der Maleinimidogruppe frei zugänglich. Verwendet wurde die punktmutierte, onkogene G12V-Variante von N-Ras **35** (¹⁻¹⁸¹N-RasG12V). Die Verkürzung der N-ras-cDNA wurde durch Standard-PCR-Methoden erreicht. So wurde ein Stop codon in die Position 182 der N-ras-cDNA eingeführt und das resultierende PCR-Produkt in einen *E. coli* Expressionsvektor (ptac Expressionsvektor) kloniert. Im folgenden wurde die Proteinexpression im *E. coli* Stamm CK600K durchgeführt, die Zellen aufgeschlossen und das Protein mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration aufgereinigt.



Schema 12 Synthese des fluoreszenzmarkierten semisynthetischen N-Ras-Proteins **2** mit Hilfe der MIC-Ligation.

Die Kopplung des Peptids **4** mit dem N-Ras-Protein **35** wurde in einem Triton X-114-haltigen Tris-Puffer acht Stunden bei 4°C durchgeführt. Dieses nichtionische Detergens ermöglichte es, sowohl das lipophile Peptid **4** als auch das hydrophile N-Ras **35** in Lösung zu halten. Die Aufreinigung der erhaltenen fluoreszierenden Lipoproteine **2** konnte ebenfalls unter Zuhilfenahme von Triton X-114 leicht bewerkstelligt werden, da es unterhalb von 30 °C mit Wasser mischbar ist, oberhalb dieser Temperatur aber eine eigene, hydrophobe Phase bildet. Hydrophobe Proteine wie das Lipoprotein **2** lösen sich in der Detergensphase und ungekoppeltes Protein verbleibt dagegen in der wässrigen Phase, so dass die Proteine in sehr hoher Reinheit erhalten werden konnten. Nach der Phasentrennung bei 37 °C wurde das Kopplungsprodukt über DEAE-Ionenaustauschchromatographie gereinigt, vom Detergens befreit und durch SDS-PAGE Gelelektrophorese charakterisiert (Abb. 18).



1, 15 Marker; 2-11 Fraktionen nach Aufreinigung; 12,13 Rohprodukt nach Kupplung; 14 $^{1-182}$ N-RasG12V

Abb. 18 SDS-PAGE des aufgereinigten Protein **2**; links Hellfeldaufnahme, rechts Fluoreszenzaufnahme.

Zusätzliche konnte durch MALDI-Massenspektroskopie des Kupplungsproduktes gezeigt werden, dass die lipidierten Peptide nur einmal an das Ras-Protein gekuppelt wurden (Abb. 19). Das Ras-Protein und Peptid wurden in equimolaren Mengen eingesetzt und es konnte das gewünschte fluoreszenzmarkierte Ras-Protein im Multimilligrammaßstab mit einer Ausbeute von 25% erhalten werden.

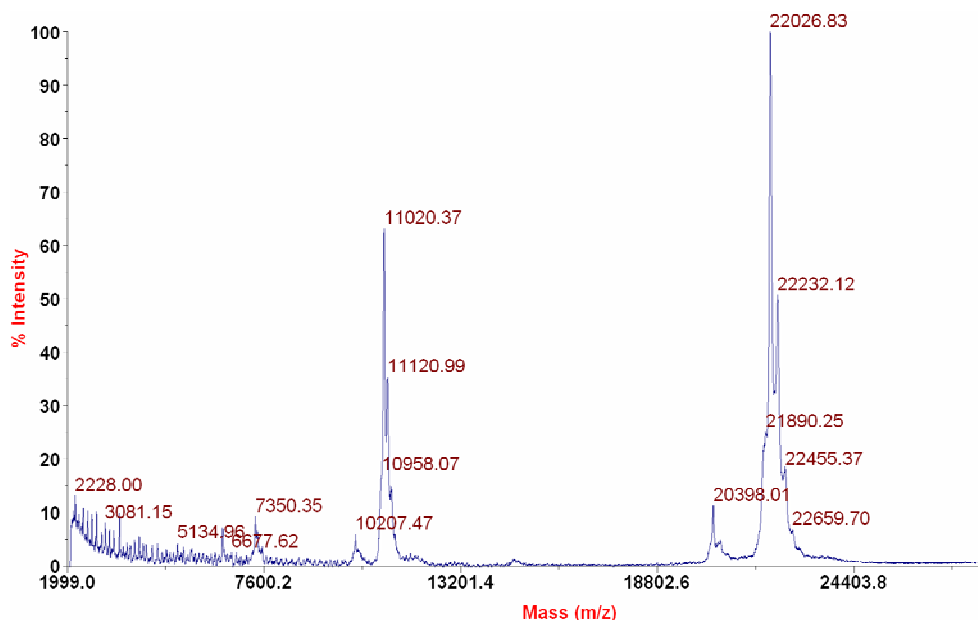


Abb. 19 Massenspektrometrische Charakterisierung des Kopplungsproduktes durch MALDI-MS. Aufgetragen ist die Signalintensität gegen die Masse in Da. Die Signale bei 10207 Da und 20398 Da entsprechen der theoretischen Masse von ungekoppeltem NRasG12V Δ 181 **35** (20440 Da) die Signale bei 11020 Da und 22026 Da der Masse des Kopplungsprodukts **2** (22060 Da).

4.1.3 Biophysikalische Evaluierung der Wechselwirkung von lipidierten, Bodipy-markierten Proteinen mit Modellbiomembranen

Mit dem synthetisierten Bodipy-markierten N-Ras-Protein **2** wurde von C. NICOLINI aus dem Arbeitskreis von R. WINTER, Universität Dortmund, im Rahmen einer Kooperation die Wechselwirkung zwischen Modellbiomembranen und lipidierten Peptiden und Proteinen untersucht. Frühere Messungen mit lipidierten Peptiden, die dem C-Terminus von N-Ras entsprechen, zeigten, dass sich sowohl einfach als auch doppelt lipidierte Peptide in der fluiden Phase anreichern. Durch Einbau von Cholesterol in die Modellmembran wird eine fluide geordnete Phase erzeugt, die dem Zustand eines *lipid rafts* ähnelt. Wird in ein solches System ein Peptid, welches dem doppelt lipidierten C-Terminus von N-Ras entspricht, eingebracht, kann die Einlagerung in eine fluide ungeordnete Phase beobachtet werden. Bei tiefen Temperaturen bilden sich schließlich einzelnen Domänen, in denen die Peptide als Dimere vorliegen. Dieses sind vermutlich fluide ungeordnete Bereiche, die neben den Cholesterol-reichen fluiden geordneten Bereichen koexistieren, somit konnte keine Anreicherung in *raft*-ähnlichen Mikrodomänen festgestellt werden.^[110]

Ziel war es nun, die Verteilung lipidierter Proteine in den verschiedenen Lipidphasen von Vesikeln zu erfassen. Eine umfassende Darstellung und Diskussion findet sich in der Dissertationsarbeit von C. NICOLINI,^[111] so dass hier lediglich einige Ergebnisse in aller Kürze zusammengefasst werden.

Die Verteilung des Proteins in unterschiedlichen Modellmembranen von ca 30 µm durchmessenden unilamellaren Vesikeln bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Membranzusammensetzungen ist untersucht worden. Als Membransystem wurde eine Mischung von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC), (2S, 3R, 4E)-2-acylaminoctadec-4-ene-3-hydroxy-1-Phosphocholin (Sphingomyelin, SM) und Cholesterol (Chol) verwendet, die je nach Zusammensetzung definierte Phasen ergeben.^[112]

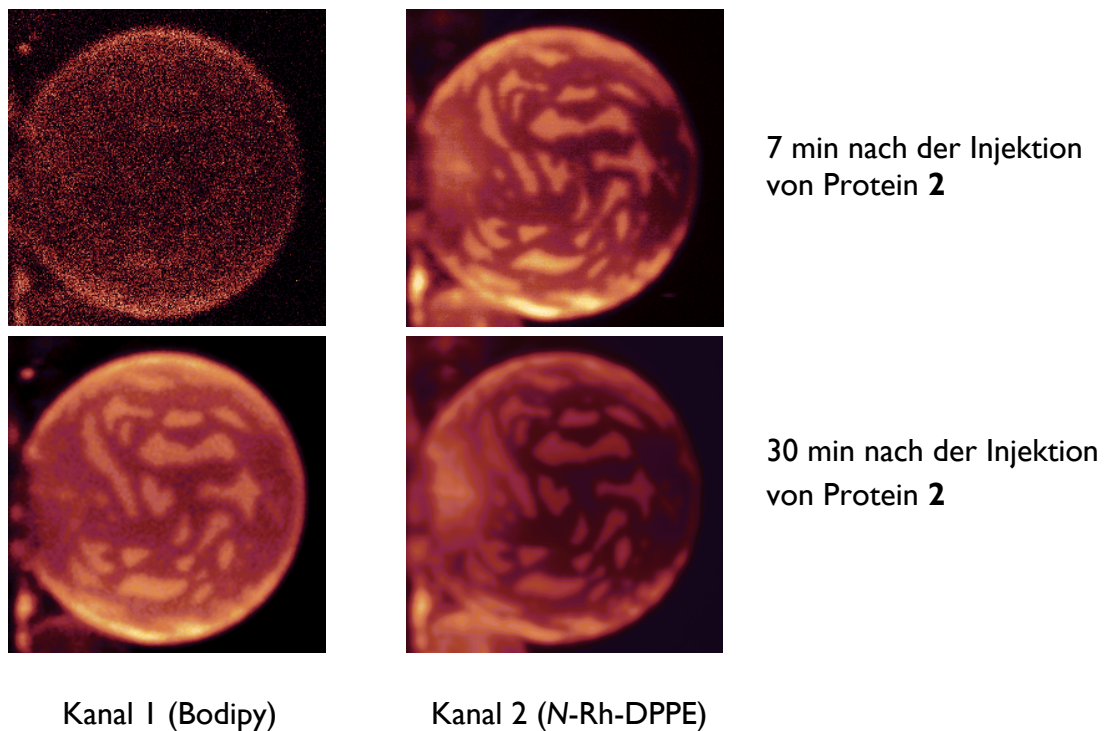


Abb. 20 Verteilung von 2 mol% Bodipy-markierten Proteins **2** in den Domänen eines Vesikels aus POPC / SM / Chol (25:65:10) mit 0.25 mol% N-Rh-DPPE bei $T=31^{\circ}\text{C}$.

In Abb. 20 ist die Verteilung des Bodipy-markierten Proteins **2** in einem Vesikel aus POPC / SM / Chol im Verhältnis 25:65:10 [n:n:n] bei 31°C dargestellt. Unter diesen Bedingungen liegt ein Zweiphasengemisch aus einer fluiden geordneten und einer Gel-Phase vor. Die fluide geordnete Phase ist mit 0.25 mol% Lissaminrhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (N-Rh-DPPE) markiert (Kanal 2). Im ersten Kanal des Fluoreszenzmikroskops wird die Wellenlänge von Bodipy gemessen. Die hellen Felder werden in Kanal 1 durch die Fluoreszenz des Bodipy und in Kanal 2 durch die Fluoreszenz des Rhodamin hervorgerufen, die dunklen Felder in Kanal 2 entsprechen demnach der Gel-Phase. Die Aufnahmen zeigen 7 Minuten nach der Injektion des Proteins noch eine gleichmäßige Verteilung der Bodipy-Fuoreszenz, nach 30 Minuten wird eine Anreicherung des Proteins **2** in der fluiden geordneten Phase deutlich.

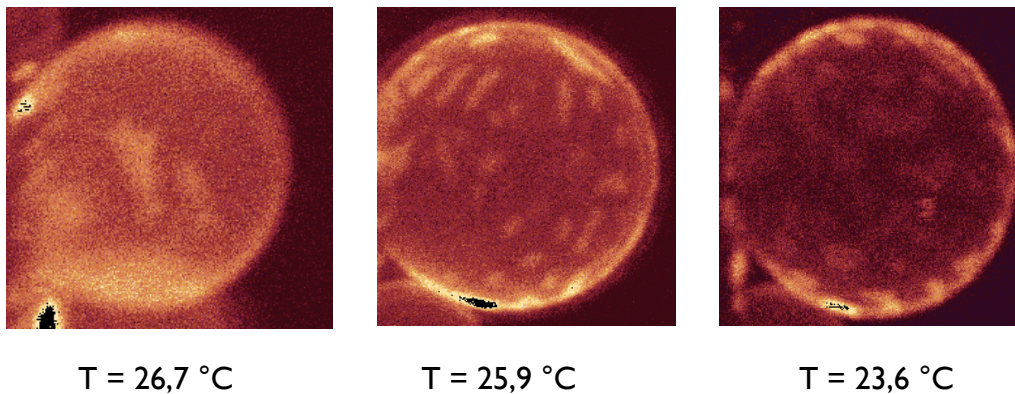


Abb. 21 Verteilung von 2 mol% Bodipy-markierten Protein **2** in den Domänen eines Vesikels aus POPC / SM / Chol (25:65:10) mit 0.25 mol% N-Rh-DPPE bei drei verschiedenen Temperaturen.

Das Phasengleichgewicht der Modellmembran ist temperaturabhängig, bei niedrigeren Temperaturen steigt der Anteil der Gel-Phase. Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen eine Abnahme der Rhodamin-markierten fluiden Phase und ein Zunahme der dunklen Gel-Phase. Gleichzeitig konnte eine entsprechende Abnahme der Bereiche, in denen das Protein **2** angereichert ist, beobachtet werden (Abb. 21). Allerdings bildet sich, anders als bei den N-Ras-Peptiden, bei tieferen Temperaturen keine eigenständige Phase aus, sondern das Protein verbleibt in den fluiden Bereichen. Messungen mit verschiedenen Membranzusammensetzungen zeigten die Tendenz des Proteins sich vorrangig in die fluide ungeordnete Phase der Membran einzulagern, und nur bei Systemen ohne diese Bereiche reicherte es sich in fluiden geordneten bzw. Gel-Phasen an. Analog den Messungen mit N-Ras-Peptiden konnte bei dem N-Ras-Protein keine Anreicherung in *raft*-ähnlichen Mikrodomänen festgestellt werden.

4.2 Posttranslational modifizierte NLS-Konjugate

In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen Modifikationen an der Kernlokalisierungssequenz auf den Kernimport am Beispiel der NLS des vJun-Proteins untersucht werden. Die Kernlokalisierungssequenz des vJun besteht aus den fünf Aminosäuren R²⁴⁹KRKL²⁵³, Phosphorylierung des benachbarten Ser²⁴⁸ im vJun inhibiert den Kernimport des Proteins.^[24, 58] Eine GlcNAc-Modifizierung des vJun-Proteins wurde bislang nicht identifiziert. Die verbreitete Annahme, dass O-GlcNAc und O-Phosphat sich nach dem sogenannten Ying-Yang-Modell modulieren,^[7] führt zu der Hypothese, dass Ser²⁴⁸ im vJun ebenfalls glycosyliert vorliegen kann. Eine O-GlcNAc-Modifikation kann daher ebenfalls einen Einfluß auf den Kernimport des Proteins haben. Um diese Hypothese zu evaluieren sollten Peptide, welche der NLS des vJun entsprechen, mit unterschiedlichen Modifikationen synthetisiert werden. Peptide mit diesen Eigenschaften, die für *in vivo* Messungen eingesetzt werden sollen, müssen demnach folgende Merkmale besitzen:

- An der Position des Ser²⁴⁸ sollten flexibel verschiedene Modifikationen eingeführt werden können.
- Um das Peptid in den für aktiven Kernimport wichtigen Massenbereich (>60 kDa) zu bringen, sollte ein Linker für die Verknüpfung mit einem Protein vorhanden sein.
- Ein Fluorophor mit hoher Quantenausbeute zur Lokalisation des Konjugates in der Zelle sollte eingesetzt werden.

N. KUDER entwickelte in seiner Doktorarbeit eine Synthesestrategie zum Aufbau von Decapeptiden mit der Kernlokalisierungssequenz des vJun, welche mit dem Fluorophor 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) markiert sind.^[113] Aufbauend auf diese Arbeit sollten nun Konjugate mit einer Masse über 60 kDa hergestellt werden.

Das Protein, welches mit der NLS verknüpft werden soll, musste durch Ligation mit dem NLS-Peptid zu einem Konjugat der gewünschten Größe führen, und möglichst

keine weitere Aktivität besitzen. Es standen einige Proteine und Linker zur Verfügung. Ausgewählt wurde schließlich ein Konjugat des Proteins Avidin mit einer biotinylierten NLS. Die Avidin-Biotin-Bindung ist mit einer Bindungskonstanten von $K_D=10^{-15}$ M eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen.^[30] Avidin ist ein Tetramer mit einer Masse von 66 kDa und jede Untereinheiten besitzt eine Bindungsstelle für Biotin (Abb. 22). Die Bindung erfolgt bei Inkubation der beiden Komponenten und ist irreversibel. Avidin kann mit einer Reihe von Fluorophoren markiert werden, unter anderem auch mit Bodipy FL. Bodipy-markiertes Avidin ist kommerziell erhältlich, was die Verwendung dieses Linkersystems praktikabel macht. Das Biotin soll am N-Terminus des NLS-Peptides eingeführt werden, und Aminocaprinsäure dient als Abstandhalter zwischen dem Linker und dem Peptid, um einen freien Zugang zu der Kernlokalisierungssequenz zu gewährleisten (Schema 13).

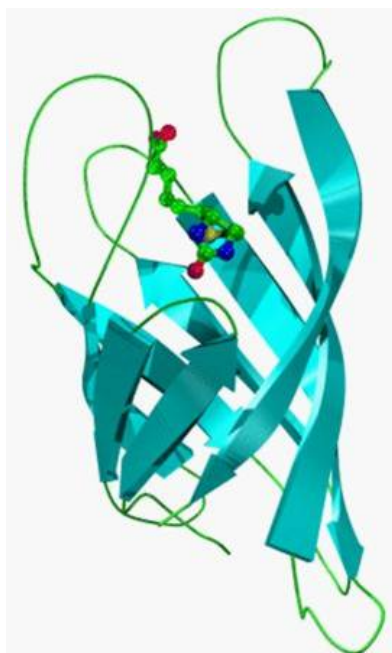
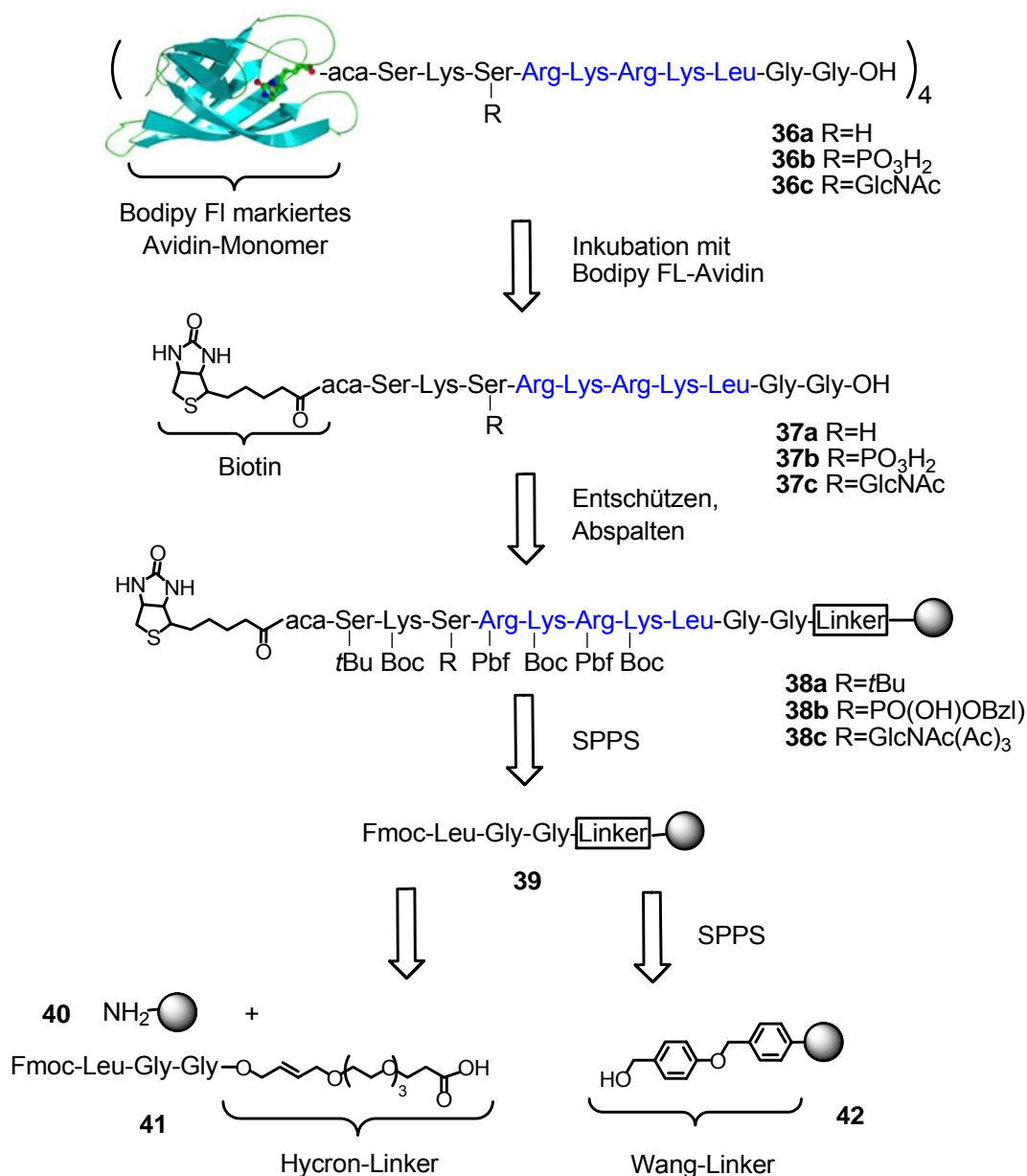


Abb. 22 Biotin – Avidin Monomer Komplex, $K_D = 10^{-15}$ M.^[30]

Für die Synthese der modifizierten Peptide stehen, wie schon früher erwähnt, zwei Strategien zur Verfügung. Zum einen können die Modifikationen in das vollständige Peptid eingeführt werden, oder andererseits schon als modifizierte Bausteine während der Synthese gekuppelt werden.^[114] Aufgrund der flexibleren

Handhabung für die Parallelsynthese wurden hier ausschließlich phosphorylierte und glycosylierte Aminosäurebausteine verwendet, welche zuvor in Lösung synthetisiert wurden.



Schema 13 Retrosynthese der NLS-Konjugate **36**.

Die Basenlabilität des vollgeschützten Phosphat- und Glucosamin-Restes erfordert eine wohlüberlegte Schutzgruppenstrategie. Bei der Synthese von Phosphopeptiden an fester Phase hat sich der Gebrauch von Phosphodiestern an Stelle

der Phosphotriester bewährt, da diese unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung stabil sind.^[115] Auch *N*-Acetylglucosaminreste tolerieren die Bedingungen der Fmoc-Abspaltung an fester Phase,^[116] so dass die Synthese nach der Fmoc/ *t*Bu-Methode durchgeführt werden kann. Als säurelabile Seitenkettenschutzgruppen sollten *t*Bu für die Hydroxyfunktion des Serins, Boc für die Aminofunktion des Lysins, die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Gruppe^[117] für die Guanidinogruppe des Arginins sowie Benzyl als Phosphat-Schutzgruppe eingesetzt werden. Die Hydroxyfunktionalitäten des Zuckerrestes sollten durch Acetylschutzgruppen maskiert und erst nach Abspaltung vom Harz durch Hydrazinolyse entfernt werden.

Um das Peptid an der festen Phase zu verankern, sollten zwei verschiedene Linker genutzt werden (Schema 13). Analog der von N. KUDER entwickelten Synthese wurde der allylische Hycron-Linker eingesetzt, welcher sich orthogonal zu den beiden säure- bzw. basenlabilen Schutzgruppentypen verhält, und sich durch Pd(0)-Katalyse unter milden Abspaltungsbedingungen entfernen lässt.^[118] Da bei dieser Synthesestrategie ein zusätzlicher Schritt der Seitenkettenentschützung auftritt und die Abtrennung des Palladium-Katalysators nach beendeter Synthese recht aufwendig ist, sollte zusätzlich die Synthese an dem säurelabilen Wang-Linker^[119] untersucht werden. Eine häufig vorkommende Nebenreaktion bei der Synthese von Glycin-Glycin-Sequenzen an fester Phase ist die Bildung von Diketopiperazinen. Um dies zu vermeiden, wurde das Tripeptid Fmoc-Leu-Gly-Gly-OH in Lösung synthetisiert, mit dem Hycron-Linker verknüpft und anschließend an den polymeren Träger gebunden.

4.2.1 Synthese der Bausteine

Die geplante Synthesestrategie erfordert den Einbau von *N*-Fmoc-geschützten Serinbausteinen, die entweder mit einer einfach Benzyl-geschützten Phosphat- oder Acetyl-geschützten *N*-Acetylglucosamin-Gruppen modifiziert sind (Abb. 23). *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-(benzylphosphato)-*L*-Serin **41** wurde schon mehrfach erfolgreich zur Phosphopeptidsynthese an fester Phase eingesetzt und ist kommerziell erhältlich.^[115]

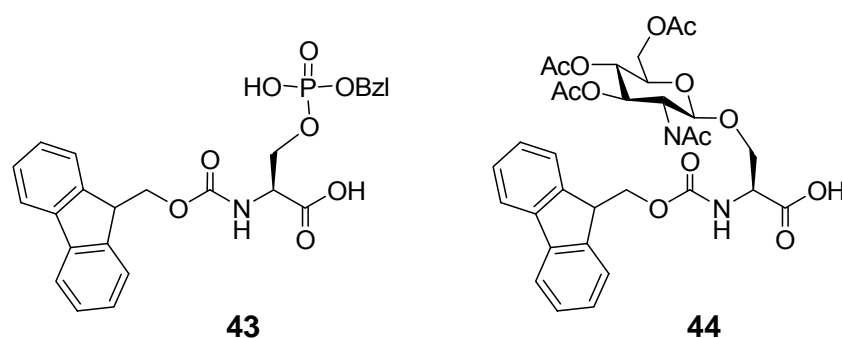
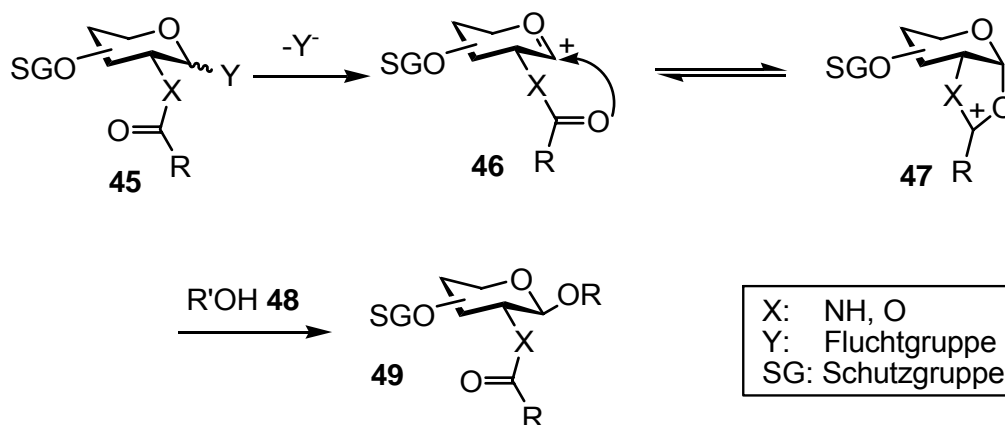


Abb. 23 Fmoc-geschützte phosphorylierte bzw. glycosylierte Serinbausteine.

Für die chemische Synthese von *O*-Glycosiden sind zahlreiche Methoden bekannt.^[120, 121] Ein allgemeiner Mechanismus ist in Schema 14 dargestellt. Es ist zuerst notwendig, die Hydroxyfunktionen des Glycosyldonors zu schützen. Der Glycosyldonor **45** besitzt an seinem anomeren Zentrum eine Fluchtgruppe. Nach deren Aktivierung und Abspaltung bildet sich das Glycosylkation (Oxoniumion) **46**. Dieses reagiert, wenn die Schutzgruppe an C-2 einen Nachbargruppeneffekt ausüben kann, zum Oxazolin- oder Dioxolanintermediat **47** weiter. Diese werden vom Akzeptor **49** unter Ausbildung der erwünschten β -glycosidischen Bindung angegriffen.

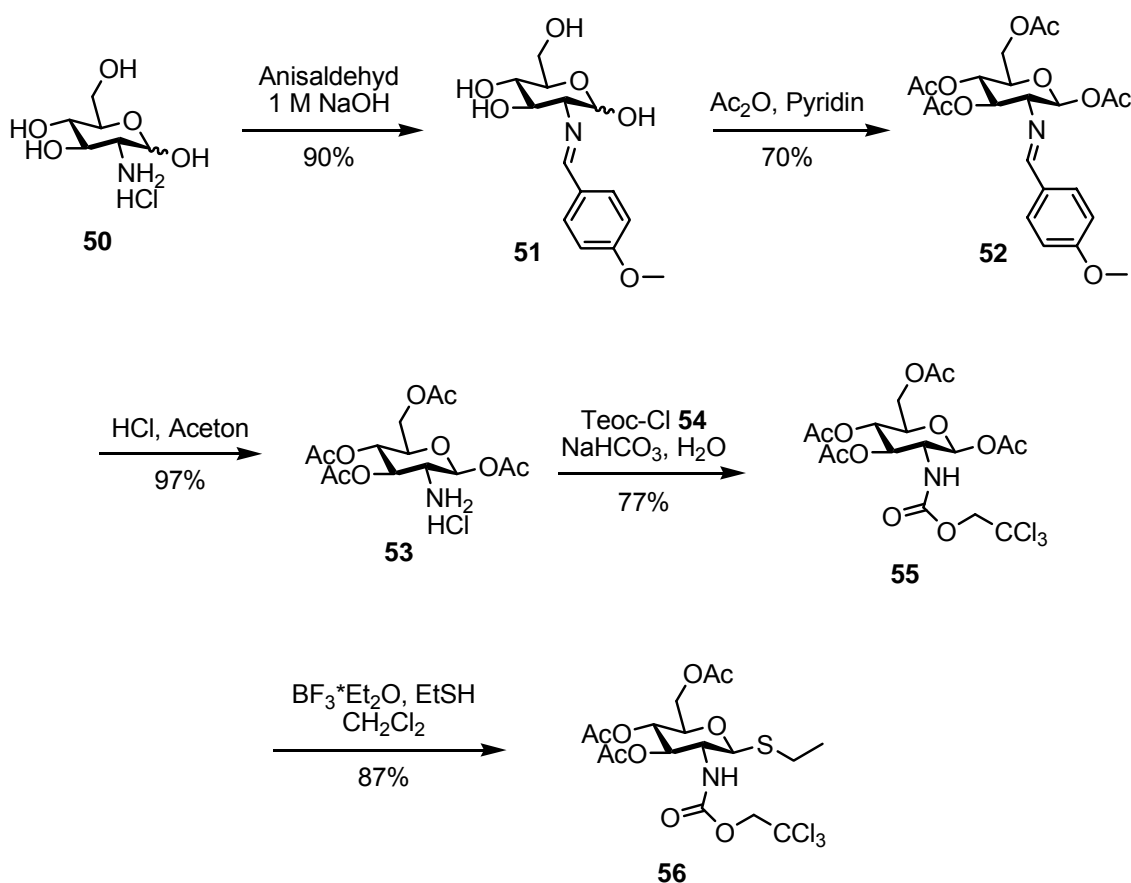


Schema 14 Allgemeine Methode zur Darstellung von *O*-Glycosiden **49**.

