

# **Synthese und biologische Evaluierung semi-synthetischer Rab7-Proteine**

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

## **DISSERTATION**

von  
Diplom-Chemikerin und Diplom-Biologin

**Ines Heinemann**

aus Lindau (S.-H.)

**Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat**

**1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann**

**2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2003**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Institut für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH) in der Zeit von November 1998 bis April 2000 und an der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, in der Zeit von Mai 2000 bis März 2003 angefertigt.

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Allgemeiner Teil</b> .....	2
<b>2.1. Lipidmodifikationen von Proteinen</b> .....	2
2.1.1. Die Prenylierung .....	3
2.1.2. Funktionen der Prenylierung .....	4
<b>2.2. Funktion und Membrananbindung der Rab/Ypt-Proteine</b> .....	5
2.2.1. Die G-Proteine .....	5
2.2.2. Die Rab/Ypt-Proteine - Regulatoren des zellulären Vesikeltransports .....	6
2.2.3. Die posttranslationale Geranylgeranylierung der Rab-Proteine .....	9
2.2.4. Mit der Rab-Protein-Aktivität verbundene Krankheiten .....	11
<b>2.3. Lipidmodifizierte Peptide</b> .....	12
2.3.1. Synthesemöglichkeiten farnesylierter und geranylgeranylierter Peptide ...	12
2.3.2. Prenylierte Peptidkonjugate in biologischen Studien .....	14
<b>2.4. Synthetische und semi-synthetische Proteine</b> .....	15
2.4.1. Ligationsmethoden von Peptiden und Proteinen .....	15
2.4.2. Das Protein- <i>Splicing</i> - eine Verknüpfung ohne artifizielles Linkersystem	17
2.4.2.1. Das natürliche Protein- <i>Splicing</i> .....	18
2.4.2.2. Die <i>Expressed Protein Ligation</i> (EPL) .....	19
<b>3. Ziel der Arbeit</b> .....	21
<b>4. Spezieller Teil</b> .....	24
<b>4.1. Allgemeiner Syntheseplan</b> .....	24
<b>4.2. Synthese einfach geranylgeranylierter Rab7-Fragmente für die</b>	
<b>MIC-Ligation</b> .....	28
2.4.2.1. Darstellung MIC-modifizierter, fluoreszenzmarkierter L-Lysine .....	28
2.4.2.2. Darstellung des C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptids .....	33
2.4.2.3. Abschließende Synthese der MIC-modifizierten,	
C-terminal prenylierten, fluoreszenzmarkierten Pentapeptide .....	38

<b>4.3. Kupplung des MIC-modifizierten, dansylmarkierten Lipopentapeptids an ein verkürztes Rab7-Protein .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4. Lipidmodifizierte und fluoreszenzmarkierte Tripeptide als Modellverbindungen für die <i>Expressed Protein Ligation</i> .....</b>	<b>41</b>
4.4.1. Untersuchungen zur Schutzgruppenstrategie und Synthese der Modelltripeptide .....	41
4.4.2. Die <i>Expressed Protein Ligation</i> mit Rab7-Modelltripeptiden .....	47
<b>4.5. Synthese unterschiedlich lipidierter Rab7-Fragmente für die <i>Expressed Protein Ligation</i> .....</b>	<b>51</b>
4.5.1. Synthese C-terminal geranylgeranylierter Hexapeptide .....	51
4.5.2. Synthese von Hexapeptiden mit einem intern geranylgeranylierten Cystein .....	54
4.5.2.1. Untersuchung zur Prenylierungsstrategie von Peptiden .....	54
4.5.2.2. Synthese des intern und des doppelt geranylgeranylierten Tetrapeptids .....	57
4.5.2.3. Abschließende Synthese des intern und des doppelt geranylgeranylierten Hexapeptids .....	60
<b>4.6. Synthese unterschiedlich lipidierter, fluoreszenzmarkierter Rab7-Proteine durch die <i>Expressed Protein Ligation</i> .....</b>	<b>63</b>
4.6.1. Die Ligation .....	63
4.6.2. Die Charakterisierung der Proteinkonjugate .....	64
<b>4.7. Evaluation und Einsatz der semi-synthetischen Rab7-Proteine in biophysikalischen und molekularbiologischen Studien .....</b>	<b>68</b>
4.7.1. Die <i>in vitro</i> Geranylgeranylierung .....	68
4.7.2. Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen .....	69
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>74</b>
5.1. Zusammenfassung .....	74
5.2. Ausblick .....	82
<b>6. Experimenteller Teil .....</b>	<b>84</b>
6.1. Messgeräte und Hilfsmittel .....	84

<b>6.2. Versuche zu Kapitel 4.2.</b> .....	87
6.1.1. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung geschützter Lysinderivate .....	87
6.1.2. Versuche zu Kapitel 4.2.1. ....	87
6.1.3. Versuche zu Kapitel 4.2.2. ....	102
6.1.4. Versuche zu Kapitel 4.2.3. ....	117
<b>6.2. Versuche zu Kapitel 4.3.</b> .....	119
<b>6.3. Versuche zu Kapitel 4.4.</b> .....	120
6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.4.1. ....	120
6.3.2. Allgemeine Vorschrift für die <i>Expressed Protein Ligation</i> fluoreszenzmarkierter Lipopeptide und <sup>1-201</sup> Rab7-MESNA .....	137
<b>6.4. Versuche zu Kapitel 4.5.</b> .....	137
6.4.1. Versuche zu Kapitel 4.5.1. ....	137
6.4.2. Versuche zu Kapitel 4.5.2.1. ....	149
6.4.3. Versuche zu Kapitel 4.5.2.2. ....	155
<b>6.5. Versuche zu Kapitel 4.6.</b> .....	174
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	177
<b>8. Anhang</b> .....	185

# 1. Einleitung

Als H.W.E. Fischer 1907 in seiner *Faraday Lecture* von der Notwendigkeit sprach, die Chemie müsste sich auf die Biologie rückbesinnen, galt er am Anfang des letzten Jahrhunderts als Visionär der Biochemie. Waren es früher Chemiker und Physiker, die Pionierarbeiten auf diesem Gebiet leisteten, kam es schon recht früh zu einer raschen Emanzipation der neuen Biowissenschaften, deren rasante Entwicklung vorläufig in dem im Juni 2001 abgeschlossenen Human-Genom-Projekt einen vielbeachteten Höhepunkt fand.

Das erneute Zusammenspiel von synthetischer Chemie und den Biowissenschaften wurde in den letzten Jahren zunehmend entscheidend für neue Konzepte zur Wirkstofffindung in der Pharmazeutischen Industrie. Zudem strebten die modernen Biowissenschaften nach einem besseren Verständnis biologischer Prozesse auf der molekularen Ebene. Der Einsatz definierter synthetischer Verbindungen in biologischen Studien und damit die Notwendigkeit von deren Herstellung stellt häufig eine Herausforderung an den synthetisch arbeitenden Chemiker dar, die oftmals die Ausarbeitung neuer Methoden erforderlich macht. So erfährt wiederum die synthetische Chemie durch die Suche nach neuen Leitstrukturen neue Impulse.

Einem Konzept der Verknüpfung - nicht nur der Wissenschaften - entsprang die Entwicklung der Peptidkondensation und darüber hinaus der Protein-Semisynthese zur Herstellung von u.a. cytotoxischen Proteinen, die nur schwer zu exprimieren sind. In der Protein-Semisynthese werden synthetische Peptide mit allen benötigten Modifikationen über Linker oder mit Hilfe eines natürlichen Ligationssystems definiert an exprimierte Proteine gebunden. Während zuvor der Aufbau von Proteinen ganz von biologischen Expressionssystemen mit allen ihren Einschränkungen abhing, ist nun eine ausgedehntere präzise Manipulation von Proteinen möglich geworden.

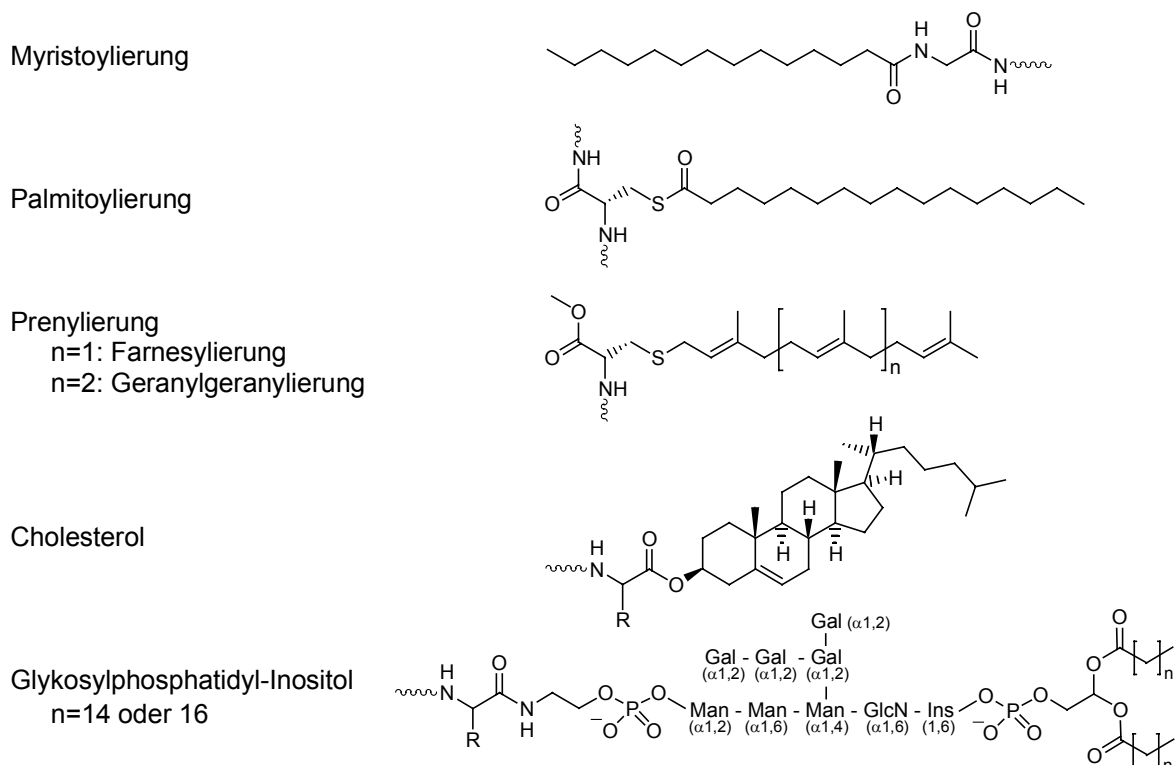
Besonders für die Mitglieder der Ras-Superfamilie, wie die Rab-Proteine, die eine Vielzahl von Zellfunktionen regulieren und deren Funktionstüchtigkeit u.a. von ihrer Membranbindung über posttranslational eingeführte Lipidreste abhängt, stellt diese Methode nicht nur eine Alternative zur klassischen Expression und Reinigung der vollständig modifizierten Proteine dar, sondern ermöglicht zudem ihre gezielte artifizielle Veränderung.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst lipidierte Rab-Teilsequenzen synthetisiert werden, die zu ihrer Detektion und für spätere Untersuchungen zusätzlich fluoreszenzmarkiert sind. Diese sollten nachfolgend an verkürzte Rab-Proteine gebunden werden, um die resultierenden semi-synthetischen Proteine in biologischen Untersuchungen einsetzen zu können.

## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1. Lipidmodifikationen von Proteinen

1951 entdeckte J. Folch mit den von ihm als „Proteolipide“ bezeichneten Proteinen aus Rattenhirn-Myelin die ersten lipidmodifizierten Proteine.<sup>[1]</sup> Dass es sich dabei um ein kovalent mit einer Fettsäure verknüpftes Protein handelt, konnte allerdings erst zwanzig Jahre später gezeigt werden.<sup>[2]</sup> Heute unterscheidet man fünf solcher Lipidmodifikationen (Abb. 1): (1) Die *N*-Myristoylierung, bei der cotranslational ein N-terminales Glycin mit Myristinsäure acyliert wird;<sup>[3]</sup> (2) die Palmitoylierung, d.h. die posttranslationale Anbindung von Palmitinsäure als Thioester an interne Cysteine;<sup>[3,4]</sup> (3) die Prenylierung, bei der posttranslational eines oder mehrere Cysteine im C-terminalen Bereich mit dem terpenoiden Farnesyl(C<sub>15</sub>)- oder Geranylgeranyl(C<sub>20</sub>)-Rest alkyliert werden;<sup>[5]</sup> (4) die C-terminale Veresterung der Hedgehog-Proteine mit Cholesterol<sup>[6]</sup> und (5) die C-terminale Verknüpfung von Proteinen mit der Phosphoethanolamin-Einheit eines Glycosylphosphatidyl-Inositol(GPI)-Ankers.<sup>[7]</sup>



**Abbildung 1:** Lipidmodifikationen von Proteinen.

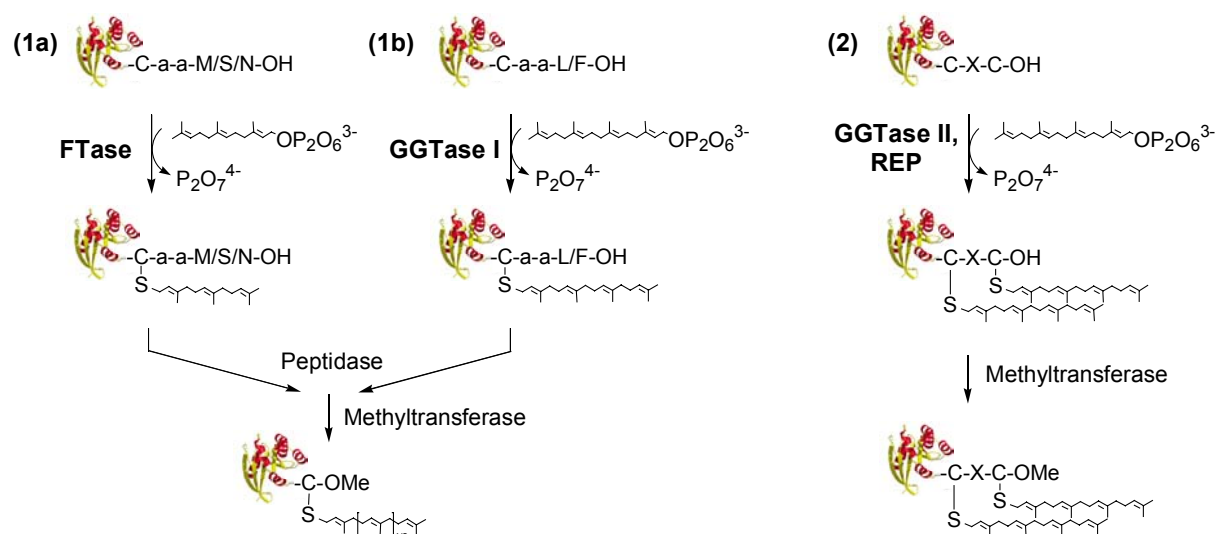
Mit Ausnahme der Palmitoylierung, die als dynamischer Prozess gilt, sind die Anbindungen der Lipidmodifikationen metabolisch stabil.<sup>[8]</sup> Bis zu 2 % der gesamten zellulären Proteine können prenyliert sein,<sup>[9]</sup> wovon wiederum 80 % geranylgeranyliert sind.<sup>[10]</sup>



### 2.1.1. Die Prenylierung

Mit Rhodotorucin A, einem Paarungsfaktor aus dem Pilz *Rhodospiridium toruloides*, wurde 1978 das erste isoprenylierte Polypeptid entdeckt.<sup>[11]</sup> Dass auch ganze Proteine posttranslational prenyliert werden, konnte allerdings erst Ende der 80er Jahre anhand des Kernhüllenproteins, Lamin B, belegt werden.<sup>[12]</sup> Das Interesse an prenylierten Lipopeptiden wuchs jedoch erst stark an, nachdem auch Ras(*rat adenosarkoma*)- und Rab(*ras genes from rat brain*)-Proteine - wichtige Regulatoren zahlreicher zellulärer Prozesse - als Lipoproteine identifiziert worden waren.

Prenylierte Proteine lassen sich je nach ihrer Signalsequenz zur Prenylierung in zwei Gruppen einteilen:<sup>[5]</sup> (1) Proteine mit C-terminalem CaaX-Motiv, wobei |C| für das zu prenylierende Cystein steht, |a| für beliebige aliphatische Aminosäuren, und mit |X| festgelegt ist, welche der „CaaX-Prenyltransferasen“ das Protein als Substrat erkennt. Ist |X| ein Methionin, Serin oder Glutamin, wird das Protein von der Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert (Schema 1; 1a). Ist |X| hingegen ein Leucin oder Phenylalanin, dann wird das Protein von der Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) geranylgeranyliert (Schema 1; 1b). Bei einer Inhibierung der FTase können einige sonst farnesylierte Proteine, z.B. K-Ras, geranylgeranyliert werden.<sup>[13]</sup> Im Anschluss an die Prenylierung wird das aaX-Tripeptid proteolytisch abgespalten und das nun C-terminale prenylierte Cystein von einer spezifischen Methyltransferase zum Methyl ester umgesetzt, wodurch sich die Hydrophobizität des C-Terminus noch erhöht.<sup>[14]</sup> Zu dieser Gruppe von Proteinen mit CaaX-Motiv gehören z.B. die Ras-Proteine, Kernlamine, die Rhodopsinkinase und die  $\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine.<sup>[5]</sup> Allerdings übertragen die FTase und die GGTase I Prenylreste auch auf einfache CaaX-Tetrapeptide.



