

**Bioorganische Synthese und biologische
Evaluierung von monolipidierten,
polybasischen Ras-Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

Angefertigt am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund, sowie
am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

Eingereicht von Dipl.-Chem. Daniel Gottlieb
aus Konstanz

Dekan: Prof. Dr. N. Krause
1. Gutacher: Prof. Dr. H. Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. R. S. Goody
Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 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 August 2001 bis August 2005 angefertigt.

Für meinen Großvater Bartholomäus Schranner

** 8. April 1910 † 1. September 2005*

1 EINLEITUNG	1
2 ALLGEMEINER TEIL	4
2.1 DIE RAS-PROTEIN-SUPERFAMILIE	4
2.1.1 <i>Ras-Proteine als molekulare Schalter in der Signaltransduktion</i>	5
2.1.2 <i>Posttranslationale Modifikationen von Ras-Proteinen</i>	9
2.2 CHEMISCHE PEPTID- UND PROTEINSYNTHESE	15
2.2.1 <i>Prinzip der Festphasensynthese</i>	16
2.2.2 <i>Synthese lipidierter Peptide</i>	19
2.3 BIOORGANISCHE PROTEINSYNTHESE	21
3 ZIEL DER ARBEIT	27
4 SPEZIELLER TEIL	30
4.1 SYNTHESESTRATEGIE	30
4.2 SYNTHESE DER BENÖTIGTEN AMINOSÄURE-DERIVATE UND DES PALLADIUM-KATALYSATORS	32
4.2.1 <i>Synthese der Lysinderivate</i>	32
4.2.2 <i>Synthese der Argininderivate</i>	33
4.2.3 <i>Synthese der Cysteinderivate</i>	35
4.2.4 <i>Synthese des Palladium-Katalysators Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)</i>	40
4.3 FESTPHASENSYNTHESE LIPIDIERTER, POLYBASISCHER PEPTIDE	41
4.3.1 <i>Festphasensynthese von D-Ral-Peptiden</i>	42
4.3.2 <i>Festphasensynthese von K-Ras 4B-Peptiden</i>	47
4.4 LIGATIONEN MIT H-RAS	50
4.4.1 <i>Ligationen der K-Ras 4B-Peptide mit verkürztem H-Ras</i>	53
4.4.2 <i>Ligationen der D-Ral-Peptide mit verkürztem H-Ras</i>	58
4.5 EINSATZ DER CHIMÄREN H-RAS/K-RAS-PROTEINE IN BIOPHYSIKALISCHEN UND ZELLBIOLOGISCHEN ASSAYS	63
4.5.1 <i>Nachweis der Funktionalität der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine durch fluoreszenzbasierte Assays</i>	63
4.5.2 <i>Experimente zur Membranbindung der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine</i>	64
4.5.3 <i>Zellbiologische Experimente mit fluoreszenzmarkierten H-Ras/K-Ras-Proteinen</i>	68

4.6 ERWEITERUNG DER SYNTHESSTRATEGIE	70
<i>4.6.1 Die Verwendung von Bodipy FL als Fluoreszenzmarker</i>	70
<i>4.6.2 Synthese des C-Terminus der monomeren GTPase RhoA</i>	75
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	80
6 EXPERIMENTELLER TEIL	86
6.1 MESSGERÄTE UND HILFSMITTEL	86
6.2 VERSUCHE ZU KAPITEL 4.2	89
<i>6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1</i>	89
<i>6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2</i>	92
<i>6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3</i>	96
<i>6.2.4 Versuche zu Kapitel 4.2.4</i>	108
6.3 VERSUCHE ZU KAPITEL 4.3	108
<i>6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1</i>	110
<i>6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2</i>	112
6.4 VERSUCHE ZU KAPITEL 4.4	114
<i>6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.4.1</i>	115
<i>6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2</i>	116
6.5 VERSUCHE ZU KAPITEL 4.6	117
<i>6.5.1 Versuche zu Kapitel 4.6.1</i>	117
<i>6.5.2 Versuche zu Kapitel 4.6.2</i>	119
7 LITERATURVERZEICHNIS	122
8 ANHANG	130
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130

1 Einleitung

“[...] Our discovery was done using the methods of physics and chemistry to understand biology. [...]“

aus der Bankett-Rede von James D. Watson zum Anlass der Verleihung des Nobelpreis für Medizin 1962 für die Aufklärung der Struktur und Bedeutung der DNA.

Diese Aussage verdeutlicht eine Entwicklung, die Anfang des 20. Jahrhunderts begonnen hat und sich insbesondere in den letzten Jahrzehnten in verstärkter interdisziplinärer Forschung niederschlägt. Die Grenzen zwischen verschiedenen Fachgebieten der Naturwissenschaften verschwimmen, unterschiedliche Disziplinen gehen ineinander über. Die Chemie, als Lehre von der Form und Funktion, der Umwandlung und Verknüpfung von Molekülen und ihren Wechselwirkungen muss hierbei als ein zentrales Prinzip der Naturwissenschaften verstanden werden.

Wissenschaftliche Durchbrüche, wie beispielsweise die Entwicklung bildgebender Verfahren in der Medizin (Röntgenkontrastmittel, Computer- und Kernspintomographie) oder die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, werden im Allgemeinen anderen Fachrichtungen zugeschrieben. Dass Chemiker wichtige Beiträge hierbei geleistet haben, gerät leicht in Vergessenheit. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das Hauptaugenmerk der Öffentlichkeit auf die medizinisch-biologischen Schlussfolgerungen und deren mögliche Anwendungen in Therapie und Medikamenten-Entwicklung gerichtet ist. Aber sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Wirkstoffentwicklung bilden chemisch synthetisierte Moleküle einen wichtigen Teil der maßgeblichen „Werkzeuge“ zur Untersuchung biologisch und medizinisch relevanter Fragestellungen. Dies hat dazu geführt, dass zelluläre Prozesse mittlerweile auf molekularer Ebene untersucht werden, was ein besseres Verständnis für die Wechselwirkungen und das Zusammenspiel regulativer Mechanismen in Zellen nach sich gezogen hat.^[1-5]

Die Auswirkungen dieser neuen Erkenntnisse werden durch die jüngsten Fortschritte im Bereich der Wirkstoffentwicklung deutlich, von denen man sich einen weitreichenden Einfluß auf die Lösung medizinischer Problemstellungen erhofft. Beispielsweise ist das Problem der Antibiotika-Resistenz bei weitem nicht auf Entwicklungsländer beschränkt, sondern stellt mehr denn je ein weltweites Problem dar. Entgegen allen Erwartungen, Infektionskrankheiten mit Hilfe von Antibiotika

unter Kontrolle zu haben, stellen sie nach wie vor eine Bedrohung für die Gesundheit und das Leben der Menschen dar. Gerade in Industrienationen nehmen bakterielle Infektionserkrankungen wieder zu, weil viele Erreger Resistenzen gegen Antibiotika entwickelt haben. Tuberkulose ist ein Beispiel für eine Infektionskrankheit die weltweit wieder auf dem Vormarsch ist. Derzeit ist ca. ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger *Mycobacterium tuberculosis* infiziert, pro Jahr sterben ca. 2 Millionen Menschen an der Erkrankung. Zum ersten Mal seit 40 Jahren wurde ein Antibiotikum (R207910, Johnson & Johnson Pharmaceuticals) zur Bekämpfung von Tuberkulose und anderen Mycobakterien entwickelt, dessen Eigenschaften so vielversprechend erscheinen, dass klinische Studien seit Ende des Jahres 2004 durchgeführt werden.^[6, 7]

Ähnlich problematisch ist die Bekämpfung von Malaria, der häufigsten Tropenkrankheit, an der nach Schätzungen der WHO weltweit mehr als 300 Millionen Menschen jährlich erkranken. In der Malariaforschung gelang die Synthese neuer Wirkstoffe, die das traditionell verwendete Artemisinin sowohl an Wirksamkeit, als auch in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit der Herstellung, in den Schatten stellen. Seit Ende des Jahres 2004 werden auch mit diesen Wirkstoff-Kandidaten klinische Studien durchgeführt.^[6, 7]

In der Krebsforschung wurde die erste Totalsynthese des Naturstoffes (+)-Discodermolid in industriellem Maßstab realisiert, wodurch es nun möglich wurde, diesen Naturstoff auf seine Verwendbarkeit als Therapeutikum zu testen.^[6, 7]

Insbesondere die Krebsforschung hat vom Zusammenspiel biologischer, chemischer und physikalischer Methoden profitiert. Mittlerweile ist ein Netzwerk von Kontrollmechanismen der Zelle bekannt, welches dazu dient unregelmässiges Wachstum von Zellen zu verhindern. Die unterschiedlichen Kontrollpunkte liegen in diversen Stoffwechselwegen und werden durch eine Vielzahl verschiedener Signale aktiviert. Dadurch werden Reparaturmechanismen in der Zelle in Gang gesetzt oder die Apoptose – der sogenannte programmierte Zelltod – wird eingeleitet. Anfang der neunziger Jahre konnte das Protein p53 als Tumorsuppressor identifiziert werden, dessen Gen in ca. 50% aller menschlichen Tumore mutiert ist. Durch Mutation bedingte Deaktivierung dieses zelleigenen Kontrollmechanismus führt zu unkontrolliertem Zellwachstum und zur Entstehung von Krebs. Bereits ein Jahrzehnt zuvor wurden die Ras-Onkogene entdeckt. Ihre Genprodukte, die Ras-Proteine, stellen molekulare Schaltstellen zellulärer Signalkaskaden dar, durch die

Proliferation, Differenzierung oder Apoptose kontrolliert werden. Mutationen in den Ras-Genen können ebenfalls zur Entstehung von Krebs führen, in ca. 30% aller menschlichen Tumore ist dies der Fall.^[8, 9]

Die gezielte Manipulation von Stoffwechselwegen in Krebszellen – wie auch in gesunden Zellen – wird verwendet, um die Mechanismen der beteiligten Signalkaskaden aufzuklären. Neben Molekülen geringen Molekulargewichts (Molekulargewicht < 500 Dalton) werden vor allem semisynthetische Proteine hierbei eingesetzt. Letztere können durch die Kombination chemischer und biologischer Methoden hergestellt werden, chemisch eingefügte Reportermoleküle dienen dem Einsatz in biologischen und biophysikalischen Assays. Es ist zu erwarten, dass semisynthetische Analoga zur weiteren Aufklärung der Mechanismen der Tumorgenese beitragen. Erkenntnisse hierzu können neue Ansatzpunkte für Weiterentwicklungen in der Krebstherapie darstellen. Intention der vorliegenden Arbeit war die Herstellung solcher semisynthetischer Analoga der Ras-Proteine und deren Einsatz in diversen Assays.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Die Ras-Protein-Superfamilie

Manche Retroviren tragen in ihrem Genom anstelle von viralen Genen zelluläre Onkogene. In infizierten Zellen werden die betreffenden Onkogene nicht mehr zell- und entwicklungsspezifisch kontrolliert, sondern aufgrund des Virusbefalls überexprimiert und tragen so zur Tumorgenese bei. In zwei Stämmen transformierender Retroviren, dem Harvey- und Kirsten Stamm des Ratten-Adeno-Sarkoma-Virus, wurden Ende der 70er Jahre die Gene entdeckt, welche für die Transformation verantwortlich waren und als H- bzw. K-Ras benannt.^[10, 11]

Als 1982 homologe Gene auch in menschlichem Tumorgewebe entdeckt werden konnten, stieg das Interesse an diesen Onkogenen enorm. Mittlerweile sind drei Isoformen der Ras-Gene bekannt, H-Ras, K-Ras und N-Ras, von denen Mutationen in N- und K-Ras am häufigsten in Tumorgeweben nachzuweisen sind. Wurde Ende der 90er Jahre noch angenommen, dass in 10% aller menschlichen Tumore Mutationen in den Ras-Genen mitverantwortlich für das Entstehen von Krebs sind, so wird heute davon ausgegangen, dass dies für mindestens 30% aller Krebsarten der Fall ist. Auffällig ist eine gewebespezifische Ungleichverteilung der Mutationen: während bei Bauchspeicheldrüsenkrebs in 90% der Fälle Mutationen in einem der Ras-Gene festgestellt werden können, trifft dies nur für 5% der Brustkrebsfälle zu.^[9, 12-17]

Die Genprodukte der oben angesprochenen Gene werden als monomere G-Proteine bezeichnet, in Anlehnung an die heterotrimeren G-Proteine, die wie die Ras-Proteine in der Signalweiterleitung in Zellen involviert sind. Alle Ras-Proteine liegen entweder in der aktiven GTP-gebundenen Form oder in der inaktiven GDP-gebundenen Form vor. Der Übergang zwischen den beiden Formen, also das „Anschalten“ oder „Ausschalten“ der GTPasen wird durch äußere Signale ausgelöst, die durch Rezeptoren ins Innere der Zelle übertragen werden und z.B. einen Konzentrationsanstieg von Botenstoffen bewirken.^[18, 19]

Die Superfamilie der Ras-Proteine, von denen mittlerweile über 100 Mitglieder in Eukaryonten identifiziert werden konnten, kann in fünf Unterfamilien aufgeteilt werden: die Ras-, die Rho/Rac/Cdc42-, die Rab-, die Sar1/Arf-Unterfamilie und die

Ran-Unterfamilie. Sie regulieren zelluläre Vorgänge wie Genexpression, Morphologie des Actin-Cytoskeletts, Vesikeltransport, Organisation der Microtubuli oder Kern-Cytoplasma-Transport und können so Zellwachstum, -differenzierung oder auch Apoptose induzieren.^[20]

2.1.1 Ras-Proteine als molekulare Schalter in der Signaltransduktion

Ras-Proteine wirken in verschiedenen Signaltransduktionsketten als molekulare Schalter und leiten Signale an ihre Effektoren weiter. Die Aktivierung der Signalkaskaden, also das „Anschalten“, wird durch die Aktivierung der Ras-Proteine durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) vermittelt (Abbildung 1). Sie bewirken eine Dissoziation von gebundenem GDP und die Bindung von GTP in einer *loop*-Region, wobei die damit verbundene Konformationsänderung des Ras-Proteins die Interaktion mit Effektor-Molekülen ermöglicht.

Das „Abschalten“ der Signalweiterleitung – die Hydrolyse von gebundenem GTP – erfolgt ebenfalls nicht spontan. Die intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-Proteine ist äußerst gering, *in vitro* ist der Komplex aus Ras-Protein und GTP mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten relativ stabil. *In vivo* erfolgt die Hydrolyse quasi spontan, da Wechselwirkungen mit sogenannten GAPs (*GTPase activating protein*) die Reaktion um einen Faktor von 10^5 beschleunigen. Erklären lässt sich dies durch eine Stabilisierung des Übergangszustands der Reaktion, die durch die Wechselwirkung mit einer ca. 330 Aminosäure großen Domäne, die für alle GAPs stark konserviert ist, ermöglicht wird.^[21-26]

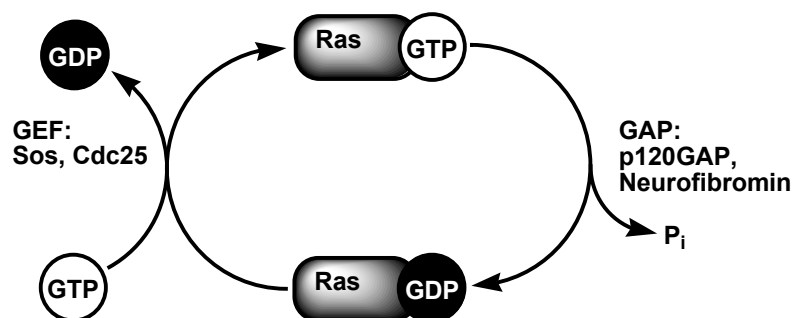


Abbildung 1. Ras-Proteine als molekulare Schaltstellen.

Mittlerweile ist bekannt, dass Ras-Proteine in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert sind, wo sie als Vermittler von extrazellulären Signalen zu den entsprechenden Zielmolekülen in der Zelle fungieren. Zu den Adressaten am Ende der Signalkaskaden, zählen unter anderem zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, SRF, JUN, ATF2 oder NF κ B, welche die Genexpression regulieren und damit den Zellzyklus beeinflussen. Die Liste der Gene, deren Expression durch Ras-Proteine stimuliert oder auch inhibiert wird, umfasst nach derzeitigen Kenntnisstand mehrere hundert Gene.^[27-30] Ausgelöst werden die Signalkaskaden durch die Aktivierung von membrandurchspannenden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (*epidermal growth factor* Rezeptor EGFR, *platelet derived growth factor* Rezeptor PDGFR, *nerve growth factor* Rezeptor NGFR, *colony stimulating factor 1* CSF1 und Insulin Rezeptor).^[15]

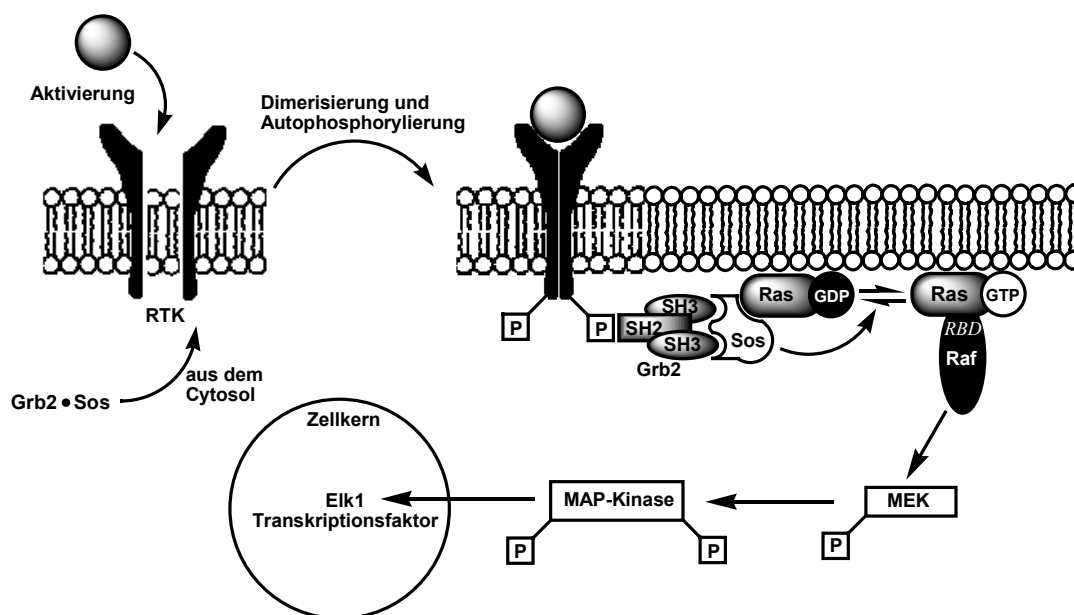


Abbildung 2. Die Ras/Raf/MEK/ERK2-Signalkaskade.

Durch Andocken des Botenstoffs an den extrazellulären Teil des Rezeptors wird eine Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinseitenketten bewirkt, wodurch ein Proteinkomplex aus dem Cytosol an den Rezeptor binden kann. Der Komplex besteht aus den Proteinen Grb2 (*growth factor receptor bound 2*) und Sos (*Son of sevenless*, benannt nach einer Mutation in *D. melanogaster*). Grb2 besteht aus einer SH2-Domäne (Src Homologie

Domäne 2), was es zur Bindung an Phosphotyrosin befähigt, und zwei SH3-Domänen (Src Homologie Domäne 3), die mit prolinreichen *loop*-Motiven im Sos-C-Terminus wechselwirken. Sos ist ein GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für Ras und bewirkt einen Übergang von der inaktiven GDP-gebundenen Form in die aktive GTP-gebundene Form. Im Gegensatz zur Dissoziation von GDP, welche durch die Bindung von Sos ausgelöst wird, wird GTP spontan angelagert. Die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Dissoziation des GEF.^[27, 31-33]

Grb2 besitzt keine katalytische Aktivität, sondern fungiert ausschließlich als „Adaptor-Protein“, das Sos vom Cytosol an die Plasmamembran relokalisiert und dadurch das Signal des EGFR an das Ras-Protein weitervermittelt.^[34-37]

Aus dem aktivierten Zustand heraus kann Ras eine Reihe von Signalkaskaden induzieren, z.B. wird ein anderes Mitglied der Ras-Superfamilie, Raf, an die Plasmamembran dirigiert. Zu einer stabilen Komplexbildung beider Proteine werden die Wechselwirkungen zweier Domänen von Raf (*Ras-binding-domain* RBD und *Cystein-rich-domain* CRD) mit Ras benötigt. Die Aktivierung ist ein mehrstufiger Prozess, die Lokalisierung an der Plasmamembran jedoch der Auslöser. Im weiteren Verlauf wird Raf phosphoryliert und bewirkt seinerseits die Phosphorylierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Kinase MEK, welche wiederum die MAP-Kinase ERK2 (*extracellular-signal-regulated kinase 2*) phosphoryliert, welche daraufhin in den Nukleus eindringt und dort Elk-1 und andere Transkriptionsfaktoren aktiviert und so Zellwachstum bewirken kann (Abbildung 2).^[18, 38-41]

Ein weiterer Effektor von Ras ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Dieses Enzym wird durch die Phospholipase C aktiviert und führt zu einer Akkumulation des Botenstoffs (*second messenger*) Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) in der Zelle. Durch die Aktivierung von Akt/PKB (die dualspezifische Protein-Kinase B) werden Stoffwechselfvorgänge wie Glukosemetabolismus, Proliferation, Apoptose, Transkription oder Zellmigration reguliert.^[42, 43]

Bei der Transformation von Zellen durch onkogenes Ras scheinen beide Signalwege synergistisch zu wirken. Um so erstaunlicher ist, dass die beiden erwähnten Signalkaskaden, die beide direkt durch aktives Ras induziert werden, entgegengesetzte Auswirkungen an ein und dem selben Zielmolekül haben können: während Ras-Aktivierung der PI3K/Akt/PKB-Kaskade die Unterdrückung von c-Myc-induzierter Apoptose bewirkt, hat die Ras-Aktivierung des Raf/MEK/ERK2-Weges den gegenteiligen Effekt.^[44, 45]

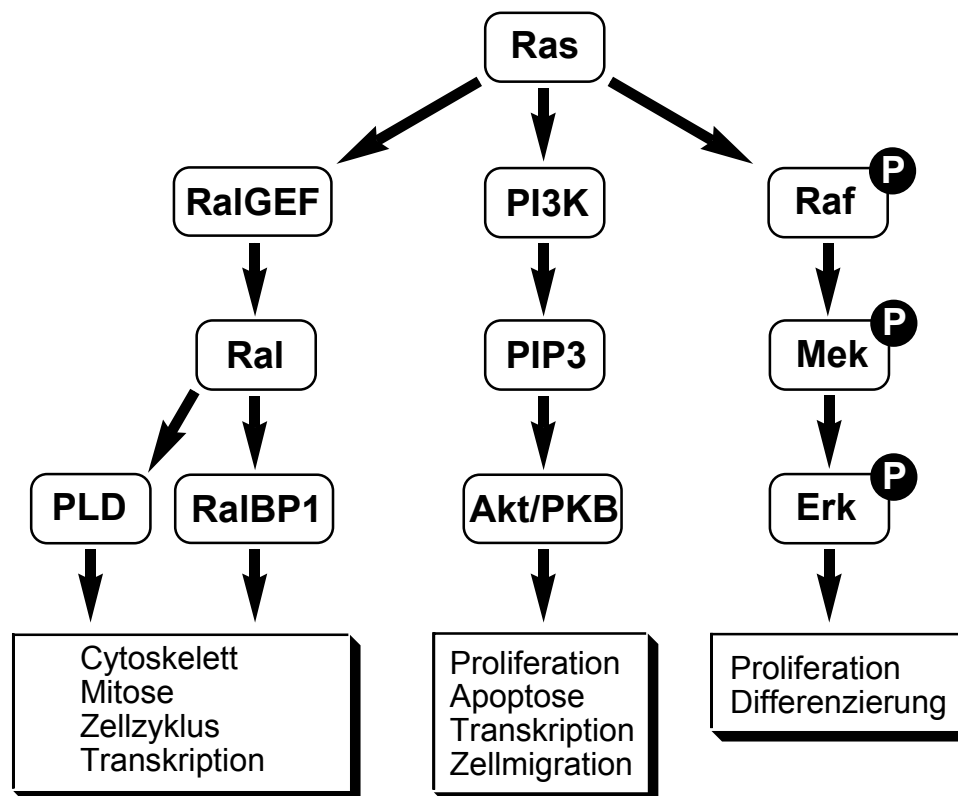


Abbildung 3. Netzwerk Ras-induzierter Signalkaskaden.

Eine andere Gruppe von Ras-Effektoren hat in den letzten Jahren verstärkt das Interesse der Wissenschaft erregt: es sind die GEFs der Ral-Proteine (*ras like proteins*) RalA und RalB, die auch als nächste Verwandte der Ras-Proteine betrachtet werden können, da sie 85% Homologie aufweisen.^[46]

Die Signalkaskade Ras/RaIGEF/Ral scheint mehrere Endpunkte aufzuweisen, also in vielfältigen Stoffwechselfvorgängen der Zelle regulatorisch zu wirken. Der Ral-Effektor RaIBP1 (*ral binding protein 1* auch als RLIP bezeichnet) wirkt als spezifisches GAP für Cdc42, ein Protein der Rho-Unterfamilie, und greift in die Organisation des Actin-Cytoskeletts und bei der Ausbildung von Filopodien in Nervenzellen ein. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass es mit dem Protein *Cytocentrin* identisch ist, welches die Ausbildung der Mitosespindel bei der Kernteilung reguliert.^[27, 47-50]

Aktiviertes Ral löst selber keine onkogenen Transformationen aus, verstärkt aber die Zelltransformation durch Ras und Raf indem es in Kooperation mit der GTPase Arf6 (*ADP ribosylation factor 6*) Phospholipase D stimuliert, wodurch die zelluläre Konzentration an *second messengern* ansteigt und der Zellzyklus beschleunigt wird.

Eine ähnliche Wirkung hat die Aktivierung von NF κ B und erhöhte Expression von Cyclin D1 durch RalA.^[51-54]

Während die Ras-Proteine fast ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert sind, bindet Ral hauptsächlich an sekretorische Vesikel im Cytoplasma und in weitaus geringerem Maße an die Plasmamembran. Durch diese Erkenntnis wurde schon früh auf eine Beteiligung am vesikulären Transport, dem Transfer von Stoffwechselprodukten zwischen Zellorganellen, geschlossen. An diesem Prozess sind mehrere Multiprotein-Komplexe beteiligt, die die Ansteuerung der korrekten Zielmembran oder die Initialisierung der Membranfusion kontrollieren. Einer dieser sogenannten *quatrefoil*-Komplexe ist der heterooctamere Exocyst-Komplex, der in Nervenzellen den Transport von synaptischen Vesikeln und Calcium-Kanälen reguliert und so die Funktionsweise der Neuronen sicherstellt. Aktiviertes Ral bildet mit dem Exocyst einen Komplex, von dem vermutet wird, dass er beim *tethering*, dem ersten Kontakt der Vesikel mit der Zielmembran, beteiligt ist. Die Auflösung des Komplexes, die SNARE-Bildung und Einleitung der Membranfusion kann durch die Konformationsänderung von Ral bei der Hydrolyse von GTP erklärt werden.^[55-59]

2.1.2 Posttranslationale Modifikationen von Ras-Proteinen

Unter posttranslationalen Modifikationen versteht man „Veränderungen“ der Proteine, die nach der ribosomalen Biosynthese stattfinden. Die meisten Proteine werden zunächst nicht in ihrer funktionalen, biologisch aktiven Form synthetisiert, sondern durchlaufen einen oder mehrere Modifikationsschritte, man spricht hier auch von einer „Reifung“ der Proteine.

Bekannt sind unter anderem folgenden Modifikationen: Proteolyse, Hydroxylierung, Methylierung, Glykosylierung, Sulfatierung, Iodinierung, Carboxylierung, Acylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Nukleotidylierung und Lipidierung. Die meisten Enzyme, welche diese posttranslationalen Modifikationen katalysieren befinden sich im endoplasmatischen Retikulum. Eine Auswahl der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen soll nachfolgend kurz erläutert werden. Auf die posttranslationalen Modifikationen der Ras-Proteine und deren Bedeutung wird anschließend genauer eingegangen

Bei der Proteolyse wird ein Teil der ursprünglichen Peptidsequenz wieder abgespalten, um das funktionelle Protein zu erhalten. Dabei handelt es sich um sogenannte Signal-Sequenzen, die 16-36 Aminosäuren lang sind und sich hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren zusammensetzen (Nobelpreis für Medizin 1999, G. Blobel)^[60]. Die Biosyntheseprodukte werden als prepro-Proteine bezeichnet. Peptidhormone werden häufig als Polypeptide synthetisiert und im Anschluß in Monomere zerschnitten bzw. zur biologisch aktiven Form verkürzt (Insulin, Relaxin, Adrenalin oder Thyroxin).

Hydroxylierung ist eine weniger häufige Form der posttranslationalen Modifikation. Das Protein Collagen, das als Fasern in Haut, Knochen oder Haaren vorkommt, stellt das vielleicht prominenteste Beispiel für hydroxylierte Proteine dar. Drei rechtsgängige Helices umschlingen sich zu einer linksgängigen Superhelix, deren Ende durch Proteolyse gestutzt werden, bevor die Aminosäuren Prolin und Lysin hydroxyliert werden.^[61]

Carboxylierte Glutaminsäure (γ -Carboxy-glutamat, Gla) ist Bestandteil von Prothrombin – auch als Faktor II der Blutgerinnung bekannt – und anderer Gerinnungsfaktoren (Faktor VII, IX und X), ausserdem wird Gla für Ca^{2+} -abhängigen Wechselwirkungen benötigt.^[62]

Die Glykosylierung ist die häufigste posttranslationalen Modifikationen; man findet glykosylierte Proteine sowohl intra- als auch extrazellulär, sowohl löslich, als auch membrangebunden. Zuckerreste beschleunigen in einigen Fällen die korrekte Faltung von Proteinen, des weiteren stabilisieren sie Proteine gegen proteolytischen Abbau aufgrund ihres sterischen Anspruchs (Abschirmen von Protease-Schnittstellen). Eine wichtige Rolle spielen glykosylierte Proteine auch in der Zell-Zell-Kommunikation oder der Zellerkennung bzw. Immunreaktion, wo sie als Erkennungsmuster fungieren. Genetische Defekte, die zu einer falschen Glykosylierung führen, können Infektionen oder auch Autoimmunerkrankungen auslösen. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass in Krebszellen häufig veränderte Glykosylierungsmuster festgestellt werden.^[61, 63]

Ebenfalls häufig ist die Phosphorylierung der Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin. Zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose können so gesteuert werden. Auch die biologische Funktion vieler Rezeptoren ist von ihrem Phosphorylierungszustand abhängig (Abbildung 2). Die Sulfatierung von Tyrosin ist eine Modifikation, die häufig bei Peptidhormonen auftritt

und bei Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie der Leukozyten-Adhäsion in Entzündungsprozessen involviert ist. Das sulfatierende Enzym ist die Tyrosin-Protein-Sulfotransferase (TPST).^[61]

Funktionell besonders wichtige posttranslationale Modifikationen – welche auch bei der Untersuchung der Ras-Proteine eine wichtige Rolle spielen – sind Lipidierungen von Proteinen, also das Anknüpfen von Fettsäureresten. Die Fettsäurereste dienen nicht nur als Erkennungssignale zwischen Proteinen sondern vielmehr zur Verankerung an Zielmembranen, an denen die lipidierten Proteine ihre biologischen Funktionen erfüllen.

Zu den N-terminale Lipidierungen zählen die Acylierung mit den gesättigten Fettsäuren Myristinsäure (C₁₄) und in geringerem Maße Laurinsäure (C₁₂) oder ungesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge. Das *sonic hedgehog* Protein bildet ein besonders interessantes Beispiel für ein lipidiertes Protein, da es eine N-terminale Acylierung mit Palmitinsäure (C₁₆) und einen C-terminalen Cholesterolester aufweist.^[64]

Bei der Myristoylierung handelt es sich strenggenommen nicht um eine posttranslationale sondern um eine cotranslationale Modifikation, da die N-Myristoyl-Transferase (NMT) die Acylierung eines N-ständigen Glycins mittels Myristoyl-Coenzym A bereits während der ribosomalen Synthese katalysiert.^[65] Neben der Stabilisierung der 3-dimensionalen Proteinkonformation wie z.B. im VP4-Hüllprotein des Poliovirus, kommt dem Fettsäurerest in einigen Proteinen eine schalterähnliche Funktion zu (*myristoyl switches*). Durch zwei unterschiedliche Proteinkonformationen, in denen sich der Myristoylrest entweder im Inneren der Faltung befindet oder auf der Außenseite des Proteins exponiert ist, kann eine reversible Membranbindung erreicht werden. Für eine stabile Membranassoziation ist ein Myristoylrest jedoch nicht ausreichend, es wird stets eine zweite Modifikation benötigt.^[66]

Während N-terminale Lipidmodifikationen ausschließlich bei Proteinen ohne Transmembrandomänen beobachtet werden, sind S-Acylierung, also die Ausbildung eines Thioesters (hauptsächlich Palmitoylierung in geringem Maße mit Myristin-, Stearin- oder Arachidonsäure)^[67, 68], sowohl von integralen als auch peripheren Membranproteinen bekannt. Im Gegensatz zu den oben erwähnten N-terminalen Lipidierungen handelt es sich hier um „echte“ posttranslationale Modifikationen; die α -Untereinheiten der meisten heterotrimeren G-Proteine, sowie N- und H-Ras weisen diese Modifikation auf. Die Palmitoylierung folgt auf eine vorangegangene

cytosolische Prenylierung und findet am Endoplasmatischen Retikulum statt. H- und N-Ras werden im Anschluß via sekretorischem Transport über den Golgi zur Plasmamembran transportiert.^[69, 70] Durch die Einführung des zweiten Lipidrests werden die Proteine stabil an der Membran verankert. Diese Erkenntnis führte zum *kinetic membrane trapping model*, welches eine vorübergehende Wechselwirkung des monolipidierten Proteins mit einer Membran und eine Palmitoylierung mit einer an der Membran lokalisierten Palmitoyl-Acyl-Transferase postuliert, wodurch eine stabile Membranassoziation erreicht würde. Von den Enzymen PPT1 und APT1 ist bekannt, daß sie Ras-Proteine deacylieren können. Für APT1 konnte erst kürzlich nachgewiesen werden, dass auch die Acylierung von Ras-Proteinen katalysiert wird.^[71]

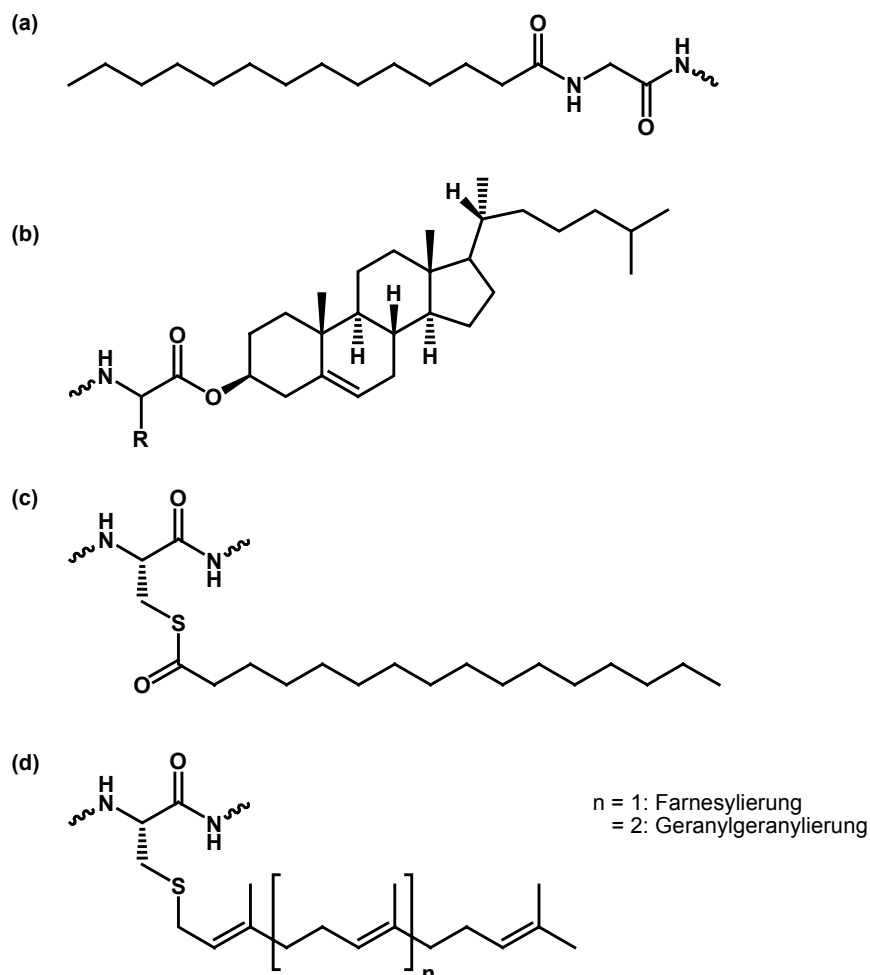


Abbildung 4. Posttranslationale Lipidierung von Proteinen.

Die häufigsten Lipidierungen in der Superfamilie der Ras-Proteine sind Isoprenylierungen von Cysteinen in der C-terminalen hypervariablen Region unter

Ausbildung eines Thioethers. Diese sind für die Transformationen von onkogenem Ras unbedingt notwendig. Das Ras-Effektor-Protein Raf (siehe Abbildung 2) wechselwirkt mit dem Isoprenylrest durch eine Zinkfinger-Domäne.^[72-74]

Es sind verschiedene Signalsequenzen bekannt, die Proteine für die Übertragung von ein oder zwei Isoprenylresten markieren. Sehr verbreitet ist die sogenannte CaaX-box, die in allen Unterfamilien der Ras-Proteine auftritt. Handelt es sich bei X um die Aminosäuren Leucin, Phenylalanin oder Asparagin so wird ein Geranylgeranylrest (C₂₀-Einheit) auf die Thiolfunktion transferiert, bei Serin, Methionin oder Glutamin wird ein Farnesylrest (C₁₅-Einheit) übertragen („a“ kennzeichnet beliebige aliphatische Aminosäuren). Bei den Rab-Proteinen sind CXC- und CC-Motive bekannt, wodurch die Rab-Proteine ein- oder zweifach geranylgeranyliert werden.

Die cytosolischen Enzyme, welche die Isoprenylierungen katalysieren, sind die Farnesyl-Transferase (FTase) und die Geranylgeranyl-Transferasen I und II (GGTase I bzw II). Die FTase und die GGTase I, durch welche die Isoprenylreste auf Proteine mit dem CaaX-Motiv übertragen werden, sind einander sehr ähnlich. Die α -Einheit beider Proteine ist identisch und bildet mit einer β -Einheit, die 30% Homologie zwischen beiden Proteinen aufweist, ein Heterodimer. Beides sind Metalloenzyme, die ein Zn²⁺-Ion zur Substratbindung und Übertragung der Isoprenylreste vom Pyrophosphat auf die Thiolfunktion benötigen. Dieser Vorgang findet an der β -Untereinheit statt, das Protein wird dabei nahe an der Grenzfläche zwischen den beiden Monomeren gebunden. Die FTase benötigt für ihre Funktion außerdem Mg²⁺-Ionen.

Die GGTase II dagegen ist ein Heterotrimer und überträgt Geranylgeranylreste auf Proteine mit dem CC- oder CXC-Motiv nach einem Mechanismus, der bisher jedoch ungeklärt ist.^[74, 75]

Im Anschluss an die Isoprenylierung werden die Proteine mit CaaX- und CXC-Motiv an der Oberfläche des rauhen Endoplasmatischen Retikulums weiter prozessiert. Die Endopeptidase Rce1 (*Ras and a-factor converting enzyme 1*) spaltet die aaX-Sequenz ab und das Enzym Icmt (*Isoprenylcystein carboxymethyl transferase*), ein Homolog des zuerst in Hefen identifizierten STE14-Proteins, überträgt einen Methylrest von S-Adenosylmethionin auf den C-Terminus, so dass ein Methylester entsteht. Proteine mit dem CxC-Motiv werden ebenfalls carboxymethyliert.^[69, 70, 74, 76]

Während die weiteren Modifikationen von N- und H-Ras aufgeklärt sind (Abbildung 5), ist unklar wie K-Ras 4B im Anschluss an die Carboxymethylierung vom Endoplasmatischen Retikulum an die Plasmamembran gelangt. Die polybasische Aminosäuresequenz befähigt K-Ras 4B an Microtubuli zu binden, eine Fähigkeit, die kein anderes Ras-Protein aufweist. Eine Vermutung ist daher, dass die Bindung an diese Filamente für den Membrantransport von K-Ras 4B verantwortlich ist. Andere Möglichkeiten, die diskutiert werden, ziehen eine passive Diffusion zur Plasmamembran allein aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in Betracht oder einen Transport analog zu dem des verwandten Rho-Proteins mittels eines Chaperons, dessen Existenz aber bisher nur postuliert worden ist.^[69, 70, 77, 78]

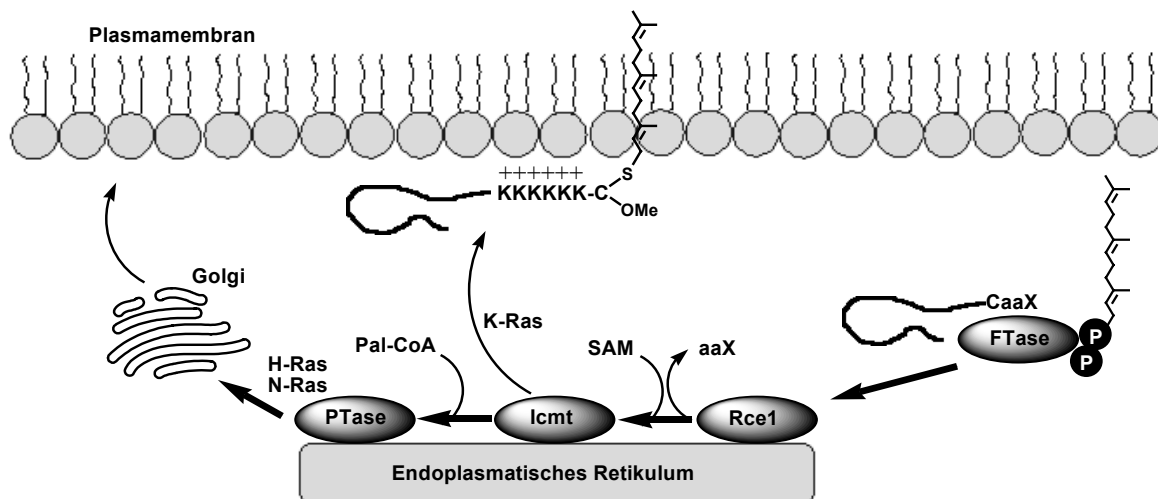


Abbildung 5. Posttranslationale Modifikation und Membrantransport der Ras-Proteine.

Die posttranslationale Lipidierung der Ras-Proteine und die damit verbundene korrekte Adressierung und Lokalisierung an zellulären Membranen ist für deren biologische Aktivität unbedingt notwendig. Bereits Mitte der 80er Jahre wurde durch die Untersuchungen an Deletions-Mutanten der Ras-Proteine nachgewiesen, dass Mutanten, denen es nicht mehr möglich war an Membranen zu binden, keine transformierenden Eigenschaften aufweisen. Erst durch die Colokalisierung mit Effektormolekülen an der Zielmembran kann die Signalübertragung erfolgen. Ausserdem werden die Wechselwirkungen durch die nahe räumliche Anordnung an der Membran um ein Vielfaches potenziert.^[73, 74, 79, 80]

Von den Ral-Proteinen ist bekannt, dass sie aufgrund der CaaX-Sequenz geranylgeranyliert werden. Das katalysierende Enzym (vermutlich die GGTase I) ist

bisher jedoch nicht identifiziert worden. Über die Bedeutung der Lipidmodifizierung über den Zweck der Membranverankerung hinaus ist ebenfalls noch nichts bekannt. Von Substanzen, die die Lipidierung der Ras-Proteine inhibieren, wird angenommen, dass sie als Medikamente gegen Krebs einsetzbar sind. Viele der bisher entwickelten FTase-Inhibitoren enthalten Motive, die die CaaX-Box imitieren, um so von dem Enzym irreversibel gebunden werden sollen. Einige werden bereits in klinischen Studien bewertet, allerdings ist die Verwendung problematisch, da weitere Proteine wie γ -Transducin oder Rhodopsin Kinase ebenfalls Substrate der FTase sind. Ausserdem können Ras-Proteine auch von der GGTase I als Substrate erkannt und somit teilweise geranylgeranyliert werden, wenn die FTase inhibiert wird. Der Transport der Ras-Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zu den jeweiligen Zielmembranen, im Anschluss an die posttranslationalen Modifikationen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, eine Inhibierung desselbigen stellt jedoch einen möglichen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Krebstherapien dar. Der Einsatz synthetischer Peptide und Proteine ermöglicht weitergehende Aufklärung des zelleigenen Transportmechanismus und bildet die Basis zur Entwicklung solcher Inhibitoren.^[69, 74, 81-83]

2.2 Chemische Peptid- und Proteinsynthese

Synthetische Peptide und Proteine stellen heute wichtige Werkzeuge in der medizinisch-chemischen oder biologischen Forschung dar. Durch die gezielte Verwendung von Reportermolekülen wird es möglich die Struktur der natürlich vorkommenden Analoga zu verifizieren, deren Aktivität zu bestimmen und Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität aufzudecken. Hierfür sind nicht nur die natürlichen Peptide oder Proteine notwendig, der Fokus liegt heute vielmehr auf synthetischen Analoga, deren Design es ermöglichen soll, sie als analytische Werkzeuge zu verwenden. Die Modifikationen, die zu diesen Zwecken eingeführt werden, sind vielfältig und reichen von Fluoreszenzmarkern über *Crosslinker* bis hin zu β -turn-Mimetika.^[84-86]

Als Beginn der Peptidchemie wird allgemein die Synthese von L-Glycylglycin durch *Fischer* 1901 betrachtet, obwohl *Curtius* bereits 1881 ein voll geschütztes

Dipeptid hergestellt hatte. Die Einführung der Cbz-Schutzgruppe (Carbobenzoxy) durch *Bergmann* und *Zervas* 1932 erleichterte die Peptidsynthese wesentlich, ab 1950 wurde die Erforschung neuer Methoden verstärkt vorangetrieben und führte so zur Entwicklung neuer Kupplungsmethoden und weiterer Schutzgruppen. Die Anstrengungen mündeten in der ersten Synthese des Peptidhormons Oxytocin durch die Gruppe von *du Vigneaud* 1953; es folgten Vasopressin, Gramicidin S, MSH (Melanozyten stimulierendes Hormon) und weitere.