In früheren Arbeiten wurden verschiedene Glycosyldonoren für die Synthese des Aminosäurebausteins Fmoc-Ser(GlcNAc₄)-OH **44** getestet,^[113] die höchste Ausbeute ergab die Kupplung des Thioglycosyldonors **56**^[122] unter Aktivierung mit dem Alkylierungsmittel Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtriflat (DMTST) **59**.^[123] Die Effizienz

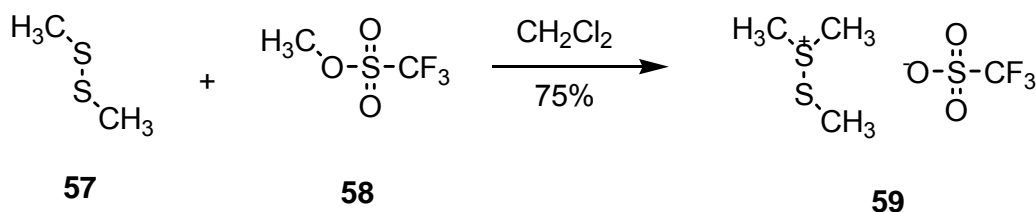
der Glycosidsynthese kann noch gesteigert werden, indem die *N*-Acetylgruppe durch die elektronenziehende 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylgruppe (Teoc) ersetzt wird.

Ausgehend von D-Glucosamin Hydrochlorid **50** konnte der Glycosyldonor **56** in fünf Schritten analog der literaturbekannten Synthese hergestellt werden.^[113, 121] Zuerst wurde D-Glucosamin Hydrochlorid **50** mit Anisaldehyd zur Schiffschen Base **51** umgesetzt und anschließend die Hydroxyfunktionen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Spaltung der Schiffschen Base mit Salzsäure und Schützung der Aminofunktion mit 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid **54** liefert den vollständig geschützten Zucker **55**. Der Glycosylierungsbaustein **56** konnte nach Umsetzung mit Ethanthiol und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in einer Gesamtausbeute von 41% erhalten werden.



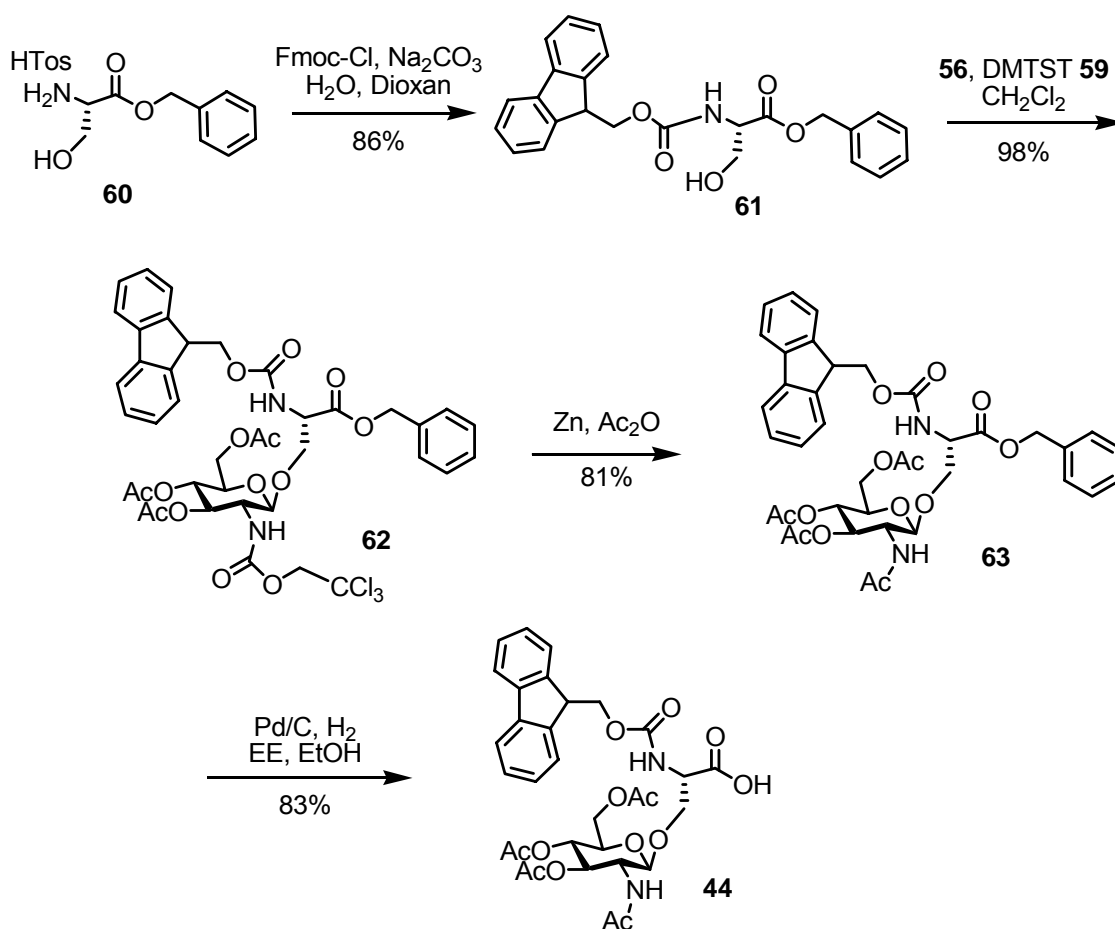
Schema 15 Synthese des Thioglycosyldonors **56**.

Die Glycosylierung der Alkoholgruppe des vollgeschützten Serin **51** erfolgt unter Aktivierung mit DMTST **59**, welches aus Dimethyldisulfid **57** und Methyltriflat **58** hergestellt wurde (Schema 16).^[124] DMTST **59** ist extrem toxisch und sowohl Luft- als auch Wasser-empfindlich, kann jedoch unter Argon bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden.



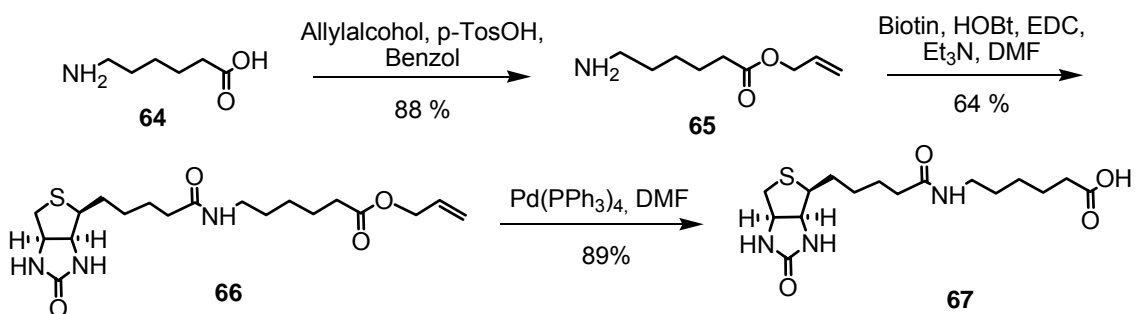
Schema 16 Synthese von Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtriflat **59**.

Ausgehend von L-Serinallylester Hydrotosylat **60** wird zunächst die Aminfunktion mit Fmoc blockiert. Nach der Alkylierung des Glycosyldonors **56** mit DMTST **59** unter anschließenden Umsetzung des gebildeten Oxazolins mit Fmoc-Ser-OBzl **61** erhält man den vollgeschützten Serinbaustein **62**. In einer Eintopf-Reaktion mit frisch aktiviertem Zinkpulver und Essigsäureanhydrid wird die aktivierende Teoc-Schutzgruppe reaktiv entfernt und gegen einen Acetylrest ausgetauscht. Die abschließende C-terminale Entschützung erfolgt mit 5% Pd auf Kohle unter Wasserstoffatmosphäre mit ständiger Reaktionskontrolle, da bei zu langen Reaktionszeiten oder einer Änderung des Lösungsmittelgemisches auch die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten werden kann. Der Serinbaustein **44** konnte ausgehend von D-Glucosamin Hydrochlorid **50** in einer achtstufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 23% hergestellt werden (Schema 17).



Schema 17 Synthese des glycosylierten Serinbausteins **44**.

Biotinaminocaprinsäure **67** konnte ausgehend von Aminocaprinsäure **64** in drei Stufen mit einer Ausbeute von 50% hergestellt werden (Schema 18).

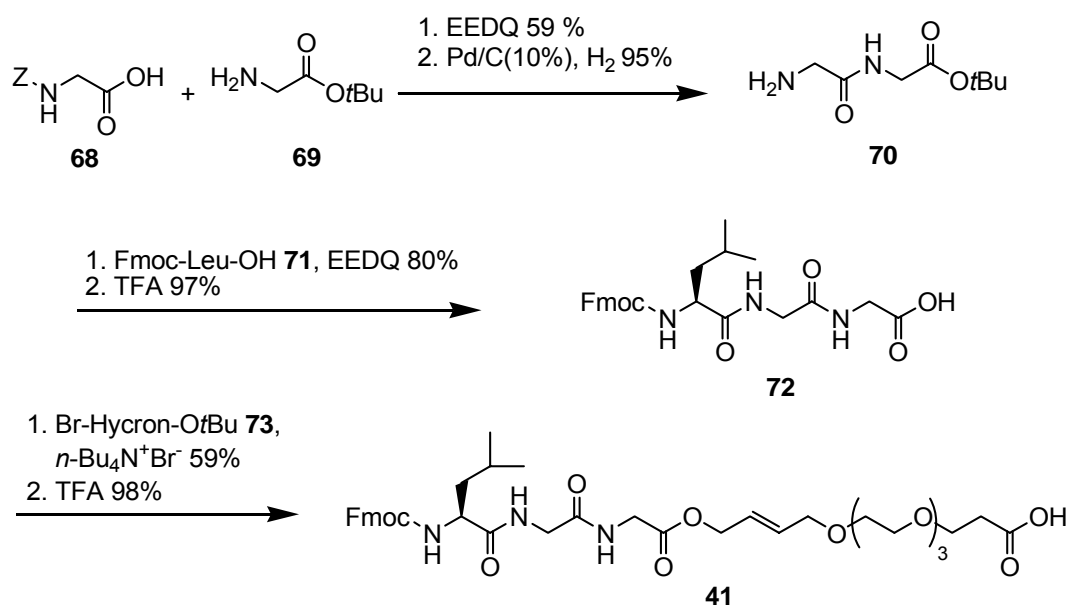


Schema 18 Synthese von Biotinaminocaprinsäure **67**.

4.2.2 Synthese der NLS-Peptide

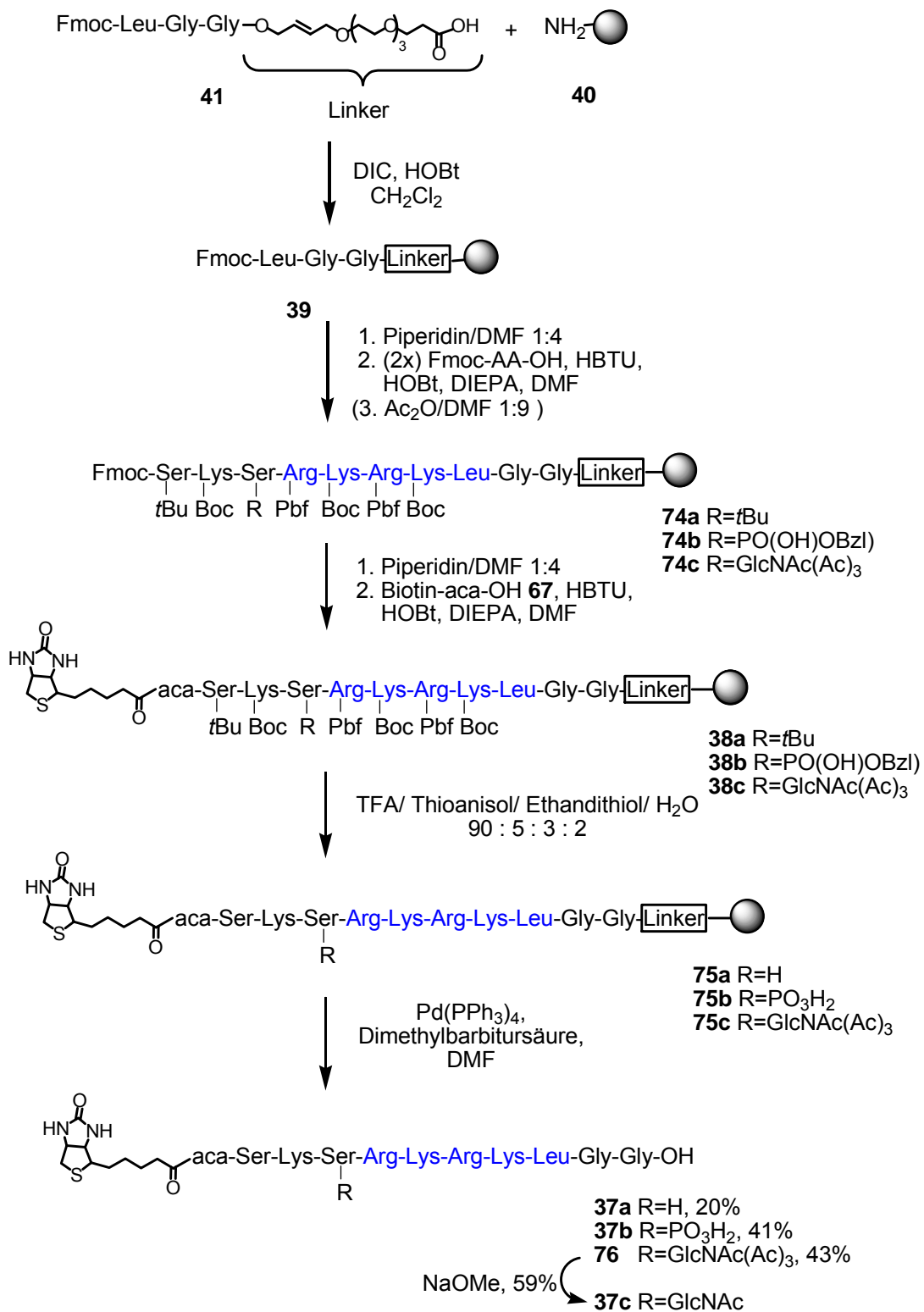
Festphasensynthese am Hycron-Linker

Die Synthese der biotinylierten Decapeptide **37** am Hycron-Linker startet mit der Kupplung des Tripeptids Fmoc-Leu-Gly-Gly-Hycron-OH **41** an aminomethyliertes Polystyrolharz. Der Baustein **41** wurde von N. KUDER in einer sechsstufigen Synthese mit 25% Gesamtausbeute synthetisiert (Schema 19).^[13]



Schema 19 Synthese von Fmoc-Leu-Gly-Gly-Hycron-OH **41**.

Die folgende Festphasenpeptidsynthese wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Fmoc-Gruppen wurden mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten, die Kettenverlängerung erfolgte unter Aktivierung mit HBTU und HOBt. Anschließendes *Capping* mit 10 % Ac₂O in Pyridin war nur nach Einführung der glycosylierten Aminosäure notwendig. In diesem Fall waren die folgenden Kupplungen nicht vollständig und die im Rohprodukt nach Abspaltung vorhandenen Abbruchsequenzen konnten nur schwer abgetrennt werden. Um möglichst quantitative Umsetzungen zu erhalten, wurden zusätzlich die Aminosäuren, die auf Ser(GlcNAc) folgen, mit Doppelkupplungen und verlängerter Kupplungszeit eingeführt.



Schema 20 Festphasensynthese der biotinylierten NLS-Peptide **37** am Hycron-Linker.

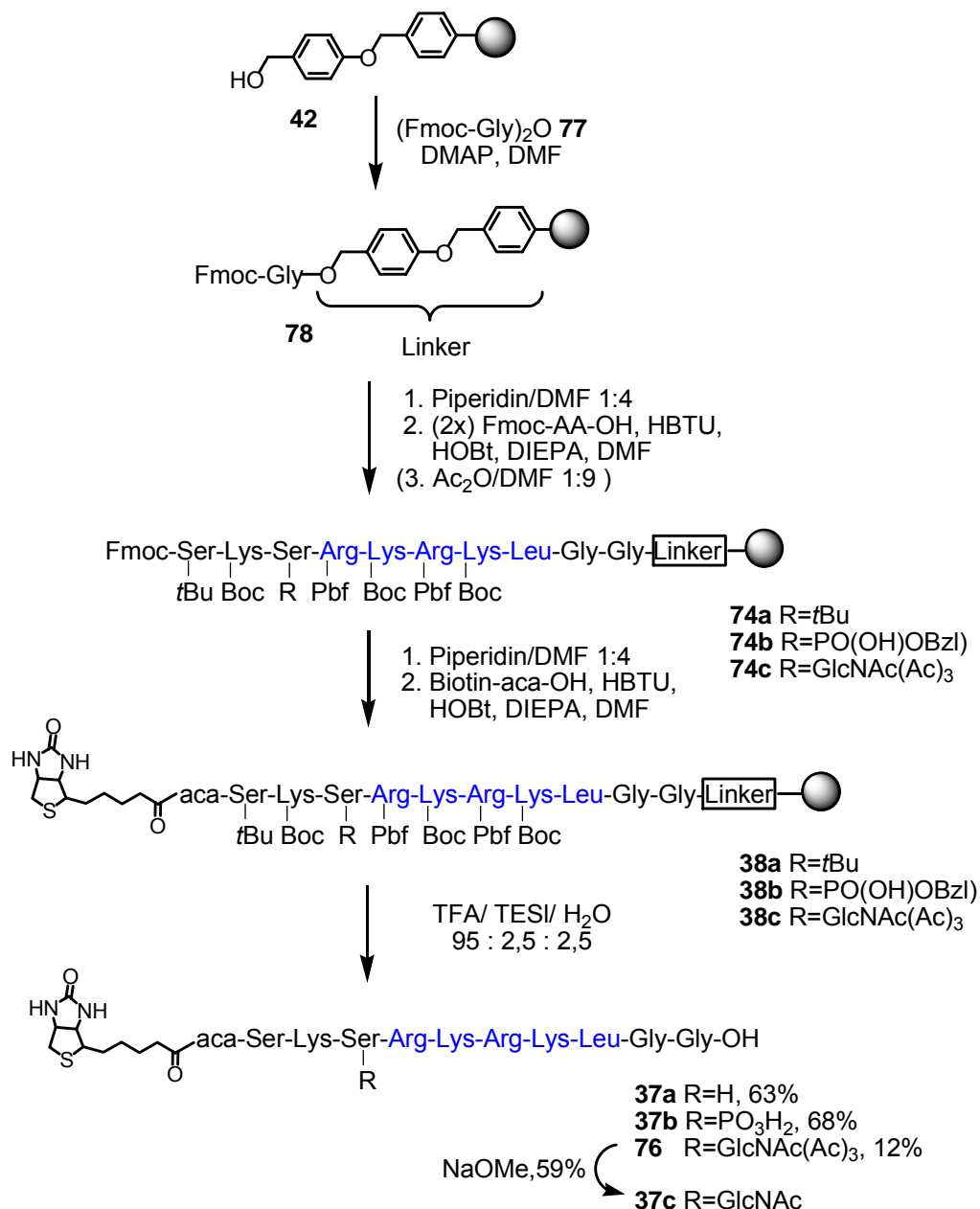
Nach der Darstellung der Decapeptide **74** wurde das terminale Amin entschützt und das polymergebundene Peptid mit Biotinaminocaprinsäure (Biotin-aca-OH) **67** verlängert. Die Löslichkeit von **67** in DMF wurde durch Zugabe der doppelten Menge an Base erhöht. Die vollgeschützten Peptide **38** wurden am Harz sauer entschützt. Die besten Ergebnisse liefert hierbei ein Gemisch aus TFA/ Thioanisol/ Ethandithiol/ Wasser im Verhältnis 90:5:3:2. Die anschließende Abspaltung der Peptide vom Harz unter Pd(0)-Katalyse mit Dimethylbarbitursäure als Allylakzeptor lieferte die biotinylierten NLS-Peptide **37a, b** und **76** in hoher Reinheit. Eine potentielle β -Eliminierung konnte nicht beobachtet werden. Die O-Acetylgruppen des N-Acetylglucosamins im glycosylierten Peptid wurden anschließend durch Umsetzung mit Natriummethanolat in Methanol in Lösung entschützt. Die N-Acetylgruppe wird unter diesen Reaktionsbedingungen nicht angegriffen. Die erhaltenen Peptide wurden erst über eine Sepac-Kartusche von dem Pd-Katalysator abgetrennt und anschließend durch präparative HPLC aufgereinigt. Die Dekapeptide **37a-c** konnten in guten Ausbeuten von 20-43%, ausgehend von der Erstbeladung des Harzes, isoliert werden (Schema 20).

Festphasensynthese am Wang-Linker

Die Synthese der Peptide am Wang-Linker erfolgte analog der beschriebenen Synthese am Hycron-Linker. Ein Vorteil dieser Strategie ist die Möglichkeit parallel zur Entschützung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen die Peptide von der festen Phase zu spalten. Zusätzlich wird die Abspaltung mit Palladium vermieden, die trotz milder Bedingungen aufwendige Aufarbeitung erfordert, um den Pd-Katalysator vollständig zu entfernen. Da die Peptide *in vivo* getestet werden sollten musste eine Beeinflussung durch Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

Nachdem die erste Aminosäure Fmoc-Glycin unter DMAP-Katalyse an die Hydroxyfunktionalität des Wang-Linkers geknüpft wurde, verlief die folgende Synthese der biotinylierten Decapeptide wie beschrieben. Die Entschützung und Abspaltung gelang mit einer Reaktionsmischung aus TFA/ Triethylsilan/ Wasser im Verhältnis 95:2,5:2,5. Die O-Acetylgruppen des N-Acetylglucosamins im glycosylierten Peptid **76** wurden anschließend wiederum durch Umsetzung mit Natriummethanolat bei pH 9

verseift. Die entschützten Peptide wurden chromatographisch aufgereinigt und konnten mit Ausbeuten von 12 – 68% isoliert werden (Schema 21).



Schema 21 Festphasensynthese der biotinylierten NLS-Peptide **37** am Wang-Linker.

Obwohl die Peptide bei der Abspaltung von der festen Phase über 1 h mit 95% TFA behandelt wurden, konnte, ebenso wie bei der Entschützung der Peptide am Hycron-Linker mit 90% TFA, keine Anomerisierung oder Abspaltung des N-

Acetylglucosamins beobachtet werden. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigt die typische Kopplungskonstante von $^3J=8,4\text{Hz}$ des $\alpha\text{-H-GlcNAc}$ für $\beta\text{-glycosidische}$ Bindungen (Abb. 24). Wichtig ist eine schnelle Aufarbeitung des abgespaltenen Rohproduktes, um die Zeit unter sauren Bedingungen zu minimieren. Die glycosidischen Bindung von gebräuchlichen Zuckern wie GalNAc, GlcNAc, Gla, Glc und Man ist für eine kurze Zeit gegenüber TFA stabil. Die Stabilität wird durch Acetylschutzgruppen noch erhöht, und es ist bekannt, dass besonders stabile *N*- und *O*-verknüpfte GlcNAc-Reste auch kurze Zeit mit HF überstehen.

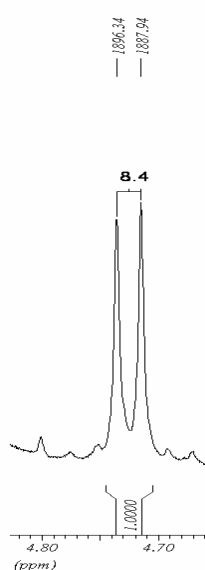


Abb. 24 $^1\text{H-NMR}$ des glycosylierten Peptids **76**

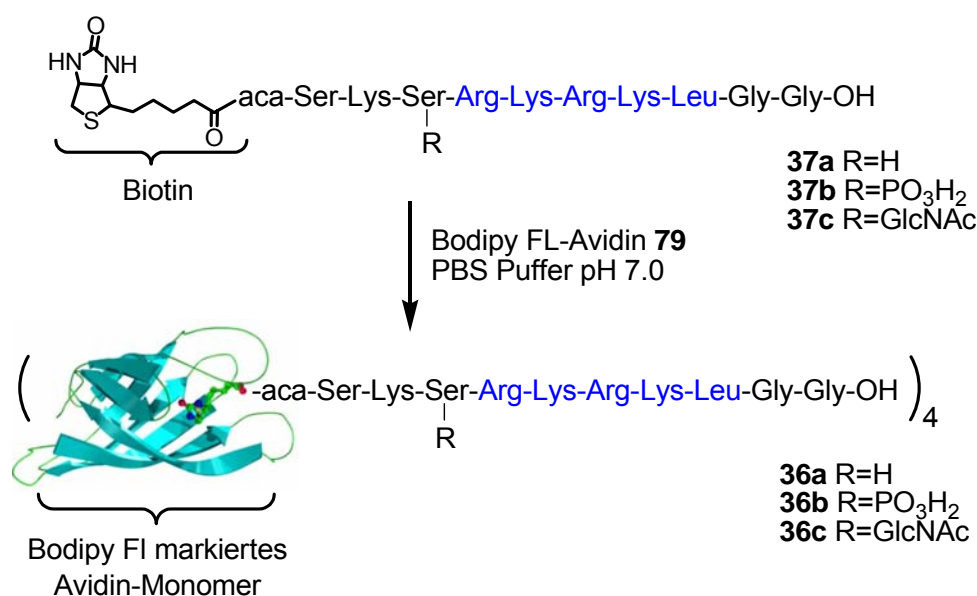
Ein Vergleich der beiden Syntheserouten zeigt eine höhere Ausbeute über 50% für die unmodifizierten und phosphorylierten Peptide am Wang-Linker (Tab. 5). Die Synthese des glycosylierten Peptides ist durch den sterisch anspruchsvollen glycosylierten Serinbaustein weniger effektiv. Obwohl die Abspaltbedingungen des Hycron-Linkers deutlich milder sind, überwiegen doch die Vorteile der Synthese am Wang-Linker: Es entfällt die aufwendige Synthese des Linkers in Lösung ebenso wie die Abtrennung des Palladium-Katalysators. Durch die simultane Entschützung der Seitenketten und Abspaltung vom Harz wird zusätzlich ein Schritt an der festen Phase eingespart, die notwendige Abtrennung der Abspaltprodukte über präoperative HPLC ist gut durchführbar.

Peptid	R	Ausbeute [%]	
		Hycron	Wang
37a	H	20*	63
37b	PO ₃ H ₂	41	68
37c	GlcNAc	25	7

Tab. 5 Ausbeuten der Peptide **37** am Hycron- und Wang-Linker. (*Verlust von ca. 60% durch defekte preparative HPLC)

4.2.3 Synthese der NLS-Avidin-Konjugate

Kleine Moleküle mit einer Masse weniger als 60 kDa können unkontrolliert durch freie Diffusion in den Zellkern gelangen. Die starke Bindung von Biotin zu Avidin sollte genutzt werden, um ein Konjugat aufzubauen, welches nur über NLS-induzierten aktiven Kernimport in den Zellkern lokalisieren kann. Die Synthese der Konjugate wurde in Zusammenarbeit mit R. VETTER aus dem Arbeitskreis von J. KUHLMANN durchgeführt.



Schema 22 Synthese der Bodipy-markierten NLS-Avidin-Konjugate **36**.

BodipyFL markiertes Avidin **79** (66 kD) wurde mit den biotinylierten vJun-NLS-Peptiden **37** in PBS Puffer (pH 7) gemischt und bei 4°C für 2h inkubiert (Schema 22). Um alle vier Biotin-Bindungsstellen des Avidin zu sättigen, wurde ein zehnfacher Überschuss der NLS-Peptide eingesetzt. Die Peptid-Avidin-Konjugate **36** besitzen eine Masse von 72 kDa. Die Kupplungslösung wurde aufkonzentriert und von ungebundenem Peptid mittels Centricon-30 Microcon-Centrators (Amicon) abgetrennt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde in einem Bradford Assay^[125] bestimmt.

4.2.4 Biologische Evaluierung der NLS-Avidin-Konjugate

Bestimmung der Affinität der NLS-Peptide zu Importin α

Die NBD-markierten Peptide **80**^[13] wurden von A. HENKEL eingesetzt um die Bindungsaffinität der verschieden modifizierten Kernlokalisierungssequenzen zu Importin α , dem Bindungspartner für NLS-induzierten Kernimport, zu bestimmen.

Die K_D -Werte wurden durch Polarisationsmessungen untersucht. Werden Fluorophore mit linearem Licht angeregt, wird das emittierte Licht je nach Beschaffenheit des Moleküls (Größe, Flexibilität) teilweise polarisiert. Diese Fluoreszenzanisotropie ist abhängig von der Fähigkeit des Moleküls zu rotieren. Nimmt durch Bindung zweier Moleküle die Größe zu, sinkt die Rotationsgeschwindigkeit und das resultierende Polarisationsignal steigt.

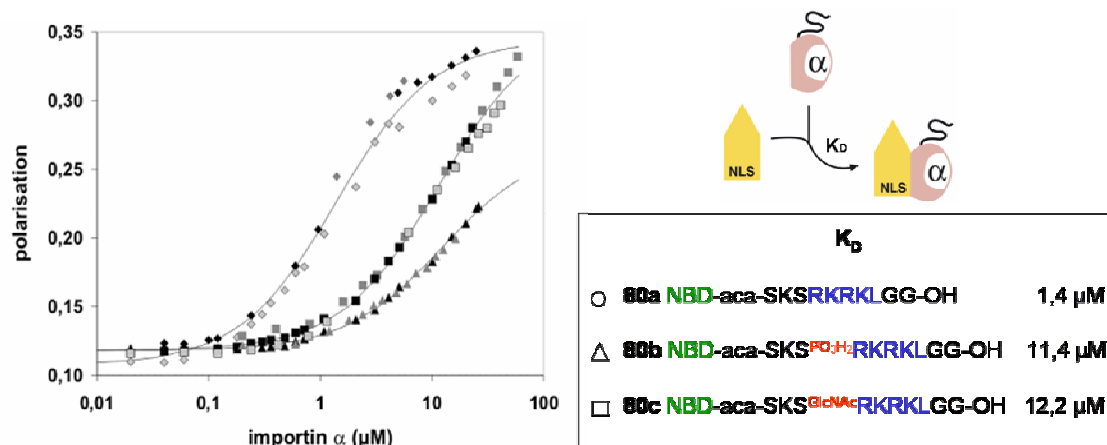


Abb. 25 Polarisationsmessungen zur Bestimmung der Affinität der Peptide **80** zu Importin α . Unterschiedliche Graustufen stehen für unabhängige Titrationsexperimente.

Steigende Konzentrationen von Importin α (0,04 – 25 μM) wurden zu den fluoreszenzmarkierten Peptiden **80** (0,2 μM) in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl pH 7,4 bei 20°C titriert. Ein Anstieg der Polarisierung bedeutet eine Bindung der NLS an Importin α . Die berechneten K_D Werte zeigen eine Abnahme der Affinität der phosphorylierten und glycosylierten Peptide **80b** und **80c** zu Importin α um eine Größenordnung im Vergleich zu dem unmodifizierten vJun-NLS-Peptid **80a** (Abb. 25).

Mikroinjektion der NLS-Avidin-Konjugate

Die Bodipy-markierten Avidin-NLS-Konjugate **36** wurden von R. VETTER (Arbeitskreis J. KUHLMANN, MPI Dortmund) biologisch evaluiert. Untersucht wurde hierbei die *in vivo* intrazelluläre Lokalisierung der Konjugate in NIH 3T3 Zellen (*Mus musculus* (Maus) Embryo Fibroblast Zellen) und MDCK Zellen (*Canis familiaris*, Madin-Darby Canine Kidney Zellen) als Repräsentanten für Epithel- und Fibroblast-Zelllinien.

Die Mikroinjektion ermöglicht das Einbringen der Proteine in lebenden Zellen und die direkte Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie. Die erfolgreiche Injektion wurde mit einem Texas Red Dextranmarker (TRD) kontrolliert. Die Coinjektion von TRD (70 kDa) diente zusätzlich als negative Kontrolle um sicher zu stellen, dass bei

der Injektion nicht der Zellkern getroffen wurde und dadurch die Ergebnisse der Lokalisationsstudie verfälscht werden.

Die NLS-Avidin Konjugate wurden mit Texas Red Dextran gemischt und in das Cytosol der Zellen injiziert. Die zelluläre Verteilung wurde zeitaufgelöst mit einem confokalen Lasermikroskop analysiert, die Fluorophore Bodipy-FL ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und TexasRed ($\lambda = 542 \text{ nm}$) wurden angeregt und in verschiedenen Kanälen aufgenommen.