**Schema 1:** Posttranslationale Modifikationsabfolgen von „CaaX- und CXC-Proteinen“.

(2) Proteine mit C-terminalem CC-, CXC-, CCXX oder CCXXX-Motiv: Beide Cysteine der Prenylierungsmotive werden von der Geranylgeranyltransferase II (GGTase II) geranylgeranyliert (Schema 1; 2). Die GGTase II wird auch als „RabGGTase“ bezeichnet, weil sie ausschließlich Mitglieder dieser Proteinfamilie modifiziert, wenn sie im Komplex mit REP (*rab escort protein*) vorliegt.<sup>[15]</sup> Rab-Proteine mit CXC-Motiv werden im Anschluss an die Prenylierung methyliert, bei solchen mit CC- bzw. CCXX-Motiv verbleibt der C-Terminus unverändert als Carboxylat.<sup>[15;16]</sup>

### **2.1.2. Funktionen der Prenylierung**

Zwei Aufgaben der Prenylierung eines Proteins sind heute anerkannt: Zum einen sind fast alle prenylierten Proteine, wie auch lipidierte Proteine im allgemeinen, Membranproteine, d.h. sie sind über ihren Lipidrest an zelluläre Membranen gebunden.<sup>[17]</sup> Zum anderen beeinflussen die Prenylreste die Wechselwirkung derart modifizierter Proteine mit anderen Proteinen.<sup>[18]</sup>

Die erste Funktion, d.h. die Membranbindung prenylierter Proteine, erfolgt über die Insertion der Prenylreste in die Lipiddoppelschicht. Dabei hängt die Stärke der Bindung von der Länge des Prenylrestes ab. Während geranylgeranylierte Proteine kinetisch stabil an eine Membran gebunden sind, zeigt ein Farnesylrest eine hohe Austauschrate.<sup>[19]</sup> Die membranständigen Ras-Proteine benötigen aus diesem Grund neben dem Farnesylrest ein zweites Membranbindungselement zur kinetisch stabilen Membranbindung. Im Fall von K-Ras<sub>B</sub> bindet zusätzlich eine polybasische Domäne nahe dem C-Terminus an die negativ geladenen Phospholipide einer Membran, während K-Ras<sub>A</sub> und N-Ras einfach und H-Ras doppelt im C-terminalen Bereich palmitoyliert werden.<sup>[20]</sup> Der Sitz einer möglichen Palmitoyltransferase wird kontrovers diskutiert:<sup>[5b]</sup> Das sog. *kinetic-trapping*-Modell geht davon aus, dass posttranslational farnesylierte Ras-Proteine an die Plasmamembran binden und erst dort palmitoyliert und damit irreversibel gebunden werden.<sup>[19]</sup> Einem anderen Modell zufolge werden die farnesylierten Ras-Proteine am Endoplasmatischen Retikulum methyliert (s. 2.1.1) und auch dort palmitoyliert, um anschließend über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert zu werden.<sup>[21]</sup>

Durch ihre Membranlokalisierung kommen verschiedene Proteine in räumliche Nähe zueinander, was ihre gegenseitige Erkennung und Interaktion ermöglicht. Eine direkte Beteiligung von Prenylresten an der Protein-Protein-Wechselwirkung wurde im Fall des Ras2-Proteins der Hefe gefunden, dessen farnesylierte Form eine 100fach höhere Affinität für die Adenylyl-Cyclase zeigt als das unmodifizierte Protein.<sup>[22]</sup> Ebenso verläuft die Wechselwirkung der Raf-1-Kinase mit Ras-Proteinen neben einer Ras-Bindungsdomäne über eine Zink-Finger-

Domäne, die nur an Ras bindet, wenn es farnesyliert vorliegt.<sup>[23]</sup> Dass Proteine über zwei Bindungsstellen, d.h. über eine Peptidsequenz und über Prenylreste, von Interaktionspartnern erkannt werden, findet sich auch im Fall der Rab-Proteine. Diese werden vom GDI(*guanine nucleotide dissociation inhibitor*)-Protein erkannt, das prenylierte Rab-Proteine aus Membranen herauslösen kann.<sup>[24]</sup>

Allerdings wird auch postuliert, dass statt der direkten Erkennung des Prenylrestes eher eine Konformationsänderung des Proteins aufgrund seiner Lipidmodifikation die Ursache für eine prenylabhängige Bindung von Effektoren oder anderen Proteinen ist.<sup>[25]</sup>

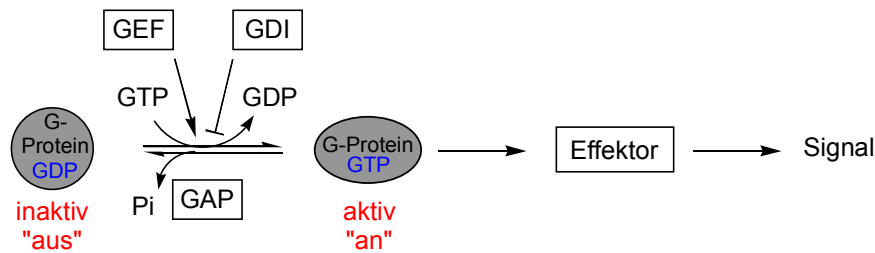
## 2.2. Funktion und Membranbindung der Rab/Ypt-Proteine

### 2.2.1. Die G-Proteine

Bei vielen Guanosinnukleotid-gebundenen Proteinen führt die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu einer Konformationsänderung, die die Affinität des Proteins für Regulatoren oder Effektoren bestimmt. Diese GTPasen, oder G-Proteine,<sup>[26]</sup> die mit Ausnahme der an der Proteinsynthese beteiligten G-Proteine auf Eukaryonten beschränkt sind, werden in zwei Klassen eingeteilt: Die heterotrimeren G-Proteine und die monomeren G-Proteine. Während Proteine der ersten Klasse im wesentlichen an der Signalweiterleitung über cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt sind,<sup>[27]</sup> sind Proteine der zweiten Klasse, zu denen die Ras-Superfamilie gehört, in zelluläre Funktionen, wie den Vesikeltransport, den Zellzyklus, den Kernimport und die Signaltransduktion involviert.<sup>[28]</sup>

Die G-Proteine durchlaufen einen Zyklus aus GTP-gebundener Form, GTP-Hydrolyse und GDP/GTP-Austausch (Schema 2).<sup>[28]</sup> Die GTP-gebundene Form eines G-Proteins wird als „aktiver“ Zustand bezeichnet, der stimulierend oder inhibierend auf zelluläre Prozesse wirkt und die Aktivität und/oder Lokalisation von Effektoren beeinflusst. Nach der Hydrolyse des GTPs zu GDP liegt das G-Protein im „inaktiven“ Zustand vor. Dieser Zyklus wird durch weitere Proteine reguliert.<sup>[29]</sup> GTPase-Aktivität verstärkende Proteine (*GTPase accelerating proteins* (GAP)) erhöhen die normalerweise geringe intrinsische hydrolytische Aktivität der G-Proteine. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) verhindern den Austausch von GDP gegen das im Cytosol in wesentlich höherer Konzentration vorliegende GTP, während Guaninnukleotid-austauschende Proteine (*guanine nucleotide exchange factors* (GEF)) die Freigabe von GDP oder GTP stimulieren.

Die Fähigkeit der GTPasen, regulativ zu wirken und auch selbst reguliert zu werden, macht sie zu molekularen Schaltern, die Signale empfangen und die Funktionen anderer Proteine



**Schema 2:** G-Proteine als molekulare Schalter.

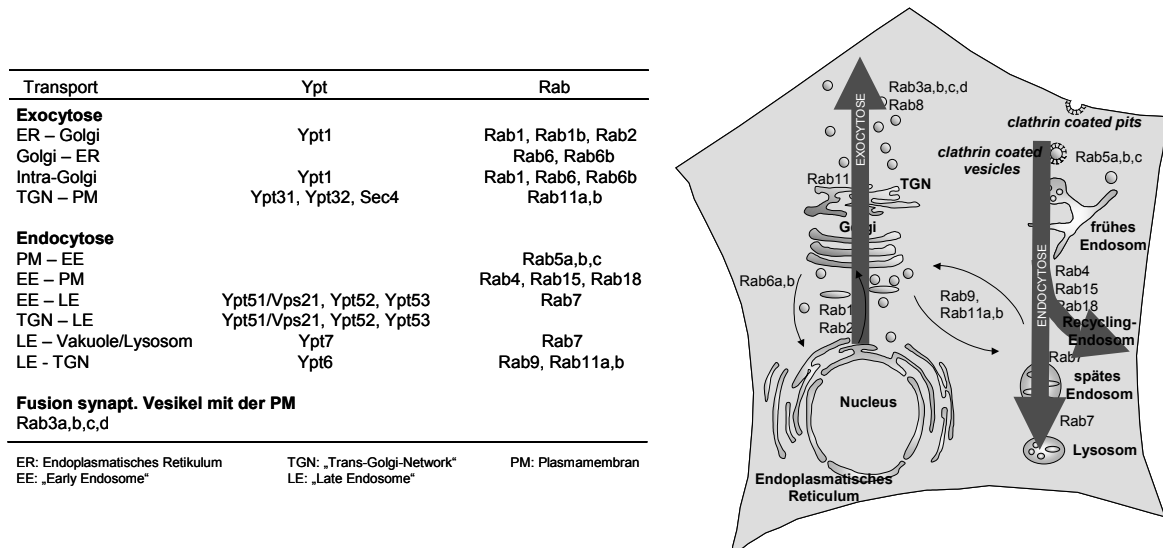
steuern können. Fehlregulationen können mit schwerwiegenden Folgen verbunden sein: Dauerhaft angeschaltete Ras-Proteine finden sich in ca. 30 % aller Krebsfälle. Aufgrund mutierter ras-Gene sind diese Proteine unfähig, GTP zu hydrolysieren, was ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge hat.<sup>[30]</sup>

### 2.2.2. Rab/Ypt-Proteine - Regulatoren des zellulären Vesikeltransports

Rab-GTPasen aus Säugern und ihre Hefe-Homologen, die Ypt(*yeast protein transport*)-GTPasen, gehören zur Ras-Superfamilie monomerer G-Proteine und bilden eine von fünf Unterfamilien. Mit 11 Ypt-Proteinen sowie 37 identifizierten und 15 über Sequenzanalyse<sup>[31]</sup> gefundenen Rab-Proteinen repräsentieren sie die größte der Unterfamilien.<sup>[32]</sup> In den letzten zehn Jahren zeigte es sich, dass die Rab/Ypt-GTPasen eine Schlüsselfunktion in der Regulierung des intrazellulären Vesikeltransports ausüben (Abb.2):

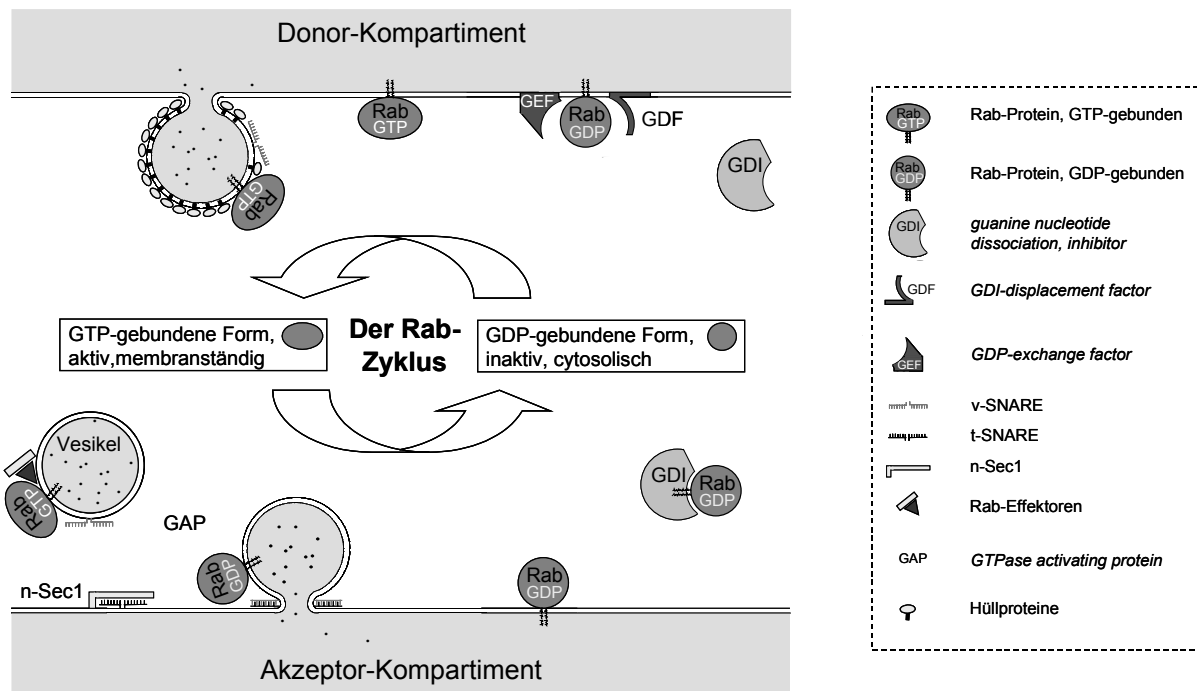
In der Zelle existiert ein Transportsystem zwischen den einzelnen Kompartimenten bzw. zwischen diesen und der Plasmamembran. Es basiert auf dem Verkehr kleiner Transportvesikel, die sich unaufhörlich von einer Membran abschnüren und mit einer anderen verschmelzen. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Zielsteuerung der Vesikel auf einer Kompartimentspezifität komplementärer SNARE(*soluble NSF(N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor*)-Proteine<sup>[33]</sup> beruht (SNARE-Hypothese<sup>[34]</sup>): Die auf einem Vesikel lokalisierten v(*vesicle*)-SNAREs binden demnach nur an komplementäre an der Zielmembran lokalisierte t(*target*)-SNAREs. Dies führt zur spezifischen Anheftung der Vesikel. Obwohl die verschiedenen v- und t-SNAREs tatsächlich auf spezifischen Zellkompartimenten gefunden werden, bestünde bei einer freien Wechselwirkung die Gefahr, dass die Organellen einer Zelle aggregieren. Auch die strikte Komplementarität der v- und t-SNAREs wird kontrovers diskutiert.<sup>[35]</sup> Daher geht man heute davon aus, dass sie zwar eine wichtige Rolle in der Membranfusion spielen, dass aber für die Zielsteuerung und Anheftung der Vesikel, d.h. für die Vorgänge, die die Basis eines spezifischen Transports bilden, andere Proteine, und zwar die Rab-GTPasen, verantwortlich sind.<sup>[36]</sup>

Das Vorkommen einzelner der 63 identifizierten Rab/Ypt-Proteine ist auf verschiedene Transportwege innerhalb einer Zelle beschränkt. Dabei konnte noch nicht jedem der Rab/Ypt-Proteine eine definierte Rolle zugewiesen werden (Abb.2).<sup>[32]</sup>



**Abbildung 2:** Beispiele von Rab/Ypt-Proteinen in Transportereignissen.

Während des Vesikeltransports wird der Wanderungszyklus der Rab/Ypt-„Schalter“ von ihrem GTPase-Zyklus überlagert (Abb. 3).<sup>[32;37]</sup> Auf der Oberfläche sich abschnürender Vesikel sind neben den Hüllproteinen Rab-Proteine lokalisiert, die vor oder kurz nach ihrer Rekrutierung über GEF-Proteine in ihre aktive, GTP-gebundene Form umgewandelt werden. In dieser Form binden sie zum einen vermutlich an Motorproteine - wie im Fall von Rab6, das an Rabkinesin-6 bindet<sup>[38]</sup> - oder an andere Elemente des Cytoskeletts, entlang dessen der Vesikel transportiert wird. Zum anderen rekrutieren Rab/Ypt-Proteine in ihrer aktiven Form eine große Anzahl heterogener und damit vermutlich hochspezialisierter Rab/Ypt-Effektoren aus dem Cytosol.<sup>[36]</sup> Diese üben direkt oder durch Bindung weiterer Proteine im wesentlichen folgende Funktionen aus: Erstens erhalten sie die Rab/Ypt-Proteine über GEF-Aktion in der aktivierten und damit Effektor-gebundenen Form. Zum zweiten dienen sie als sogenannte *tether*, d.h. Anheftungsfaktoren, über die ein Vesikel erstmals mit der Zielmembran über eine relativ große Distanz in Verbindung tritt. Oder sie binden drittens an Proteinkomplexe, die als Markierungen auf der Zielmembran dienen. Darüberhinaus wird angenommen, dass die Effektoren die Paarung komplementärer SNARE-Proteine beeinflussen. Da sich der Anheftungskomplex aus Rab/Ypt-Proteinen und Rab/Ypt-Effektoren nur bildet, wenn die Rab/Ypt-Proteine in ihrer aktiven Form vorliegen, ist gewährleistet, dass ausschließlich funktionsfähige Transportvesikel an die Zielmembran binden und nicht etwa ganze Kompartimente.



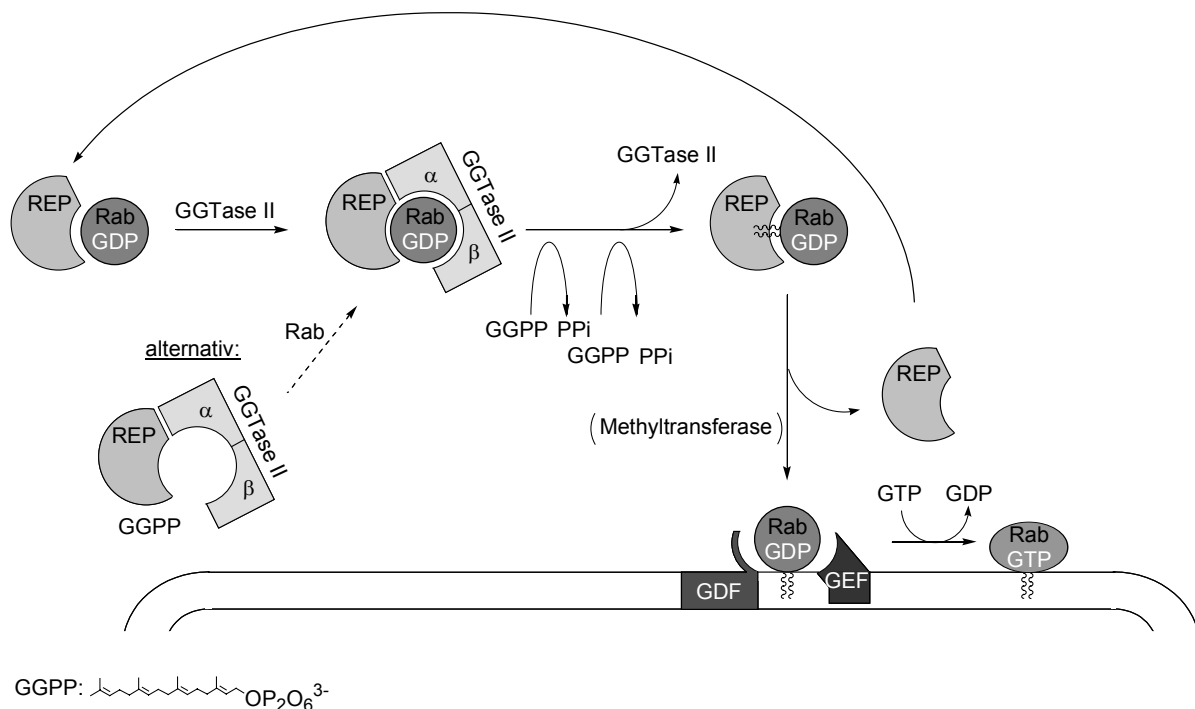
**Abbildung 3:** Der vektorielle Vesikeltransport.