Ein Meilenstein in der Entwicklung der Peptidsynthese ist unbestritten die Einführung der Festphasensynthese durch *Merrifield*, der 1963 eine erste Veröffentlichung dazu und 1964 die Synthese des Nonapeptids Bradykinin veröffentlichte, worauf 1966 bereits die Entwicklung des ersten *Synthesizer* für die Festphasensynthese folgte. Die heute weit verbreitete Fmoc-Schutzgruppe (Fluorenylmethyloxycarbonyl) und Phosphoniumverbindungen als Kupplungsreagenzien werden seit 1970 verwendet, die Uronium-Kupplungsreagenzien werden seit 1978 eingesetzt.^[87-91]

1981 führte *Kemp* die erste Ligationsmethode (*thiol capture*) zur Kupplung ungeschützter Peptide ein, die spätere *chemical ligation* (1992, *Kent*) und *native chemical ligation* (1994, *Dawson*) beruhen auf Beobachtungen die bereits 1953 von *Wieland* gemacht wurden und bilden mittlerweile die Grundlage für eine Vielzahl von Ligationsmethoden.^[87, 91, 92]

Im folgenden sollen die wesentlichen Gesichtspunkte der Synthese von Peptiden und Semisynthese von Proteinen kurz dargestellt werden.

2.2.1 Prinzip der Festphasensynthese

In der Festphasensynthese wird ein Substratmolekül auf einem unlöslichen Träger (meist ein polymeres Material) kovalent immobilisiert und Reagenzien werden in Lösung zugegeben. Durch die Immobilisierung auf einem unlöslichen Material können hohe Überschüsse an Reagenzien verwendet werden, die nach Beendigung der Reaktion durch Filtration abgetrennt werden können.

Durch die auftretende sterische Hinderung, geringere Diffusionsraten und die Umgebung des Substrats müssen Standardmethoden aus der Lösungssynthese für den Einsatz an der festen Phase adaptiert werden. Durch Quellen des Harzes in

geeigneten Lösungsmitteln werden die funktionellen Gruppen im Inneren der schwammartigen Polymermatrix zugänglich, gerade in der Peptidsynthese kann ein Einfluss auf das Quellverhalten der verschiedenen Seitenketten beobachtet werden.^[93-96]

Die Schutzgruppen zum Blockieren der funktionellen Gruppen werden je nach Problemstellung variiert, um eine orthogonale Strategie zu erreichen, die sowohl mit dem verwendeten Linker, als auch mit den speziellen Eigenschaften des Zielpeptids kompatibel ist.^[99]

Durch Verwendung sogenannter Linker-Moleküle, die quasi bifunktionelle Schutzgruppen darstellen, ist eine bessere Kontrolle der Beladung des Harzes und eine Minimierung von Nebenreaktionen möglich geworden. Ausserdem können die Abspaltungsbedingungen durch Substituenteneinflüsse modulieren werden, um hohen Ausbeuten bei milden Konditionen zu erhalten. Tatsächlich sind eine Reihe von Linkern ausgehend von Schutzgruppen entwickelt worden (Trityl-, Phenylhydrazin-, NVOC) (Abbildung 6). Wie Schutzgruppen können sie deshalb in Bezug auf ihre Spaltungsbedingungen kategorisiert werden: säurelabil, basenlabil, photolabil, oxidativ oder reaktiv spaltbar, etc.

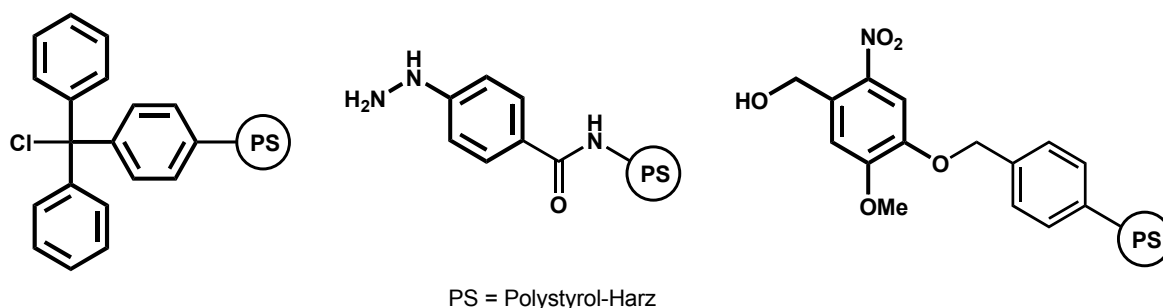


Abbildung 6. Linkergruppen (Trityl-, Phenylhydrazid-, 6-Nitroveratryl-linker, von links nach rechts)

Eine Sonderstellung kommt den sogenannten *traceless* und *safety catch* Linkern zu: erstere bilden bei der Spaltung eine C-H- oder C-C-Bindung aus, so dass keine funktionelle Gruppe gebildet wird und nicht offensichtlich ist, wo das Molekül an der festen Phase verankert war. Letztere erfordern eine zweistufige Abspaltungssequenz, die aus der Aktivierung des Linkers und seiner anschließenden Spaltung besteht (Orthogonalität höherer Ordnung).^[100-102]

Kupplungsreagenzien werden eingesetzt um die Reaktion zwischen Amin- und Säurefunktion zu beschleunigen. Dabei ist zu beachten, dass Peptide fast

ausschließlich vom C- in Richtung des N-Terminus aufgebaut werden, um Nebenreaktionen wie die Bildung von Oxazolonen oder Diketopiperazinen zu minimieren (Abbildung 7). Die Verwendung von Urethan-Schutzgruppen zur Blockierung der Aminfunktion trägt ebenfalls zur Unterdrückung dieser Nebenreaktionen bei.^[103, 104]

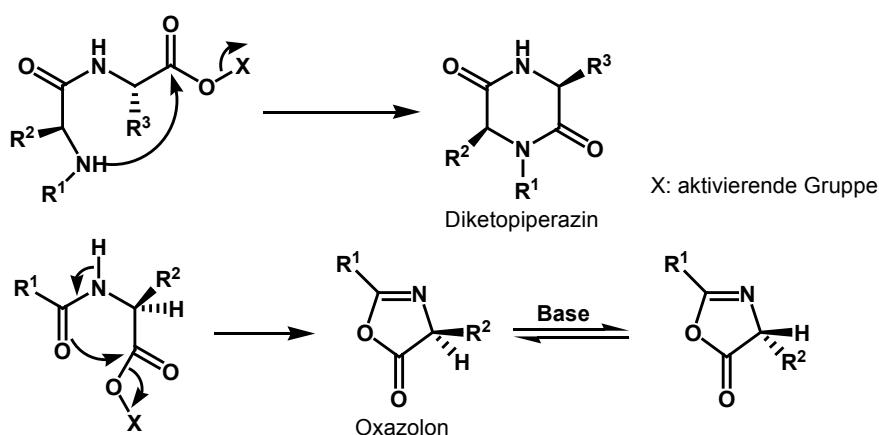


Abbildung 7. Diketopiperazin- und Oxazolonebildung.

Für die Kupplung sterisch stark gehinderter Aminosäuren werden auch heute noch Säurehalogenide oder gemischte Anhydride verwendet, allerdings ist die Gefahr der Racemisierung und Entstehung von Nebenprodukten groß.^[104-106]

Bereits seit 1955 werden Carbodiimide als Kupplungsreagenzien unter Zusatz von Additiven wie Hydroxysuccinimid oder -phthalimid eingesetzt.^[105] Anfang der 70er Jahre wurden die ersten, auf Hydroxybenzotriazol basierenden, Phosphoniumreagenzien eingeführt, von diesen ausgehend wurden die Uroniumreagenzien entwickelt (Abbildung 8). Die 7-Aza-Derivate der Uroniumreagenzien können durch das Substrat durch zusätzliche Wasserstoff-Brücken-Bindungen günstig positionieren und die Kupplungseffektivität erhöhen. Daher werden sie verstärkt in Sequenzen mit sterisch gehinderten Aminosäurederivaten, Cyclisierung oder anderen schwierigen Sequenzen eingesetzt. Derivate mit elektronenziehenden Substituenten können die Reaktivität noch erhöhen.^[104, 107-110]

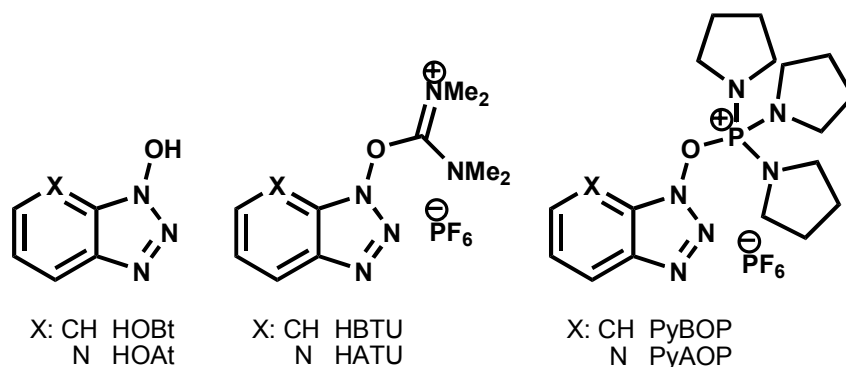


Abbildung 8. Auf HOBt basierende Kupplungsreagenzien.

Zur Unterdrückung der Racemisierung werden Zusätze wie Hydroxybenzotriazol (HOBt) und Derivate zugesetzt, aber auch Kupfer(II)salze sind in Einzelfällen schon erfolgreich angewendet worden. Die Verwendung von sterisch gehinderten Basen (substituierte Pyridinderivate) dient dem gleichen Zweck.^[105, 111]

Die Festphasensynthese ist heutzutage fest etabliert und neue Verfahren wie *on-bead screening*, die *flow-cell* und *micro-tube* Synthese, Synthese auf Oberflächen, DNA-Arrays oder Affymetrix[®]-Genchips basieren auf dieser Technik.^[97, 98]

2.2.2 Synthese lipidierter Peptide

Die Synthese lipidierter Peptide ist trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der Peptidsynthese nach wie vor mit zahlreichen Problemen behaftet, die eine automatisierte Synthese bisher verhindert haben. Die Schwierigkeiten ergeben sich hauptsächlich aus der Labilität der verschiedenen Lipidreste gegenüber dem eingesetzten chemischen Milieu, welches zur Abspaltung der Schutzgruppen bzw. vom Linker verwendet werden.

Bei prenylierten Peptiden (mit einem oder mehreren farnesyl- oder geranylgeranylmodifizierten Cysteinen) führen saure Reaktionsbedingungen zu Additions- oder Umlagerungsreaktionen an den Lipidresten.^[112] Reduktive Bedingungen wie die hydrogenolytische Abspaltung von Schutzgruppen bewirken einen Verlust der Doppelbindungen der Prenylreste (Abbildung 9).

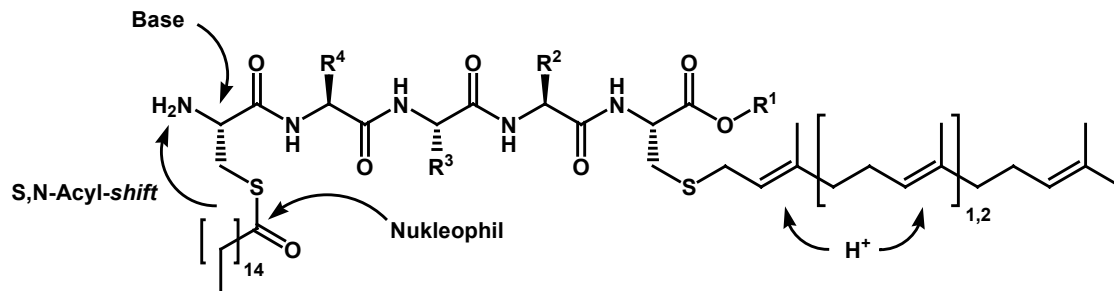


Abbildung 9. Labilität palmitoylierter und prenylierter Peptide gegen Säuren, Basen und Nukleophile.

Eine elegante Methode zur Einführung der Prenylreste ist die enzymatische Lipidierung unter Einsatz der Farnesyltransferase oder der Geranylgeranyltransferase I, die auf ungeschützte Peptide angewendet werden kann. Allerdings werden die entsprechenden Prenylpyrophosphate benötigt, desweiteren sind die Peptide weitgehend auf die natürlichen Sequenzen beschränkt, um von den Enzymen als Substrate erkannt zu werden.^[113]

Eine andere Möglichkeit zur Einführung der Lipidreste ist der Aufbau eines Peptids an der festen Phase mit einer anschließenden Kupplung des prenylierten Cysteins in Lösung. Die Seitenkettenfunktionalitäten müssen geschützt vorliegen, wobei die schlechte Löslichkeit seitenkettengeschützter Peptide sich jedoch als problematisch erweisen kann.^[114-116]

Durch eine geeignete Auswahl an Schutzgruppen ist es auch möglich das Peptid an der festen Phase aufzubauen, die Thiofunktion des gewünschten Cysteins freizusetzen und an der festen Phase zu prenylieren. Hierbei müssen jedoch sehr hohe Überschüsse an Prenylhalogenid eingesetzt werden.^[114, 116, 117]

Die Verwendung von lipiderten *building blocks*, also von geschützten, lipiderten Cysteinderivaten, die im Verlauf der Festphasensynthese wie herkömmliche geschützte Aminosäuren gekuppelt werden können, bietet einen flexiblen Zugang zu lipiderten Peptiden. Hauptnachteil ist die aufwendige Lösungssynthese dieser Bausteine, die der Verwendung in der nachfolgenden Peptidsynthese vorangeht.^[118, 119]

Für alle drei chemischen Methoden gilt natürlich die Einschränkung, dass die Schritte im Anschluss an die Einführung des Prenylrests mit diesem kompatibel sein müssen. Die Auswahl des Linkers und der Schutzgruppen wird dadurch stark eingeschränkt. Hauptsächlich werden schwach sauer spaltbare Linker wie der Trityl-Linker und

Modifikationen desselbigen verwendet. Unter den Abspaltbedingungen von bis zu 5% Trifluoressigsäure für eine Stunde sind Farnesylreste noch stabil, für geranylgeranylierte Peptide kann maximal 1%-ige TFA verwendet werden, ohne den Lipidrest zu beeinträchtigen. Für die Blockierung der Seitenkettenfunktionen haben sich Schutzgruppen wie Alloc, Trt oder AcOZ durchgesetzt, die unter neutralen oder milden Bedingungen bzw. enzymatisch abspaltbar sind.

Palmitoylreste, die als Thioester über die Seitenkettenfunktion von Cysteinen verknüpft sind, besitzen eine Labilität gegenüber Nukleophilen, die den Thioester spalten können. Dadurch wird die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe bzw. von Piperidin zu deren Abspaltung stark eingeschränkt. Es kann sowohl eine Spaltung der Thioesterbindung beobachtet werden, als auch ein S,N-Acyl-*shift* des Palmitoylrests zum entschützten N-Terminus. Diese Problematik kann durch die Verwendung nichtnukleophiler Basen wie 1,8-Diaza-bicycloaminoethylundec-7-en (DBU) bei sehr kurzen Entschützungszeiten umgangen werden. Doch auch diese Methode ist nicht unproblematisch, da es zur Abstraktion des α -Protons und Ausbildung von Dehydroalanin kommen kann.^[119, 120]

Mittlerweile sind einige Übersichtsartikel erschienen, welche die Synthese von lipidierten Peptiden behandeln.^[4, 5, 121] Nach wie vor bleibt die Synthese von lipidierten Peptiden aber eine Herausforderung, die es erforderlich macht vor jeder Synthese eines lipidierten Peptids, bekannte Synthesestrategien zu modifizieren. Unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenz und deren Seitenkettenfunktionalitäten, der einzuführenden Lipidreste und anderer Modifikationen wie z.B. Fluoreszenzmarkern können die angepassten Methoden auf die neue Problemstellung angewendet werden.

2.3 Bioorganische Proteinsynthese

Die Größe eines durchschnittlichen Proteins liegt bei ca. 250 Aminosäuren. Eine Synthese des vollständigen Proteins an der festen Phase ist trotz aller Vorteile der Methode nicht möglich. Grund hierfür sind nicht-quantitative Kupplungsreaktionen. Durch unvollständige Kupplungen entstehen Abbruch und Deletionssequenzen, deren Abtrennung vom Zielpeptid häufig problematisch ist. Daher werden im

allgemeinen Peptide bis zu einer Kettenlänge von 60 Aminosäuren aufgebaut.^[87] Allerdings ist es möglich Peptide durch eine Ligationsreaktion miteinander zu verknüpfen, um so längere Fragmente zu erhalten.

Die heute bekannten Ligationsmethoden, also Verfahren zur Verknüpfung von Peptiden miteinander, basieren auf einer zweistufigen Reaktionssequenz: der erste Schritt ist eine reversible *capture*-Reaktion zwischen einem N-terminalen Nucleophil und einem C-terminalen Elektrophil. N- und C-Terminus der beiden Peptide werden so in räumlicher Nähe fixiert, woraufhin sich eine irreversible, intramolekulare Acyl-Wanderung anschließt, bei welcher eine stabile Bindung zwischen beiden Peptiden ausgebildet wird. Bei orthogonalen Ligationen reagieren nur N- und C-Terminus der Peptide regiospezifisch miteinander, Seitenkettenfunktionen müssen nicht blockiert werden und führen zu keinen Nebenprodukten.^[92]

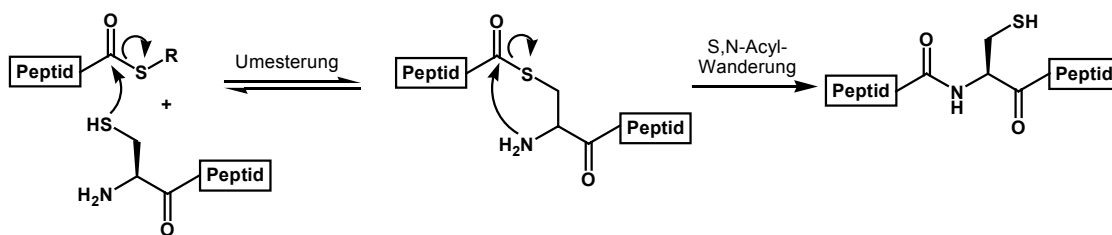


Abbildung 10. Mechanismus der *native chemical ligation*.

Ursprünglich wurden in der *chemical ligation* und *native chemical ligation* ein C-terminaler Thioester mit einem N-terminalen Cystein umgesetzt, an der Ligationsstelle entstand eine native Amidbindung. Dabei kommt es zuerst zu einer reversiblen Transesterifizierung mit der Thiolseitenkette des Cysteins, anschließend folgt eine irreversible Übertragung des Acylrests (C-terminales Peptid) über einen fünfgliedrigen Übergangszustand auf die Aminofunktion des N-terminalen Cysteins (Abbildung 10).

Mittlerweile wurden weitere Methoden entwickelt, die eine Variation der Ligationsstelle zulassen, schließlich beträgt die natürliche Häufigkeit von Cystein in Proteinen nur 1.7%. Eine Variante ist die chemische Entschwefelung des Cysteins durch Raney-Nickel (dies führt zu einem Alanin), durch die Verwendung von Homocystein und nachfolgender Methylierung kann ein Methionin an der Position der Ligation generiert werden.^[91] Die Voraussetzung für die Anwendung dieser Modifikationen ist ein Fehlen von weiteren Cysteinen in der Sequenz und eine

Toleranz der restlichen Seitenketten gegenüber den verwendeten Reagenzien und Reaktionsbedingungen.

Selenocystein und Homoselenocystein können anstatt des N-terminalen Cysteinderivats eingesetzt werden und zeigen eine gesteigerte Reaktivität, Histidin benötigt eine Aktivierung des C-terminalen Esters oder saure Bedingungen, um reagieren zu können.^[87] In Pseudoprolin-Ligationen werden Esterglycoaldehyde mit einem N-terminalen Cystein, Serin oder Threonin zur Reaktion gebracht, an der Ligungsstelle entstehen Thiaprolin oder Oxazolidinone (Abbildung 11).^[91, 92]

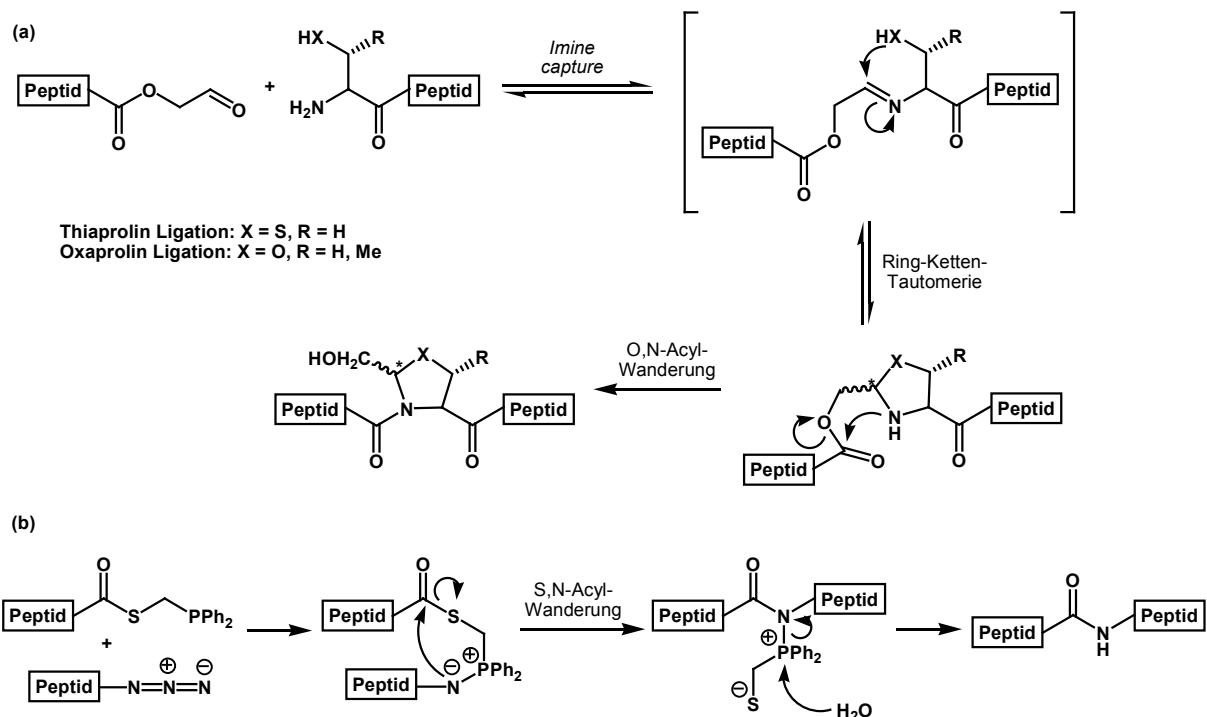


Abbildung 11. Mechanismen der Pseudoprolin-Ligation (a) und der Staudinger-Ligation (b).

Die als Staudinger-Reaktion bekannte Reaktion von Aziden mit Phosphenen lässt sich ebenfalls zur regioselektiven Verknüpfung zweier Peptide verwenden (Abbildung 11). Mittlerweile ist es auch möglich Azido-Aminosäuren in rekombinante Proteine einzufügen. Unter Einsatz dieser Methodik konnte ein Octapeptid mit einem rekombinanten Protein ligiert werden, weitere chemische Ligungsreaktionen sind in der Entwicklung.^[122-125]

Eine interessante Alternative zu den bisher aufgeführten Methoden stellen enzymkatalysierte Ligationen dar, bei denen zum Teil genetisch veränderte Proteasen eingesetzt werden (V8-Protease, Subtiligase, Sortease). Allerdings gibt es bisher nur wenige Beispiele für diese Strategie, aufgrund der Anforderungen an die

Substrate, um von den Enzymen erkannt zu werden bzw. wegen der abgeschwächten, aber immer noch vorhandenen proteolytischen Aktivität der Enzyme.^[126-128]

Die meisten Ligationsverfahren lassen sich auch auf Proteine erweitern; viele der posttranslationalen Modifikationen treten nur am C-Terminus eines Proteins auf, daher können zur Semisynthese von Proteinen rekombinante, verkürzte Proteine mit einem chemisch hergestellten C-terminalen Peptid ligiert werden. Dieser Ansatz bietet auch Zugang zu modifizierten Proteinen, die als Sonden in der Erforschung von Stoffwechselfvorgängen in der Zelle eingesetzt werden sollen. Neben der bereits erwähnten *native chemical ligation* (NCL) kommt hier die Intein-vermittelte Ligation, die auch als *expressed protein ligation* (EPL) bezeichnet wird, zum Einsatz, die sich das Prinzip des Protein-Spleißens zunutze macht (Abbildung 12).

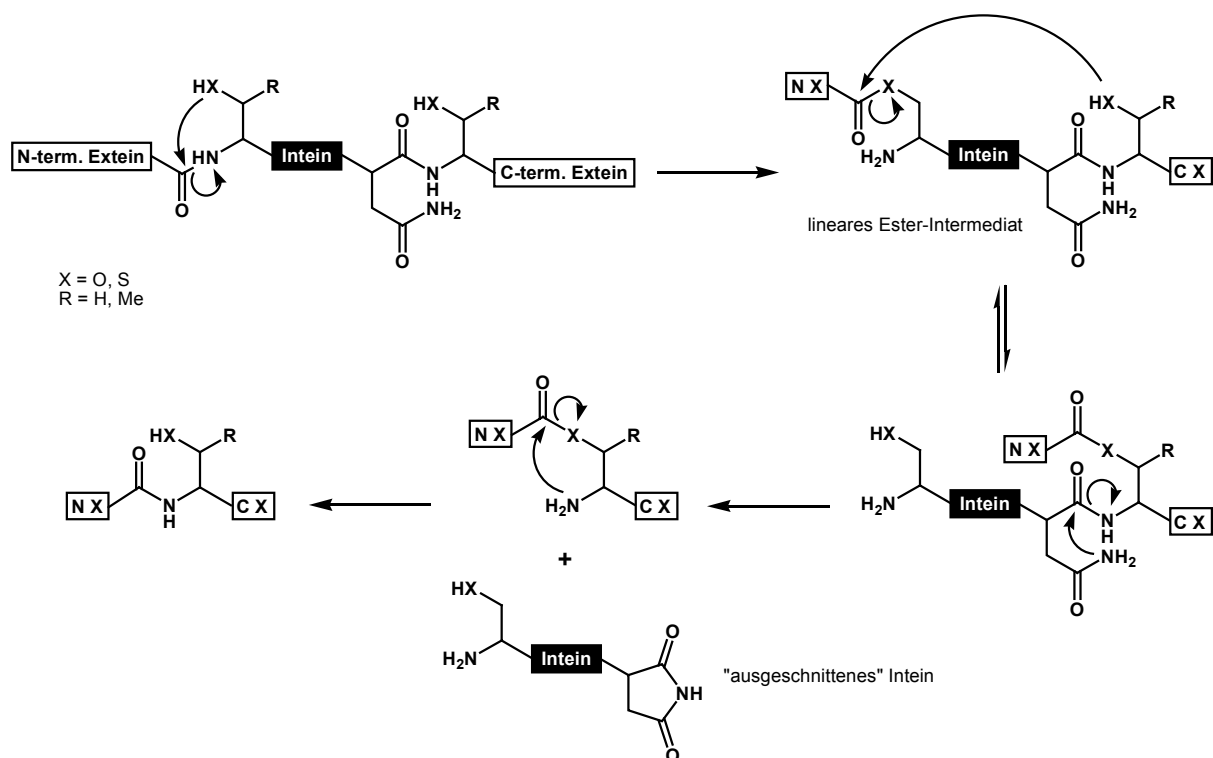


Abbildung 12. Mechanismus des Protein-Spleißens (NX = N-terminales Extein, CX = C-terminales Extein).

Inteine sind autokatalytische, enzymähnliche Polypeptid-Sequenzen, die sich posttranslational aus einem Protein-*precursor* ausschneiden, was zu einer Verknüpfung der beiden flankierenden Peptide (Exteine) und damit zum funktionellen Protein führt. Bei diesem Vorgang handelt es sich um eine intramolekulare Reaktion für die keine exogenen Kofaktoren notwendig sind und welche als Protein-Analogen

zum RNA-Spleißen in mRNA bzw. hnRNA angesehen werden kann. Die erforderlichen Informationen für diesen autokatalysierten Mechanismus sind in der Polypeptid-Sequenz des Inteins und der ersten Extein-Aminosäure des C-terminalen Exteins kodiert, daher die Bezeichnung *protein splicing element*.

Seit ihrer Entdeckung in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) 1990^[129] wurden bisher ca. 100 verschiedene Inteine identifiziert. Nahezu alle bekannten Inteine enden C-terminal mit der Aminosäure Asparagin (zwei Ausnahmen sind bekannt, in denen Glutamin Asparagin ersetzt), N-terminal mit Serin, Threonin oder Cystein und enthalten konservierte Histidine, die Übergangszustände während der Reaktion stabilisieren.

Der allgemein anerkannte Mechanismus der Reaktion besteht aus zwei Spaltungen von Peptidbindungen mit einer sich anschließenden Ligationsreaktionen zwischen den beiden flankierenden Exteinen (Abbildung 12).

Im ersten Schritt greift das Heteroatom der N-terminalen Aminosäureseitenkette die Carbonylfunktion der nachfolgenden Aminosäure an. Durch die N,X-Acyl-Wanderung kommt es zur Ausbildung eines linearen (Thio)ester-Intermediats. Der Angriff der N-terminalen Aminosäureseitenkette des Inteins bewirkt eine Umesterung und den Transfer des N-terminalen Exteins zur C-terminalen Spleißstelle. Eine Cyclisierung von Asparagin (Glutamin) führt zur Freisetzung des Inteins als Succinimid und zur Verknüpfung der beiden Exteine. Schließlich wird durch eine spontane X,N-Acylumlagerung eine stabile Amidbindung ausgebildet.^[130]

Mutationen der C-terminalen Spleißstelle resultierten in Polypeptidsequenzen, bei denen die Reaktionssequenz bereits auf der ersten Stufe, dem Ester oder Thioester, angehalten wird. Durch thiole spezifische Reagenzien konnte das N-terminale Extein vom Rest der Polypeptidsequenz abgespalten werden. Diese Modifizierungen führten schließlich zu der Entwicklung des IMPACT[™]-Systems (*intein-mediated purification with an affinity chitin-binding tag*) durch die Firma New England Biolabs (Abbildung 13). In diesem System ist die Chitin-Bindungs-Domäne (CBD) von *Bacillus circulans* anstatt dem N-terminalen Extein an das Intein fusioniert. Im Gegensatz zu anderen Affinitäts-tags, wie dem GST- (Glutathion S-transferase) oder dem MBP-tag (Maltose-bindendes Protein), wird nach der Reinigung durch Affinitätschromatographie zur Elution keine Protease benötigt, die einen nachgeschalteten Reinigungsschritt erforderlich macht. Vielmehr ist es möglich, durch Verwendung von thiole spezifischen Reagenzien, die autokatalysierte

Abspaltung des Inteins vom Extein auszulösen und letzteres als Thioester in hoher Reinheit und Ausbeute zu erhalten. Die rekombinanten Proteinthioester können nachfolgend in Ligrationsreaktionen mit synthetischen Peptiden zur Generierung von maßgeschneiderten semisynthetischen Proteinen verwendet werden. In manchen Fällen ist auch eine Kombination beider Schritte, also die Abspaltung vom Extein durch eine Ligrationsreaktion mit einem Peptid möglich. Durch Einsatz von NCL und EPL sind bis dato mehr als 100 Proteine semisynthetisch hergestellt worden.^[131-135]

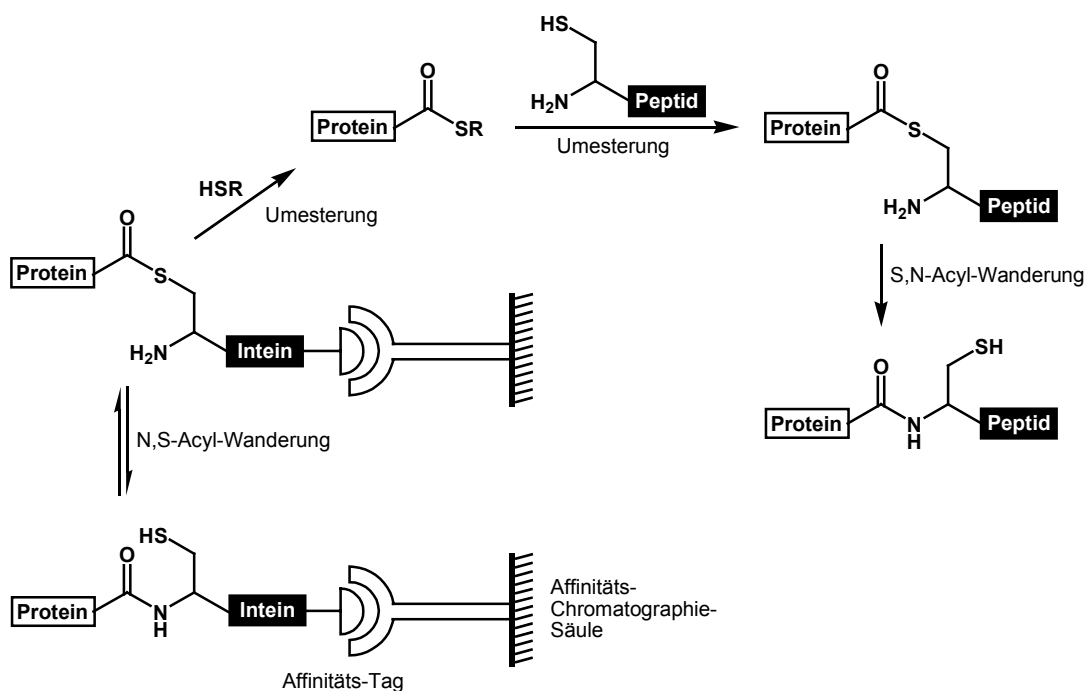


Abbildung 13. Einsatz des IMPACT™-Systems zur Semisynthese von Proteinen.

Die Identifikation von Intein-codierenden Sequenzen in den Genen von *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae*, sowie *Candida tropicalis* hat zur Suche nach Spleiß-Inhibitoren geführt, von den man sich die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung dieser Infektionskrankheiten erhofft.^[136-139]

3 Ziel der Arbeit

Die Aufklärung der Mechanismen der Signaltransduktion ist ein zentrales Thema in der Krebsforschung, sowohl von akademischer Seite aus, als auch von seiten der pharmazeutischen Industrie. Trotz intensiver Bemühungen auf diesem Forschungsgebiet sind viele Aspekte, die als neue Ansatzpunkte zur Entwicklung von Therapien dienen könnten, noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie die bioorganische Semisynthese von polybasischen, monolipidierten Vertretern der Ras-Protein-Superfamilie realisiert werden. So erhaltene Proteine stellen molekulare Sonden dar, welche in biophysikalischen und zellbiologischen Assays eingesetzt werden. Ihr gezielter Einsatz ermöglicht neue Erkenntnisse über die Rolle und Funktionsweise der nativen Protein ein der Signaltransduktion und Tumorgenese.

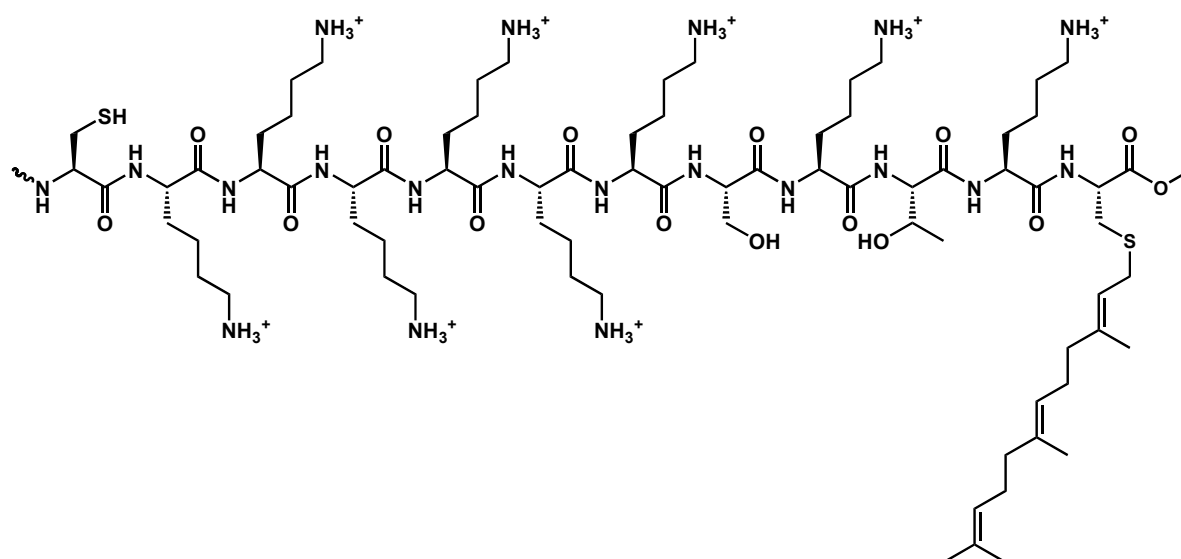


Abbildung 14. Nativer C-Terminus von K-Ras 4B.

Zur Synthese semisynthetischer Proteine sollte ein flexibler Zugang zu polybasischen, monolipidierten Peptiden mittels einer *building block*-Strategie am polymeren Träger entwickelt werden. Dies beinhaltet die Synthese sowohl der nativen als auch modifizierter C-Termini der Ras-Proteine K-Ras 4B und D-Ral (Abbildung 14 und 15). Die Synthese der beiden Peptide und weiterer Derivate erfordert die Zugänglichkeit spezieller Bausteine (*building blocks*). Als Position zur Einführung eines Fluoreszenzmarkers war anfänglich der C-Terminus der Zielpeptide

vorgesehen. Dies erschien sinnvoll, da so keine Störung der Membranbindung durch die polybasische Aminosäuresequenz und den Isoprenylrest zu erwarten war.

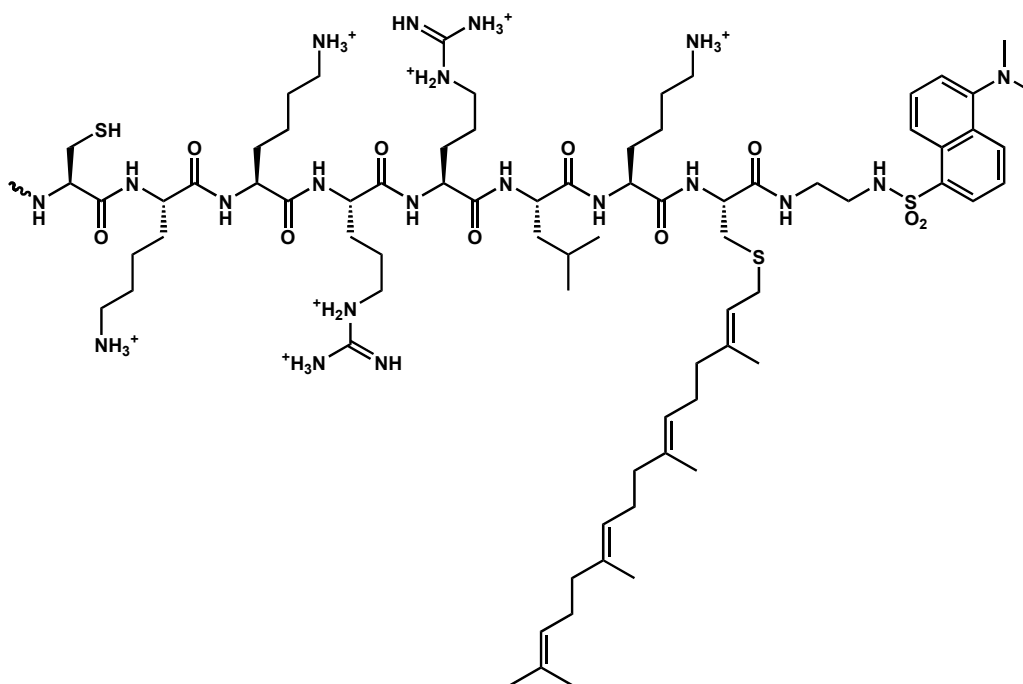


Abbildung 15. Fluoreszenzmarkierter C-Terminus von D-Ral.

Durch Ligation der synthetisierten Peptide mit verkürztem H-Ras(1-180)-MESNA-Thioester sollten chimäre Proteine generiert werden. Die Expression und Reinigung des rekombinanten H-Ras(1-181) war bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann etabliert und in Kooperation mit R. Reents und M. Völkert aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Waldmann erfolgreich zur Semisynthese anderer chimärer Ras-Proteine eingesetzt worden.^[140, 141]

Das H-Ras-Protein wurde ausgewählt, da es ausführlich charakterisiert ist und ein stabiles Expressionssystem bekannt war. Ausserdem weisen H-Ras und K-Ras 4B eine Sequenzidentität von 85% auf. Die Unterschiede zwischen beiden Proteinen liegen hauptsächlich im C-Terminus, welcher chemisch synthetisiert wurde. Die Homologie zwischen H-Ras und D-Ral beträgt 55%. Bisher wurde bei Ligationen jedoch ein Maleinimidocaproyl-Linker (MIC) zur Verknüpfung von Protein und Peptid eingesetzt werden. Versuche die *expressed protein ligation* (EPL) zu diesem Zweck einzusetzen, waren aufgrund schlechter Löslichkeiten der eingesetzten Peptide ohne Erfolg verlaufen. Mit den polybasischen, monolipidierten Peptiden sollte erneut

versucht werden, die Ligationen mittels EPL durchzuführen, da so eine native Peptidbindung an der Ligationstelle erhalten werden kann (Abbildung 16).

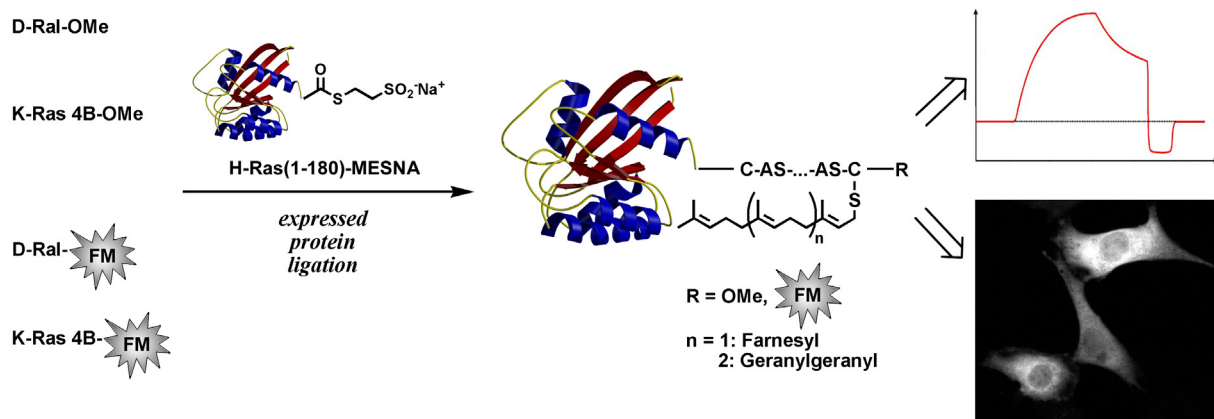


Abbildung 16. Schematische Darstellung der Semisyntese chimärer Ras-Proteine mittels *expressed protein ligation* (FM: Fluoreszenzmarker) und deren Verwendung in biophysikalischen und zellbiologischen Untersuchungen.

Die chimären Proteine sollten nachfolgend in biophysikalischen und zellbiologischen Assays untersucht werden. Durch Einsatz von *surface plasmon resonance*-Messungen könnte die Assoziations-Kinetik der Proteine mit Modellmembranen studiert werden. Von den Ergebnissen dieser Assays wurden Hinweise darauf erwartet, ob für die Anlagerung von K-Ras 4B an die Plasmamembran ein Transportmechanismus notwendig wäre oder ob die Relokalisierung vom Endoplasmatischen Retikulum zur Membran allein durch passive Diffusion erfolgen könnte. In gleicher Weise könnten auch die kinetischen Größen der chimären H-Ras/D-Ral-Proteine bestimmt werden.

Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Proteinen bei Microinjektionen sollte die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Experimente würden weitere Rückschlüsse auf potentielle Transportmechanismen des K-Ras 4B-Proteins zulassen.

Da über die Ral-Proteine bisher nur wenig bekannt ist, würden Microinjektionen und die daraus abgeleitete Membranlokalisation erste Hinweise auf ihre Funktion in der zellulären Signalweiterleitung geben.

4 Spezieller Teil

4.1 Synthesestrategie

Die bereits angesprochene Labilität der Isoprenylreste (Abbildung 10) erfordert eine besonders milde Schutzgruppenstrategie zum Aufbau der Zielpeptide. Ausgewählt wurde eine Fmoc-Strategie in Kombination mit einem sehr säurelabilen Linker. Die Auswahl der Seitenkettenschutzgruppen war demzufolge stark eingeschränkt. Für die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin schien die Allyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Aloc) am geeignetsten: diese ist unter sauren und basischen Bedingungen stabil, lässt sich aber unter Verwendung des Palladiumkatalysators $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und eines Nucleophils zum Abfangen der reaktiven Allylspezies unter neutralen Bedingungen abspalten. In Kombination mit Fmoc-geschützten Aminosäuren und einem säurelabilen Linker stellt dies eine orthogonale Schutzgruppenstrategie dar. Im Gegensatz zum Lysinderivat war ein Fmoc-bis-Aloc-geschütztes Arginin allerdings weder kommerziell erhältlich noch war eine zufriedenstellende Synthese ausgearbeitet. Für diese Verbindung sollte eine zuverlässige Syntheseroute ausgearbeitet werden, durch welche Fmoc-bis-Aloc-geschütztes Arginin für die Festphasensynthese von Peptiden in grösseren Mengen zugänglich würde.

Die Alkoholfunktionen der Aminosäuren Threonin und Serin wurden als Tritylether blockiert, wodurch eine simultane Freisetzung dieser Seitenketten bei der Abspaltung von der festen Phase möglich wurde. Das N-terminale Cystein sollte mit einer *tert*-Butylthio-Schutzgruppe blockiert werden, welche unter milden, reduktiven Bedingungen entfernt werden kann. Es war bereits bekannt, daß eine Abspaltung während der Ligation mit einem Protein durch Zusatz von Mercaptoethansulfonsäure erfolgen kann.^[142]

Durch die Verwendung von prenylierten Cysteinen, die in Lösung zu synthetisieren waren, in einem sogenannten *building block approach* sollte eine flexible Synthese gewährleistet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurde eine Synthesestrategie für die C-Termini von K-Ras 4B und D-Ral in Anlehnung an eine bekannte Synthese ausgearbeitet (Abbildung 17):

Durch die Verknüpfung an die feste Phase über die Seitenkette eines Lysins blieben sowohl N- als auch C-Terminus dieser Aminosäure zur Kettenverlängerung zugänglich. C-terminal sollten unterschiedliche Cysteinderivate eingeführt werden, N-terminal sollte die restliche Peptidsequenz aufgebaut werden. Die Verwendung eines Trityl-Linkers würde eine milde Abspaltung von der festen Phase mit einer gleichzeitigen Entschützung der Alkoholseitenketten im Falle des K-Ras 4B ermöglichen.

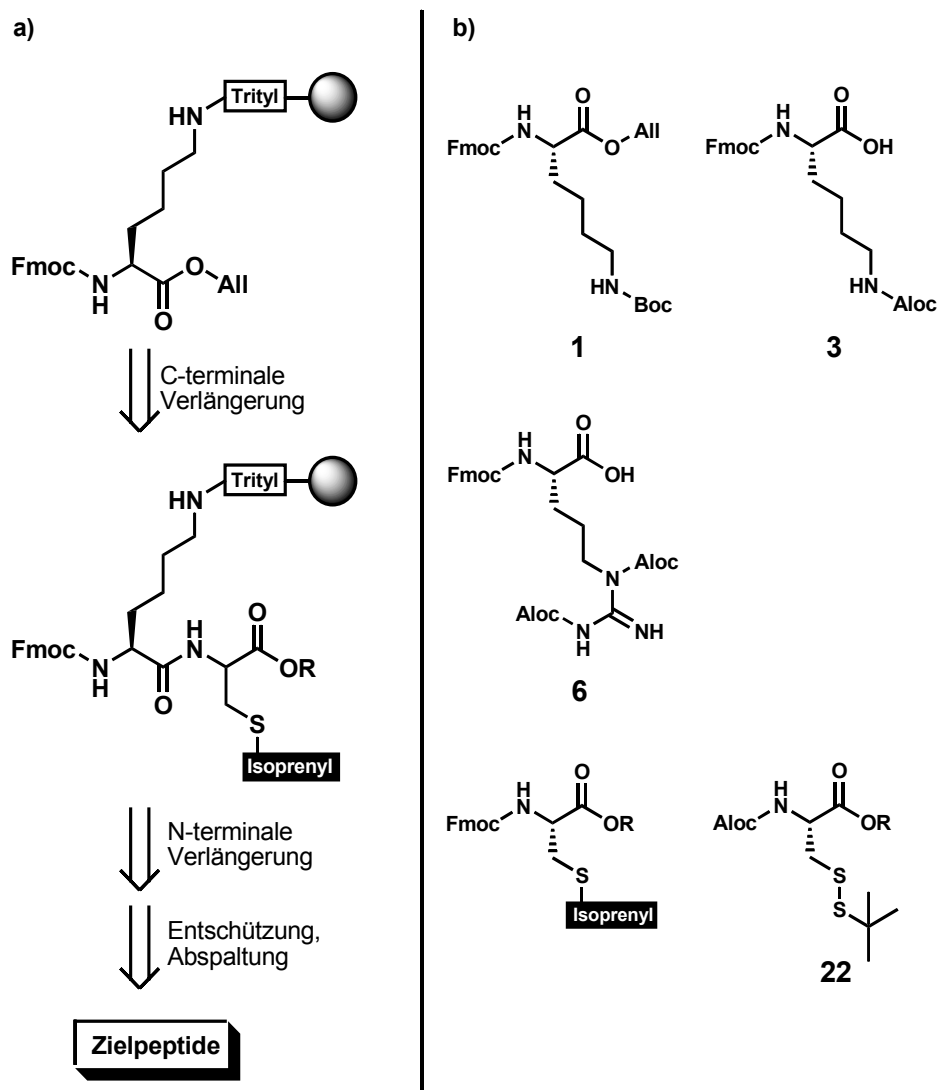


Abbildung 17. Synthesestrategie für die C-Termini von K-Ras 4B und D-Ral (a); zu synthetisierende Aminosäure-Bausteine (b).

Ein Großteil der benötigten Aminosäurederivate (FmocLys(Boc)All **1**, FmocLys(Aloc) **3**, FmocArg(Aloc)₂ **6**, isoprenylierte Cysteinderivate, AlocCys(S^tBu) **22**) sollte ausgehend von den ungeschützten Aminosäuren synthetisiert werden.

4.2 Synthese der benötigten Aminosäure-Derivate und des Palladium-Katalysators

4.2.1 Synthese der Lysinderivate

Zur Immobilisierung der ersten Aminosäure auf dem Trityllinker wurde ein *N*^α-Fmoc-geschützter Lysinallylester benötigt. Ausgehend von *N*^α-Fmoc-*N*^ε-Boc-geschütztem Lysin (dieses wurde von E. Simon synthetisiert und bereitgestellt) wurde die Carboxylfunktion durch Reaktion ihres Cäsiumsalzes mit Allylbromid in 58% Ausbeute in den Ester **1** überführt. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch 50% TFA folgte die Beladung des Chlortrityl-Polystyrol-Harzes unter basischen Bedingungen. Die Beladung des gewaschenen und unter vermindertem Druck getrockneten Harzes **2** konnte mittels UV-Fmoc-Methode bestimmt werden und betrug 0.41 mmol/g (Abbildung 18).

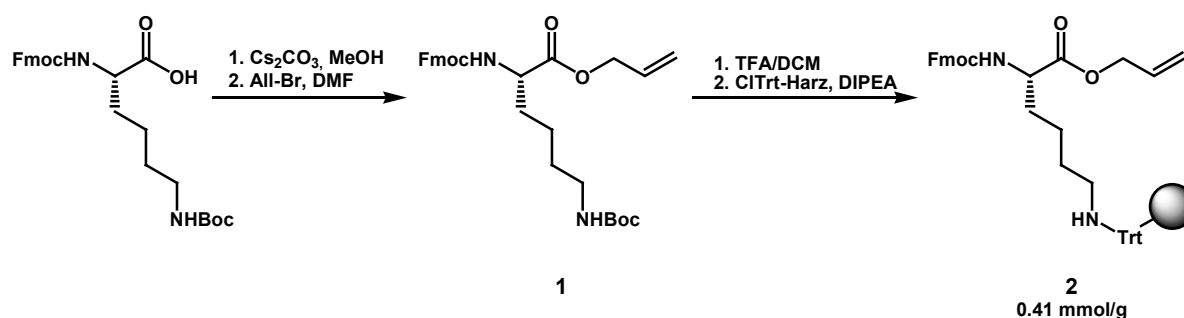


Abbildung 18. Synthese des Fmoc-geschützten Lysinallylesters **1** und Beladung des Harzes **2**.

N^α-Fmoc-*N*^ε-Aloc-geschütztes Lysin konnte nach einer bekannten Vorschrift hergestellt werden.^[143] Ausgehend von L-Lysin wurde die Aloc-Schutzgruppe, nach Maskierung der Aminosäurefunktion mit Kupfer(II), eingeführt.

Nach Freisetzen der N^α -Aminofunktion wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch Reaktion mit Fmoc-Chlorid in wässriger Lösung eingeführt. Das Produkt **2** konnte in 62% Ausbeute isoliert werden (Abbildung 19).

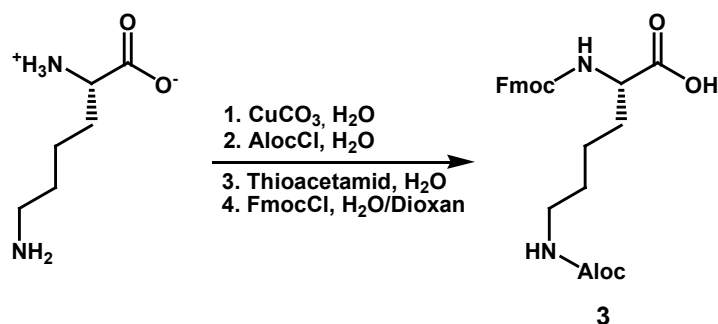


Abbildung 19. Synthese von N^α -Fmoc- N^ϵ -Aloc-L-Lysin **3**.

4.2.2 Synthese der Argininderivate

Ein Argininderivat mit Aloc-geschützter Seitenkette, welches für die Synthese des D-Ral-C-Terminus verwendet werden sollte, war zu Beginn der Arbeit kommerziell nicht erhältlich, eine Synthese durch den Austausch einer N^α -Boc-Schutzgruppe gegen die Fmoc-Schutzgruppe war zwar literaturbekannt, die Ausbeute von 15% schien jedoch ungeeignet, um die Verbindung in größeren Mengen herzustellen.^[144]

Da die Maskierung einer Aminosäurefunktion durch Chelatbildung mit Kupfer(II)salzen prinzipiell für alle Aminosäuren möglich ist (Abbildung 20) und auch für die Darstellung von N^ω -Phosphoarginin erfolgreich angewendet wurde,^[145] wurde diese Syntheseroute zur Herstellung von **6** eingesetzt. Obwohl sich der Arginin-Kupfer-Chelat-Komplex **32** bildete, der durch eine tiefblaue Farbe charakterisiert ist, gelang die Umsetzung mit Allylchloroformat zum bis-Aloc-geschützten Argininderivat **33** nicht.

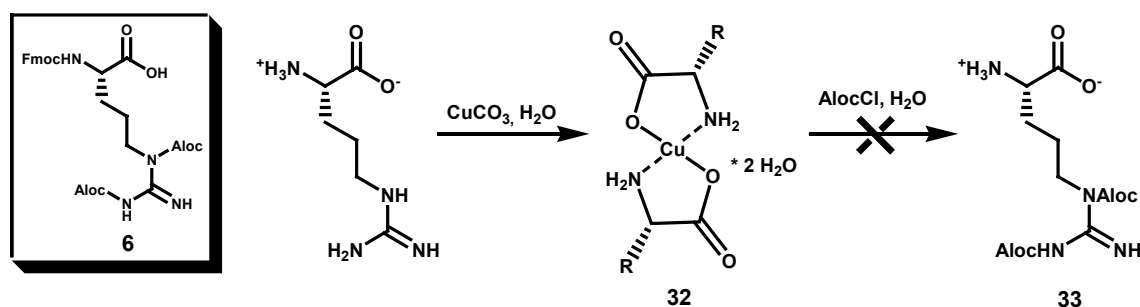


Abbildung 20. Bildung des Arginin-Kupfer-Komplex **32**.

Eine Synthese der Zielverbindung durch Umsetzung von L-Arginin mit Fmoc-Chlorid zur N^α -geschützten Aminosäure und anschließende Umsetzung mit Allylchloroformat führt ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt.

Die Einführung der Boc-Schutzgruppe in wässriger Lösung, eine nachfolgende Silylierung mit Trimethylsilylchlorid und anschließende Einführung der Aloc-Schutzgruppen lieferte N^α -Boc- $N^{\delta,\omega}$ -bis-Aloc-Arginin in moderater Ausbeute. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 50% Trifluoressigsäure in Dichlormethan und Einführung der Fmoc-Schutzgruppe konnte zwar die Literatursausbeute im letzten Schritt von 15% auf 33% verbessert werden, die Gesamtausbeute an N^α -Fmoc- $N^{\delta,\omega}$ -Aloc-Arginin **6** mit 19% in vier Schritten war jedoch für die Synthese eines Bausteins, welcher in der Festphasensynthese in hohem Überschuss eingesetzt werden sollte, ineffizient (Abbildung 21).

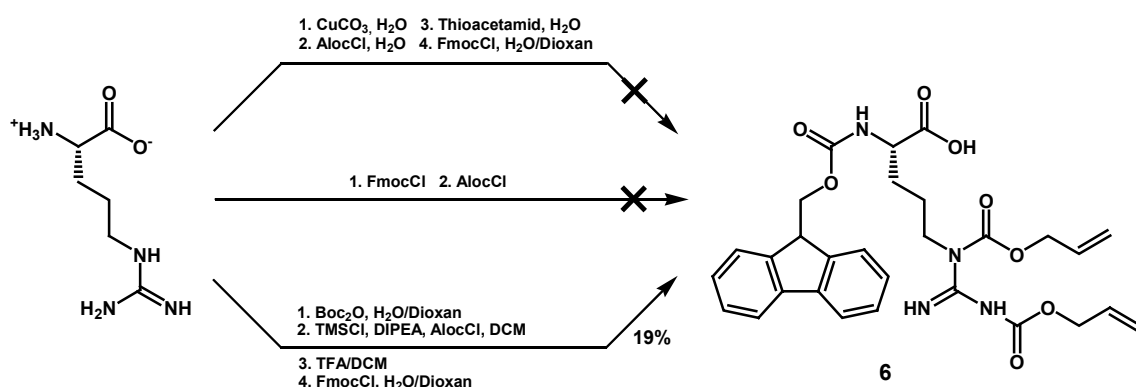


Abbildung 21. Syntheserouten zur Darstellung von N^α -Fmoc- $N^{\delta,\omega}$ -bis-Aloc-Arginin **6**.

Die Verwendung von bis-Aloc-geschützten Guanylierungsreagenzien, analog dem literaturbekannten N,N' -bis-Boc-1H-pyrazol-1-carboxamidin **34**^[146, 147], schien eine vielversprechende Alternative zur Synthese von **6** zu sein. Durch die Umsetzung

eines Fmoc-geschützten Ornithins mit dem bis-Aloc-geschützten Guanylierungsreagenz wäre die Zielverbindung zugänglich.

Das Pyrazolcarboxamidin **7** konnte durch die Reaktion von Pyrazol mit Cyanamid in wasserfreiem 1N salzsaurem 1,4-Dioxan unter Rückfluss hergestellt werden (Abbildung 22).

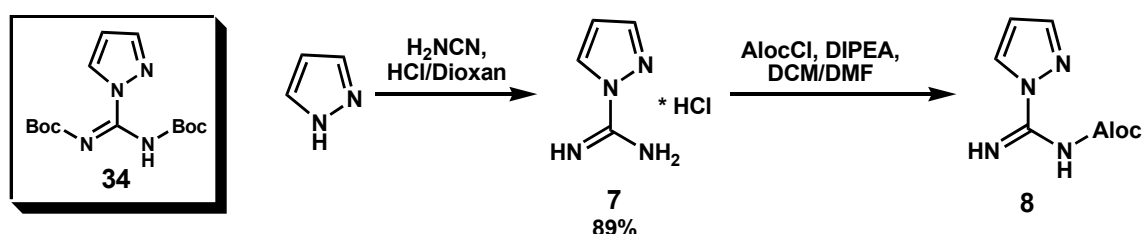


Abbildung 22. Synthese von *N*-Aloc-1H-pyrazol-1-carboxamidin **8**.

Die Reaktion mit Allylchloroformat unter Zugabe von Di-*iso*-propylethylamin führte zu *N*-Aloc-1H-pyrazol-1-carboxamidin **8** (nicht isoliert, als Rohprodukt NMR-spektroskopisch analysiert). Diese Verbindung konnte jedoch nicht in Analogie zur bekannten Vorschrift zur Synthese von *N,N'*-bis-Boc-1H-pyrazol-1-carboxamidin unter Verwendung von Natriumhydrid zum bis-Aloc-geschützten Pyrazolcarboxamidin umgesetzt werden.

Ab Februar 2002 war N^α -Fmoc- $N^{\delta,\omega}$ -Aloc-Arginin kommerziell erhältlich (Senn Chemicals, Dielsdorf, Schweiz), so dass die Synthese dieser Verbindung nicht weiter verfolgt wurde.

4.2.3 Synthese der Cysteinderivate

Der Synthese verschiedener Cysteinderivate vorausgehend wurde die Synthese von all-trans-Geranylgeranylchlorid **13** durchgeführt. Diese Verbindung kann zur Alkylierung der Thiofunktion von Cystein eingesetzt werden, um so geranylgeranyierte Derivate zu erhalten. All-trans-Geranylgeraniol, welches leicht durch Reaktion mit N-Chlorsuccinimid in das Chlorid überführt werden kann, ist kommerziell erhältlich. Aufgrund ökonomischer Gesichtspunkte ist jedoch in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Waldmann eine Synthese etabliert worden.

Ausgehend von kommerziell erhältlichem Farnesylbromid **35** wurde nach besagter Vorschrift in 4 Stufen Geranylgeraniol hergestellt (Abbildung 23).

Farnesylbromid wurde mit Acetessigsäureethylester zu all-trans-3,7,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester **9** umgesetzt, der mit Kaliumhydroxid in ethanolischer Lösung zu all-trans-6,10,14-Trimethyl-pentadeca-5,9,13-trien-2-on **10** verseift und decarboxyliert wurde. In einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion wurde das Keton mit Di-*iso*-propyl(ethoxycarbonylmethyl)-phosphonat und Natriumhydrid zum 3,7,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,10,14-teraensäureethylester **11** umgesetzt.

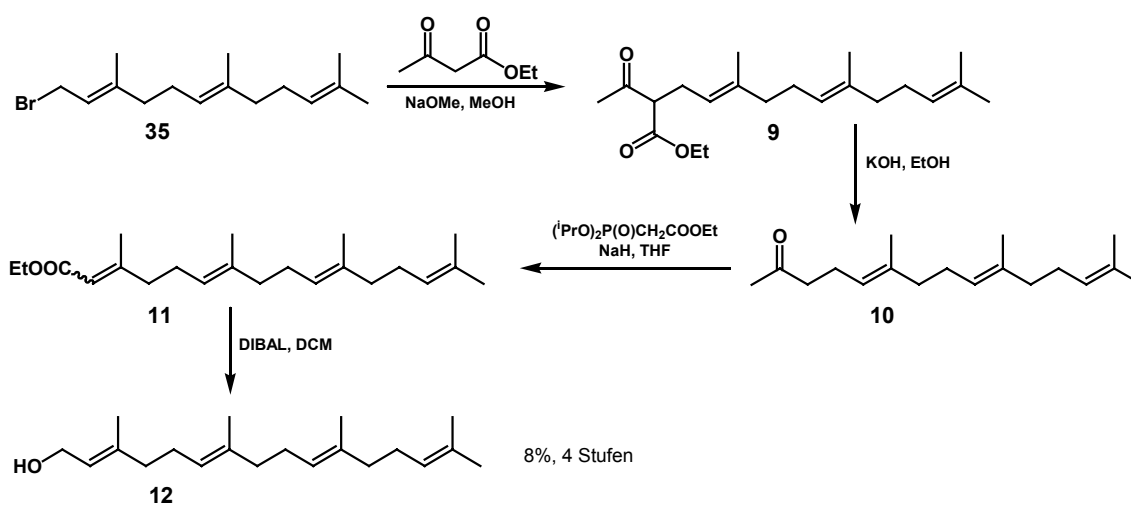


Abbildung 23. Syntheseroute zur Darstellung von Geranylgeraniol **12**.

Hierbei entstand ein Gemisch der all-*E*- und *E,E,Z*-Isomeren. Die Reduktion der Ester zum Alkohol **12** wurde durch Reaktion mit Di-*iso*-butylaluminiumhydrid (DIBALH) in trockenem Dichlormethan erreicht. Die Trennung der beiden isomeren Alkohole ist aufgrund sehr ähnlicher Retentionszeiten bei der Flash-Chromatographie sehr aufwendig. Nach jeder chromatographischen Trennung erhält man das all-*E*-Isomer, Mischfraktionen, sowie das *E,E,Z*-Isomer. Die Mischfraktionen wurden erneut durch Flash-Chromatographie gereinigt. Nach der vierstufigen Reaktionssequenz und insgesamt sieben flash-chromatographischen Trennungen betrug die Ausbeute an all-*E*-Geranylgeraniol lediglich 8%.

Das so erhaltene Geranylgeraniol konnte in einer Corey-Kim-ähnlichen Reaktion, durch Umsetzung mit einem bei tiefer Temperatur *in situ* aus *N*-Chlorsuccinimid (NCS) und Dimethylsulfid (DMS) gebildetem Salz, in Ausbeuten bis zu 99% in

ausgezeichneter Reinheit zum Geranylgeranylchlorid **13** umgesetzt werden (Abbildung 24). Hierbei ist zu beachten, dass das Produkt durchaus flüchtig ist und ein Trocknen im Vakuum über mehr als 16 h vermieden werden sollte.

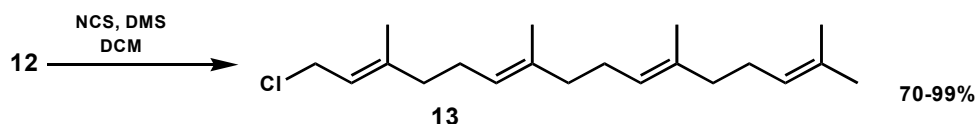


Abbildung 24. Umsetzung des Geranylgeraniols zum Geranylgeranylchlorid **13**.

Im $^1\text{H-NMR}$ können der Alkohol und das Chlorid nur durch die chemische Verschiebung der benachbarten Methylengruppe unterschieden werden, ansonsten sind die Signale beider Verbindungen quasi identisch. Die Verbreiterung des Dubletts beim Geranylgeraniol entsteht durch den Austausch des aziden Alkohol-Protons (Abbildung 25).

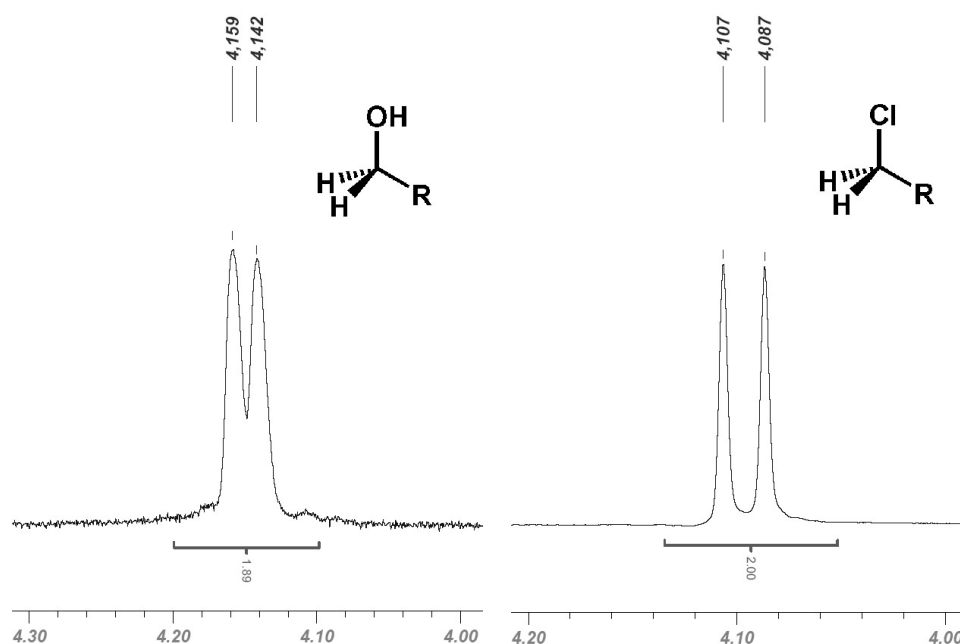


Abbildung 25. $^1\text{H-NMR}$ -Signale der benachbarten Methylengruppe des Geranylgeraniols (links) und des Geranylgeranylchlorids (rechts).

Die Prenylierung von Cystein oder Cysteinmethylester wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Brown et al.*^[114] mit dem Chlorid **13** in 4N methanolischer Ammoniaklösung durchgeführt. Der Methylester **14** konnte in einer Ausbeute von 64% isoliert werden. Hier konnten durch die Verwendung von Dichlormethan/Methanol-Gemischen bessere Trennungen als mit Cyclohexan/Ethylacetat-Gemischen erzielt werden. Aufgrund des geringen eingesetzten Methanolanteils muss das Mischungsverhältnis genau eingehalten werden, da sonst keine Trennung erreicht werden kann.

Die freie Säure **36** wurde nicht isoliert, statt dessen wurde das Rohprodukt der Alkylierung ohne vorherige Reinigung mit Fmoc-Succinimid unter Zusatz von Triethylamin in 46% Ausbeute zum *N*^α-Fmoc-geschützten Derivat **15** umgesetzt (Abbildung 26).^[148]

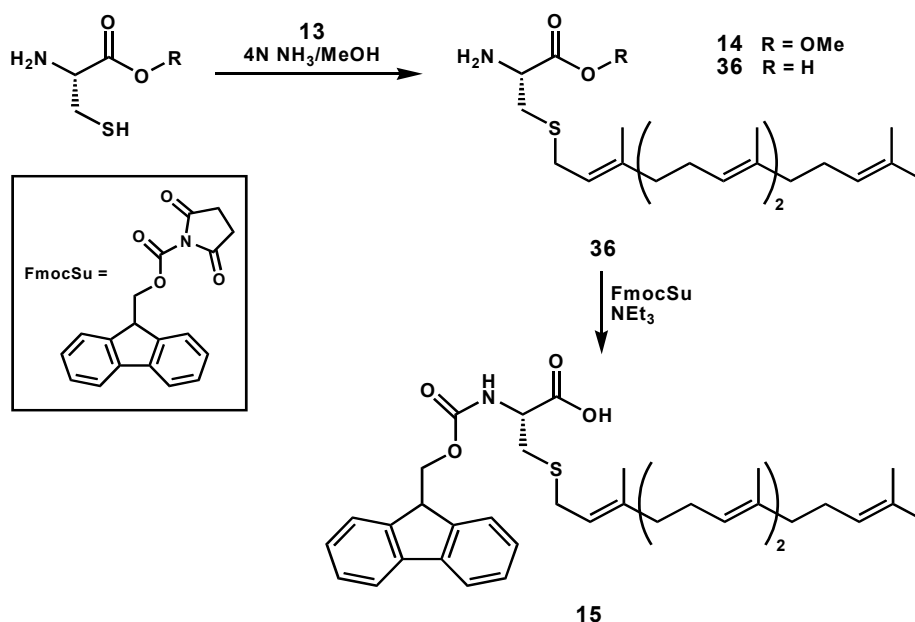


Abbildung 26. Synthese geranylgeranylierter Cysteinderivate.

Um ein C-terminal fluoreszenzmarkiertes Cysteinderivat zu erhalten, wurde zunächst Dansyl mit Ethylendiamin zur Reaktion gebracht; so wurde *N*-(2-Aminomethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid (DANSA) erhalten.^[149] Nach Umkristallisieren aus Ethanol konnte **16** in 73% Ausbeute erhalten werden (Abbildung 27).

Die Kupplung des Fmoc-geschützten, geranylgeranylierten Cysteinderivats **15** mit **16** wurde unter Verwendung von HBTU als Kupplungsreagenz durchgeführt. Nach dem Voraktivieren des Cysteinderivats in einem DMF/DCM-Gemisch wurde dieses mit dem fluoreszenzmarkierten Ethylendiaminderivat umgesetzt. Nach anschließender

chromatographischer Reinigung an Silica-Gel konnte das C-terminal fluoreszenzmarkierten Cysteinderivat **17** in 73% Ausbeute isoliert werden. Hier musste ebenfalls auf eine exakte Einstellung des Mischungsverhältnis des Eluens geachtet werden, um eine Abtrennung von Verunreinigungen zu erreichen.

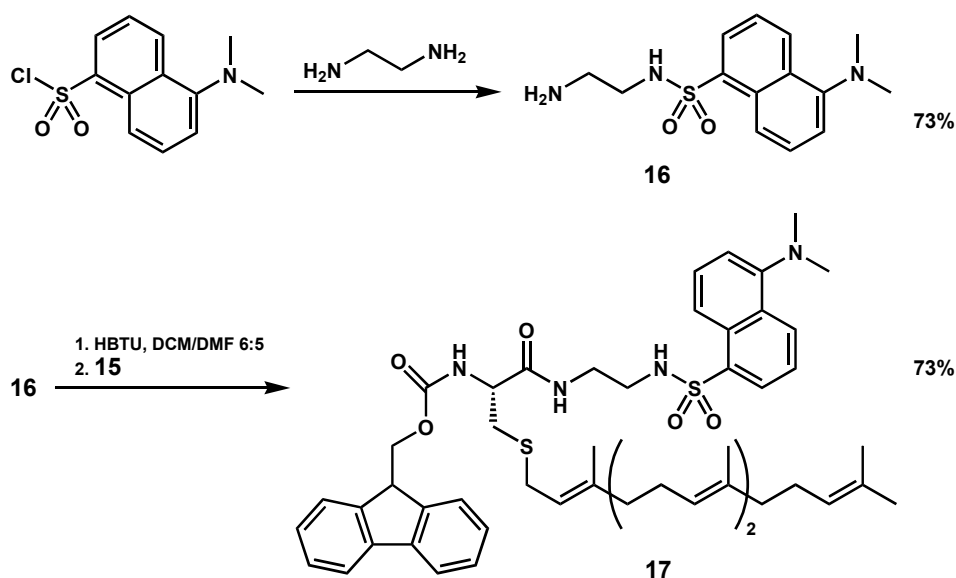


Abbildung 27. Synthese von *N*-(2-aminomethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid **16** und C-terminale Kupplung an das Cysteinderivat **15**.

Analog konnten der farnesylierte Cysteinmethylester **18** und das dansylmarkierte, Fmoc-geschützte Cysteinderivat **20** ausgehend von kommerziell erhältlichem Farnesylchlorid oder Farnesylbromid synthetisiert werden und in 87% bzw. 56% isoliert werden (Abbildung 28).

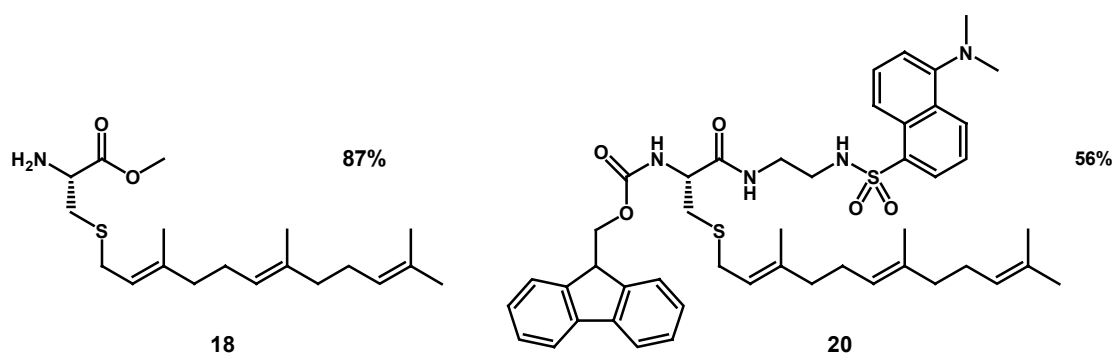


Abbildung 28. Der farnesylierte Cysteinmethylester **18** und das dansylmarkierte Cysteinderivat **20**.

Als N-terminale Aminosäure sollte in der Peptidsynthese *N*-Aloc-*S*-*tert*-butylthio-cystein verwendet werden, wodurch eine simultane Abspaltung aller Schutzgruppen

und die Abspaltung von der festen Phase in zwei Schritten ermöglicht werden sollte. Dieser Aminosäure-Baustein ist kommerziell nicht erhältlich und musste daher selber synthetisiert werden. *S-tert*-Butylthiocystein **21** konnte durch Reaktion von L-Cystin mit *tert*-Butylmercaptan in basischem Medium synthetisiert werden. Zur Oxidation des nichtumgesetzten L-Cystins musste dem Ansatz für 5 Tage Luftsauerstoff zugeführt werden. Durch diese Maßnahme wurde die Abtrennung des Produkts erheblich erleichtert. Nach mehreren Testreaktionen zur Bestimmung der optimalen Konditionen konnte *S-tert*-Butylthiocystein **21** durch Umsetzung mit Allylchloroformat in einem 2:1-Gemisch von 2N Natriumcarbonat-Lösung mit 1,4-Dioxan in die Zielverbindung **22** überführt werden (Abbildung 29).

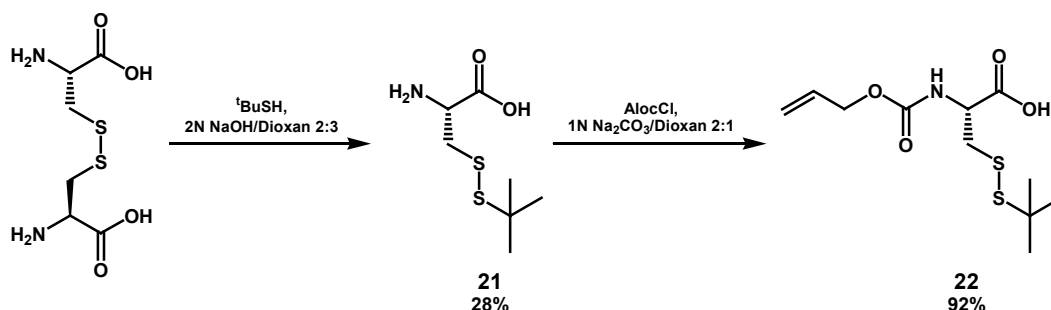


Abbildung 29. Synthese von *N*-Alc-*S-tert*-butylthio-cystein **22** ausgehend von L-Cystin.

4.2.4 Synthese des Palladium-Katalysators Tetrakistriphenylphosphinpalladium(0)

Der Katalysator Tetrakistriphenylphosphinpalladium(0) zur Abspaltung der Allyloxy-carbonyl- und Allylschutzgruppen sowohl in Lösung als auch in der Festphasensynthese war literaturbekannt.^[150] Dieser war zwar kommerziell erhältlich, wegen der Labilität gegen Feuchtigkeit und Luftsauerstoff schien es jedoch ratsam, die Synthese selbst durchzuführen.^[151, 152]

Zur Herstellung wurde Palladium(II)chlorid mit einem Überschuss von Triphenylphosphin und Hydrazinhydrat in trockenem Dimethylsulfoxid umgesetzt. Nach Abfiltrieren des kristallinen Produkts, Waschen mit Diethylether und zweitägigem Trocknen unter vermindertem Druck wurde die Zielverbindung Tetrakistriphenylphosphinpalladium(0) **23** in 93% Ausbeute isoliert. Alle Schritte

wurden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Das Produkt wurde unter Schutzgas bei -18°C gelagert.

4.3 Festphasensynthese lipidierter, polybasischer Peptide

Wie bereits im Allgemeinen Teil (2.2.5 Festphasensynthese lipidierter Peptide) erwähnt, ist die Synthese lipidierter Peptide mit einer Anzahl von Problemen behaftet. Die Basen- und Säurelabilität schränkt die Auswahl an geeigneten Schutzgruppen und Linkern für die Festphasensynthese stark ein, die lipidierten Aminosäure-Bausteine sind kommerziell nicht erhältlich, sondern müssen selber synthetisiert werden und sind oft nicht sehr stabil.

Eine weitere Problematik wird dadurch in den Hintergrund gedrängt: das Auftreten von ungenügenden Kupplungsausbeuten aufgrund der Aminosäuresequenz des aufzubauenden Peptids. In der Festphasensynthese von Peptiden werden solche Peptidteilstrukturen auch als „schwierige Sequenzen“ (engl. *difficult sequences*) bezeichnet. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass es im Verlauf der Synthese zur unvollständigen Entschützung des N-Terminus und/oder zu unvollständiger Kupplungen der nachfolgenden Aminosäure kommt. Dieses Phänomen kann mehrere Ursachen haben: ein offensichtlicher Grund ist der sterische Anspruch einiger Aminosäuren wie Valin oder Isoleucin, wodurch der reaktive N-Terminus schlecht zugänglich ist. In vielen Protokollen zur Festphasensynthese wird nach der Kettenverlängerung mit Prolin eine Doppel-Kupplung der nächsten Aminosäure empfohlen, aufgrund der Sterik und da es sich um ein sekundäres Amin mit geringerer Reaktivität handelt.^[153, 154]

Ab Kettenlängen von 10 Aminosäuren kann es ausserdem zur Ausbildung sekundärer Strukturen wie β -Faltblättern oder α -Helices kommen, die eine zusätzliche sterische Hinderung darstellen. Erstere werden vor allem bei Alanin-, Valin- oder Isoleucin-reichen Sequenzen beobachtet, letztere treten häufiger bei Aminosäuren mit polarer Seitenkette auf. Durch polare Seitenketten kann es ausserdem zu einer Vernetzung durch H-Brücken kommen; sowohl zwischen den wachsenden Polypeptidketten selber (*interchain clustering*), als auch mit dem Harz. Die Auswirkungen dieser Quervernetzung ist eine verminderte Quellfähigkeit des

Harzes, wodurch der Zugang für Lösemittel und Reagenzien eingeschränkt wird. Die Verwendung polarer Lösemittel wie N-Methylpyrrolidon, reaktiverer Kupplungsreagenzien oder chaotroper Salze kann hier Abhilfe schaffen.^[153-155]

Ein Beispiel ist die erste Synthese des K-Ras 4B-C-Terminus durch die Gruppe von *M.H. Gelb* bei der alle Aminosäuren (mit Ausnahme des ersten Bausteins, der auf dem Harz immobilisiert wurde) zwei- bis vierfach gekuppelt werden mussten, um eine akzeptable Ausbeute zu erreichen. Die Ausbeute an farnesyliertem Peptid betrug letztendlich jedoch lediglich 0.7%.^[117, 156]

Die Festphasensynthese von Peptiden kann in vielen Fällen mittlerweile automatisiert mit sog. Synthesizern betrieben werden, lipidierte und/oder polybasische Peptide und andere schwierige Sequenzen bleiben davon jedoch ausgenommen.

4.3.1 Festphasensynthese von D-Ral-Peptiden

Die D-Ral-Peptide wurden ausgehend von dem mit N^α -Fmoc-Lysin-allylester beladenen Trityl-Harz **2** aufgebaut. Durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in trockenem THF wurde die Säurefunktion aus dem Allylester freigesetzt (Abbildung 29). Bei der Reaktion musste unter Luftabschluss gearbeitet werden, da der Katalysator durch Oxidation mit Luftsauerstoff deaktiviert wird. Desweiteren muss dem Ansatz 1 Vol-% Phenylsilan zugesetzt werden. Das Silan dient als *Allyl-scavenger* und übernimmt die entstehende Allyl-Liganden vom Palladiumkatalysator unter gleichzeitiger Regenerierung desselbigen (Abbildung 30).

C-terminal wurde mit einem Cysteinderivat unter Verwendung von PyBOP in 4% N-Methylmorpholin/DMF als Kupplungsreagenz verlängert. Der geranylgeranylierte Cysteinmethylester **14** konnte ohne weitere Vorbehandlung gekuppelt werden. Bei der Synthese des fluoreszenzmarkierten C-Terminus von D-Ral wurde Fmoc-Cys(GerGer)-DANSA **17** eingesetzt. Von dieser Verbindung wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch Reaktion mit 20% Diethylamin/DCM entfernt. Diethylamin hat einen deutliche niedrigeren Siedepunkt (55°C) verglichen mit dem üblicherweise verwendeten Piperidin (106°C), wodurch ein schonendes Entfernen von Reagenz und Lösungsmittel erreicht werden kann. Beim Trocknen unter vermindertem Druck

muss allerdings Toluol zugegeben werden, um eine Aufkonzentration der Base Diethylamin und die damit verbundene Zerstörung des Geranylgeranylrests zu verhindern.

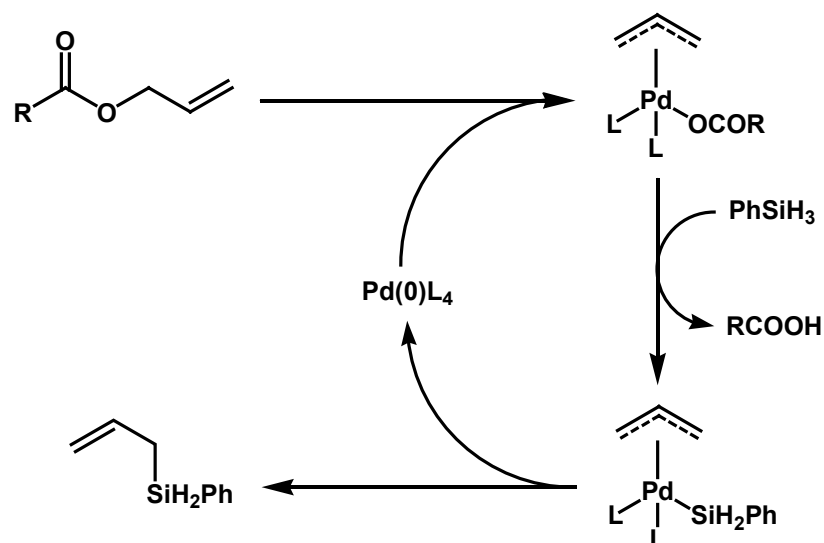


Abbildung 30. Katalysekreislauf bei der Verseifung des C-terminalen Allylesters mit Tetrakis(triphenyl)palladium(0); L = Triphenylphosphin (PPh₃).

Der Aufbau der Peptide erfolgte unter Verwendung von HBTU/HOBt in DMF mit DIPEA als Base für die Kupplung von Fmoc-Leucin. Für die Aminosäuren der polybasischen Sequenz wurde HATU/HOAt in DMF unter Zugabe von DIPEA verwendet. In Vorarbeiten von B. Ludolph in der Arbeitsgruppe von Prof. Waldmann hatte sich herausgestellt, dass akzeptable Kupplungsausbeuten beim Aufbau polybasischer Sequenzen nur bei Verwendung von HATU/HOAt erreicht werden können. Bei Verwendung weniger reaktiver Reagenzien wie dem erwähnten HBTU, kommt es zu unvollständigen Kupplungen und damit zu Abbruch und Deletionssequenzen. Die Abtrennung solcher verkürzter Peptide ist aufgrund sehr ähnlicher physikochemischer Eigenschaften problematisch.

Nach dem Aufbau der kompletten Peptidsequenz an der festen Phase wurden durch Behandlung mit Tetrakis(triphenyl)phosphinpalladium(0) alle Aloc-Schutzgruppen von den Aminofunktionen entfernt. Die Abspaltung vom polymeren Träger wurde durch Behandlung des Harzes mit 1% Trifluoressigsäure unter Zugabe von Triethylsilan zum Abfangen der polymergebundenen Tritylkationen in trockenem DCM erzielt.