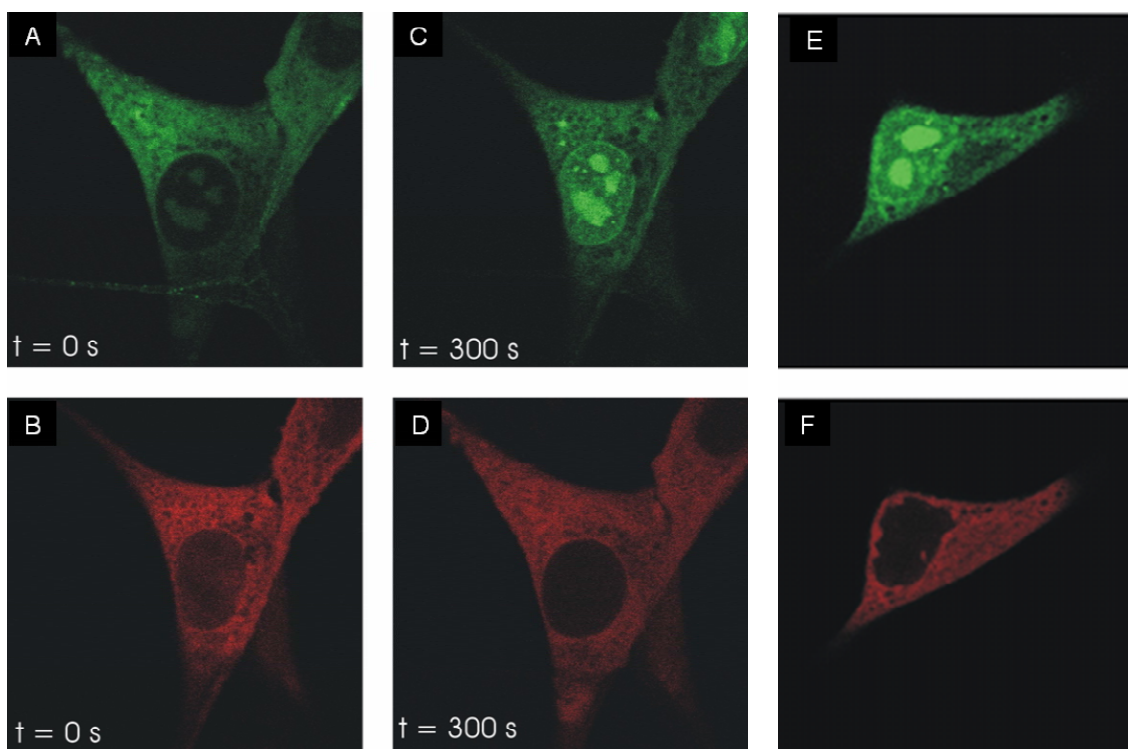


Abb. 26 Mikroinjizierte Bodipy-markierte Avidin-NLS-Konjugate ($9 \mu\text{M}$, grüne Fluoreszenz), coinjiziert mit Texas Red Dextran ($14 \mu\text{M}$, rote Fluoreszenz). A, B) Konjugat **36a** + TRD in NIH 3T3 Zellen bei $t=0 \text{ min}$; C, D) Konjugat **36a** + TRD in NIH 3T3 Zellen bei $t=5 \text{ min}$; E, F) Konjugat **36a** + TRD in MDCK Zellen bei $t=10 \text{ min}$.

Nach Mikroinjektion des unmodifizierten NLS-Avidin-Konjugates **36a** kann in beiden Zelltypen schon nach wenigen Sekunden eine Lokalisation der grünen Bodipy-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet werden (Abb. 26). Die stark gefärbten Felder im Zellkern entsprechen den Nucleoli. Die rote Fluoreszenz zeigt dagegen ausschließlich eine cytosolische Verteilung des TRD.

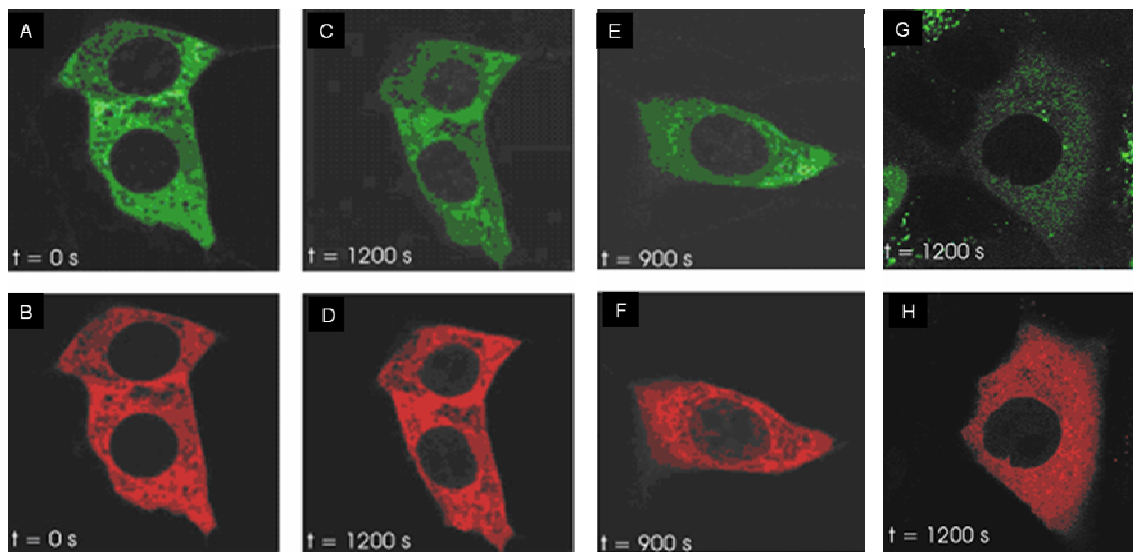


Abb. 27 Mikroinjizierte Bodipy-markierte Avidin-NLS-Konjugate (grüne Fluoreszenz), coinjiziert mit Texas Red Dextran ($14\mu\text{M}$, rote Fluoreszenz). A, B) Konjugat **36b** ($11\mu\text{M}$) + TRD in NIH 3T3 Zellen bei $t=0$ min; C, D) Konjugat **36b** ($11\mu\text{M}$) + TRD in NIH 3T3 Zellen bei $t=20$ min; E, F) Konjugat **36c** ($7\mu\text{M}$) + TRD in NIH 3T3 Zellen bei $t=15$ min; G, H) Konjugat **36b** ($11\mu\text{M}$) + TRD in MDCK Zellen bei $t=20$ min.

Die phosphorylierten und glycosylierten Konjugate **36b** und **36c** werden nach dem gleichen Verfahren mikroinjiziert (Abb. 27). Hier konnte weder für das phosphorylierte Konjugat **36b** noch für das glycosylierten Konjugat **36c** Kernimport beobachtet werden, Studien über einen Zeitraum von bis zu 20 Minuten zeigten keine Bodipy-Fluoreszenz im Zellkern.

Um einen unspezifischen Import der NLS-Avidin-Konjugate auszuschließen wurden NIH 3T3 und MDCK Zellen mit Bodipy-Avidin **79** (64 kDa) injiziert (Abb. 28). Es zeigt sich in beiden Zelltypen ausschließlich eine Anfärbung der cytosolischen Strukturen. Selbst nach 10 Minuten kann kein Import des Avidin in den Kern festgestellt werden. Der Kernimport des Konjugates **36a** ist folglich ausschließlich auf einen aktiven, NLS-induzierten Transport zurückzuführen.

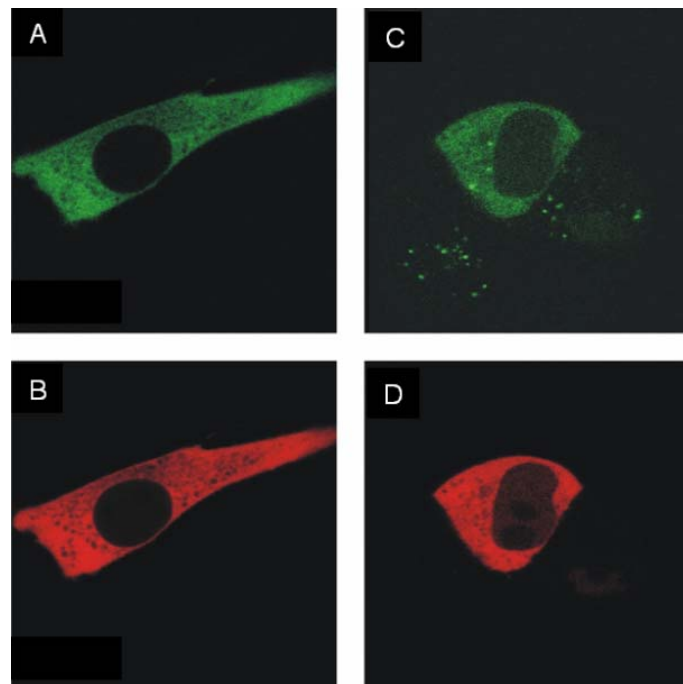


Abb. 28 Mikroinjiziertes Bodipy-markiertes Avidin **79** ($15\mu\text{M}$) mit Texas Red Dextran ($14\mu\text{M}$) in NIH 3T3 (A, B) und MDCK Zellen (C, D) bei $t=10\text{min}$.

Die Lokalisationsstudien zeigen deutlich einen selektiven Kernimport durch die unmodifizierte vJun-NLS. Das Protein Avidin, welches selbst nicht durch den NPC gelangen kann, kann durch Konjugation mit dem der vJun-NLS entsprechenden Decapeptid **37a** gezielt in den Zellkern transportiert werden. Diese Fähigkeit der Kernlokalisierungssequenz wird durch Modifizierung des der NLS benachbarten Serin beeinflusst. Entsprechend der für das vJun bekannten Regulierung verhindert eine Phosphorylierung an dieser Stelle den Kernimport. Die kurze Peptidsequenz besitzt demnach alle Eigenschaften der NLS im vJun-Protein. Es wurde bislang keine Glycosylierungsstelle am vJun-Protein identifiziert, der Einfluss einer GlcNAc-Modifizierung auf den Kernimport ist daher unbekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Glycosylierung des Serin den gleichen Effekt wie die Phosphorylierung hat und den Kernimport des NLS-Avidin-Konjugates negativ reguliert. Dies widerspricht der Theorie, nach der eine GlcNAc-Modifizierung potentielle Phosphorylierungsstellen blockiert und diese beiden Modifikationen dadurch konträre Funktionen erfüllen. Für das Beispiel der Kernlokalisierungssequenz des vJun-Proteins muss von einem anderen

Mechanismus ausgegangen werden. Die gemessene Affinität der NLS zu Importin α entspricht den *in vivo* gefundenen Resultaten. Die Bindung der polybasischen Kernlokalisierungssequenz zu Importin erfolgt vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen, welche durch Einbringen einer zusätzlichen negativen Ladung im Bereich der Bindung gestört werden können. Phosphorylierung und auch Glycosylierung regulieren so den Kernimport negativ.

4.3 PTD-NLS-Konjugate

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte ein Peptid bestehend aus einer Proteintransduktionsdomäne (PTD) und einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) aufgebaut werden. Durch Kombination dieser beiden Sequenztypen sollte die Translokation durch die Zellmembran und die Zellkernadressierung erreicht werden. Die Entwicklung neuer Transportsysteme würde eine gezielte Manipulation zellulärer Abläufe ermöglichen. Die Ausnutzung natürlich vorhandener Transportwege und Adressierung bietet ein großes Potential, Fracht unterschiedlichster Art effektiv und selektiv in bestimmte Zellen beziehungsweise Zellkompartimente einzuschleusen.

In vorangegangenen Arbeiten wurden von T. KRÄMER und H. M. S. KUMAR einige PTD-NLS-Peptide synthetisiert (Tab. 6).^[126, 127] Ein peptidischer Linker (GGG) trennt die hydrophobe und die NLS-Sequenz. Als Proteintransduktionsdomäne diente der myristoylierte (Myr) N-Terminus des HIV-1 Gag MA Proteins. Als Kernlokalisierungssequenz wurde entweder die Polylysinsequenz des Maus c-abl Proteins oder die ebenfalls polybasische Sequenz des humanen c-myc Proteins verwendet. Anschließende biologische Untersuchungen durch Fluoreszenzmikroskopie sollten die Eigenschaften der Peptidkonjugate *in vivo* belegen. Die Fluoreszenzmarkierung wurde an einem C-terminalen Lysin-Rest eingeführt.

	NLS	PTD	Peptid	
81	Maus c-abl	HIV-1 gag MA	Myr GARASVL GGG KKKKK X(Mant)-OH	[126]
82	Maus c-abl	HIV-1 gag MA	Myr GARASVLL GGG KKKKK K(Mant)-OH	[127]
83	Humanes c-myc	HIV-1 gag MA	Myr GARASVL GGG PAAKRKVKL K(Mant)-OH	[127]

Tab. 6 Fluoreszenz-markierte PTD-NLS-Peptide. X=2-Amino-5-hydroxy-pentansäure.

Als Fluorophor kamen einige Gruppen in Betracht. 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol- (NBD-), Dansyl-, Pyren- und Bodipy FL-Fluorophore zeichnen sich durch ihre Stabilität und hohe Quantenausbeute aus. Diphenylhexatrien- (DPH)-,^[128] N-Methylantranilat- (Mant-),^[91, 129] Coumarin-,^[130] o-Phthaldialdehyd-(OPA)-^[131] oder Fluorenyl- (Fluo-)^[132]

Chromophore besitzen im Vergleich eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität, zusätzlich zeigen sich bei Mant Interferenzen mit zelleigenen Chromophoren. So absorbiert/ emittiert das Mant-Chromophor bei 368 nm/ 437 nm, das zelleigene Reduktionsmittel NADH hingegen bei 365 nm/ 450 nm. Eine Visualisierung dieser Chromophore *in vivo* ist damit ausgeschlossen.

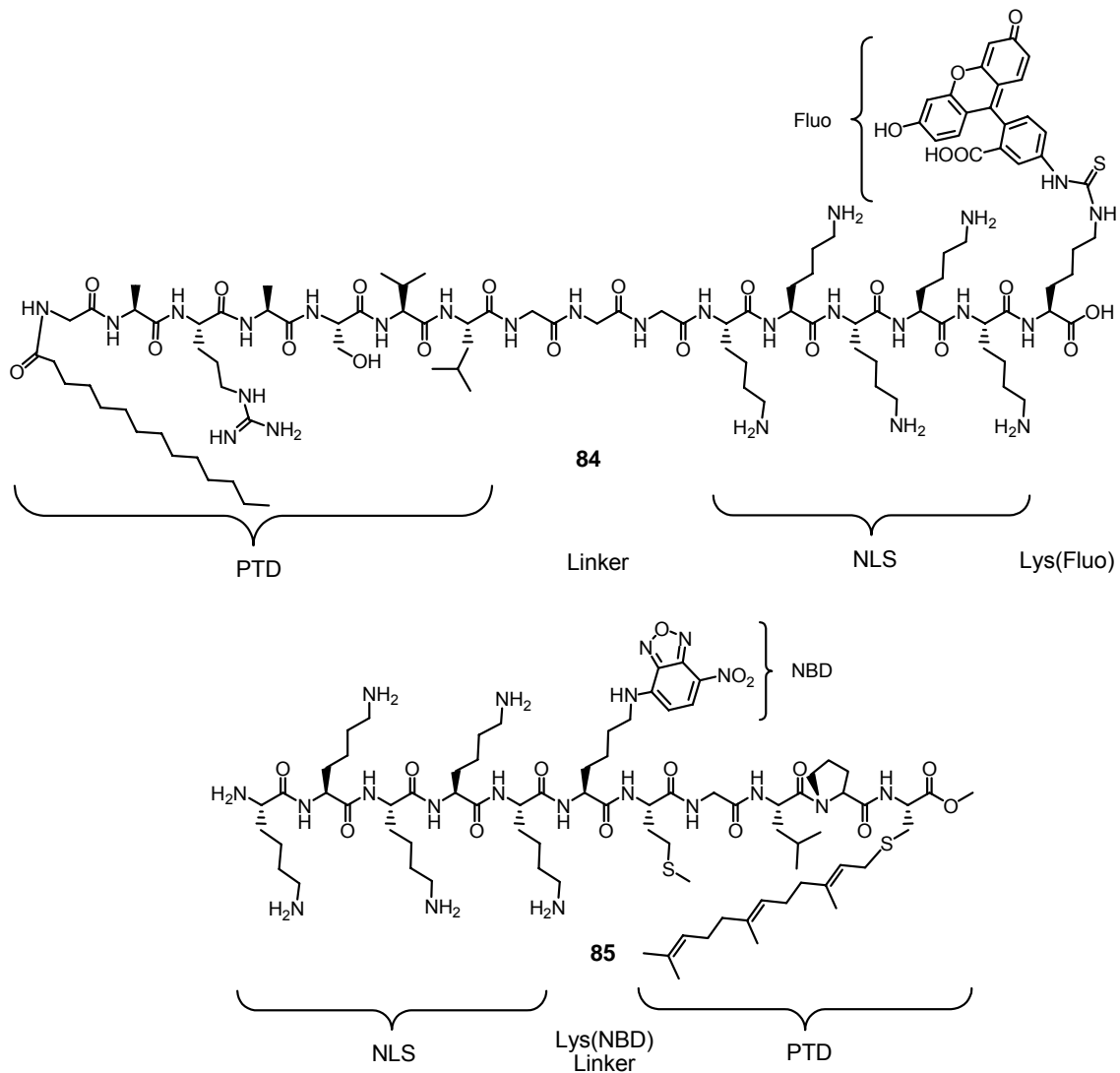


Abb. 29 Fluoreszenz-markierte PTD-NLS-Konjugate **84** und **85**.

Bei den bisher synthetisierten Peptiden wurde Mant als Fluorophor verwendet, dieses eignet sich nicht für *in vivo* Untersuchungen. Konjugat **84** sollte daher analog der

Synthese des Konjugates **82** mit einem geeigneteren Fluoreszenzmarker, wie z. B. Fluorescein, hergestellt werden (**84**, Abb. 29).

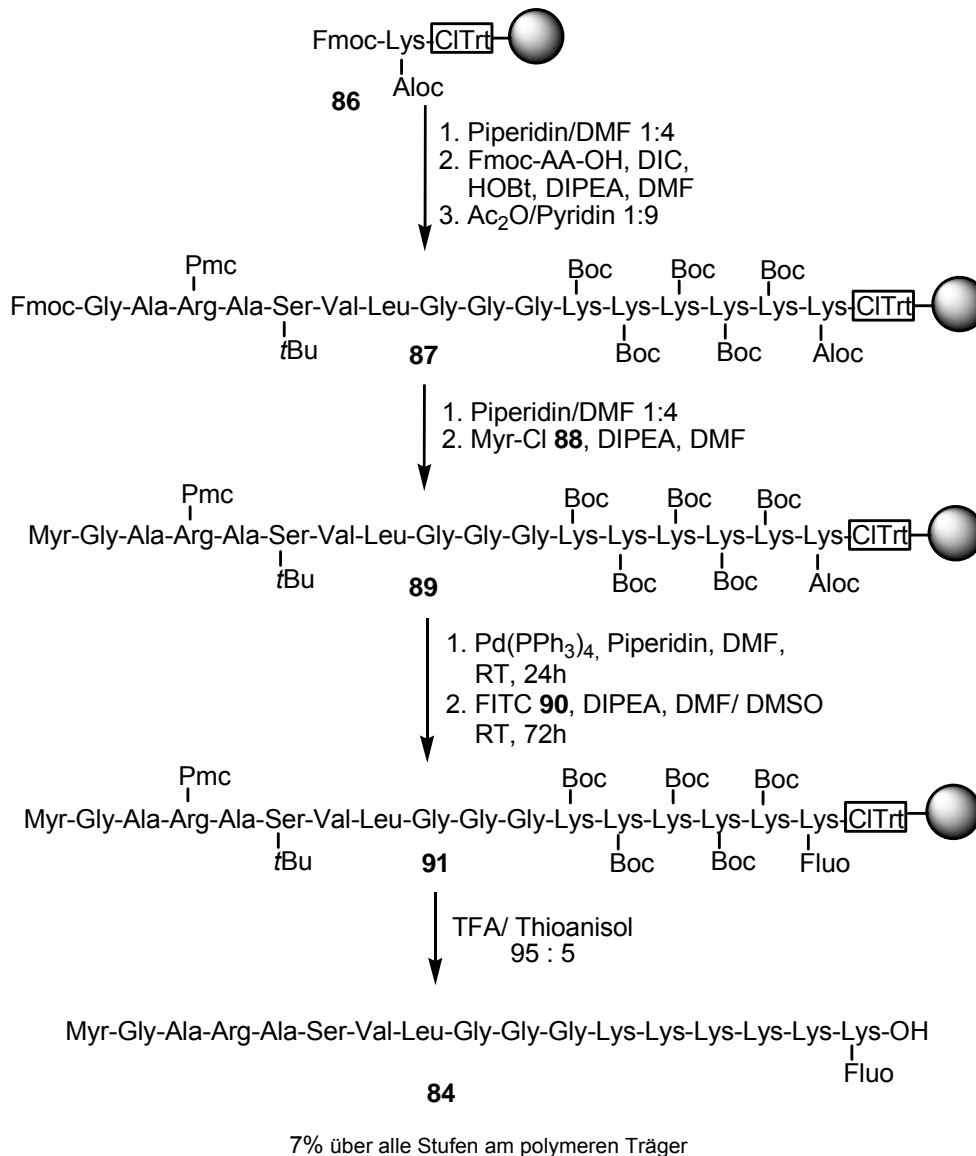
Es sollte außerdem ein Peptid bestehend aus einer weiteren Kombination von PTD und NLS synthetisiert werden (**85**, Abb. 29). Die C-terminale farnesylierte Sequenz des N-Ras Proteins (M¹⁸²GLPC(Far)-OMe) ist durch die einfache Lipidierung in der Lage, Membranen über den so genannten Flip-Flop-Mechanismus zu durchdringen.^[64] Sie sollte mit der Kernlokalisierungssequenz des Maus c-abl Proteins verknüpft werden. Ein Fluoreszenzmarker sollte an das Seitenkettenamin eines Lysins gebunden werden und als Linker zwischen der hydrophoben und der hydrophilen Sequenz eingesetzt werden. Als Fluorophor wurde 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) ausgewählt. An der Position des Fluorophors kann für folgende Anwendungen ein beliebiges Transportgut verankert werden.

4.3.1 Synthese des Fluorescein-markierten PTD-NLS-Konjugates **84**

Die Synthese des Peptides **84** aufgebaut aus der PTD des HIV-1 gag MA und der NLS des Maus c-abl wurde von H. M. S. KUMAR^[127] entwickelt und in Zusammenarbeit durchgeführt.

Das Peptid wurde ausgehend von Fmoc-Lys(Aloc)-OH nach der Fmoc-Strategie an Polystyrolharz mit dem säurelabilen CITrt-Linker aufgebaut (Schema 23). Die Kettenverlängerung wurde unter Standardbedingungen mit DIC/ HOBt als Kupplungsreagenzien durchgeführt. Nach jeder Kupplung erfolgte ein *Capping* mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Als Seitenkettenschutzgruppen dienten die säurelabilen Boc-, *tert*-Butyl und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl- (Pmc-) Gruppen. Das Lysin, an dessen Seitenkettenamin der Fluorophor gebunden werden sollte, wurde mit der orthogonalen Aloc-Schutzgruppe geschützt. Die N-terminale Myristoilsäure wurde durch zweimalige Reaktion des Säurechlorids **88** mit dem festphasengebundenen Peptid in DMF mit DIPEA als Base eingeführt. Als letzten Schritt an der festen Phase wurde der Fluorophor angeknüpft. Die Aloc-Schutzgruppe wurde Pd(0)-katalysiert

abgespalten, gefolgt von der Kupplung des Fluoresceinisothiocyanats (FITC) **90** in einem Lösemittelgemisch aus DMF/ DMSO.



Schema 23 Synthese des Fluorescein-markierten Peptids **84**.

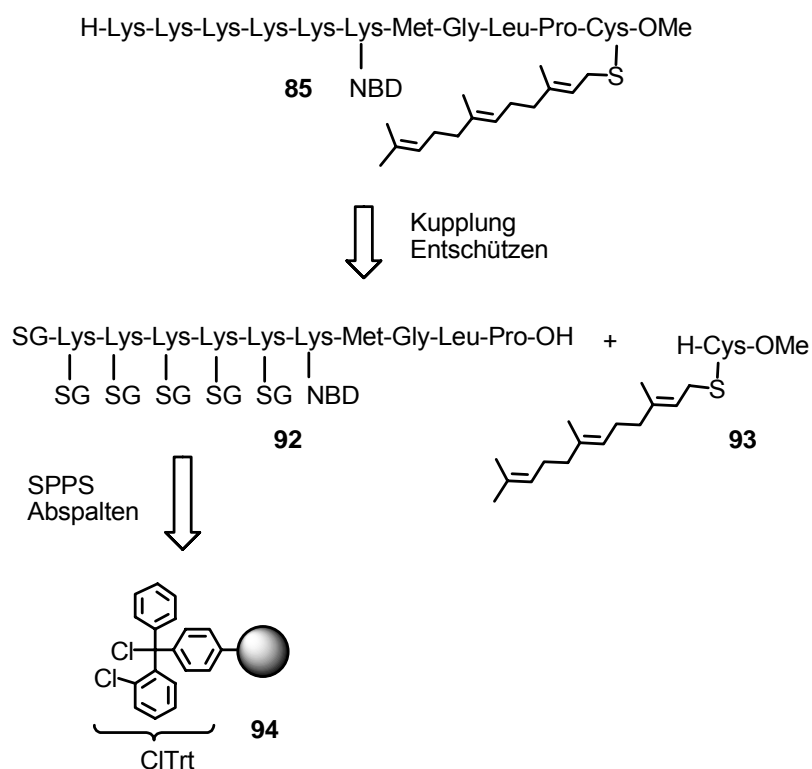
Aufgrund des großen sterischen Anspruchs der Fluoresceingruppe konnte auch nach einer Reaktionszeit von 72 h kein quantitativer Umsatz erreicht werden. Auch durch Versuche das Fluorescein in Lösung an das Aloc-entschützte und ansonsten vollgeschützten Peptid einzuführen zeigten keine Verbesserung der Umsetzung. Da für diese Strategie das geschützte Peptid unter den milden Bedingungen mit Essigsäure/

Trifluorethanol/ Dichlormethan (2:2:6) abgespalten werden muss und zwei zusätzliche Schritte der Kupplung und anschließender Entschützung in Lösung hinzukommen, wurde weiterhin nach der ersten Strategie verfahren.

Das Produktgemisch aus Fluoreszenz-markiertem und unmarkiertem Peptid wurde mit 95% TFA vollständig entschützt und parallel von der festen Phase abgespalten. Nach Aufreinigung über präperative HPLC konnte das PTD-NLS-Konjugat **84** in 7 % Ausbeute, ausgehend von der Erstbeladung des Harzes, isoliert werden.

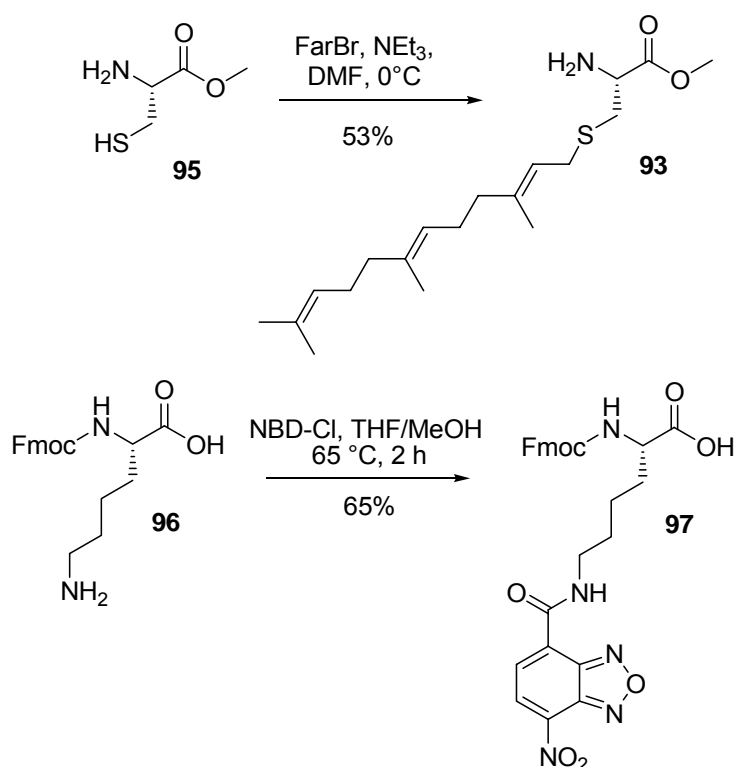
4.3.2 Synthese des NBD-markierten PTD-NLS-Konjugates **85**

Die Synthese des PTD-NLS-Peptides **85** sollte an der festen Phase über eine konvergente Strategie durchgeführt werden (Schema 24). Die Anknüpfung des farnesylierten C-terminalen Cysteinmethylesters **93** erfolgte in Lösung als Fragmentkondensation an das vollständig geschützte Decapeptid **92**. Diese Strategie bot den Vorteil, das Decapeptid über Standardfestphasenpeptidsynthese aufbauen zu können, da der empfindliche Farnesylrest im letzten Schritt eingeführt wurde. Die Fragmentkondensation an der Position zwischen Prolin und Cystein verhindert zusätzlich eine mögliche Racemisierung der aktivierten Aminosäure. Um das Peptid am Harz zu verknüpfen wurde der bewährte, stark säurelabile 2-Chlortrityl-Linker am Polystyrolharz ausgewählt. Die milden Abspaltbedingungen ermöglichen die Synthese von vollständig geschützten Peptiden. Die Festphasenpeptidsynthese sollte nach der Fmoc-Strategie erfolgen.



Schema 24 Retrosynthese des NBD-markierten PTD-NLS-Peptids **85**. SG= Schutzgruppe.

Für die Synthese wurde zum einen der farnesylierte Cysteinmethylester **93** und zum anderen das NBD-markierte Lysin **97**, welches als Baustein in das Peptid eingeführt werden sollte, benötigt und in Lösung dargestellt (Schema 25). Die Synthese von **93** gelang in 53% Ausbeute durch Umsetzung von Cysteinmethylester **95** mit Farnesylobromid. Ausgehend von Fmoc-Lysin **96** wurde das Fmoc-geschützten Lys(NBD)-OH **97** in 65% Ausbeute synthetisiert.

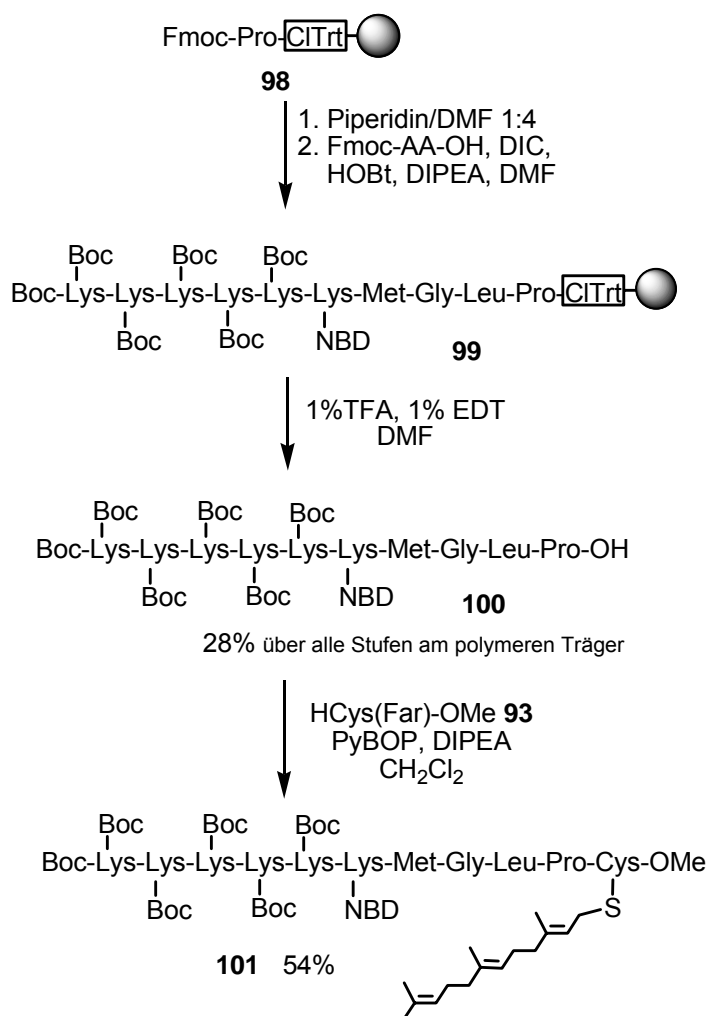


Schema 25 Synthese von *H*-Cys(*far*)-OMe **93** und Fmoc-Lys(NBD)-OH **97**.