Mit n-Sec1, einem Protein, das an t-SNAREs bindet und eine zur Paarung mit einem v-SNARE ungünstige Konformation stabilisiert, konnte zudem ein erstes SNARE-blockierendes Protein gefunden werden.<sup>[39]</sup> Erst die Wechselwirkung mit Proteinen des Anheftungskomplexes führt über Konformationsänderungen zu einer Freisetzung der t-SNAREs und damit, wenn t- und v-SNARE komplementär sind, zu einem Andocken des Vesikels. Der resultierende Komplex aus t- und v-SNARE besteht aus einem Bündel von vier verknäulten Helices.<sup>[40]</sup> Die Bildung dieses extrem stabilen Komplexes, der SDS-, Protease- und hitzebeständig ist, zwingt den Vesikel in eine solche Nähe zum Zielkompartiment, dass ihre Membranen entgegen der elektrostatischen Abstoßung miteinander verschmelzen. Erst die Wechselwirkung mit NSF (*N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein*) und  $\alpha$ -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) löst den Komplex und reaktiviert die SNARE-Proteine.<sup>[41]</sup> Zu welchem Zeitpunkt die Rab/Ypt-Proteine ihr gebundenes GTP hydrolysieren und damit in den inaktiven Zustand übergehen, wird kontrovers diskutiert, zumal Unterschiede in der homotypischen Fusion, d.h. der Fusion zweier Vesikel, und der heterotypischen Fusion, d.h. der Fusion eines Vesikels mit einem Kompartiment oder der Plasmamembran, vermutet werden.<sup>[37a]</sup> Die inaktiven, aufgrund ihrer Membrananker - den beiden Geranylgeranylresten - wasserunlöslichen Rab/Ypt-Proteine werden vom GDI-Protein aus der Membran gelöst und zum Donorkompartiment zurücktransportiert. Mit dem membranständigen GDF (*GDI*

*displacement factor*)-Protein, das Rab/Ypt-Proteine aus dem Komplex mit GDI löst, konnte ein erster Rezeptor für recycelte Rab/Ypt-Proteine gefunden werden.<sup>[42]</sup>

### 2.2.3. Die posttranslationale Geranylgeranylierung der Rab-Proteine

Die Membranständigkeit der Proteine, die maßgeblich am vektoriellen Vesikeltransport in der Zelle beteiligt sind, ist für ihre Funktion unerlässlich. Während einige SNARE-Proteine über carboxyterminale Transmembrandomänen verankert sind, tragen SNAP-25 - ein t-SNARE - und die Rab/Ypt-Proteine Lipidmodifikationen.<sup>[33]</sup> Vier palmitoylierte Cysteine im zentralen Bereich des Proteins bewirken bei SNAP-25 eine feste Membranbindung. Im Fall der Rab/Ypt-Proteine wird diese über die Anknüpfung zweier Geranylgeranylreste im C-terminalen Bereich des Proteins realisiert (Schema 3). Neusynthetisierte Rab-Proteine binden an REP, und dieser binäre Komplex wird von der GGTase II erkannt. Nach Ausbildung eines ternären Komplexes überträgt die GGTase II zwei Geranylgeranylreste auf das Rab-Protein (s. 2.1.1.), der ternäre Komplex zerfällt, und REP geleitet das nun wasserunlösliche Rab-Protein durch das Cytosol zum jeweiligen Zielkompartiment.<sup>[5a]</sup>



**Schema 3:** Prenylierung und Membranbindung von Rab-Proteinen.

Die Bindung der GGTase II an den binären Komplex aus Rab-Protein und REP ist nicht nur unabhängig vom Nukleotid, das an Rab gebunden ist, sondern wird auch nur wenig beeinflusst vom C-terminalen Bereich der Rab-Proteine.<sup>[43]</sup> Der Rab/REP-Komplex wird

demzufolge als Ganzes oder auch nur über eine REP-Bindungsstelle<sup>[44]</sup> von der GGTase II erkannt, woraufhin anschließend der flexible C-terminale Bereich der Rab-Proteine ins aktive Zentrum gelangt.<sup>[43]</sup> Für eine REP-Bindungsstelle spricht auch die Existenz eines offenbar möglichen alternativen Weges zur Ausbildung des ternären Komplexes (Schema 3): In Anwesenheit von Geranylgeranylpyrophosphat kann REP allein an die GGTase II binden, und dieser binäre Komplex bindet anschließend neusynthetisiertes Rab-Protein.<sup>[45]</sup>

Bei der GGTase II handelt es sich wie bei allen Prenyltransferasen um ein  $\alpha$ -,  $\beta$ -Heterodimer bestehend aus einer 50 kDa  $\alpha$ - und einer 38 kDa  $\beta$ -Untereinheit.<sup>[5a]</sup> Allerdings unterscheidet sich die GGTase II in zwei wichtigen Punkten von der FTase und der GGTase I: Zum einen sind kurze Peptide trotz geeignetem C-terminalen Motiv aus den oben genannten Gründen keine Substrate der GGTase II, sondern nur mit REP komplexierte Proteine.<sup>[46]</sup> Zum anderen katalysiert sie den Transfer *zweier* Prenylgruppen. Letzteres ist ein einzigartiger Prozess, der auch nach Aufklärung der Struktur der GGTase II nicht an Interesse verloren hat.<sup>[47]</sup> Schon 1998 konnten DESNOYERS und SEABRA zeigen, dass die GGTase II wie die „CaaX-Prenyltransferasen“ nur eine Prenylbindungstasche besitzt, und es sich deswegen bei der Übertragung zweier Geranylgeranylgruppen um aufeinanderfolgende unabhängige Reaktionen handeln muss.<sup>[48]</sup> Auch die Röntgenstruktur der GGTase II zeigt nur eine Pyrophosphatbindungsstelle an, die nahe des aktiven  $Zn^{2+}$ -gebundenen Zentrums in der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert ist, verbunden mit nur einer Prenylbindungstasche.<sup>[47]</sup> Für die zweite Prenylierung muss daher in dieser Tasche ein Austausch des im ersten Transfer übertragenen Geranylgeranylrestes gegen das zweite zu übertragende Geranylgeranylpyrophosphat stattfinden, während die Thiolgruppe des nun zu prenylierenden Cysteins die Thioethergruppe des prenylierten Cysteins vom aktiven Zentrum verdrängt.<sup>[47]</sup>

Studien zum Mechanismus des GGTase II-katalysierten Geranylgeranyltransfers gibt es vergleichsweise wenige: 1996 konnte durch Einsatz von nur einfach prenylierbaren Rab1a-Serin-Mutanten, Rab1aC204S und Rab1aC205S, gezeigt werden, dass es zumindest in diesem artifiziiellen System keine absolute Ordnung im Prenyltransfer gibt, da beide geranylgeranyliert wurden.<sup>[49]</sup> Auch die Frage, ob das monoprenylierte Rab-Protein während des Wechsels in der Prenylbindungstasche an das Enzym gebunden bleibt oder zeitweilig dissoziiert, aber aufgrund der starken Bindung zwischen GGTase II und dem Rab/REP-Komplex für eine zweite Prenylierung wieder mit der GGTase II zusammenfindet, konnte bisher nur mit Serinmutanten zugunsten des ersten Szenarios beantwortet werden.<sup>[50]</sup>

Obwohl manche der mit Hilfe von Serinmutanten erzielten Ergebnisse Abweichungen vom natürlichen System zeigten, sind sie bisher unverzichtbar, da gezielt einfach geranylgerany-



lierte prenylierbare Reaktionsintermediate molekularbiologisch nicht zugänglich sind.

#### **2.2.4. Mit der Rab-Protein-Aktivität verbundene Krankheiten**

Es wird angenommen, dass die Mehrzahl der Rab-Proteine hochspezialisierte Funktionen in verschiedenen Zelltypen ausüben. Trotzdem konnten bisher nur vergleichsweise wenige Krankheiten auf eine Fehlfunktion der Rab-Proteine zurückgeführt werden. Einer der Gründe ist vermutlich, dass die komplexe Vernetzung der Rab-Proteine mit biochemischen Abläufen bis heute nicht vollständig verstanden ist. Je weiter die Forschung voranschreitet, desto mehr Krankheiten bis hin zu Krebs scheinen auch mit der Funktion der Rab-Proteine verknüpft zu sein.<sup>[32b]</sup>

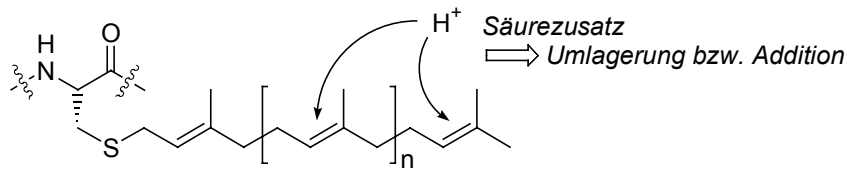
Gesichert scheint, dass Störungen der Rab-Prenylierungsmaschinerie wie Mutationen des REP-1-Proteins bzw. der  $\alpha$ -Untereinheit der GGTase II Ursachen der Choroideremia (CHM)<sup>[51]</sup>, einer degenerativen Netzhauterkrankung, die im mittleren Alter zur Erblindung führt, bzw. des Hermansky-Pudlak-Syndroms (HPS)<sup>[52]</sup> sind. Mutationen im GDI-Protein manifestieren sich in einer mentalen Zurückgebliebenheit.<sup>[53]</sup> Bedeutend sind auch neuere Befunde, die das Fortschreiten von Infektionskrankheiten mit gezielten Änderungen einzelner Rab-Funktionen verbinden<sup>[32b]</sup> oder einzelnen Rab-Proteinen - wie Rab7 - eine entscheidende Rolle in der Knochenresorption durch Osteoclasten zuweisen, welche im Osteoporosefall krankhaft gesteigert ist.<sup>[54]</sup> Einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Behandlung von Osteoporose bietet daher auch die kürzliche Entdeckung eines ersten selektiven Inhibitors der GGTase II, des Phosphonocarboxylat-Analogons des Bisphosphonats Risedronat.<sup>[55]</sup>

### **2.3. Lipidmodifizierte Peptide**

#### **2.3.1. Synthesemöglichkeiten farnesylierter und geranylgeranylierter Peptide**

Häufig ist die Herstellung vollständig modifizierter Proteine schwierig oder sogar unmöglich, da in prokaryontischen Expressionssystemen keine posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Lipidreste eingeführt werden. Bei zahlreichen biophysikalischen und zellbiologischen Untersuchungen von Lipidmodifikationen bietet sich daher der Einsatz lipidierter Teilstücke als Modell des gesamten Proteins an. Für die Synthese prenylierter Peptide sind viele unterschiedliche Verfahren beschrieben. Dabei ist die Synthesestrategie abhängig von zahlreichen Faktoren, wie u.a. der Aminosäuresequenz, der Anzahl einzuführender Prenylreste und der weiteren Modifizierung des C- bzw. N-Terminus. In allen Fällen muss die

Säurelabilität des Prenylrestes beachtet werden, der schon unter schwach sauren Bedingungen anfällig für Umlagerungs- und Additionsreaktionen ist (Abb. 4).<sup>[56;57]</sup>



**Abbildung 4:** Labilität prenylierter Cysteine innerhalb eines Peptids.

Die Anzahl möglicher Schutzgruppenstrategien reduziert sich weiter durch die Vermeidung hydrogenolytischer Abspaltungsbedingungen und oftmals durch die erhöhte Racemisierungsanfälligkeit von Cysteinstern in der Festphasensynthese unter basischen Bedingungen,<sup>[58]</sup> die schlechte Löslichkeit prenylierter Peptide in wässrigen Medien und die Vermeidung von Schwermetallen im letzten Syntheseschritt, wenn die Peptide direkt in biologischen Tests eingesetzt werden sollen.

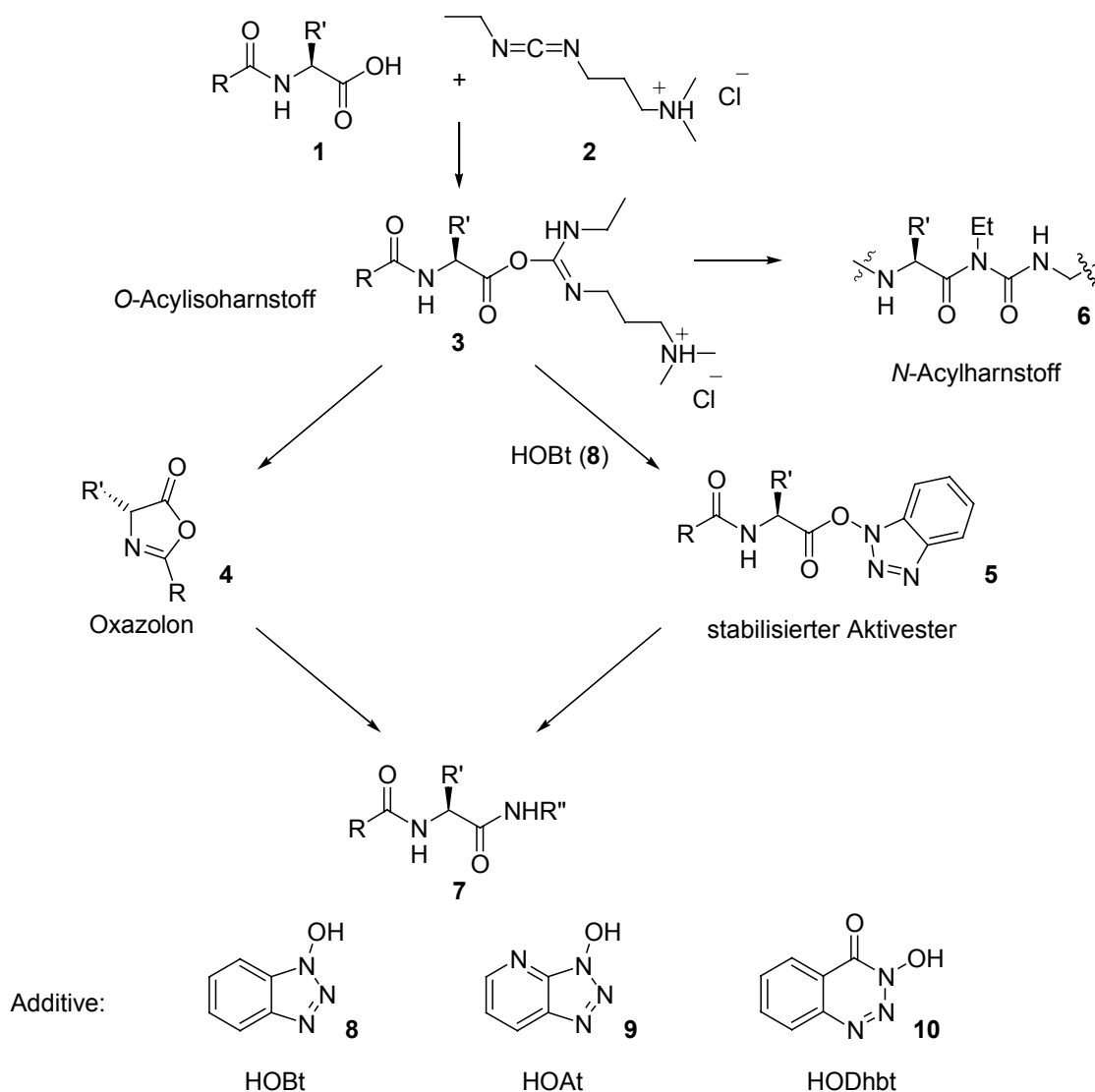
Bei der Synthese prenylierter Peptide lassen sich grundsätzlich vier Strategien unterscheiden:

- (1) Die Synthese selektiv entschützter Peptide und ihre anschließende Umsetzung mit dem entsprechenden Prenylbromid unter basischen<sup>[59;56]</sup>, neutralen<sup>[19]</sup> oder sauren<sup>[60]</sup> Bedingungen, d.h. unter Zugabe von Diisopropylethylamin, Kaliumfluorid-Dihydrat bzw. Zinkacetat.
- (2) Die Prenylierung von Cysteinderivaten, die dann als prenylierte Bausteine in der Peptidsynthese eingesetzt werden.<sup>[57]</sup>
- (3) Die enzymatische Einführung der Prenylreste unter Verwendung der entsprechenden Prenylpyrophosphate und der FTase bzw. der GGTase I.<sup>[61]</sup>
- (4) Die vollständige Synthese prenylierter Peptide an der festen Phase.<sup>[62]</sup>

Die Einzelheiten dieser Synthesestrategien sind in Übersichtsartikeln<sup>[63]</sup> aufgeführt und sollen daher hier nicht weiter diskutiert werden.

In der Lösungssynthese prenylierter Peptide wurden häufig prenylierte Cysteinbausteine verwendet. Beim sequenziellen Aufbau von Peptiden mit einem C-terminalen prenylierten Cysteinstern ist aufgrund der Säurelabilität des Prenylrestes eine Fragmentkondensation häufig unumgänglich. Aufgrund der damit verbundenen Racemisierungsgefahr des C-terminalen aktivierten Peptids sollte diese nach Möglichkeit an nicht chiralen Glycin oder kaum racemisierungsanfälligen Prolin stattfinden. Sind diese Aminosäuren nicht in der Sequenz des Peptids, kann durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen auch hier die Racemisierung stark vermindert oder sogar unterdrückt werden. Bewährt hat sich hier wie auch allgemein in

der Peptidchemie die Carbodiimidmethode<sup>[64]</sup> mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>[65]</sup> (**8**), 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAt)<sup>[66]</sup> (**9**) oder 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HODhbt)<sup>[67]</sup> (**10**) als Additiv (Schema 4).



**Schema 4:** Die Carbodiimid/Additiv-vermittelte Variante zur Peptidknüpfung.<sup>[68]</sup>

Der primär aus der C-terminal freien Komponente **1** und dem Carbodiimid (hier: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) (**2**)) gebildete sehr reaktive *O*-Acylisourea **3** wird nucleophil vom Additiv angegriffen, wodurch das weniger reaktive Acylierungsmittel **5** entsteht, das abschließend mit der C-terminalen Komponenten zum Peptid **7** reagieren kann. So kann die unerwünschte Umlagerung des *O*-Acylisourea **3** zum stabilen *N*-Acylisourea **6** wie auch die Bildung des racemisierungsanfälligen

Oxazolons **4**, das selbst gegenüber Aminolyse aktiviert ist, vermieden werden. Darüberhinaus kann bei Fragmentkupplungen oder bei Kupplungen von Cysteinderivaten die Racemisierung durch Vermeidung polar aprotischer Lösungsmittel wie Dimethylformamid drastisch vermindert oder vollständig unterdrückt werden.<sup>[69;70]</sup> Dabei hat sich zur Löslichkeitsvermittlung bei polareren Verbindungen der Zusatz von Trifluorethanol etabliert.<sup>[70]</sup>

Zur Synthese prenylierter Peptide in Lösung bewährte sich neben anderen Strategien auch die Fmoc-Strategie.<sup>[57]</sup> Durch die Verwendung von Dichlormethan anstelle von Dimethylformamid wurde hier bei der basischen Deblockierung offenbar eine Racemisierung des C-terminalen Cysteinesters nicht beobachtet.<sup>[57;71]</sup>

### **2.3.2. Prenylierte Peptidkonjugate in biologischen Studien**

Prenylierte Modellpeptide wurden zum einen zur Aufklärung des Prenylierungsmechanismus (1) und zum anderen in weit größerem Maß in Studien zur Membranbindung (2) eingesetzt: (1) Mechanistische Studien und damit häufig die Kenntnis des Übergangszustands der Prenyltransferase-Reaktion sind wertvoll für das Design neuer Inhibitoren dieser Enzyme, die gerade im Fall von Ras auch schon in der Tumorthherapie Anwendung finden (s.2.2.1).<sup>[72]</sup> Bei den „CaaX-Prenyltransferasen“ kann der Umstand ausgenutzt werden, dass auch einfache Tetrapeptide als Substrate dienen. So zeigten DISTEFANO et al.<sup>[61]</sup> in Weiterführung früherer stereochemischer Experimente,<sup>[73]</sup> dass die von der FTase katalysierte Farnesylierung eines Peptids unter Inversion der Konfiguration am C1 des Farnesylrestes verläuft. Unter Einbeziehung weiterer Ergebnisse<sup>[74]</sup> wird im Fall der FTase auf einen assoziativen Mechanismus mit einem Übergangszustand mit elektrophilem Charakter geschlossen.<sup>[75]</sup>

(2) In umfassenden Arbeiten zur Membraninsertion prenylierter Proteine wurden die physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich lipidierter Peptide, u.a. der Verteilungskoeffizient der Peptide zwischen Lösung und Modellmembran und die Geschwindigkeitskonstanten für das Herauslösen lipidierter Peptide aus diesen Membranen bestimmt. Als Testsysteme kamen Phospholipid-Vesikel<sup>[19;76]</sup> zum Einsatz. Über die Bestimmung der effektiven Dissoziationskonstante,  $K_D^{\text{eff}}$ , bzw. der Halbwertszeit,  $t_{1/2}$ , für den Austausch fluoreszenzmarkierter Lipopeptide zwischen Vesikeln und wässriger Lösung bzw. zwischen den einzelnen Vesikeln konnte gezeigt werden, dass schon einfach lipidierte Peptide eine hohe Membranaffinität zeigen. Diese Affinität steigt mit der Länge des Lipidrestes - unabhängig von dessen Verzweigung - und mit der Methylierung des C-Terminus.<sup>[19;76]</sup> Die Halbwertszeiten einfach lipidierter Peptide liegen im Bereich von Sekunden, während für doppelt lipidierte Peptide Halbwertszeiten von mehreren Tagen gefunden werden. Auf

Grundlage dieser Daten entwickelten SILVIUS et al. für Ras-Proteine das sog. *kinetic trapping*-Modell:<sup>[19;77]</sup> Die einfache Farnesylierung führt zu einer reversiblen Bindung lipidierter Proteine an die Membran, wo sie erst durch Übertragung eines zweiten Lipidrestes fest gebunden werden. Ein Austausch zwischen Membranen soll dann nur noch durch einen aktiven Transportmechanismus oder durch die Wiederablösung eines Lipidrestes möglich sein. Über Messungen der Oberflächenplasmonresonanz künstlicher Membranen auf Sensor-Chips<sup>[78]</sup> (kommerziell als BIAcore<sup>TM</sup>-System erhältlich<sup>[79]</sup>) und Zelllokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten lipidmodifizierten Peptiden<sup>[80]</sup> wurden Ergebnisse erzielt, die dieses Modell der „Membranfalle“ unterstützen.