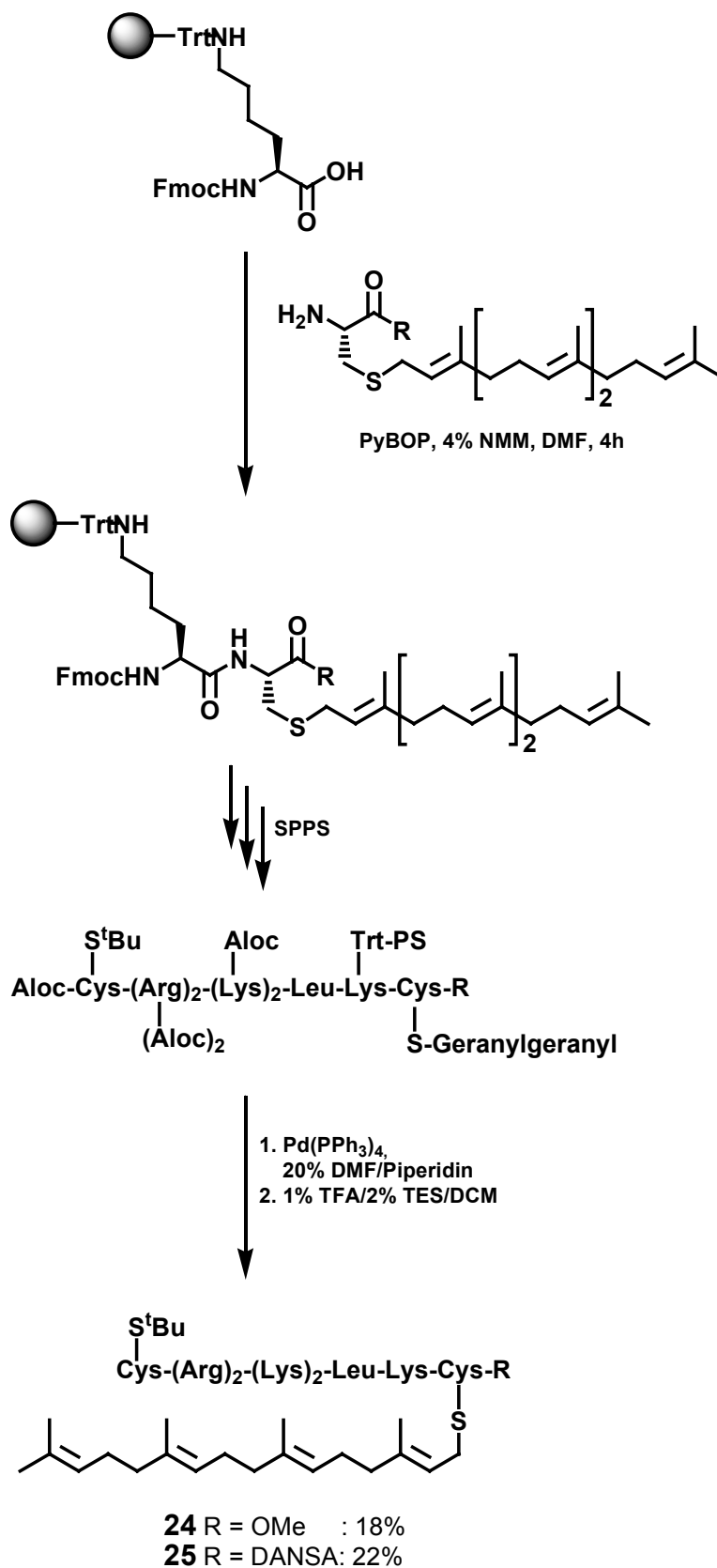


Abbildung 31. Festphasensynthese des unmodifizierten D-Ral-C-Terminus **24** und des fluoreszenzmarkierten Peptids **25**.

Die Oxidationsempfindlichkeit des Palladiumkatalysators, sowie die ausgeprägte Säurelabilität des Geranylgeranylrests erforderten die Abspaltung der Schutzgruppen und das Ablösen vom polymeren Träger unter Schutzgasatmosphäre mit argongesättigten Lösungen.

Nach dem Abspalten wurde das Harz mit Mischungen von Methanol und DCM (7:3, 1:1, 3:7 v/v) mehrfach ausgewaschen, um das Produkt vom polymeren Träger zu eluieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass fluoreszierendes Material auf dem polymeren Harz zurückblieb. Es ist unklar, ob es nur zu einer unvollständigen Abspaltung vom Harz kam. Wahrscheinlicher scheint, dass das amphiphile Peptid auf dem Polymer adsorbiert und nicht vollständig eluiert werden konnte. Polare Lösemittel, welche die Wechselwirkungen unterbrechen könnten, bewirken ihrerseits ein Schrumpfen des Harzes. Dadurch wäre ein Grossteil der Harz-Oberfläche dem Lösungsmittel nicht mehr zugänglich.

Die vereinigten Eluate wurden unter vermindertem Druck eingeeengt. Dabei muss erneut mit Toluol coevaporiert werden, da sonst Trifluoressigsäure aufkonzentriert wird und den Geranylgeranylrest zerstören kann. Nach Entfernen der Lösungsmittel und der Trifluoressigsäure wurde ein geleeartiges Rohprodukt erhalten.

Dieses Rohprodukt wurde in ca. 1 ml Methanol gelöst und in 4 Falcon-Tubes mit je 10 ml eiskaltem Diethylether präzipitiert, um nichtpeptidische Verunreinigungen wie z.B. Reste des *scavengers* Triethylsilan zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde abzentrifugiert, in destilliertem Wasser gelöst und lyophilisiert.

In einem letzten Reinigungsschritt wurden durch präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) alle restlichen Verunreinigungen abgetrennt und die Zielpeptide **24** und **25** in 18% bzw. 22% Ausbeute isoliert (Abbildung 31). In Anbetracht der schwierigen Sequenz und des offensichtlichen Verlusts von Produkt durch die Adsorption auf dem polymeren Trägermaterial ist die Ausbeute für die beiden octameren Peptide durchaus als sehr gut zu bezeichnen.

Die Analyse erfolgte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und LC-gekoppelte Massenspektrometrie (Methylester: ESI-MS m/z 1409.1 und MALDI-TOF m/z 1409.4; dansylmarkiertes Peptid: ESI-MS m/z 1671.2 und MALDI-TOF 1671.6); 2-dimensionale NMR-Spektren mussten in argongesättigtem, deuteriertem Wasser aufgenommen werden, um ein Präzipitieren der Peptide zu verhindern (Abbildungen 32, 33).

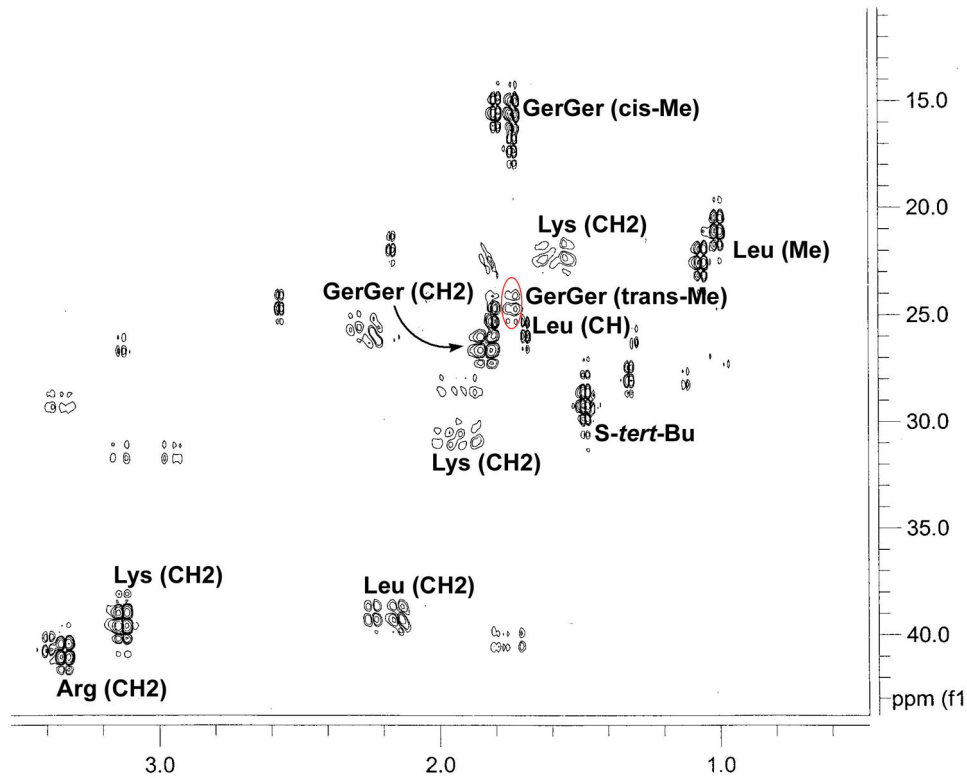


Abbildung 32. ^1H , ^{13}C -Korrelations-NMR-Spektrum des D-Ral-C-Terminus im Hochfeld-Bereich.

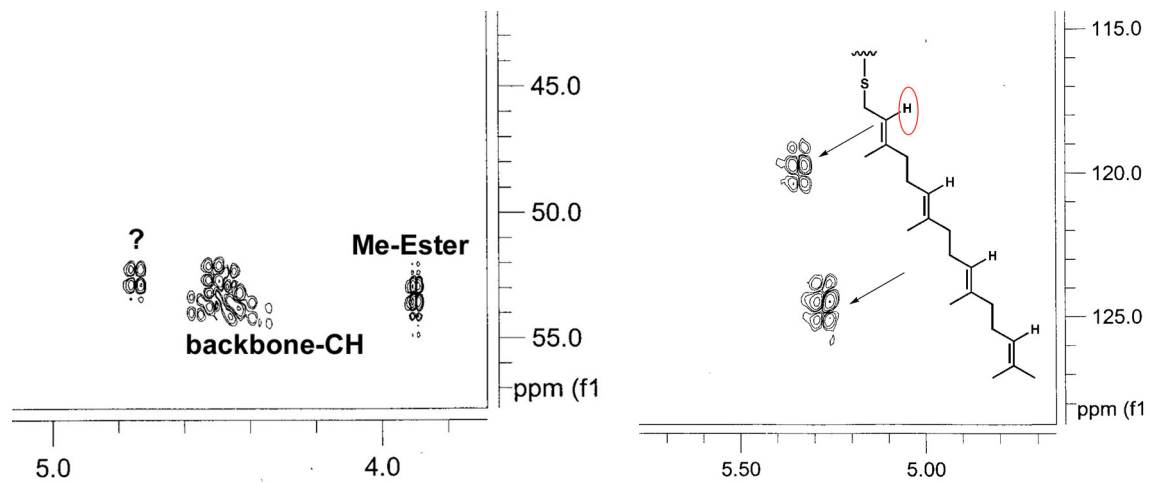


Abbildung 33. ^1H , ^{13}C -Korrelations-NMR-Spektrum der α -Protonen (links), sowie der charakteristischen Signale des Geranylgeranylrests (rechts).

4.3.2 Festphasensynthese von K-Ras 4B-Peptiden

Der C-Terminus des K-Ras 4B-Proteins konnte prinzipiell in gleicher Weise wie die D-Ral-Peptide aufgebaut werden. Wie bereits erwähnt musste aber auch hier der Oxidationsempfindlichkeit des Katalysators und der Säurelabilität des Prenylrests Rechnung getragen werden, so dass ein Großteil der Schritte unter Schutzgasatmosphäre ausgeführt wurde.

Der Allylester des beladenen Trityl-Harzes **2** wurde durch Behandlung mit Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) abgespalten. C-terminal wurde mit den farnesylierten Cysteinderivaten **18** oder **20** verlängert. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Fmoc-geschützten, farnesylierten und Dansyl-markierten Cystein **20** erfolgte wie bereits beschrieben. Zur Kupplung wurde PyBOP in 4% *N*-Methylmorpholin/DMF verwendet.

Nach N-terminaler Entschützung wurde unter Verwendung der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt für die ersten drei Aminosäuren und HATU/HOAt für die schwierig zu kuppelnde polybasische Sequenz die gesamte Peptidsequenz aufgebaut. In einigen Ansätzen wurde innerhalb der polybasischen Sequenz mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (1:9 v/v) gecappt, um Deletionssequenzen zu minimieren. Nach Abschluss der Synthese und Aufreinigung wurde jedoch deutlich, dass diese Maßnahme weder die Ausbeute verbesserte, noch die Reinigung erleichterte. Daher wurde von der weiteren Verwendung dieser Methode abgesehen.

Anschliessend an den Aufbau des Peptids an der festen Phase wurden alle Alloc-Schutzgruppen durch Reaktion mit Tetrakis-triphenylphosphin-palladium(0) entfernt.

Durch Reaktion mit 1% Trifluoressigsäure wurde vom Trityllinker abgespalten, im gleichen Schritt wurden auch die Trityl-geschützten Seitenketten der Aminosäuren Threonin und Serin freigesetzt. Nach Ausfällen in eiskaltem Diethylether, Lösen des abzentrifugierten Pellets in Wasser, Lyophilisieren und Reinigung mittels präparativer HPLC konnten die Zielpeptide **26** und **27** in ausgezeichneten 22% bzw 35% Ausbeute isoliert werden (Abbildung 34). Die Analyse erfolgte wiederum durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und LC-gekoppelte Massenspektrometrie (Methylester: ESI-MS m/z 1744.8 und MALDI-TOF m/z 1744.4; dansylmarkiertes Peptid: ESI-MS m/z 2005.0 und MALDI-TOF 2028.1 ($M+Na^+$);, sowie durch 2-dimensionale NMR-Spektroskopie (Abbildungen 35-37).

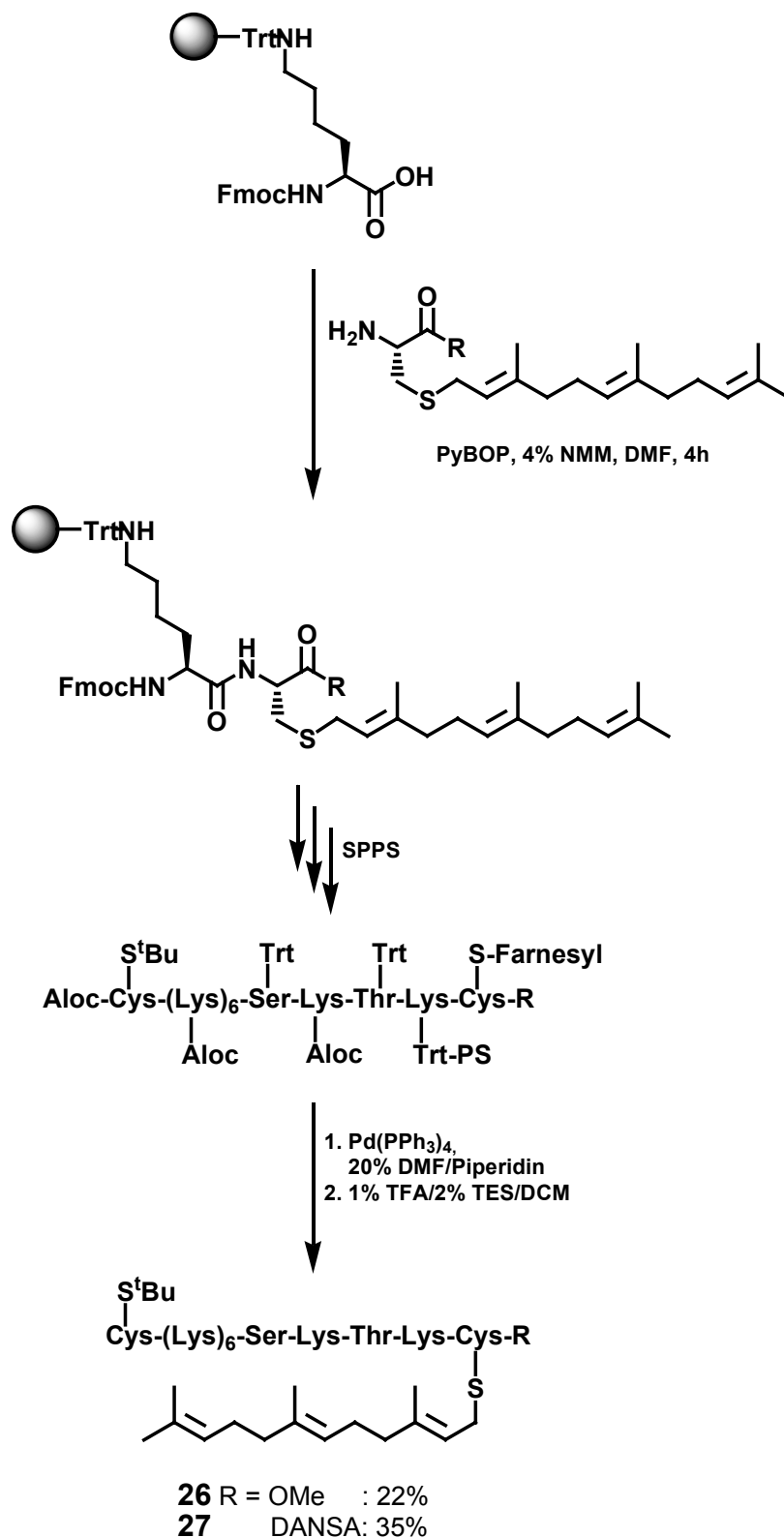


Abbildung 34. Festphasensynthese des farnesylierten K-Ras 4B-C-Terminus **26** und des farnesylierten und fluoreszenz-markierten Peptids **27**.

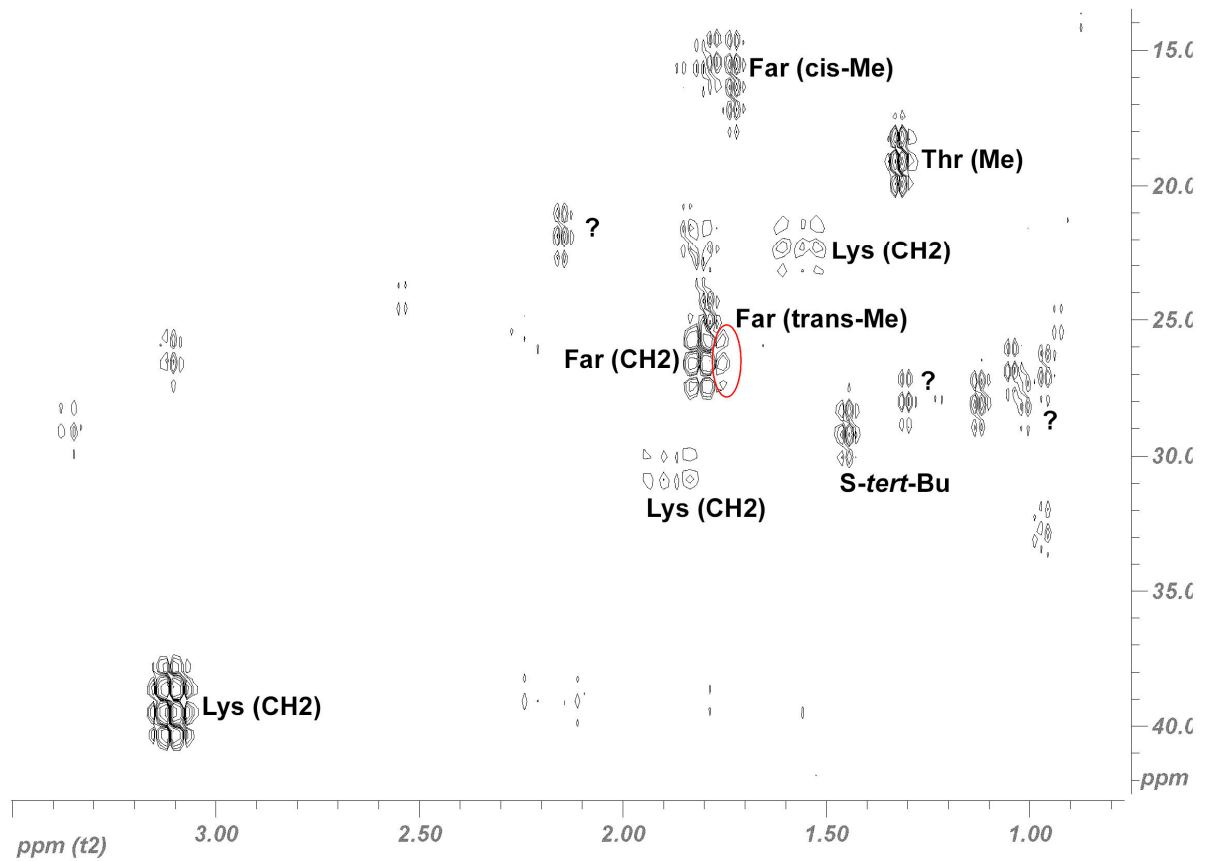


Abbildung 35. ^1H , ^{13}C -Korrelations-NMR-Spektrum des K-Ras 4B-C-Terminus im Hochfeld-Bereich.

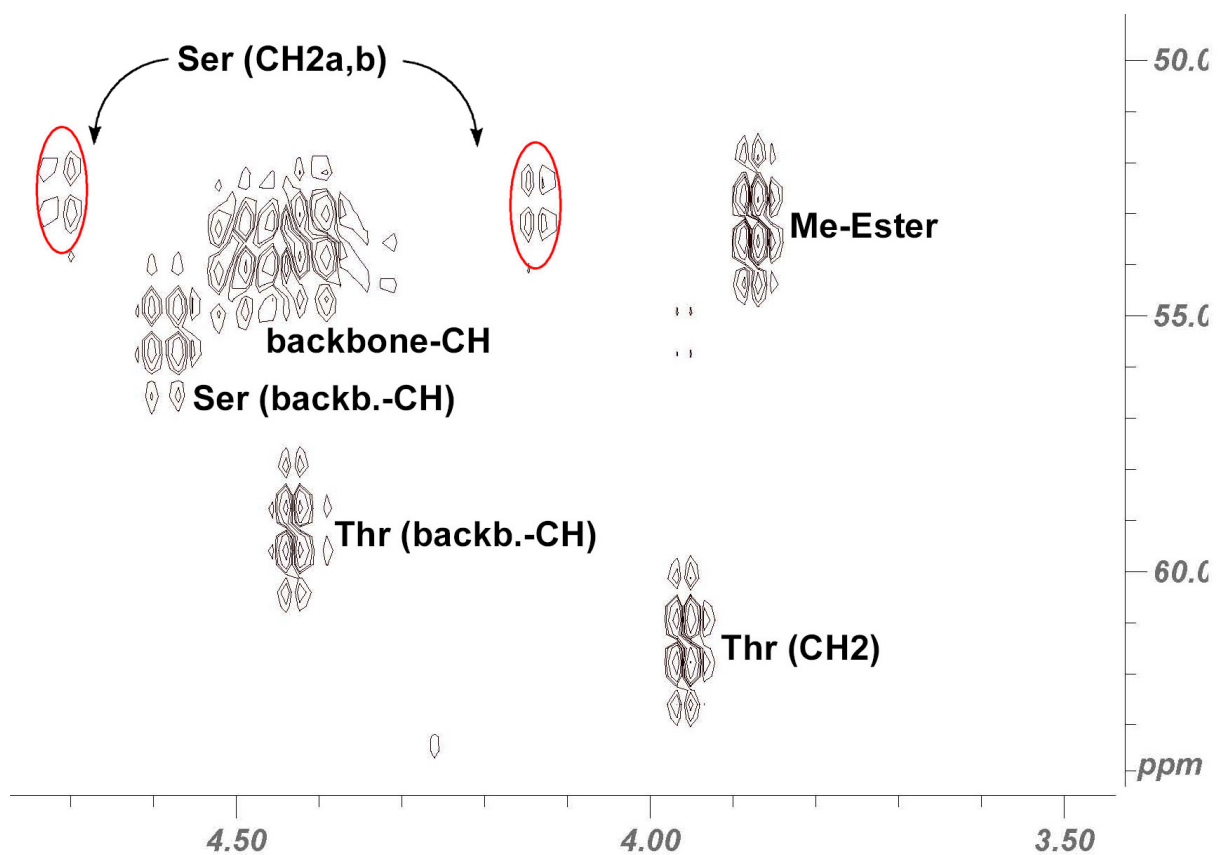


Abbildung 36. ^1H , ^{13}C -Korrelations-NMR-Spektrum der α -Protonen des K-Ras 4B-C-Terminus.

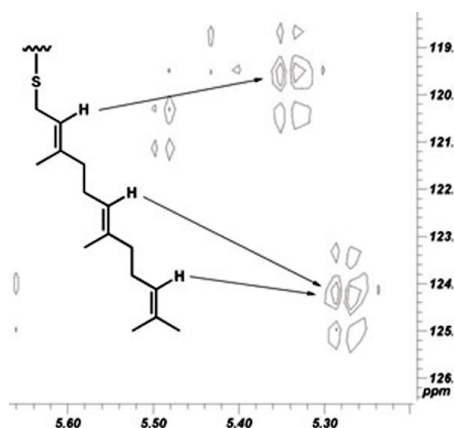


Abbildung 37. ^1H , ^{13}C -Korrelations-NMR-Spektrum der charakteristischen Signale des Farnesylrests.

4.4 Ligationen mit H-Ras

Bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Waldmann war bisher zur Ligation von chemisch synthetisierten Peptiden mit rekombinanten Ras-Proteinen ein Maleinimidcaproyl-Linker (MIC-Linker) zur Verknüpfung verwendet worden. Das Maleinimid reagiert mit freien Thiolen, also z.B. mit einem N-terminalen Cystein im rekombinanten Protein, in einer Thio-Michael-Reaktion wodurch eine Verknüpfung der beiden Moleküle herbeigeführt wird (Abbildung 38).^[140, 141, 157, 158]

In den nachfolgenden biologischen Assays stellte sich heraus, dass diese Protein-Konstrukte zur Identifizierung von Bindungspartnern der Ras-Proteine bzw. zur Lokalisierung innerhalb der Zelle erfolgreich eingesetzt werden konnten.^[140, 141] Für Bindungsstudien an künstlichen Membranen schienen solche Konstrukte jedoch ungeeignet. Die Ligationsstelle würde in direkter Nachbarschaft zur polybasischen Sequenz der Proteine lokalisiert sein, wodurch eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften zu erwarten wäre. Zum einen unterscheidet sich die Sterik des MIC-Linkers deutlich vom Raumanpruch einer natürlichen Peptidbindung. Peptide, welche einen MIC-Linker für eine anschließende Ligation tragen, werden in der Regel um eine Aminosäure verkürzt, um die Länge des Linkermoleküls zu kompensieren. Der Einfluss der Seitenkette der entfernten Aminosäure geht verloren. Des weiteren finden die Verknüpfung mit einem rekombinanten Protein oder einem anderen Peptid an einer Cystein-Thiofunktion statt. Die entstehende Bindung weicht in ihrer Geometrie stark von einer linearen Peptidkette ab. Durch den Einbau eines

Heterozyklus in das Protein/Peptid-*backbone* werden die Torsionswinkel ϕ und ψ stark beeinflusst, wodurch des Peptid andere Sekundärstrukturen aufweisen kann. Es wurde daher die Synthese mittels *expressed protein ligation angestrebt*.

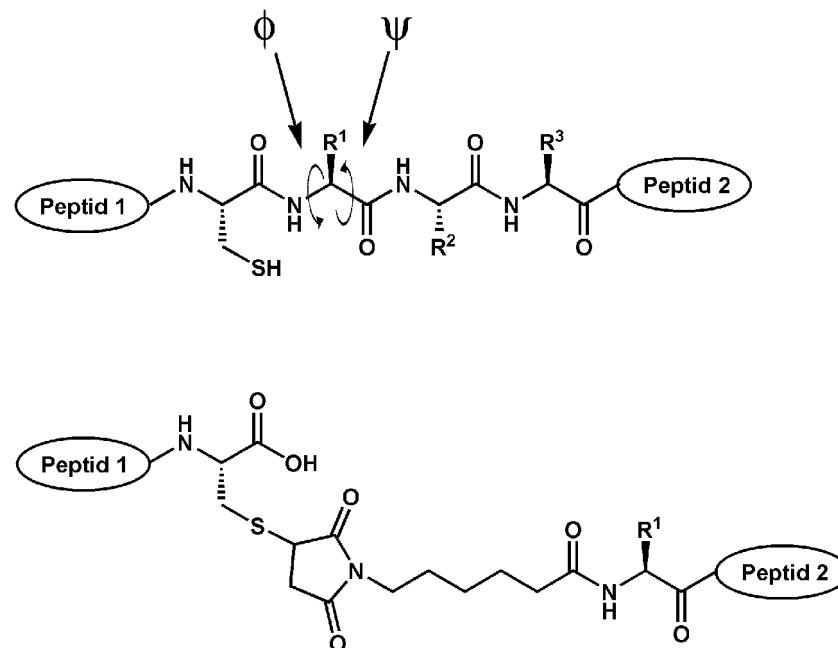


Abbildung 38. Gegenüberstellung: natürliches Peptid-*backbone* und MIC-verknüpftes Peptid.

Alle bisherigen Versuche, Ras-Proteine mit einem nativen *backbone* durch den Einsatz der *expressed protein ligation* (EPL) zu synthetisieren, führten zum Präzipitieren des Proteins. Da die Ligation standardmässig in wässrigem Medium durchgeführt wird, konnte angenommen werden, dass die Verknüpfung mit einem lipophilen Peptid zu erhöhter Hydrophobie und damit zum Ausfallen des Proteins führte. Ein weiteres Problem stellt die Oxidationsempfindlichkeit der rekombinanten Ras-Proteine dar, die dazu tendieren ihre Sekundärstruktur zu verlieren und auszufallen.^[158, 159] Nach Rückfaltung und Solubilisierung des Ligationsprodukts konnte selbiges jedoch nicht isoliert werden und nur durch tryptischen Verdau und massenspektrometrische Analyse des SDS-PAGE-Gels nachgewiesen werden.^[140] Rab-Proteine und deren Hefe-Analoga, die Ypt-Proteine, dagegen konnten erfolgreich durch EPL synthetisiert werden. Den Ligationen wurde das Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) zugesetzt, wodurch eine bessere Umsetzung der Edukte erreicht werden konnte. Micellen (wie Detergentien sie ausbilden können) sind bekannt dafür, dass sie Reaktionen katalysieren können, indem sie Produkte oder Zwischenstufen stabilisieren, Dissoziationskonstanten

modulieren oder Substrate günstig zueinander orientieren. Letzteres scheint für die Beschleunigung der Ligationsreaktion zuzutreffen. Durch die Einlagerung in die Micellen könnten das rekombinante Protein und das synthetische Peptid in räumlicher Nähe fixiert werden, was die Reaktion beschleunigt und bessere Kupplungsausbeuten erzielt werden.^[160] Die Reinigung gelang nur durch ein Ausfällen des Proteins und Waschen mit organischen Lösungsmitteln zum Entfernen des nichtumgesetzten Peptids. Nachfolgend konnte eine Rückfaltung durch Anwendung einer Lösung von Arginin, Trehalose und 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat (CHAPS) erreicht werden. Eine Isolierung des rückgefalteten Proteins war nur durch Komplexierung mit zwei Bindungspartner der Rab-Proteine (*Rab Escort Protein 1* oder *Rab Guadinucleotid Dissociation Inhibitor*) möglich.^[142, 160-162]

Entsprechende Chaperone, die Ras-Proteine solubilisieren können, sind derzeit nicht bekannt. In den anstehenden Ligationen der synthetischen K-Ras 4B- und Ral-Peptide sollte Triton X-114 als Detergenz verwendet werden, da es möglich ist dieses durch eine temperaturbedingte Phasentrennung von der wässrigen Pufferlösung abzutrennen. Ausserdem musste darauf geachtet werden, ein Ausfallen des Ligationsprodukt so weit wie möglich zu vermeiden.

Für die Ligationen sollte ein Thioester von verkürztem, rekombinantem H-Ras (Aminosäuren 1-180) verwendet werden. Daher wurde ein Vektor in den *E. coli*-Stamm BL21 (D3) eingebracht durch den die Überexpression eines Fusionsproteins angeregt wurde. Das Fusionsprotein bestand aus dem H-Ras(1-180)-Fragment, einem Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne (CBD). Nach dem Zellaufschluss wurde das Lysat auf eine Säule mit chitinmodifizierter stationärer Phase geladen (Chitin: Poly- β -(1-4)N-acetylglucosamin). Alle weiteren Bestandteile des Zell-Lysats konnten durch Waschen der Säule abgetrennt werden, das rekombinante Zielprotein wurde durch Waschen mit einer Lösung von Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz (MESNA) in Tris-Puffer eluiert. Das Mercaptoethansulfonat löst die Exzision aus, also das Ausschneiden des Inteins. Das Intein, welches mit der CBD verknüpft ist, verbleibt auf der Säule, es eluiert ausschliesslich der H-Ras(1-180)-MESNA-Thioester (vgl 2.3 Bioorganische Proteinsynthese). Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingengt und in Aliquoten eingefroren. Das Züchten der Zellkulturen,

sowie die Reinigung und Isolierung des rekombinanten H-Ras wurde von C. Nowak (AG Kuhlmann) durchgeführt.

4.4.1 Ligationen der K-Ras 4B-Peptide mit verkürztem H-Ras

Zur Optimierung der Ligationsbedingungen wurden Testreaktionen mit unterschiedlichen Mengen an K-Ras 4B durchgeführt. Für die Ligationen wurde ein Phosphatpuffer von hoher Salzkonzentration verwendet, der sich schon für die Ligationen der Rab-Proteine bewährt hatte. Da für die Ras-Proteine Chaperone, wie RabGDI oder REP-1, nicht bekannt sind, musste ein Ausfallen des Ligationsprodukts aufgrund des Verlusts der Tertiärstruktur/Faltung vermieden werden, da dies zum Verlust des Produkts führen würde. Es blieb aufzuklären, ob dieser Puffer auch für die Ligationen der Ras-Proteine geeignet wäre. Zur Reinigung war vorgesehen, den Ligationsansatz mit einer Triton X-114-Lösung zu behandeln und anschliessend eine temperaturbedingte Phasentrennung durchzuführen. Es wurde erwartet, dass sich das nichtumgesetzte Peptid in der Tritonphase sammeln würde, während das Ligationsprodukt in der Pufferphase verbleiben würde.

Der Puffer wurde vor jeder Verwendung durch Einleiten von Argon im Ultraschallbad mit Schutzgas gesättigt. Desweiteren wurde den Ligationsansätzen Mercaptoethanolsulfonsäure bis zu einer Konzentration von 125 mM zugesetzt. Die reduktiven Bedingungen gewährleisteten die Abspaltung der *tert*-Butylthio-Schutzgruppe vom N-terminalen Cystein der eingesetzten Peptide und verhinderten zugleich die Bildung von Disulfidbrücken.

In den ersten Ansätzen wurden zwei, vier und sechs Äquivalente des Peptids (bezogen auf ein Äquivalent Protein) eingesetzt und der Reaktionsverlauf mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die Reaktion mit erheblich höherem Umsatz des verkürzten, rekombinanten Proteins zu einem Ligationsprodukt höherer Masse verlief als in bisherigen Versuchen mit N-Ras^[140] oder auch mit den Rab- und Ypt-Peptiden.^[161] Das amphiphilen polybasische K-Ras-Peptid war in dem verwendeten Phosphatpuffer problemlos löslich, wohingegen bei den anderen erwähnten Peptiden hier bereits erste Probleme auftraten. Den Ligationen mit N-Ras oder den Rab- bzw. Ypt-Peptiden mussten daher Detergentien

zugemischt werden, um die Hydrophobie der eingesetzten Peptide zu kompensieren. Die verbesserte Löslichkeit alleine dürfte bereits eine erhebliche Beschleunigung der Ligrationsreaktion bewirkt haben.

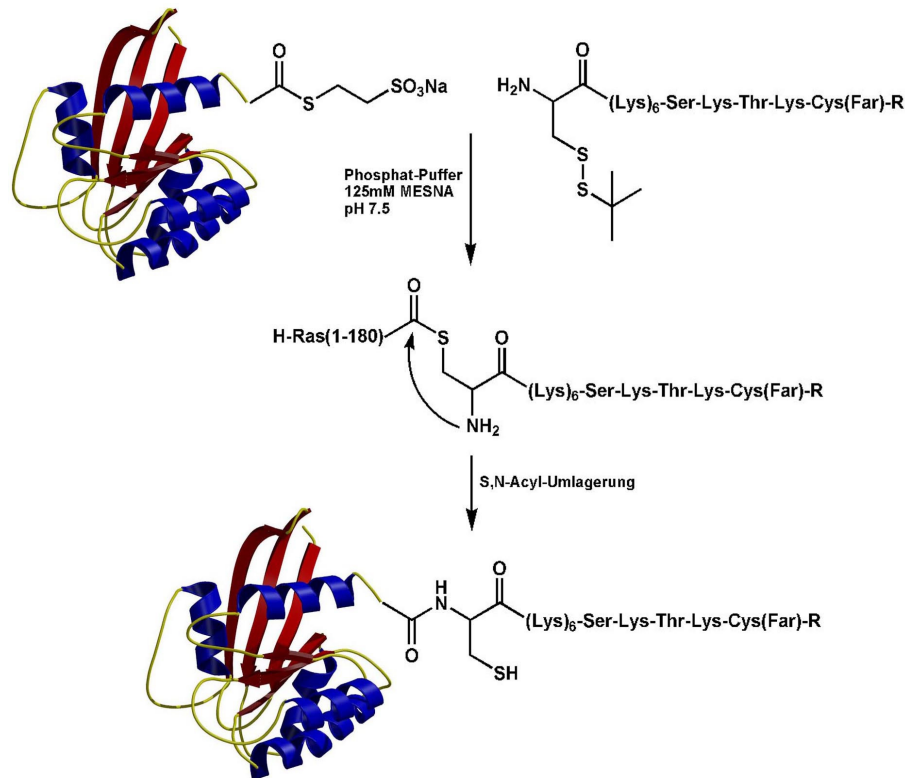


Abbildung 39. Ligation von rekombinantem H-Ras(1-180) mit den K-Ras 4B-Peptiden; R = Methylester bzw Ethylenaminodansyl.

Die Umsetzung war jedoch nicht vollständig, weswegen weitere Test-Ligationen mit fünf und zehn Äquivalenten an Peptid durchgeführt wurden (Abbildung 31).

Erfreulicherweise zeigte sich bei der Analyse dieser Ansätze, dass durch den Einsatz von zehn Äquivalenten eine nahezu vollständige Umsetzung des verkürzten H-Ras zu einem Ligrationsprodukt erreicht wurde. Die Ansätze wurden anschliessend massenspektrometrisch (MALDI-TOF-MS) untersucht (Abbildung 31B). Aufgrund der hohen Salzkonzentrationen konnten zwar keine exakten Massen bestimmt werden, doch die Abschätzung der Flächen unter den Messkurven bestätigte die Eindrücke der SDS-PAGE-Gelelektrophorese (Abbildung 31A). Während der Umsatz im ersten Fall (fünf Äquivalente des Peptids) auf 30% abgeschätzt werden konnte, schien dieser im zweiten Fall (zehn Äquivalente des Peptids) bei 90% oder mehr zu liegen.

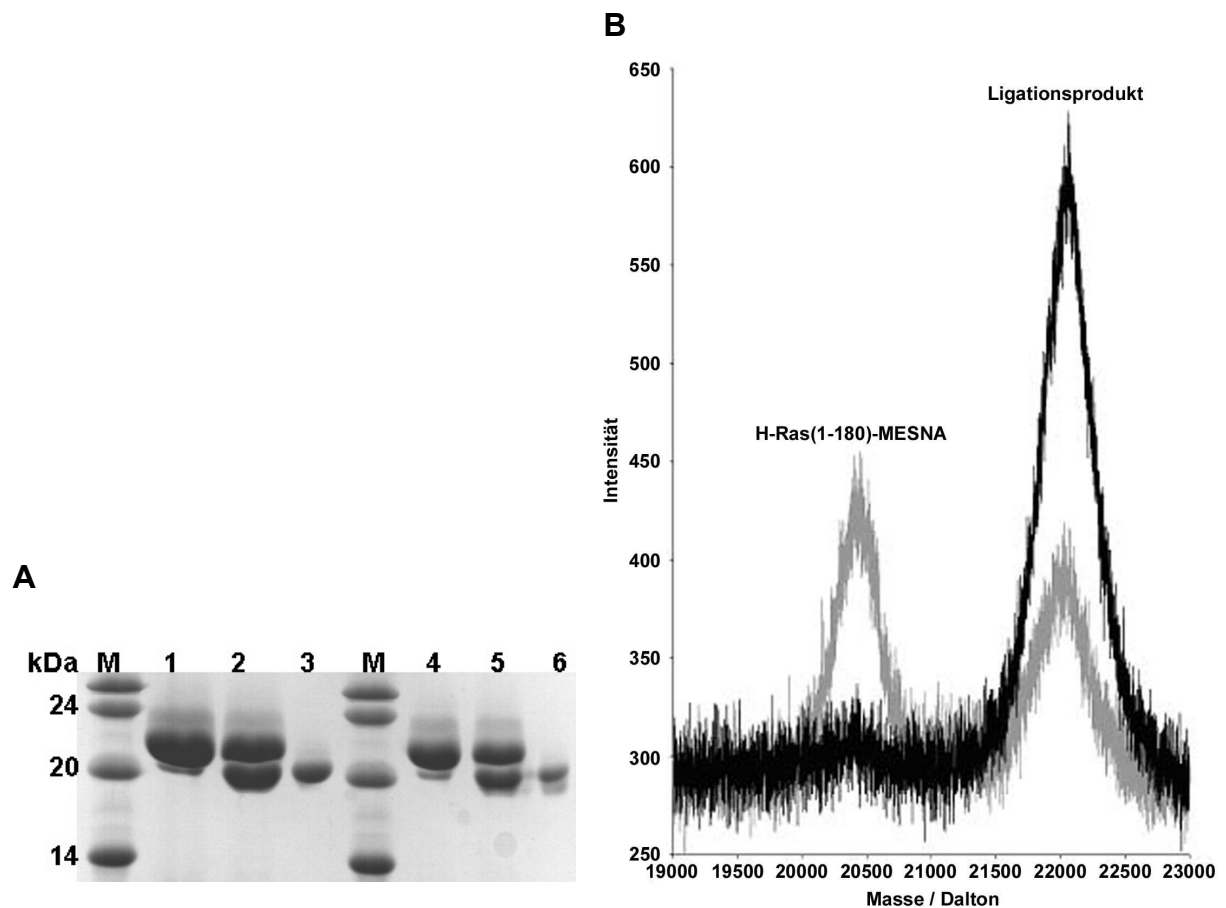


Abbildung 40. A) SDS-PAGE der Test-Ligationen: Ansatz mit 10 Äquivalenten Peptid (lane 1 und 4); Ansatz mit 5 Äquivalenten (lane 2 und 5); H-Ras-MESNA-Thioester (lane 3 und 6); in den lanes 1-3 wurden je 5 μ l aufgetragen, in den lanes 4-6 je 3 μ l; M = SDS7-Marker (Sigma-Aldrich).
B) MALDI-TOF-Massenspektrum der unbehandelten Ligationsansätze mit 5 Äquivalenten Peptid (grau) und 10 Äquivalenten (schwarz).

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit C. Nowak (AG Kuhlmann) eine Ligation im präparativen Maßstab durchgeführt. Das isolierte Reaktionsprodukt sollte eindeutig charakterisiert und für biophysikalische und biologische Assays verwendet werden. Eingesetzt wurden 5 mg des verkürzten H-Ras(1-180)-MESNA-Thioesters (0.24 μ mol) und 4.2 mg des K-Ras 4B-methylesters **26** bzw 4.8 mg des dansylmarkierten Peptids **27** (jeweils 2.4 μ mol). Die Ligationsreaktionen wurden bei 4°C für 16 h wie bereits beschrieben durchgeführt. Vor der weiteren Aufarbeitung der Ansätze war bereits zu erkennen, dass sich ein unlösliches Präzipitat gebildet hatte. Es schien wahrscheinlich, dass wenigstens ein Teil der Proteine im Verlauf der Reaktion ausgefallen war.

Die Idee einer Reinigung mittels Triton-Extraktion erwies sich jedoch als eine Sackgasse. Zwar konnte eine Phasentrennung herbeigeführt werden, allerdings

waren sowohl das Ligationsprodukt, als auch nichtumgesetztes Peptid in beiden Phasen aufzufinden. Verantwortlich hierfür dürfte die erhöhte Amphiphilie aufgrund des polybasischen C-Terminus sein, die es dem Ligationsprodukt ermöglichen sich sowohl in der unpolaren als auch in der polaren Phase zu lösen. Versuche das Ligationsprodukt durch Dialyse von Triton X-114 abzutrennen, resultierten im vollständigen Präzipitieren des Ligationsprodukts.

Die Gründe für das Ausfallen des Proteins ist unklar: einerseits dürfte die Oxidationsempfindlichkeit des H-Ras(1-180) eine Rolle spielen, zum anderen ist bekannt, dass poly-Lysin-Sequenzen hochgeordnete Strukturen bilden können, die durch H-Brücken miteinander vernetzt sein können. Die H-Brücken können sowohl zu den Carbonylfunktionen des Peptid-*backbones*, als auch zu negativ geladenen Aminosäureseitenketten ausgebildet werden. Im Kollagen wird die Triple-Helix durch H-Brücken zusammengehalten, ausserdem sind die Lysinseitenketten verantwortlich für die Anheftung an Zelloberflächen wie Fibronectin. Eine Agglomeration aufgrund der Ausbildung von unspezifischen Wechselwirkungen mehrerer Proteine scheint am wahrscheinlichsten zu sein.^[163, 164] Zwar können solche Wechselwirkung durch den Einsatz chaotroper Salze aufgebrochen werden, allerdings erschwert deren Einsatz die Analytik mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie erheblich. Desweiteren würde es nach der Aufreinigung, also der Entfernung der chaotropen Salze, erneut zur Agglomeration der Proteine kommen.