Als Schutzgruppen für die Lysinseitenketten sollte zunächst die Boc-Gruppe untersucht werden. Boc-Gruppen sind stabil unter den milden Abspaltbedingungen des CITrt-Linkers, können aber schon mit 5% TFA abgespalten werden. Unter diesen Bedingungen kann in Anwesenheit eines Farnesylrestes entschützt werden, ohne die säurelabile Gruppe zu gefährden.^[79] Alternativ wurde die Aloc-Gruppe eingesetzt, diese ist als Pd(0)-spaltbare Schutzgruppe orthogonal zu dem säurelabilen Linker und der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe.

Zunächst wurde Fmoc-Prolin unter basischen Bedingungen an das 2-Chlorotrylchloridharz gebunden. Hierzu wurden 1,2 Äquivalente der Aminosäure mit 4,8 Äquivalenten DIPEA in trockenem CH₂Cl₂ mit dem vorgequollenen Harz geschüttelt. Für zufriedenstellende Beladungen (0,3-0,6 mmol/g) musste die Aminosäure vorher durch wiederholte Zugabe und Abdestillation von Toluol azeotrop getrocknet werden. Nach der Anbindung des Prolins wurden überschüssige Anknüpfungsstellen abgesättigt, indem das Harz mit MeOH / DIPEA in CH₂Cl₂

behandelt wurde. Die Fmoc-Gruppen wurden mit 20% Piperidin in DMF abgespalten, die Kettenverlängerung erfolgte unter Aktivierung mit HBTU und HOBT. Als letzte Aminosäure wurde ein zweifach Boc-geschütztes Lysin eingeführt, so dass das Decapeptid **99** nun vollständig mit sechs Boc-Gruppen geschützt war. Die Abspaltung des Peptides **99** vom Harz gelang mit 1% TFA in CH_2Cl_2 und in Anwesenheit von 1% EDT ohne ungewolltes Entschützen der Boc-Gruppen (Schema 26). Die anschließende HPLC-Aufreinigung und Charakterisierung von **101** wurde erheblich durch die geringe Löslichkeit des vollgeschützten Decapeptides erschwert und lieferte das geschützte Peptid in 28% Ausbeute.



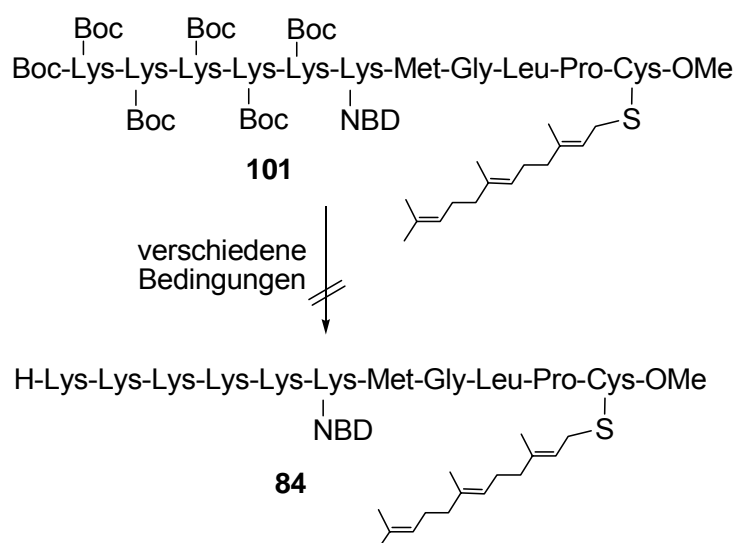
Schema 26 Synthese des Boc-geschützten Undecapeptides **101**.

Ein weiteres Problem bei der Synthese war die leichte Oxidation des Methionin-Schwefels. Obwohl die Synthese vollständig unter Argon durchgeführt wurde, konnte ein großer Anteil nur als oxidiertes Peptid erhalten werden. Um das Methioninsulfoxid wieder zu reduzieren wurden einige Bedingungen getestet (Tab. 7). Keine konnte allerdings das Methionin selektiv reduzieren. Mit Trimethylsilylbromid und Ethandithiol konnte das Sulfoxid vollständig reduziert werden, allerdings wurden hierbei auch alle Boc-Schutzgruppen abgespalten. Die Möglichkeit die Reduktion als letzten Schritt mit gleichzeitiger Entschützung durchzuführen entfiel, da die Farnesylgruppe unter diesen Bedingungen nicht stabil ist. Das oxidierte Peptid konnte allerdings teilweise durch präparative HPLC abgetrennt werden.

Reaktionsbedingungen	M(O) Reduktion	Boc	Far
DMF-SO ₃ , Bu ₄ Ni, DMF, RT, 3h		Zersetzung	
TMS-S-Ph, DMF, RT, 2h		Zersetzung	
EDT, TMSBr, DMF, RT, 1h	quantitativ	abgespalten	nein
EDT, TMSBr, DCM, RT, 15min	quantitativ	abgespalten	nein
Bu ₄ NBr, EDT, RT, 15min ^[133]	nein	o.k.	

Tab. 7 Versuche zur Reduktion des Methioninthioethers.

Die Kupplung von **100** mit H-Cys(far)-OMe **93** lieferte die besten Ergebnisse unter Verwendung von PyBOP oder HATU/ HOAt als Kupplungsreagenzien (Schema 26). Allerdings wurde bei der Kupplung mit PyBOP kaum Oxidation des Methionin festgestellt, während unter den Bedingungen mit HATU/ HOAt fast vollständig oxidiert wurde. Kupplungen mit EEDQ oder DIC/ HOBt zeigten auch nach sechs Tagen kaum Umsatz. Nach Säulenchromatographie mit Chloroform/ Methanol konnte das farnesylierte Undecapeptid in 54% Ausbeute isoliert werden.

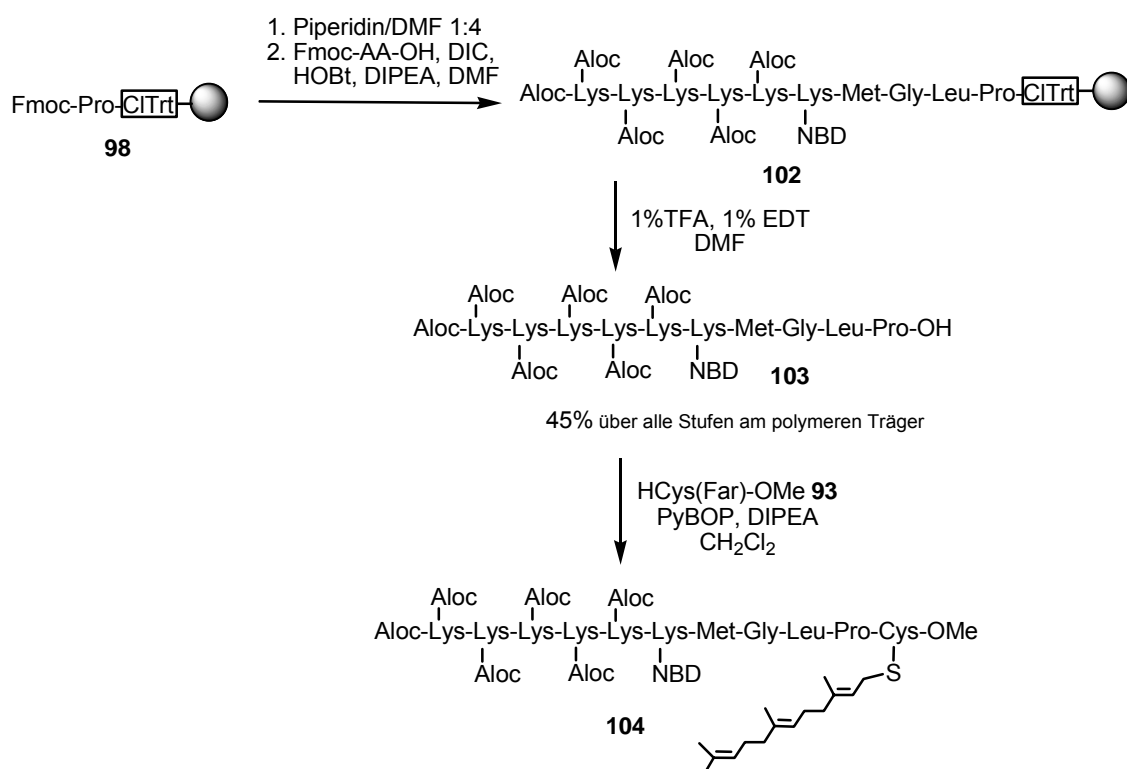


Schema 27 Versuche zur Boc-Entschützung.

Die abschließende Entschützung der Lysinseitenketten gestaltete sich als äußerst schwierig. Es wurden verschiedene Bedingungen getestet (Schema 27). Es ist bekannt, dass man mit TMSOTf und Lutidin selektiv Boc-Gruppen in Anwesenheit von säurelabilen Farnesylresten entschützen kann.^[79] Dies gelang allerdings nur unvollständig. Um alle sechs Boc-Gruppen abzuspalten, mussten die Reaktionszeiten soweit verlängert werden, dass die Farnesylgruppe unter diesen Bedingungen nicht mehr intakt war. Weitere Versuche mit milden Bedingungen wie z. B. verschiedenen Konzentrationen an TFA, SiO₂, SiO₂/ NaHSO₄ oder SiO₂ unter Mikrowellenstrahlung^[134] lieferten ähnliche Ergebnisse. Sobald die Reaktionsbedingungen ausreichten um alle Boc-Gruppen abzuspalten, war der Farnesylrest nicht mehr stabil.

Da die Entschützung von sechs Boc-Schutzgruppen nicht kompatibel mit der Farnesylgruppe ist, wurde die Synthesestrategie umgestellt. Als unter milden Bedingungen abspaltbare Schutzgruppe wurde nun die Aloc-Gruppe eingesetzt. Die Synthese des Aloc-geschützten Decapeptides **103** erfolgte analog der Synthese von **100** (Schema 28). Das Peptid konnte mit 1% TFA vom Harz abgespalten werden und durch Zugabe von Wasser ausgefällt werden. Das Produkt konnte in 45% Ausbeute als Gemisch aus Peptid **103** und dem am Methionin oxidierten Peptid erhalten werden.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit gelang eine Aufreinigung durch HPLC jedoch nicht. Das Produktgemisch wurde unter Aktivierung mit PyBOP mit H-Cys(far)-OMe **93** umgesetzt. Mittels MALDI-Spektrometrie konnten zwar sowohl Edukt **105** wie auch Produkt **104** nachgewiesen werden, eine Isolierung des Produktes gelang durch die schlechte Löslichkeit allerdings nicht. Eine Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen auf dieser Stufe mittels Pd(PPh₃)₄ und Phenylsilan blieb erfolglos.



Schema 28 Synthese des Aloc-geschützten Undecapeptides **104**.

Die bei dieser Synthese aufgetretenen Probleme begründeten sich hauptsächlich in der schlechten Löslichkeit der Intermediate, ein durchaus bekanntes Problem in der konvergenten Peptidsynthese.^[135]

4.3.3 Biologische Evaluierung der PTD-NLS-Konjugate

In *in vivo* Tests sollte nun die Lokalisation des Fluorescein-markierten PTD-NLS-Konjugates **84** untersucht werden. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit A. HENKEL aus der Arbeitsgruppe von J. KUHLMANN, MPI Dortmund, durchgeführt.^[136]

HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid **84** (2 μM , 8 μM , 30 μM) bei 37°C für 10 Minuten oder 22 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen gewaschen und mit Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Mukasol auf einem Objektträger eingedeckelt und nach Aushärtung unter einem Lasermikroskop betrachtet. Es zeigte sich, dass die Morphologie der Zellen, mit Ausnahme der Zellen bei Zugabe des Peptides in 30 μM Konzentration, sich nicht von den Negativkontrollen unterschied. Bei der hohen Konzentration an Peptid waren die Zellen größtenteils lysiert, die Zellfragmente allerdings zeigten zum Teil Fluoreszenz. Vermutlich stört die Einlagerung vieler Peptide in die Zellmembran deren Struktur soweit, dass sie aufbricht. Ähnliche Beobachtungen wurden schon von anderen Arbeitsgruppen gemacht.^[137]

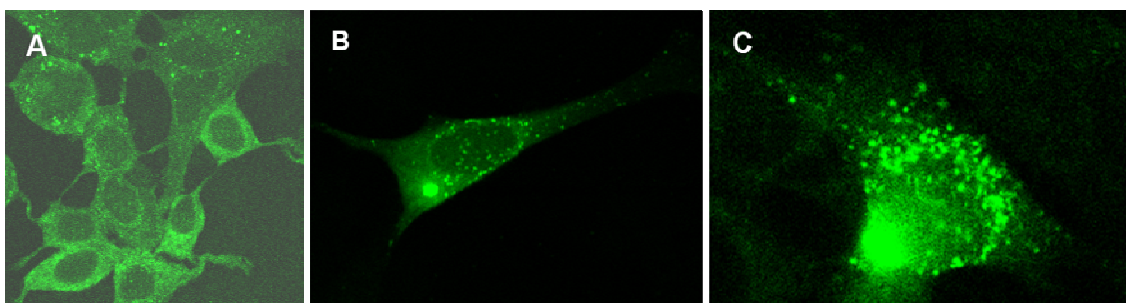


Abb. 30 Fluoreszenzaufnahmen von fixierten HeLa-Zellen nach Inkubation mit PTD-NLS-Konjugat **84** (2 μM). A) 10 min; B-C) 22 h.

Bei Zugabe des Konjugates **84** in 2 μM und 8 μM Konzentration konnte eine Akkumulation der Fluorescein-Fluoreszenz in den Zellen festgestellt werden (Abb. 30). Nach 10 min Inkubation zeigten die Zellen eine verhältnismäßig gleichförmige Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zellen mit Aussparung des Zellkerns. Werden die Zellen für 22h inkubiert, bilden sich Aggregate in der Nähe des Zellkerns sowie im Bereich des Golgiapparates.

Die Fluoreszenz der Zellen zeigte, dass das Peptid in die Zellen gelangen konnte. Die Aussparung des Zellkerns ist allerdings ungewöhnlich. Aufgrund seiner geringen Größe sollte das Peptid **84** durch Diffusion in den Zellkern zu gelangen können. Ein durch die NLS eingeleiteter aktiver Kernimport sollte eine Akkumulation im Kern noch verstärken. Dies konnte hier nicht beobachtet werden, es liegt sogar eine geringere Fluoreszenz im Zellkern gegenüber dem Cytoplasma vor. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Affinität des Peptides zur Zellmembran. Myristoylreste in Kombination mit einer polybasischen Sequenz können die Membranaffinität um das 3000fache erhöhen und so das Peptid irreversibel an Membranen binden.^[3, 138] Im membrangebundenen Zustand wäre zusätzlich durch eine Anlagerung der NLS an die Lipiddoppelschicht die Bindung eines nukleocytoplasmatischen Transportfaktors nicht möglich. Die Bindung ist zum einen für den Kernimport notwendig, zum anderen würde sie ein Herauslösen des Peptids aus der Membran unterstützen, da eine Wiederanlagerung der basischen Sequenz an die Membran verhindert wird. Durch die verstärkte Bindung von Peptid und Plasmamembran kommt es nur selten zur Dissoziation des Peptids aus der Plasmamembran in das Cytoplasma. Die geringe Dissoziationsrate und das Vorkommen weiterer Membranen innerhalb der Zellen reduzieren die Transportereignisse in den Kern.

Das eingesetzte Peptid **84** kann aufgrund der myristoylierten Sequenz des HIV-1 gag MA Proteins in die Membran einlagern und so in die Zelle zu gelangen. Ein Weitertransport in den Zellkern findet nicht statt bzw. konnte nur sehr selten beobachtet werden. Vermutlich liegt das Konjugat **84** in den Zellen rein membrangebunden vor und wird anfangs gleichmäßig an der Cytoplasmamembran anlagert. Längere Inkubationszeiten führen zu Membrantransport innerhalb der Zelle (Kernhülle und Golgi) und gezieltem Abbau in Lysosomen, was die Verteilung der Fluoreszenz, und somit des Peptides in der Zelle erklären würde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Peptide mit maßgeschneiderten posttranslationalen Modifikationen bieten die Möglichkeit, biologische Informationen auf molekularer Ebene zu sammeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen eine Festphasensynthese für doppelt lipidierte Peptide zur Ligation an verkürztes N-Ras entwickelt werden. Außerdem sollten phosphorylierte und glycosylierte Peptide, welche der Kernlokalisationssequenz des vJun-Proteins entsprechen, synthetisiert werden. Durch Verknüpfung mit einem Protein sollten die Transporteigenschaften dieser Konjugate in mikrobiologischen Untersuchungen analysiert werden. Im letzten Teil der Arbeit sollte ein amphiphilisches Peptid, bestehend aus einer lipidierten Sequenz und einer polybasischen Sequenz, an der Festphase aufgebaut und dessen zelluläre Lokalisation untersucht werden.

Die Synthese lipidiertes Peptide wird durch die Säurelabilität der Isoprenylthioether und die Basenlabilität der Palmitoylthioester außerordentlich erschwert. Insbesondere wenn beide Lipidierungen in einem Peptid vorkommen, ist die Wahl von mild abzuspaltenden Schutzgruppen entscheidend. In dieser Arbeit konnten doppelt lipidierte, mit einem MIC-Linker zur Proteinligation versehene Peptide an der festen Phase synthetisiert werden und anschließend C-terminal mit einem Bodipy-Fluorophor markiert werden (Abb. 31).

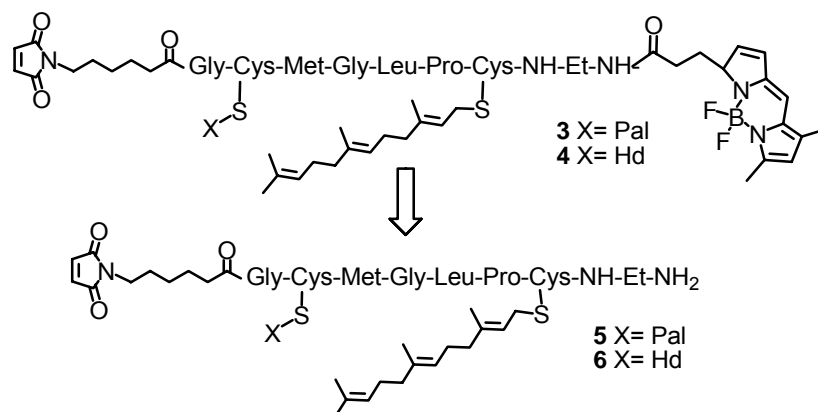
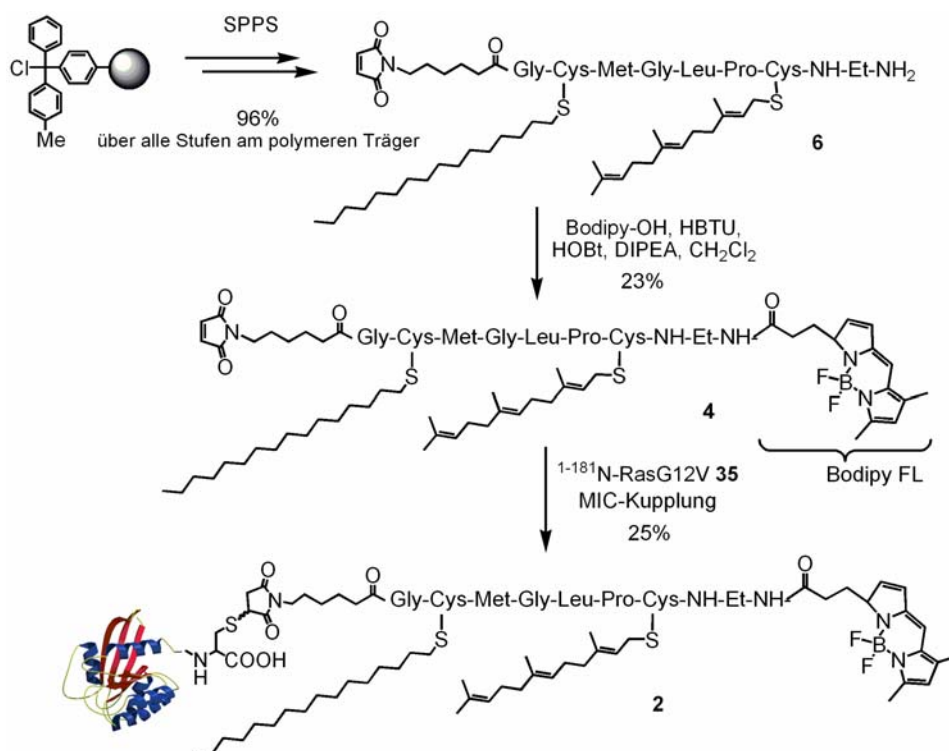


Abb. 31 N-Ras-Peptide.

Die Synthese des hexadecylierten und farnesylierten Heptapeptid **6** konnte in sehr guten Ausbeuten von 96% über Standardfestphasenpeptidsynthese (SPPS) an dem säurelabilen MeTrt-Linker durchgeführt werden. Das MIC-markierte Heptapeptid **6** wurde mit Bodipy FL nach Aktivierung mit HBTU und HOBt in 23% Ausbeute umgesetzt. Durch Ligation mit verkürztem N-Ras **35** konnte erstmals ein doppelt lipidiertes und C-terminal Fluoreszenz-markiertes semisynthetisches N-Ras Protein (**2**) hergestellt werden (Schema 29).



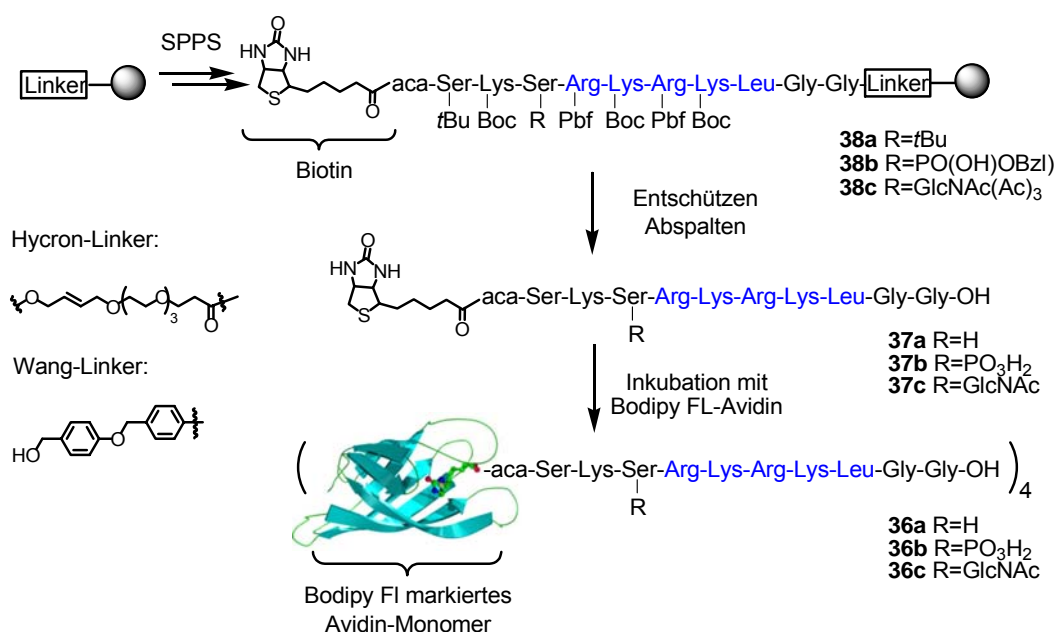
Schema 29 Festphasensynthese des Bodipy-markierten, hexadecylierten und farnesylierten N-Ras-Peptides **4** und anschließende MIC-Kupplung zum semisynthetischen N-Ras-Protein **2**.

Die Synthese des palmitoylierten und farnesylierten Heptapeptids **5**, welches der nativen C-terminalen Sequenz des N-Ras entspricht, wurde durch die zusätzliche Labilität des Palmitoylthioesters und dessen Tendenz zur *S,N*-Acylwanderung erschwert. Die Palmitoylgruppe kann entweder an der festen Phase eingeführt werden oder bereits im Cystein-Baustein vorhanden sein. Beide Strategien wurden bisher noch nicht an der festen Phase mit einem säurelabilen Linker durchgeführt. Hier konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass beides möglich ist.

Die schon bei Peptid **6** aufgetretene Tendenz zur Zyklisierung während der Abspaltung vom Harz ist bei dem palmitoylierten Peptid deutlicher ausgeprägt. Es konnten keine Abspaltungsbedingungen gefunden werden, die zu dem Peptid **5** in großer Reinheit führen. Das Produktgemisch aus **5** und zyklisiertem Nebenprodukt konnte mit Bodipy umgesetzt werden, jedoch war eine Isolierung des Fluoreszenz-markierten, palmitoylierten und farnesylierten Peptids **3** nicht möglich.

Das semisynthetische N-Ras-Protein **2** wurde von C. NICOLINI (Arbeitsgruppe R. WINTER, Universität Dortmund) für biophysikalische Studien eingesetzt. Es konnten anhand der Verteilung des Proteins in Modellmembranen Rückschlüsse auf die molekularbiologischen Eigenschaften von N-Ras geschlossen werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde ein System zur Translokation von großen Molekülen in den Zellkern entwickelt und die Regulierung dieses Transportes durch Phosphorylierung und Glycosylierung untersucht. Es wurden verschieden modifizierte Peptide, welche der Kernlokalisationssequenz des vJun-Proteins entsprechen, an der festen Phase aufgebaut. Hier war ebenfalls die Labilität des Phosphat- bzw. GlcNAc-Restes entscheidend für die Planung der Synthese. Die Peptide wurden mit Biotin markiert und an Fluoreszenz-markiertes Avidin konjugiert.



Schema 30 Synthese der unmodifizierten, phosphorylierten und glycosylierten Bodipy-Avidin-NLS-Konjugate **36**.

Die Festphasensynthese wurde zum einen an dem hydrogenolytisch spaltbaren Hycron-Linker und zum anderen an dem säurelabilen Wang-Linker durchgeführt (Schema 30). Beide Synthesestrategien lieferten die gewünschten biotinylierten Peptide **37** in guten Ausbeuten. Ein Vorteil der Synthese am Wang-Linker ist die Vermeidung von Palladium im Produkt, da dieses die folgenden zellbiologischen Untersuchungen stören könnte. Ohne die aufwendige Synthese des Hycron-Linkers und durch paralleles Abspalten und Entschützen der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen am Wang-Linker entfallen zusätzliche Syntheseschritte. Durch Inkubation mit Bodipy-markiertem Avidin wurden alle vier Biotin-Bindungsstellen gesättigt und die erhaltenen Avidin-NLS-Konjugate **36** konnten in Lokalisationsstudien untersucht werden.

Die biologischen Experimente wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von J. KUHLMANN (MPI Dortmund) durchgeführt. Die Mikroinjektionsexperimente zeigen deutlich einen selektiven Kernimport des Avidin durch die unmodifizierte vJun-NLS (Abb. 32). Diese Fähigkeit der Kernlokalisierungssequenz wird durch Phosphat- oder GlcNAc-Modifizierung des der NLS benachbarten Serin negativ reguliert. Die Resultate für das unmodifizierte und phosphorylierte Peptid entsprechen der für das vJun-Protein bekannten Regulierung des Kernimports. Die kurze Peptidsequenz besitzt demnach alle Eigenschaften der NLS im vJun-Protein und kann separat genutzt werden, um ein Transportgut in den Zellkern zu adressieren.

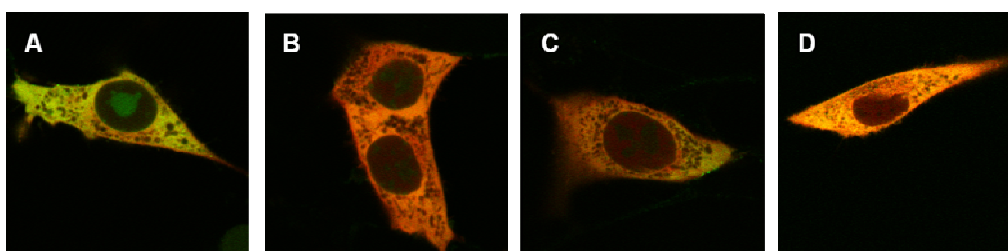


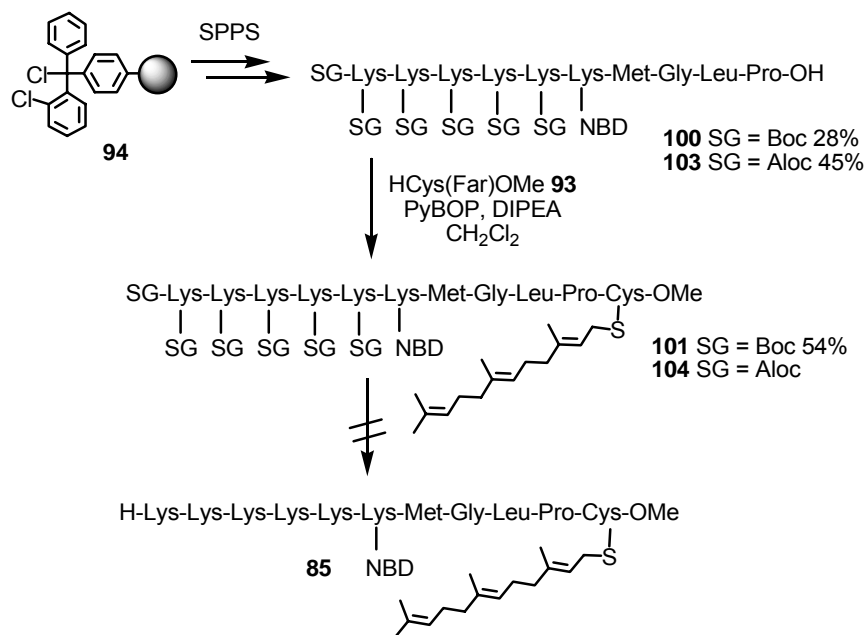
Abb. 32 Mikroinjektion in NIH 3T3 Zellen; A) Konjugat **36a**; B) Konjugat **36b**; C) Konjugat **36c**; D) Avidin **79**; coinjiziert mit Texas-Red-Dextran.

Der Einfluss einer GlcNAc-Modifizierung war bislang unbekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Glycosylierung des Serins den gleichen Effekt wie die Phosphorylierung hat und den Kernimport des NLS-Avidin-Konjugates negativ reguliert. Dies widerspricht der Theorie, nach der eine GlcNAc-Modifizierung potentielle

Phosphorylierungsstellen blockiert und diese beiden Modifikationen dadurch konträre Funktionen erfüllen. Für das Beispiel der Kernlokalisierungssequenz des vJun-Proteins muss daher von einem anderen Mechanismus ausgegangen werden. Die Bindung der polybasischen Kernlokalisierungssequenz zu Importin erfolgt vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen, welche durch Einbringen einer zusätzlichen negativen Ladung im Bereich der Bindung gestört werden können. Phosphorylierung und auch Glycosylierung regulieren vermutlich auf diesem Wege den Kernimport negativ.