Mit Modellpeptiden kann meist nur eine erste Hypothese entworfen werden, die es durch Übertragung auf die Proteinebene zu beweisen gilt, da nicht alle Eigenschaften eines modifizierten Proteins durch Modellpeptide erfasst werden können. In diesem Fall machte es erst die Verwendung unterschiedlich lipidierter Peptid-Protein-Konjugate möglich, die Ergebnisse aus den Modellpeptidstudien auch auf Proteinebene zu bestätigen.<sup>[81]</sup> Derartige, je nach Experiment anpassungsfähig modifizierbare, semi-synthetische Peptid-Protein-Konjugate sind im Gegensatz zu Modellpeptiden universell einsetzbar. Heute sind Peptid-Protein-Konjugate nicht zuletzt durch Fortschritte in der Manipulation exprimierter Proteine auf verschiedenen Wegen zugänglicher geworden.

## 2.4. Synthetische und semi-synthetische Proteine

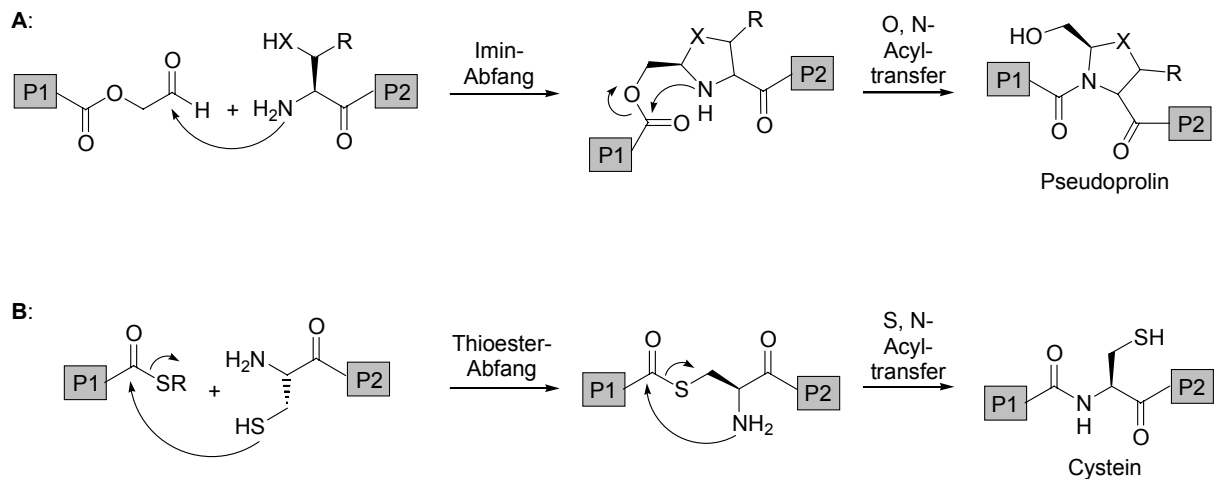
### 2.4.1. Ligationsmethoden von Peptiden und Proteinen

Mit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese vor 40 Jahren schienen die Vorteile der chemischen Synthese in der Proteinherstellung nutzbar zu werden. Die Hoffnung, ganze Proteine chemisch herstellen zu können, wurde allerdings enttäuscht, da die Größe der synthetisierbaren Polypeptide auf solche mit bis zu ca. 150 Aminosäuren beschränkt blieb.

Die Lösung - schon 40 Jahre zuvor von WIELAND et al. entwickelt<sup>[82]</sup> - blieb bis in die neunziger Jahre unbeachtet, bis sie von KENT et al. wieder aufgegriffen wurde und als *Native Chemical Ligation* (NCL) ihren Siegeszug in den Laboren antrat.<sup>[83]</sup> Die NCL ermöglicht als erste der orthogonalen Ligationen, d.h. einer Ligationsmethode, die ohne Schutzgruppen auskommt, die Synthese von Proteinen mit einem durchgängig „nativen“ Peptidrückgrat über die Verknüpfung von synthetisch hergestellten Polypeptidsegmenten.

Frühe Fragmentkondensationen verliefen über die chemoselektive Reaktion zweier

funktioneller Gruppen am N- bzw. C-Terminus der Peptidsegmente unter Ausbildung einer nichtamidischen Bindung (Tabelle 1, I). Die NCL, wie auch andere neuere orthogonale Ligationen verlaufen dagegen - basierend auf dem Prinzip des Thiolabfangs nach KEMP et al.<sup>[84]</sup> - in zwei Schritten. Dabei folgt einem chemoselektiven Abfangschritt, in dem eine kovalente Bindung zwischen den Polypeptidsegmenten ausgebildet wird, ein intramolekularer Acyltransfer zur Bildung einer Amidbindung zwischen den Segmenten. Obwohl eine Vielzahl verschiedener Ligationmethoden, die sich nach der Art ihres Abfangschrittes in Imin- und Thioesterligationen gliedern lassen (Schema 5, Tabelle 1, II + III),<sup>[85]</sup> entwickelt worden ist, ist nur über die Thioesterligationen, zu der die eingangs erwähnte *Native Chemical Ligation* gehört, ein Ligationsprodukt mit durchgängigem „nativen“ Peptidrückgrat zugänglich.



**Schema 5:** A. Imin-Ligation; B. Thioester-Ligation, hier: *Native Chemical Ligation*.

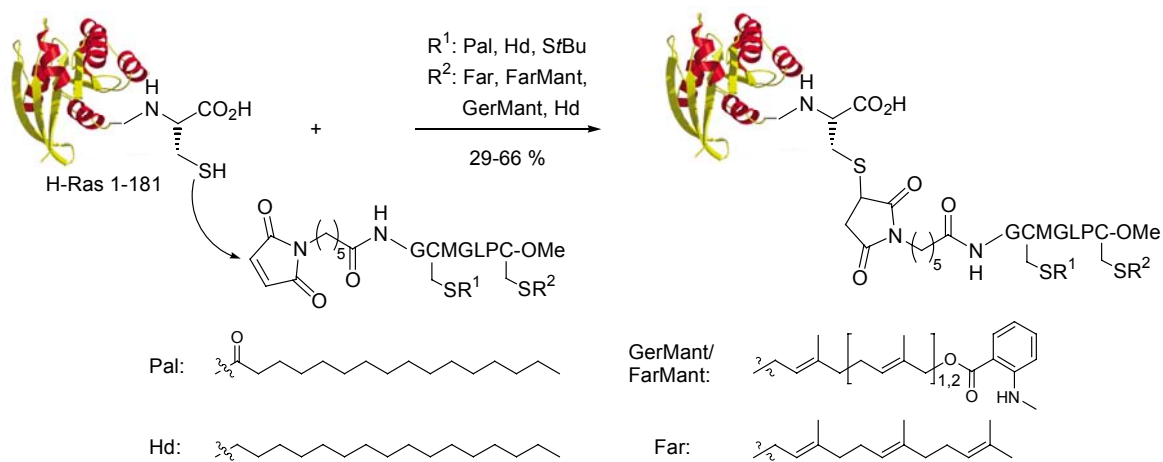
Methode	C-Terminus	N-Terminus	Produkt
I. Nichtamidische Ligationen	Thiosäure	Bromacetyl	Thioester
	Cys	Iodacetyl/ Maleinimid	Thioether
II. Imin-Abfang	Aldehyd	Cys/Ser/Thr...	Amid (Pseudoprolin)
	Aldehyd Cys	Cys Aldehyd	Amid (bicyclische Lactame)
III. Thioester-Abfang	Thioester	Cys	Amid (Cys)
	Thioester	homo-Cys*	Amid (Met)
	Thiosäure	Br-Ala Aziridinsäure	Amid (Cys)

\* Mit anschließender Methylierung.

**Tabelle 1:** Auswahl an Methoden zur Herstellung verschiedener Polypeptid-Konjugate.

Neben der Festphasensynthese größerer Polypeptidsegmente bieten sich biologische Expressionssysteme an, wenn die notwendigen funktionellen Gruppen auch über diese Systeme einführbar sind. Im Fall eines C-terminalen Cysteins ist dies gut möglich. Die erste

Verknüpfung exprimierter Proteine mit chemisch synthetisierten lipidierten Peptiden zu Lipopeptid-Protein-Konjugaten verlief dann auch Maleinimidocaproyl(MIC)-vermittelt unter Einsatz eines C-terminal auf Cystein endenden verkürzten H-Ras-Proteins (Schema 6).<sup>[81]</sup>



**Schema 6:** Synthese lipidierten Peptid-Protein-Konjugate über einen Maleinimidlinker.

Da die Lipidmodifikationen der Rab- und Ras-Proteine auf einen kurzen C-terminalen Bereich begrenzt sind, sind nach dieser Strategie vollständig und flexibel modifizierte Proteine zugänglich, deren Herstellung sich sonst aufgrund fehlender Enzyme oder komplizierterer Expressionssysteme als schwierig oder sogar unmöglich gestaltet. Allerdings schließt die MIC-vermittelte Ligation unspezifische Mehrfachanbindungen des Peptids über interne Cysteine des Proteins nur aus, wenn diese unzugänglich im Proteininneren lokalisiert sind. Zudem sind modifizierte Proteine mit einem durchgängig natürlichen Peptidrückgrat für biologische Studien besonders attraktiv, obwohl sich auch die oben erwähnten, semi-synthetischen Ras-Proteine trotz des artifiziellen Linkersystems als funktional erwiesen haben.<sup>[81]</sup>

Heute ist es möglich, über die Ausnutzung eines natürlichen Protein-*Splicing*-Systems die beiden funktionellen Gruppen einer *Native Chemical Ligation*, durch die zwei Segmente peptidisch verknüpft werden, in Proteine einzuführen.

#### 2.4.2. Das Protein-Splicing – eine Verknüpfung ohne artifizielles Linkersystem

Das Protein-*Splicing* ist ein „autokatalysierter“ Prozess, der dem RNA-*Splicing* auf Proteinebene entspricht, aber weder Cofaktoren noch andere Enzyme erfordert.<sup>[86]</sup> Im Verlauf des *Splicings* wird ein internes Polypeptidsegment, das sogenannte Intein (*internal protein*), aus

einer Proteinvorstufe herausgeschnitten. Die beiden benachbarten Domänen werden über eine Peptidbindung verknüpft, und das Protein wird so in seine aktive Form überführt. Seit 1990 das erste Protein-*Splicing*-Element entdeckt worden ist,<sup>[87]</sup> konnten über 100 weitere Inteine in Archaeobakterien, Eubakterien und einzelligen eukaryontischen Organismen gefunden werden.<sup>[88]</sup>

#### **2.4.2.1. Das natürliche Protein-Splicing**

Detaillierte biochemische Studien in den Jahren 1993-1996 führten zur Aufklärung des Protein-*Splicing*-Mechanismus, der im wesentlichen in vier Schritten abläuft (Schema 7):<sup>[86]</sup>

##### *(1) N, O- bzw. N, S-Acyltransfer*

Das Protein-*Splicing* wird eingeleitet durch den nucleophilen Angriff der Hydroxyl- bzw. Thiolgruppe der N-terminalen Aminosäure des Inteins, eines Serins oder Cysteins, auf die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des N-Exteins.

##### *(2) Umesterung*

Die so aktivierte Carboxylgruppe kann nun nucleophil von der Seitengruppe der N-terminalen Aminosäure des C-Exteins, eines konservierten Cysteins, Serins oder Threonins, angegriffen werden, wodurch das N-Extein auf die Seitenkette des C-Exteins übertragen wird.

##### *(3) Asparagin-Cyclisierung*

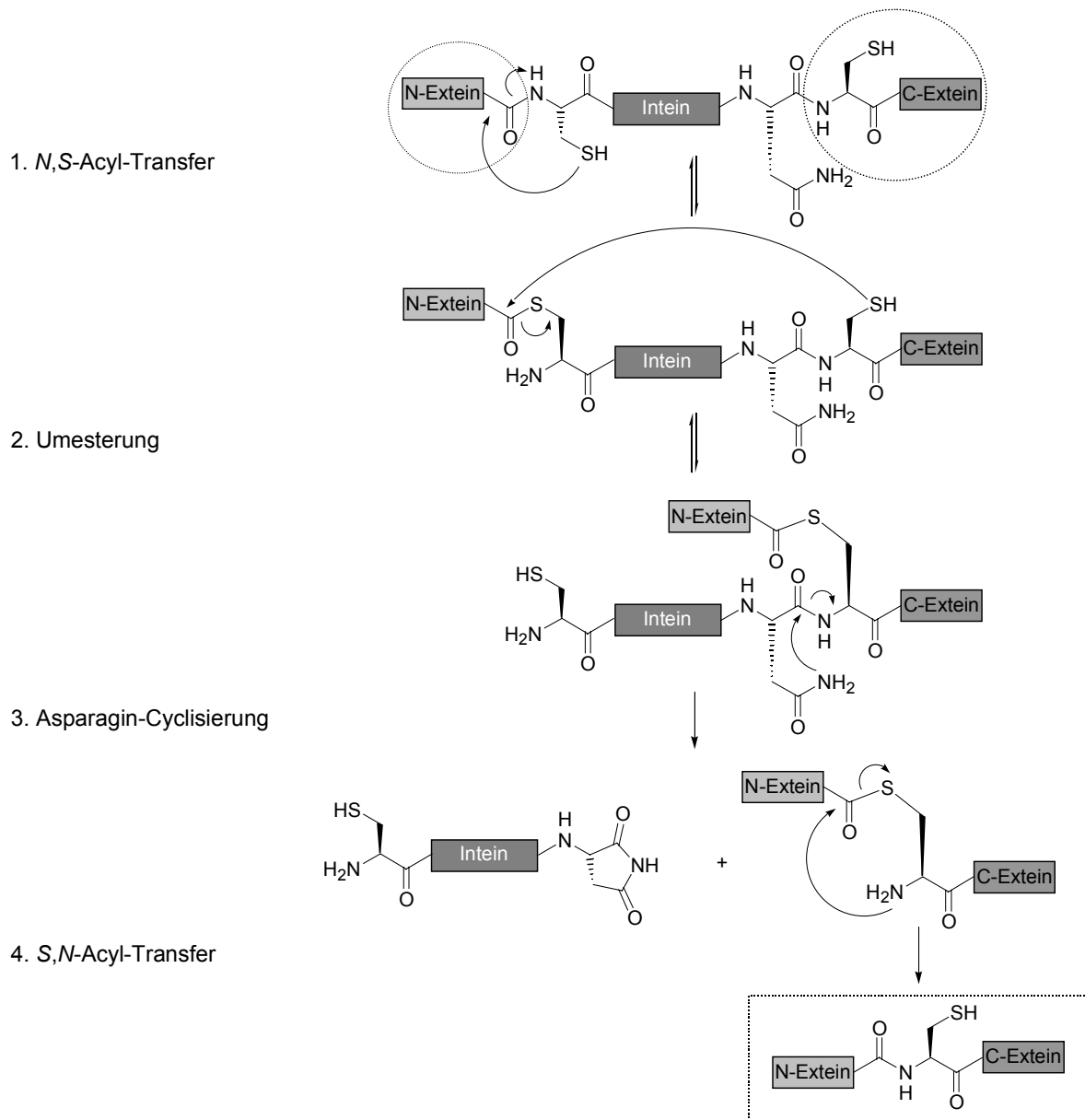
Das Intein wird endgültig über die Cyclisierung seines C-terminalen Asparagins unter Ausbildung des Aminosuccinimids freigesetzt, das vermutlich - unkatalysiert - zum Asparagin oder Isoasparagin hydrolysiert.

##### *(4) O, N- bzw. S, N-Acyltransfer*

Das Ligationsprodukt aus N- und C-Extein, das als instabiler Ester vorliegt, lagert sich nahezu irreversibel zum korrespondierenden stabilen Amid um.

Die ersten drei Schritte des Protein-*Splicings* werden vom Intein, das mit seinen Substraten, dem N- und C-Extein, kovalent verbunden ist, „katalysiert“. Aufgrund der Schwierigkeit, ein selbst-*splicendes* System zu kristallisieren, ist wenig über „katalytische“ Gruppen im Intein bekannt. Allerdings lässt die ungewöhnliche thermodynamische Stabilität des zuerst gebildeten Thio- bzw. Oxyesters eine atypische Peptidbindung zwischen N-Extein und Intein vermuten, die auch in zwei Fällen als energiereiche *cis*- oder als verbogene *trans*-Konformation näher beschrieben werden konnte.<sup>[89;90]</sup>





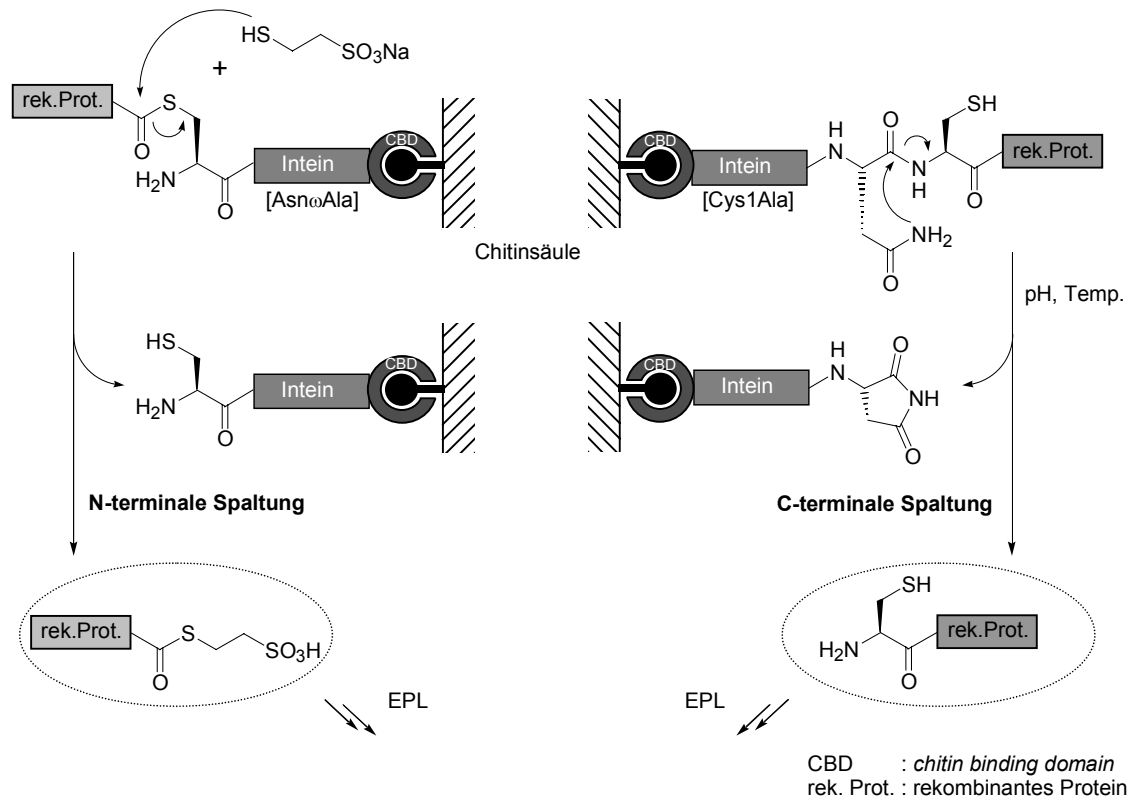
**Schema 7:** Mechanismus des Protein-*Splicings*.

#### 2.4.2.2. Die Expressed Protein Ligation (EPL)

Durch Fortschritte in der Proteinmanipulation können beide reaktiven Gruppen der NCL heute auch in *rekombinante* Proteine eingebaut werden. Dadurch ist die Verknüpfung aller Kombinationen aus synthetischen und rekombinanten Bausteinen über eine native Peptidbindung in einem semi-synthetischen Prozess möglich geworden.