In nachfolgenden Ansätzen konnte die Reinigung der Ligationsprodukte, nach dem Einengen der Ligationsansätze durch Dialyse gekoppelt mit Ultrazentrifugation, durch Ionenaustausch- und Größenausschluß-Chromatographie erreicht werden. Von beiden Proteinen konnten je 1 mg isoliert werden, was einer Ausbeute von 20% für den Methylester **28** ($m/z_{\text{obs}} = 21982.0$, $m/z_{\text{calc}} = 21981.1$) und 19% für das fluoreszenzmarkierte Derivat **29** ($m/z_{\text{obs}} = 22243.0$, $m/z_{\text{calc}} = 22242.5$) entspricht (Abbildung 32). Dies war die erste erfolgreiche Synthese eines Ras-Proteins mittels *native chemical ligation*.

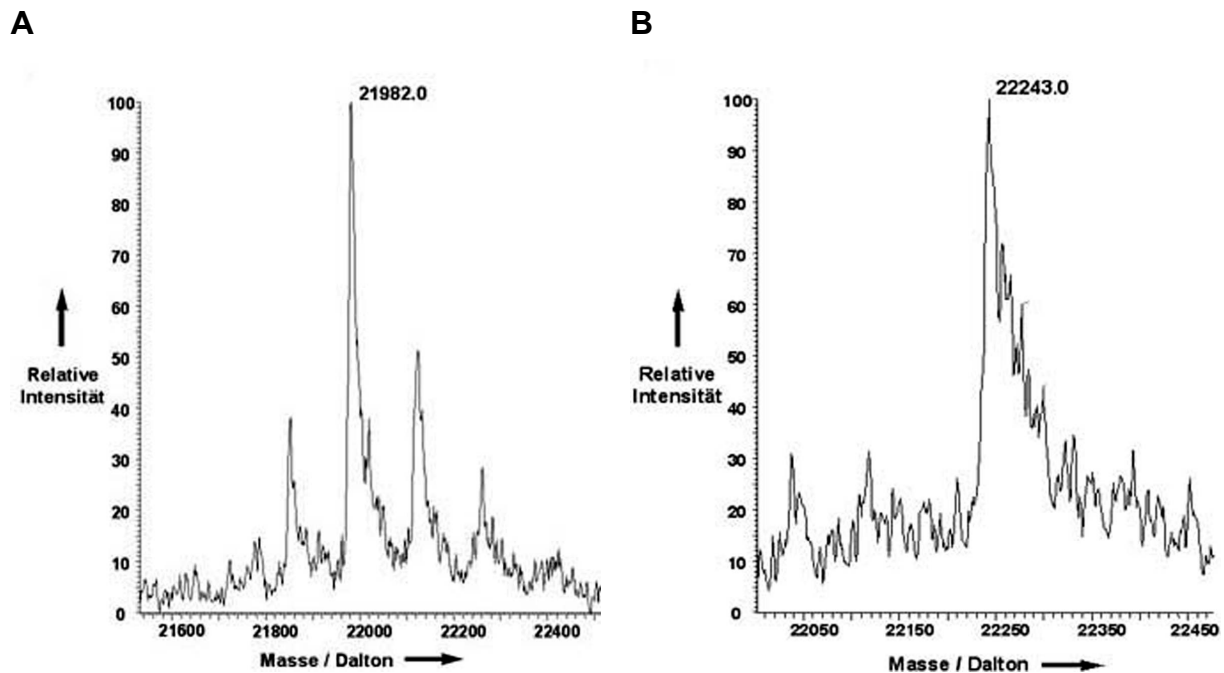


Abbildung 41. ESI- Massenspektren der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine nach ; A) Methyl ester **28**; B) dansylmarkiertes Protein **29**.

Die gezeigten Spektren wurden aus unbehandelten Ligationsansätzen mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie aufgenommen und mittels Konvolution (Berechnung der Molekülmasse aufgrund der detektierten mehrfachgeladenen Ionen) bearbeitet. Auffällig war ein ausgeprägtes *tailing* (es konnte kein scharfer Peak bei der Elution beobachtet werden. Die Substanz „schmiert“ von der HPLC-Säule), welches den ausgeprägten amphiphilen Charakter der Ligationsprodukte unterstreicht. Beim fluoreszenzmarkierten H-Ras/K-Ras-Konstrukt schien der Dansylfluorophor diesen Effekt noch zu verstärken.

Die Signale mit kleinerer Masse konnte keiner Deletionssequenz zugeordnet werden. Die Peaks mit höherer Masse, sowie die breite *Schulter* beim fluoreszenzmarkierten Peptid scheinen durch Komplexierung von Salzen aus dem Ligationspuffer herzurühren. Eine genaue Zuordnung der Art und Anzahl der möglicherweise komplexierten Ionen gelang jedoch nicht.

4.4.2 Ligationen der D-Ral-Peptide mit verkürztem H-Ras

Bei den Ligationen mit den K-Ras 4B-Peptiden war aufgefallen, dass ein Teil der Proteine im Verlauf der Reaktion präzipitiert war. Diese festen Rückstände konnten nicht wieder in Lösung gebracht und mit dem Rest des Reaktionsansatzes aufgereinigt werden. In nachfolgenden Reaktionen sollte ein Verlust an chimärem Protein durch Präzipitieren weitestgehend vermieden werden. Daher wurde untersucht, ob eine kürzere Reaktionszeit oder eine geringere Salzkonzentration des Puffers zu weniger Präzipitierung führen würden. Zu diesen Zweck wurden Ligationen bei 25°C durchgeführt, wodurch eine Beschleunigung der Reaktion erwartet wurde. Den Ligationsansätzen mit 10 Äquivalenten D-Ral-DANSA in halbkonzentriertem und unverdünntem Puffer wurden nach 4, 6 und 8h Proben entnommen. Die entnommenen Proben wurden mit denaturierendem, 4-fach konzentriertem Elektrophoresepuffer gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zeitgleich mit einem 15%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert (Abbildung 43).

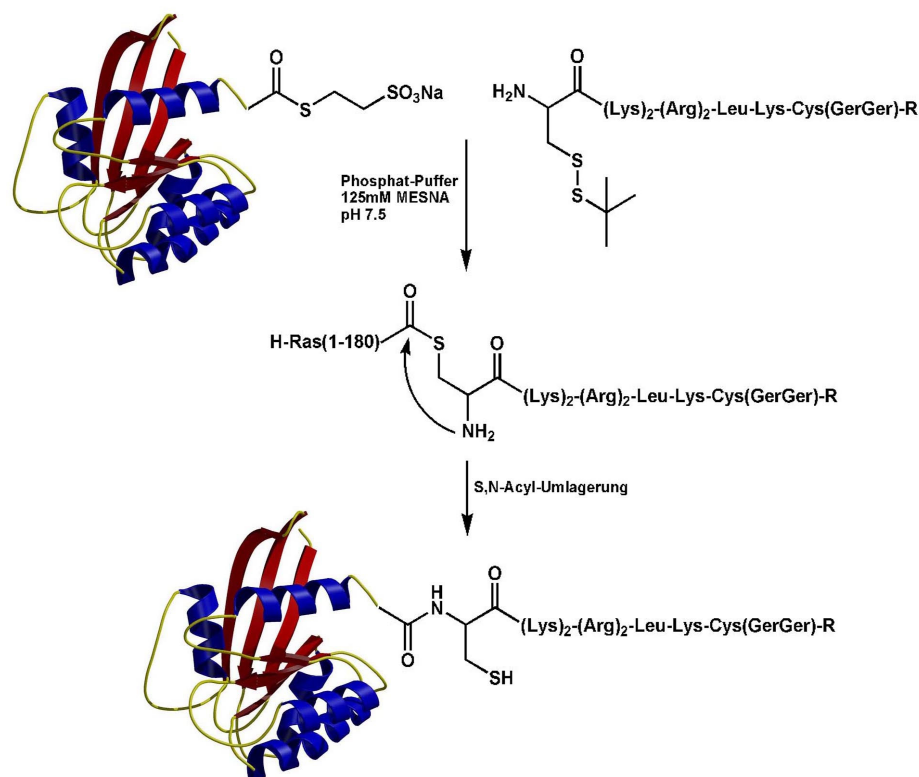


Abbildung 42. Ligation von rekombinantem H-Ras(1-180) mit den D-Ral-Peptiden; R = Methylster bzw Ethylenaminodansyl.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ligationsreaktion nach 4h nahezu vollständig abgelaufen war und danach kaum weitere Umsetzung des Edukts stattfand. Die Menge an ausgefallenem Protein war zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise gering, nahm aber bei fortlaufender Reaktion zu, wie aus der Menge an unlöslicher Substanz in den Geltaschen deutlich wurde. Die Konzentration des Ligationspuffers hingegen schien keine Auswirkung auf den Verlauf der Reaktion zu haben.

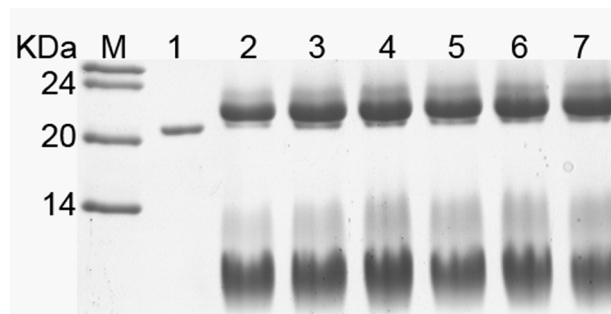


Abbildung 43. Analyse des Reaktionsverlaufs: H-Ras-MESNA-Thioester (lane 1); Ligationsansatz nach 4h (lane 2, 3), nach 6h (lane 4, 5), nach 8h (lane 6, 7); M = SDS7-Marker.

Die nachfolgenden Ligationsreaktionen wurden daher standardgemäß für 4h bei 25°C durchgeführt, da diese Bedingungen maximalen Umsatz bei minimalem Verlust an Protein versprachen. Andere Additive wie Guanidinium-Hydrochlorid oder Glycerol, von denen ein stabilisierender Effekt auf die Proteinfaltung, verbunden mit einer weiteren Reduktion an Präzipitat erwartet wurde, hatten keinerlei positiven Einfluß auf den Verlauf der Ligation (Ergebnisse nicht dargestellt). Die beiden chimären Ligationsprodukte konnten mittels LC-gekoppelter Massenspektrometrie aus dem unbehandelten Reaktionsansatz nachgewiesen werden; der Methylester **30** ($m/z_{\text{obs}} = 21645.0$, $m/z_{\text{calc}} = 21645.7$) und das fluoreszenzmarkierte Derivat **31** ($m/z_{\text{obs}} = 21905.0$, $m/z_{\text{calc}} = 21907.1$) (Abbildung 44).

Die Aufreinigung des chimären H-Ras/D-Ral-Konstrukts erwies sich als äußerst problematisch. Bei dem Versuch die Ligationsansätze wie im Falle der H-Ras/K-Ras 4B-Chimäre zu entsalzen und durch Gelfiltration zu reinigen, konnte kein Protein von der SP-Sepharose-Säule eluiert werden. Durch die Verwendung des fluoreszierenden Derivats sollte sich einfach verfolgen lassen, bei welchem Schritt es zum Verlust des Proteins kam. In den nachfolgenden Reinigungsversuchen wurde deutlich, daß fluoreszierendes Material sowohl auf den DyeEx Filterkartuschen (DyeEx Spin Kit, Firma Quiagen) als auch auf der Sepharose-Säule adsorbiert wurde

und nicht mehr eluiert werden konnte. Dabei blieb unklar, ob das fluoreszierende Ligationsprodukt während dem Versuch der Elution präzipitierte oder ob Bedingungen gewählt wurden, unter denen es nicht möglich war dieses von der Säule zu waschen.

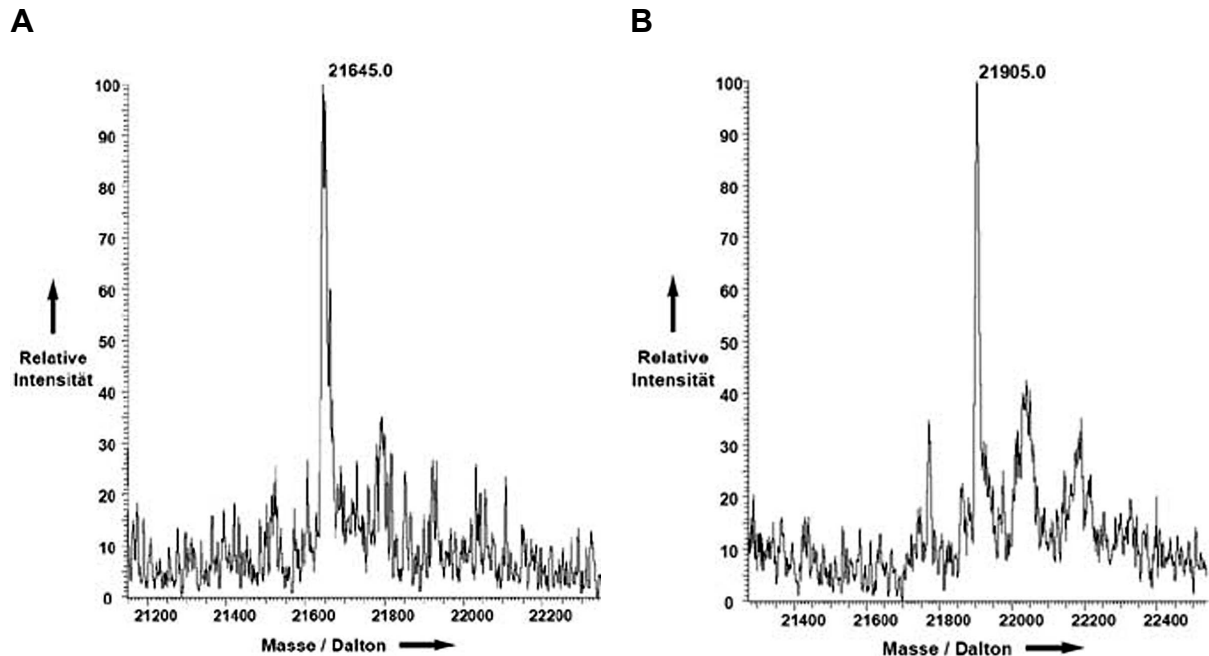


Abbildung 44. ESI- Massenspektren der chimären H-Ras/D-Ral-Proteine (unbehandelter Ligationsansatz); A) Methylester **30**; B) dansylmarkiertes Protein **31**.

Durch die fast vollständige Umsetzung des Proteins, hatte die Abtrennung des restlichen Peptids, welches im Überschuß eingesetzt worden war, Priorität. Prinzipiell wäre dies auch mittels Dialyse mit einer Membran entsprechender Porengröße möglich. Es wurden mehrere Versuche mit einem 2 kDa *cut-off*-Filter gemacht. Dabei wurde der Ligationsansatz (Volumen ca. 10-20 μ l) in die Dialysekartusche gegeben und für bis zu 24h unter Schutzgas in 500 ml argongesättigtem Phosphatpuffer verschiedener Ionenkonzentrationen oder Wasser dialysiert. Die Dialyse-Versuche führten lediglich zum Präzipitieren von fluoreszierender Substanz. Im zurückgehaltenen Volumen war weder Fluorezenz zu beobachten, noch konnten Peptide oder Proteine mittels Gelelektrophorese oder massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Es mußte also angenommen werden, daß sowohl das Protein als auch das Peptid vollständig ausfielen.

Als weitere Alternative zur Aufreinigung wurde die *hydrophobic interaction chromatography* (HIC) in Betracht gezogen. Diese Chromatographie-Technik kann

benutzt werden, um Proteine mit unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften aufgrund ihrer unpolaren Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial voneinander zu trennen. Über den zugrundeliegenden Mechanismus existieren mehrere Hypothesen, von denen bisher jedoch keine verifiziert worden ist. Die Säulenmatrix besteht aus Sepharose (quervernetzte Agarose), deren Oberfläche mit unterschiedlichen unpolaren Gruppen, z.B. Phenyl, Octyl oder Butyl, modifiziert ist. Proteine werden in stark konzentrierten Salzpuffern aufgegeben, wodurch eine Adsorption am Säulenmaterial forciert wird (Aussalzen), die Elution kann durch Waschen mit Puffern von geringerer Ionenstärke erreicht werden.^[165]

Die Methode schien für die Reinigung der chimären H-Ras/D-Ral-Proteine geeignet zu sein. Zum einen war ein Entsalzen des Reaktionsansatzes vor dem eigentlichen Reinigungsschritt nicht mehr notwendig (bei vorangegangenen Versuchen war es dabei zum vollständigen Verlust des Reaktionsprodukts gekommen). Zum anderen sollte die Wechselwirkungen aufgrund hydrophober Eigenschaften des eingesetzten lipidierten Peptids und des Ligationsprodukts unterschiedlich genug sein, um eine Trennung zu erzielen.

Für die Versuche wurden drei verschiedene 1ml-Säulen von Amersham Bioscience verwendet (Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow, Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow und Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (low sub)), die mit einer Pumpenspritze bei einer Flussrate von 1 ml/min betrieben wurden. Vor dem Aufgeben auf die Säulen wurden die Ligationsansätze 1:1 mit 1M Ammoniumsulfatlösung verdünnt, dabei konnte keine Bildung von Präzipitat beobachtet werden. Ammoniumsulfatpuffer wird als Standard zur Verwendung bei der HIC-Chromatographie verwendet, da er eine sehr hohe Ionenstärke besitzt, wodurch eine Adsorption begünstigt wird. Die Säulen wurden nachfolgend mit dem fünffachen Säulenvolumen von drei verschiedenen konzentrierten Ammoniumsulfat-Puffern und schließlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Fraktionen wurden auf Fluoreszenz untersucht, mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert und lyophilisiert. Keines der drei Säulenmaterialien führte zu einer Trennung des Reaktionsgemischs, vielmehr war es unmöglich die adsorbierten Substanzen wieder von den Säulen zu eluieren (die fluoreszierenden Banden im Säulenmaterial waren deutlich sichtbar). Reinigungsversuche mit einem Ammoniumacetat-Puffer, welcher flüchtig ist und daher keine nachfolgende Dialyse zur Abtrennung erfordert, verliefen ebenfalls ohne Erfolg.

Es erscheint erstaunlich, dass die Reinigung der H-Ras/D-Ral-Chimäre im Vergleich zum H-Ras/K-Ras-Konstrukt so problematisch ist, da sich beide Peptid-Sequenzen stark ähneln. Für die offensichtlich weitaus stärkeren Wechselwirkungen mit stationären Phasen (egal ob lipo- oder hydrophil oder ungeladen) sind zwei Eigenschaften in Betracht zu ziehen:

Der Austausch des Farnesylrest gegen den Geranylgeranylrest, also die Verlängerung um eine Isoprenyleinheit, verstärkt lipophile Wechselwirkungen um ein Vielfaches. Bei biophysikalischen Assays mit künstlichen Membranen wurde deutlich, dass dieser Austausch bei sonst identischen Peptiden eine im Durchschnitt 45-mal stärkere Wechselwirkung mit Modellmembranen zur Folge hat. Bei doppelt lipidierten Peptiden und einem Austausch beider Farnesyl- gegen zwei Geranylgeranylreste werden die Wechselwirkungen sogar um drei Zehnerpotenzen erhöht.^[166, 167]

Desweiteren stellt Arginin zwar wie Lysin eine basische Aminosäure dar, die Guanidino-Funktion weist jedoch sehr spezielle Eigenschaften auf. Im Gegensatz zu Lysin kann die positive Ladung einer protonierten Seitenkettenfunktion besser delokalisiert und damit stabilisiert werden (Abbildung 45).

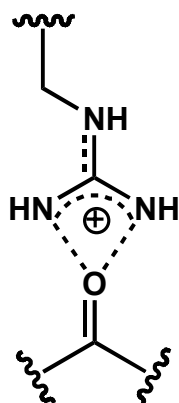


Abbildung 45.

Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen einer Argininseitenkette und einer Carboxylfunktion des Peptid-*backbones*.

Demzufolge werden stabilere Wasserstoff-Brücken ausgebildet, die durch einen zusätzlichen Chelat-Effekt stabilisiert werden und zur Agglomerisierung (*interchain clustering*) von Peptiden und Proteinen beitragen können. Mit negativ geladenen Carboxylfunktionen (z.B. Glutamat oder Aspartat bei physiologischem pH) können Ionenpaare gebildet werden, die ausser Wasserstoff-Brücken auch Komplexe aufgrund von Kationen- π oder Anion- π -Wechselwirkungen bilden können. Aufgrund dieser ausgeprägten Amphiphilie werden Arginin-

reiche Sequenzen in einer Anzahl von Protein-Transduktionsdomänen aufgefunden (Tat-Domäne des HIV-1-Virus, *D. antennapedia* und *H. simplex* VP-22 Transkriptionsfaktoren). Die Funktion besteht im Transport verschiedenster Konjugate durch zelluläre Membranen.^[168]

Dieser Vergleich der Eigenschaften unterschiedlicher Strukturelemente beider C-Termini zeigt, dass ein unterschiedliches physikochemisches Verhalten der beiden Proteinkonstrukte zu erwarten war, aus welchem die Schwierigkeiten bei der Aufreinigung des H-Ras/D-Ral-Konstrukts herrühren. Bisher konnte keine Strategie zur erfolgreichen Reinigung des H-Ras/D-Ral-Ligationsprodukts entwickelt werden.

4.5 Einsatz der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine in biophysikalischen und zellbiologischen Assays

4.5.1 Nachweis der Funktionalität der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine durch fluoreszenzbasierte Assays

Zum Nachweis der Funktionalität der chimären Proteine – also um zu zeigen, dass die Faltung der H-Ras-Domänen nach der Ligationsreaktion noch intakt war – wurde von Dr. J. Kuhlmann ein fluoreszenzbasierter Assay durchgeführt (Abbildung 46). Hierbei wurde das Protein-Konstrukt mit fluoreszierendem Methylantraniloyl-GDP (mant-GDP) beladen und anschliessend mit dem Ras-GEF Sos und einem Überschuss von unmarkiertem GDP inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit dem verkürzten, mant-GDP-beladenen H-Ras(1-181) durchgeführt.

Während in der Negativ-Kontrolle nur ein sehr langsamer Abfall in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden konnte, wurde im Fall des chimären Proteins ein sehr schnelles Absinken der Fluoreszenz bei Zugabe von Sos und unmarkiertem GDP registriert. Das beweist, dass sowohl die Nukleotid-Bindungsdomäne, welche zur Wechselwirkung mit Sos und GTP/GDP notwendig ist, als auch der farnesylierte C-Terminus, der die Sos-Ras-Wechselwirkungen verstärkt, intakt und funktional vorlagen.

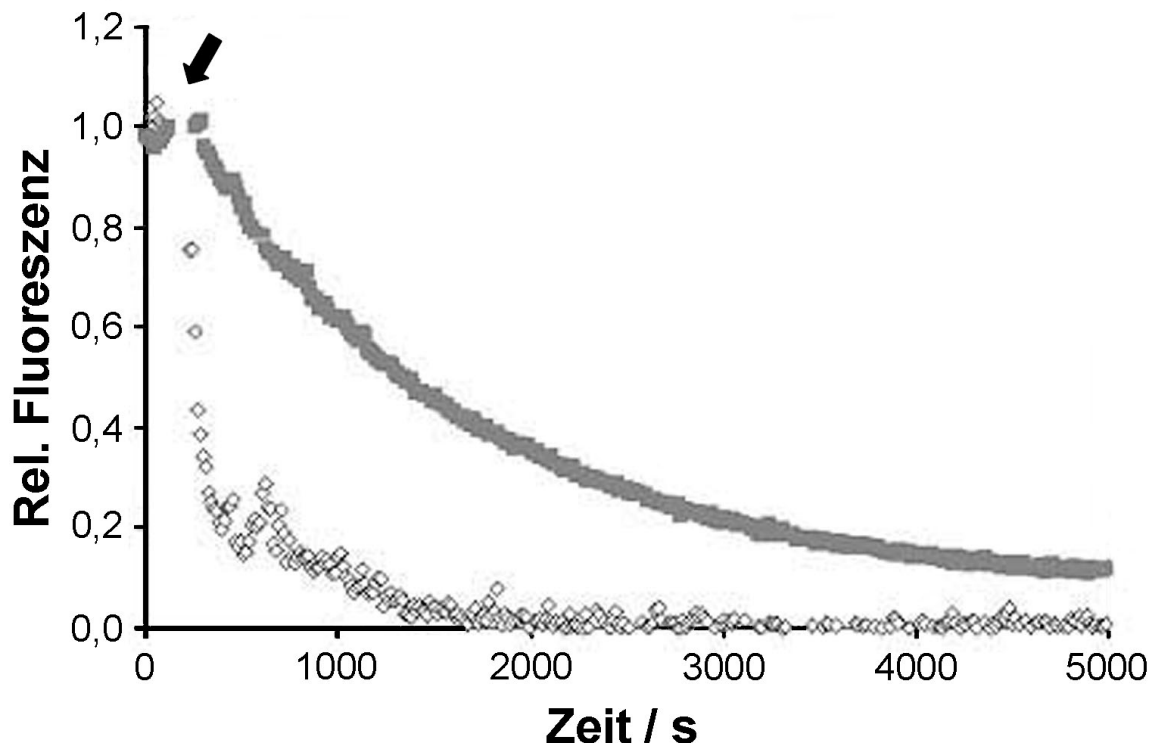


Abbildung 46. Fluoreszenzintensität beim Austausch von mant-GDP gegen GDP (◇); Negativkontrolle (■). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Sos-Zugabe.

4.5.2 Experimente zur Membranbindung der chimären H-Ras/K-Ras-Proteine

Zur Aufklärung des Bindungsverhaltens des H-Ras/K-Ras-Konstrukts wurden *surface plasmon resonance*-Untersuchungen (SPR) mit einem BIAcore™-Gerät durchgeführt. Diese Messmethode kann eingesetzt werden, um die Wechselwirkungen zwischen einem Analyt (Protein) und einer Oberfläche zu messen (Abbildung 47).

In SPR-Messungen werden kleinste Veränderungen im Brechungsindex der Messfläche und in der unmittelbaren Nachbarschaft registriert. Die bei den Messungen verwendeten Chips bestehen aus einem optische Gitter bzw. Prisma welches auf einer Glasflächen angebracht ist. Die Glasoberfläche ist mit einer dünnen Metallschicht bedampft. Diese Metallschicht trägt eine Sensibilisierungsschicht, die den Analyten besonders gut bindet und in Kontakt mit einer Analytenthaltenden Lösung gebracht wird.

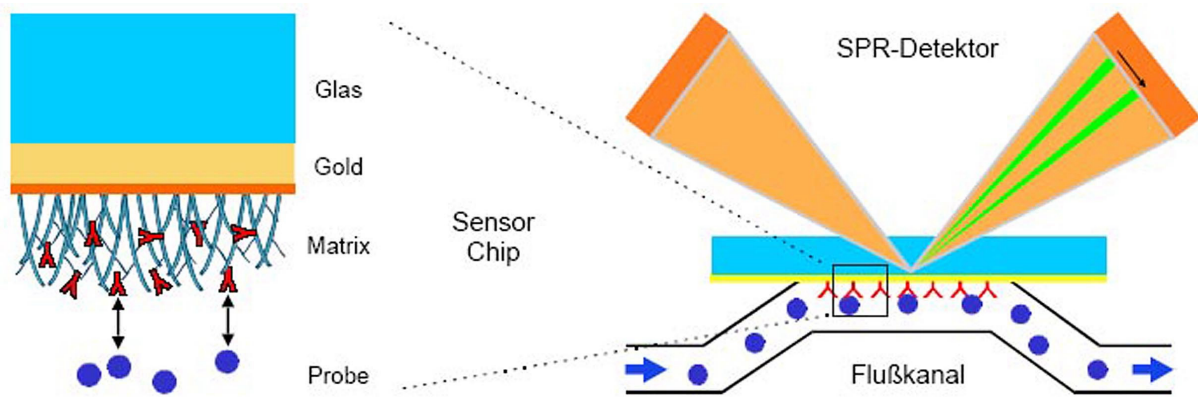


Abbildung 47. Prinzip einer SPR-Messung.

In dem Gerät entsteht eine kollektive Anregung der Elektronen im Metallfilm, was bei einer bestimmten Wellenlänge zu einer totalen Lichtabsorption bei einem bestimmten Einfallswinkel führt. Dieser Einfallswinkel ist abhängig von den Brechungsindizes auf beiden Seiten des Metallfilms. Durch die Assoziation von Molekülen wird der Brechungsindex an der Grenzfläche zwischen Sensitivierungs- und Metallschicht verändert. Die resultierende Veränderung des Winkels der totalen Absorption wird gemessen und zur Konzentration des Analyten in Relation gesetzt.^[169]

Die wesentlichen Merkmale einer Messkurve sind eine Assoziationsphase, während der zunehmend mehr Analyt-Moleküle an der Oberfläche adsorbiert werden. Es folgt die Dissoziationsphase, in der die Oberfläche mit Puffern gespült wird, was eine Dissoziation der Moleküle von der Oberfläche erlaubt (Abbildung 48). Aus dem Kurvenverlauf lassen sich durch Annäherung durch das *Langmuir*-Modell die Affinitätskonstante K_D , sowie die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation k_{ass} bzw. k_{diss} berechnen.

Das *Langmuir*-Modell wurde bereits 1916 für die Adsorption von Gasen postuliert und basiert auf zwei Annahmen: zum einen entsteht bei der Adsorption wegen starker, spezifischer Wechselwirkungen zwischen Adsorbat und Oberfläche ausschließlich eine Einfach-Schicht (*monolayer*) von adsorbierten Molekülen. Zum anderen handelt es sich um ein Gleichgewicht, d.h. die Wahrscheinlichkeit für die Adsorption eines Moleküls an einer Oberfläche ist gleich groß wie die Wahrscheinlichkeit der Desorption. Diese Wahrscheinlichkeit ist direkt abhängig von der Größe der Wechselwirkungen. Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist proportional zu den Konzentrationen der Reaktionspartner, also zur Konzentration des Adsorbats sowie

der Anzahl der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche. Eine beobachtete Sättigung der Bindungsstellen zeigt die Einstellung des Gleichgewichts an.^[170]

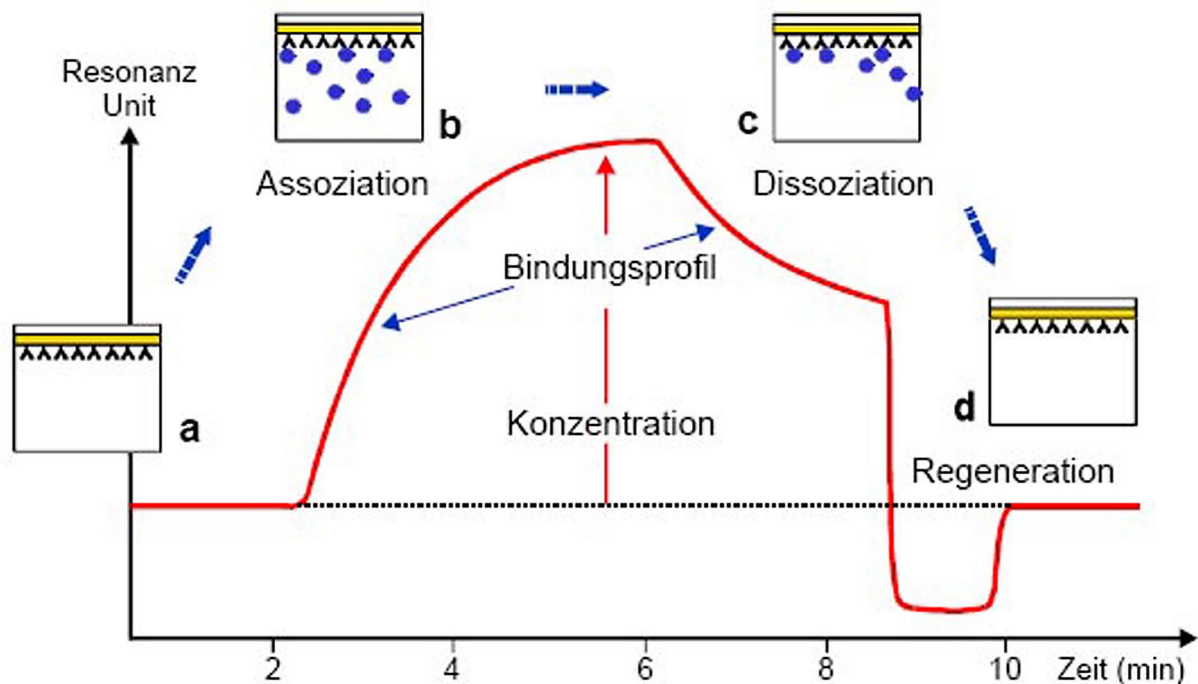


Abbildung 48. Messkurve eines SPR-Experiments.

Das Protein **28** (H-Ras/K-Ras-Methylester) wurde von C. Grunwald (AG Kuhlmann) in BIAcore™-Experimenten (*surface plasmon resonance*) eingesetzt, um die Membranbindung an künstlichen Lipiddoppelschichten unterschiedlicher Ladung zu überprüfen. In ähnlichen Experimenten waren bisher nur Peptide (B. Ludolph) eingesetzt worden. Die Verwendung der chimären Proteine sollte weitere Rückschlüsse auf einen möglichen Membrantransport durch passive Diffusion zulassen.

Eingesetzt wurden zwei unterschiedliche Chipoberflächen, auf denen Lipiddoppelschichten aufgebracht worden waren. Durch den Aufbau der künstlichen Membranen aus zwei verschiedenen Lipiden (Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC) ein neutrales Lipid, Phosphatidylserin (PS) ein negativ geladenes Lipid, Abbildung 49) wurden Membranen unterschiedlicher negativer Oberflächenladung simuliert. In mehreren BIAcore-Experimenten wurden sowohl die Assoziation des Proteins an die Doppelschichten als auch die Dissoziation von diesen aufgezeichnet.

Dabei traten deutlich stärkere Wechselwirkungen des Proteins mit den geladenen Membranen auf, als zwischen dem Protein und einer ungeladenen POPC-Membran. Auf einem mit Siliziumdioxid beschichteten Chip konnte ausserdem eine Differenzierung der Wechselwirkungen bezüglich der Membranzusammensetzung beobachtet werden (Abbildung 50).

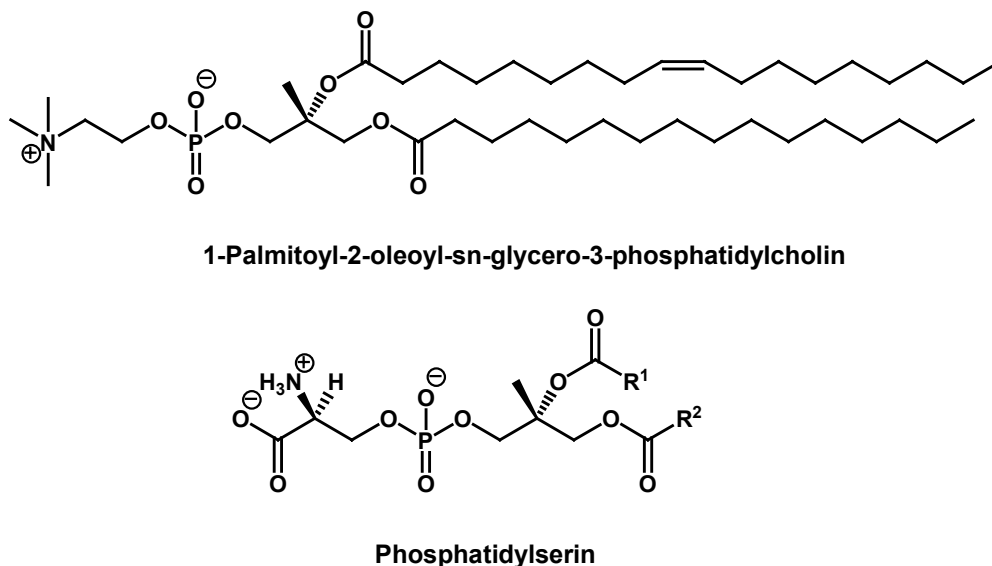


Abbildung 49. Lipide, die zum Aufbau der künstlichen Membranen verwendet wurden.

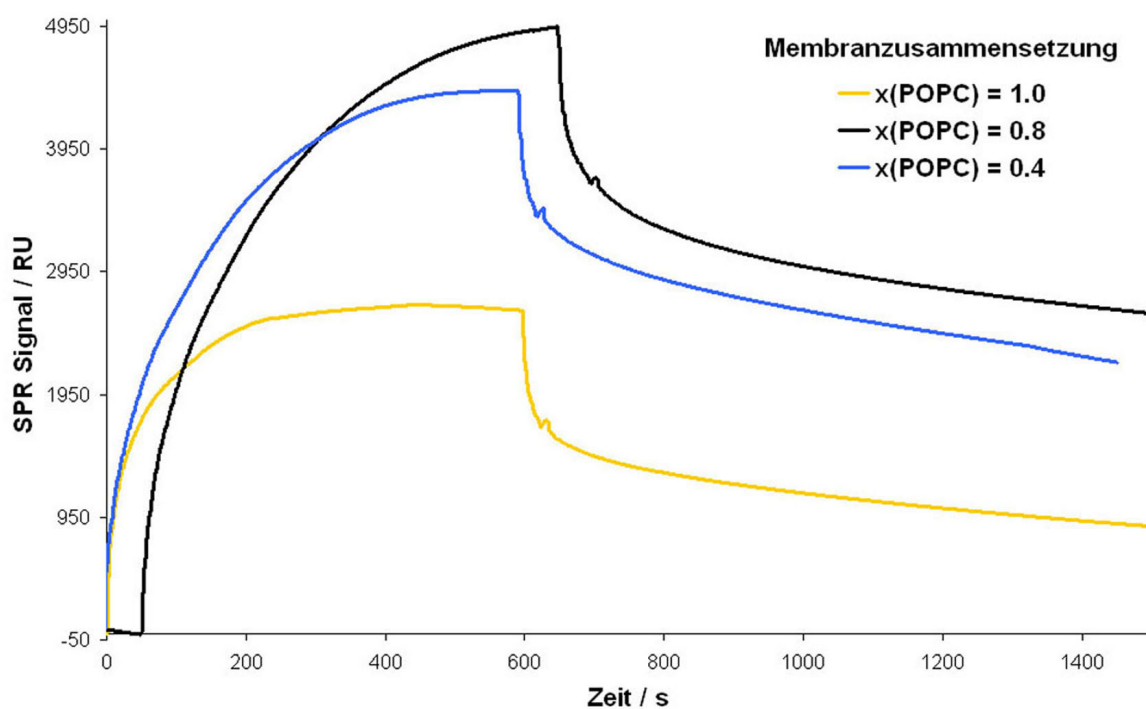


Abbildung 50. SPR-Messungen des chimären H-Ras/K-Ras-Proteins auf einem Siliziumdioxid-beschichteten BIAcore-Chip.

Allerdings folgten die Messkurven für die Assoziation und die Dissoziation des Proteins von den künstlichen Membranoberflächen nicht dem *Langmuir*-Modell, welches zur Ableitung der Affinität K_D und der Geschwindigkeitskonstanten k_{ass} bzw. k_{diss} aus SPR-Messungen herangezogen wird. Vor allem der zweite Teil der Messkurve, welcher die Dissoziation von der Membran beschreibt, zeigte starke Abweichungen vom *Langmuir*-Modell. Der „flache“ Verlauf deutet eine sehr langsame Dissoziation an. Für diesen Effekt könnte Phänomene wie das sogenannte *rebinding* verantwortlich sein: dabei kommt es nach einem kurzen Dissoziieren eines Moleküls von der Oberfläche zum erneuten, oft unspezifischen Binden an die Oberfläche. Statt des Abtransports des Molekül durch den übergeleiteten Puffer wird also eine scheinbar verlängerte Bindung beobachtet. Defektstellen in der Oberfläche begünstigen diesen Effekt.

Daher liessen sich die charakteristischen Grössen für die Membranbindung des chimären Proteins nicht aus den durchgeführten Messungen bestimmen.

4.5.3 Zellbiologische Experimente mit fluoreszenzmarkierten H-Ras/K-Ras-Proteinen

Das fluoreszenzmarkierte Protein-Konstrukt **29** wurde von R. Vetter (AG Kuhlmann) in NIH 3T3 Zellen injiziert. Es sollte geklärt werden, ob das chimäre Protein ebenfalls mit der Plasmamembran und eventuell anderen zellulären Membranen assoziieren würde. Zusammen mit dem Protein wurde Texas Red-markiertes Dextran zur Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen injiziert. Anschliessend wurde die Fluoreszenz der Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (Abbildung 51).

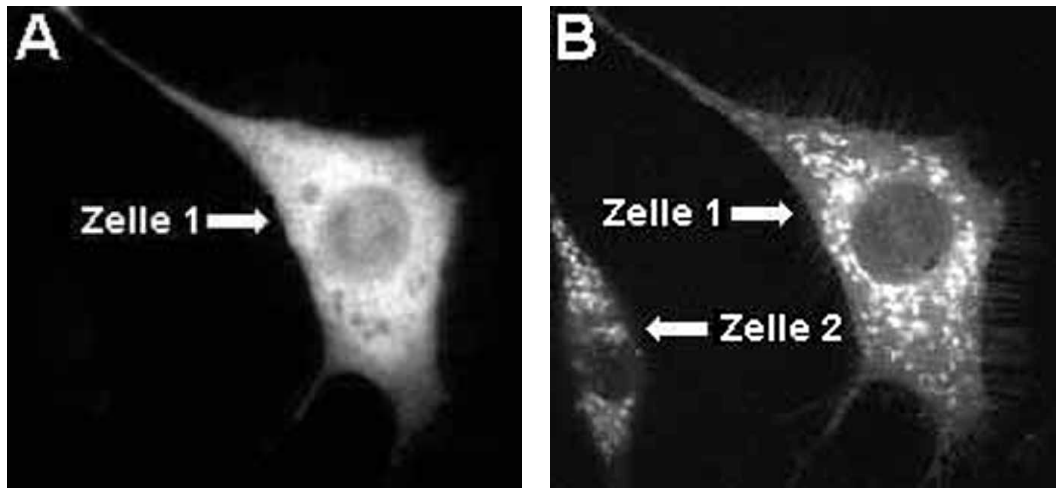


Abbildung 51. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie: Anregung von Texas Red (A); Anregung von Dansyl (B).

Die Experimente zeigten deutlich, dass der Dansyl-Fluorophor nicht für den Einsatz in zellbiologischen Assays geeignet ist: Abbildung 51A zeigt eine Zelle, in die das fluoreszenzmarkierte Protein zusammen mit Texas Red injiziert wurde unter Anregung des Texas Red-Fluorophors (Zelle 1). In Abbildung 51B wurde der Dansyl-Fluorophor angeregt und dessen Fluoreszenz beobachtet. Erwartungsgemäß fluoresziert Zelle 1 auch unter diesen Bedingungen. Allerdings fluoresziert ebenfalls eine zweite Zelle (Zelle 2), in die kein Protein injiziert wurde (keine Texas Red-Fluoreszenz). Daher muss angenommen werden, dass die Fluoreszenz des Dansylrests durch die natürliche Fluoreszenz der Coenzyme NAD und FAD überlagert wird. Eine Lokalisierung des fluoreszenzmarkierten Proteins in der Zelle wird dadurch unmöglich.

4.6 Erweiterung der Synthesestrategie

4.6.1 Die Verwendung von Bodipy FL als Fluoreszenzmarker

Dansyl ist, aufgrund seiner geringen Quantenausbeute, als Fluorophor nur mit Einschränkungen in zellbiologischen Assays verwendbar. Außerdem überschneiden sich seine Fluoreszenz mit der natürlichen Fluoreszenz des in Zellen vorliegenden NAD. Eine Lokalisierung von Dansyl-markierten Proteinen oder Peptiden mittels konfokaler Mikroskopie hat sich als nahezu unmöglich herausgestellt.^[140]

Dagegen weist Bodipy-FL eine sehr hohe Quantenausbeute auf und fluoresziert in einem Wellenlängenbereich, in dem es zu keinerlei Überschneidungen mit der natürlichen Fluoreszenz in zellulären Assays kommt. Daher sollte ein Bodipy-markierter K-Ras 4B-C-Terminus synthetisiert werden (Abbildung 51), der mit verkürztem H-Ras(1-180) verknüpft und für Studien zur zellulären Lokalisierung des chimären Proteins eingesetzt werden sollte.

Zwei Aspekte mußten bei der Synthese des fluoreszenzmarkierten Peptids berücksichtigt werden: zum einen sollte der Fluoreszenzmarker nicht mehr über den C-Terminus mit dem Peptid verknüpft werden, da bekannt war, dass der Methylester anteilig zur Membranbindung des Proteins beiträgt. Um diesen Beitrag nicht zu verlieren und somit die Membranbindungseigenschaften nicht zu verfälschen, wurde die Verknüpfung über eine Lysinseitenkette angestrebt.

Dies wäre einerseits möglich durch die Verwendung einer weiteren, orthogonalen Schutzgruppe, die eine gezielte Freisetzung einer Lysin-Aminofunktion und Verknüpfung mit dem Fluorophor an der festen Phase ermöglicht hätte. Um zusätzliche Reaktionsschritte zu vermeiden und da der Fluoreszenzmarker außerhalb der hexa-Lysinsequenz eingebracht werden sollte, wäre auch der Aufbau des Peptids nach der bereits bekannten Methodik mit nachfolgender Abspaltung, ohne die Seitenkettenfunktionen zu entschützen, denkbar. Durch die Abspaltung von der festen Phase würde eine Lysinseitenkette freigesetzt, die dann in Lösung mit dem Fluoreszenzmarker gekuppelt werden könnte. Dies würde eine Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen in Lösung erfordern.