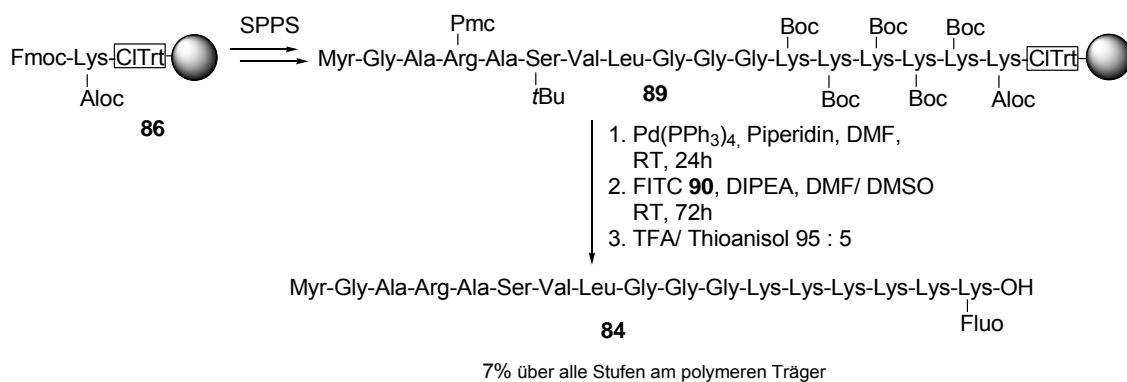
Im dritten Teil der Arbeit sollte durch die Kombination von Kernlokalisierungssequenz (NLS) und Proteintransduktionsdomäne (PTD) ein Transporter geschaffen werden, der in der Lage ist, seine Ladung über Ausnutzung natürlicher Transportsysteme durch die Plasmamembran und den Kernporenkomplex zu translokieren. Dazu wurden Synthesemöglichkeiten für Fluoreszenz-markierte Peptide untersucht, die diese beiden Sequenztypen tragen. Als NLS wurde die Pentalysinsequenz des Maus c-abl eingesetzt und als PTD diente entweder der myristoylierte N-Terminus des HIV-1 gag MA oder der farnesylierte C-Terminus des N-Ras. Die Kombination von Lipidierung und polybasischer Sequenz erschwerte die Synthese, da vollgeschützte Zwischenstufen schlecht löslich sind und entschützte Peptide zur Aggregation neigen.

Das NBD-markierte Peptid **85** sollte über Fragmentkondensation aufgebaut werden (Schema 31). Die geschützten Decapeptide **100** und **103** wurde mittels Festphasensynthese an dem unter sehr milden Bedingungen spaltbaren CITrt-Linker synthetisiert. Als Schutzgruppen für die Lysin-Seitenketten wurden die säurelabile Boc- sowie die hydrogenolytisch spaltbare Aloc-Gruppe eingesetzt. Die Fragmentkondensation von **103** mit dem säurelabilen farnesylierten Cysteinmethylester **93** zum Aloc-geschützten Peptid **104** erwies sich aufgrund der schlechten Löslichkeit von **103** als schwierig, ebenso wie die Isolierung des massenspektrometrisch nachgewiesenen Produktes **104**. Das Boc-geschützte Decapeptid zeigte eine bessere Löslichkeit und konnte in 54% mit dem farnesylierten Cysteinmethylester **93** verknüpft werden. Abschließend war es allerdings nicht möglich, die sechs Boc-Schutzgruppen quantitativ abzuspalten ohne den Farnesylrest anzugreifen.



Schema 31 Untersuchungen zur Synthese des NBD-markierten Peptids **85**.

Das Fluoreszenz-markierte Peptid **84** wurde in Zusammenarbeit mit H. M. S. KUMAR synthetisiert (Schema 32). Da die Myristoylierung eine stabile Modifikation des *N*-Terminus ist, konnte das Peptid vollständig an der festen Phase mit dem säurelabilen CITrt-Linker aufgebaut werden. Der Fluorophor wurde als letzter Schritt am Harz durch Umsetzung mit Fluoresceinisothiocyanat **90** in eine Lysin-Seitenkette eingeführt. Diese Reaktion verlief aufgrund der sterisch anspruchsvollen Reaktionspartner in nur 50% Umsatz, das Peptid **84** konnte nach chromatographischer Aufreinigung in 7% Gesamtausbeute isoliert werden.



Schema 32 Festphasensynthese des Fluorescein-markierten Peptids **84**.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. KUHLMANN (MPI Dortmund) wurden *in vivo* Untersuchungen durchgeführt um Auskunft über die Transporteigenschaften dieses Konjugates zu erhalten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten eine Aggregation von **84** in der Nähe des Zellkerns sowie im Bereich des Golgiapparates (Abb. 33). Eine Anfärbung des Zellkerns konnte nur in wenigen Fällen beobachtet werden. Das myristoylierte Peptid **84** ist folglich in der Lage, die Plasmamembran zu durchdringen. Ein Weitertransport in den Zellkern findet dagegen nicht statt. Durch die Kombination von Lipidrest und polybasischer Sequenz besitzt das Konjugat **84** zwei Signale, die eine irreversible Membranbindung erwarten lassen. Das Konjugat **84** liegt vermutlich in den Zellen rein membrangebunden vor, und längere Inkubationszeiten führen zu Membrantransport innerhalb der Zelle (Kernhülle und Golgi) und gezieltem Abbau in Lysosomen.

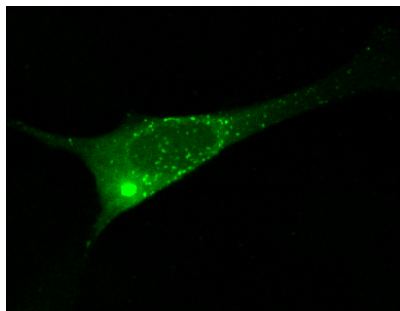


Abb. 33 HeLa-Zelle nach Inkubation mit PTD-NLS-Konjugat **84** (2 μ M) für 22 h.

Es konnte in dieser Arbeit durch chemische Synthese ein Zugang zu wichtigen Hilfsmitteln in drei unterschiedlichen Bereichen biologischer Fragestellung geschaffen werden. Ein Vorteil der chemischen Synthese ist die Möglichkeit, Moleküle mit spezifischen Modifikationen und Reportergruppen herzustellen und dadurch eine gezielte Analyse biologischer Vorgänge durchzuführen. Durch die entwickelten Synthesestrategien können biologisch relevante Peptide mit posttranslationalen Modifikationen aufgebaut werden, um Aussagen über Vorgänge auf molekularer Ebene zu treffen. Gerade die hier gezeigte Ausnutzung zellulärer Transportwege ist ein großes Feld mit dem Potential wertvolle Erkenntnisse zu erlangen, die z. B für den Bereich der Gentherapie interessant sind.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

NMR-Spektroskopie

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

Varian Mercury 400 400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR

Bruker AMX 400 400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR

Bruker DRX 500 500 MHz ^1H -NMR, 125.8 MHz ^{13}C -NMR.

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, ddd = Dublett vom Doppeldublett, t = Triplett, m = Multipllett, br = breites Signal, m_{verd} = Signal teilweise vom Lösungsmittel verdeckt.

Massenspektrometrie

El und FAB-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70 aufgenommen (FAB: 3-Nitrobenzylalkohol (NBA) als Matrix). Die Messung der MALDI-TOF Massenspektren erfolgte auf einer Voyager-DE Pro BioSpectrometry™ Workstation der Firma PerSeptive Biosystems (Stickstoff-UV-Laser $\lambda = 237$ nm, Beschleunigungsspannung = 28 kV⁹ mit 2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) als Matrix. Die ESI-Massenspektren wurden mit einem Finnigan LCQ Massenspektrometer gemessen.

Optische Rotation

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

UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektren wurden auf einem Cary 50 UV-Vis-Spektrometer der Firma Varian gemessen.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Schmelzpunktmessgerät Büchi 530 bestimmt und sind unkorrigiert angegeben.

Chromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumplatten, beschichtet mit Kieselgel 60_{F254}, der Firma Merck verwendet. Die entsprechenden Laufmittel und R_f -Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, 366 nm und die folgenden Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdophosphorsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser.

Reagenz B: 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml Ethanol.

Reagenz C: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm) mit einem Druck von 0.3-0.8 bar. Zur Größen-ausschlußchromatographie wurde Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia verwendet.

HPLC-ESI-MS Spektren wurden mit einer Hewlett-Packard Agilent 1100 HPLC und einem Finnegan LCQ Massenspektrometer aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, 254 nm und 301 nm. Als Säulen dienten analytische Nucleosil C4, C18HD oder C18-Nautilus Säulen von Macherey&Nagel und wurden mit einem Gemisch von CH₃CN + 0.1 % Ameisensäure / H₂O + 0.1 % Ameisensäure oder CH₃CN + 10 mM NH₄OH / H₂O + 10 mM NH₄OH und einer Flussrate von 1ml/min betrieben. Verwendete Gradienten sind direkt bei den einzelnen Substanzen angegeben.

Analytische HPLC Chromatogramme wurden mit einer Hewlett-Packard Agilent 1100 HPLC aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 210 nm und 254 nm. Alle Säulen stammten von der Firma Macherey&Nagel und wurden mit einem Gemisch von CH₃CN/H₂O/TFA und einer Flussrate von 1mL/min betrieben.

Für die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde eine Varian Pro Star Anlage mit einem Varian Detektor Model 340 und ein System der Firma Agilent (1100 Series) verwendet. Die verwendeten Säulen der Firma Macherey-Nagel sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben, es wurden Flussraten von 27 ml/ min eingesetzt. Das Lösungsmittel der Produktfraktionen wurde anschließend durch Lyophilisieren entfernt.

Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde mit einem Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer durchgeführt.

Chemikalien

Alle verwendeten Ausgangskemikalien wurden bei den Firmen Acros Chimica, Aldrich, Avocado, Bachem, Fluka, Novabiochem, Molecular Probes, Riedel de Haen, Senn Chemicals oder Sigma erworben mit Ausnahme einiger Aminosäuren aus

Schenkungen der Degussa AG. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über einem nach Laborstandard üblichen Trockenmittel destilliert und bei Bedarf nach Standardvorschriften absolutiert. Falls unter Argon als Schutzgas gearbeitet wurde, ist dies vermerkt. Das verwendete Argon wurde über Silicapent der Firma Merck getrocknet.

Proteine, Zellkulturen und Mikroinjektionen

Die verwendeten N-Ras Proteine wurden, wenn nicht anders vermerkt, von C. NOWAK der Arbeitsgruppe J. KUHLMANN, MPI Dortmund, überexprimiert. Die verwendeten *E. coli*-Stämme CK600K, BL21 (DE 3) und eukaryontischen Zelllinien MDCK Zellen (*Canis familiaris* (Hund) Madin-Darby Canine Kidney Epithel Zellen; ATCC CCL-34), HeLa Zellen und NIH 3T3 Zellen (*Mus musculus* (Maus) Embryo Fibroblast Zellen; ATCC CRL-1658) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) mit 10% fetal calf serum (FCS; Invitrogen), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) von A. HENKEL, C. NOWAK und R. VETTER bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Mikroinjektionen mit einem automatisierten Injektionssystem (Micromanipulator 5171 und Transjector 5246, Eppendorf) unter Beobachtung der Zellen mit einem konfokalen Leica DM IRBE Mikroskop (Leica Microsystems, Bensheim) und einem HCX PL APO Leica Objektiv 63x/1,32-0,6 Oil CS wurden von R. VETTER durchgeführt.

Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV I: Bestimmung des Harz-Belegungsgrades von Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine eingewogene Menge zwischen 5 und 10 mg Polymer wird mit 18 mL einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 10 min geschüttelt. Die UV-Absorption der Lösung bei 301 nm wird bestimmt. Die Konzentration und damit der Belegungsgrad lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1

6.2.1 Synthese von N-Ras Peptiden

AAV 2: Erstbeladung des Tritylchlorid-, 2-Chlortritylchlorid- und 4-Methyltritylchlorid-Harzes

Eine Lösung von 5.5 Äquivalenten der ersten Aminosäure und 11 Äquivalenten Diisopropylethylamin in abs. NMP (5 ml) wird unter Argon-Atmosphäre zu in 2 ml abs. Dichlormethan vorgequollenen Tritylchlorid-, 2-Chlortritylchlorid- oder 4-Methyltritylchlorid-PS-Harz gegeben und drei h bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend wird das Harz dreimal mit NMP, dreimal mit DMF und dreimal mit Dichlormethan gewaschen.

AAV 3: Abspaltung von einer Polymerprobe mit 1% TFA zwecks nachfolgender Analytik

Einige Harzkügelchen (≤ 1 mg) werden abgenommen und fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Es wird 1 mL einer Lösung von 1 % TFA in Dichlormethan hinzugefügt und für 1 h geschüttelt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Gemisch aus Methanol/Acetonitril 1:1 (v/v) aufgenommen.

AAV 4: Basenvermittelten Spaltung von Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppen an der festen Phase

Das Polymer wird in einem Gemisch von 20 % Piperidin in DMF suspendiert und 10 min geschüttelt. Nach Abfiltrieren wird der Vorgang einmal wiederholt. Es wird anschließend fünfmal mit DMF gewaschen. Enthält das abzuspalende Peptid eine Palmitoylgruppe, wird eine modifizierte Abspaltungsmethode gewählt: Das Polymer

wird in einem Gemisch von 1 % DBU in DMF suspendiert und 30 sek geschüttelt. Nach Abfiltrieren wird der Vorgang einmal wiederholt. Es wird anschließend dreimal mit DMF und dreimal mit Dichlormethan gewaschen.

AAV 5: Aminosäurekupplung mit HBTU/ HOBt

Eine Lösung von 4 eq Aminosäure, 3.6 eq HBTU, 4 eq HOBt und 4 eq DIPEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 6: Kupplung von Maleimidocapronsäure

Eine Lösung von 4 eq Maleimidocapronsäure, 3.6 eq HBTU, 4 eq HOBt und 8 eq DIPEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 7: Blockierung der nach der Kupplung verbleibenden freien Aminogruppen

Das Polymer wird zweimal in einem Gemisch von 10 % Essigsäureanhydrid in Pyridin suspendiert und für jeweils 5 min geschüttelt. Nach dem zweiten Abfiltrieren wird mit DMF und Dichlormethan gewaschen.

AAV 8: Reduktive Abspaltung der SStBu-Gruppe von Cystein

Es werden 100 eq PBU_3 einer entgasten Lösung von 400 eq H_2O in DMF/Dichlormethan 1:1 (v/v) hinzugefügt. Diese wird zum Harz gegeben, es wird 12 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und jeweils fünfmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen. Typischerweise verwendet man 3.2 mL PBU_3 zusammen mit 1 mL H_2O in 20 mL Lösungsmittelgemisch.

AAV 9: Palmitoylierung von Thiolen an der festen Phase

Eine Lösung von 20 eq Pal-Cl, 21 eq HOBT und 22 eq Triethylamin in DMF/Dichlormethan 1:3 (v/v) wird zu frisch entschützten, harzgebundenen Thiolen gegeben. Es wird 15 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und sechsmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

AAV 10: Verlängerung der Peptidkette nach Einführung von Fmoc-Cys(pal)

Das Polymer wird in einem Gemisch von 1 % DBU in DMF suspendiert und 30 sek geschüttelt. Nach Abfiltrieren wird der Vorgang einmal wiederholt. Es wird anschließend zweimal mit DMF gewaschen und sofort eine für 10 min voraktivierten Lösung von 10 eq Fmoc-Aminosäure, 10 eq HATU und 40 eq DIPEA in DMF/Dichlormethan (1:4) zu dem Polymer gegeben. Es wird für 3 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 11: Spaltung von Allyloxycarbonyl-Gruppen

Zu einer Suspension des Harzes in DMF (10 ml) werden 0.1 ml Phenylsilan gegeben. Das Reaktionsgefäß wird bis zur Gasentwicklung evakuiert und anschließend mit Argon belüftet. Nach 5 Wiederholungen wird im Argongegenstrom Pd(PPh₃)₄-Katalysator (10 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung für 4 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und je dreimal mit DMF, Dichlormethan und Methanol gewaschen.

Abspaltung von der festen Phase:

AAV 12: MeTrt- und CITrt-Harz, TFA

Zu einer Suspension des in 10 ml Dichlormethan vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 0.1 ml Trifluoressigsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten geschüttelt und das Harz dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt.

AAV 13: MeTrt- und CITrt-Harz, HFIP

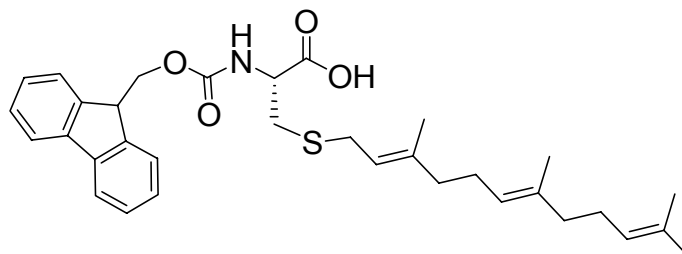
Zu einer Suspension des in 3 ml Dichlormethan vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 10 ml Dichlormethan/ Hexafluoroisopropanol 3:2 [v:v] gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h geschüttelt und das Harz dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt.

AAV 14: Trt- Harz, TFA

Zu einer Suspension des in 10 ml Dichlormethan vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 0.3 ml Trifluoressigsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten geschüttelt und das Harz dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt.

AAV 15: Trt-Harz, HFIP

Zu einer Suspension des in 3 ml Dichlormethan vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 7 ml Dichlormethan/ Hexafluoroisopropanol 2:5 [v:v] und 1 eq HCl gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h geschüttelt und das Harz dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt.

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-farnesyl-L-Cystein (Fmoc-Cys(far)-OH) 10

Zu einer Lösung von 1.0 g (5.7 mmol) L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat in 11 ml Methanol werden bei 0°C 15 ml einer 7M Ammoniaklösung in Methanol gegeben. Nach 5 min werden 1.38 ml (5.7 mmol) Farnesylbromid zugetropft. Man rührt 3 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, der verbleibende Feststoff wird mit Pentan (3 x 10 ml) gewaschen und anschließend werden 50 ml Dichlormethan zugegeben. Die Suspension wird in einem Eisbad gekühlt und 0.88 ml (6.28 mmol) Triethylamin und 2.12 g (6.28 mmol) Fmoc-succinimid werden zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann im Vakuum eingengt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: 0-5% Methanol in Dichlormethan) erhalten.

Farbloses Öl

Ausbeute: 2.1 g (3.7 mmol), 65%

$R_f = 0.7$ (Dichlormethan/ Methanol 9:1 [v:v])

$[\alpha]_D^{20} = -2.8$ (c = 1, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.60$ (s, 3H, CH_3 Far); 1.62 (s, 3H, CH_3 Far); 1.65 (s, 3H, CH_3 Far); 1.70 (s, 3H, CH_3 Far); 1.98-2.13 (m, 8H, CH_2 Far); 2.94 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H, β - CH_{2a} Cys); 3.04 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H, β - CH_{2b} Cys); 3.21 (tr, $J = 6.6$ Hz, 2H, Far CH_2 -S); 4.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH Fmoc); 4.39 (m, 2H, CH_2 Fmoc); 4.63 (m, 1H, α -CH Cys); 5.11 (m, 2H, CH Far); 5.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH Far); 5.97 (m, 1H, NH); 7.29 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc); 7.37 (dd, $J =$

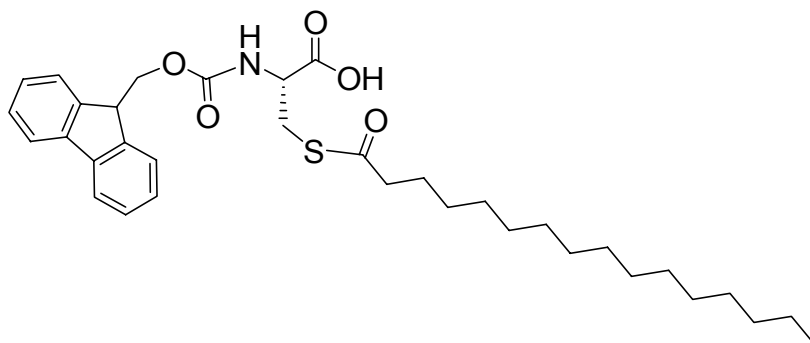
7.2 Hz, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc); 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc); 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 16.3$; 16.4; 18.0; 26.0 (4 CH_3 Far); 26.7; 27.2 (2 CH_2 Far); 30.4 ($\beta\text{-CH}_2$ Cys); 33.7 (S- CH_2 Far); 39.9; 40.0 (2 CH_2 Far); 47.3 (CH Fmoc); 54.2 ($\alpha\text{-CH}$ Cys); 67.7 (CH_2 Fmoc); 119.9 (CH Fmoc); 120.2; 124.1; 124.7 (CH Far); 125.4 (CH Fmoc); 127.4 (CH Fmoc); 127.9 (CH Fmoc); 131.4; 135.5 (2 Cq Far); 140.2 (Cq Fmoc); 141.5 (Cq Far); 144.0 (Cq Fmoc); 156.5 (C=O Fmoc); 171.9 (C=O Cys)

MS (LRMS-FAB, 3-NBA): ber.: 547.27 $[\text{M-H}]^-$ gef.: 546.11

$\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{NO}_4\text{S}$ (547.7)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-palmitoyl-L-Cystein (Fmoc-Cys(pal)-OH) 12



Zu einer Lösung aus 2 g (3.4 mmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH in 50 ml Dichlormethan werden 2.5 ml of TFA und 1.5 ml of Triethylsilan zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Anschließend wird das Lösemittel mit Toluol im Vakuum coevaporiert. Der erhaltene Feststoff wird mit 2 x 30 ml Pentan gewaschen um Triphenylmethan vollständig zu entfernen. Der weiße Feststoff (1.2 g) wird in 25 ml Dichloromethan gelöst und 0.48 ml (3.7 mmol) Trimethylsilylchlorid werden zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h unter Rückfluß erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung werden 3.1 ml (10.2 mmol) Palmitoylchlorid gegeben und anschließend über 3 h eine Lösung aus 0.78 ml (5.6 mmol) Triethylamin in 15 ml Dichloromethan unter Argon-Atmosphäre zugetropft. Die Mischung wird für eine weitere h gerührt und dann im Vakuum eingedunstet. Das Produkt wird nach

flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: 1:0 – 4:1 c-Hexan/
Ethylacetat) erhalten.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 1.6 g (2.7 mmol), 92%

R_f = 0.6 (Ethylacetat/ c-Hexan 2:1 [v:v], 1% Essigsäure)

Smp.: 86 °C

[α]_D²⁰ = +5.4 (c = 0.93 in CHCl₃).

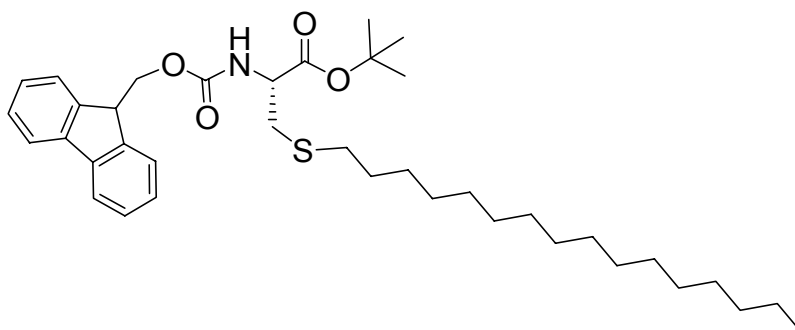
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 1.23 (s, 24H), 1.70-1.60 (m, 2H), 2.59 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 3.50-3.34 (m, 2H), 4.24 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.39 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.62 (m, 1H), 5.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.29 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.62-7.55 (m, 2H), 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 14.6, 23.1, 26.0, 29.4, 29.7, 29.8, 29.9, 30.0, 30.1, 30.10, 30.1, 30.1, 30.8, 32.4, 44.5, 47.4, 54.3, 62.8, 67.8, 120.2, 125.4, 127.3, 127.9, 141.4, 143.8, 156.2, 174.5, 199.5.

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 604.3073[M+Na]⁺ gef.: 604.3085

C₃₄H₄₇NO₅S (595.8)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-hexadecyl-L-Cystein-tert-butylester (Fmoc-Cys(hd)-OtBu)



Zu einer Lösung von 1.85 g (4.60 mmol) S-Hexadecyl-L-Cystein-tert-butylester in 4 ml einer 10%igen wässrigen Na₂CO₃-Lösung und 2 ml Dioxan wird bei 0°C eine Lösung von 1.19 g (4.60 mmol) 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid in 3 ml Dioxan zugetropft. Man rührt acht h bei Raumtemperatur, gießt die Reaktionsmischung auf 40 ml Wasser und extrahiert zweimal mit 10 ml Diethylether. Unter Eiskühlung wird der pH-Wert der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit 10 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Ethylacetat 15:1 [v:v] bis 2:1 [v:v]) erhalten.

Farbloses Öl

Ausbeute: 1.90 g (3.05 mol), 66%

R_f = 0.50 (*c*-Hexan/ Ethylacetat 5:1 [v:v]).

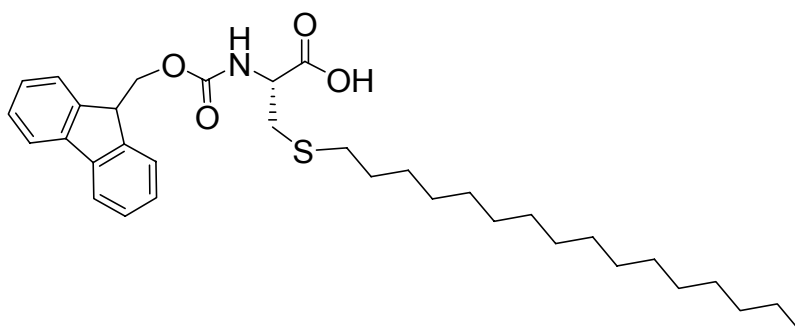
[α]_D²⁰ = -2.8 (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.94 (t, J = 6.8, 3H, ω-CH₃ HD); 1.53 (s, 3H, CH₃ tBu); 1.25-1.63 (m, 28H, CH₂ HD); 2.58 (t, J = 7.2, 3H, α-CH₂ HD); 2.98 (dd, J = 14.0 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, β-CH_{2a} Cys); 3.05 (dd, J = 14.0 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, β-CH_{2b} Cys); 4.25 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.40 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.56 (m, 1H, α-CH Cys); 5.86 (m, 1H, NH); 7.32 (dd, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.39 (dd, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.63 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.74 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 14.5; 23.0; 27.2; 28.2; 29.1; 29.5; 29.7; 29.8; 29.9; 30.0; 32.2; 33.3; 34.9 (15 CH₂ HD, CH₃ tBu, β-CH₂ Cys); 47.2 (CH Fmoc); 54.6 (α-CH Cys); 67.4 (CH₂ Fmoc); 82.7 (C_q tBu); 120.3; 125.4; 127.4; 128.1 (CH Fmoc); 141.5 (C_q Fmoc); 144.1 (C_q Fmoc); 155.8 (C=O Fmoc); 170.1 (C=O Cys)

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 623.4008 [M+Na]⁺ gef.: 623.4023

C₃₈H₅₇NO₄S (623.9)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-hexadecyl-L-Cystein Fmoc-Cys(hd)-OH 14

Zu einer Lösung von 1.90 g (3.05 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-hexadecyl-*L*-Cystein-*tert*-butylester in 2 ml Dichlormethan werden 5 ml Trifluoressigsäure gegeben. Bei Raumtemperatur wird 1 h gerührt, anschließend 1 ml Thioanisol hinzugegeben und die Lösungsmittel dreimal durch Codestillation mit Toluol im Vakuum entfernt.

Farbloses Öl

Ausbeute: 1.62 g (2.85 mol), 94%

R_f = 0.20 (c-Hexan/ Ethylacetat 5:1 [v:v])

[α]_D²⁰ = 6.2 (c = 1, CHCl₃)

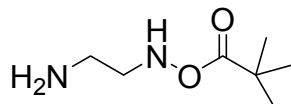
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.92 (t, *J* = 6.8, 3H, ω-CH₃ HD); 1.24-1.39 (m, 26H, CH₂ HD); 1.51-1.63 (m, 2H, β-CH₂ HD); 2.56 (t, *J* = 7.2, 3H, α-CH₂ HD); 3.05 (m, 2H, β-CH₂ Cys); 4.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.42 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.67 (m, 1H, α-CH Cys); 5.82 (m, 1H, NH); 7.31 (dd, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.40 (dd, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 14.5; 23.1; 27.2; 28.2; 29.1; 29.5; 29.7; 29.8; 29.9; 30.0; 32.2; 33.3; 34.5 (15 CH₂ HD, β-CH₂ Cys); 47.4 (CH Fmoc); 53.8 (α-CH Cys); 67.7 (CH₂ Fmoc); 119.8; 125.0; 127.0; 127.6 (CH Fmoc); 141.3 (C_q Fmoc); 143.8 (C_q Fmoc); 156.2 (C=O Fmoc); 175.3 (C=O Cys)

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 568.3382 [M+Na]⁺ gef.: 568.3452

C₃₄H₄₉NO₄S (567.3)

tert-Butyloxycarbonyl-Ethylendiamin^[139]



Zu einer Lösung aus 6.1 g Boc₂O (28 mmol) in Dichloromethan (400 ml) wurde über 6 h eine Lösung aus 11.2 ml Ethylendiamin (168 mmol) in Dichloromethan (50 ml) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird im Vacuum eingeeengt und das verbleibende Öl in gesättigter Na₂CO₃-Lösung aufgenommen und mit Dichloromethan (2 x 300 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Farbloses Öl

Ausbeute: 4.4 g (178 mmol), 100%

Rf = 0.4 (Dichlormethan/ Methanol 5:1 [v:v])

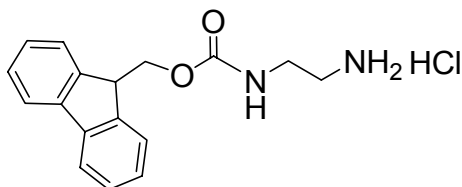
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.27 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.61 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, CH₂-NH₂), 2.99 (br s, 2 H, CH₂NHBoc), 3.15 (br d, J = 20.1 Hz, 1 H, NH₂), 5.40 (br s, 1 H, NHBoc)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 28.6 (C(CH₃)₃), 42.1 (CH₂-NH₂), 43.7 (CH₂NHBoc), 79.0 (C(CH₃)₃), 156.3 (C(O))

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 183,1112 [M+Na]⁺ gef.: 183,1211

C₇H₁₆N₂O₂ (160.2)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Ethylendiamin Hydrochlorid (Fmoc-NH-Et-NH₂ *HCl) 16



Einfach Boc-geschütztes Ethylendiamin (1.7 g, 10.5 mmol) wird in Wasser gelöst und der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 9-9.5 eingestellt. Eine Lösung aus 4.2 g Fmoc-OSu (12.6 mmol) in Acetonitril (30 mL) wird in einer Portion zugegeben. Ein weißer Feststoff fällt aus und wird filtriert und mit Acetonitril und Wasser gewaschen. Anschließend wird das Filtrat in Chloroform und Methanol gelöst und mit Toluol im Vakuum coevaporiert. Der weiße Feststoff wird in Chloroform (45 mL) gelöst und bei 0°C wird eine Lösung aus 7 M HCl in Methanol (30 mL) zugetropft und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Ein weißer Feststoff fällt aus und wird filtriert und aus Methanol/ Ether/ Hexan umkristallisiert.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 2.5 g (8.1 mmol), 77%

R_f = 0.6 (Dichlormethan/ Methanol 19:1 [v:v])

Smp.: 156°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.88 (br s, 2 H, CH₂-NH₃), 3.30 (q, J = 12.3 Hz, J = 6.4 Hz, 2 H, CH₂NHFmoc), 4.26 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.35 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 7.42 (dd, J = 7.4 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.36 (dd, J = 7.4, 7.4 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.58 (t, J = 5.4 Hz, 1 H, NHFmoc), 7.74 (d, J = 7.4 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.92 (d, J = 7.4 Hz, 2H, CH Fmoc), 8.23 (br s, 3 H, NH₃)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 38.7 (CH₂NH), 39.2 (CH₂NH), 47.3 (CH Fmoc), 66.3 (CH₂ Fmoc), 120.8 (CH Fmoc), 125.9 (CH Fmoc), 127.7 (CH Fmoc), 128.3 (CH Fmoc), 141.4 (C_q Fmoc), 144.5 (C_q Fmoc), 156.9 (C=O Fmoc)

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 304.2580 [M+Na]⁺ gef.: 304.2632

$C_{17}H_{18}N_2O_2$ (282.3)

Maleimidocaproyl-glycyl-(S-hexadecyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(S-farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamin (MIC-Gly-Cys(hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(far)-NH-Et-NH₂) 6

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 wird 1 g 4-Methyltrylchlorid-PS-Harz (Beladung 2 mmol/g) mit 4.36 g (11.0 mmol) Fmoc-NH-Et-NH₂ beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 an 14 mg (Beladung 0.87 mmol/g, 0.0119 mmol Ethylendiamin) festphasengebundenen Fmoc-NH-Et-NH₂ durchgeführt. Das Festphasengebundene Heptapeptid Fmoc-Gly-Cys(hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(far)-NH-Et-NH₂ **18** wird nach AAV 6 mit Maleimidocapronsäure umgesetzt und mit 1% TFA wird das Peptid **6** vom Harz abgespalten (AAV 12). Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 15.3 mg (0.0114 mmol), 96%

$[\alpha]_D^{20} = -0.2$ (c= 1, CHCl₃)

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 44.95/54.95/0.1; 15 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 7.6 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.88 (t, J = 6.8, 3H, ω -CH₃ HD), 0.82-1.00 (m, 6H, CH₃ Leu), 1.25-1.63 (m, 28H, 13 CH₂ HD, CH₂ MIC), 1.42-1.73 (m, 21H, 2 CH₂ MIC, β -CH₂ Leu, γ -CH Leu, 4 CH₃ Far, β -CH₂ HD), 1.83-2.15 (m, 15H, β -CH_{2b} Met, β -CH_{2b} Pro, γ -CH₂ Pro, SMe, 4 CH₂ Far), 2.22-2.30 (m, 4H, α -CH₂ MIC, β -CH_{2a} Met, β -CH_{2a} Pro), 2.48-2.63 (m, 4H, γ -CH₂ Met, α -CH₂ HD), 2.89-3.00 (m, 4H, β -CH₂ Cys, NH-CH₂-CH₂-NH), 3.15 (m, 4H, β -CH₂ Cys, Far CH₂-S), 3.42-3.70 (m, 8H, δ -CH_{2a} Pro, δ -CH_{2b} Pro, NCH₂ MIC, NH-CH₂-CH₂-NH), 3.73-4.00 (m, 3 H, α -CH Pro, α -CH₂ Gly, α -CH₂ Gly'), 4.32-4.55 (m, 4H, 2 α -CH Cys, α -CH Leu, α -CH Met), 5.09 (t, J = 6.7, 2H, 2

C=CH Far), 5.17-5.22 (m, 1H, C=CH-CH₂-S Far), 6.69 (s, 2H, -CH=CH- MIC), 7.15-8.25 (m, 7H, NH)

MS (ESI): ber.: 1343.8 [M+H]⁺ gef.: 1343.9

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 1343.8195 [M+H]⁺ gef.: 1343.8247

C₆₉H₁₁₈N₁₀O₁₀S₃ (1343.93).