Vor allem die Herstellung von Proteinthioestern konnte erst durch mutierte „einseitig“ *splicende* Inteine realisiert werden. Die Firma New England Biolabs entwickelte mit Hilfe derartiger Inteine kommerziell erhältliche Systeme für die Einführung der funktionellen Gruppen (Schema 8).<sup>[88;91]</sup> Grundprinzip ist die bakterielle Expression der Proteine als Fusionsprotein mit dem jeweilig „einseitig“ *splicenden* Intein und einer Chitinbindedomäne. Nach Anbindung an eine Chitinsäule lassen sich durch Induktion des *Splicings* die als Thio-

ester aktivierten oder mit einem N-terminalen Cystein modifizierten Proteine selektiv eluieren und können dann mit anderen Proteinen oder Peptiden in einer NCL zu semi-synthetischen Proteinen verknüpft werden. Definitionsgemäß wird dabei nur die Ligation C-terminal als *Expressed Protein Ligation* bezeichnet.<sup>[92]</sup> Andere Autoren fassen beide Prozesse als *Intein-Mediated Protein Ligation* (IPL) zusammen.<sup>[93]</sup>



**Schema 8:** Modifizierte *Splicing*-Systeme.

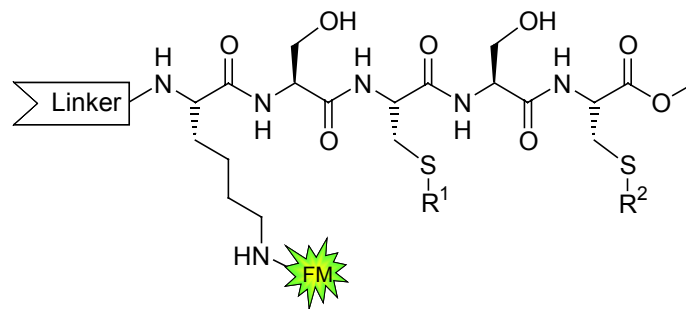
In der EPL wie auch in der NCL wird die Schnittstelle, wenn möglich, vor einem natürlich vorkommenden Cystein gewählt, so dass die native Aminosäuresequenz unverändert bleibt und die Einführung eines „Ligations“-Cysteins umgangen werden kann. In den anderen Fällen führten Erweiterungen der NCL zu abspltbaren Auxiliargruppen, die schließlich auch gute Ligrationsraten boten, jedoch für ihre Abspaltung stark saure Bedingungen benötigen.<sup>[94]</sup>

Auch die *traceless* Staudinger-Ligation wäre eine cysteinunabhängige Verknüpfungsmethode. Sie konnte bisher jedoch nur an der Synthese von Dipeptiden demonstriert werden.<sup>[95]</sup>

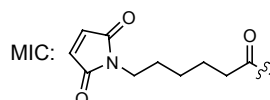
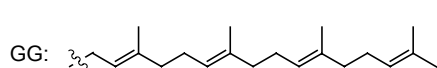
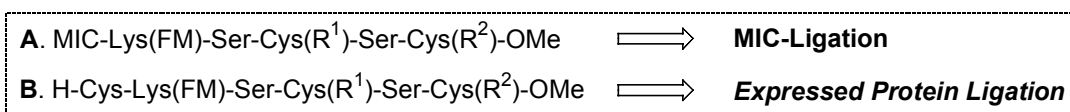
Die Kombination der strukturell flexiblen, aber größenlimitierten chemischen Peptidsynthese mit der rekombinanten DNA-Expression und die Verknüpfung zweier rekombinanter Proteine ermöglichte insgesamt den Einbau unterschiedlichster Modifikationen<sup>[96;97]</sup> oder unnatürlicher<sup>[98]</sup> Aminosäuren in Proteine und die Darstellung von cytotoxischen,<sup>[91b]</sup> cyclischen bzw. polymeren<sup>[91c]</sup> Proteinen.

### 3. Ziel der Arbeit

Das Interesse an der Aufklärung des vektoriellen intrazellulären Vesikeltransports nimmt stetig zu. Rab/Ypt-Proteine, die posttranslational im C-terminalen Bereich geranylgeranyliert werden und dadurch membrangebunden sind, üben hier als Regulatoren eine entscheidende Rolle aus. Motiviert durch den erfolgreichen Einsatz semi-synthetischer Ras-Proteine in Studien zur Signaltransduktion<sup>[81]</sup> sollte im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund ein flexibler molekularbiologisch nicht zu realisierender Zugang zu unterschiedlich geranylgeranylierten und zusätzlich fluoreszenzmarkierten, semi-synthetischen Rab-Proteinen gefunden werden. Zunächst sollte die Synthese modifizierter Peptide mit einer dem Rab7-C-Terminus angelehnten Sequenz ausgearbeitet werden, um diese anschließend über eine Linkergruppe mit ligationsfähigem bakteriell exprimierten Rab7-Protein zu verknüpfen (Schema 9).



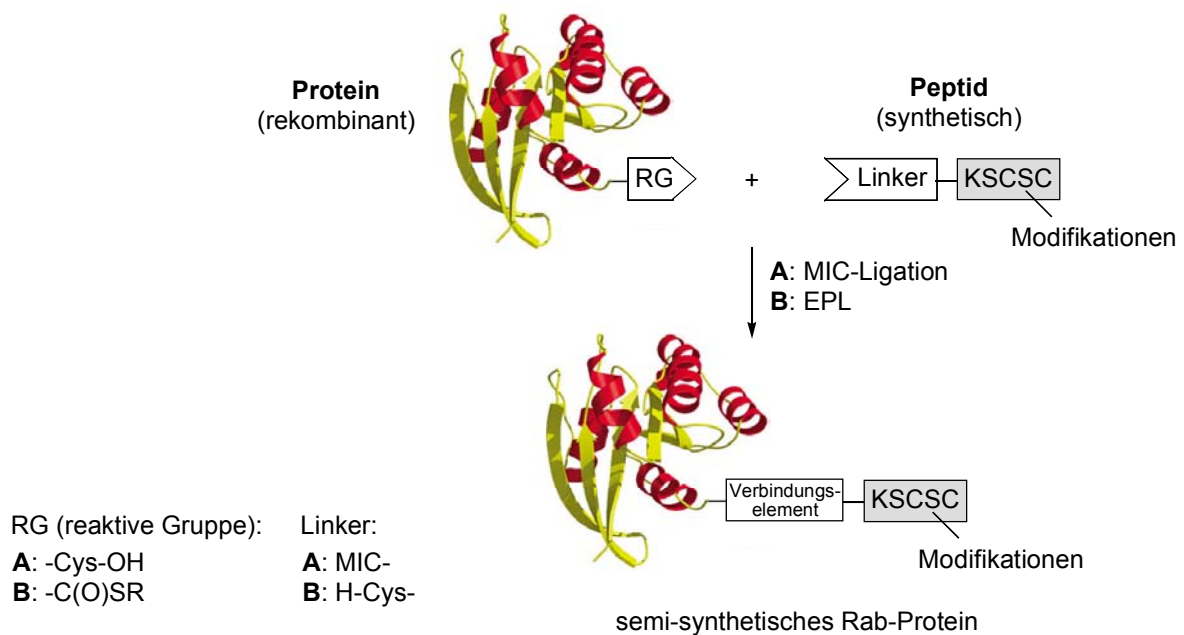
- |                                    |  |                               |
|------------------------------------|--|-------------------------------|
| 1. vollständig modifiziertes Rab7: | $R^1 = \text{GG}, R^2 = \text{GG}$     | doppelt geranylgeranyliert    |
| 2. Reaktionsintermediate:          | a) $R^1 = (\text{H}), R^2 = \text{GG}$ | C-terminal geranylgeranyliert |
|                                    | b) $R^1 = \text{GG}, R^2 = (\text{H})$ | intern geranylgeranyliert     |



**Schema 9:** Zielsequenzstrukturen der vorliegenden Arbeit.

Für anschließende biologische Studien, wie u.a. die Bestimmung kinetischer Daten mittels eines Fluoreszenzassays<sup>[43]</sup>, war es geplant, die an das entscheidende C-terminale SCSC-Motiv angrenzende native Glutaminsäure durch ein fluoreszenzmarkiertes Lysin zu ersetzen.

Als Ligationsmethode sollte zunächst die etablierte Maleinimidocaproyl(MIC)-vermittelte Verknüpfung Anwendung finden (Schema 10; A).<sup>[81]</sup> Diese Strategie, in der N-terminal maleinimidmodifizierte lipidierte Peptide von der Thiolgruppe eines C-terminalen Cysteins des Proteins angegriffen werden, hat sich zur Synthese lipidierter Ras-Proteine bewährt.<sup>[81]</sup> Aufgrund eventuell störender anderer Cysteine des Proteins, die ebenfalls an den MIC-Linker addieren können, sollte parallel erstmals die Verknüpfung lipidierter Peptide und Proteine über die *Expressed Protein Ligation* (EPL)<sup>[91b;92]</sup> durchgeführt werden (Schema 10; B). In diesem Fall wird unter Ausnutzung eines natürlichen *Splicing*-Systems der C-Terminus eines entsprechend verkürzten Rab-Proteins als Thioester aktiviert, der dann selektiv mit einem N-terminalen Cystein des modifizierten Peptids in einer zur *Native Chemical Ligation*<sup>[83]</sup> analogen Reaktionssequenz reagiert. Der Vorteil dieser Ligationsmethode ist zusätzlich die Ausbildung einer nativen Amidbindung zwischen Peptid und Protein.



**Schema 10:** Geplante Ligationen der synthetisierten Peptide mit verkürzten Rab7-Proteinen.

Mit den semi-synthetischen Rab-Proteinen stünden folgende wichtige Rab7-Proteine erstmals für biologische Tests zur Verfügung:

- (1) Das fluoreszenzmarkierte, vollständig modifizierte, d.h. doppelt geranylgeranylierte Rab7A202CE203K, dessen C-Terminus zusätzlich als Methylester vorliegt.<sup>[5a]</sup>

- 
- (2) Die fluoreszenzmarkierten, gezielt einfach geranylgeranylierten *prenylierbaren* Rab7-Intermediat-Analoga aus der von der Geranylgeranyltransferase II katalysierten doppelten Prenyltransferreaktion.

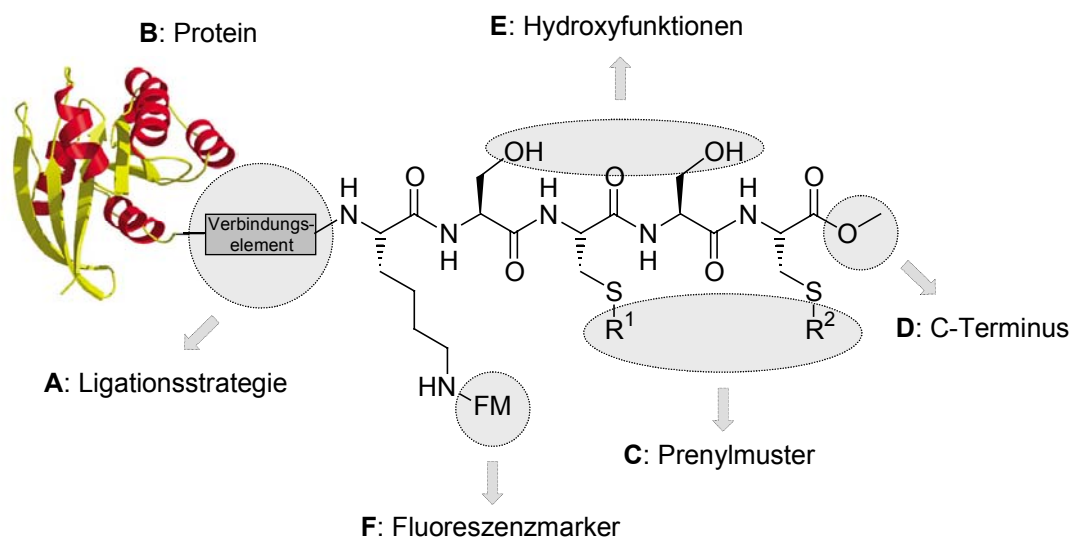
Die Verwendung der EPL zur Darstellung lipidierter Proteine ist bisher nicht angewandt worden. Über ihre Entwicklung wäre erstmalig ein flexibler Zugang zu unterschiedlichst modifizierten Lipoproteinen mit durchgängigem Peptidrückgrat ermöglicht, der weder über prokaryontische oder eukaryontische Expressionssysteme noch über enzymatische *in vitro*-Modifizierungen realisierbar ist.

## 4. Spezieller Teil

### 4.1. Allgemeiner Syntheseplan

Vollständig prozessierte Rab7-Proteine tragen zwei Geranylgeranylreste angebunden als Thioether an die Thiolgruppen der Cysteine <sup>205</sup>Cys und <sup>207</sup>Cys des C-terminalen CXC-Motivs. Zusätzlich liegt das <sup>207</sup>Cys als Methylester vor.<sup>[15;16]</sup>

Die semi-synthetischen Rab7-Proteine sollten dem nativen vollständig modifizierten Protein respektive den beiden möglichen Reaktionsintermediaten aus der Prenyltransferreaktion weitestgehend entsprechen. Änderungen im C-terminalen Bereich waren durch die Anbindung des Fluoreszenzmarkers wie auch durch die benötigten Linkergruppen bedingt. Der Aufbau von Penta- bzw. Hexapeptiden ermöglicht dabei die Platzierung dieser beiden Modifizierungen in ausreichender Distanz zum CXC-Motiv.



**Abbildung 5:** Generelles Schema der Zielproteine.

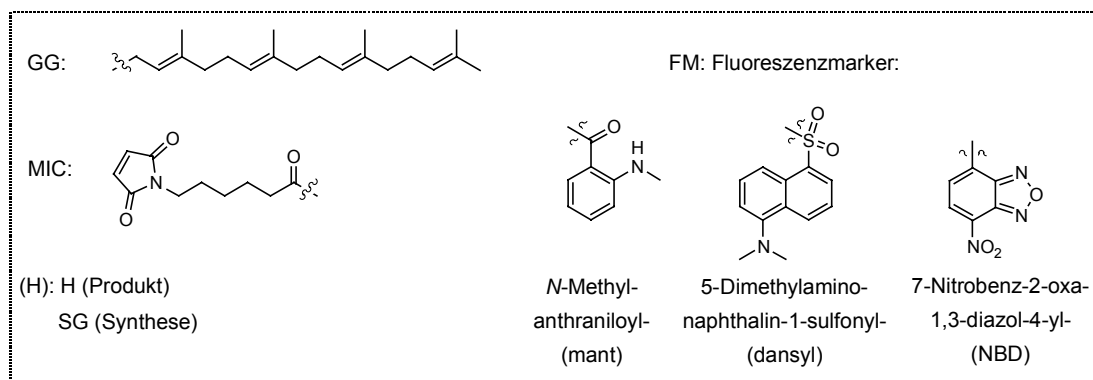
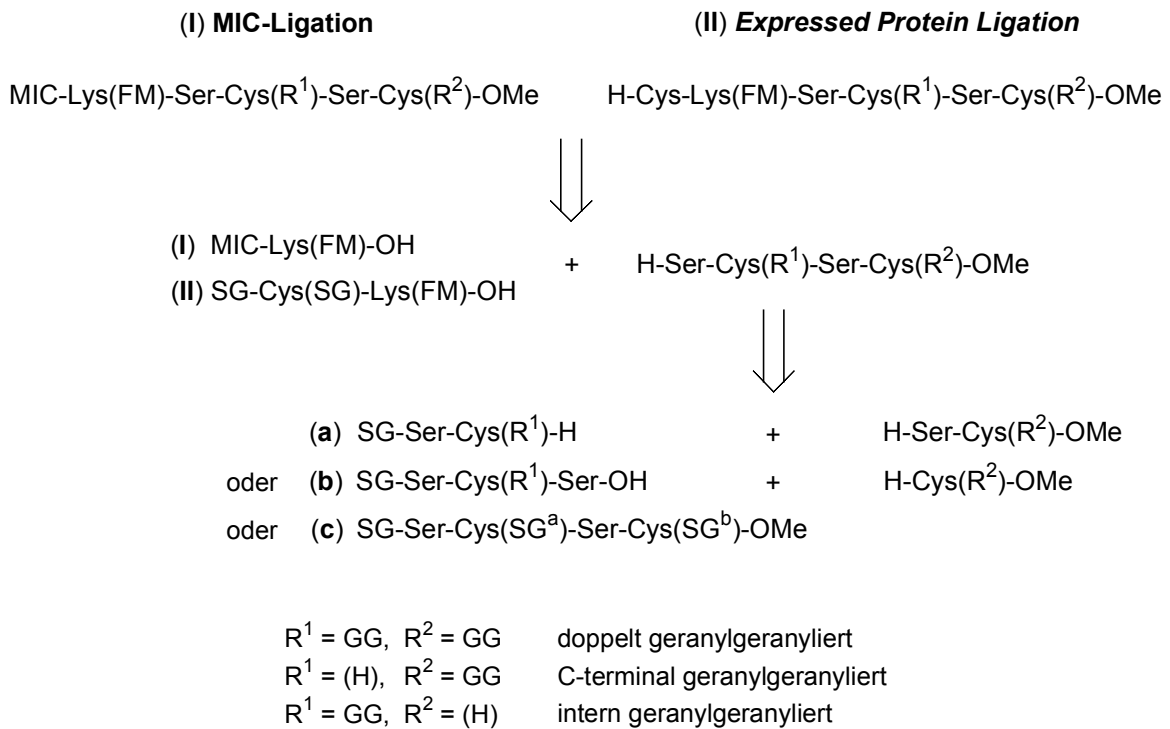
Sechs Punkte waren bei der Synthese besonders zu berücksichtigen:

- (A) Über die Wahl der N-terminalen Linkergruppe wird die Ligationsstrategie festgelegt. Im Fall der MIC-vermittelten Verknüpfung ist es geplant, N-terminal mit dem Linker acylierte Pentapeptide aufzubauen. Im Fall der EPL ersetzt ein „Ligations“-Cystein diesen Linker und substituiert dadurch in der Sequenz des Rab7 das native <sup>202</sup>Ala, da die nächste natürliche potenzielle Schnittstelle mit <sup>143</sup>Cys zu weit vom C-Terminus entfernt wäre. Es wurde erwartet, dass das „Ligations“-Cystein aufgrund seiner Lage nicht prenyliert wird und auch das Verhalten des semi-synthetischen Proteins nicht

- beeinflussen würde. Bedingt durch die Säurelabilität der Prenylreste schloss sich die EPL mit abspaltbaren Auxiliargruppen aus (s. 2.4.2.2).
- (B) Allgemein sollten C-terminal verkürzte Rab7-Proteine eingesetzt werden. Für die MIC-Ligation muss das Protein so modifiziert werden, dass es C-terminal mit einem Cystein endet. Im Fall der EPL wird der C-Terminus des verkürzten Rab7-Proteins über das IMPACT<sup>TM</sup>-System<sup>[91]</sup> der Firma New England Biolabs als Thioester aktiviert.
- (C) Das Prenylmuster bestimmt die Analogie der Peptid-Protein-Konjugate zum vollständig modifizierten Rab7 oder zu den möglichen einfach prenylierten Reaktionsintermediaten. Angesichts der möglichen Reaktion mit dem Linker, kann im Fall der MIC-Ligation das jeweilige prenylierbare Cystein erst nach der Ligation freigesetzt werden. Dies kann, ohne das Protein zu beeinträchtigen, durch den Einsatz des gemischten Disulfids, *S-tert*-Butylthiocystein, erreicht werden, das sich nach der Ligation reduktiv spalten lässt.<sup>[99]</sup>
- (D) Für eine einheitliche Synthesestrategie der aufzubauenden Peptide war es beabsichtigt, dass der C-Terminus der Proteine generell als Methylester vorliegt. Eine Auswirkung auf die Bindung der späteren semi-synthetischen Proteine an REP bzw. an die GGTase II wurde nicht erwartet, da die Stabilität des ternären Komplexes aus Rab, REP und GGTase II relativ unbeeinflusst vom C-terminalen Bereich der Rab-Proteine ist (s. 2.2.3).<sup>[43]</sup> Zudem scheint der GGTase II eine Bindungsstelle für das C-terminale Carboxylat zu fehlen, da hier im Vergleich zur Farnesyltransferase (FTase) das seitenkettenfunktionalitätslose <sup>108</sup>Gly das <sup>167</sup>Gln aus der FTase-Bindungstasche ersetzt, an dessen Seitenkette das C-terminale Carboxylat eines CaaX-Motivs über eine H-Brücke bindet.<sup>[47]</sup>
- (E) In der Peptidsynthese können die Hydroxylgruppen der Serine - unter Verwendung milder Kupplungsreagenzien<sup>[71a,c]</sup> - ungeschützt bleiben, auch wenn bei ihrer Kupplung häufig niedrigere Ausbeuten beobachtet wurden.<sup>[100]</sup> Dies ermöglicht die Vermeidung weiterer Schutzgruppen und Reaktionsschritte.
- (F) Als Fluoreszenzmarker sollten möglichst kompakte und damit wenig störende Gruppen wie der *N*-Methylantraniloyl(mant)-, der 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl(dansyl)- oder der 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl(NBD)-Rest eingesetzt werden (Schema 11), da so eine Beeinflussung des CXC-Motivs oder der Ligation umgangen werden kann. In allen Fällen bietet der Ersatz des nativen <sup>203</sup>Glu durch Lysin mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eine universelle stabile Anbindungstelle.