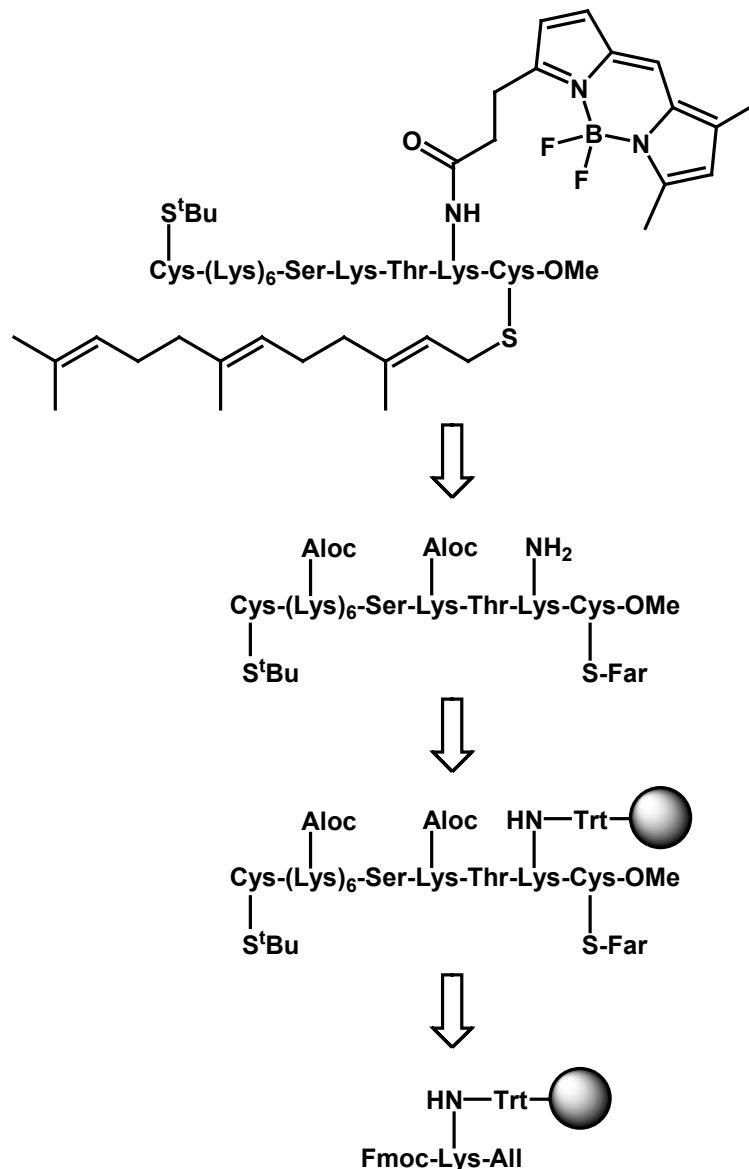


Abbildung 52. Synthesestrategie zur Darstellung eines Bodipy[®]-gelabelten K-Ras 4B-C-Terminus.

Das Aloc-geschützte K-Ras 4B-Peptid ist jedoch in nahezu allen Lösungsmitteln unlöslich und kann infolgedessen vor der Kupplung mit dem Fluoreszenzmarker und der nachfolgenden Entschützung nicht analysiert werden. Dies war in Vorarbeiten von B.Ludolph^[171] und bei der Synthese der bereits vorgestellten K-Ras 4B-Derivate festgestellt worden.

Als zweiter Gesichtspunkt kam erschwerend hinzu, daß Bodipy gegenüber Basen wie Piperidin nicht stabil ist. Das bedeutete, daß keine markierten Lysinderivate im Verlauf einer Standard-Festphasensynthese eingesetzt werden könnten. Es ist zwar möglich Fmoc-Schutzgruppen auch mit 1% DBU zu entschützen, doch bei einem Test mit einem kurzen Peptidfragment konnte kein fluoreszierendes Produkt isoliert

werden. Die Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen könnte durch diesen Umstand ebenfalls nicht wie üblich in Piperidin/DMF (4:1 v/v) durchgeführt werden, vielmehr müssten andere *scavenger* eingesetzt werden.

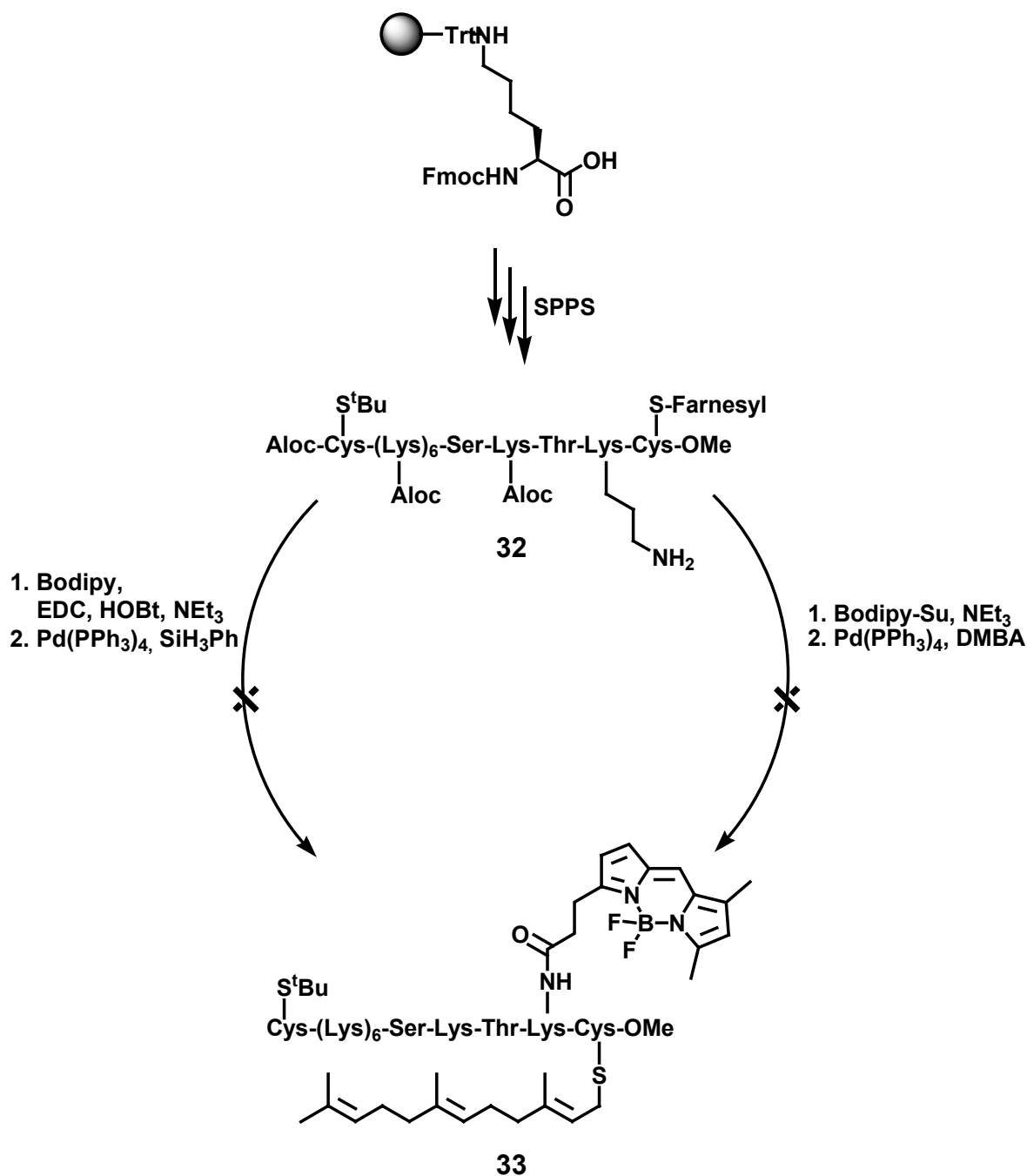


Abbildung 53. Synthese des Bodipy-markierten K-Ras 4B-Peptides **33**.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde das Peptid an der festen Phase aufgebaut und unter Erhaltung der Aloc-Schutzgruppen abgespalten. Das erhaltene Rohprodukt wurde unter Verwendung von Ultraschall in DMF weitestgehend gelöst und mit Bodipy, das mit EDC/HOBT und Triethylamin voraktiviert worden war, über Nacht

umgesetzt. Nach dem Abfiltrieren unlöslicher Feststoffe wurde versucht die Aloc-Schutzgruppen mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ unter Zugabe von Phenylsilan (dieser *scavenger* wurde auch bei der Spaltung des C-terminalen Allylestere an der festen Phase eingesetzt) für 4h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluß abzuspalten (Abbildung 53).

Das Rohprodukt wies nach der Reaktion mit dem Palladiumkomplex keinerlei Fluoreszenz mehr auf und war mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nicht zu analysieren. Es mußte also angenommen werden, daß der Fluoreszenzmarker bei der Abspaltung unter der Einwirkung des Palladiumkomplexes oder des nukleophilen Phenylsilans zerstört worden war.

Für weitere Versuche wurde Bodipy durch die Reaktion mit DCC und Hydroxysuccinimid in Bodipy-Succinimid umgesetzt, dadurch wurden für die Kupplung mit der Aminofunktion keine Aktivierungsreagenzien benötigt. Das so aktivierte Bodipy wurde erneut mit Aloc-geschütztem K-Ras 4B gekuppelt. Für die Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen wurde dem Reaktionsansatz diesmal Dimethylbarbitursäure als *scavenger* zugesetzt (Abbildung 53). Auch in diesem Versuch konnte keine Fluoreszenz mehr beobachtet werden und das MALDI-TOF-Massenspektrum zeigte weder die erwartete Masse des Zielproteins (MW 2018.4831) noch konnten die detektierten Massen Fragmenten oder Deletionssequenzen zugeordnet werden (Abbildung 54).

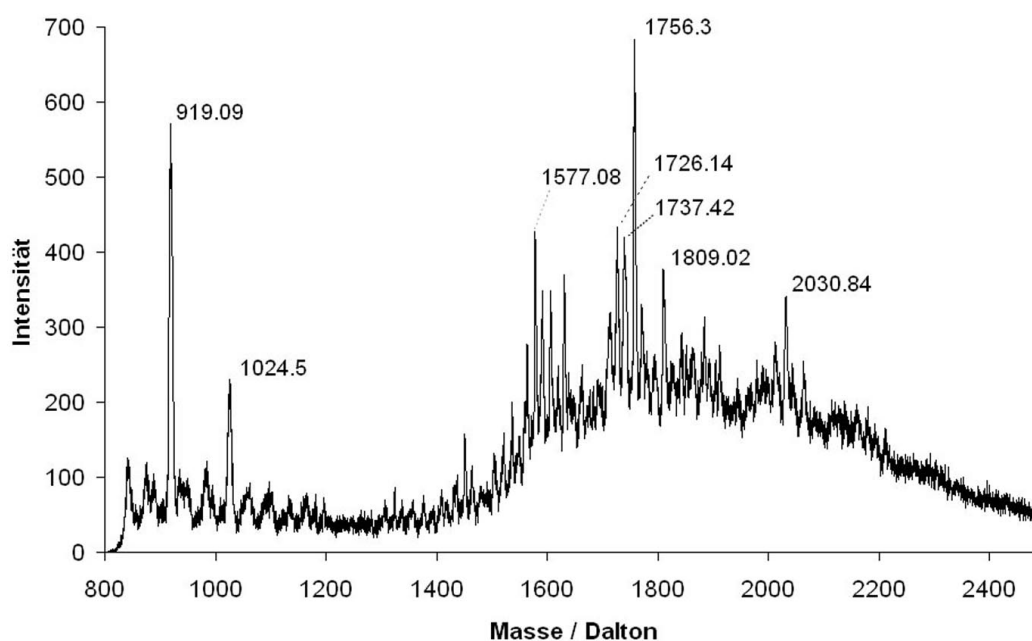


Abbildung 54. MALDI-TOF-Massenspektrum nach der Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen.

Mit der etablierten Fmoc/Aloc-Schutzgruppen-Strategie lässt sich der Bodipy-Fluoreszenzmarker nicht in polybasische, lipidierte Peptide einfügen. Die Verwendung dieses Reportermoleküls erfordert eine neue Synthesestrategie unter Verwendung anderer Schutzgruppen. Kommerziell erhältliche Lysin-Derivate für die Festphasensynthese wie Fmoc-Lys(Boc) oder Fmoc-Lys(Mtt) sind aufgrund der Säurelabilität des Prenylrests nicht anwendbar bzw. würden ausserdem eine neue Linker-Strategie erfordern. Ob der Fluoreszenzmarker und/oder der Farnesylrest unter den Abspaltbedingungen der Dde- oder ivDde-Schutzgruppe, welche ebenfalls zur Seitenkettenblockierung von Lysin verwendet werden können, stabil sind, konnte nicht geklärt werden.

4.6.2 Synthese des C-Terminus der monomeren GTPase RhoA

Die monomere GTPase RhoA, ebenfalls ein Mitglied der Ras-Superfamilie, weist am C-Terminus ebenfalls eine polybasische Sequenz auf (¹⁸²Arg-Arg-Gly-(Lys)₃-Ser-Gly-¹⁹⁰Cys). In Kombination mit der Geranylgeranylierung und Carboxymethylierung des C-terminalen Cysteins lokalisiert RhoA zur Plasmamembran und nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation und Stabilisierung des Actin-Cytoskeletts ein (vergleiche 2.1). Im Hinblick auf die Untersuchung der Membranbindung durch polybasische und monolipidierte Sequenzen stellte der RhoA-C-Terminus (Abbildung 55) demzufolge ein weiteres hochinteressantes Zielpeptid dar.

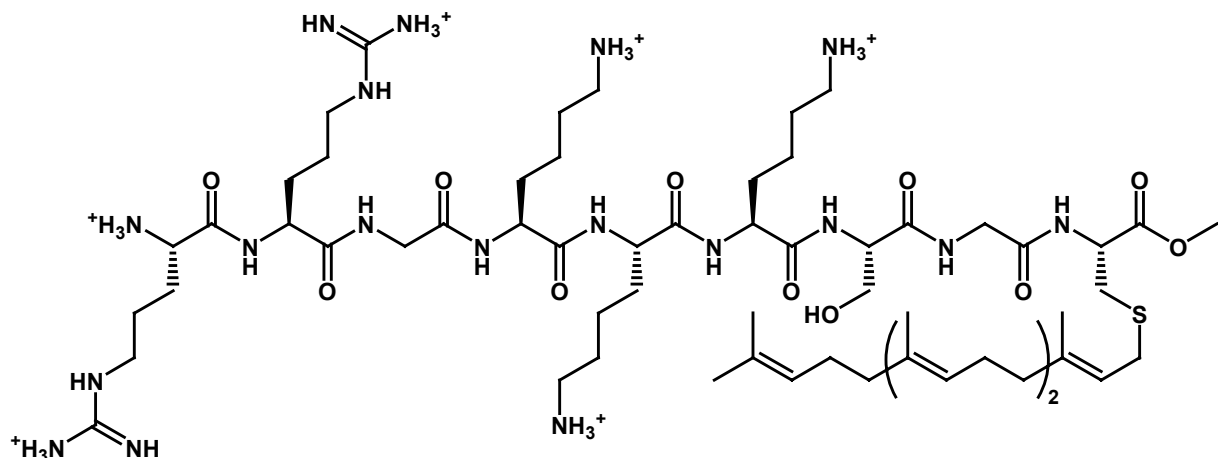


Abbildung 55. C-Terminus (Aminosäuren 182-190) von RhoA.

Die biologische Evaluierung sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Fr. PD G. Schmidt vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg erfolgen. In ihrer Arbeitsgruppe wird die Funktionsweise von Toxinen Gram-negativer Bakterien untersucht, welche Rho-GTPasen durch kovalente Modifikation inaktivieren oder aktivieren können. Während C3-Exoenzyme dies durch Ribosylierung oder Glykosylierung erreichen, konnte bei dem Protein YopT aus *Yersinia enterocolitica* eine proteolytische Aktivität festgestellt werden. YopT ist in der Lage das C-terminale, geranylgeranylierte Cystein vom Rest des RhoA-Proteins abzuspalten. Dadurch wird die Membranassoziation unterbrochen, das cytosolische RhoA ist inaktiv. Infolgedessen kommt es zu einer Zerstörung des Actin-Cytoskeletts der betroffenen Zellen.^[172, 173]

Die Erkennung der GTPase durch YopT erfolgt durch die polybasische Sequenz und den C-terminalen Methylester.^[174] Beide Strukturelemente durften also bei einer Synthese nicht modifiziert werden. Die N-terminale Modifizierung mit Biotin war zur Reinigung und Immobilisierung für die nachfolgenden Untersuchungen vorgesehen. In Anlehnung an die erfolgreichen Synthesen der D-Ral und K-Ras 4B-Peptide sollte mit einer ähnlichen Fmoc/Aloc-Schutzgruppenstrategie unter Verwendung des bereits bekannten geranylgeranylerten Cysteinmethylester-Bausteins eine Festphasensynthese des biotinylierten RhoA-C-Terminus durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den bisher synthetisierten Peptiden ist in direkter Nachbarschaft des C-Terminus jedoch kein Lysin lokalisiert, so dass eine Anknüpfung an den polymeren Träger über eine Lysinseitenkette nicht realisierbar war.

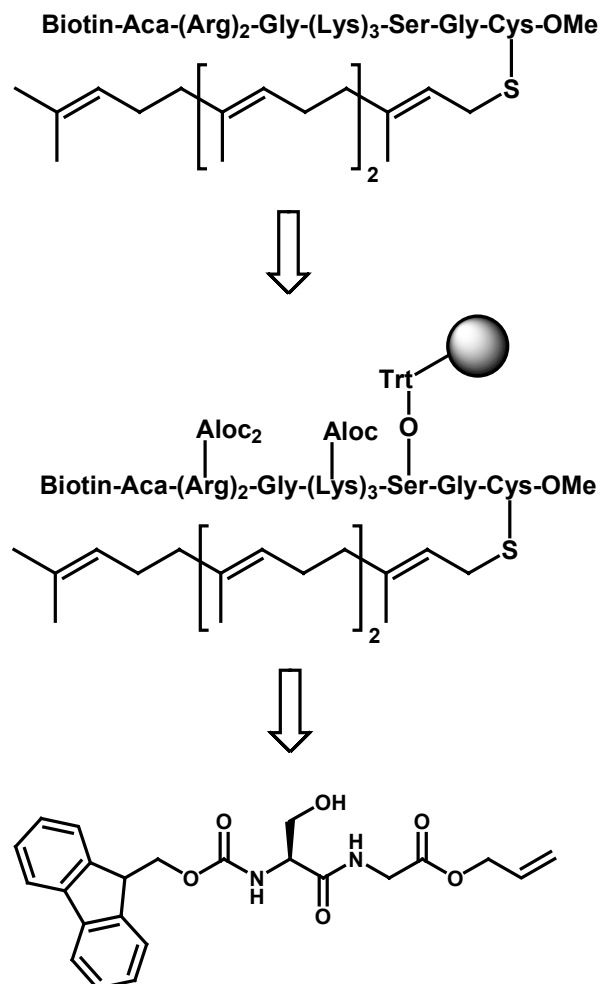


Abbildung 56. Retrosynthetische Analyse des biotinylierten RhoA-C-Terminus

Statt dessen sollte ein Fmoc-L-seryl-L-glycyl-allylester als Ether auf einem Trityl-beladenen Harz immobilisiert werden. Ausgehend von dem Dipeptid würde dann die polybasische Sequenz auf die bereits vorgestellte Art und Weise aufgebaut werden (Abbildung 56).

Diese Art der Anknüpfung an den polymeren Träger war bereits in Vorarbeiten von C. Peters erfolgreich zur Synthese von Hedgehog-Peptiden eingesetzt worden.^[158]

Ob durch diese Methodik auch der RhoA-C-Terminus zugänglich wäre, war unklar, da bisher zur Abspaltung 5% Trifluoressigsäure eingesetzt worden waren. Die Modifizierung mit einem Geranylgeranylrest ließ jedoch nur die 1% TFA zur Spaltung der Trityletherbindung zu.

Das benötigte Dipeptid wurde in Lösung synthetisiert: dazu wurde zunächst L-Glycin unter saurer Katalyse unter Rückfluss mit Allylalkohol verestert (Abbildung 57). Das Rohprodukt wurde durch mehrfaches Digerieren mit Diethylether unter Ultraschall gereinigt. Die Zielverbindung wurde als *para*-Toluolsulfonat in einer Ausbeute von 70% isoliert und massenspektrometrisch sowie NMR-spektrometrisch charakterisiert.

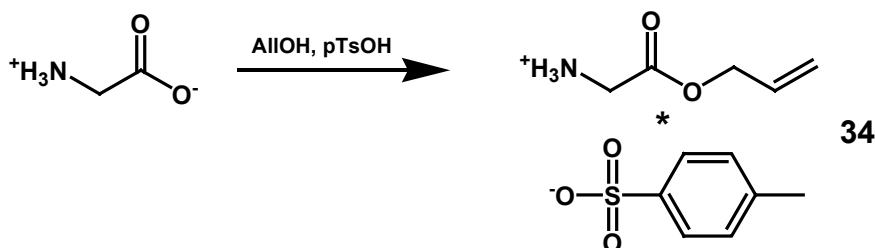


Abbildung 57. Synthese des L-Glycyl-allylesters **34**.

Im nächsten Schritt wurde der L-Glycyl-allylester unter Verwendung von HOBt und EDC als Kupplungsreagenzien mit N^α-Fmoc-L-Serin gekuppelt (Abbildung 58). Harnstoffderivate, die durch den Einsatz von EDC entstehen, konnten problemlos durch wässrige Aufarbeitung abgetrennt werden. Nach flash-chromatographischer Reinigung wurde das Dipeptid in 77% Ausbeute isoliert und ebenfalls spektrometrisch charakterisiert.

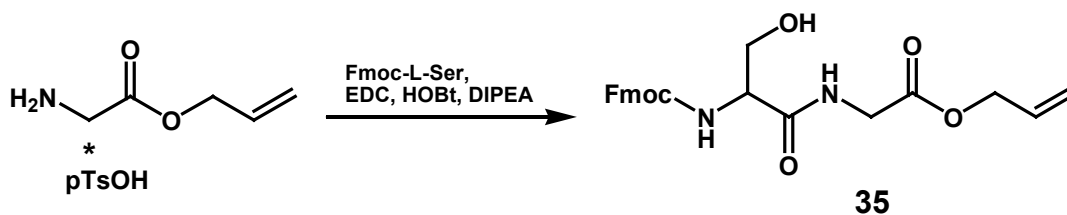


Abbildung 58. Synthese des Fmoc-L-seryl-L-glycyl-dipeptids **35**.

Eine Beladung des Trityl-Harztes mit dem Dipetid unter Einsatz von Pyridin als Base bei Raumtemperatur schlug fehl, erst eine Erhöhung der Temperatur auf 60°C ergab Beladungen von 0.6 bzw 0.5 mmol/g. Die Beladung wurde mittels UV-Fmoc-Methode bestimmt.

Die Synthese erfolgte wie bereits für die anderen Peptide beschrieben: Nach Entschützung durch 18-stündige Reaktion mit Tetrakis(triphenyl)palladium(0) unter Zusatz von Phenylsilan, wurde C-terminal mit dem geranylgeranyierten Cysteinmethylester **14** unter Verwendung von PyBOP und N-Methylmorpholin verlängert. In N-terminaler Richtung wurden HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien verwendet, die Fmoc-Schutzgruppen wurden durch Behandlung mit 50% Piperidin in DMF entfernt. Bei der abschliessenden Kupplung des Biotin erwies sich dessen Schwerlöslichkeit in DMF als problematisch. In der ersten Synthese wurde die Temperatur erhöht und Ultraschall verwendet, um eine vollständige Solubilisierung zu erreichen. Allerdings bildete sich beim Abkühlen schnell ein unlöslicher Niederschlag aus, der die Filterfritte des Festphasenreaktors verstopfte. In den nachfolgenden Ansätzen konnte dieses Problem durch die Verwendung von 8 statt 4 Äquivalenten DIPEA bei der Kopplung des Biotins umgangen werden. Von einem Erwärmen von Aktivestern ist allgemein abzuraten, da diese thermisch labil sind.

An die letzte Kupplung schloss sich wie in den vorhergehenden Synthesen ein gründliches Waschen mit DMF im Lösemitteldurchfluss an. Zur Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen wurde das Harz mit Tetrakis(triphenyl)phosphin-palladium(0) in einer Mischung von Piperidin/DMF (4:1 v/v) unter Schutzgas behandelt. Nach dem abschliessenden, wiederholten Waschen des Harzes mit DMF, DCM, DCM/MeOH und DCM wurde das Harz unter vermindertem Druck getrocknet.

Zur Abspaltung vom polymeren Träger wurde ein Teil des getrockneten Harzes mit 1% TFA und 1% TES in trockenem DCM für 1 h geschüttelt. Nach dem Auswaschen mit verschiedenen MeOH/DCM-Mischungen und dem Einengen unter vermindertem

Druck, wurde das Rohprodukt massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnte das Zielpeptid nicht nachgewiesen werden. Es musste daher angenommen werden, dass eine Spaltung der Tritylester-Bindung zum polymeren Träger mit 1% TFA nicht möglich war. Eine Behandlung des restlichen Harzes mit 2% TFA und 2% TES in trockenem DCM verlief ohne eine Verbesserung dieses Ergebnisses. Nach erneuter Festphasensynthese wurde eine Abspaltung mit 5% TFA und 3% TES innerhalb von 10 Minuten getestet. Dabei musste eine Schwarzfärbung des polymeren Trägers beobachtet werden. Nach dem Auswaschen wurde das Filtrat sofort mit einem entsprechenden Volumen an DIPEA neutralisiert, eingengt und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Dabei konnten keine der beobachteten Ionen dem Zielpeptid (MW 1532.0163) oder Fragmenten zugeordnet werden (Abbildung 59).

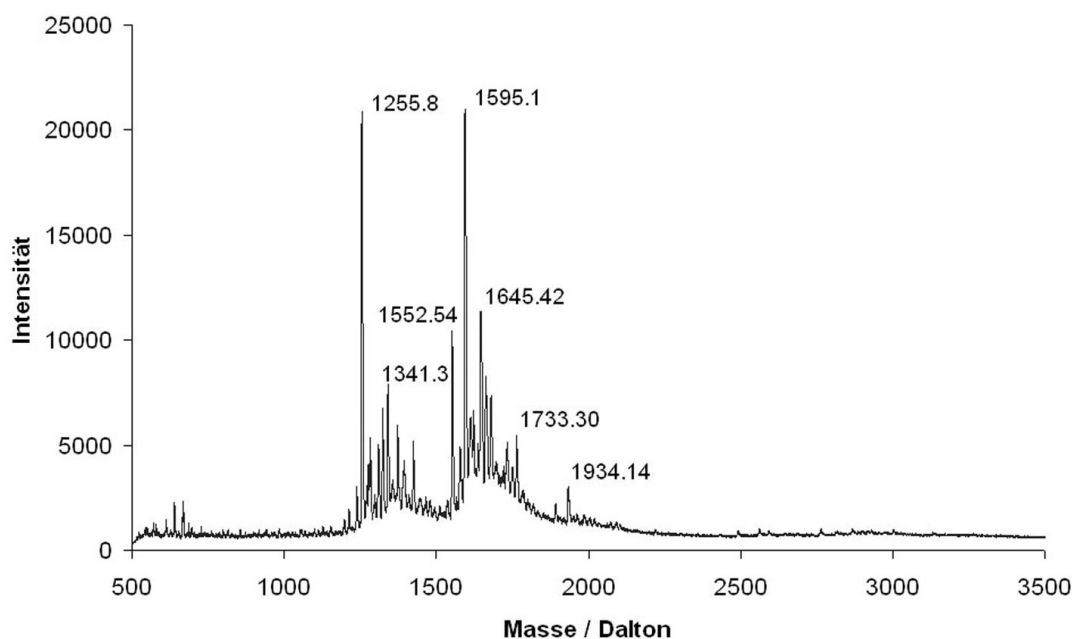


Abbildung 59. MALDI-TOF-Massenspektrum nach der Abspaltung mit 5% TFA.

Daraus kann gefolgert werden, dass die Anbindung an den polymeren Träger via Tritylether und der sehr säurelabile Geranylgeranylrest nicht miteinander kompatibel sind. Für die RhoA-Synthese mittels SPPS wird eine völlig andere Schutzgruppen-/Linker-Strategie entwickelt werden müssen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aufklärung der Tumorgenese und die Entdeckung neuer Ansatzpunkte für Krebstherapien sind seit Jahren ein zentrales Thema der medizinisch-chemischen Forschung. Die bedeutenden Fortschritte im Bereich der Gentechnik in den vergangenen Jahrzehnten haben diesem Forschungsbereich neue Möglichkeiten und Methoden eröffnet. Um die Hintergründe der Tumorgenese zu analysieren, ist es erforderlich die zelleigenen Mechanismen, welche ihr entgegenwirken oder sie unterstützen können, auf molekularer Ebene zu verstehen. Zu diesem Zweck werden häufig semisynthetische Proteine verwendet, weil die nativen Proteine aufgrund ihrer posttranslationalen Modifikationen nur in geringem Maße durch gentechnische Verfahren zugänglich sind. Die Ras-Proteine stellen eine Familie solcher „tumor-relevanter“ Proteine dar, welche Schlüsselstellen in der Signalweiterleitung in der Zelle einnehmen.

In einem semisynthetischen Ansatz werden große, gentechnisch hergestellte Proteinfragmente mit kurzen, chemisch synthetisierten Peptiden kombiniert. In letzteren können die nativen posttranslationalen sowie weitere unnatürliche Modifikationen eingeführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden polybasische, monolipidierte Proteine der Ras-Familie durch die *expressed protein ligation* aus einem rekombinatem Protein und mehreren chemisch synthetisierten Peptiden generiert werden. Als Zielproteine wurden K-Ras 4B, das am häufigsten mutiert auftretende Mitglied der Ras-Onkogene, und das bisher wenig untersuchte D-Ral A ausgewählt.

In beiden Peptidsequenzen wurden zur Lokalisierung in nachfolgenden zellulären Assays Fluoreszenzmarker eingebracht. Als Position für diese Reportermoleküle wurde zunächst der C-Terminus ausgewählt, da hier die geringste Beeinflussung der Proteineigenschaften erwartet wurde.

Zentraler Ausgangspunkt für die Synthese der nativen und der fluoreszenzmarkierten Peptide war das mit N^{ϵ} -Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysin-allylester beladene Trityl-Harz **2** (Abbildung 60).

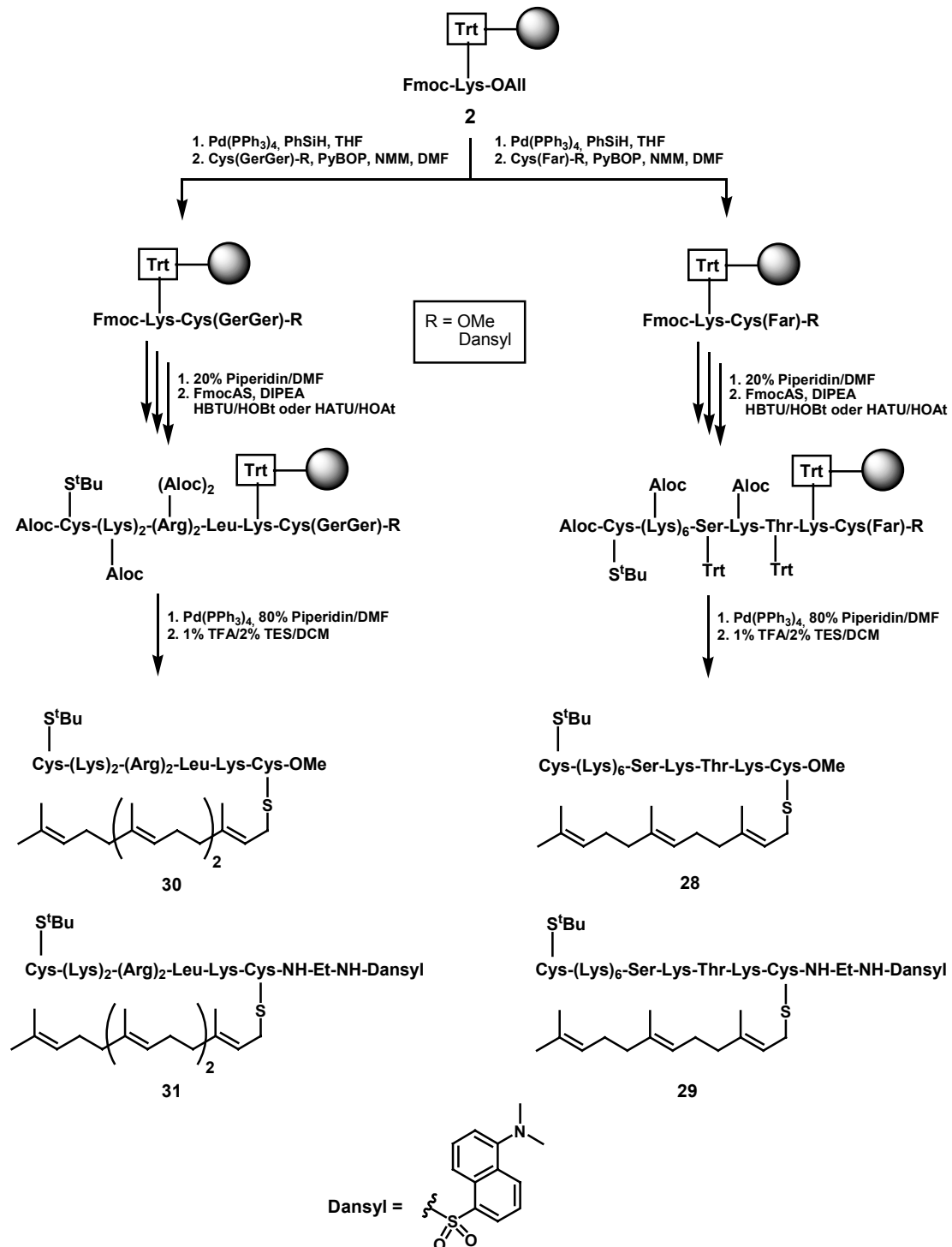


Abbildung 60. Synthesestrategie zur Darstellung der polybasischen, monolipidierten K-Ras-Peptide **28**, **29** und D-Ral-Peptide **30**, **31**.

C-terminal wurde mit verschiedenen prenylierten und teilweise fluoreszenzmarkierten Cysteinderivaten verlängert. Die eingesetzten Cystein-Bausteine **14**, **17**, **18** und **19** waren zuvor durch Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung und weitere Derivatisierung aus L-Cystein oder dem L-Cysteinmethylester synthetisiert worden.

Das hierfür verwendete Geranylgeranylchlorid **13** wurde durch einer fünfstufigen Reaktionssequenz ausgehend von Farnesylbromid aufgebaut. Für die weitere N-terminale Verlängerung wurde unter Berücksichtigung der ausgeprägten Säurelabilität der Isoprenylgruppen eine Fmoc-Strategie mit Alloc- bzw. Trityl-geschützten Seitenkettenfunktionalitäten angewendet.

Die Zielmoleküle konnten vollständig auf dem polymeren Träger aufgebaut und nach der Reinigung ohne weitere Modifizierungen verwendet werden. Die decameren Peptide **28** und **29**, welche den C-Terminus von K-Ras 4B repräsentieren, konnten in sehr guten Gesamtausbeuten von 22 bzw. 35% isoliert werden. Die heptameren Peptide **30** und **31**, die den C-Terminus von D-Ral repräsentieren, konnten in guten Ausbeuten von 18 bzw. 22% erhalten werden. Alle synthetisierten Peptide konnten mittels Massenspektrometrie (ESI- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie) und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Synthese eines Bodipy-markierten Peptids war mit dieser Methodik jedoch nicht möglich. Wie sich herausstellte war der Fluoreszenz-Marker nicht mit den Methoden zur Abspaltung der Schutzgruppen kompatibel.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann am Max-Planck-Institut Dortmund wurden die synthetisierten Peptide mittels *expressed protein ligation* mit verkürztem rekombinanten H-Ras(1-180) verknüpft. Bisher waren Ligationen von Ras-Proteinen mit Peptiden nur unter Verwendung eines Maleinimidocaproyl-Linkers möglich gewesen. Die so synthetisierten Proteine besitzen jedoch ein nicht-natürliches Protein-*backbone* an der Ligationsstelle (Abbildung 61), durch die *expressed protein ligation* dagegen wird an dieser Stelle native Amidbindung ausgebildet.

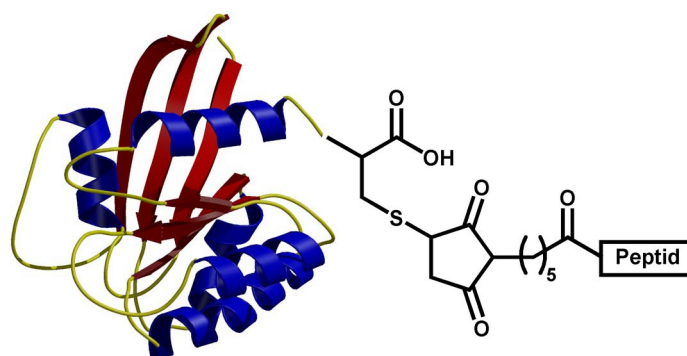


Abbildung 61. Ausbildung eines nicht-natürlichen Peptid-*backbones* durch MIC-Ligation.

In mehreren Testreaktionen konnten die optimalen Bedingungen für die Reaktionen der Peptide mit dem rekombinanten H-Ras-MESNA-Thioester ermittelt werden. Die Durchführung bei 25°C und die Reduzierung der Reaktionszeit von 16 auf 4 h verringerte die Bildung von unlöslichem Präzipitat. Eine nahezu quantitative Umsetzung des rekombinanten Proteins wurde durch die Verwendung hoher Überschüsse der Peptide erreicht. Durch den Einsatz der polybasischen Peptide ist es erstmals gelungen semisynthetische Ras-Proteine mit natürlichem *backbone* in sehr guten Ausbeuten von bis zu 20% zu synthetisieren. Die erfolgreiche Ligation konnte durch die Verschiebung zu höheren Massen und fluoreszierende Banden in der SDS-PAGE-Gelelektrophorese belegt und eindeutig durch LC-gekoppelte Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abbildung 62).

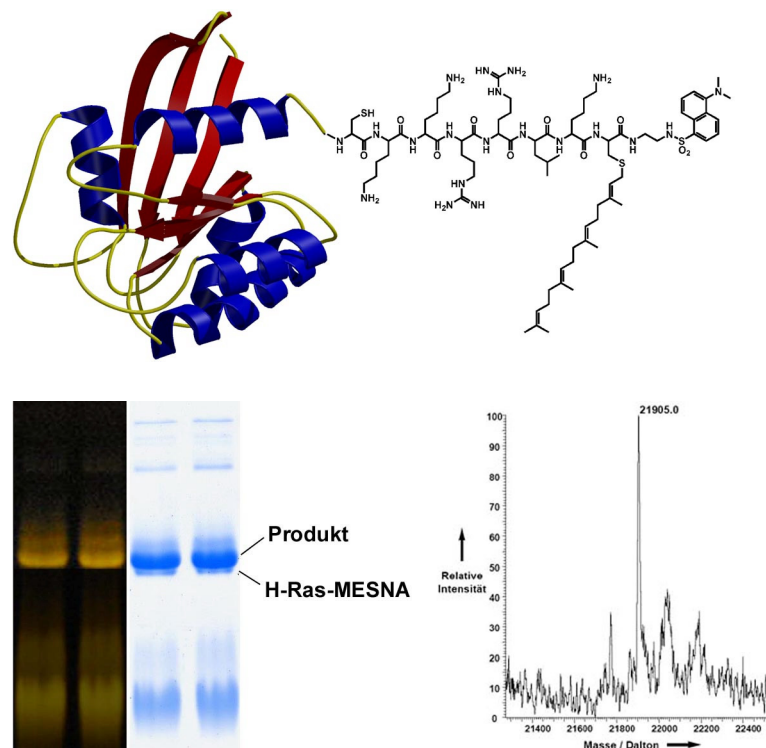


Abbildung 62. Das fluoreszierende H-Ras/D-Ral-Konstrukt: SDS-PAGE-Gelelektrophorese und ESI-Massenspektrum.

Die chimären Proteine repräsentieren aufgrund der hohen Sequenzidentität unter diesen Mitgliedern der Ras-Familie die wesentlichen Eigenschaften der nativen Proteine. Nach Syntheseansätzen im präparativen Maßstab mit den K-Ras 4B-Peptiden konnten die isolierten chimären Proteine in biophysikalischen und zellulären Assays eingesetzt werden.

Durch ein fluoreszenzbasiertes Assay mit dem H-Ras/K-Ras-Methylester wurde nachgewiesen, dass die Faltung der Domänen des rekombinanten Proteins während der Ligationsreaktion und der nachfolgenden Reinigung intakt geblieben war. Das chimäre Protein wurde mit einem fluoreszierenden Guaninriphosphat beladen und mit dem *guaninnucleotide exchange factor* Sos inkubiert. Dadurch wurde der Austausch des markierten GTPs gegen unmarkiertes GTP, welches gleichzeitig mit Sos appliziert wurde, stimuliert. Für die Negativ-Kontrolle wurde verkürztes, rekombinantes H-Ras verwendet (Abbildung 63). Das Assay belegt, dass durch die Ligation mit dem synthetischen Peptid ein funktionelles Protein generiert wurde, welches ein Substrat für den GEF Sos darstellt.

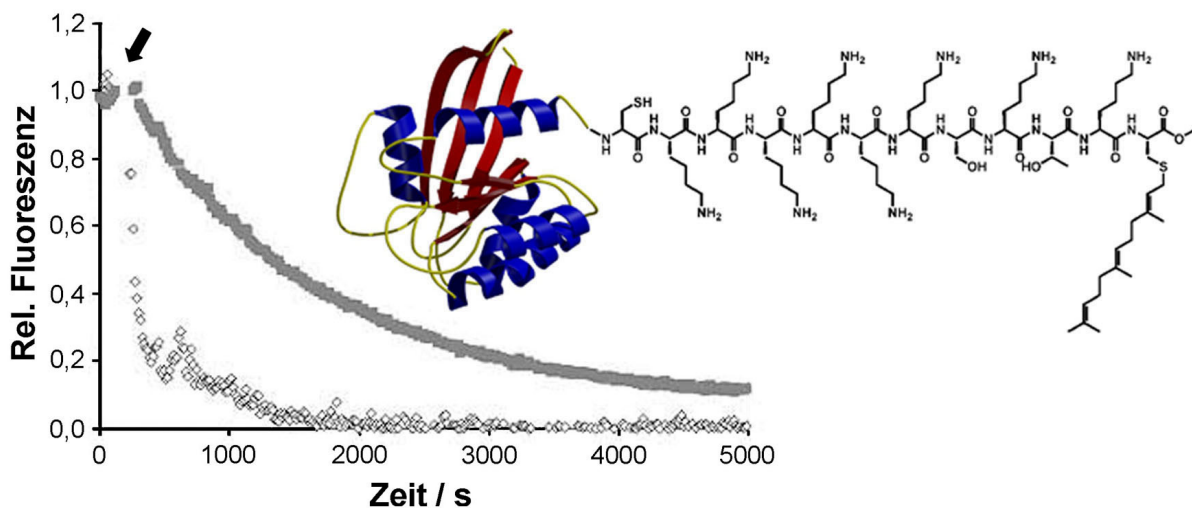


Abbildung 63. Fluoreszenzbasierter GTP-Austausch-Assay mit dem H-Ras/K-Ras-Methylester (der Pfeil markiert die Zugabe von Sos und GTP).

Für das gleiche Protein, das quasi-native K-Ras, wurde ebenfalls die Assoziationskinetik mit Membranen mittels *surface plasmon resonance*-Experimenten an Model-Membranen untersucht (C. Grunwald, AG Kuhlmann). Die artifiziellen Membranen waren aus verschiedenen binären Mischungen eines ungeladenen und eines negativ geladenen Lipids aufgebaut worden. Die Auswertung der Assays zeigt eine deutlich stärkere Assoziation des Proteins mit geladenen Membranen als mit ungeladenen Membranen. Dies unterstützt die Theorie, dass K-Ras 4B nach den posttranslationalen Modifikationen am Endoplasmatischen Retikulum durch passive Diffusion zur Plasmamembran transportiert wird. Die erhaltenen Kurven für die Assoziation und Dissoziation an bzw. von den Membranen

konnten jedoch nicht durch ein einfaches Langmuir-Model beschrieben werden, so dass die kinetischen Koeffizienten vorerst nicht berechnet werden konnten.

Microinjektionen des fluoreszenzmarkierten chimären Proteins (R. Vetter, AG Kuhlmann) sollten zur Aufklärung der Membranlokalisation von K-Ras 4B und dem Transport vom Endoplasmatischen Retikulum beitragen. Allerdings konnte das Dansyl-markierte Protein nicht durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden, da die Coenzyme NAD und FAD im gleichen Wellenlängenbereich emittieren. Eine Verifizierung der Ergebnisse der SPR-Experimente war in Ermangelung eines für zellbiologische Assays einsetzbaren Proteins daher nicht möglich.