Maleimidocaproyl-glycyl-(S-hexadecyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(S-farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-Bodipy[®]FL (MIC-Gly-Cys(hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(far)-NH-Et-NH-Bodipy[®]FL) 4

Zu einer Lösung aus Bodipy[®]FL (6.7 mg, 22.8 μmol), HBTU (7.8 mg, 20.5 μmol), HOBT (3.5 mg, 22.8 μmol) und DIPEA (7.8 μl, 45.6 μmol) in 0.5 ml trockenem Dichlormethan wird unter Argon-Atmosphäre 15.3 mg MIC-Gly-Cys(hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(far)-NH-Et-NH₂ **6** (11.4 μmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 18 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt, im Vakuum eingengt und in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen. Das Produkt wird über eine Chromafix C4 Säule mit einem Gradienten von 50-100% Acetonitril in Wasser aufgereinigt.

Rotes Öl

Ausbeute: 4.3 mg (2.7 μmol), 23%

$[\alpha]_D^{20} = \text{nd.}$ ^[140]

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 44.95/54.95/0.1; 35 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 17.8 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.82-1.00 (m, 9H, ω-CH₃ Leu, ω-CH₃ HD), 1.25-1.63 (m, 28H, 13 CH₂ HD, CH₂ MIC), 1.42-1.73 (m, 21H, 2 CH₂ MIC, β-CH₂ Leu, γ-CH Leu, 4 CH₃ Far, β-CH₂ HD), 1.83-2.15 (m, 17H, CH₂- Bodipy FL, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH₂ Pro, SMe, 4 CH₂ Far), 2.22-2.30 (m, 7H, α-CH₂ MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro, CH₃- Bodipy FL), 2.48-2.63 (m, 7H, γ-CH₂ Met, α-CH₂ HD, CH₃- Bodipy FL), 2.83-3.70 (m, 16H, δ-CH_{2a} Pro, δ-CH_{2b} Pro, NCH₂ MIC, NH-CH₂-CH₂-NH, CH₂ Bodipy FL, β-

CH₂Cys, Far CH₂-S, β-CH₂Cys), 3.72-4.00 (m, 3H, α-CH Pro, α-CH₂Gly, α-CH₂Gly'), 4.55-4.32 (m, 4H, 2 α-CH Cys, α-CH Leu, α-CH Met), 5.09 (t, J = 6.7, 2H, 2 C=CH Far), 5.17-5.22 (m, 1H, C=CH-CH₂-S Far), 6.13 (s, 1H, H Pyrrol), 6.27-6.29 (m, 1H, H Pyrrol), 6.67 (s, 2H, -CH=CH- MIC), 6.87-6.92 (m, 1H, H Pyrrol), 7.11 (s, 1H, H Pyrrol), 7.15-8.25 (m, 7H, NH)

MS (ESI): ber.: 1617.9 [M+H]⁺ gef.: 1617.8

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 1343.8195 [M+H]⁺ gef.: 1343.8247

C₈₃H₁₃₂BF₂N₁₂O₁₁S₃ (1619.0).

Maleimidocaproyl-glycyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(S-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamin (MIC-Gly-Cys(pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(far)-NH-Et-NH₂) 5

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 wird 0.4 g Tritylchlorid-PS-Harz (Beladung 1.2 mmol/g) mit 0.74 g (2.6 mmol) Fmoc-NH-Et-NH₂ beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 an 150 mg (Beladung 0.699 mmol/g, 0.0119 mmol Ethylendiamin) festphasengebundenen Fmoc-NH-Et-NH₂ durchgeführt. Die Palmitoylierung erfolgt entweder an der festen Phase durch Entschützen von Cys(SStBu) nach AAV 8 und Umsetzung mit Palmitoylchlorid nach AAV 9, oder durch Kupplung von Fmoc-Cys(pal)-OH nach AAV 5 und anschließender Kettenverlängerung nach AAV 10. Fmoc-entschützung nach Einführung der Palmitoyl-Gruppe erfolgt nach AAV 4. Das Festphasen-gebundenen Heptapeptid Fmoc-Gly-Cys(pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH₂ wird nach AAV 6 mit Maleimidocapronsäure umgesetzt und nach AAV 14 oder 15 vom Harz abgespalten. Der Rückstand ist ein Produktgemisch, die Zwischenstufen werden durch Testabspaltung nach AAV 3 belegt.

Gelbliches Öl

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/NH₄OH): 0 min 44.95/54.95/0.1; 15 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 7.7 min

MS (ESI): ber.: 1358.80 [M+H]⁺ gef.: 1358.9

C₆₉H₁₁₆N₁₀O₁₁S₃ (1357,91)

Maleimidocaproyl-glycyl-(S-palmitoyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolin (MIC-Gly-Cys(pal)-Met-Gly-Leu-Pro-OH) 28

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 beladene 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz (0.07 g, Beladung 0.53 mmol/g, 17 μmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 das Festphasen-gebundenen Peptid Aloc Gly-Cys(pal)-Met-Gly-Leu-Pro **28** aufgebaut. Die Palmitoylierung erfolgt an der festen Phase durch Entschützen von Cys(SStBu) nach AAV 8 und Umsetzung mit Palmitoylchlorid nach AAV 9. Aloc-Entschützung nach Einführung der Palmitoyl-Gruppe erfolgt nach AAV 11. Das Festphasen-gebundenen Hexapeptid Fmoc-Gly-Cys(pal)-Met-Gly-Leu-Pro-OH wird nach AAV 12 vom Harz abgespalten und über präperative HPLC mit einer C4-Säule aufgereinigt.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 3.7 mg (3.7 μmol), 10%

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 9.99/89.91/0.1; 35 min 89.91/9.99/0.1): R_f = 5.8 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.74-0.98 (m, 9H, δ-Leu, ω-Pal), 1.23 (s, 24H, 12 CH₂ Pal); 1.31-1.37 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.39-1.73 (m, 9H, 2 CH₂ MIC, β-CH₂ Leu, γ-Leu, β-CH₂ Pal) 1.98-2.19 (m, 7H, β'-Met, β'-Pro, γ-Pro, CH₃-Met), 2.20-2.48 (m, 6H, α-CH₂MIC, β-Met, β-Pro, α-Pal), 2.47-2.74 (m, 2H, γ-Met), 2.98-3.19 (m, 2H, β-Cys), 3.42-3.57 (m, 2H, N-CH₂ MIC), 3.58-3.69 (m, 1H, δ'-Pro), 3.77-4.04 (m, 5H, 2 α-Gly, δ-Pro), 4.09-4.23 (m, 1H, α-Pro), 4.24-4.56 (m, 2H, α-Met, α-Cys), 4.62-4.79 (m, 1H, α-Leu), 6.69 (s, 2H, HC=CH)

MS (ESI): ber.: 1008.54 [M+H]⁺ gef.: 1008.89

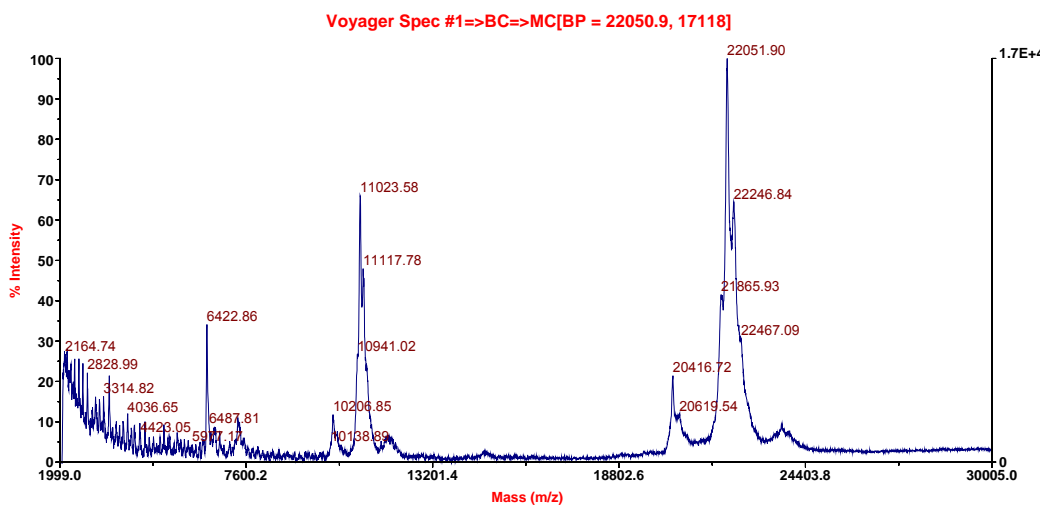
C₄₉H₈₁BN₇O₁₁S₂ (1008.34).

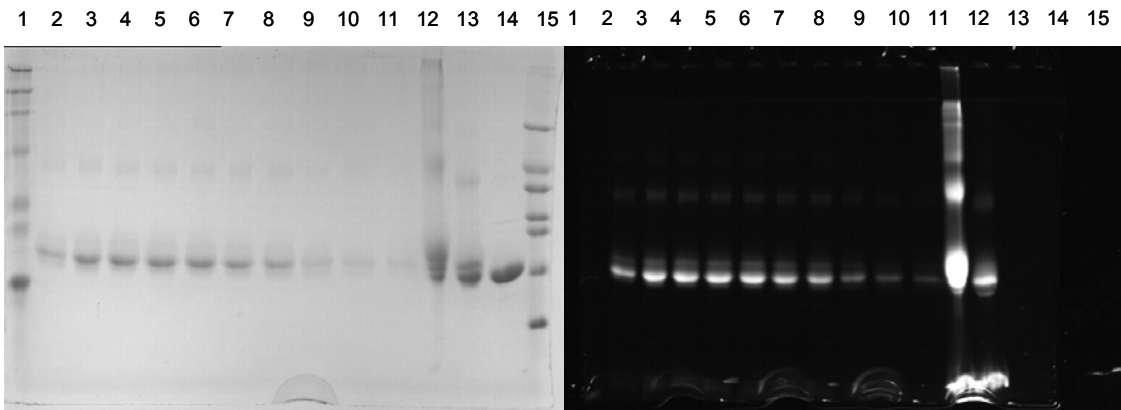
6.2.2 MIC-Ligation

Alle Kupplungen von Lipoproteinen an C-terminal verkürztes N-Ras (¹⁻¹⁸²N-RasG12V) wurden von C. NOWAK analog der Arbeitsvorschrift von B. BADER *et al.* durchgeführt.^[90, 91] Das Produkt wurde mittels MALDI-TOF MS und SDS-PAGE analysiert.

N-RasΔ181 MIC-Gly-Cys(Hd)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy®FL 2

Das Massenspektrum zeigt die Masse von ¹⁻¹⁸²N-RasG12V (20440 Da) und einen, aufgrund der Dekomposition des Bodipy, breiten Peak im Bereich des semisynthetischen Proteins **2** (22060 Da).





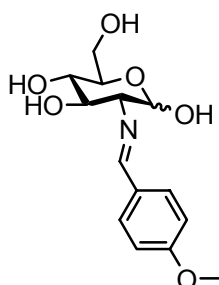
1, 15 Marker; 2-11 Fraktionen nach Aufreinigung; 12,13 Rohprodukt nach Kupplung; 14 $^{1-182}\text{N-RasG12V}$

Das SDS-PAGE (links Hellfeldaufnahme, rechts Fluoreszenzaufnahme) zeigt eine vollständige Abtrennung des ligierten vom unligierten Protein.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.2

6.3.1 Synthese der Bausteine

2-Deoxy-2-(*p*-methoxybenzylidenamino)-D-glucopyranose **51**^[141]



Zu einer Lösung von 3.0 g 2-Amino-2-desoxy-D-glucopyranose Hydrochlorid **50** (13.9 mmol) in 14.1 ml 1 N NaOH-Lösung wird 1.72ml Anisaldehyd (14.1mmol) (gegeben und bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Danach wird die inzwischen breiige Lösung auf 0° C abgekühlt und danach abgefiltert, mit eiskaltem Wasser und einem ebenfalls kalten Ethanol/Ether 1:1 Gemisch gewaschen und getrocknet um **51** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Farblosen Feststoff

Ausbeute: 3.81 g (12.8 mmol), 90 %

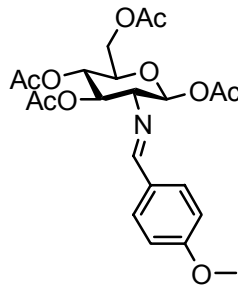
Smp.: 160° C

R_f = 0.08 (c-Hexan/ Ethylacetat 1:1)

¹H-NMR (400-MHz, DMSO-d₆): δ = 2.83 (m, 1H, H-2); 3.18 (m, 1H, H-6a); 3.27 (m, 1H, H-6b); 3.40-3.60 (m, 2H, H-3 and H-4); 3.76 (m, 1H, H-5); 3.83 (s, 3H, OCH₃); 4.59 (m, 1H, OH-6); 4.73 (m, 1H, H-1); 4.86 (d, J=5.5Hz, 1H, OH-3); 4.97 (d, J=5.3Hz, 1H, OH-4); 6.57 (d, J=6.8Hz, 1H, OH-1); 7.02 (d, J=8.8Hz, 2H, Ar); 7.72 (d, J=8.8Hz, 2H, Ar); 8.15 (s, 1H, CH=N)

C₁₄H₁₉NO₆ (297.3)

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-N-(p-methoxybenzylidenamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranose **52**^[141]



Zu einer Lösung von 3.48 g 2-N-(p-Methoxybenzylidenamino)-2-deoxy-D-glucopyranose **51** (11.7 mmol) in trockenem Pyridin (24 ml) wird unter Eiskühlung Essigsäureanhydrid (13 ml) getropft. Nachdem die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird auf Eiswasser (50 ml) gegossen. Die Reaktionsmischung wird 3 h auf 0° C abgekühlt und der entstandene farblose Niederschlag abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert um **52** als farblosen Feststoff zu ergeben.

Farblosen Feststoff

Ausbeute: 3.8 g (8.2 mmol), 70 %

R_f = 0.24 (Cyclohexan/Essigester 2:1)

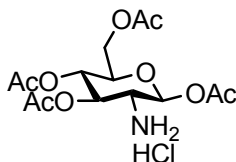
Smp.: 185° C

[α]_D²⁰ = +97.0 (c= 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.88, 2.02, 2.03, 2.10 (s, 4 3H, 4 COCH₃); 3.47 (m, 1H, H-2); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 3.97 (m, 1H, H-5); 4.12 (q, J=12.5Hz and 2.0Hz, 1H, H-6a); 4.37 (q, J=12.5Hz and 4.8Hz, 1H, H-6b); 5.14 (m, 1H, H-4); 5.44 (m, 1H, H-3); 5.95 (d, J=8.3Hz, 1H, H-1); 6.92 (d, J=9.0Hz, 2H, Ar); 7.68 (d, J=8.3Hz, 2H, Ar); 8.15 (s, 1H, CH=N)

C₂₂H₂₇NO₁₀ (465.5)

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranose Hydrochlorid
53^[141]



Eine Lösung von 1.39 g 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-N-(*p*-methoxybenzylidenamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranose **52**, (2.99 mmol) in 8.5 ml Aceton wird 10 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 0.5 ml 6 N HCl-Lösung entsteht sofort ein farbloser Niederschlag. Nach Abkühlen der Lösung wird 9 ml Diethylether zugegeben, 3 h bei 0° C stehen gelassen, der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Ether gewaschen, um **53** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Farblosen Feststoff

Ausbeute: 1.11 g (2.89 mmol), 97%

R_f = 0.07 (c-Hexan/Ethylacetat 1:1 [v:v]+ 2% Triethylamin)

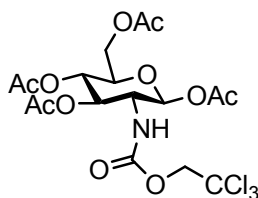
Smp.: 235° C Zersetzung

[α]_D²⁰ = +49.3° (c = 1, Wasser)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ=2.01, 2.03, 2.06, 2.21 (s, 4 3H, 4 COCH₃); 3.67 (m, 1H, H-2); 4.03 (q, J=12.4Hz and 2.0Hz, 1H, H-6a); 4.08 (m, 1H, H-5); 4.22 (q, J=12.3Hz and 4.2Hz, 1H, H-6b); 4.97 (m, 1H, H-4); 5.40 (m, 1H, H-3); 5.95 (d, J=8.8Hz, 1H, H-1); 8.89 (s, 2H, NH₂).

C₁₄H₂₁NO₉ HCl (383.8)

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranose **55**^[122]



Zu einer Lösung von 1.05 g 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose Hydrochlorid **53** (2.74 mmol) und 0.46 g Natriumhydrogencarbonat (5.5 mmol) in 22 ml Wasser wird 0.63 g 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid **54** (2.95 mmol) in 15 ml Chloroform gegeben und 3 h gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 0.5 M HCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in möglichst wenig Ethanol aufgenommen und durch Zugabe von kaltem Wasser ausgefällt. Das Rohprodukt wird in Essigester gelöst und **55** durch Zugabe von *n*-Hexan ausgefällt.

Farbloser Feststoff

Ausbeute: 1.10 g (2.12 mmol), 77%

R_f = 0.21 (*n*-Hexan/ Ethylacetat 1:1 [v:v])

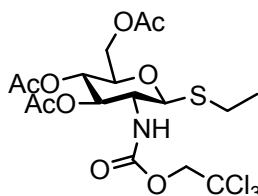
Smp.: 124° C

[α]_D²⁰ = +14.4° (c= 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.04, 2.09, 2.06, 2.11 (s, 4 3H, 4 COCH₃); 3.83 (m, 1H, H-5); 3.95 (m, 1H, H-2); 4.12 (dd, *J*=12.4, 2.2Hz, 1H, H-6a); 4.29 (dd, *J*=12.4Hz, 4.4Hz, 1H, H-6b); 4.72 (s, 2H, Teoc CH₂); 5.12 (t, *J*=9.6Hz, 1H, H-4); 5.21-5.28 (m, 2H, H-3 and NH); 5.73 (d, *J*=8.8Hz, 1H, H-1)

C₁₇H₂₂NO₁₁Cl₃ (522.7)

Ethyl-3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-1-thio-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid **56**^[122]



Zu einer Lösung von 1.3 g 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranose **55** (2.5 mmol) in absolutem Dichlormethan (6 ml) wird 0.2 g 4 Å Molsieb gegeben und die Mischung 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem 0.5 ml Ethylmercaptan (7 mmol) zugegeben wurde, wird die Reaktionsmischung auf -10° C abgekühlt und 1.0 ml Bortrifluorid Etherat (8.5 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 Minuten bei -10° C gerührt und anschließend 90 min bei Raumtemperatur. Es wird über Celite filtriert und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (20 ml) neutralisiert. Nachdem die Phasen getrennt wurden, wird die wäßrige Phase mit Dichlormethan nochmals extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Essigester gelöst. Durch Zugabe von kaltem Cyclohexan wird **56** als farbloser Feststoff erhalten.

Farbloser Feststoff

Ausbeute: 1.1 g (2.2 mmol), 87%

R_f = 0.23 (c-Hexan/ Ethylacetat 1:1 [v:v])

Smp.: 139° C

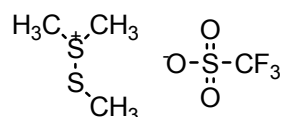
[α]_D²⁰ = -15.2 (c= 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.27 (t, *J*=7.3Hz, 3H, CH₃); 2.03, 2.08 (s, 3 3H, 3 COCH₃); 2.73 (m, 3H, SCH₂); 3.70 (m, 1H, H-5); 3.78 (m, 1H, H-2); 4.13 (dd, *J*=12.3Hz, 2.0Hz, 1H, H-6a); 4.25 (dd, *J*=12.3Hz, 5.0Hz, 1H, H-6b); 4.62-4.69 (m, 2H,

Teoc-CH₂a, H-1); 4.80 (d, *J*=12Hz, 1H, Teoc-CH₂b); 5.08 (t, *J*=9.8Hz, 1H, H-4); 5.15-5.25 (m, 2H, H-3 and NH)

C₁₇H₂₄NO₉SCl₃ (524.8)

Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat **59**^[124]



Zu einer Lösung von 2.4 g Dimethyldisulfid **57** (25 mmol) in trockenem Dichlormethan (50 ml) wird eine Lösung von 4.1 g Methyltriflat **58** (25 mmol) in trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von trockenem Ether (150 ml) wird das erwünschte Produkt ausgefällt, welches unter Argon abgetrennt und mit trockenem Ether gewaschen wird, um **59** zu erhalten, welcher sowohl Luft- als auch Wasser-empfindlich ist, jedoch bei –20° C unter Argon mehrere Wochen gelagert werden kann.

Braunen Feststoff

Ausbeute: 4.84 g (18.8 mmol), 75%

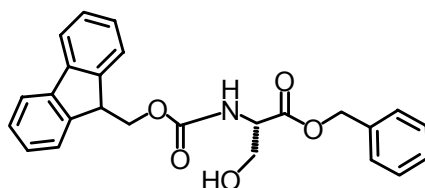
R_f = 0.7 (Dichlormethan/Methanol 9:1 [v;v])

Smp.: 34° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.81 (s, 3H); 3.21 (s, 6H)

C₄H₉O₃S₃F₃ (258.3)

N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinbenzylester **61** ^[142]



Zu einer Lösung von 7.35 g L-Serinbenzylester Hydrotosylat **60** (20 mmol) in 10%iger Natriumcarbonatlösung (50 ml) und Dioxan (40 ml) wird bei 0° C eine Lösung von 5.18 g 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (20 mmol) in Dioxan (40 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf Wasser (500 ml) gegossen und dreimal mit Essigester (je 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit c-Hexan/ Ethylacetat 2:1 als Eluens gereinigt um **61** zu erhalten.

Gelbes Öl

Ausbeute: 7.18 g (17.2 mmol), 86%

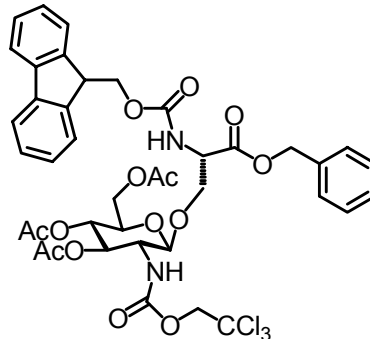
R_f = 0.21 (c-Hexan/ Ethylacetat 2:1 [v:v])

[α]_D²⁰ = +1.5 (c=1.2, Ethylacetat)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.35 (s, 1H, OH), 3.91 (m, 1H, Ser-CH_{2a}), 4.00 (m, 1H, Ser-CH_{2b}), 4.20 (t, J = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.40 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.49 (m, 1H, Ser-αCH), 5.2 (m, 2H, Bzl-CH₂), 5.7 (d, J = 6 Hz), 1H, Urethan), 7.24-7.40 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.57 (d, J = 7 Hz, 2H, Fmoc), 7.74 (d, J = 7 Hz, 2H, Fmoc)

C₂₅H₂₃NO₅ (417.5)

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **62**^[143]**



Zu einer Lösung von 0.15 g *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinbenzylester **61** (0.35 mmol) und 0.64 g Ethyl-3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-1-thio-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl-amino)- β -D-glucopyranosid **56** (1.22 mmol) in absolutem Dichlormethan (25 ml) wird 4 g 4Å Molsieb gegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird 0.27 g Dimethyl-(methylthio)-sulfonat Triflat **59** (1.37 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 0.19 ml Triethylamin (1.37 mmol) zugegeben, über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *c*-Hexan/ Ethylacetat (4:1 – 2:1 als Eluens gereinigt um **62** zu erhalten.

Gelbes Öl

Ausbeute: 0.30 g (0.34 mmol), 98%

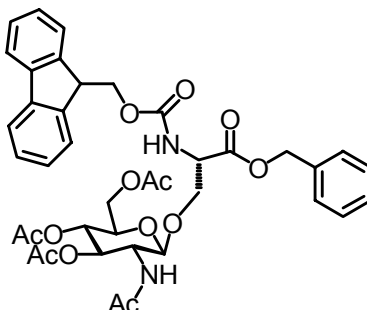
R_f = 0.19 (*c*-Hexan/ Ethylacetat 1:1 [v:v])

[α]_D²⁰ = +24.1 (*c* = 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.02, 2.03, 2.07 (3 s, 9H, 3 OAc), 3.59 (m, 2H, H-5, H-2), 3.92 (m, 1H, H-6a), 4.10 (m, 1H, H-6a), 4.23 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Ser-CH₂a), 4.39-4.53 (m, 3H Ser- α CH, Fmoc-CH, Ser-CH₂b), 4.58-4.81 (m, 3H, H-1, Teoc-CH₂), 5.02 (t, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 5.17-5.31 (m, 3H, H-3, Bzl-CH₂), 5.81 (m, 2H, 2 NH), 7.27-7.42 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.61 (m, 2H, Fmoc), 7.76 (d, *J* = 7 Hz, 2H, Fmoc)

C₄₀H₄₁N₂O₁₄Cl₃ (880.1)

N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester 63^[144]



Zu einer Lösung von 0.26 g N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-(3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **62** (0.3 mmol) in Essigsäureanhydrid (2 ml) wird 0.1 g frisch aktiviertes Zinkpulver gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit Toluol verdünnt, das Zinkpulver abfiltriert und das Lösungsmittel durch Coevaporation mit Toluol unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit c-Hexan/ Ethylacetat 2:1 als Eluens gereinigt um **63** zu erhalten.

Gelbes Öl

Ausbeute: 0.18 g (0.24 mmol), 81%

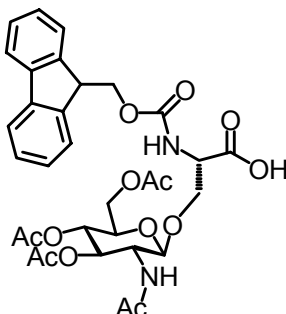
R_f = 0.34 (c-Hexan/ Ethylacetat 1:1 [v;v])

[α]_D²⁰ = +7.0° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.82 (s, 1H, NAc), 2.03, 2.04, 2.07 (3 s, 9H, 3 OAc), 3.62 (m, 1H, H-5), 3.7 (m, 1H, H-2), 3.86 (dd, J = 12, 2 Hz, 1H, H-6a), 4.08 (dd, J = 12, 2 Hz, 1H, H-6a), 4.23 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Ser-CH₂a), 4.45 (m, 2H, Fmoc-CH, Ser-CH₂b), 4.53 (m, 1H Ser-αCH), 4.67 (d, J = 8 Hz, 1H, H-1), 5.02 (t, J = 10 Hz, 1H, H-4), 5.19 (m, 2H, Bzl-CH₂), 5.25 (t, J = 10 Hz, 1H, H-3), 5.37 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 5.81 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 7.3-7.42 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.77 (d, J = 7 Hz, 2H, Fmoc)

C₃₉H₄₂N₂O₁₃ (746.8)

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-L-serin **44**^[145]**



Zu einer Lösung von 0.28 g *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **63** (0.38 mmol) in 10 ml Ethylacetat/ Ethanol 1:1 wird eine katalytische Menge 5% Palladium auf Kohle (5 mg) gegeben und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Sobald sich mittels Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr nachweisen läßt, wird das Reaktionsgemisch über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 30:1 – 10:1 als Eluens gereinigt um **44** zu erhalten.

Farbloses Öl

Ausbeute: 0.20 g (0.31 mmol), 83%

$R_f = 0.13$ (Chloroform/ Methanol 10:1 [v:v])

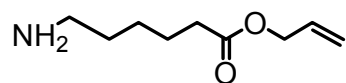
$[\alpha]_D^{20} = +7.3^\circ$ (c=0.8, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 2.00 (s, 3H, NHAc); 2.11, 2.15, 2.17 (s, 3 3H, 3 OAc); 3.91-4.04 (m, 2H, H-5, Ser-CH₂a); 4.18 (m, 1H, H-2); 4.21-4.33 (m, 2H, 1H, H-6a, Ser-CH₂b); 4.36-4.43 (m, 3H, Fmoc-CH₂, H-6b); 4.49 (m, 1H, Fmoc-CH); 4.55 (m, 1H, Ser- α H); 4.83 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-1); 5.11 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, H-4); 5.36 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, H-3); 7.47 (m, 2H, Fmoc); 7.54 (m, 2H, Fmoc); 7.82 (m, 2H, Fmoc); 7.94 (m, 2H, Fmoc).

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 679.2115 [M+ Na]⁺ gef.: 679.2098

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ (656.6)

6-Aminohexansäureallylester Hydrotosylat (HAcaOAll*TosOH) 65



Eine Lösung aus 4.00 g 6-Aminohexansäure **64** (30.5 mmol), 6.08 g p-TosOH (32.0 mmol) and 6.0 ml Allylalkohol in 160 ml Benzol wird mit einem Wasserabscheider für 12 h refluxiert. Anschließend wird die Mischung im Vakuum eingengt und mit Ethylacetat gewaschen.