Im Vordergrund der Peptidsynthesestrategie stand neben dem flexiblen Austausch der Linkergruppe und der Fluoreszenzmarker - und damit in beiden Fällen der Möglichkeit einer

optimierten Auswahl - die effiziente Synthese in Bezug auf das einzusetzende Geranylgeraniol, das in vier Stufen aus Farnesylbromid hergestellt werden muss. Deshalb wurden die Zielsequenzen auf einen N-terminalen Baustein, der gleichzeitig die Ligationmethode und den Fluoreszenzmarker bestimmt, sowie ein C-terminales Tetrapeptid, mit dem das Prenylmuster eingeführt wird, zurückgeführt.



**Schema 11:** Allgemeiner Syntheseplan für die unterschiedlich modifizierte Rab7-Peptide.

Die N-terminalen Bausteine, d.h. das N<sup>(α)</sup>-maleinimidocaproylierte, fluoreszenzmarkierte L-Lysin für die MIC-Kupplung und das geschützte Dipeptid SG-Cys(SG)-Lys(FM)-OH für die EPL, sollten über die Modifizierung von L-Lysin bzw. zusätzlich der Kupplung mit einem entsprechend geschützten Cystein zugänglich sein.



Für den Aufbau der unterschiedlich prenylierten Tetrapeptide war geplant, von drei möglichen Strategien die effizienteste in Bezug auf das einzusetzende Geranylgeraniol zu bestimmen.

Grundsätzlich kann die Synthese über prenylierte Bausteine (Schema 11; Weg a,b), oder aber nach selektiver Deblockierung einzelner oder beider Thiolgruppen der Cysteine über die Geranylgeranylierung des gesamten Peptids erfolgen (Schema 11; Weg c).

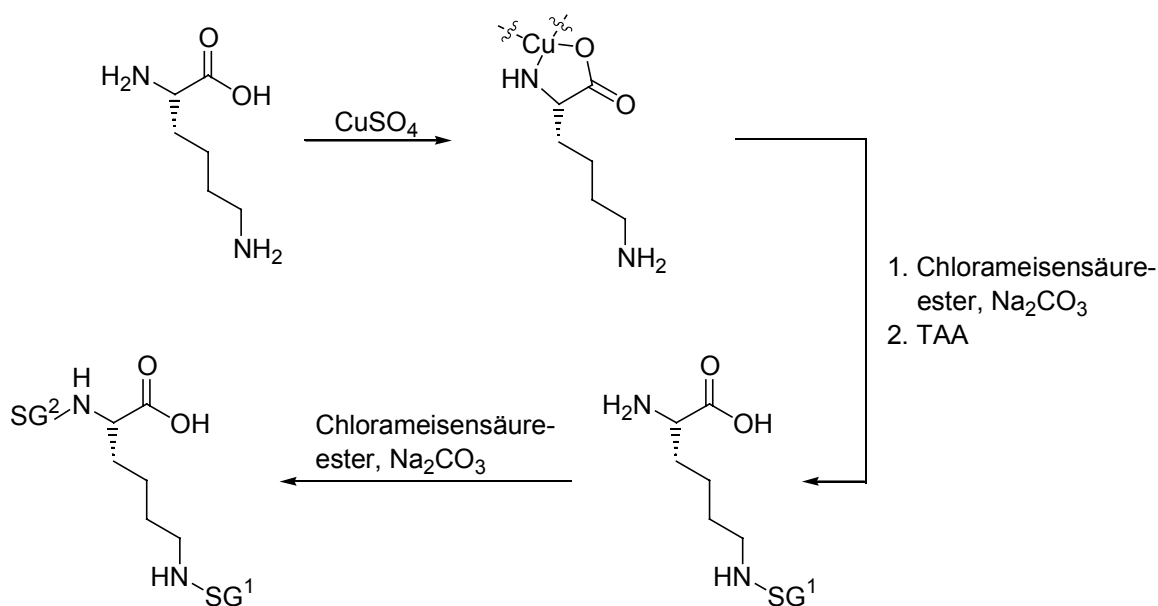
Im ersten Fall zeichnet sich die Kupplung von Dipeptiden zwar durch eine hohe Konvergenz aus (Schema 11; Weg a), allerdings ergeben sich bei N-terminal deblockierten Dipeptidmethylestern häufig Schwierigkeiten, da diese als freie Basen sehr leicht zu Diketopiperazinen cyclisieren.<sup>[101]</sup> Diese Cyclisierung kann durch die Wahl einer sauer abspaltbaren, N-terminalen Schutzgruppe und die damit verbundene Protonierung des N-Terminus verhindert werden. Ist das C-terminale Cystein geranylgeranyliert, dann ist dies aufgrund der Säurelabilität des Prenylrestes jedoch keine Alternative. Trotz unumgänglicher nicht-saurer Abspaltung konnten labile N-terminal freie Dipeptidmethylester in Einzelfällen jedoch durch zügige Aufarbeitung und schnellen Einsatz in einer Peptidkupplung verwendet werden.<sup>[100a]</sup> Je nach Syntheseproblem muss entschieden werden, ob der Aufbau ausgehend von prenylierten Synthesebausteinen über die Kupplung zweier Dipeptide oder eines Tripeptids mit einem modifizierten Cysteinmethylester (Schema 11; Weg b) erfolgen sollte.

Nach der Kupplung des N-terminalen Bausteins mit dem Tetrapeptid ist im Fall der MIC-modifizierten Pentapeptide die Synthese abgeschlossen, während im Fall der Hexapeptide für die EPL noch das N-terminale Cystein freigesetzt werden muss. Dies kann aufgrund der hohen Säurelabilität des Geranylgeranylrestes nicht wie in der Literatur häufig beschrieben unter stark sauren Bedingungen erfolgen,<sup>[102]</sup> was die nachfolgende Oxidation zum symmetrischen Disulfid unterbinden würde. Daher sollte anhand eines Testsystems zunächst eine optimierte Schutzgruppenstrategie entwickelt werden. Je nachdem, ob es sich als günstig erweisen würde, die Thiofunktion des N-terminalen und gegebenenfalls der anderen unprenylierten Cysteine vor oder während der Ligation freizusetzen, war es geplant, für die EPL entsprechend S-blockierte oder vollständig entschützte Peptide zu synthetisieren.

## 4.2. Synthese einfach geranylgeranylierter Rab7-Fragmente für die MIC-Ligation

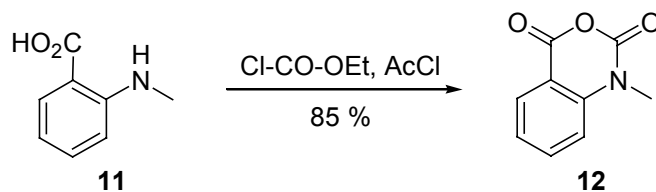
### 4.2.1. Darstellung MIC-modifizierter, fluoreszenzmarkierter L-Lysine

Anfangs wurden einfach geranylgeranylierte Peptide für die MIC-Ligation aufgebaut. Ihre Synthese begann mit der Modifizierung von L-Lysin. Zur Darstellung der Lysinbausteine wurde entweder von  $N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Cbz-Lys-OH) ausgegangen oder in einem allgemeinen Verfahren zuerst die beiden Aminofunktionen von L-Lysin differentiell blockiert. Dabei wird durch Komplexbildung mit Kupfer(II) die  $\alpha$ -Aminogruppe maskiert, so dass die Behandlung des resultierenden Kupfer(II)-Komplexes mit Chlorameisensäureestern eine selektive Carbamoylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe erlaubt (Schema 12).<sup>[103]</sup> Mittels Thioacetamid (TAA) als Sulfidquelle oder 8-Chinolinol<sup>[104]</sup> als konkurrierendem Chelatbildner wurde anschließend das  $\epsilon$ -NH-geschützte L-Lysin freigesetzt und stand für weitere Derivatisierungen zur Verfügung.



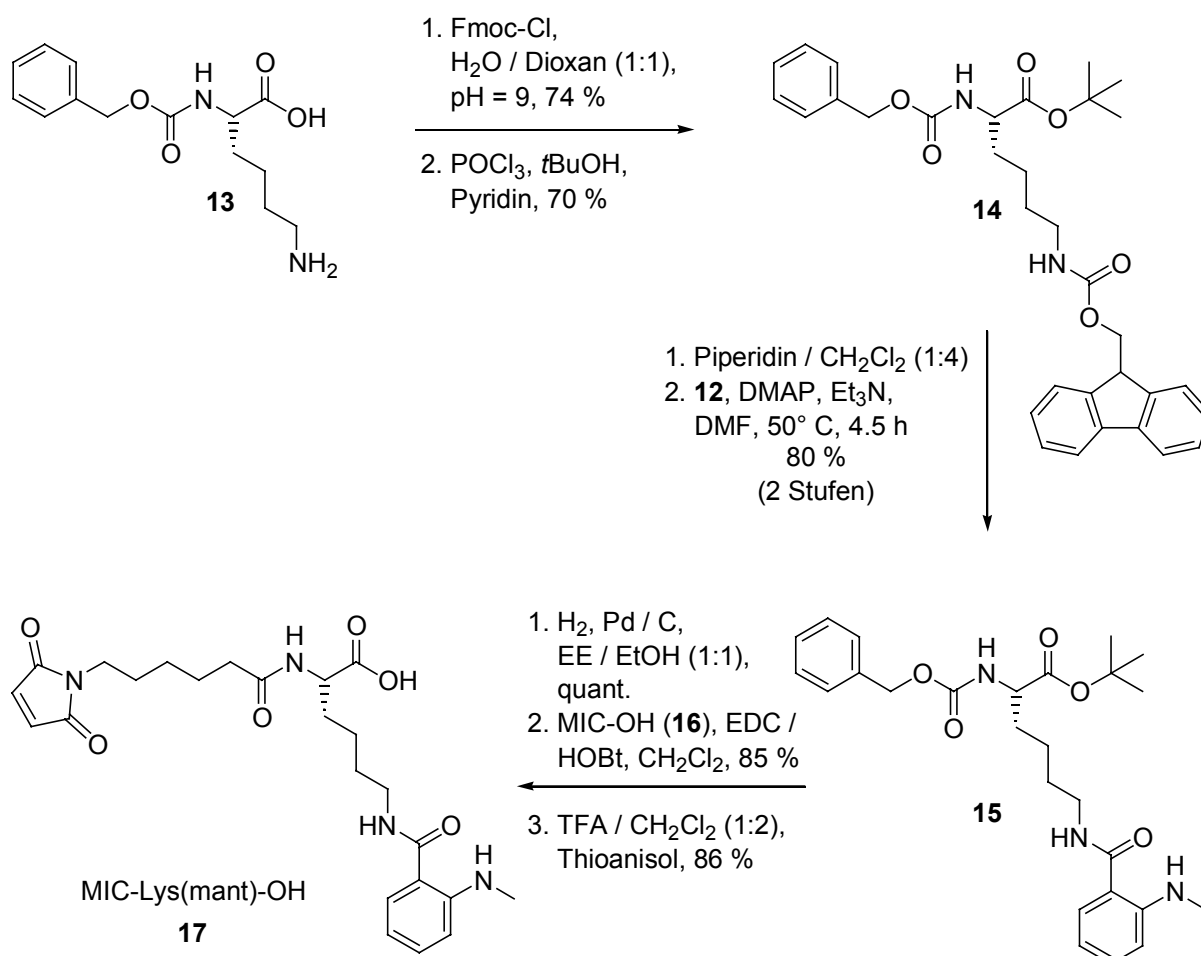
**Schema 12:** Verfahren zur differentiellen  $N$ -Derivatisierung von L-Lysin.

Zunächst war geplant, die kleinstmögliche und damit vermutlich am wenigsten störende fluoreszierende Gruppe, den  $N$ -Methylantraniloyl(mant)-Rest, einzusetzen. Für seine Einführung wird die Carboxylfunktion der  $N$ -Methylantranilsäure (**11**) in einem Schritt durch Überführung in das  $N$ -Methylisatosäureanhydrid (**12**) aktiviert,<sup>[105]</sup> das nach Umkristallisation aus Toluol in sehr reiner Form erhalten werden kann (Schema 13).



**Schema 13:** Synthese von *N*-Methylisatrosäureanhydrid (**12**) zur Einführung der mant-Gruppe.

Ausgehend von *N*<sup>(α)</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (**13**) wurde in zwei Schritten zunächst das vollständig geschützte Lysin **14** hergestellt (Schema 14). Dazu wurde mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid erst die *N*<sup>(ε)</sup>-Aminofunktion blockiert. Die anschließende Veresterung gelang durch Aktivierung mit Phosphorylchlorid in Gegenwart von Pyridin und Umsetzung mit *tert*-Butanol. Dabei musste eine Temperatur von unter 20° C eingehalten werden, um die Racemisierung des L-Lysins zu vermeiden.

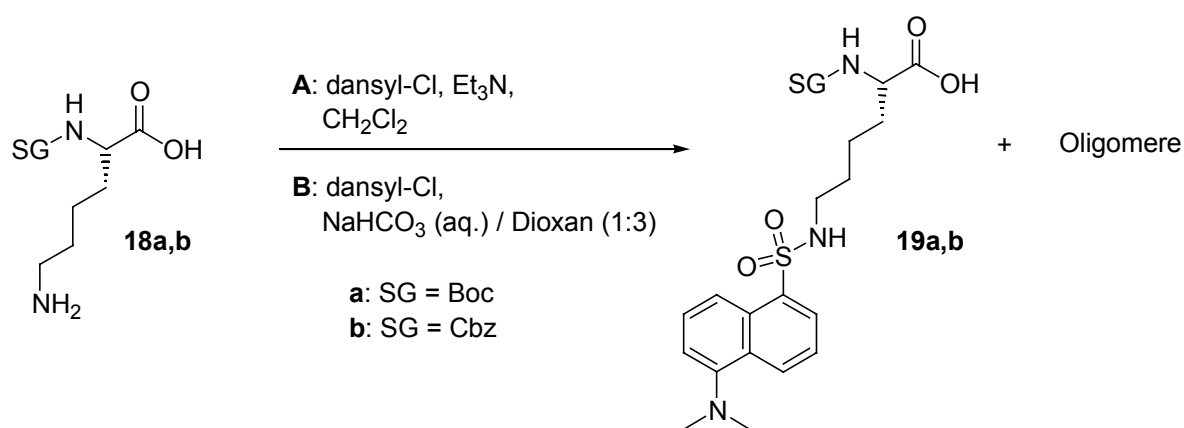


**Schema 14:** Darstellung des fluoreszierenden, MIC-modifizierten Lysins **17**.

Die basische Entschützung der  $\varepsilon$ -Aminofunktion und die anschließende direkte Umsetzung mit *N*-Methylisatosäureanhydrid (**12**) führte zum fluoreszenzmarkierten Lysin **15**. Die anfänglich mäßige Ausbeute von 40 % konnte durch die sehr langsame Zugabe einer Lösung des Anhydrids in Dimethylformamid bei 50° C auf das Doppelte gesteigert werden. Die hydrogenolytische Entfernung der Cbz-Schutzgruppe und die folgende *N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid(EDC)<sup>[109]</sup>/HOBT<sup>[65]</sup>-vermittelte Kondensation mit Maleinimidocapronsäure (**16**) lieferten nach abschließender säurekatalysierter Esterhydrolyse das linkerverknüpfte, fluoreszente Lysin **17** in durchgängig sehr hohen Ausbeuten.

Als weiterer Fluoreszenzmarker wurde der etwas größere 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl(dansyl)-Rest, der besonders für spätere Fluoreszenzassays wichtig war, an die  $\varepsilon$ -Aminofunktion des L-Lysins angebunden. Mit *N*<sup>( $\varepsilon$ )</sup>-Dansyl-L-lysin sollte dabei ein universell einsetzbarer Baustein synthetisiert werden, der auch in anderen Synthesen verwendet werden kann.

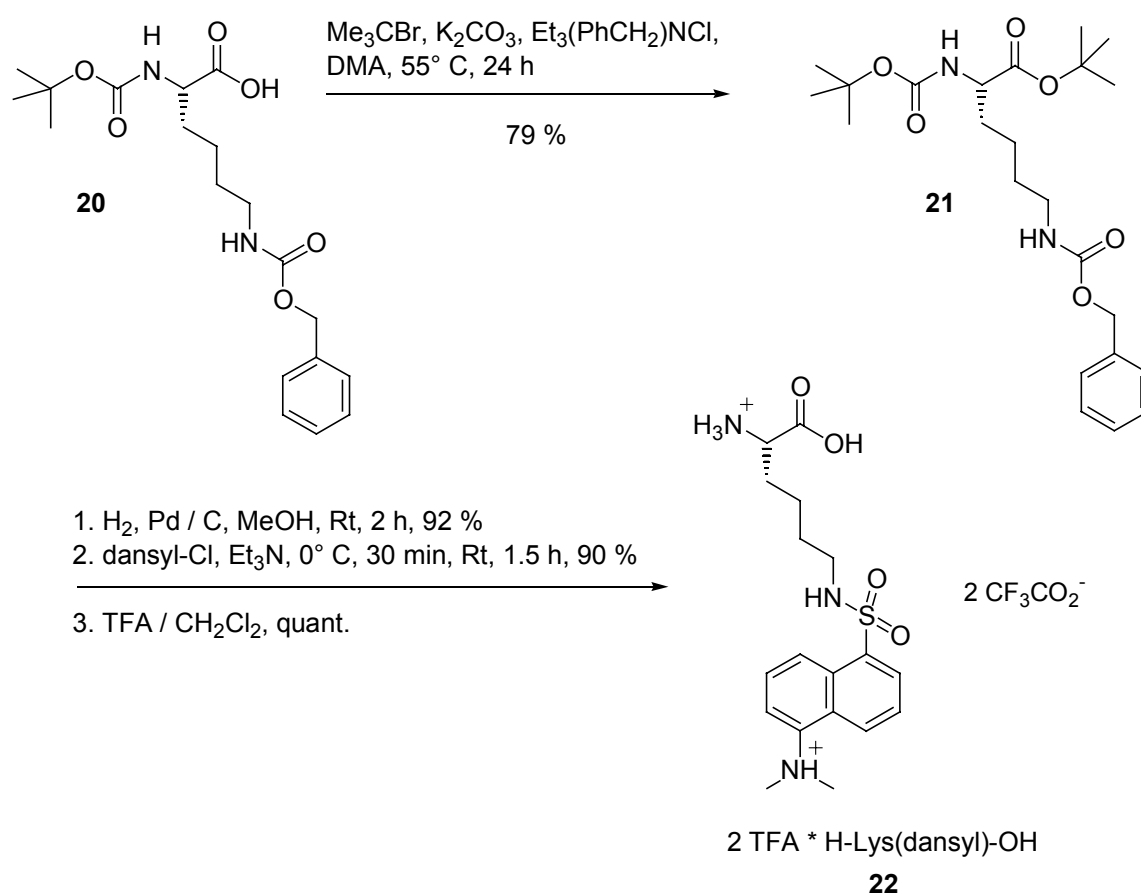
Ausgehend von *N*<sup>( $\omega$ )</sup>-geschütztem L-Lysin sind in der Literatur zwei Beispiele zur Synthese des dansylierten Bausteins bekannt.<sup>[106]</sup> In analogen Reaktionen konnte auch nach Variation des Lösungsmittels und der z.T. ausführlich angegebenen Reaktionsbedingungen die Bildung von Oligomeren über die Aktivierung der Carboxylfunktion des Lysins durch Dansylchlorid nicht vollständig verhindert werden. Diese waren aufgrund ihrer sehr ähnlichen Polarität vom Produkt nicht zu trennen (Schema 15).