Die durch die Menge an chimären Protein limitierte Anzahl der biophysikalischen Messungen lassen noch keine präzisen Rückschlüsse auf die Kinetik der Membranassoziation von K-Ras 4B zu. Aufgrund des ungewöhnlichen Kurvenverlaufs, der eine Annäherung mittels Langmuir-Model nicht zulässt, sind weitere Messreihen notwendig, um die kinetischen Koeffizienten des chimären H-Ras/K-Ras-Proteins zu bestimmen.

Für zellbiologische Assays wird ein Bodipy-markiertes Protein benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Synthese eines entsprechend markierten Peptids nicht realisiert werden, da die verwendete Strategie mit dem Fluorezenzmarker nicht kompatibel ist. Für die Synthese eines solchen Peptids wird ein völlig neue Syntheseroute ausgearbeitet werden müssen. Das gleiche trifft für die Synthese der RhoA-C-Terminus zu. Eine Synthese konnte nicht erfolgreich unter Verwendung eines Trityl-Linkers abgeschlossen werden, da die Abspaltbedingungen in diesem Fall nicht mit der Säurelabilität des Geranylgeranylrests kompatibel waren.

Für Ligationsreaktionen scheinen die polybasischen Peptide allerdings in besonderem Maße geeignet zu sein. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse ist zu erwarten, dass semisynthetische Ras-Proteine mit nativem Peptid-*backbone* künftig in präparativen Mengen zugänglich sein werden. Eine Erweiterung der Synthesestrategie unter Verwendung geeigneter Reportergruppen wird den Zugang zu einer Vielzahl an semisynthetischen Proteinen ermöglichen. Der Einsatz dieser Proteine in biophysikalischen und zellulären Assays wird weiter dazu beitragen die Mechanismen der Signaltransduktion durch die monomeren GTPasen aufzuklären.

6 Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Chemikalien

Alle verwendeten Ausgangskemikalien wurden von den Firmen Acros Organics, Avocado, Bachem, Fluka, Novabiochem, Senn Chemicals oder Sigma-Aldrich bezogen; mit Ausnahme der nichtmodifizierten Aminosäuren aus Schenkungen der Degussa AG, sowie N^α -Fmoc- N^ϵ -Boc-L-Lysin und Bodipy, welche von E. Simon synthetisiert wurden.

Chromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) verwendet. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm bzw. 366 nm verwendet. Zum Anfärben der Substanzen wurden die nachfolgenden Reagenzien benutzt:

Ammoniummolybdat-Lösung: 2.5 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat, 2.0 g Cer(IV)-sulfat, 50 ml konz. Schwefelsäure, mit Wasser auf 400 ml aufgefüllt.

Kaliumpermanganat-Lösung: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 ml Wasser.

Die verwendeten Laufmittel, sowie die R_f -Werte der Verbindungen sind angegeben. Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngrösse 40-60 μm) bei Druck von 1.2–1.7 bar. Diese wurden zum größten Teil manuell durchgeführt, für einige Trennungen wurde ein CombiFlash Sq16x der Firma Isco benutzt.

Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde mit einem Gerät der Firma Hewlett Packard (Agilent, 1100 Series) an einer VP 125/21 Nucleodur-C18-gravity 5 μ -Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden an einem Gerät der Firma Hewlett Packard (Hewlett-Packard, Series) an einer CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 Nautilus-Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Zur Bestimmung der Retentionszeiten (t_R) wurde ein stufenloser Gradient von 100% Laufmittel A (Wasser/Ameisensäure 99.9:0.1 (v/v)) bis 100% Laufmittel B

(Acetonitril/Ameisensäure 99.9:0.1 (v/v)) in 30 Minuten bei einer Flussrate von 1ml/min verwendet.

Massenspektrometrie

FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde Nitrobenzylalkohol (3-NBA) verwendet, gegebenenfalls wurde TFA zugesetzt. Die verwendete Matrix und die m/z Werte sind angegeben.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem Voyager-DE™ Pro der Firma PerSeptive Biosystems gemessen. Als Matrix für die Messungen der Peptide wurde eine gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Wasser/Ethanol (9:1 v/v, 0.1% TFA), für die Messung der Proteine wurde eine Lösung von Sinapinsäure (10 mg/ml) in Acetonitril/wässriger TFA (0.1%) (1:1 v/v) verwendet.

LC-gekoppelte Massenspektren wurden auf einem LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan gemessen. Zur chromatographischen Trennung wurden eine CC125/4 Nucleodur C18 gravity 3 μ -Säule der Firma Machery-Nagel, sowie eine Jupiter 5u C4 300A-Säule der Firma Phenomenex® verwendet.

NMR-Spektroskopie

Bruker AC 250	250 MHz (¹ H-NMR); 62.8 MHz (¹³ C-NMR);
Varian Mercury-200	200 MHz (¹ H-NMR); 81.0 MHz (³¹ P-NMR);
Bruker AM 400	400 MHz (¹ H-NMR); 100.5 MHz (¹³ C-NMR);
Varian Mercury-400	400 MHz (¹ H-NMR); 100.5 MHz (¹³ C-NMR);
Bruker DRX 500	500 MHz (¹ H-NMR); 125.7 MHz (¹³ C-NMR);

Die in ppm angegebenen Verschiebungen δ beziehen sich auf deuterio-Chloroform, deuterio-Methanol oder deuteriertes Wasser als interne Standards. Das verwendete Lösungsmittel ist bei dem jeweiligen Spektrum aufgeführt. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben, die Signalmultiplizitäten sind wie im Abkürzungsverzeichnis angegeben abgekürzt worden.

Optische Rotation

Die Drehwerte chiraler Substanzen wurden mittels Polartronic HH80-Polarimeter der Firma Schmidt+Haensch bestimmt. Die verwendeten Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen vermerkt.

Proteine, *surface plasmon resonance*-Messungen und Microinjektionen

Der verwendete H-Ras(1-180)-MESNA-thioester wurden von C. Nowak im *E. coli*-Stamm BL21(D3) überexprimiert und aufgereinigt. *Surface plasmon resonance*-Experimente wurden von C. Grunwald, die fluoreszenzbasierten Assays wurden von Dr. J Kuhlmann durchgeführt. Microinjektionen in NIH 3T3 Zellen wurden von R. Vetter durchgeführt. Alle hier aufgeführten Mitarbeiter sind am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Dortmund) in der Abteilung I (Strukturelle Biologie), Arbeitsgruppe Kuhlmann tätig.

Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktgerät 530 gemessen und sind nicht korrigiert.

UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden mit einem Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrometer der Firma Varian aufgenommen.

6.2 Versuche zu Kapitel 4.2

6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1

Synthese von *N*^α-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysinallylester (Fmoc-Lys(Boc)-OAll) **1**^[175]

Zu einer Lösung von 469 mg FmocLys(Boc) (1.00 mmol) in 10 ml trockenem Methanol wurden unter Argonatmosphäre 163 mg Cäsiumcarbonat (0.50 mmol) langsam zugegeben, wobei es zu einer Gasentwicklung kam. Nach einer Stunde Rühren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Toluol coevaporiert und für 10 Minuten an der Ölpumpe getrocknet.

Der Feststoff wurde in 10 ml trockenem DMF gelöst und 870 µl Allylbromid wurden zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren wurde der entstandene Niederschlag über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand unter Vakuum getrocknet.

Die Aufreinigung des Rohprodukts (farbloses Öl) erfolgte durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel mit einem CombiFlash Sq16x durch Gradientenelution von 0-30% Ethylacetat in Cyclohexan für 30 Minuten. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 397 mg (0.78 mmol, 78%), farbloser Feststoff

C₂₉H₃₆N₂O₆ (MW 508.61)

[α]_D²⁰ = -13.7° (MeOH)

R_F-Wert (cHex/EE 1:1 v/v) = 0.53

HRMS-FAB (3-NBA, [M]⁺) ber.: 508.2573 gef.: 508.2554

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (m, 2H, ArH); 7.61 (br m, 2H, ArH); 7.33 (m, 2H, ArH); 7.31 (m, 2H, ArH); 5.90 (m, 1H, CH); 5.34 (m, 1H, CH₂); 5.27 (m, 1H, CH₂); 4.65 (br d, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂); 4.40 (m, 3H, CH, CH₂); 4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH); 3.11 (m, 2H, CH₂); 1.87 (m, 1H, CH₂); 1.72 (m, 1H, CH₂); 1.44 (s, 9H, CH₃).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, CDCl_3): δ = 172.28, 156.22, 143.91, 141.46 (C_q); 131.65 (CH); 127.85 (CH); 127.21 (CH); 125.24 (CH); 120.12 (CH_2); 67.17 (CH_2); 53.93 (CH); 47.33 (CH); 40.10 (d, $J_{\text{CN}} = 16.1$, CH_2); 32.36 (CH_2); 29.75 (CH_2); 28.56 (CH_3); 22.50 (CH_2).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Beladen des Trityl-Harz mit N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysin-allylester 2

Eine Lösung von 724 mg FmocLys(Boc)OAll (1.4 mmol) in 5 ml trockenem Dichlormethan wurde mit 200 μl Triethylsilan und 5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und 16 h an der Ölpumpe getrocknet.

Der feste Rückstand wurde in 7 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 972 μl DIPEA (5.6 mmol) wurden zugegeben. Diese Lösung wurde zu 1732 mg Trityl-Harz (Novabiochem, Beladung 1.3 mmol/g) gegeben, das 16 h über Natriumhydroxid-Pellets im Vakuum getrocknet worden war und es wurde 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde abfiltriert und das Harz 30 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 v/v/v) geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wurden jeweils 5 flow-washes mit Dichlormethan, Dimethylformamid, Methanol und Dichlormethan durchgeführt und das Harz für 16 h im Vakuum getrocknet.

Die Beladung wurde nach der UV-Fmoc-Methode bestimmt und betrug 0.41 mmol/g.

Bestimmung der Beladung des Trityl-Harzes:

Eine Suspension von 2.4 mg des Harzes wurden in 3 ml 20% Piperidin in Dimethylformamid 2 min geschüttelt. Es wurden 0.5 ml entnommen und mit 20% Piperidin in Dimethylformamid auf 3 ml verdünnt. Anschließend wurde die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm ($\epsilon = 7800/\text{mol}\times\text{cm}$) bestimmt. Die Beladung läßt sich mittels Lambert-Beer-Gesetz berechnen.

**Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl- N^ϵ -allyloxycarbonyl-L-lysin
(Fmoc-Lys(Aloc)) **3**^[176]**

Zu einer Lösung von 439 mg L-Lysin (3.0 mmol) in 20 mL Wasser wurde 729 mg basisches Kupfercarbonat (3.3 mmol) zugegeben und es wurde 30 min unter Rückfluss gerührt. Feste Rückstände wurden abfiltriert und der pH-Wert auf pH 9 eingestellt. Das tiefblaue Filtrat wurde auf 0°C gekühlt und 480 µl Chlorameisensäureallylester wurden innerhalb von 20 min zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für 16 h bei einem konstanten pH-Wert von 9 gerührt.

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in 40 ml Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 450 mg Thioacetamid (6.0 mmol) wurde 30 min zum Rückfluß erhitzt; dann wurde der pH-Wert mit halbkonzentrierter Salzsäure auf 2 eingestellt und weitere 30 min erhitzt. Das ausgefallene Kupfersulfid wurde abfiltriert, das Filtrat auf 0°C abgekühlt und der pH-Wert auf 10 eingestellt. Innerhalb von 30 min wurde eine Lösung von 1164 mg FmocCl in 25 ml 1,4-Dioxan zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 16 h bei einem konstanten pH-Wert von 10 gerührt.

Das 1,4-Dioxan wurde bei vermindertem Druck entfernt, die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der pH-Wert der wässrigen Phase mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt und es wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Als Rohprodukt erhielt man ein gelbliches Öl.

Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel (cHex/EE/ 1:1 v/v, 1% Ameisensäure).

Ausbeute: 840 mg (1.86 mmol = 62%), gelblicher Feststoff

$C_{25}H_{28}N_2O_6$ (MW 452.50)

$[\alpha]_D^{20} = -1.6^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (cHex/EE/Essigsäure 1:1:2% v/v/v) = 0.49

HRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$)

ber.: 453.2020

gef.: 453.2015

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 7.76 (m, 2H, ArH); 7.64 (m, 2H, ArH); 7.36 (m, 2H, ArH); 7.28 (m, 2H, ArH); 5.87 (m, 1H, CH); 5.24 (m, 1H, CH); 5.12 (m, 1H, CH); 4.46 (m, 2H, CH_2); 4.31 (m, 2H, CH_2); 4.19 (m, 1H, CH); 4.09 - 4.12 (m, 1H, CH); 3.08 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH_2); 1.82 (m, 1H, CH_2); 1.68 (m, 1H, CH_2); 1.48 (m, 2H, CH_2); 1.40 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3): δ = 143.96, 143.81 (C_q); 141.42, 127.85, 127.21, 125.22, 120.11 (CH); 117.93, 67.20, 65.92 (CH_2); 53.75 (CH); 47.27 (CH); 40.63, 32.73, 31.81, 29.42 (CH_2).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2

Synthese von *N*^α-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-arginin (Boc-Arg) 4

Zu einer Lösung von 3.5 g L-Arginin (20.0 mmol) in 200 ml 1,4-Dioxan/Wasser wurden bei pH 9 8.7 g Boc-Anhydrid (40.0 mmol) zugegeben. Nach 2.5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck entfernt und durch das entsprechende Volumen an Wasser ersetzt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Diethylether gewaschen, mit 2N Salzsäure bei 0°C auf pH 2 angesäuert und mit Ethylacetat gewaschen. Da nach Lagern bei 4°C für 16 h kein Produkt aus der wässrigen Phase auskristallisierte, wurde das Wasser unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff 16 h unter Vakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ (MW 274.32)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.4^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (EtOH/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:1:2 v/v/v) = 0.59

LRMS-FAB (3-NBA, $[\text{M}+\text{H}]^+$) ber.: 274.32 gef.: 275.48

**Synthese von N^{α} -tert-Butyloxycarbonyl- $N^{\delta,\omega}$ -bis-allyloxycarbonyl-L-arginin
(Boc-Arg(Aloc)₂) **5**^[176]**

Zu einer Suspension von **4** (≤ 20 mmol, Rohprodukt) in 100 ml trockenem Dichlormethan wurden unter Schutzgasatmosphäre 10.8 ml DIEA (80 mmol) und 7.6 ml frisch destilliertes Trimethylsilylchlorid (60 mmol) zugetropft. Anschließend wurde 2 h zum Rückfluß erhitzt. Nachdem auf 0°C abgekühlt worden war und 8 ml DIPEA (60 mmol) und 4.2 ml Chlorameisensäureallylester (20 mmol) zugetropft worden waren, wurde für weitere 30 min bei 0°C und danach 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurde mit 120 ml Wasser verdünnt und der pH-Wert wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit Dichlormethan wurden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand 16 h im Vakuum getrocknet. Als Rohprodukt erhielt man ein gelbliches Öl.

Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel (cHex/EE/Ameisensäure 1/1/1% v/v/v).

Ausbeute: 840 mg (1.86 mmol = 62%), gelbliches Öl

C₁₉H₃₀N₄O₈ (MW 442.46)

$[\alpha]_D^{20} = -1.6^\circ$ (MeOH)

HRMS-FAB (3-NBA, [M+H]⁺) ber.: 443.2136 gef.: 443.2154

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.99$ - 5.89 (m, 2H, CH); 5.38 - 5.29 (m, 4H, CH); 4.70 (m, 4H, CH₂); 4.59 (m, 5H, CH, CH₂); 4.00 - 3.99 (m, 2H, CH₂); 1.84 (m, 2H, CH₂); 1.74 (m, 2H, CH₂); 1.43 (s, 9H, CH₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 175.65$, 159.96 , 155.21 (C_q); 132.51 , 130.48 (CH); 119.29 , 117.29 (CH₂); 67.39 , 65.75 (CH₂); 53.07 (CH); 43.69 (CH₂); 27.84 (CH₃); 24.30 (CH₂).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl- $N^{\delta,\omega}$ -bis-allyloxycarbonyl-L-arginin (Fmoc-Arg(Aloc)₂) **6**^[177]

Eine Lösung von 229 mg N^α -Boc- $N^{\delta,\omega}$ -Aloc-L-Arginin (≤ 0.53 mmol, Rohprodukt) in 8 ml TFA/DCM wurde 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde der feste Rückstand in 10 ml 1N Natriumcarbonatlösung aufgenommen und der pH-Wert mit gesättigter Natriumcarbonatlösung auf pH 10 eingestellt. Bei 0°C wurde eine Lösung von 160 mg FmocCl (0.59 mmol) in 10 ml 1,4-Dioxan zugetropft und es wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Entfernen des 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck wurde mit dem entsprechenden Volumen an Wasser verdünnt, mit Diethylether gewaschen und nach Ansäuern der wässrigen Phase mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 2 mit Ethylacetat extrahiert.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand 16 h im Vakuum getrocknet und mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel gereinigt (cHex/EE/Ameisensäure 1/1/1% v/v/v).

Ausbeute: 54 mg (0.1 mmol = 18%), farbloser Feststoff

$C_{29}H_{32}N_4O_8$ (MW 564.59)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH/Essigsäure 90:8:2 v/v/v) = 0.62

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₈): δ = 7.85 (m, 2H, ArH); 7.67 (m, 2H, ArH); 7.37 (m, 2H, ArH); 7.27 (m, 2H, ArH); 5.92-5.86 (m, 2H, CH); 5.21-5.12 (m, 4H, CH₂); 4.65 (m, 4H, CH₂); 4.45 (m, 2H, CH₂); 4.22 (m, 1H, CH); 3.88-3.83 (m, 1H, CH).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von 1H-Pyrazol-1-carboxamidin Hydrochlorid **7**^[147]

Zu einer Lösung von 642 mg Pyrazol (9.4 mmol) in 10 ml trockenem 1,4-Dioxan wurden unter Schutzgas 397 mg Cyanamid (9.4 mmol) und anschließend 1.4 ml mit HCl gesättigtes 1,4-Dioxan zugegeben (Endkonzentration an HCl: 1M). Es wurde für

2 h zum Rückfluß erhitzt, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2.6 ml trockener Diethylether zugeben, um das Produkt zu präzipitieren. Der cremefarbene Niederschlag wurde abfiltriert, mit trockenem Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 1230 mg (8.4 mmol = 89%)

$C_4H_7ClN_4$ (MW 146.58)

R_f -Wert (MeOH) = 0.22

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.73, 9.47 (br s, 4H, CH_2^+); 8.91 (s, 1H, CH); 8.08 (s, 1H, CH); 6.78 (s, 1H, CH).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 153.95 (C_q); 147.65, 147.40, 113.30 (CH).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von Allyl-imino(1H-pyrazol-1-yl)methylcarbamat **8**

Zu einer Lösung von 595 mg 1H-Pyrazol-1-carboxamidin (4.1 mmol) in 40 ml DCM/DMF gelöst wurden nach Zugabe von 1.70 ml DIPEA (4.5 mmol) 500 μ l Allylchloroformat zugetropft und es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der feste Rückstand im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.36 g (Rohprodukt)

$C_8H_{10}N_4O_2$ (MW 194.19)

R_f -Wert (MeOH) = 0.79

1H -NMR (500 MHz, CD $_3$ OD): δ = 9.59 (br s, 2H, NH_2^+); 8.43 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH); 7.91 (d, J = 0.7 Hz, 1H, CH); 6.57 (m, 1H, CH); 5.95 (m, 1H, CH); 5.31 (dd, J = 1.8 Hz, 17.2 Hz, 1H, CHH); 5.20 (dd, J = 1.6 Hz, 10.5 Hz, 1H, CHH); 4.56 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2).

6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3

Synthese von all-trans-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester **9**^[178]

Eine Suspension von 5.4 g Natriummethanolat (100 mmol) in 125 ml trockenem Methanol wurde unter Schutzgasatmosphäre auf 0°C gekühlt und es wurden 15 g frisch destillierter Acetessigsäureethylester (115 mmol) und 5 min später 11.2 g all-trans-Farnesylbromid (39.2 mmol) zugegeben. Nach 3 h bei 0°C wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde auf 200 ml Cyclohexan aufgegossen, mit 150 ml Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde für 16 h unter Vakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 12.8 g (32.3 mmol, 82%), rotbraune Flüssigkeit

C₂₁H₃₄O₃ (MW 334.49)

HRMS-FAB (3-NBA, [M]⁺) ber.: 334.2508 gef.: 334.2495

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.07-5.02 (m, 3H, CH); 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂); 3.44-3.40 (m, 1H, CH); 2.54 (m, 2H, CH₂); 2.21 (s, 3H, CH₃); 2.06-1.96 (m, 8H, CH₂); 1.67 (s, 3H, CH₃); 1.62 (s, 3H, CH₃); 1.59 (m, 6H, CH₃); 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃): δ = 203.19 (C_q); 169.73 (C_q); 138.58 (C_q); 135.32 (C_q); 131.41 (C_q); 124.48 (C_q); 124.02 (C_q); 119.79 (C_q); 61.40 (CH); 59.98 (CH₂); 39.83 (CH₂); 27.05 (CH₃); 26.89 (CH₂); 26.64 (CH₂); 25.81 (CH₃); 17.81 (CH₂); 16.26 (CH₃); 16.11 (CH₃); 14.24 (CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von all-trans-6,10,14-Trimethylpentadeca-5,9,13-trien-2-on **10**^[178]

In einer Reibschale wurden 5.6 g Kaliumhydroxid-Pellets zerkleinert und unter Anwendung von Ultraschall in 50 ml Ethanol suspendiert. Nach Zugabe von 12.8 g

all-trans-3,7,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester wurde für 4 h zum Rückfluß erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurden 50 ml Wasser und 100 ml Hexan zugegeben. Die organischen Phase wurde je zweimal mit 5%-iger Salzsäure und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen des Rückstands unter Vakuum für 16 h, wurde das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (CombiFlash) gereinigt (cHex nach cHex/EE 9:1 (v/v)).

Ausbeute: 6.49 g (24.7 mmol = 65%); gelbliches Öl

$C_{18}H_{30}O$ (MW 262.43)

R_f -Wert (cHex/EE 30:1 v/v) = 0.15

HRMS-FAB (3-NBA, $[M]^+$) ber.: 262.2297 gef.: 262.2283

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.10-5.07 (m, 3H, CH); 2.45 (m, 2H, CH_2); 2.25 (m, 2H, CH_2); 2.13 (s, 3H, CH_3); 2.05-1.96 (m, 8H, CH_2); 1.67 (s, 3H, CH_3); 1.60 (m, 9H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 208.94 (C_q); 136.55 (C_q); 135.19 (C_q); 124.51 (CH); 124.20 (CH); 122.67 (CH); 43.92 (CH_2); 39.82 (CH_2); 30.05 (CH_3); 26.90 (CH_3); 26.67 (CH_2); 25.82 (CH_2); 22.62 (CH_2); 17.81 (CH_3); 16.13 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von all-trans-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester **11**^[179]

Zu einer Suspension von 1.56 g Natriumhydrid in 45 ml trockenem Tetrahydrofuran wurde unter Schutzgasatmosphäre eine Lösung von 9.5 g Di-*iso*-propyl-(ethoxycarbonylmethyl)phosphonat in 40 ml trockenem Tetrahydrofuran zugetropft. Nach 75 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 6.487 g all-trans-6,10,14-Trimethyl-pentadeca-5,9,13-trien-2-on **10** in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran innerhalb von 30 min zugetropft und anschließend 20 h zum Rückfluß erhitzt.

Die Reaktionsmischung wurde auf Eiswasser aufgegossen, mit 30 ml ges. Natriumchloridlösung versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Um das all-trans-Isomer vom *Z,E,E*-Isomer abzutrennen wurde mehrere Male mittels Flash-Chromatographie gereinigt; Laufmittel cHex/EE 70:1 (v/v).

Ausbeute: 3.09 g (9.3 mmol = 38%)

$C_{22}H_{36}O_2$ (MW 332.52)

R_f -Wert (cHex/EE 70:1 v/v) = 0.21

HRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 333.2788 gef.: 333.2793

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.10 (m, 4H, CH); 4.14 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2); 2.09-1.95 (m, 12H, CH_2); 1.67 (s, 3H, CH_3); 1.59 (s, 12H, CH_3); 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.02, 159.87, 136.30, 135.17, 131.38 (C_q); 142.53, 124.25, 123.05, 115.78 (CH); 59.57, 41.11, 39.83 (CH_2); 26.91, 25.82, 18.95, 17.81, 16.16, 14.47 (CH_3).

Synthese von all-trans-Geranylgeraniol (GerGerOH) **12**^[180]

Zu 42 ml einer 1N Lösung von Di-*iso*-butylaluminiumhydrid (DIBALH) (41.76 mmol) in Dichlormethan wurden weitere 20 ml trockenem Dichlormethan zugegeben und es wurde unter Schutzgasatmosphäre auf $-78^\circ C$ abgekühlt. Eine Lösung von 3087 mg all-trans-3,7,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,10,14-tetraensäure-ethylester **11** (9.28 mmol) in 40 ml trockenem Dichlormethan wurde langsam zugetropft und es wurde für 3 h bei $-78^\circ C$ gerührt.

Nach Zugabe von ges. Ammoniumchloridlösung entstand ein farbloser Niederschlag, der nach Erwärmen auf Raumtemperatur über Celite abfiltriert wurde. Es wurde mehrere Male mit Ethylacetat nachgewaschen, die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt im Vakuum 16 h getrocknet.

Die Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel; Laufmittel cHex/EE 30:1 bis 5:1 v/v.

Ausbeute: 898 mg (3.03 mmol = 33%)

C₂₀H₃₄O (MW 290.48)

R_f-Wert (cHex/EE 5:1 v/v) = 0.22

HRMS-FAB (3-NBA, [M]⁺) ber.: 290.2610 gef.: 290.2643

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ = 5.44-5.40 (m, *J* = 1.3 Hz, 6.8 Hz, 1H, CH); 5.11 (m, 3H, CH); 4.15 (dd, *J* = 0.6 Hz, 6.9 Hz, 2H, CH₂); 2.13-1.97 (m, 12H, CH₂); 1.68 (s, 3H, CH₃); 1.60 (s, 12H, CH₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃): δ = 139.97, 135.54, 135.12, 131.41 (C_q); 124.54, 124.33, 123.93, 123.49 (CH); 59.56, 39.87, 39.71, 26.92, 26.78, 26.47 (CH₂); 25.83, 17.82, 16.42, 16.16, 16.15 (CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.^[181]

Synthese von all-trans-Geranylgeranylchlorid (GerGerCl) **13**^[182]

Eine Lösung von 239 mg *N*-Chlorsuccinimid in 10 ml trockenem Dichlormethan wurde unter Schutzgasatmosphäre auf -40°C abgekühlt und 131 µl trockenes Dimethylsulfid wurden langsam zugetropft. Es wurde weitere 5 min bei -40°C gerührt, dann auf 0°C erwärmen lassen und 5 min bei 0°C gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf -40°C wurden 347 mg all-trans-Geranylgeraniol in 8 ml trockenem Dichlormethan langsam zugetropft. Anschließend wurde für je 30 min bei -40°C bzw. 0°C und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der Reaktionsansatz wurde auf kalte, ges. Natriumchloridlösung aufgegossen, die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Zu den vereinigten organischen Phasen wurden zusätzliche 15 ml Dichlormethan gegeben und es wurde zweimal mit kalter, ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und für 16 h unter Vakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt konnte ohne weitere Reinigungsschritte verwendet werden.

Ausbeute: 365 mg (1.2 mmol = 99%)

$C_{20}H_{33}Cl$ (MW 308.93)

HRMS-FAB (3-NBA, $[M]^+$) ber.: 308.2271 gef.: 308.2266

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.47-5.43 (m, 1H, CH); 5.11-5.08 (m, 3H, CH); 4.10 (d, J = 8.02 Hz, 2H, CH_2); 2.13-1.96 (m, 12H, CH_2); 1.73 (s, 3H, CH_3); 1.68 (s, 3H, CH_3); 1.60 (s, 9H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 142.90, 135.76, 135.11, 131.39 (C_q); 124.54, 124.33, 123.61, 120.47 (CH); 41.28, 39.88, 39.82, 39.61 (CH_2); 26.76, 26.28, 25.83 (CH_2); 17.82, 16.26, 16.19, 16.15 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von S-all-trans-Geranylgeranyl-L-cystein-methylester

(Cys(GerGer)OMe) **14**^[114]

Eine Lösung von 196 mg Cysteinmethylester Hydrochlorid (1.1 mmol) in 7 ml 4N Ammoniak/Methanol wurde unter Schutzgas auf 0°C abgekühlt. Es wurden 352 mg Geranylgeranylchlorid (1.1 mmol) zugegeben, anschließend wurde 3 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt; Laufmittel: DCM → DCM/MeOH 9:1 v/v).

Ausbeute: 287 mg (0.7 mmol = 64%)

$C_{21}H_{41}NO_2S$ (MW 407.65)

$[\alpha]_D^{20}$ = -4.6° (MeOH)

HRMS-FAB (3-NBA, $[M]^+$) ber.: 407.2858 gef.: 407.2824

R_f -Wert (DCM/MeOH 95:5 v/v) = 0.30

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.23 (m, 1H, CH); 5.10 (m, 3H, CH); 3.75 (s, 3H, CH_3); 3.72 (m, 1H, CH); 3.19 (m, 2H, CH_2); 2.93 (m, 1H, CH_2); 2.74 (m, 1H, CH_2); 2.09-1.97 (m, 12H, CH_2); 1.67 (m, 6H, CH_3); 1.60 (s, 9H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, CDCl_3); δ = 167.72, 139.86, 135.39, 134.94, 132.44 (C_q); 130.84, 124.37, 124.16 (CH); 68.14 (CH); 39.68 (CH_3); 39.63, 38.73, 30.35, 28.91, 26.76, 26.63 (CH_2); 25.67, 23.74, 17.66, 15.99 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-S-all-trans-geranylgeranyl-L-cystein (Fmoc-Cys(GerGer)) 15

Eine Lösung von 232 mg Cystein Hydrochlorid Hydrat (1.3 mmol) in 6 ml 4N Ammoniak/Methanol wurde unter Schutzgas auf 0°C abgekühlt. Es wurden 392 mg Geranylgeranylchlorid (1.3 mmol) zugegeben, anschließend wurde 3 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Der feste Rückstand wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst, 563 μl Triethylamin (4.1 mmol) wurden zugetropft und 1360 mg Fmoc-succinimid (4.1 mmol) wurden portionsweise zugegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt; Laufmittel: DCM \rightarrow DCM/MeOH 95:5 v/v).

Ausbeute: 346 mg (0.6 mmol = 46%)

$\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{NO}_4\text{S}$ (MW 615.87)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33.3^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.55

HRMS-FAB (3-NBA, $[\text{M}+\text{Na}]^+$): ber.: 638.3280 gef.: 638.3326

^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.79 (d, J = 7.6 Hz, 2H, ArH); 7.68 (m, 2H, ArH); 7.38 (t, J = 7.2 Hz, 2H, ArH); 7.31 (m, 2H, ArH); 5.22 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH); 5.08 (m, 3H, CH); 4.39-4.29 (m, 2H, CH); 4.23 (t, J = 5.6 Hz, 1H, CH); 3.28-3.22 (m, 1H, CH_2); 3.19-3.12 (m, 1H, CH_2); 3.01-2.97 (m, 1H, CH_2); 2.79-2.74 (m, 1H, CH_2); 2.11-1.93 (m, 10H, CH_2); 1.66-1.58 (m, 15H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, CDCl_3); δ = 145.24, 142.60, 140.54, 136.24, 135.89 (C_q); 128.82, 128.22, 126.38, 125.51, 121.62, 120.95 (CH); 68.23 (CH_2); 55.35 (CH); 40.88, 40.81, 33.92, 27.86, 27.61, 27.46 (CH_2); 25.96, 17.84, 16.32, 16.22 (CH_3).

Synthese von *N*-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid (DANSA) **16**^[149]

Eine Lösung von 2.2 ml Etylendiamin (32.8 mmol) in 150 ml THF wurde auf 0°C abgekühlt und 889 mg Dansylchlorid (3.3 mmol) in 100 ml THF wurden langsam zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde 4 h gerührt.

Anschließend wurden 9 ml 1N Kaliumhydroxidlösung zugegeben und das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde in Ethanol in der Siedehitze gelöst, nach vollständigem Lösen wurden einige Tropfen Wasser zugegeben und der Ansatz 16 h auf 4°C gekühlt. Das Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und 24 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 701 mg (2.42 mmol = 73%)

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (MW 293.38)

R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.18

HRMS-FAB (3-NBA, $[\text{M}]^+$) ber.: 293.1198 gef.: 293.1233

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH); 8.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH); 8.24 (dd, J = 1.2 Hz, 7.2 Hz, 1H, ArH); 7.52 (m, 2H, ArH); 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH); 2.94 (m, 2H, CH_2); 2.88 (s, 6H, CH_3); 2.75 (m, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, CDCl_3); δ = 151.95, 134.66, 130.37, 129.78 (C_q); 129.59, 129.56, 128.38, 123.15, 118.78, 115.20 (CH); 45.39 (CH_3); 45.05, 40.73 (CH_2).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

Synthese von *N*^α-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-all-trans-geranylgeranyl-L-cysteyl-(aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid (Fmoc-Cys(GerGer)-DANSA 17)

Zu einer Lösung von 191 mg FmocCys(GerGer) 15 (0.31 mmol) in 5.5 ml DCM/DMF (6:5 v/v) wurden 118 mg HBTU (0.31 mmol) zugegeben. Nach Aktivierung der Säurefunktion nach 30 min (DC-Kontrolle: Laufmittel DCM/MeOH 9:1 v/v) wurden 109 mg *N*-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid **16** (0.37 mmol) zugegeben. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (Laufmittel: DCM/MeOH 99:1 v/v).

Ausbeute: 200 mg (0.22 mmol = 72%)

$C_{52}H_{66}N_4O_5S_2$ (MW 891.23)

$[\alpha]_D^{20} = -23.3^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.80

HRMS-FAB: die Messung eines hochaufgelösten Massenspektrums war trotz mehrfacher Versuche nicht möglich.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.18$ (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH); 7.78 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH); 7.63-7.59 (m, 3H, ArH); 7.56-7.47 (m, 2H, ArH); 7.42-7.38 (m, 3H, ArH); 7.33-7.28 (m, 3H, ArH); 5.28 (m, 1H, CH); 5.11-5.07 (m, 3H, CH); 4.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2); 4.24 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH); 3.17 (br d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2); 2.09-2.03 (m, 8H, CH_2); 1.98-1.95 (m, 4H, CH_2); 1.67-1.59 (m, 15H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 171.02, 158.13, 143.72, 141.30, 135.14$ (C_q); 131.23, 129.43, 127.76, 127.11, 125.13, 125.11, 124.38, 124.18, 123.70, 120.00 (CH); 67.29 (CH_2); 47.13 (CH); 39.85 (CH_2); 39.71 (CH_3); 39.69, 39.63 (CH_2); 29.89, 26.76, 26.66, 26.48 (CH_2); 25.68, 17.68, 16.22, 16.05, 16.00 (CH_3).

Synthese von S-Farnesyl-L-cystein-methylester (Cys(Far)OMe) **18**

Der farnesylierte Cysteinmethylester **18** wurde durch Umsetzung von 1482 mg Cysteinmethylester Hydrochlorid (8.64 mmol) mit 757 μ l Farnesylchlorid (2.88 mmol) synthetisiert. Die Synthese erfolgte wie bereits für den geranylgeranylierten Cysteinmethylester **14** beschrieben.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (DCM/MeOH 99:1 v/v \rightarrow DCM/MeOH 95:5 v/v).

Ausbeute: 845 mg (2.51 mmol = 87%)

$C_{19}H_{33}NO_2S$ (MW 339.54)

$[\alpha]_D^{20} = -4.8^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (DCM/MeOH 95:5 v/v) = 0.09

HRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 340.2305 gef.: 340.2332

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.25$ (m, 1H, CH); 5.11 (m, 2H, CH); 3.70 (s, 3H, CH_3); 3.70 (m, 1H, CH); 3.20 (m, 2H, CH_2); 2.90 (m, 1H, CH_2); 2.74 (m, 1H, CH_2); 2.07-1.97 (m, 8H, CH_2); 1.67 (m, 6H, CH_3); 1.60 (s, 6H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 169.34, 138.12, 135.71, 132.85$ (C_q); 126.46, 124.45, 123.06 (CH); 65.61 (CH); 41.01 (CH_3); 39.35, 37.84, 29.15, 27.65, 26.98, 26.34 (CH_2); 25.70, 19.61, 17.42, 16.23 (CH_3).

Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-S-farnesyl-L-cystein (Fmoc-Cys(Far)) **19**

Das Fmoc-geschützte, farnesylierte Cystein **19** wurde durch die Umsetzung von 505 mg Cystein Hydrochlorid Hydrat (2.88 mmol) mit 757 μ l Farnesylchlorid (2.88 mmol) und 1080 mg Fmoc-Succinimid (3.36 mmol) und 445 μ l Triethylamin (3.21 mmol) synthetisiert. Die Synthese erfolgte wie bereits für das Fmoc-geschützte, geranylgeranylierte Cysteinderivat **15** beschrieben.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (DCM \rightarrow DCM/MeOH 98:2 v/v).

Ausbeute: 1049 mg (1.92 mmol = 66%)

$C_{33}H_{41}NO_4S$ (MW 547.75)

$[\alpha]_D^{20} = -33.5^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.25

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.78-7.52$ (m, 2H, ArH); 7.62-7.58 (m, 2H, ArH); 7.43-7.38 (m, 2H, ArH); 7.34-7.29 (m, 2H, ArH); 5.22 (m, 1H, CH); 5.09 (m, 2H, CH); 4.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2); 4.26-4.22 (m, 1H, CH); 2.11-1.95 (m, 8H, CH_2); 1.68-1.59 (m, 12H, CH_3).

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 174.38, 155.95, 143.66, 141.27, 135.36, 131.28$ (C_q); 127.71, 127.06, 125.09, 124.95, 124.31, 123.70, 119.96 (CH); 67.33, 53.48 (CH_2); 47.09 (CH); 39.67, 39.59, 33.25, 30.11, 26.71, 26.41 (CH_2); 25.67, 17.67, 16.12, 16.01 (CH_3).

Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-S-farnesyl-L-cysteyl-(aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid (Fmoc-Cys(Far)-DANSA) 20

Der fluoreszenzmarkierte, farnesylierte Cysteinbaustein konnte ausgehend von 200 mg Fmoc-Cys(Far) **19** (0.61 mmol) durch Reaktion mit 214 mg *N*-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid (DANSA) **16** (0.73 mmol) unter Verwendung von 231 mg HBTU (0.61 mmol) als Kupplungsreagenz synthetisiert werden. Die Synthese erfolgte wie bereits für das Fmoc-geschützte, geranylgeranylierte Cysteinderivat **17** beschrieben.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (DCM nach DCM/MeOH 99:1 v/v).

Ausbeute: 280 mg (0.34 mmol = 56%)

$C_{47}H_{58}N_4O_5S_2$ (MW 823.12)

$[\alpha]_D^{20} = -21.8^\circ$ (MeOH)

R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v) = 0.77

HRMS-FAB: die Messung eines hochaufgelösten Massenspektrums war trotz mehrfacher Versuche nicht möglich.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.10 (d, J = 7.0 Hz, 1H, ArH); 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 2H, ArH); 7.64-7.60 (m, 3H, ArH); 7.56-7.45 (m, 2H, ArH); 7.45-7.39 (m, 3H, ArH); 7.29-7.25 (m, 3H, ArH); 5.24 (m, 1H, CH); 5.10-5.05 (m, 2H, CH); 4.44 (d, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2); 4.24-4.20 (m, 1H, CH); 3.13 (br d, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2); 2.08-1.96 (m, 8H, CH_2); 1.66-1.58 (m, 12H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3): δ = 171.10, 157.37, 142.97, 141.22, 136.73 (C_q); 133.61, 128.86, 127.27, 126.73, 124.73, 124.61, 124.11, 123.34, 120.20 (CH); 67.49 (CH_2); 47.38 (CH); 40.09 (CH_2); 39.80 (CH_3); 39.74 (CH_2); 29.85, 26.73, 26.22 (CH_2); 25.65, 17.84, 16.36, 16.10 (CH_3).

Synthese von *S-tert*-Butylthio-L-cystein (Cys(*S*^tBu)) **21**^[183]

Zu einer Lösung von 13.3 g L-Cystin (84.4 mmol) in 55 ml 2N Natriumhydroxidlösung wurden 83 ml Dioxan und anschließend 12.0 ml *tert*-Butylmercaptan (111.8 mmol) zugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde 5 Tage lang Luft durch die Reaktionslösung geleitet.

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit heisser 50%-iger Essigsäure extrahiert. Das Extrakt wurde auf 50 ml eingengt, auf Wasser aufgegossen und zum Auskristallisieren 16 h lang auf 4°C gekühlt. Nach dem Abfiltrieren und Waschen des Feststoffs mit Wasser wurde 16 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.54 g (21.6 mmol = 28%)

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ (MW 177.26)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16.5^\circ$ (0.0136, MeOH)

HRMS-FAB (3-NBA, $[\text{M}+\text{H}]^+$) ber.: 210.0622 gef.: 210.0651

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 3.82 (m, 1H, CH); 3.38 (m, 1H, CH_2); 2.95 (m, 1H, CH_2); 1.36 (s, 9H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, DMSO-d_6): δ = 53.91 (CH); 47.59 (C_q); 43.96 (CH_2); 29.65 (CH_3).

Synthese von *N*^α-Allyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cystein (Aloc-Cys(S^tBu))

22

Eine Lösung von 1056 mg *S*-*tert*-Butylthio-L-cystein (5.0 mmol) in 90 ml 1N Natriumcarbonatlösung/1,4-Dioxan (2:1 v/v) wurde auf 0°C abgekühlt und 584 µl Chlorameisensäureallylester (5.5 mmol) in 30 ml 1,4-Dioxan wurden langsam zugetropft. Es wurde 1 h bei 0 °C und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das 1,4-Dioxan wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Reaktionsansatz wurde 24 h lang auf 4°C gekühlt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und 16 h im Vakuum getrocknet.

Die Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel (DCM/MeOH 9:1 → 1:1 v/v)).

Ausbeute: 1337 mg (4.54 mmol = 91%)

C₁₁H₁₉NO₄S (MW 261.34)

[α]_D²⁰ = -110.4° (0.026, MeOH)

R_f-Wert (cHex/EE/Ameisensäure 2:1:1% v/v/v) = 0.17

HRMS-FAB: die Messung eines hochaufgelösten Massenspektrums war trotz mehrfacher Versuche nicht möglich.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.93-5.87 (m, 1H, CH); 5.28 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz CHH); 5.17 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, CHH); 4.46 (m, 2H, CH₂); 3.97 (m, 1H, CH); 3.21 (m, 1H, CHH); 3.05 (m, 1H, CHH); 1.27 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 155.31 (C_q); 133.59 (CH); 116.79 (CH₂); 64.17 (CH₂); 54.85 (CH); 47.28 (CH₂); 43.83 (C_q); 29.51 (CH₃).

6.2.4 Versuche zu Kapitel 4.2.4

Synthese von Tetrakistriphenylphosphinpalladium(0) **23**^[152]

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 3.54 g Palladiumchlorid (20.78 mmol) und 26.21 g Triphenylphosphin (99.98 mmol) in 240 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und zum Rückfluß erhitzt wobei ein ständiger Schutzgasstrom übergeleitet wurde. Nach 1h Rühren bei 140°C wurden 4.1 ml Hydrazin Hydrat (84.4 mmol) zugegeben. Nach 1 min wurde der Kolben in ein kaltes Wasserbad gestellt bis ein gelber Feststoff präzipitierte, dann wurde bei Raumtemperatur weitergerührt.

Der gelbe Feststoff wurde unter Schutzgas abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und für 2 Tage unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 22.34 g (19.33 mmol = 93%)

³¹P-NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 24.37

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.3

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von prenylierten, polybasischen Peptiden AAV1

Alle Angaben beziehen sich auf einen 0.05 mmol-Ansatz.

Von einem mit FmocLysOAll **1** beladenen Trityl-Harz (Beladung 0.41 mmol/g) wurden 123 mg 16h lang unter vermindertem Druck über NaOH-Pellets getrocknet. Zur Spaltung des Allylestere wurden 3 mg Pd(PPh₃)₄ (2.5 μ mol) und 87 μ l Phenylsilan (0.70 mmol) in 1.5 ml trockenem Tetrahydrofuran zum Harz gegeben und es wurde für 16h unter Schutzgas bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei eine Braunfärbung

beobachtet wurde. Anschließend wurde mehrmals mit THF, DMF, DCM/MeOH und wieder mit DMF gewaschen bis die Waschlösung keine Färbung mehr zeigte.

Zur Verlängerung in C-terminaler Richtung wurden 2.2 Äquivalente des entsprechenden Cysteinderivats (0.11 mmol) eingesetzt. Vor Zugabe zum Harz erfolgte die Aktivierung mit einer Lösung von 55 mg PyBOP (0.11 mmol) in 1.5 ml DMF unter Zugabe von 25 μ l N-Methylmorpholin (0.23 mmol). Nach 4-16h Schütteln bei Raumtemperatur wurde mehrfach mit DMF und DCM/MeOH gewaschen. In manchen Fällen war das Harz sehr klebrig, dann wurde unter verminderten Druck getrocknet und in einen anderen Reaktor umgefüllt.