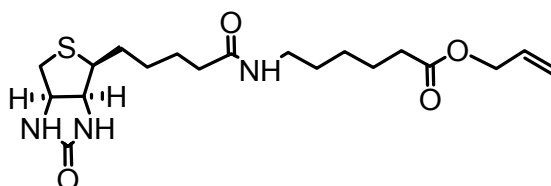
Weißer Feststoff

Ausbeute: 9.24 g (26.9 mmol), 88 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.2 (m, 2H, γ-CH₂, Aca); 1.5 (m, 4H, β-CH₂ Aca, δ-CH₂ Aca); 2.2 (t, J=7Hz, 2H, α-CH₂ Aca); 2.35 (s, 3H, CH₃ Tos); 2.75 (m, 2H, ε-CH₂ Aca); 4.55 (d, J=7Hz, 2H OCH₂); 5.2-5.35 (m, 2H, CH₂=CH Allyl); 5.8-6.0 (m, 1H, CH₂=CH Allyl); 7.2 (d, J=8Hz, CH Tos); 7.7 (s, 3H, NH₃); 7.75 (d, J=8Hz, CH Tos)

C₁₆H₂₅NO₃S (343.4)

6-Biotinylaminohexansäureallylester (BiotAcaOAll) 66



Eine Lösung aus 0.34 g Biotin (1.39 mmol) und 0.86 g HAcaOAll*TosOH **65** (2.50 mmol) in 6 ml DMF wird auf 40°C erwärmt und unter Argon mit 0.33 ml NEt₃ (2.40 mmol), 0.38 g EDC (2.00 mmol) and 0.27 g HOBT (2.00 mmol) versetzt. Die reaktionsmischung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung im Vakuum eingengt, in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 0.5 N HCl gewaschen. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Nach Chromatographie über Kieselgel (Eluent: Ethylacetat/ Methanol 5:1) erhält man das Produkt **66**.

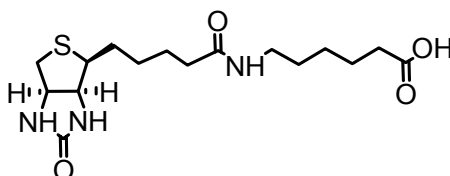
Weißer Feststoff

Ausbeute: 0.35 g (0.89 mmol), 64 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.32-1.70 (m, 12H, 3 CH₂ Aca, 3 CH₂ Biotin); 2.21 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, α -CH₂ Aca); 2.34 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, CH₂ Biotin); 2.74 (d, $J=12.7$ Hz, 1H, CH₂ Biotin); 2.94 (q, $J=4.7$ Hz and 12.7Hz, 1H, CH₂ Biotin); 3.14 (m, 1H, CH Biotin); 3.20 (m, 2H, ϵ -CH₂ Aca); 4.31 (m, 1H, CH Biotin); 4.52 (m, 1H, CH Biotin); 4.56 (q, $J=6$ Hz and 1.2Hz, 2H, OCH₂); 5.21-5.32 (m, 2H, CH₂=CH Allyl); 5.88-.94 (m, 1H, CH₂=CH Allyl); 6.34 (s, 1H, NH); 6.63 (s, 1H, NH)

C₁₉H₃₁N₃O₄S (397.5)

6-Biotinylamino-hexanoic acid (BiotAcaOH) 67



Zu einer Lösung aus 0.27 g BiotAcaOAll **66** (0.69 mmol) in 5ml DMF wird unter Argon-Atmosphäre 62.88 μ l Morpholin (0.731mmol) und Pd(PPh₃)₄ (5 mg) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum einrotiert und der verbleibende Feststoff in Methanol umkristallisiert.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 0.22 g (0.62 mmol), 90 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.20-1.57 (m, 12H, 3 CH₂ Aca, 3 CH₂ Biotin); 1.99 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, α -CH₂ Aca); 2.14 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂ Biotin); 2.53 (d, $J=12.5$ Hz, 1H, CH₂ Biotin); 2.77 (q, $J=5.0, 12.5$ Hz, 1H, CH₂ Biotin); 2.95 (m, 2H, ϵ -CH₂ Aca); 3.05 (m, 1H, CH Biotin); 4.09 (m, 1H, CH Biotin); 4.26 (m, 1H, CH Biotin); 6.32 (s, 1H, NH); 6.38 (s, 1H, NH); 7.70 (s, 1H, NH)

HR-MS (FAB, 3-NBA): ber.: 380.1620 [M+ Na]⁺ gef.: 380.1615

C₁₆H₂₇N₃O₄S (357.5)

6.3.2 Synthese der NLS-Peptide

AAV 16: Erstbeladung des PS-Harzes mit Fmoc-LGG-Hycron-OH 40

Zu einer Suspension von 0.66 g Aminomethylpolystyrolharz **40** (Beladung 0.96 mmol/g, 0.63 mmol) in 10 ml Dichlormethan werden 1.40 g *E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-leucylglycylglycyloxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure **41** (1.89 mmol), 0.28 g DIC (2.2 mmol) und 0.58 g HOBt (3.8 mmol) gegeben. Nach 18 h Schütteln wird das Harz 6 mal mit Dichlormethan gewaschen und zum *Cappen* zweimal 5 min mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 3:1 geschüttelt. Das Harz wird 6 mal mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet um **39** zu erhalten. Die Beladung wird nach AAV I photometrisch bestimmt.

AAV 17: Erstbeladung des Wang-Harzes

Eine Lösung von 10 Äquivalenten der ersten Aminosäure und 5 Äquivalenten DIC in abs. Dichlormethan (5 ml) wird für 20 min unter Argon-Atmosphäre bei 0°C gerührt. Anschließend wird das Lösemittel im Vakuum entfernt, die konzentrierte Lösung in DMF aufgenommen und zu in 2 ml abs. DMF vorgequollenen Wang-PS-Harz gegeben. Nach Zugabe von 0.1 Äquivalent DMAP in DMF wird 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend wird das Harz dreimal mit DMF und dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Die Beladung wird nach AAV I photometrisch bestimmt.

AAV 18: Abspaltung von einer Polymerprobe mit 95 % TFA zwecks nachfolgender Analytik

Einige Harzkügelchen des Wang-Harzes (≤ 1 mg) werden abgenommen und fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Es wird 1 mL einer Lösung von 95 % TFA in Dichlormethan hinzugefügt und für 1 h geschüttelt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Gemisch aus Methanol/Acetonitril 1:1 (v/v) aufgenommen.

AAV 19: Aminosäurekupplung mit HBTU/ HOBt

Eine Lösung von 4 eq Aminosäure, 3.6 eq HBTU, 4 eq HOBt und 4 eq DIPEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 1 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 20: Kupplung von Biotinaminocaprinsäure 67

Eine Lösung von 4 eq Biotinaminocaprinsäure, 3.6 eq HBTU, 4 eq HOBt und 8 eq DIPEA in DMF wird für drei Minuten voraktiviert und dann zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 2 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen.

AAV 21: Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen

Das Harz wird zwei mal 45 min mit einer Mischung von TFA/Thioanisol/Ethandithiol/Wasser 90:5:3:2 geschüttelt. Anschließend wird das Harz je sechsmal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

Abspaltung von der festen Phase:

AAV 22: Hycron-PS-Harz

Zu einer Suspension des Harzes in DMF (10 ml) werden 1.5 eq Dimethylbarbitursäure gegeben. Das Reaktionsgefäß wird bis zur Gasentwicklung evakuiert und anschließend mit Argon belüftet. Nach 5 Wiederholungen wird im Argongegenstrom Tetrakistriphenylphosphinpalladium-Katalysator (10 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung für 15 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und dreimal mit DMF gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt um das Rohprodukt zu erhalten.

AAV 23: Wang-PS-Harz

Das in Dichlormethan vorgequollene Harz wird unter Argon-Atmosphäre mit 10 ml TFA/ TES/ Wasser 95:2.5:2.5 [v:v:v] für 1.5 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz dreimal mit Dichlormethan, dreimal mit DMF und wieder dreimal mit Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates durch Coevaporation mit Toluol entfernt.

AAV 24 Aufreinigung

Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und über eine Sepac[®]-C18-Kartusche (Gradient: 0-50 % Acetonitril in Wasser) vorgereinigt. Nach der Lyophilisation wird das vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer C18-PPN-Säule (Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100-5 C18 HD; Fluß 3.5 ml/min; Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 5.91:94.99:0.1 und 20 min 29.97:69.93:0.1) gereinigt.

Biotinylaminocaproyl-L-seryl-L-lysyl-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin 37a

Synthese am Hycron-Linker:

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 16 beladene Aminomethyl-PS-Harz **39** (0.05 g, Beladung 0.43 mmol/g, 0.022 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 19 das Festphasen-gebundenen Decapeptid Fmoc-S(tBu)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74b** aufgebaut. Umsetzung nach AAV 20 mit Biotinaminocapronsäure **67** und Abspaltung vom Harz nach AAV 20 liefert das Peptid **37a** nach Aufreinigung (AAV 24).

Ausbeute: 6.3 mg (4.3 µmol), 20 %

Synthese am Wang-Linker:

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 wird 0.6 g Wang-PS-Harz (Beladung 1.2 mmol/g) mit 2.14 g (7.2 mmol) Fmoc-Glycin beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 19 an 0.3 g festphasengebundenen Fmoc-Glycin (Beladung 0.84 mmol/g, 0.252 mmol Glycin) durchgeführt. Das festphasengebundene Decapeptid Fmoc-S(tBu)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74a** wird nach AAV 20 mit Biotinaminocaprinsäure **67** umgesetzt und mit 95% TFA wird das Peptid **37a** unter gleichzeitiger Entschützung der Seitenketten vom Harz abgespalten (AAV 23) und nach AAV 24 aufgereinigt.

Ausbeute: 232.0 mg (159 μ mol), 63 %

Weißer Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -13.1$ (c = 0.6, Methanol)

HPLC (Säule: C18 PPN, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 9.99/89.91/0.1; 30 min 24.97/74.93/0.1): R_f = 8.7 min

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 0.95 (d, J=6.2Hz, 3H, Leu-CH₃); 0.98 (d, J=6.2Hz, 3H, Leu-CH₃); 1.32-2.02(m, 41H, 3 Aca-CH₂, 3 Biotin-CH₂, Leu- γ CH₂, Leu-CH, 3 Lys- β CH₂, 3 Lys- γ CH₂, 3 Lys- δ CH₂, 3 Arg- β CH₂, 3 Arg- γ CH₂); 2.23 (t, J=7.2Hz, 2H, Biotin-CH₂C=O); 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H, Aca- α CH₂); 2.74 (d, J=12.7Hz, 1H, Biotin-CH₂S); 2.93-2.99 (m, 7H, 3 Lys- ϵ CH₂, Biotin-CH₂S); 3.18-3.27 (m, 7H, 2 Arg- ϵ CH₂, Aca- ϵ CH₂, Biotin-CHS); 3.82-4.07 (m, 8H, 2 Gly-CH₂, 2 Ser-CH₂); 4.32-4.55 (m, 9H, 8 α CH, Biotin-CHN); 4.53 (m, 1H, Biotin-CHN)

MS (ESI): ber.: 1454.85 [M+H]⁺ gef.: 1454.9

C₆₂H₁₁₄N₂₂O₁₆S (1455.8)

Biotinylaminocaproyl-L-seryl-L-lysyl-(O)-phosphato-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycine 37b

Synthese am Hycron-Linker:

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 16 beladene Aminomethyl-PS-Harz **39** (0.04 g, Beladung 0.43 mmol/g, 0.016 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 19 das Festphasen-gebundenen Decapeptid Fmoc-S(PO(OH)OBzl)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74b** aufgebaut. Umsetzung nach AAV 20 mit Biotinaminocaprinsäure **67** und Abspaltung vom Harz nach AAV 22 liefert das Peptid **37b** nach Aufreinigung (AAV 24).

Ausbeute: 10.3 mg (6.7 μ mol), 41 %

Synthese am Wang-Linker:

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 wird 0.6 g Wang-PS-Harz (Beladung 1.2 mmol/g) mit 2.14 g (7.2 mmol) Fmoc-Glycin beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 19 an 0.1 g festphasengebundenen Fmoc-Glycin (Beladung 0.39 mmol/g, 0.04 mmol Glycin) durchgeführt. Das Festphasen-gebundenen Decapeptid Fmoc-S(PO(OH)OBzl)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74b** wird nach AAV 20 mit Biotinaminocaprinsäure **67** umgesetzt und mit 95% TFA wird das Peptid **37b** unter gleichzeitiger Entschützung der Seitenketten vom Harz abgespalten (AAV 23) und nach AAV 24 aufgereinigt.

Ausbeute: 41 mg (26.7 μ mol), 68 %

Weißer Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -73.0$ (c = 0.15, Wasser)

HPLC (Säule: C18 PPN, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 0.99/99.91/0.1; 30 min 39.96/59.94/0.1): R_f = 5.1 min

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 0.91 (d, J=6 Hz, 3H, Leu-CH₃); 0.95 (d, J=6 Hz, 3H, Leu-CH₃); 1.28-1.92(m, 41H, 3 Aca-CH₂, 3 Biotin-CH₂, Leu-γ-CH₂, Leu-CH, 3 Lys-β-CH₂, 3 Lys-γ-CH₂, 3 Lys-δCH₂, 3 Arg-βCH₂, 3 Arg-γ-CH₂); 2.20 (t, J=7 Hz, 2H, Biotin-CH₂C=O); 2.33 (t, J=7 Hz, 2H, Aca-α-CH₂); 2.70 (d, J=12.5Hz, 1H, Biotin-CH₂S); 2.90-2.98 (m, 7H, 3 Lys-ε-CH₂, Biotin-CH₂S); 3.15-3.32 (m, 7H, 2 Arg-εCH₂, Aca-ε-CH₂, Biotin-CHS); 3.82-4.00 (m, 6H, 2 Gly-CH₂, Ser-CH₂); 4.09-4.16 (m, 2H, Ser-CH₂); 4.32-4.49 (m, 9H, 8 α-CH, Biotin-CHN); 4.58 (m, 1H, Biotin-CHN)

³¹P NMR (162.1 MHz, MeOD, 25°C): δ = 2.29

MS (ESI): ber.: 1535.82 [M+H]⁺ gef.: 1535.2

C₆₂H₁₁₅N₂₂O₁₉PS (1535.8)

Biotinylaminocaproyl-L-seryl-L-lysyl-O-(2-acetamido-3,4,6-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin 76

Synthese am Hycron-Linker:

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 beladene Aminomethyl-PS-Harz **39** (0.09 g, Beladung 0.43 mmol/g, 0.038 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 20 das Festphasen-gebundenen Decapeptid Fmoc-S(PO(OH)OBzl)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74c** aufgebaut. Umsetzung nach AAV 21 mit Biotinaminocapronsäure **67** und Abspaltung vom Harz nach AAV 22 liefert das Peptid **76** nach Aufreinigung (AAV 24).

Ausbeute: 29.0 mg (16.4 μmol), 43 %

Synthese am Wang-Linker:

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 wird 0.6 g Wang-PS-Harz (Beladung 1.2 mmol/g) mit 2.14 g (7.2 mmol) Fmoc-Glycin beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 19 an 0.1 g festphasengebundenen Fmoc-Glycin (Beladung 0.84 mmol/g, 0.084 mmol Glycin) durchgeführt. Das festphasengebundene Decapeptid Fmoc-S(PO(OH)OBzl)-K(Boc)-S(tBu)-R(Pbf)-K(Boc)-R(Pbf)-K(Boc)-L-G-G **74b** wird nach AAV 20 mit Biotinaminocaprinsäure **67** umgesetzt und mit 95% TFA wird das Peptid **37b** unter gleichzeitiger Entschützung der Seitenketten vom Harz abgespalten (AAV 23) und nach AAV 24 aufgereinigt.

Ausbeute: 17.5 mg (9.8 μ mol), 12 %

Weißer Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -58.0$ (c = 0.6, Methanol)

HPLC (Säule: C18 PPN, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 9.99/89.91/0.1; 30 min 24.97/74.93/0.1): R_f = 16.0 min

¹H NMR (400 MHz, d-MeOD) δ = 0.95 (d, J=6.4Hz, 3H, Leu-CH₃); 0.98 (d, J=6.4Hz, 3H, Leu-CH₃); 1.36-1.96 (m, 41H, 3 Aca-CH₂, 3 Biotin-CH₂, Leu- γ CH₂, Leu-CH, 3 Lys- β CH₂, 3 Lys- γ CH₂, 3 Lys- δ CH₂, 3 Arg- β CH₂, 3 Arg- γ CH₂); 1.98 (s, 3H, NAc); 2.01, 2.05, 2.10 (s, 3 3H, 3 OAc); 2.23 (t, J=7.2Hz, 2H, Biotin-CH₂C=O); 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H, Aca- α CH₂); 2.74 (d, J=12.7Hz, 1H, Biotin-CH₂S); 2.93-3.07 (m, 7H, 3 Lys- ϵ CH₂, Biotin-CH₂S); 3.14-3.31 (m, 7H, 2 Arg- ϵ CH₂, Aca- ϵ CH₂, Biotin-CHS); 3.80-4.07 (m, 10H, 2 Gly-CH₂, 2 Ser-CH₂, GlcNAc H-2, GlcNAc H-6b); 4.15 (q, J=12.0Hz, 2.0Hz, 1H, GlcNAc H-6a); 4.26-4.43 (m, 9H, 8 α CH, Biotin-CHN); 4.50 (t, J=6.0Hz, 1H, GlcNAc H-5); 4.54 (m, 1H, Biotin-CHN); 4.71 (d, J=8.4Hz, 1H, GlcNAc H-1); 5.02 (t, J=9.6Hz, 1H, GlcNAc H-4); 5.21 (t, J=9.6Hz, 1H, GlcNAc H-3)

MS (ESI): ber.: 1784.96 [M+H]⁺ gef.: 1784.8

C₇₆H₁₃₃N₂₃O₂₄S (1785.1)

Biotinylaminocaproyl-L-seryl-L-lysyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycine 37c

Der pH-Wert einer Lösung von 17.5 mg Biotinylaminocaproyl-L-seryl-L-lysyl-O-(2-acetamido-3,4,6-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin **76** (9.81 μmol) in trockenem Methanol (1 ml) wird durch die Zugabe von 0.1 M Lösung von Natriummethanolat in trockenem Methanol wird auf 9 eingestellt. Nach 30 min Rühren wird der pH-Wert durch die Zugabe von Essigsäure auf 3 gebracht. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine SepPak®-C18 Kartusche gereinigt um **37c** zu erhalten.

Weißer Feststoff

Ausbeute: 9.6 mg (5.8 μmol), 59 %

$[\alpha]_D^{20} = -235.7^\circ$ (c = 0.17, Wasser)

HPLC (Säule: C18 PPN, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 9.99/89.91/0.1; 30 min 24.97/74.93/0.1): R_f = 9.67 min

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 0.88 (d, J=5.7Hz, 3H, Leu-CH₃); 0.93 (d, J=5.7Hz, 3H, Leu-CH₃); 1.36-1.96 (m, 41H, 3 Aca-CH₂, 3 Biotin-CH₂, Leu-γCH₂, Leu-CH, 3 Lys-βCH₂, 3 Lys-γCH₂, 3 Lys-δCH₂, 2 Arg-βCH₂, 2 Arg-γCH₂); 1.98 (s, 3H, NAc); 2.03 (s, 2H, NAc Rotamer); 2.06 (s, 1H, NAc Rotamer); 2.24 (t, J=7.0Hz, 2H, Biotin-CH₂C=O); 2.33 (t, J=7.4Hz, 2H, Aca-αCH₂); 2.77 (d, J=12.9Hz, 1H, Biotin-CH₂S); 2.97-3.01 (m, 7H, 3 Lys-εCH₂, Biotin-CH₂S); 3.15-3.19 (m, 6H, 2 Arg-εCH₂, Aca-εCH₂); 3.32 (m, 1H, Biotin-CHS); 3.40-3.48 (m, 2H, GlcNAc H-4, GlcNAc H-5); 3.54 (t, J=9.6Hz, GlcNAc H-3); 3.66-4.10 (m, 11H, 2 Gly-CH₂, 2 Ser-CH₂, GlcNAc H-2, GlcNAc H-6); 4.26-4.43 (m, 8H, 8 αCH); 4.51-4.55 (m, 2H, GlcNAc H-1, Biotin-CHN); 4.60 (m, 1H, Biotin-CHN)

MS (ESI): ber.: 1658.93 [M+H]⁺ gef.: 1659.8

C₇₀H₁₂₇N₂₃O₂₁S (1659.0)

6.3.3 Synthese der NLS-Avidin-Konjugate

Alle Kupplungen von biotinylierten Peptiden an Avidin wurden in Zusammenarbeit mit R. VETTER durchgeführt.

BodipyFL-markiertes Avidin (66 kD; Molecular Probes Inc., Eugene, USA), wird mit 10 Äquivalent biotinyliertem Peptid **37** in PBS-Puffer (pH 7) gemischt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Reaktionsmischung wird aufkonzentriert und die unligierten Peptide durch Filtration über Centricon-30 Microcon-Centrators (Amicon) abgetrennt. Die Endkonzentration wird über Bradford Assay^[125] bestimmt.

6.3.4 Biologische Evaluierung der NLS-Avidin-Konjugate

Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit R. VETTER und A. HENKEL durchgeführt.

Polarisationsmessungen

In 1 ml 10 mM HEPES Puffer (pH 7,4) mit 150 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ werden 0,2 µM der NBD-markierten NLS-Peptide **80** gegeben. Zu dieser Lösung werden verschiedene Konzentrationen an Importin α (0,04 – 25 µM) titriert und die Änderung der Polarisation in einem Fluoromax-2 Fluoreszenzspektrometer mit einem 1971 Autopolarisator (L-Konfiguration, Horiba/Jobin-Yvon) bei 20°C gemessen. Für jede Messung wurde das Polarisationssignal berechnet. Zugabe von Importin α führt zu einem Anstieg des Polarisationssignals für den größeren Peptid-Protein-Komplex. Die resultierenden Bindungskurven wurden für jedes Peptid mit GraFit 3.0 (Erithacus Software) nach einem $A + B = AB$ Bindungsmodell gefittet.

Microinjektion der NLS-Avidin-Konjugate

Die Zellen wurden auf 30 mm Deckgläschen ausgesät und für 24 h in Vollmedium kultiviert.

NLS-Avidin Konjugate **36** (10-14 μM) werden mit 14 μM TexasRed Dextran (70 kD; Molecular Probes Inc., Eugene) gemischt und ungelöstes Material durch Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 10 min bei 4 °C abgetrennt. Die Lösung wird in das Cytosol der Zellen mit einem *Micromanipulator 5171* und *Transjector 5246* microinjiziert (Injektionszeit 0.4 s). Die Zellen werden mit einem konfokalen *Leica DM IRBE* Mikroskop und einem *HCX PL APO Leica* Objektiv *63x/1,32-0,6 Oil CS* beobachtet. Bodipy-FL wird mit einem Argon Laser der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm und TexasRed mit einem HeNe Laser der Wellenlänge $\lambda = 542$ nm angeregt.

Die Bilder wurden mit der Leica Confocal Software aufgenommen, jedes Bild ist aus drei Bildern gemittelt. Es wurden jedes Mal ca. 50 Zellen injiziert und analysiert, die ausgesuchten Zellen sind repräsentative Beispiele.

6.4 Versuche zu Kapitel 4.3

6.4.1 Synthese des Fluorescein-markierten PTD-NLS-Konjugates **84**

AAV 25: Myristoylierung

Eine Lösung von 1.4 ml Myristoylchlorid/ DIPEA (1:1) in 10 ml abs. DMF wird zu dem in DMF gequollenen Polymer gegeben. Es wird für 20 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen. Die Kupplung wird ein zweites mal durchgeführt und das Harz abschließend mit Dichlormethan, DMF, Methanol und Et₂O gewaschen.

AAV 26: Aloc Entschützung

Zu einer Suspension des Harzes in DMF (10 ml) werden 0.1 ml Piperidin gegeben. Das Reaktionsgefäß wird bis zur Gasentwicklung evakuiert und anschließend mit Argon belüftet. Nach 5 Wiederholungen wird im Argongegenstrom Pd(PPh₃)₄-Katalysator (100 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung für 18 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und je dreimal mit DMF, Dichlormethan und Methanol gewaschen.

AAV 27: FITC- Kupplung an der festen Phase

Eine Lösung von 10 eq FITC und 10 eq DIPEA in 10 ml DMF/ DMSO (1:1) wird zu frisch entschütztem, harzgebundenem Amin gegeben. Es wird 48 h unter Argon im Lichtausschluss geschüttelt, das Harz abfiltriert und mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Ether gewaschen.

AAV 28: Abspalten vom CITrt-Harz

Das in Dichlormethan vorgequollene Harz wird unter Argon-Atmosphäre mit 10 ml TFA/ Thioanisol 95:5 [v:v] für 40 min geschüttelt. Anschließend wird das Harz dreimal mit Dichlormethan, dreimal mit DMF und wieder dreimal mit Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates durch Coevaporation mit Toluol entfernt.

AAV 29: Abspalten des vollgeschützten Peptides vom CITrt-Harz

Das in Dichlormethan vorgequollene Harz wird unter Argon-Atmosphäre mit 10 ml Dichlormethan/ Trifluorethanol/ Essigsäure 6:2:2 [v:v:v] für 2 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz dreimal mit Dichlormethan, dreimal mit DMF und wieder dreimal mit Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates durch Coevaporation mit n-Hexan entfernt.

AAV 30: FITC- Kupplung in Lösung

Eine Lösung von 10 eq Fluorenylthiocyanat und 10 eq DIPEA in 10 ml DMF/ DMSO (1:1) wird zu dem Aloc-entschützten, ansonsten vollgeschützten Peptid gegeben. Es wird 48 h unter Argon im Lichtausschluss geschüttelt, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der erhaltene rote Feststoff mit einer Ether/ n-Pentan Mischung gewaschen.

N-Myristoyl-L-glycyl-L-alanyl-L-arginyl-L-alanyl-L-seryl-L-valyl-L-leucyl-L-glycyl-L-glycyl-L-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-N-fluoresceinisothiocyanat-L-lysin (Myr Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys(Fluo)-OH) 84

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 beladene 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz (1.0 g, Beladung 0.1 mmol/g, 0.1 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4), Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 und *Cappen* (AAV 7) das Festphasen-gebundenen Peptid GAR(Pmc)AS(tBu)VLGGGK(Boc)K(Boc)K(Boc)K(Boc)K(Aloc) **87** aufgebaut und nach AAV 25 myristoyliert. Nach Abspalten der Aloc-Gruppe (AAV 26) erfolgt die Kupplung mit Fluorenylisothiocyanat entweder an der festen Phase durch Umstzung mit FITC nach AAV 27; oder in Lösung nach Abspalten des vollgeschützten Peptides (AAV 29) durch Kupplung von FITC nach AAV 30. Das Festphasen-gebundenen Peptid MyrGAR(Pmc)AS(tBu)VLGGGK(Boc)K(Boc)K(Boc)K(Boc)K(Boc)K(Fluo) wird mit 95% TFA unter gleichzeitiger Entschützung der Seitenketten vom Harz abgespalten (AAV 28). Der Rückstand wird über eine C18PPN-Säule (Gradient: 30 % Acetonitril – 60 % Acetonitril in 30 min) getrennt.

Roter Feststoff

Ausbeute: 15.8 mg (7.1 μmol) 7 %

$[\alpha]_D^{20} = -16.3$ (c = 0.06 in Methanol)

HPLC (Säule: C18 PPN, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 9.99/89.91/0.1; 30 min 24.97/74.93/0.1): R_f = 11.8 min

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 0.76-0.81 (m, 15 H, 2 CH₃ Leu, 2 CH₃ Val, CH₃ Myr); 1.12-1.42 (m, 20 H, 10 CH₂ Myr); 1.50-1.62 (m, 14 H, 5 δ -CH₂ Lys, γ -CH₂ Arg, CH₂ Myr); 1.67-1.73 (m, 6 H, 2 CH₃ Ala); 1.76-1.84 (m, 16 H, 6 β -CH₂ Lys, β -CH₂ Leu); 1.94-2.02 (m, 3 H, γ -CH Leu, CH₂-CO Myr); 2.75-2.82 (m, 13 H, β -CH Val, 5 ϵ -CH₂ Lys, δ -CH₂ Arg); 3.74-3.88 (m, 8 H, ϵ -CH₂ Lys, 4 α -CH, β -CH₂ Ser); 4.14-4.25 (m, 10

H, 10 α -CH); 4.33-4.38 (m, 2 H, 2 α -CH); 6.09-6.11 (m, 2H, armo. H); 6,23 (d, $J = 7$ Hz, 1 H, arom. H); 6.65-6.73 (m, 2H, arom. H); 6.98-7.05 (m, 2H, arom. H); 7.25-7.29 (m, 2H, arom. H)

MS (ESI): ber.: 2212.26 $[M+H]^+$ gef.: 2212.47

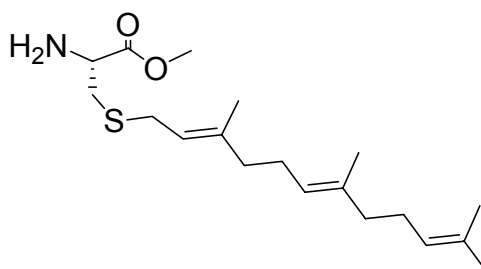
$C_{105}H_{170}N_{26}O_{24}S$ (2212.70)

6.4.2 Synthese des NBD-markierten PTD-NLS-Konjugates 85

AAV 3 I: Abspalten vom CITrt-Harz

Das in Dichlormethan vorgequollene Harz wird unter Argon-Atmosphäre mit 1% TFA und 1% Ethandithiol in Dichlormethan für 45 min geschüttelt. Anschließend wird das Harz dreimal mit Dichlormethan, dreimal mit DMF und wieder dreimal mit Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates durch Coevaporation mit Toluol entfernt.

S-Farnesyl-Cysteinmethylester (H-Cys(far)-OMe) 93



Zu 500 mg Cysteinmethylester-hydrochlorid (2.9 mmol) in 5 mL abs. DMF werden unter Eiskühlung 800 mg Farnesylbromid (2.9 mmol, 1.0 Äq.) und 1.0 mL NEt_3 (7.25 mmol) getropft und 30 Min bei $0^\circ C$ gerührt. Der entstandene Niederschlag wird

abfiltriert, die Lösung in 50 ml Wasser gegeben und der pH mit Na_2CO_3 auf 9 eingestellt. Die wässrige Phase wird achtmal mit je 30 ml n-Hexan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit c-Hexan/ Ethylacetat 1:1 gereinigt.

Farbloses Öl

Ausbeute: 478 mg (1.5 mmol), 53 %

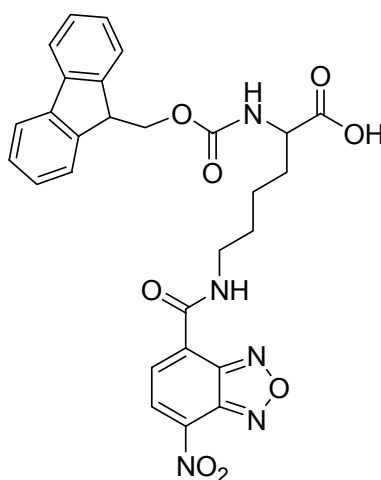
$R_f = 0.3$ (c-Hexan/ Ethylacetat 1:1 [v:v])

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.58$ (s, 6H, 2 CH_3 -Far); 1.67 (s, 3H, 2 CH_3 -Far); 1.83 (s, 3H, CH_3 -Far); 1.94-2.01 (m, 8H, 4 CH_2 -Far); 2.68 (dd, 1H, $J = 13.6, 7.7$ Hz, β CH_2); 2.89 (dd, 1H, $J = 13.6, 4.5$ Hz, α CH); 3.14-3.20 (m, 2H, α CH_2 -Far); 3.65 (dd, 1H, $J = 7.7, 4.5$ Hz, β' CH_2); 3.74 (s, 3H, O- CH_3); 5.05-5.11 (m, 2H, CH-Far); 5.23 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, CH-Far)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 16.3, 16.4, 17.9, 25.9, 26.6, 26.9, 30.1, 36.5, 39.9, 52.4, 54.5, 120.1, 124.0, 124.5, 131.6$ (q), 135.6(q), 139.9(q), 174.7(q)

$\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{NO}_2\text{S}$ (353.6)

**N-Fluorenylmethoxycarbonyl-N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol)-L-Lysin
(Fmoc-Lys(NBD)-OH) 97**



1.6 g Fmoc-Lys-OH (4 mmol) wird in 20 ml Methanol und 15 ml Wasser suspendiert und mit 1.08 g Natriumhydrogencarbonat (12 mmol) und 1.28 g NBD-Chlorid (6 mmol) versetzt und für 2 h auf 55°C erhitzt. Anschließend wird der pH mit Salzsäure auf ~2 eingestellt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit Dichlormethan/ Methanol (1:0 – 10:1) gereinigt.