**Schema 15:** Versuche zur Synthese von *N*<sup>( $\varepsilon$ )</sup>-dansyliertem, N-terminal-blockiertem L-Lysin.

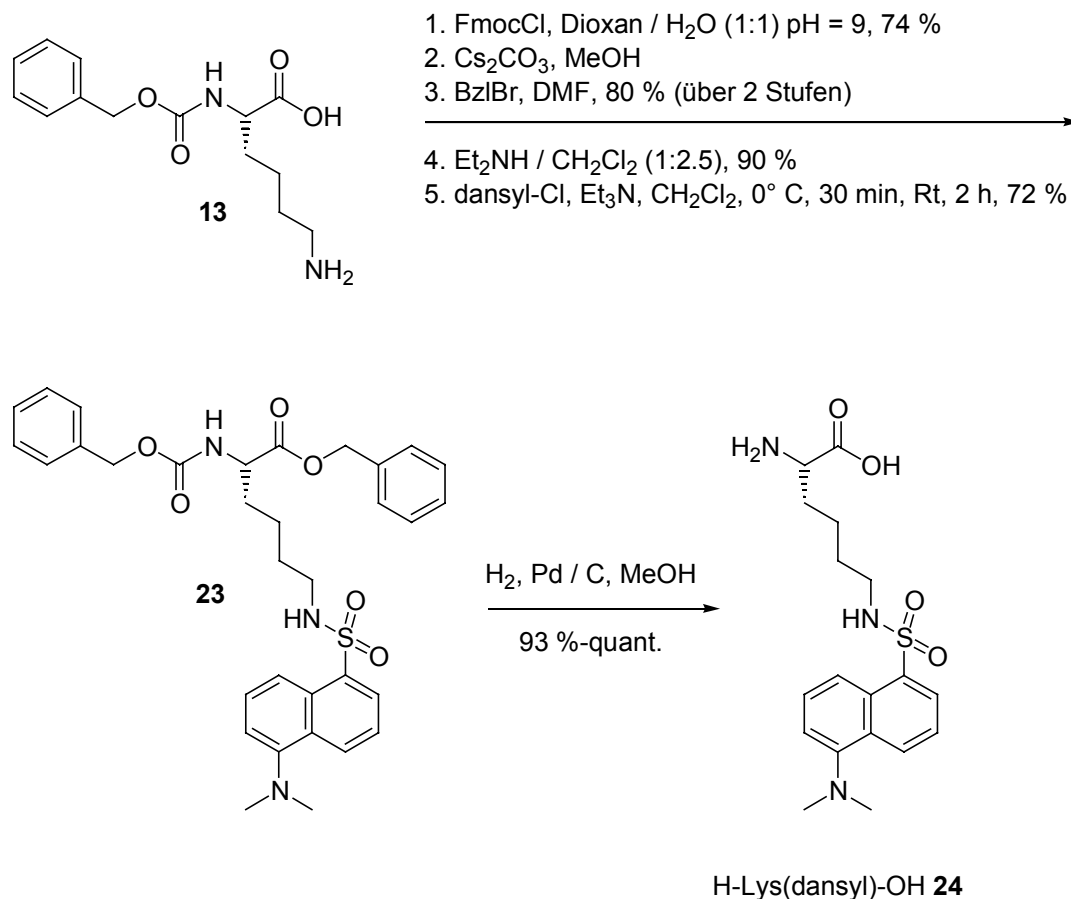
Angesichts der Notwendigkeit einer C-terminalen Schutzgruppe wurden zwei Synthesen mit gleichzeitiger Abspaltung der N- und C-terminalen Schutzgruppen im letzten Schritt zur Darstellung von *N*<sup>( $\varepsilon$ )</sup>-Dansyl-L-lysin entwickelt.

Da häufig C- und N-terminal freie Aminosäuren im protonierten Zustand eine größere Löslichkeit aufweisen, wurde in einer ersten Synthese das Trifluoracetat-Salz des  $N^{(\epsilon)}$ -Dansyl-L-lysins generiert (Schema 16). Dabei wurde zunächst das über Kupfer(II)-Komplexierung erhaltene Boc-Lys(Cbz)-OH (**20**) mit *tert*-Butylbromid zum vollständig blockierten Lysin **21** umgesetzt. Hydrogenolytische Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe, anschließende Reaktion des  $N^{(\epsilon)}$ -freien L-Lysins mit Dansylchlorid und abschließende saure Entschützung führten in durchgehend hohen Ausbeuten zum fluoreszenzmarkierten L-Lysin-hydrotrifluoracetat (**22**).



**Schema 16:** Synthese von  $N^{(\epsilon)}$ -Dansyl-L-lysine-hydrotrifluoracetat (**22**).

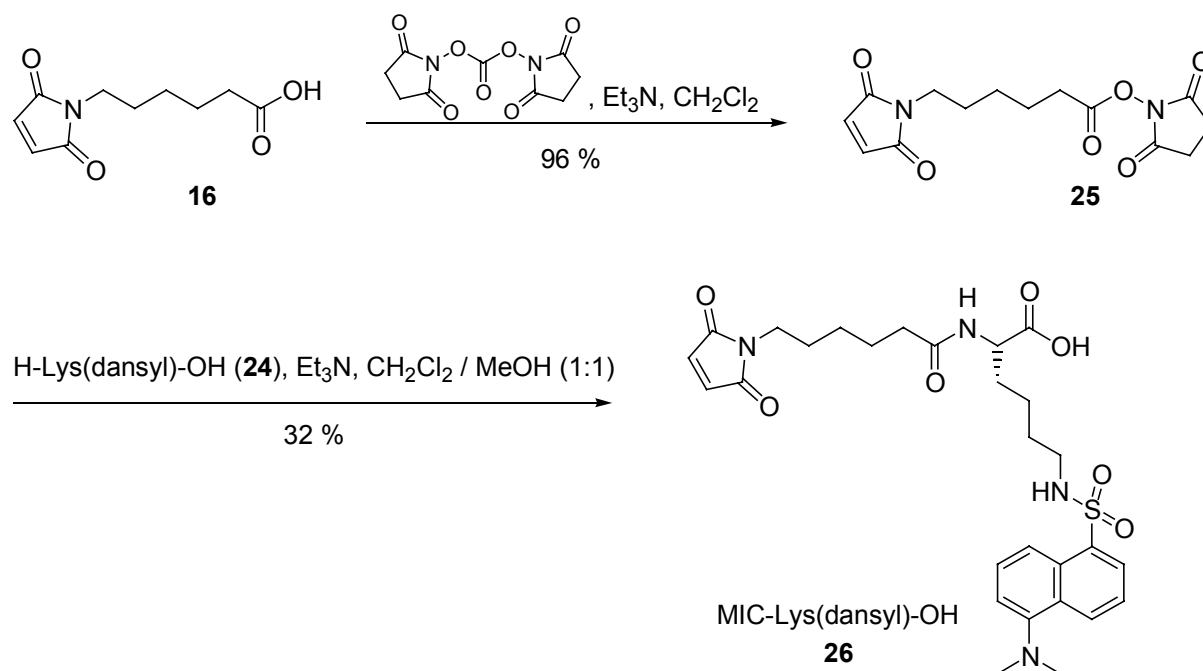
Da sich das Trifluoracetat **22** jedoch eher durch eine besonders schlechte Löslichkeit auszeichnete, wurde in einer zweiten Synthese in fünf Schritten der neutrale Baustein,  $N^{(\epsilon)}$ -Dansyl-L-lysine, ausgehend von Cbz-Lys-OH (**13**) dargestellt (Schema 17).



**Schema 17:** Synthese von  $N^{\epsilon}$ -Dansyl-L-lysin (**24**).

Zunächst wurde durch Reaktion mit Fluorenylmethoxycarbonylchlorid und nachfolgender Veresterung mit Benzylbromid das vollständig blockierte L-Lysin hergestellt. Die selektive Entschützung der  $\epsilon$ -Aminofunktion und die Reaktion mit Dansylchlorid lieferten in hohen Ausbeuten das fluoreszenzmarkierte Lysin **23**, und die abschließende hydrogenolytische Deblockierung führte dann quantitativ zum  $N^{\epsilon}$ -Dansyl-L-lysin (**24**).

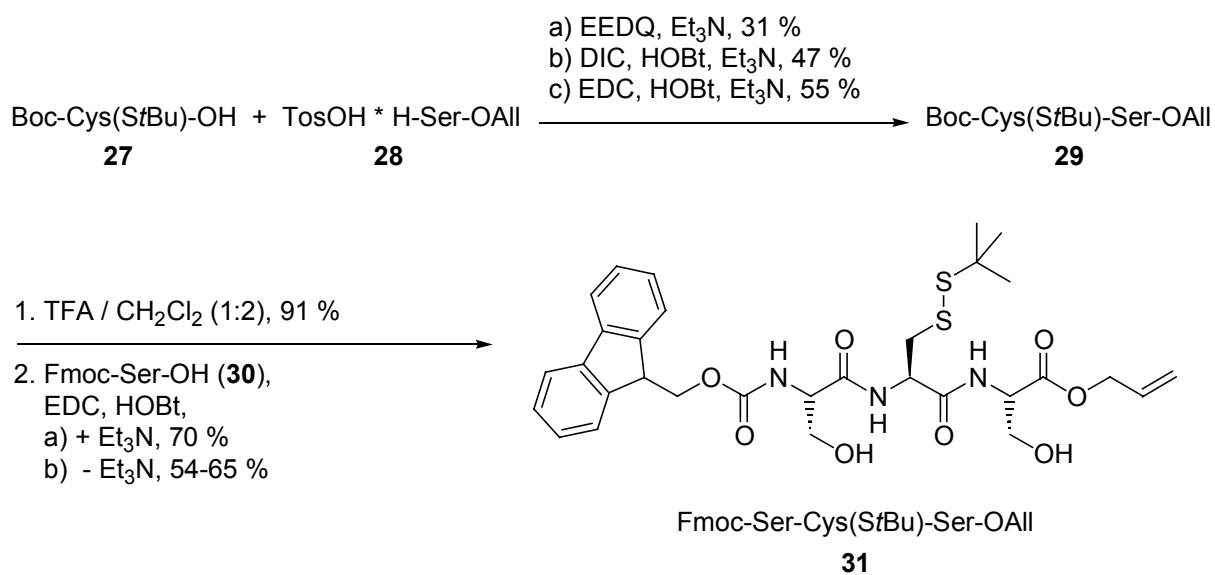
Ausgehend von  $N^{\epsilon}$ -Dansyl-L-lysin (**24**) erfolgte die Synthese des N-terminal MIC-modifizierten Lysinbausteins über die Hydroxysuccinimidmethode (Schema 18).<sup>[107]</sup> Die einfache carbodiimidvermittelte Aktivierung der Maleinimidocapronsäure gelang jedoch nicht. Erst der Einsatz von Disuccinimidylcarbonat führte zum Aktivester **25**. Die anschließende Kondensation mit  $N^{\epsilon}$ -Dansyl-L-lysin (**24**) verlief zwar mit geringer Ausbeute, lieferte aber genügend Material für die spätere Synthese des Zielpeptids.



**Schema 18:** Synthese des N-terminalen Bausteins **26** über die Hydroxysuccinimidmethode.

#### 4.2.2. Darstellung des C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptids

Die Synthese des C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptids begann mit der Darstellung des Tripeptids **31**, da sich ein sequentieller Aufbau beginnend mit geranylgeranyliertem Cysteinmethylester aus synthetischen Gründen ausschloss. Über die Kondensation von Boc-S-tert-butylthio-L-Cystein **27** und L-Serinallylester-hydrotosylat **28** wurde daher zunächst das Dipeptid **29** hergestellt (Schema 19). Diese Kondensation verlief, wie allgemein von

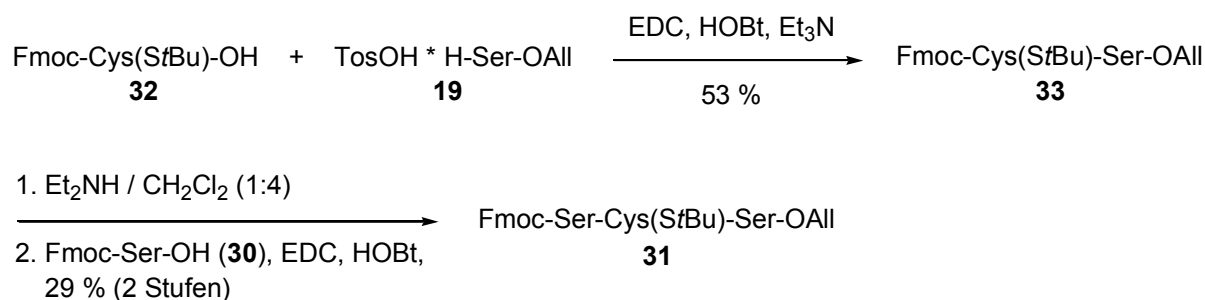


**Schema 19:** Synthese des Tripeptids **31**.

Kupplungen N-terminal freier Serinbausteine mit ungeschützter Hydroxyfunktion bekannt,<sup>[100]</sup> mit nur mäßigen Ausbeuten, unabhängig davon, ob als Kupplungsreagenzien 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ)<sup>[108]</sup>, Diisopropylcarbodiimid (DIC)/HOBt oder EDC/HOBt verwendet wurde. Vom Einsatz stärker aktivierender Kupplungsreagenzien wurde abgesehen, um die Reaktion der freien Hydroxyfunktion des Serins zum Esterderivat zu vermeiden.

Die säurekatalysierte Entschützung von **29**, die nicht zuletzt aufgrund ähnlicher Abspaltungen als unproblematisch erwartet wurde,<sup>[71a;110]</sup> verlief auch bei verringerter Säurekonzentration nicht ohne Bildung eines nicht weiter charakterisierten Nebenprodukts. Mit 0.1 % Wasser anstelle von Thioanisol als Fänger und einem Verhältnis von Lösungsmittel zu Trifluoressigsäure von 10:1 konnte seine Bildung unterdrückt werden. Andererseits ließ sich das Trifluoressigsäure auch nach der Reaktion ohne Fänger über Flashchromatographie reinigen. Zügiger Einsatz des Dipeptids in der folgenden Kondensation mit Fmoc-Ser-OH (**30**) lieferte das Tripeptid **31** in guten Ausbeuten.

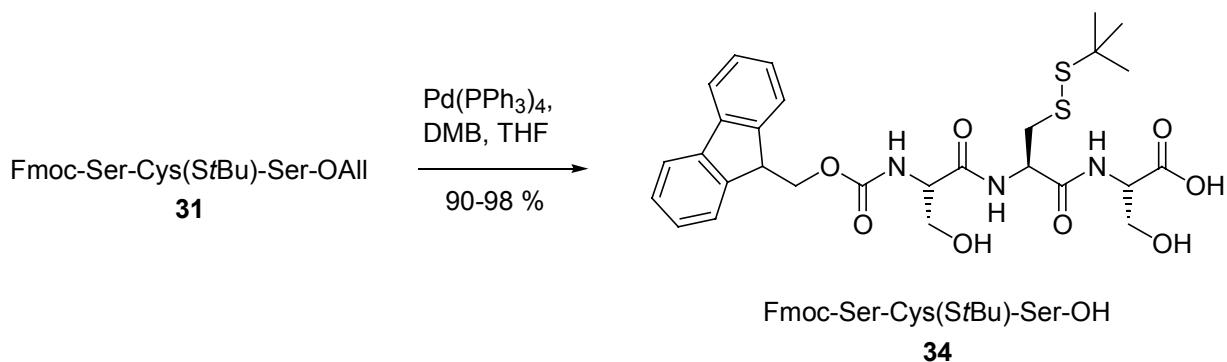
Ein alternativer Weg über das Fmoc-geschützte Dipeptid **33** erwies sich mit einer Gesamtausbeute von 11 % über drei Schritte gegenüber dem ersten Syntheseweg (29 % Gesamtausbeute), nicht zuletzt aufgrund der auch bei vorsichtiger Reaktionsführung nicht vollständig zu vermeidenden Diketopiperazinbildung als unterlegen (Schema 20).



**Schema 20:** Alternative Syntheseroute zum Tripeptid **31**.

Ein sich anschließender Palladium(0)-katalysierter Allyltransfer von **31** auf *N,N*-Dimethylbarbitursäure (DMB)<sup>[111]</sup> als Allylakzeptor führte in nahezu quantitativen Ausbeuten zur Bildung des C-terminal freien Tripeptids **34** (Schema 21).

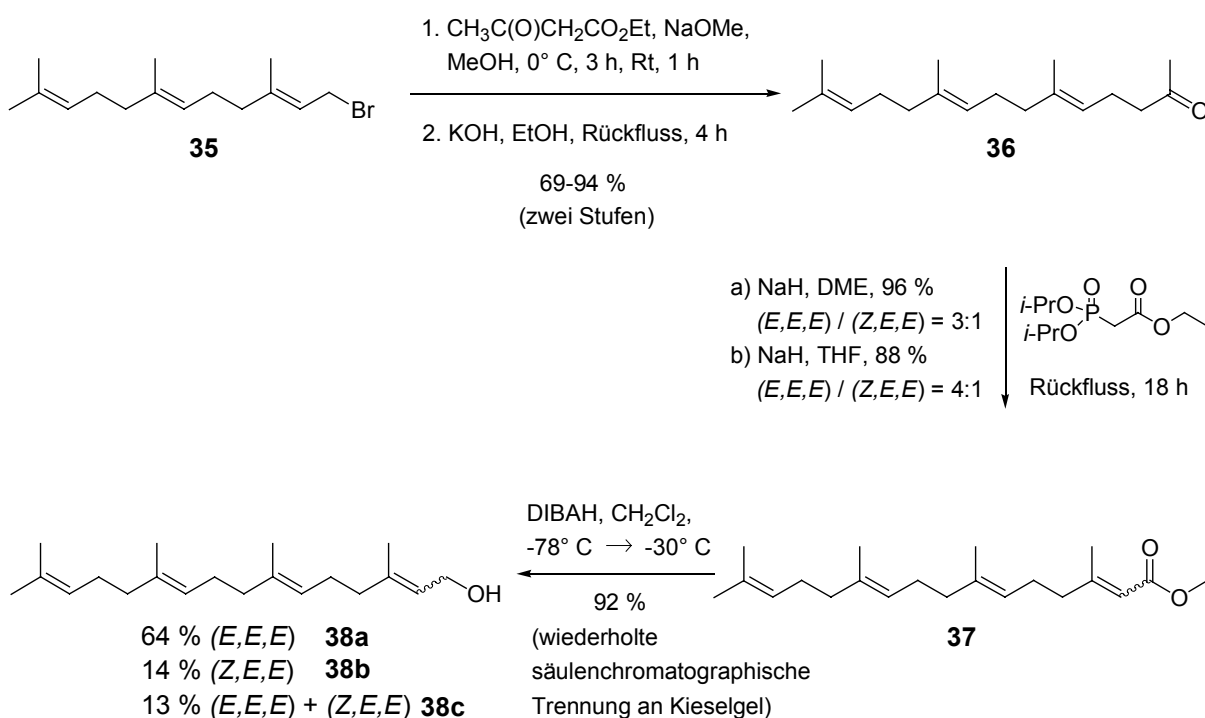




**Schema 21:** Allylabspaltung vom Tripeptid **31**.

Das C-terminal entschützte Tripeptid **34** sollte nachfolgend mit geranylgeranyliertem L-Cysteinmethylester kondensiert werden. Dessen Darstellung erforderte zunächst die Synthese von all-*trans*-Geranylgeraniol.