Die Kupplung der Aminosäuren in N-terminaler Richtung folgte Standard-Fmoc-Protokollen: die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde durch zweimaliges Behandeln mit Piperidin/DMF (1:1 v/v) für je 5 min erreicht, nach gründlichem *flow-wash* mit DMF wurden zur Aktivierung der Aminosäure (0.2 mmol) 68 mg HATU (0.18 mmol) in Kombination mit 28 mg HOAt (0.20 mmol) oder 68 mg HBTU (0.18 mmol) in Kombination mit 32 mg HOBt (0.20 mmol) sowie jeweils 70 μ l DIPEA (0.4 mmol) in 2.5 ml DMF zugegeben. Nach Zugabe dieser Kupplungs-Mischung zum Harz wurde für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt, erneut mit DMF gewaschen und die angegebenen Schritte wiederholt.

Nach Aufbau des Zielpeptids an der festen Phase wurden die Aloc-Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen durch Behandeln mit 23 mg Pd(PPh₃)₄ (0.02 mmol) in 2.5 ml argongesättigter Piperidin/DMF-Lösung (4:1 v/v) für 16h abgespalten und das Harz mit DMF, DCM und DCM/MeOH mehrfach gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase (und der Trityl-Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen falls vorhanden) wurde das getrocknete Harz in 20 ml trockenem Dichlormethan unter Zugabe von 1% Trifluoressigsäure und 2% Triethylsilan als *scavenger* für 1h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachfolgend wurde das Harz mit Lösungen von MeOH/DCM in verschiedenen Mischungsverhältnissen gewaschen. Dem Filtrat wurde entweder DIPEA zum Neutralisieren der Trifluoressigsäure beigesetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, oder es wurde mit Toluol coevaporiert.

Das so erhaltene Rohprodukt wurde in 1 ml MeOH gelöst und in 4×10 ml eiskaltem Diethylether präzipitiert. Nach dem Abzentrifugieren des Pellets wurde dieses in

Wasser gelöst und lyophilisiert. Das Peptid konnte durch präparative HPLC auf einer C18-*reversed phase*-Säule isoliert werden.

6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1

Synthese von *S*-*tert*-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-leucyl-L-lysyl-(*S*-geranylgeranyl)-L-cystein-methylester (Cys(S^tBu)-Lys-Lys-Arg-Arg-Leu-Lys-Cys(GerGer)-OMe) **24**

Nach der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 325 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit Fmoc-Lys-OAll von 0.41 mmol/g) mit 240 mg Cys(GerGer)OMe **14** (0.59 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 190 mg Fmoc-Leu, 308 mg Fmoc-Arg(Aloc)₂ (zweimal), 243 mg Fmoc-Lys(Aloc) **3** (zweimal) und 159 mg Aloc-Cys(S^tBu) **22** (je 1.1 mmol AS) unter Verwendung von HBTU/HOBt für die Kupplung von Leucin und HATU/HOAt in den restlichen Fällen verlängert.

Nach dem Entschützen, Abspalten von der festen Phase, Etherpräzipitieren und Reinigung durch präparative HPLC-Chromatographie an einer C18-*reversed phase*-Säule konnte das Zielprotein isoliert werden und wurde unter Argon bei -18°C aufbewahrt.

Ausbeute: 69 mg (0.049 mmol, 18%)

C₆₇H₁₂₅N₁₇O₉S₃ (MW 1409.02)

[α]_D²⁰ = -32.5° (MeOH)

Retentionszeit t_R = 5.28 min

ESI-MS: m/z 1409.1 [M]⁺ m/z 1410.0 [M+H]⁺

MALDI-TOF: m/z 1409.4 [M]⁺

¹H-¹³C-COSY-Spektrum (500 MHz, 125 MHz, D₂O): δ = 1.02/21.1 (Leu CH₃); 1.10/22.6 (Leu CH₃); 1.49/29.3 (S^tBu); 1.60/22.0 (Lys γ-CH₂); 1.65/25.7 (Leu CH); 1.74/15.3 (GerGer cis-Me); 1.74/16.2 (GerGer cis-Me); 1.74/17.2 (GerGer cis-Me);

1.74/24.4 (GerGer trans-Me); 1.86/24.6-27.0 (GerGer CH₂); 1.89-2.02/30.8 (Lys β,δ-CH₂); 2.15-2.25/39.0 (Leu β-CH₂); 3.13/39.3 (Lys ε-CH₂); 3.35/40.7 (Arg δ-CH₂); 3.90/53.2 (Me-Ester); 4.40-4.58/52.1-54.3 (α-CH); 5.28/124.5 (GerGer CH); 5.35/119.8 (GerGer CH);

Synthese von S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-leucyl-L-lysyl-(S-geranylgeranyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-5-dimethylamino-1-naphthalen (Cys(S^tBu)-Lys-Lys-Arg-Arg-Leu-Lys-Cys(GerGer)-NH-Et-NH-Dansyl) 25

Nach der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 122 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit Fmoc-Lys-OAll von 0.41 mmol/g) mit dem Rohprodukt der Fmoc-Entschützung von 95 mg Fmoc-Cys(GerGer)-DANSA (0.11 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 70 mg Fmoc-Leu, 114 mg Fmoc-Arg(Aloc)₂ (zweimal), 90 mg Fmoc-Lys(Aloc) (zweimal) und 58 mg Aloc-Cys(S^tBu) (je 0.2 mmol AS) unter Verwendung von HBTU/HOBt für die Kupplung von Leucin und HATU/HOAt in den restlichen Fällen verlängert.

Nach dem Entschützen, Abspalten von der festen Phase, Etherpräzipitieren und Reinigung durch präparative HPLC-Chromatographie an einer C18-reversed phase-Säule konnte das Zielprotein isoliert werden und wurde unter Argon bei -18°C aufbewahrt.

Ausbeute: 18 mg (0.011 mmol, 22%)

C₈₀H₁₄₀N₂₀O₁₀S₄ (MW 1670.36)

[α]_D²⁰ = -77.5° (MeOH)

Retentionszeit t_R = 5.50 min

ESI-MS: m/z 1671.2 [M+H]⁺

MALDI-TOF: m/z 1671.6 [M+H]⁺

¹H-¹³C-COSY-Spektrum (500 MHz, 125 MHz, D₂O): δ = 1.01/20.7 (Leu CH₃); 1.05/22.2 (Leu CH₃); 1.44/28.95 (S^tBu); 1.48/16.2 (GerGer cis-CH₃); 1.48/17.1 (GerGer cis-CH₃); 1.48/17.7 (GerGer cis-CH₃); 1.48/28.95 (GerGer trans-CH₃);

1.59/22.2 (Lys γ -CH₂); 1.80/25.0 (Arg γ -CH₂); 1.82/26.35 (GerGer CH₂); 3.12/39.4 (Lys ε -CH₂); 3.30/40.7 (Arg δ -CH₂); 4.44-4.45/52.6-53.7 (α -CH); 5.15/124.2 (GerGer CH); 5.25/119.4 (GerGer CH); 7.84/125.2 (Dansyl arom. CH); 7.85/128.8 (Dansyl arom. CH); 8.36/129.4 (Dansyl arom. CH); 8.60/129.1 (Dansyl arom. CH);

6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2

Synthese von *S*-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(*S*-farnesyl)-L-cystein-methylester (Cys(S^tBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe) **26**

Nach der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 123 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit Fmoc-Lys-OAll von 0.41 mmol/g) mit 37 mg Cys(GerGer)-OMe (0.11 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 117 mg Fmoc-Thr(Trt), 90 mg Fmoc-Lys(Aloc) (insgesamt siebenmal), 114 mg Fmoc-Ser(Trt) und 59 mg Aloc-Cys(S^tBu) (je 0.2 mmol) unter Verwendung von HBTU/HOBt für die ersten drei Aminosäuren und HATU/HOAt für die restlichen Aminosäuren verlängert.

Nach dem Entschützen, Abspalten von der festen Phase, Etherpräzipitieren und Reinigung durch präparative HPLC-Chromatographie an einer C18-reversed phase-Säule konnte das Zielprotein isoliert werden und wurde unter Argon bei -18°C aufbewahrt.

Ausbeute: 18 mg (0.011 mmol, 22%)

C₈₁H₁₅₄N₂₀O₁₅S₃ (MW 1744.41)

$[\alpha]_D^{20} = -37.7^\circ$ (MeOH)

Retentionszeit $t_R = 5.43$ min

ESI-MS: m/z 1744.8 [M]⁺

MALDI-TOF: m/z 1744.4 [M]⁺

^1H - ^{13}C -COSY-Spektrum (500 MHz, 125 MHz, D_2O): δ = 1.34/19.1 (Thr Me); 1.48/29.0 (S^tBu); 1.60/22.2 (Lys γ - CH_2); 1.74/15.5 (Far cis-Me); 1.74/17.0 (Far cis-Me); 1.74/26.5 (Far trans-Me); 1.82/26.5 (Far- CH_2); 1.88-2.00/30.4 (Lys β,δ - CH_2); 3.07/39.1 (Lys ε - CH_2); 3.88/53.0 (Me-ester); 3.97/61.4 (Thr β - CH_2); 4.14/52.8 (Ser β - CH_a); 4.41-4.54/53.6 (α -CH); 4.43/59.4 (Thr α -CH); 4.59/55.7 (Ser α -CH); 4.63/52.8 (Ser β - CH_b); 5.28/124.3 (Far CH); 5.35/119.7 (Far CH);

Synthese von S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cysteyl-diaminoethyl-5-dimethylamino-1-naphthalen (Cys(S^tBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-NH-Et-NH-Dansyl) 27

Nach der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 122 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit Fmoc-Lys-OAll von 0.41 mmol/g) mit dem Rohprodukt der Fmoc-Entschützung von 88 mg Fmoc-Cys(GerGer)-DANSA (0.11 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 117 mg Fmoc-Thr(Trt), 90 mg Fmoc-Lys(Aloc) (insgesamt siebenmal), 114 mg Fmoc-Ser(Trt) und 59 mg Aloc-Cys(S^tBu) (je 0.2 mmol) unter Verwendung von HBTU/HOBt für die ersten drei Aminosäuren und HATU/HOAt für die restlichen Aminosäuren verlängert.

Nach dem Entschützen, Abspalten von der festen Phase, Etherpräzipitieren und Reinigung durch präparative HPLC-Chromatographie an einer C18-reversed phase-Säule konnte das Zielprotein isoliert werden und wurde unter Argon bei -18°C aufbewahrt.

Ausbeute: 35 mg (0.017 mmol, 35%)

$\text{C}_{94}\text{H}_{169}\text{N}_{23}\text{O}_{16}\text{S}_4$ (MW 2005.76)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30.0^\circ$ (MeOH)

Retentionszeit $t_{\text{R}} = 5.50$ min

ESI-MS: m/z 2005.0 $[\text{M}]^+$ m/z 1003.7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

MALDI-TOF: m/z 2028.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

^1H - ^{13}C -COSY-Spektrum (500 MHz, 125 MHz, D_2O): $\delta = 1.35/19.0$ (Thr Me); $1.46/29.1$ (S^tBu); $1.60/22.2$ (Lys γ - CH_2); $1.76/15.0$ (Far cis-Me); $1.76/16.0$ (Far cis-Me); $1.76/24.9$ (Far trans-Me); $1.84/26.7$ (Far CH_2); 1.87 - $2.02/30.7$ (Lys β,δ - CH_2); $3.14/39.5$ (Lys ϵ - CH_2); $3.23/41.8$ (Ethylendiamin CH_2); $3.25/46.0$ (Dansyl Me); $3.34/39.5$ (Ethylendiamin CH_2); $3.98/61.6$ ((Thr β - CH_2); $4.17/51.9$ (Ser β - CH_a); 4.41 - $4.58/53.9$ (α -CH); $4.47/59.3$ (Thr α -CH); $4.62/55.4$ (Ser α -CH); $5.12/124.2$ (Far CH); $5.29/120.0$ (Far CH); $7.80/117.5$ (Dansyl arom. CH); $7.92/125.3$ (Dansyl arom. CH); $7.92/128.8$ (Dansyl arom. CH); $8.42/129.5$ (Dansyl arom. CH); $8.58/121.8$ (Dansyl arom. CH); $8.64/128.8$ (Dansyl arom. CH);

6.4 Versuche zu Kapitel 4.4

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Ligation von H-Ras(1-180)-MESNA-thioester mit lipidierten, polybasischen Peptiden (analytischer Maßstab) AAV2

0.024 mmol des Peptids wurden in 6.85 μl argongesättigtem Ligationspuffer gelöst, mit 2.5 μl einer 500 mM Lösung von Mercaptoethansulfonsäure in Wasser versetzt und es wurden 0.65 μl der Proteinlösung zugegeben (0.0024 mmol, 77.18 g/l). Die Reaktionsmischung wurde mit Argon überschichtet, auf einem Vortex-Schüttler gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Mischung für 4h bei 20°C geschüttelt.

Die Analyse der Ligrationsreaktion erfolgte anschließend durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese auf einem 15%-igen Polyacrylamid-Gel, das am Tag zuvor gegossen worden war. Typischerweise wurden 1 μl des Ligrationsansatzes mit 2.5 μl vierfachem SDS-Elektrophoresepuffer gemischt, es wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 μl mit Wasser aufgefüllt und vor dem Auftragen auf das Gel für bis zu 10 min auf 80°C erwärmt.

Alternativ wurde der Ligrationsansatz mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 μl verdünnt und mittels LC-MS analysiert.

Ligationspuffer: 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl , pH 7.5

6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.4.1

Synthese des chimären H-Ras/K-Ras 4B-Proteins (H-Ras/K-Ras-OMe) 28

Nach AAV2 wurden 50 μg des verkürzten H-Ras-MESNA-Thioesters (0.0024 mmol) mit 0.4 mg des fluoreszenzmarkierten K-Ras 4B-Peptids (0.024 mmol) unter Zugabe von 500 mM wässriger MESNA-Lösung unter Argonatmosphäre bei 25°C reagiert. Nach 4 h wurden 3 μl der Reaktionslösung abgenommen und mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Desweiteren wurde der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 50 μl aufgefüllt und mittels LC-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert. Von dem isolierten chimären Protein aus einem präparativen Ansatz (C. Nowak) wurde ausserdem ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen.

ESI-MS [M^+]: $m/z_{\text{obs}} = 21982.0$ $m/z_{\text{calc}} = 21981.1$

MALDI-TOF-MS [$\text{M}+\text{K}^+$]: $m/z_{\text{obs}} = 22024.5$ $m/z_{\text{calc}} = 22020.2$

Synthese des chimären, fluoreszenzmarkierten H-Ras/KRas 4B-Proteins (H-Ras/K-Ras-DANSA) 29

Nach AAV2 wurden 50 μg des verkürzten H-Ras-MESNA-Thioesters (0.0024 mmol) mit 0.5 g des fluoreszenzmarkierten K-Ras 4B-Peptids (0.024 mmol) unter Zugabe von 500 mM wässriger MESNA-Lösung unter Argonatmosphäre bei 25°C reagiert. Nach 4 h wurden 3 μl der Reaktionslösung abgenommen und mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Desweiteren wurde der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 50 μl aufgefüllt und mittels LC-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert. Von dem isolierten chimären Protein aus einem präparativen Ansatz (C. Nowak) wurde ausserdem ein MALDI-TOF-Massenspektrum aufgenommen.

ESI-MS [M^+]: $m/z_{\text{obs}} = 22243.0$ $m/z_{\text{calc}} = 22242.5$

MALDI-TOF-MS [$\text{M}+\text{Na}^+$]: $m/z_{\text{obs}} = 22266.1$ $m/z_{\text{calc}} = 22265.5$

6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2

Synthese des chirmären H-Ras/D-Ral-Proteins (H-Ras/D-Ral-OMe) 30

Nach AAV2 wurden 50 µg des verkürzten H-Ras-MESNA-Thioesters (0.0024 mmol) mit 0.3mg des fluoreszenzmarkierten K-Ras 4B-Peptids (0.024 mmol) unter Zugabe von 500 mM wässriger MESNA-Lösung unter Argonatmosphäre bei 25°C reagiert. Nach 4 h wurden 3 µl der Reaktionslösung abgenommen und mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Desweiteren wurde der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mittels LC-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert.

ESI-MS [M^+]: $m/z_{\text{obs}} = 21645.0$ $m/z_{\text{calc}} = 21645.7$

Synthese des chimären, fluoreszenzmarkierten H-Ras/D-Ral-Proteins (H-Ras/D-Ral-DANSA) 31

Nach AAV2 wurden 50 µg des verkürzten H-Ras-MESNA-Thioesters (0.0024 mmol) mit 0.4 mg des fluoreszenzmarkierten K-Ras 4B-Peptids (0.024 mmol) unter Zugabe von 500 mM wässriger MESNA-Lösung unter Argonatmosphäre bei 25°C reagiert. Nach 4 h wurden 3 µl der Reaktionslösung abgenommen und mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Desweiteren wurde der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mittels LC-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert.

ESI-MS [M^+]: $m/z_{\text{obs}} = 21905.0$ $m/z_{\text{calc}} = 21907.1$

6.5 Versuche zu Kapitel 4.6

6.5.1 Versuche zu Kapitel 4.6.1

Synthese von S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-lysyl(Aloc)-L-seryl-L-lysyl(Aloc)-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester (Cys(S^tBu)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Lys(Aloc)-Ser-Lys(Aloc)-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe) 32

Nach der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 293 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit Fmoc-Lys-OAll von 0.41 mmol/g) mit 117 mg Cys(GerGer)-OMe (0.35 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 140 mg Fmoc-Thr(Trt), 108 mg Fmoc-Lys(Aloc) (insgesamt siebenmal), 137 mg Fmoc-Ser(Trt) und 71 mg Aloc-Cys(S^tBu) (je 0.24 mmol) unter Verwendung von HBTU/HOBt für die ersten drei Aminosäuren und HATU/HOAt für die restlichen Aminosäuren verlängert. Nach jeder Kupplung wurde durch zweimaliges fünfminütiges Behandeln mit 10% Essigsäureanhydrid in Pyridin gecappt.

Nach dem Aufbau am polymeren Träger wurde, ohne die Aloc-Gruppen zu entfernen, durch Behandlung mit 1% TFA und 1% TES in trockenem DCM von der festen Phase abgespaltet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute (Rohprodukt): 138 mg

Aufgrund der Schwerlöslichkeit in allen Lösungsmitteln konnte das Rohprodukt nicht charakterisiert werden.

Synthese eines fluoreszenzmarkierten K-Ras 4B-Peptids **33** durch Kupplung mit BODIPY

Das Aloc-geschützte Peptid **32** wurde unter Einsatz von Ultraschall in 15 ml DCM/DMF (1:2 v/v) gelöst und in zwei Aliquote aufgeteilt:

das erste Aliquot wurde mit 18.8 mg BODIPY (57 μmol), 8.7 mg HOBt (57 μmol), 10.9 mg EDC (57 μmol) und 8.7 μl Triethylamin (63 μmol) bei 0°C unter Lichtausschluss umgesetzt. Nach 5 min Rühren bei 0°C wurde das Eisbad entfernt und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

Feste Rückstände wurden abfiltriert und es wurde mit 65 mg Pd(PPh₃)₄ und 700 μl PhSiH₃ für 4 h umgesetzt, um die Aloc-Schutzgruppen zu entfernen. Im Anschluss an die Abspaltung der Schutzgruppen konnte im Reaktionsansatz keine Fluoreszenz mehr festgestellt werden.

Das zweite Aliquot wurde mit BODIPY-Succinimid umgesetzt, da so eine Verwendung von Kupplungsreagenzien umgangen werden konnte. Der Peptidlösung wurden bei 0°C 10 μl Triethylamin und eine Lösung von 57 μmol BODIPY-Succinimid (Rohprodukt) in 1 ml DMF zugegeben. Nach 5 min Rühren bei 0°C wurde das Eisbad entfernt und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

Zum Abspalten der Aloc-Schutzgruppen wurden 65 mg Pd(PPh₃)₄ und 20 mg Dimethylbarbitursäure (120 μmol) zugegeben und für 4 h unter Lichtausschluss gerührt. Bei der Reaktion bildete sich ein bräunlicher Niederschlag aus, im Reaktionsansatz konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Durch Dialyse an einer Nitrozellulose-Membran mit 1000 ml Methanol sollte versucht werden das Produkt zu isolieren, doch weder in der methanolischen Phase noch im Rückstand konnte das Zielpeptid massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Synthese von BODIPY-Succinimid^[184]

Zu einer Lösung von 18.8 mg BODIPY (57 μmol) in 3 ml trockenem DCM wurden unter Schutzgasatmosphäre bei 0°C 13.0 mg DCC (63 μmol) und 7.3 mg Hydroxysuccinimid (63 μmol) sowie 8.7 μl Triethylamin (63 μmol) zugegeben. Es wurde für 5 min bei 0°C, danach für 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

Feststoffe wurden abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das feste Rohprodukt wurde direkt mit dem geschützten K-Ras-Peptid umgesetzt.

6.5.2 Versuche zu Kapitel 4.6.2

Synthese des L-Glycinalylester-*para*-Toluolsulfonats **34**

Zu einer Suspension von 751 mg L-Glycin (10 mmol) und 1902 mg *para*-Toluolsulfonsäure (10 mmol) in 10 ml Benzol wurden 4 ml Allylalkohol (59 mmol) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 16h unter Verwendung eines Wasserabscheiders (Dean-Stark-trap) zum Rückfluß erhitzt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Als Rohprodukt wurde ein gelbliches Öl (2.2 g) erhalten. Nach mehrfachem Digerieren mit Diethylether wurde ein farbloser Feststoff erhalten, der abfiltriert und unter vermindertem Druck für 16 h getrocknet wurde.

Ausbeute: 2018 mg (7.0 mmol) = 70%

$C_{12}H_{17}NO_5S$ (MW 287.33)

LRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 288.3395 gef.: 288.08

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ArH); 7.07 (d, J = 8.1 Hz, 2H, ArH); 5.72 (m, 1H, CH); 5.21 (d, J = 15.5 Hz, 1H, CHH); 5.14 (d, 1H, J = 10.5 Hz, CHH); 4.46 (d, 2H, J = 5.8 Hz, CH_2); 3.68 (s, 2H, CH_2); 2.31 (s, 3H, *p*-Toluolsulfonat- CH_3);

^{13}C -NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.35 (C_q); 141.34 (Ar- C_q); 140.59 (Ar- C_q); 131.25 (Ar-CH); 129.08 (Ar-CH); 119.08 (CH_2); 66.73 (CH_2); 40.63 (CH_2); 21.43 (CH_3).

Synthese von N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-L-glycyl-allyester **35**

Zu einer Lösung von 500 mg Fmoc-L-Serin (1.4 mmol) und 380 mg L-Glycinallylester-*para*-Toluolsulfonat (1.4 mmol) in 50 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0°C 210 mg HOBt (1.7 mmol), 250 mg EDC·HCl (1.4 mmol) und 380 µl Triethylamin (1.4 mmol) zugegeben. Nachdem 30 min bei 0°C gerührt wurde auf Raumtemperatur erwärmen lassen und weitere 16 h rühren lassen..

Anschließend wurde mit je 30 ml 1N HCl, 1N NaHCO₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel (Laufmittel cHex/EE 1:1 → 1:3)

Ausbeute 364 mg (0.86 mmol) = 77%

C₂₃H₂₄N₂O₆ (MW 424.45)

HRMS-FAB (3-NBA, [M+H]⁺) ber.: 425.4539 gef.: 425.1722

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH); 7.58 (br d, *J* = 7.9 Hz, 2H, ArH); 7.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH); 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, ArH); 6.95 (br s, 1H, NH); 5.88 (m, 2H, CH + NH); 5.33 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, CHH); 5.27 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CHH); 4.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂); 4.44 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂); 4.22 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH); 4.07 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH);

Beladen des Tritylharzes mit N^α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-L-glycyl-allyester^[185]

Zu 150 mg trockenem Tritylharz wurde eine Lösung von 50 mg des Dipeptid **35** (0.12 mmol) und 20 µl Pyridin (0.24 mmol) zugegeben. Unter Schutzgasatmosphäre wurde bei 60°C für 16 h langsam gerührt.

Nach dem Abfiltrieren des Harzes wurde mehrfach mit MeOH/DCM/DIPEA (2:17:1 v/v/v), DCM, DMF und erneut DCM im Lösemitteldurchfluss gewaschen und anschließend unter vermindertem Druck für 16 h getrocknet.

Die Beladung des Harzes wurde mittels Fmoc-UV-Methode bestimmt und betrug 0.5-0.6 mmol/g.

Zur Bestimmung wurden 2.02 mg bzw. 1.87 mg des Harzes verwendet, die Absorption bei 300 nm betrug 0.4621 bzw. 0.4861 (vgl. 6.2.1 Beladung des Tritylharzes). Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergeben sich die oben genannten Beladungen.

Synthese des biotinylierten RhoA-C-Terminus

Analog der AAV1 zur Synthese polybasischer, lipidierter Peptide wurde die Zielverbindung durch Reaktion von 83 mg Harz (Trityl-Harz mit einer Beladung mit N^α-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-L-glycyl-allyester von 0.60 mmol/g) mit 41 mg Cys(GerGer)OMe **14** (0.10 mmol) C-terminal verlängert.

N-terminal wurde mit 90 mg Fmoc-Lys(Aloc) **3** (dreimal), 60 mg Fmoc-Gly, 113 mg Fmoc-Arg(Aloc)₂ (zweimal) sowie mit 71 mg Biotin-6-aminocaprinsäure (je 0.2 mmol AS) unter Verwendung von HATU/HOAt verlängert. Den Kupplungen wurden jeweils 70 µl DIPEA (0.2 mmol) zugesetzt, bei der Kupplung des Biotin-Aca wurden 140 µl (0.4 mmol) verwendet, um das Solubilisieren des Bausteins zu erreichen.

Nach Beendigung der Synthese wurde mit 20 mg Pd(PPh₃)₄ in 2.0 ml entgastem Piperidin/DMF (4:1 v/v) unter Schutzgasatmosphäre für 16 h entschützt. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte durch einstündige Behandlung mit 1-2% TFA mit 2% TES in trockenem DCM. Unter diesen Bedingungen wurde keine Abspaltung vom Harz erreicht. Bei der Abspaltung mit 5% TFA und 5% TES für 10 min wurde ein Schwarzfärbung des Harzes beobachtet.

Nach dem Auswaschen des Harzes mit DCM/MeOH (7:3, 1:1 und 3:7 v/v) und dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, konnte das Rohprodukt isoliert werden. In den nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen konnte das Zielpeptid jedoch nicht nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] *Nature* **2001**, 411, 399.
- [2] D. Adam, *Nature* **2001**, 411, 408.
- [3] T. Gura, *Nature* **2000**, 407, 282.
- [4] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, 1, 144.
- [5] M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 1133.
- [6] S. Bormann, *Chemical & Engineering News* **2004**, 38, 53.
- [7] <http://www.who.int/en/>.
- [8] G. L. Bond, W. Hu, A. J. Levine, *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, 5, 3.
- [9] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, 49, 4682.
- [10] U. H. Chien, M. Lai, T. Y. Shih, I. M. Verma, E. M. Scolnick, B. Roy, P., N. Davidson, *J. Virology* **1979**, 31, 752.
- [11] T. Y. Shih, D. R. Williams, M. O. Weeks, J. M. Maryak, W. C. Vass, E. M. Scolnick, *J. Virology* **1978**, 27, 45.
- [12] L. B. Eckert, G. A. Repasky, A. S. Ülkü, A. McFall, H. Zhou, C. I. Sartor, C. J. Der, *Cancer Res.* **2004**, 64, 4585.
- [13] M. P. Goldfarb, K. Shimuzu, M. Perucho, M. Wigler, *Nature* **1982**, 296, 404.
- [14] L. F. Parada, C. J. Tabin, C. Shih, R. A. Weinberg, *Nature* **1982**, 297, 474.
- [15] G. J. Pronk, L. J. Bos, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1198, 131.
- [16] E. Santos, S. R. Tronick, S. A. Aaronson, S. Pulciani, M. Barbacid, *Nature* **1982**, 298, 343.
- [17] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, 39, 4192.
- [18] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1990**, 348, 125.
- [19] A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 615.
- [20] T. Matozaki, H. Nakanishi, Y. Takai, *Cell. Signal.* **2000**, 12, 515.
- [21] M. R. Ahmadian, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. R. Bischoff, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 16409.
- [22] J. F. Eccleston, K. J. M. Moore, L. Morgan, R. H. Skinner, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27012.
- [23] M. S. Marshall, W. S. Hill, A. S. Ng, U. S. Vogel, M. D. Scahber, E. M. Scolnick, R. A. F. Dixon, J. B. Gibbs, *EMBO Journal* **1989**, 8, 1105.
- [24] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, 277, 333.

- [25] K. Scheffzek, A. Lautwein, W. Kabsch, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Nature* **1996**, *384*, 591.
- [26] C. E. Ellis, G. Clark, *Cell. Signal.* **2000**, *12*, 425.
- [27] M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993**, 643.
- [28] R. Khosravi-Far, S. Campbell, K. L. Rossman, C. J. Der, *Adv. Cancer Res.* **1998**, *72*, 57.
- [29] M. Malumbres, A. Pellicer, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, 887.
- [30] J. Zuber, O. I. Tchernitsa, B. Hinzmann, A.-C. Schmitz, M. Grips, M. Hellriegel, C. Sers, A. Rosenthal, R. Schäfer, *Nature Genetics* **2000**, *24*, 144.
- [31] L. Buday, J. Downward, *Cell* **1993**, *73*, 611.
- [32] P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler, D. Bar-Sagi, *Science* **1993**, *260*, 1338.
- [33] M. A. Simon, G. S. Dodson, G. M. Rubin, *Cell* **1993**, *73*, 169.
- [34] N. W. Gale, S. Kaplan, E. J. Lowenstein, J. Schlessinger, D. Bar-Sagi, *Nature* **1993**, 88.
- [35] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Nature* **1993**, 85.
- [36] F. McCormick, *Nature* **1993**, 15.
- [37] M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *Nature* **1993**, 15.
- [38] T. Bondeva, A. Balla, P. Varnai, T. Balla, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 2323.
- [39] M. T. Burgering, J. L. Bos, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 18.
- [40] R. J. Davis, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14553.
- [41] D. K. Morrison, R. E. Cutler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 174.
- [42] D. P. Brazil, B. A. Hemmings, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 657.
- [43] A. B. Vojtek, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1998**, *272*, 19925.
- [44] A. Kauffmann-Zeh, P. Rodriguez-Viciano, F. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, G. Evan, *Nature* **1997**, 544.
- [45] C. Rommel, E. Hafen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, *8*, 412.
- [46] S. B. Cantor, T. Urano, L. A. Feig, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 4578.
- [47] A. Brymora, V. A. Valova, M. R. Larsen, B. D. Roufogalis, P. J. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29792.
- [48] R. Kozma, S. Ahmed, A. Best, L. Lim, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1942.
- [49] L. M. Machesky, H. A., *J. Cell Biol.* **1997**, *138*, 913.

- [50] A. Quaroni, E. C. A. Paul, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 707.
- [51] Y. Chien, M. A. White, *EMBO reports* **2003**, *4*, 800.
- [52] D. O. Henry, S. A. Moskalenko, K. J. Kaur, F. Maofu, R. G. Pestell, J. H. Camonis, M. A. White, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8084.
- [53] E. Tchevkina, L. Agapova, N. Dyakova, A. Martinjuk, A. Komelkov, A. Tatosyan, *Oncogene* **2005**, *24*, 329.
- [54] L. Xu, P. Frankel, D. Jackson, T. Rotunda, R. L. Boshans, C. D'Souza-Schorey, D. A. Foster, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 645.
- [55] S. Fukai, H. T. Matern, J. R. Jagath, R. H. Scheller, A. T. Brunger, *EMBO Journal* **2003**, *22*, 3267.
- [56] S. Moskalenko, C. Tong, C. Rosse, G. Mirey, E. Formstecher, L. Davier, J. Camonis, M. A. White, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51743.
- [57] A. Polzin, M. Shipitsin, T. Goi, L. A. Feig, T. J. Turner, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1714.
- [58] M. Shipitsin, L. A. Feig, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5746.
- [59] I. E. Vega, S.-C. Hsu, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 3839.
- [60] G. Blobel, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 86.
- [61] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- [62] J. W. Suttie, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 459.
- [63] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198.
- [64] R. B. Pepinsky, C. Zeng, D. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber, K. Miatkowski, F. R. Taylor, E. A. Wang, A. Galdes, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14037.
- [65] J. T. Dunphy, M. E. Lindner, *Biophys. Biochim. Acta* **1998**, *1436*, 245.
- [66] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **199**, *1451*, 1.
- [67] H. Hallack, L. Muszbek, M. Laposata, E. Belmonte, L. F. Brass, D. R. Manning, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4713.
- [68] E. M. Van Cott, L. Muszbek, M. Laposata, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **1997**, *57*, 33.
- [69] J. F. Hancock, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 373.
- [70] I. A. Prior, J. F. Hancock, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1603.

- [71] P. Deck, D. Pendzialek, M. Biel, M. Wagner, B. Popkirova, B. Ludolph, G. Kragol, J. Kuhlmann, A. Giannis, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *accepted*.
- [72] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1529, 203.
- [73] B. M. Willumsen, A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, D. R. Lowy, *Nature* **1984**, 310, 583.
- [74] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 241.
- [75] S. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 355.
- [76] Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15030.
- [77] Z. Chen, J. C. Otto, M. O. Bergo, S. G. Young, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 41251.
- [78] M.-O. Roy, R. Leventis, J. Silvius, *Biochem.* **2000**, 39, 8298.
- [79] M. H. Gelb, *Science* **1997**, 275, 1750.
- [80] B. M. Willumsen, A. G. Papageorge, H.-F. Kung, E. Bekesi, T. Robins, M. Johnson, W. C. Vass, D. R. Lowy, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, 2646.
- [81] S. J. deSolms, T. M. Ciccarone, S. C. MacTough, A. W. Shaw, C. A. Buser, M. Ellis-Hutchings, C. Fernandes, K. A. Hamilton, H. E. Huber, N. E. Kohl, R. B. Lobell, R. G. Robinson, N. N. Tsou, E. S. Walsh, S. L. Graham, L. S. Beese, J. S. Taylor, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2973.
- [82] M. R. Graaf, D. J. Richel, C. J. van Noorden, H. J. Guchelaar, *Cancer Treat. Rev.* **2004**, 30, 609.
- [83] D. M. Leonard, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2971.
- [84] K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, 37, 688.
- [85] K. S. Kee, S. D. Jois, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 1209.
- [86] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957.
- [87] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Sci.* **2005**, 65, 229.
- [88] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [89] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 304.
- [90] R. B. Merrifield, *Methods Enzym.* **1997**, 289.
- [91] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, 34, 91.
- [92] J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2001**, 60, 194.

- [93] G. B. Fields, C. G. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4202.
- [94] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 333.
- [95] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 8951.
- [96] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5463.
- [97] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 403.
- [98] D. A. Wellings, E. Atherton, *Methods Enzym.* **1997**, *289*.
- [99] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **1999**.
- [100] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- [101] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855.
- [102] M. F. Songster, G. Barany, *Methods Enzym.* **1997**, *289*.
- [103] N. Thieriet, F. Guibé, F. Albericio, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1815.
- [104] F. Albericio, L. A. Carpino, *Methods Enzym.* **1997**, *289*.
- [105] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- [106] D. S. Perlow, J. M. Erb, N. P. Gould, R. D. Tung, R. M. Freidinger, R. D. Williams, D. F. Vetter, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4394.
- [107] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tet. Lett.* **1997**, *38*, 4853.
- [108] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [109] L. A. Carpino, J. Xia, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 54.
- [110] L. A. Carpino, J. Xia, C. Zhang, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 62.
- [111] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460.
- [112] P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75.
- [113] R. L. Edelstein, V. A. Weller, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5298.
- [114] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176.
- [115] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023.
- [116] H. Xie, Y. Shao, J. M. Becker, F. Naider, R. A. Gibbs, *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 8552.
- [117] F. Ghomashchi, X. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochem.* **1995**, *34*, 11910.
- [118] E. K. Dolence, J. M. Dolence, C. D. Poulter, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 35.

- [119] G. Kragol, M. Lumbierres, J. M. Palomo, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 5839.
- [120] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chemistry Eur. J.* **1999**, *5*, 1239.
- [121] O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2247.
- [122] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 19.
- [123] M. Köhn, R. P. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 2.
- [124] R. Merkx, A. J. Brouwer, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1125.
- [125] R. Merkx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tet. Lett.* **2003**, *44*, 4515.
- [126] F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817.
- [127] N. Budisa, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1176.
- [128] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollock, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670.
- [129] P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Steven, *Science* **1990**, *250*, 651.
- [130] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 450.
- [131] R. David, M. P. O. Richter, A. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 663.
- [132] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421.
- [133] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M.-Q. Xu, *Gene* **1997**, *271*.
- [134] S. Chong, G. E. Montello, A. Zhang, E. J. Cantor, W. Liao, M.-Q. Xu, J. Benner, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5109.
- [135] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6705.
- [136] I. K. O. Cann, S. Q. Amaya, M. W. Southwork, F. B. Perler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3158.
- [137] J. P. Gangopadhyay, S. Q. Jiang, H. Paulus, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2456.
- [138] E. Adam, F. B. Perler, *J. Mol. Microbio. Biotechnol.* **2002**, *4*, 479.
- [139] B. M. Lew, H. Paulus, *Gene* **2002**, *282*, 169.
- [140] R. Reents, *Dissertationschrift* **2002**.

- [141] M. Völkert, *Dissertationsschrift* **2003**.
- [142] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648.
- [143] F. Eisele, *Dissertationsschrift* **2000**
- [144] A. Loffet, H. X. Zhang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 346.
- [145] J. M. Fujitaki, A. W. Steiner, S. E. Nichols, E. R. Helander, Y. C. Lin, R. A. Smith, *Prep. Biochem.* **1980**, *10*, 205.
- [146] M. S. Bernatowitz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2497.
- [147] M. S. Bernatowitz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *Tet. Lett.* **1993**, *34*, 3389.
- [148] G. Kragol, *persönliche Mitteilung*.
- [149] B. Ren, F. Gao, Z. Tong, Y. Yan, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *307*, 55.
- [150] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 901.
- [151] R. P. Breinbauer, *persönliche Mitteilung*.
- [152] D. R. Coulson, *Inorg. Syn.* **1990**, *28*, 107.
- [153] R. C. d. L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6039.
- [154] J. P. Tam, Y.-A. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058.
- [155] C. Dhalluin, C. Boutillon, A. Tartar, G. Lippens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10494.
- [156] N. M. Okeley, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21833.
- [157] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223.
- [158] C. Peters, *Dissertationsschrift* **2003**.
- [159] J. Kuhlmann, *persönliche Mitteilung*.
- [160] T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, A. Hildebrand, I. Heinemann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16368.
- [161] T. Durek, *Dissertationsschrift* **2003**.
- [162] L. Brunsveld, A. Watzke, T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, H. Waldmann, *Chemistry Eur. J.* **2005**, *11*, 2756.
- [163] M. H. Flint, G. C. Gillard, M. J. Merrilees, *Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects* **1980**, Vol. 2.
- [164] K. M. Hawkins, S. S. S. Wang, D. M. Ford, D. F. Skantz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9112.

- [165] *Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles and methods*, GE Healthcare (Amersham Bioscience).
- [166] J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochem.* **1994**, 33, 3014.
- [167] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochem.* **1995**, 34, 3813.
- [168] N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14348.
- [169] F. Holm, *Sensoren für Lebensmittelqualität 2003*, Fair Flow Europe 4, 14.
- [170] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **1987**, 388.
- [171] B. Ludolph, *persönliche Mitteilung*.
- [172] K. Aktories, C. Wild, M. Vogelsgesang, *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.* **2004**, 152, 1.
- [173] F. Shao, J. E. Dixon, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, 529, 79.
- [174] F. Shao, P. O. Vacratsis, Z. Bao, K. E. Bowers, C. A. Fierke, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 904.
- [175] B. Ludolph, *Dissertationschrift 2004*.
- [176] F. Eisele, *Dissertationschrift 2002*.
- [177] A. Loffet, H. X. Zhang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, 42, 346.
- [178] E. E. van Tamelen, R. G. Nadeau, *Bioorg. Chem.* **1982**, 11, 197.
- [179] S. Klinge, M. Demuth, *Synlett.* **1993**, 10, 783.
- [180] S. Thavalam, *persönliche Mitteilung*.
- [181] K. Eis, H. G. Schmalz, *Synthesis* **1996**, 2, 204.
- [182] V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremmer, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4768.
- [183] K. Uwai, *persönliche Mitteilung*.
- [184] A. Watzke, *persönliche Mitteilung*.
- [185] *Novabiochem Katalog 2002/3*, Anhang, 217.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung
ε	spezifischer Absorptionskoeffizient
$[\alpha]_D^{20}$	spezifischer Drehwert bei 20°C
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
AcOZ	para-Acetoxybenzyloxycarbonyl
All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
Boc	tertiär-Butyloxycarbonyl
Bodipy [®] FL	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäure
br	breit
C _q	quarternärer Kohlenstoffkern
d	Dublett
dd	Dublettdublett
DANSA	<i>N</i> -(2-aminoethyl)-5-(dimethylamino)-naphthalensulfonamid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide
EE	Ethylacetat
EPL	<i>expressed protein ligation</i>
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation

FAB	<i>fast atom bombardment</i> -Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FTase	Farnesyltransferase
GAP	GTPase aktivierendes Protein (<i>GTPase activating protein</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
hnRNA	<i>heterogenous nuclear</i> Ribonukleinsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HR	hochaufgelöste
Hz	Hertz
ivDde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
LC-MS	HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie
LR	niedrigaufgelöste
m	Multipllett
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation time of flight</i> (MS)
MeOH	Methanol
MESNA	Natrium 2-Mercaptoethanesulfonat
MIC	Maleinimidocaproyl
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure

MS	Massenspektrometrie
Mtt	4-Methyltrityl
MW	Molekulargewicht
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NCL	Native Chemische Ligation (<i>native chemical ligation</i>)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NVOC	6-Nitroveratryloxycarbonyl
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Polystyrol oder Phosphatidylserin
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexaphosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
Ras	Ratten-Adenosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
t	Triplett
tert.	tertiär
TFA	Trifluoessigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t _R	Retentionszeit
Trt	Trityl
UV/VIS	ultravioletter und sichtbarer Bereich des Lichts
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Die Aminosäuren wurden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525.) und haben L-Konfiguration nach der FISCHER-Projektion.

Danksagung

Bei Prof. Waldmann möchte ich bedanken für die anspruchsvolle Aufgabenstellung, sowie die finanziellen und technischen Mittel, die mir im Rahmen des Promotionsvorhabens zur Verfügung gestellt wurden.

Dr. Kuhlmann und seinen Mitarbeitern danke ich für die Kooperation und die wertvollen Beiträge bei den Ligationsreaktionen sowie den Microinjektionen und den biophysikalischen Messungen.

Für Hilfestellungen in Rat und Tat bei der Analytik der synthetisierten Substanzen möchte ich mich bei Fr. Danzmann, Dr. Costisella, Dr. Griewel, bei Sandra Eichhorn und Christiane Vornweg, sowie Fr. Evelyn Merten und Dr. Petra Janning bedanken.

Für's Korrekturlesen und Lektionen im Anwenden der neuen Rechtschreibung bedanke ich mich herzlichst bei Dr. Christoph „Meister“ Röhrig, Matthias „Pommes“ Riedrich, Dirk Pendzialek, Nicola Bisek und meiner Schwester Nora.

Dortmund war nie meine Lieblingsstadt und wird es sicherlich auch nicht werden, trotzdem werde ich schöne Erinnerungen mitnehmen, verantwortlich dafür „die sieben Zwerge“ (Ester, Gemma, Marta, Ana, Esther & Belen und Bahar), sowie der Rest der „spanischen Gemeinde“ (Miguel & Frank, Joaquin, José & Anka und Javier), außerdem Maja & Chris, Sandra & Frank, Anja, Luc, Nici, Döppe und Pommes.

Für Entführungen an deutsche Strände und die Motivation mich zwei Sommer lang im Sand „körperlich zu ertüchtigen“ danke ich Daniell Ferraz, Tom „G-Star“ Gottge, Roland Steinke, Micha Overhage, Ray & Schuschi und vielen anderen ...

Hier zuletzt, aber gedanklich an erster Stelle: vielen Dank an meine Familie, die mir durch ihre Unterstützung das Studium erst ermöglicht hat und auch während „mentaler Durststrecken“ immer wieder aufmunternde Worte fanden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Daniel Gottlieb
Geboren am: 12. Juni 1975 in Konstanz
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08.1981 – 07.1985 Sonnenhalde-Grundschule in Konstanz
09.1985 – 06.1994 Alexander-von-Humboldt Gymnasium in Konstanz
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Studium:

10.1994 – 03.1997 Chemie-Grundstudium an der Universität Konstanz
04.1997 – 08.1999 Chemie-Hauptstudium an der Universität zu Köln
09.1999 – 08.2000 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln, unter der Betreuung von Priv.-Doz. F. J. Marner mit dem Thema „*Isolierung und Strukturaufklärung der Iridale von Iris hollandica*“

Promotion:

08.2001 – 09.2005 Doktorarbeit an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, unter der Betreuung von Prof. H. Waldmann mit dem Thema „*Bioorganische Synthese und biologische Evaluierung von monolipidierten, polybasischen Ras-Proteinen*“
15.09.2005 Promotionsprüfung

Dortmund, im März 2006