Brauner Feststoff

Ausbeute: 1.38 g (2.6 mmol), 65 %

R_f = 0.3 (Dichlormethan/ Methanol 1:10 [v:v])

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 1.51 (m, 2H, γ-CH₂ Lys); 1.73 (m, 2 H, δ-CH₂ Lys); 1.90 (m, 2 H, β-CH₂ Lys); 3.35 (m, 2H, ε-CH₂ Lys); 4.10 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.23 (m, 1H, NH); 6.09 (d, J = 8.7 Hz, 1H, CH NBD); 7.31 (dd, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.39 (dd, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.56 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.63 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 8.24 (d, J = 8.7 Hz, 1H, CH NBD)

¹³C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ = 22.9; 27.2; 31.0; 53.6; 66.4; 98.1; 119.4; 124.7; 126.6; 127.3; 136.9; 140.9; 143.6; 157.2; 174.5

C₂₇H₂₅N₅O₇S (531.52)

Boc-(N-Boc)-L-Lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-NBD)-L-lysyl-L-metyl-L-glycyl-L-leucyl-L-prolin (Boc-Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(NBD) Met Gly Leu Pro-OH) 100

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 beladene 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz (0.41 g, Beladung 0.6 mmol/g, 0.25 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 das Festphasen-gebundenen Peptid Boc-Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(NBD) Met Gly Leu Pro-OH **99** aufgebaut.

Nach Abspalten nach AAV 31 und Aufreinigung über eine C4-Säule (Gradient: 30% Acetonitril – 60% Acetonitril in 30 min) erhält man das vollgeschützte Peptid **100**.

Farbloses Öl

Ausbeute: 136 mg (0.07 mmol), 28%

$[\alpha]_D^{20} = -31.4$ (c= 0.8, CHCl₃)

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 44.95/54.95/0.1; 30 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 14 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.92 (dd, 6H, J=10.0, 6.5 Hz, δ-Leu); 1.21-1.32 (m, 66H, 8 CH₃ Boc, 6 γ-CH₂ Lys); 1.50-1.62 (m, 10 H, 5 δ-CH₂ Lys); 1.76-1.83 (m, 16 H, 6 β-CH₂-Lys, β-Leu); 2.00 (s, 3H, CH₃-Met); 1.85-2.05 (m, 5H, γ-Pro, γ-Met, δ-CH₂ Lys); 2.07-2.15 (m, 3H, CH₂ β-Pro, γ-Leu); 2.40-2.58 (m, 2H, δ-Pro); 2.97-3.09 (12 H, 6 ε-CH₂-Lys); 3.65-3.90 (m, 2H, α-Gly); 4.20-4.24 (m, 1H, α-Pro); 4.32-4.36 (m, 1H, α-Met); 4.53 (m, 1H, α-Leu); 6.67-6.71 (m, 1H, arom. H); 7.89-7.98 (m, 1H, arom. H)

MS (ESI): ber.: 1948,09 [M+H]⁺ gef.: 1948,47

C₉₀H₁₅₂N₁₉O₂₆S (1948,35)

Boc-(N-Boc)-L-Lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-Boc)-L-lysyl-(N-NBD)-L-lysyl-L-metyl-L-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-S-farnesy-L-cystein (Boc-Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(Boc) Lys(NBD) Met Gly Leu Pro-Cys(far)-OMe) 101

Zu einer Lösung von 50 mg vollgeschütztes Peptid **100** (25 μmol), 13 mg PyBOP (25 μmol) und 8.5 μl DIPEA (50 μmol) in 1 ml DMF wird nach 10 min 17 mg H-Cys(far)-OMe **93** (50 μmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird im Vakuum eingengt und das Rohprodukt über durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit CHCl₃/ Methanol (20:1 – 4:1) gereinigt.

Roter Feststoff

Ausbeute: 30.7 mg (0.014 mmol), 54%

$[\alpha]_D^{20} = -12.0$ (c= 0.1, CHCl₃)

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 44.95/54.95/0.1; 30 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 27.3 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.94 (dd, 6H, J=10.0, 6.4 Hz, δ-Leu); 1.22-1.36 (66H, 8 CH₃ Boc, 6 γ-CH₂ Lys); 1.51-1.62 (m, 10 H, 5 δ-CH₂ Lys); 1.61 (s, 6H, 2 CH₃-Far); 1.68 (s, 3H, O-CH₃); 1.72 (s, 3H, CH₃-Met); 1.76-1.82 (m, 16 H, 6 β-CH₂-Lys, β-Leu); 1.85-2.03 (m, 13H, γ-Pro, γ-Met, δ-CH₂ Lys, 4 CH₂-Far); 2.07-2.15 (m, 3H, CH₂ β-Pro, γ-Leu); 2.40-2.48 (m, 2H, δ-Pro); 2.55 (s, 2H, SCH₂), 2.74 (dd, 1H, J= 13.5, 6.8 Hz, β-Cys), 2.96 (dd, 1H, J= 13.5, 4.5 Hz, β-Cys), 2.97-3.09 (12 H, 6 ε-CH₂-Lys); 3.71 (s, 3H, O-CH₃); 3.75-3.90 (m, 2H, α-Gly); 4.20-4.24 (m, 1H, α-Pro); 4.32-4.36 (m, 1H, α-Met); 4.52-4.58 (m, 1H, α-Leu, α-Cys); 6.67-6.71 (m, 1H, arom. H); 7.89-7.98 (m, 1H, arom. H)

MS (ESI): ber.: 2269,30 [M+H]⁺ gef.: 2269,83

C₁₀₉H₁₈₃N₂₀O₂₇S₂ (2269,87)

Aloc-(N-Aloc)-L-Lysyl-(N-Aloc)-L-lysyl-(N-Aloc)-L-lysyl-(N-Aloc)-L-lysyl-(N-Aloc)-L-lysyl-(N-NBD)-L-lysyl-L-metyl-L-glycyl-L-leucyl-L-prolin (Aloc-Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(NBD) Met Gly Leu Pro-OH) 103

An dem nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 beladene 2-Chlortritylchlorid-PS-Harz (0.41 g, Beladung 0.6 mmol/g, 0.25 mmol) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens von Fmoc-Gruppen (AAV 4) und Ankupplung von Aminosäuren nach AAV 5 das Festphasen-gebundenen Peptid (Aloc-Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(Aloc) Lys(NBD) Met Gly Leu Pro-OH **99**) aufgebaut. Abspalten nach AAV 31 ergibt das vollgeschützte Peptid **103**.

Farbloses Öl

Ausbeute: 224 mg (0.126 mmol), 45%

HPLC (Säule: Nucleosil 120-5 C4, Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 0 min 44.95/54.95/0.1; 30 min 89.85/9.95/0.1): R_f = 16.3 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.95 (dd, 6H, J=10.3, 6.5 Hz, δ-Leu); 1.20-1.29 (m, 12H, 6 γ-CH₂ Lys); 1.48-1.60 (m, 10 H, 5 δ-CH₂ Lys); 1.68-1.79 (m, 16 H, 6 β-CH₂-Lys, β-Leu); 2.02 (s, 3H, CH₃-Met); 1.85-2.08 (m, 5H, γ-Pro, γ-Met, δ-CH₂ Lys); 2.05-2.14 (m, 3H, CH₂ β-Pro, γ-Leu); 2.40-2.53 (m, 2H, δ-Pro); 3.00-3.11 (12 H, 6 ε-CH₂-Lys); 3.66-3.88 (m, 2H, α-Gly); 4.22-4.25 (m, 1H, α-Pro); 4.30-4.36 (m, 1H, α-Met); 4.51-4.54 (m, 1H, α-Leu); 4.67-4.79 (m, 12H, 6 CH₂ Aloc); 5.16-5.27 (m, 12H, 6 =CH₂ Aloc); 5.87-5.98 (m, 6H, 6 CH Aloc); 6.65-6.70 (m, 1H, arom. H); 7.89-7.96 (m, 1H, arom. H)

MS (ESI): ber.: 1852,91 [M+H]⁺ gef.: 1852,77

C₈₄H₁₂₉N₁₉O₂₆S (1853,10)

6.4.3 Biologische Evaluierung des PTD-NLS-Konjugates **84**

Die folgenden *in vivo* Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit A. HENKEL durchgeführt.

Zuerst werden 20 Hela-Zellen in Kulturschalen angeimpft (Medium: MEM 41090 028; 10 % FCS; 1 % Phe/Streptomycin; Kultivierung bei 37 °C und 6,8 % CO₂). Zu den über Nacht gewachsenen Zellen werden zum Zeitpunkt $t = 0$ die entsprechenden Mengen der Peptidlösung zugesetzt (Endkonzentrationen 2 μ M, 5 μ M und 30 μ M). Nach den entsprechenden Zeitpunkten $t = 10$ min, 22 h wurden die Zellen gewaschen. Dazu wurde das Medium mit 1 ml BPS-Puffer (1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) gespült und anschließend die Zellen mit Trypsine EDTA von der Oberfläche des Gefäßes gelöst. Die abgelösten Zellen werden in der doppelten Menge Medium aufgenommen und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Medium verworfen und das Pellet mit 90-100 μ l BPS-Puffer resuspendiert. Danach werden die Zellen mit 1 ml 3.7 % Formaldehydlösung fixiert und bei 600 rpm 2 min zentrifugiert. Die Phase mit der Formaldehydlösung wird abgenommen und nochmals 1 ml BPS-Puffer zugegeben und wiederum die Zellen abzentrifugiert. Der Puffer wird so weit wie möglich entfernt. Die Zellen werden auf einem Objektträger fixiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

7 Literatur

- [1] V. Braun, V. Bosch, K. Hantke, K. Schaller, *Annu. NY Acad. Sci.* **1974**, 235, 66-82; P. Stoffyn, J. Folch-Pi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 44, 157-161; D. H. MacLennan, C. C. Yip, G. H. Iles, P. Seeman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1972**, 37, 469-477.
- [2] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1436, 245-261.
- [3] M. D. Resh, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1999**, 1451, 1-16.
- [4] S. Yalovsky, M. Rodríguez-Concepción, W. Gruissem, *Trends in Plant Science* **1999**, 4, 439-445.
- [5] C. R. Torres, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 3308-3317.
- [6] J. H. Hanover, *FASEB J.* **2001**, 15, 1865-1876.
- [7] N. E. Zachara, G. W. Hart, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1673, 13-28.
- [8] R. S. Haltiwanger, G. D. Holt, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 2563-2568; C. M. Starr, J. H. Hanover, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 6868-6873.
- [9] Y. Gao, L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9838-9845.
- [10] S. A. Whelan, G. W. Hart, *Circ. Res.* **2003**, 93, 1047-1058.
- [11] X. Cheng, R. N. Cole, J. Zaia, G. W. Hart, *Biochemistry* **2000**, 39, 11609-11620.
- [12] L. Medina, K. Grove, R. S. Haltiwanger, *Glycobiology* **1998**, 8, 383-391.
- [13] T. Y. Chou, G. W. Hart, C. V. Dang, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18961-18965.
- [14] W. G. Kelly, M. E. Dahmus, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 10416-10424.
- [15] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, C.-X. Gong, *PNAS* **2004**, 101, 10804-10809.
- [16] L. Wells, K. Vosseller, G. W. Hart, *Science* **2001**, 291, 2376-2378.
- [17] G. Blobel, R. W. Wozniak, *Nature* **2000**, 403, 835-836.
- [18] T. D. Allen, J. M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, M. W. Goldberg, *J. Cell Science* **2000**, 113, 1651-1659.
- [19] P. L. Paine, L. C. Moore, S. B. Horowitz, *Nature* **1975**, 254, 109-114.
- [20] D. Pante, M. Kann, *Mol. Biol. Cell* **2002**, 13, 425-434.

-
- [21] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, A. E. Smith, *Cell* **1984**, *39*, 499-509.
- [22] S. K. Vasu, D. J. Forbes, *Cur. Opin. Cell. Biol.* **2001**, *13*, 363-375; C. W. Pouton, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 51-64; C. Dingwall, R. Laskey, *Science* **1992**, *258*, 942-947.
- [23] D. A. Jans, S. Hübner, *Physiol. Rev.* **1996**, *76*, 651-685.
- [24] K. Chida, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4290-4294.
- [25] R. A. van Etten, P. Jackson, D. Baltimore, *Cell* **1989**, *58*, 669-678.
- [26] C. V. Dang, W. M. F. Lee, *Mol. Cell. Biol.* **1988**, *8*, 4048-4054.
- [27] J. Schreiber, M. Molinete, H. Boeuf, G. De Murcia, J. Menissier-De Murcia, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3263-3269.
- [28] J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey, C. Dingwall, *Cell* **1991**, *64*, 615-623.
- [29] B. Catimel, T. Teh, M. R. M. Fontes, I. G. Jennings, D. A. Jans, G. J. Howlett, E. C. Nice, B. Kobe, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34189-34198.
- [30] S. R. Wenthe, *Science* **2000**, *288*, 1375-1377.
- [31] Y.-Z. Lin, S. Y. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson, J. Hawiger, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14255-14258.
- [32] H.-P. Rihs, R. Peters, *EMBO J.* **1989**, *8*, 1479-1484.
- [33] M. Vandromme, C. Gauthier-Rouvière, N. Lamb, A. Fernandez, *TIBS* **1996**, *21*, 59-64.
- [34] H.-P. Rihs, D. A. Jans, H. Fan, R. Peters, *EMBO J.* **1991**, *10*, 633-639; D. A. Jans, M. J. Ackermann, J. R. Bischoff, D. H. Beach, R. Peters, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1203-1212.
- [35] J. K. Forwood, D. A. Jans, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9333-9340; M. H. C. Lam, L. J. Briggs, W. Hu, T. J. Martin, M. T. Gillespie, D. A. Jans, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7391-7398; C. X. Cai, T. F. Linsenmayer, *J. Cell Science* **2001**, *114*, 2327-2334; M. V. Nachury, U. W. Ryder, A. I. Lamond, K. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 582-587.
- [36] D. A. Jans, C.-Y. Xiao, M. H. C. Lam, *BioEssays* **2000**, *22*, 532-544.
- [37] T. Lefebvre, S. Ferreira, L. Dupont-Wallois, A. Bussiére, J.-C. Michalski, M.-L. Caillet-Boudin, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1619*, 167-176.
-

-
- [38] E. Duverger, V. Carpentier, A. C. Roche, M. Monsigny, *Exp. Cell Res.* **1993**, *207*, 197-201; E. Duverger, C. Pellerin-Mendes, R. Mayer, A. C. Roche, M. Monsigny, *J. Cell Science* **1995**, *108*, 1325-1332.
- [39] C. Rondanino, M.-T. Bousser, M. Monsigny, A.-C. Roche, *Glycobiology* **2003**, *13*, 509-519; E. Duverger, A. C. Roche, M. Monsigny, *Glycobiology* **1996**, *6*, 381-386; M. Monsigny, C. Rondanino, E. Duverger, I. Fajac, A.-C. Roche, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 94-103.
- [40] V. Escriou, M. Carriere, D. Scherman, P. Wils, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 295-306.
- [41] C. R. Dass, *J. Mol. Med.* **2004**, *82*, 579-591.
- [42] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*, 27-34.
- [43] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188–18193.
- [44] G. Elliott, P. O'Hare, *Cell* **1997**, *88*, 223-233.
- [45] A. G. Bukrinskaya, A. Ghorpade, N. K. Heinzinger, T. E. Smithgall, R. E. Lewis, M. Stevenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 367-371.
- [46] E. Vives, C. Granier, P. Prevot, B. Lebleu, *Lett. Pep. Science* **1997**, *4*, 429-436.
- [47] M. C. Schmidt, B. Rothen-Rutishauser, B. Rist, A. Beck-Sickinger, H. Wunderli-Allenspach, W. Rubas, W. Sadee, H. P. Merkle, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16582–16590.
- [48] M. Pooga, C. Kut, M. Kihlmark, M. Hallbrink, S. Fernaeus, R. Raid, T. Land, E. Hallberg, T. Bartfai, U. Langel, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2001**, *15*, 1451–1453.
- [49] K. Sheldon, D. Liu, J. Ferguson, J. Gariepy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2056-2060.
- [50] D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Peptide Res.* **2000**, *56*, 318-325.
- [51] J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1414*, 127-139.
- [52] P. S. Kabouridis, *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 498-503.
-

-
- [53] R. Trehin, H. P. Merkle, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58, 209-223.
- [54] K. Braun, P. Peschke, R. Pipkorn, S. Lampel, M. Wachsmuth, W. Waldeck, E. Friedrich, J. Debus, *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 237-243.
- [55] L. Zhang, T. R. Torgerson, X.-Y. Liu, S. Timmons, A. D. Colosia, J. Hawiger, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9184-9189.
- [56] M. C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 273; F. Simeoni, M. C. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 2717-2724.
- [57] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nature Biotech.* **2001**, 19, 1173-1176.
- [58] T. Tagawa, T. Kuroki, P. K. Vogt, K. Chida, *J. Cell Biol.* **1995**, 130, 255-263.
- [59] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 716-780.
- [60] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4193-4214.
- [61] R. C. Sears, J. R. Nevins, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 11617-11620.
- [62] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, 63, 133-139.
- [63] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, 34, 3813-3822.
- [64] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, 36, 13102-13109.
- [65] J. R. Silvius, *J. Membr. Biol.* **2002**, 190, 83-92.
- [66] D. J. Bartels, D. A. Mitchell, X. Dong, R. J. Deschenes, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 6775-6787; X. Dong, D. A. Mitchell, S. Lobo, L. Zhao, D. J. Bartels, R. J. Deschenes, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 6574-6583.
- [67] E. London, D. A. Brown, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, 14, 111-136.
- [68] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock, R. G. Parton, *Nature Cell Biology* **1999**, 1, 98-105; T. Magee, C. Marshall, *Cell* **1999**, 98, 9-12; I. A. Prior, A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nature Cell Biology* **2001**, 3, 368-375.
- [69] J. F. Hancock, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 373-385.
- [70] E. Fischer, *Chem. Ber.* **1906**, 39, 539-537.
-

-
- [71] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [72] F. Albericio, *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221; S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467; M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo, *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E 22a*, Thieme, Stuttgart, **2002**.
- [73] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, Oxford University Press, **2000**.
- [74] M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1133-1145; F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, *43*, 3-14; D. Kadereit, H. Waldmann, *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 571-584.
- [75] I. Heinemann, M. Völkert, H. Waldmann, in *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods, Vol. 283* (Ed.: C. M. Niemeyer), Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2004**, pp. 221-232.
- [76] S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2444-2445; P. Mayerfligge, J. Volz, U. Kruger, E. Sturm, W. Gernandt, K. P. Schafer, M. Przybylski, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 355-363; B. Denis, J. P. S. E. Trifilieff, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 372-377.
- [77] B. Ludolph, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3683-3691.
- [78] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *Chembiochem* **2002**, *3*, 901-+.
- [79] D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1184-1193.
- [80] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239-1252.
- [81] L. Maetínská, W. Neugebauer, J. Pérodin, M. Lefebvre, E. Escher, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3271-3279; Y. Trudelle, A. Caille, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1977**, *10*, 291-298.
- [82] S. Ferrari, W. Bannwarth, S. J. Morley, N. F. Totty, G. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7282-7286; K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydrate Res.* **1974**, *35*, 3-14.
- [83] A. J. Mort, A. D. T. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
-

-
- [84] T. Kappes-Roth, H. Waldmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **2000**, 2579-2581; J. Sander, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1564-1577; M. Meldal, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 710-718; J. W. Perich, in *Peptides and Protein Phosphorylation* (Ed.: B. E. Kemp), CRC Press, Boca Raton, FL (USA), **1990**, p. 289.
- [85] J. S. McMurray, D. R. Coleman, W. Wang, M. L. Campbell, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2001**, 60, 3-31.
- [86] O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2001**, 57, 2247-2277.
- [87] K. M. Halkes, C. H. Gotfredsen, M. Grøtli, L. P. Miranda, J. Ø. Duus, M. Meldal, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3584-3591; J. Offer, M. Quibell, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 175.
- [88] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2839-2876; C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, 54, 11317-11362.
- [89] G. T. Hermanson, in *Bioconjugates Techniques*, Academic Press, London, **1996**, p. Chapters 2.2 and 5.
- [90] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, 403, 223-226.
- [91] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1023-1035.
- [92] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30; J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893; I. Fisch, G. Kunzi, K. Rose, R. E. Offord, *Bioconj. Chem.* **1992**, 3, 147-153; C.-F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6584.
- [93] T. Wieland, H. U. Lang, D. Liebsch, *Liebigs Ann. Chem.* **1956**, 597, 227-234; P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [94] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705-6710; K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16205-16209.
- [95] T. C. Evans Jr., M.-Q. Xu, *Biopolymers* **1999**, 51, 333-342.
- [96] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5648-5649.
- [97] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5421-5428.
- [98] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4900-4908.
-

-
- [99] R. Reents, Dissertation, Universität Dortmund **2002**.
- [100] M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12749-12758; J. Kuhlmann, A. Tebbe, M. Volkert, M. Wagner, K. Uwai, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2546-2550.
- [101] H. Hofemeister, K. Weber, R. Stick, *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 3233-3246.
- [102] D. Huster, A. Vogel, C. Katzka, H. A. Scheidt, H. Binder, S. Dante, T. Gutberlet, O. Zschornig, H. Waldmann, K. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4070-4079.
- [103] C. A. Hrycyna, S. K. Sapperstein, S. Clarke, S. Michaelis, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1699-1709; C. A. Hrycyna, S. Clarke, *Mol. Biol. Cell* **1990**, *10*, 5071-5076.
- [104] R. Reents, M. Wagner, S. Schlummer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6*, 86-94; M. Wagner, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum **2003**.
- [105] A. Treibs, F. H. Kreuzer, *Ann. Chem. J. Liebig* **1968**, *718*; R. P. Haughland, M. S. Kang, *83*, 458, [4,774,339], pp. 1-18, **1987**. US Patent.
- [106] I. D. Johnson, H. C. Kang, R. P. Haughland, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 228-237.
- [107] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregar, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 194-199.
- [108] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954-5955; B. Ludolph, Dissertation, Universität Dortmund **2004**.
- [109] G. Kragol, M. Lumbierres, J. M. Palomo, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5839-5842.
- [110] S. Janosch, C. Nicolini, B. Ludolph, C. Peters, M. Völkert, T. L. Hazlet, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7496-7503; S. Janosch, Dissertation, Universität Dortmund **2004**.
- [111] C. Nicolini, R. Winter, unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Dortmund
- [112] R. F. M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406-2416.
- [113] N. Kuder, Dissertation, Universität Dortmund **2001**.
- [114] T. Pohl, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6702-6710; N. Kuder, T. Zelinski, T. Pathak, O. Seitz, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2433-
-

-
- 2439; S. Flohr, V. Jungmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 669-681; O. Seitz, *Chem. Bio. Chem.* **2000**, *1*, 214-246.
- [115] T. Wakamiya, T. Nishida, R. Togashi, K. Saruta, J.-I. Yasuoka, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 465-468; T. Vorherr, W. Bannwarth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2661-2664; Z. Kupihár, G. Váradi, É. Monostri, G. K. Tóth, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4457-4461.
- [116] O. Seitz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776.
- [117] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829-7832.
- [118] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [119] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- [120] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236; K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* **1993**, *93*; Mootoo, D. R., P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584; H. Waldmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 675-682; G. Arsequell, L. Krippner, R. A. Dwek, S. Y. C. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2383-2384.
- [121] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydrate Res.* **1996**, *296*, 135-147.
- [122] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydrate Res.* **1996**, *280*, 251-260.
- [123] P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconjugate J.* **1987**, *4*, 97-108.
- [124] M. Ravenscroft, R. M. G. Roberts, J. G. Tillett, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1982**, 1569-1572.
- [125] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [126] T. Krämer, Dissertation, Universität Dortmund **2002**.
- [127] H. M. S. Kumar, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Dortmund).
- [128] R. D. Kaiser, E. London, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2610; R. D. Kaiser, E. London, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8180-8190.
- [129] D. J. Owen, K. Alexandrow, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 570-573.
- [130] R. L. Atkins, D. E. Bliss, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1975-1980.
-

-
- [131] X. P. Li, K. Abdi, S. J. Mentzer, *J. Immunol. Methods* **1994**, *172*, 141-145.
- [132] A. K. Lala, R. R. Dixit, V. Koppaka, S. Patel, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8981-8989.
- [133] L. Taboada, E. Nicolás, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1891-1893.
- [134] T. Apelqvist, D. Wensbo, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1471-1472; J. G. Siro, J. Martín, J. L. García-Navío, M. J. Remuinan, J. J. Vaquero, *Synlett* **1998**, 147-148.
- [135] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 975-989; L. Moroder, in *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E 22a*, Thieme, Stuttgart, **2002**, pp. 17-39.
- [136] A. Henkel, Dissertation, Philipps-Universität Marburg **2003**.
- [137] D. Bonnet, K. Thiam, E. Loing, O. Melnyk, H. Gras-Masse, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 468-471.
- [138] D. Murray, L. Hermida-Matsumoto, C. A. Buser, J. Tsang, C. T. Sigal, N. Bentall, B. Honig, M. D. Resh, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2145-2159.
- [139] K. B. Jensen, T. M. Braxmeier, M. Demarcus, J. G. Frey, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1300-1309.
- [140] *Emission des Fluorophors interferiert mit der Meßwellenlänge des Polarimeters.*
- [141] M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1931**, *64*, 975-980; A. Medgyes, E. Farkas, A. Lipták, V. Pozsgay, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4159-4178; D. J. Silva, H. Wang, N. M. Allanson, R. K. Jain, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5926-5929.
- [142] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [143] H. Kunz, J. Zimmer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2907-2910.
- [144] S. A. Mitchell, M. R. Pratt, V. J. Hruby, R. Polt, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2327-2342.
- [145] L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5643-5656.

8 Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D^{20}$	Spezifischer Drehwert bei 20°C
AA	Aminosäure
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs	absolut
Ac	Acetyl
Aca	6-Aminocaproyl-
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
APT I	Acyl-Protein-Thioesterase I
arom	aromatisch
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bodipy FL	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a- diaza-s-indacen-3-propionsäure
Bu	Butyl
Bzl	Benzyl
cdk	Cyclin-abhängige Kinase
Chol	Cholesterol
cJun	zelluläres Jun
CKII	Casein Kinase II
CITrt	2-Chlorotrityl
Da	Dalton
Dansyl	5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMB	Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTST	Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EDT	Ethandithiol
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EI-MS	<i>electron impact</i> -Massenspektrometrie
EPL	<i>expressed protein ligation</i>
eq	Äquivalent
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER β	Östrogen-Rezeptor β
Et	Ethyl
FAB-MS	<i>fast atom bombardment</i> -Massenspektrometrie

Far	Farnesyl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo	Fluorenyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTase	Farnesyltransferase
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanidinin nucleotide exchange factor</i>
gef.	gefunden
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GPCR	G-Proteingekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	GTP-bindenden Proteinen
H Tos	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
HAc	Essigsäure
HATU	<i>N</i> -[(dimethylamino)- <i>1H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>N</i> -[(<i>1H</i> -benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
hCT	humanen Calcitonin
Hd	Hexadecyl
HFIP	Hexafluoro- <i>iso</i> -propanol
HIV-1 gag MA	Membran assoziierte Domäne des Humanen Immundefizienz-Virus
HIV-1 Tat	Transaktivierungsfaktor des Humanen Immundefizienz-Virus
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HR MS	Hochauflösende Massenspektroskopie
Hz	Hertz
IPL	Intein-vermittelte Protein Ligation
K _D	Dissoziationskonstante
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i> -Massenspektrometrie
Mant	<i>N</i> -Methylanthranyl
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MDCK	<i>Canis familiaris</i> (Hund) Madin-Darby Canine Kidney Epithel Zellen
Me	Methyl
MeTrt	4-Methyltrityl
MIC	Maleinimidocaproyl
Myr	Myristoyl
NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCL	native chemical ligation
nd	nicht bestimmt

NE	<i>nuclear envelope</i>
NIH 3T3 Zellen	<i>Mus musculus</i> (Maus) Embryo Fibroblast Zellen
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektrometrie
NPC	Kernporenkomplex
N-Rh-DPPE	Lissaminrhodamine B 1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
OGT	O-GlcNAc-Transferase
OTf	Triflat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitoyl
PalCoA	Palmitoyl-Coenzym A
PalTase	Palmitoyltransferase
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
pcCMT	proteocytosolische Carboxymethyltransferase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PNA	Peptidnukleinsäure
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
prNLS	durch Phosphorylierung regulierte Kernlokalisierungssequenz
PS	Polystyrol
PTD	Proteintransduktionsdomänen
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tri(pyrrolidino) phosphonium-hexafluorophosphat
quart	quartär
Ras	Adenosarkom aus Ratten
R _f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
RNA Pol II	RNA Polymerase II
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SG	Schutzgruppe
SM	Sphingomyelin, (2S, 3R, 4E)-2-acylaminooctadec-4-ene-3-hydroxy-1-Phosphocholin
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
SV40 Tag	Simian Virus 40 large T Antigen
tBu	<i>tert</i> -Butyl
Teoc	Trichlorethoxycarbonyl
tert	tertiär
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol

THF	Tetrahydrofuran
TIS	Tri- <i>iso</i> -propylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TRD	Texas Red Dextran
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
v	Volumen
verd.	verdeckt
vJun	virales Jun

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.

Danke

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung sowie die stete Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Laborkolleginnen und -kollegen Jantje Mareike Gerdes, Ines Heinemann, Patrick Deck, Elke Simon, Svenja Röttger, Torben Leßmann und Karoline Obstoy danke ich ebenso wie meinen Bürokolleginnen Eleni Gourzoulidou und Catherine Katzka für die hervorragende Stimmung und die vielen Diskussionen, es hat großen Spaß gemacht. Elke Simon möchte ich für die tatkräftige praktische Unterstützung während der gesamten Zeit in Labor A3.14 danken. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die vielen Tipps und Ideen und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen.

Die Kooperationen mit der Abteilung von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer gelangen vor allem aufgrund der hervorragenden Zusammenarbeit mit Robin Vetter, Andreas Henkel und Dr. Jürgen Kuhlmann. Christine Nowak danke ich für ihre Hilfe bei der MIC-Kupplung der Ras-Proteine. Für die sehr gute Zusammenarbeit danke ich Chiara Nicolini und Prof. Dr. Roland Winter.

Großer Dank gebührt auch Torben Leßmann, Maja Köhn, Christine Leimkühler, Maria Liumbierres und Dirk Pendzialek für die zügige und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen der Universität Dortmund und des Max-Planck-Instituts danke ich herzlich für die Durchführung der Analysen und die Messung der Spektren. Sandra Eichhorn, Christiane Vornweg und Dr. Petra Janning danke ich für die Aufnahme von Massenspektren.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, durch deren Unterstützung mein Studium erst ermöglicht wurde, und meinen Schwestern und Freunden, die mich während meines Studiums und in den folgenden Jahren begleitet haben.

Lebenslauf

Stefanie Schlummer

Geburtstag und -ort: 8. November 1974 in Lippstadt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule

08/1981 – 06/1985 | Mariengrundschule Werl-Büderich

08/1985 – 06/1994 | Ursulinengymnasium Werl

06/1994 | Abitur

Studium

10/1994 – 06/2000 | Chemie Studium an der Universität Paderborn

09/1996 | Praktikum im Referat Immissionsschutz und Behördenkontakte, Schering AG, Werk Bergkamen

04/1997 | Vordiplom Chemie

08/1997 – 05/1998 | Auslandsstudium an der University of Waterloo, Kanada

01/1998 – 05/1998 | Forschungsarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Gilles Lajoie an der University of Waterloo, zum Thema:
"Structure activity studies of Aureobasidins"

10/1999 – 06/2000 | Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Karsten Krohn an der Universität Paderborn, zum Thema:
„Untersuchungen zur biomimetischen Synthese von 1,8-Naphthalindiol-Spiroacetalen“

06/2000 | Diplom

07/2000 – 09/2000 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter and der Universität Paderborn, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Karsten Krohn

Promotion

10/2000 – 12/2004 | Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, zum Thema:
„Synthese und biologische Evaluierung von Lipo-, Glyco- und Phosphopeptiden“

04/2005 | Promotion

Dortmund, im April 2005