In der Literatur sind für den stereoselektiven Aufbau dieses C<sub>20</sub>-Isoprens eine Vielzahl von Methoden beschrieben.<sup>[112]</sup> Die Synthese ausgehend von kommerziell erhältlichem all-*trans*-Farnesylbromid (**35**) versprach die geringste Anzahl an Reaktionsschritten (Schema 22).<sup>[113]</sup>



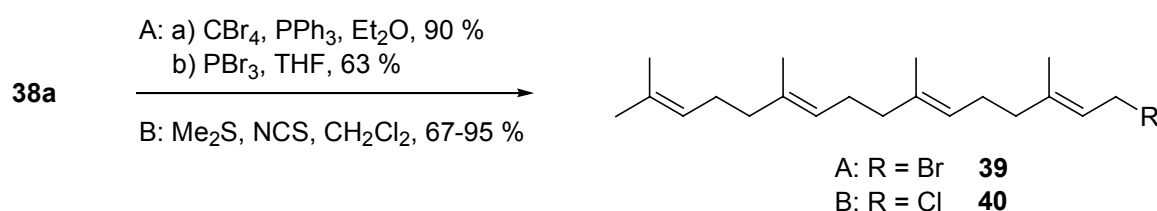
**Schema 22:** Synthese von all-*trans*-Geranylgeraniol (**38a**).

All-*trans*-Farnesylbromid (**35**) wurde zunächst mit Acetessigsäureethylester unter basischen Bedingungen umgesetzt. Die anschließende Verseifung und Decarboxylierung des

Rohprodukts führte in hoher Ausbeute zu all-*trans*-Farnesylaceton (**36**). Die Einführung der vierten Doppelbindung erfolgte über eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion, die mit Diisopropylethylphosphonoacetat in 1,2-Dimethoxyethan optimal verlaufen soll.<sup>[112d]</sup> Das gewünschte all-*trans*-Isomer wurde zwar tatsächlich im hohen Überschuss gewonnen, allerdings konnte das in der Literatur angegebene Verhältnis des (*E,E,E*)-Isomeren zum (*Z,E,E*)-Isomeren von 10:1 auch nach Wechsel des Lösungsmittels zu Tetrahydrofuran bei weitem nicht erreicht werden. Die Trennung der Isomeren durch wiederholte Flashchromatographie erfolgte dann nach Reduktion der Ester mit Diisobutylaluminiumhydrid zu den Alkoholen, die in sehr hohen Ausbeuten gelang.

Die Prenylierung von L-Cystein erfordert die Aktivierung des Prenols durch die Überführung des Alkohols in ein Halogenid. In fast allen Fällen wird das entsprechende Prenylbromid eingesetzt (s. 2.3.1).<sup>[63]</sup> Die Darstellung des Geranylgeranyl bromids gelang in einer Appel-Reaktion durch Tetrabrommethan und Triphenylphosphin oder durch Reaktion des Alkohols mit Phosphortribromid (Schema 23). Das Geranylgeranyl bromid (**39**) ist verhältnismäßig empfindlich und zersetzt sich sowohl auf der Dünnschichtchromatographieplatte als auch nach kurzer Zeit im NMR. Die Instabilität mancher Prenylbromide und ein daraus erschwertes Einsatz in Alkylierungsreaktionen ist literaturbekannt.<sup>[71d]</sup> Analog zu einem Prenylierungsverfahren nach POULTER et al. sollte daher stattdessen das wesentlich stabilere Prenylchlorid eingesetzt werden.<sup>[114]</sup>

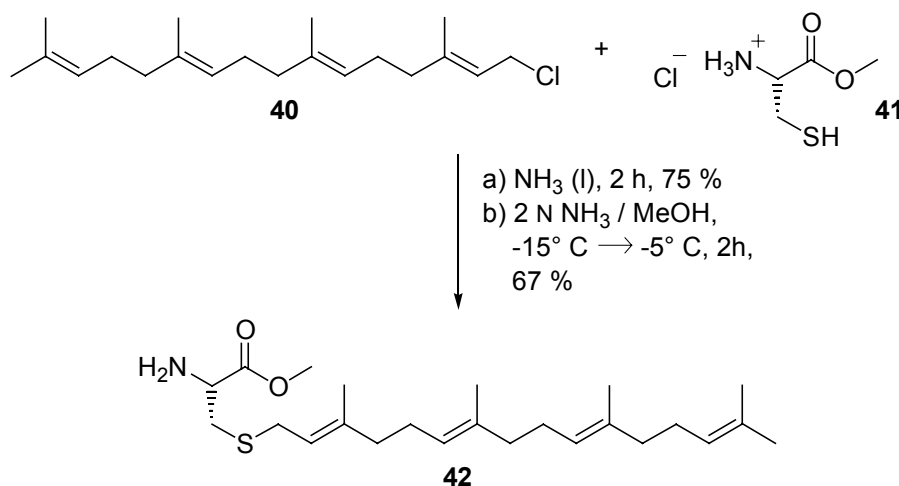
Das all-*trans*-Geranylgeranylchlorid konnte in einer Corey-Kim-Reaktion durch Umsetzung von **38a** mit *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid<sup>[115]</sup> in sehr hohen Ausbeuten hergestellt werden, deren exakte Bestimmung allerdings durch die relativ hohe Flüchtigkeit des Prenylchlorids erschwert wird (Schema 23).



**Schema 23:** Darstellung von all-*trans*-Geranylgeranyl bromid bzw. -chlorid (**39** bzw. **40**).

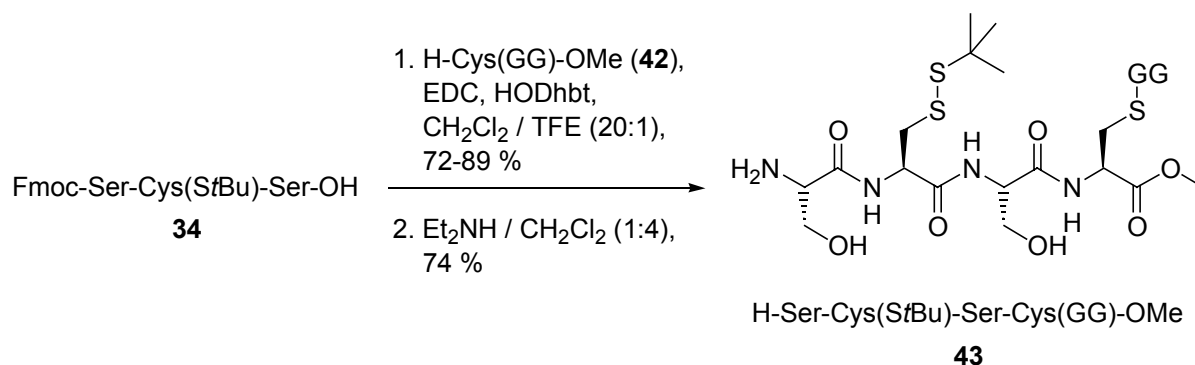
Der geranylgeranylierte L-Cysteinmethylester **42** wurde zunächst durch Umsetzung des Prenylchlorids mit L-Cysteinmethylester-hydrochlorid (**41**) in flüssigem Ammoniak generiert

(Schema 24).<sup>[114]</sup> Auch unter Einsatz einer 2 N Lösung von Ammoniak in Methanol zur Vereinfachung der Reaktionsführung verlief die Alkylierung bei tiefen Temperaturen und einem leichten Überschuss an **41** mit guter Selektivität am nukleophileren Schwefelatom und wurde daher anschließend bevorzugt angewandt.



**Schema 24:** Synthese des geranylgeranylierten Cysteinmethylesters **42**.

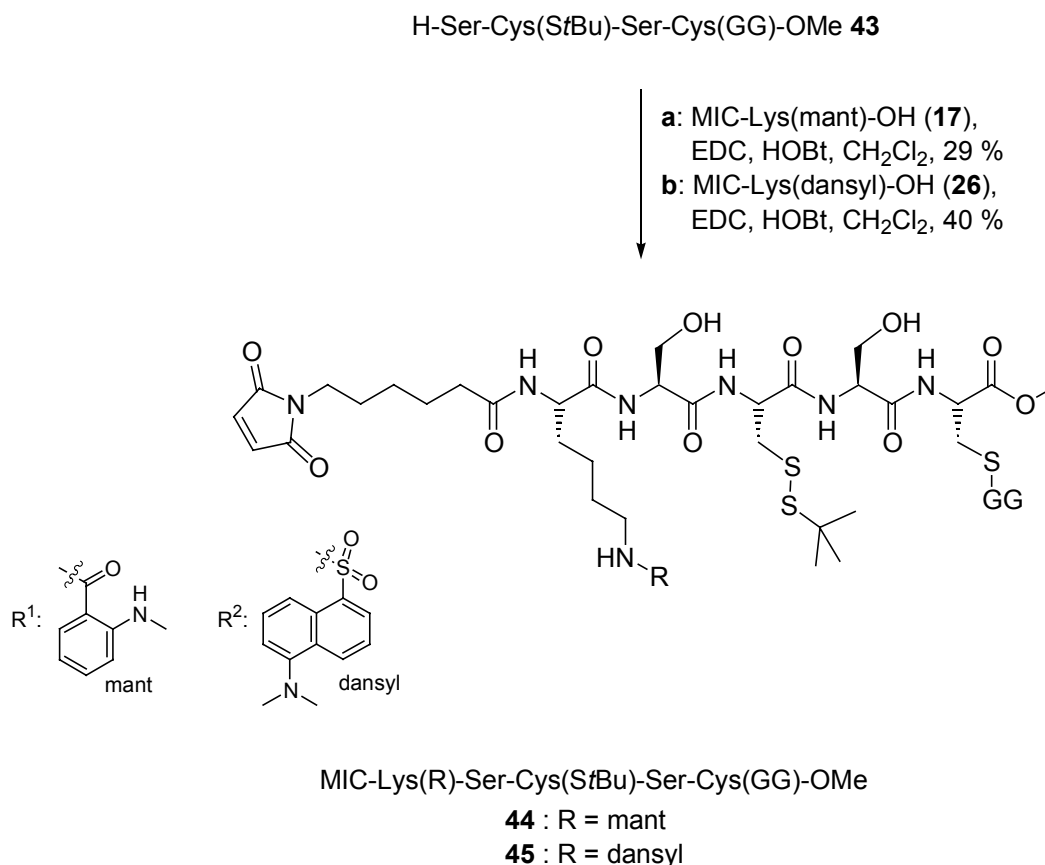
Die Blockkupplung des geranylgeranylierten Cysteinmethylesters **42** mit dem Tripeptid **34** wurde zur Vermeidung der Epimerisierung EDC/HODhbt-vermittelt durchgeführt,<sup>[67]</sup> wobei zur besseren Löslichkeit Trifluorethanol zugesetzt wurde (Schema 25).<sup>[70]</sup> Das geranylgeranylierte N-terminal geschützte Tetrapeptid, das in unpolaren Lösungsmitteln sehr stark zur Gelbildung neigt, war so in durchgängig hohen Ausbeuten zugänglich. Die anschließende basische Deblockierung verlief trotz der erforderlichen säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel und dabei auftretender Löslichkeitsschwierigkeiten in zufriedenstellender Ausbeute.



**Schema 25:** Darstellung des C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptids **43**.

### 4.2.3. Abschließende Synthese der MIC-modifizierten, C-terminal prenylierten, fluoreszenzmarkierten Pentapeptide

Die EDC/HOBt-vermittelte Kondensation des Tetrapeptids **43** mit den MIC-modifizierten, mant- und dansylmarkierten Lysinen **17** und **26** führte abschließend zu den C-terminal geranylgeranylierten Pentapeptiden **44** und **45** (Schema 26).

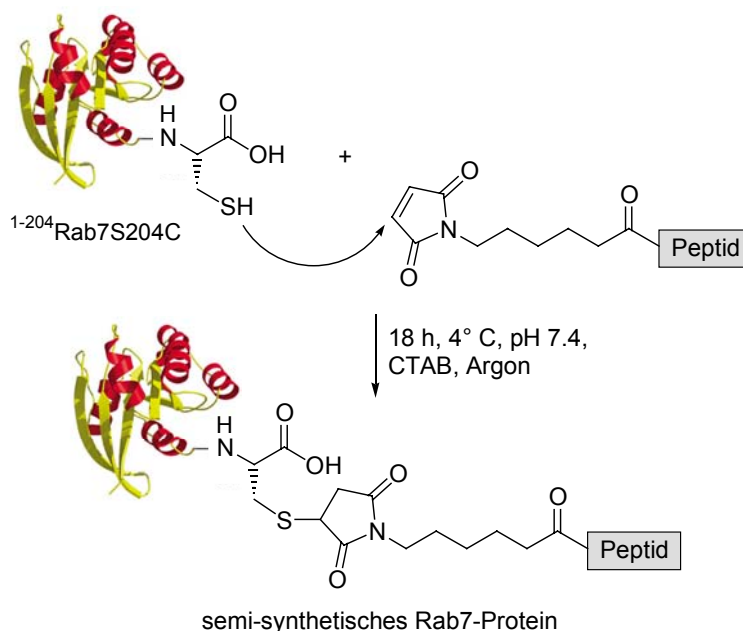


**Schema 26:** Abschließende Synthese der fluoreszenzmarkierten Zielpeptide **44** und **45**.

In verschiedenen anderen Arbeiten hatte sich zwischenzeitlich herausgestellt, dass *N*-Methylantranilsäure als Fluoreszenzmarker nicht die gewünschten optischen Eigenschaften aufweist.<sup>[116]</sup> So zeigt der Fluorophor eine ähnliche Fluoreszenz wie NADH (Nicotinamidadenindinucleotid) und ist damit für zelluläre Experimente nicht geeignet. Im Folgenden wurde daher nur das dansylmarkierte Pentapeptid **45** in der MIC-Ligation eingesetzt.

### 4.3 Kupplung des MIC-modifizierten, dansylmarkierten Lipopeptids an ein verkürztes Rab7-Protein

Für die MIC-Ligation wurde eine Rab7-Mutante von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund nach Standardmethoden hergestellt.<sup>[117]</sup> Das resultierende Protein, <sup>1-204</sup>Rab7S204C, ist C-terminal um drei Aminosäuren verkürzt, und die so C-terminale Aminosäure <sup>204</sup>Ser ist gegen ein für die Ligation erforderliches Cystein ausgetauscht. Ein natürlich vorkommendes Cystein konnte aufgrund der Sequenz des Rab7-Proteins für die Ligation nicht ausgenutzt werden. Die Sulfhydrylgruppe der Seitenkette dieses, aber auch anderer Cysteine, addiert im pH-Bereich von 6.5-7.5 selektiv an den Maleinimidlinker des Peptids (Schema 27).<sup>[118]</sup> Röntgenkristallographischen Daten zufolge liegen die neben dem C-terminal artifiziell eingefügten <sup>204</sup>Cys im verkürzten Rab7-Protein enthaltenden Cysteine an den Positionen 83, 84 und 143 im Inneren des Proteins und sollten daher für maleinimidocaproylmarkierte Lipopeptide wesentlich schwerer zugänglich sein als das C-terminale <sup>204</sup>Cys.<sup>[119]</sup> Unterstützt wird diese Annahme auch dadurch, dass in vorausgehenden Experimenten zur Fluoreszenzmarkierung unmodifizierter Rab-Proteine diese internen Cysteine nicht markiert werden konnten.<sup>[43]</sup>

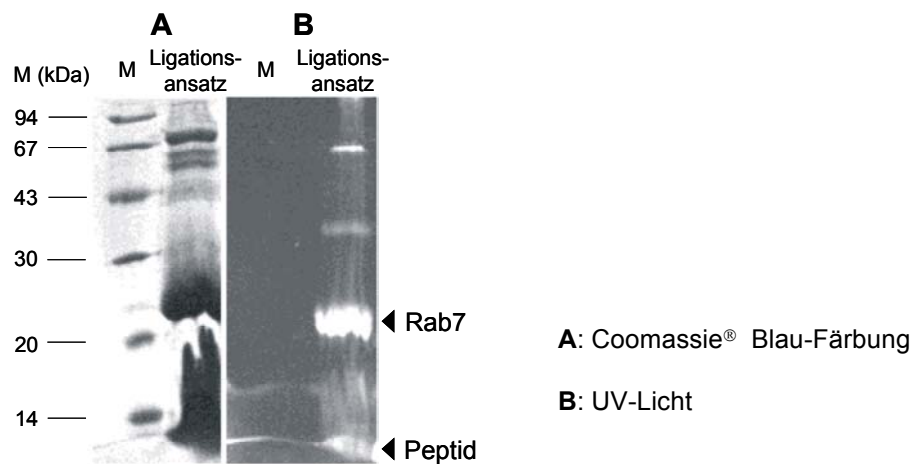


**Schema 27:** Maleinimid-vermittelte Verknüpfung von Protein und Peptid.

Die Ligation der Rab7-Mutanten mit dem MIC-modifizierten fluoreszenzmarkierten Lipopeptid **45** wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biochem. Thomas Durek aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody durchgeführt und folgte weitgehend einer etablierten

nicht-denaturierenden Methode.<sup>[81]</sup> Anstelle des bewährten Detergenz Triton<sup>®</sup> X-114<sup>[120]</sup> als Löslichkeitsvermittler wurde jedoch das kationische Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) eingesetzt. Eine wässrige Lösung von Triton<sup>®</sup> X-114 hätte zwar den Vorteil, oberhalb von 30 °C eine Phasenseparation einzugehen,<sup>[121]</sup> wodurch sich selektiv die hydrophoben Proteine isolieren lassen. Allerdings kann hier der Erfolg der Ligation direkt über die Fluoreszenz des semi-synthetischen Proteins im SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel (SDS-PAGE)<sup>[122]</sup> verfolgt werden. Dazu eignen sich Triton<sup>®</sup> X-114-haltige Proben aufgrund einer häufig zu beobachtenden deutlich schlechteren Auflösung der Gele nicht.

Zur Ligation wurde das hydrophobe C-terminal prenylierte Peptid **45** daher in Methanol und einer wässrigen CTAB-Lösung gelöst. Nach Zugabe der bakteriell exprimierten Rab7-Mutanten in Phosphatpuffer von pH 7.5 wurde der Ansatz unter einer Argonatmosphäre - zur Vermeidung einer möglichen Oxidation des C-terminalen Cysteins im Protein zum Disulfid - 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Über SDS-PAGE wurde der Erfolg der Ligation nachgewiesen (Abb. 6). Unter Einfluss von UV-Licht ließ sich deutlich das aufgrund der Dansylmarkierung des Lipopeptids fluoreszierende, semi-synthetische Protein in der zu erwartenden Höhe von ca. 23 kDa detektieren (Abb. 6, B).



**Abbildung 6:** SDS-PAGE des semi-synthetischen Rab7-Proteins.

Damit war die Herstellung eines ersten semi-synthetischen, prenylierten Rab7-Protein gelungen. Aufgrund des erhöhten Interesses an derartigen Proteinen mit einem durchgängigen Peptidrückgrat und eigenen Fortschritten auf dem Gebiet der *Expressed Protein Ligation* wurde an dieser Stelle das Projekt der Maleinimid-vermittelten Ligation abgeschlossen, ohne eine etwaige Doppelmodifizierung durch die internen Cysteine, <sup>83</sup>Cys, <sup>84</sup>Cys und <sup>143</sup>Cys, über die Massenbestimmung des Peptid-Protein-Konjugats auszuschließen oder über Variation des Tetrapeptids **43** weitere außerdem geplante Modifikationen einzuführen.

#### 4.4. Lipidmodifizierte und fluoreszenzmarkierte Tripeptide als Modellverbindungen für die *Expressed Protein Ligation*

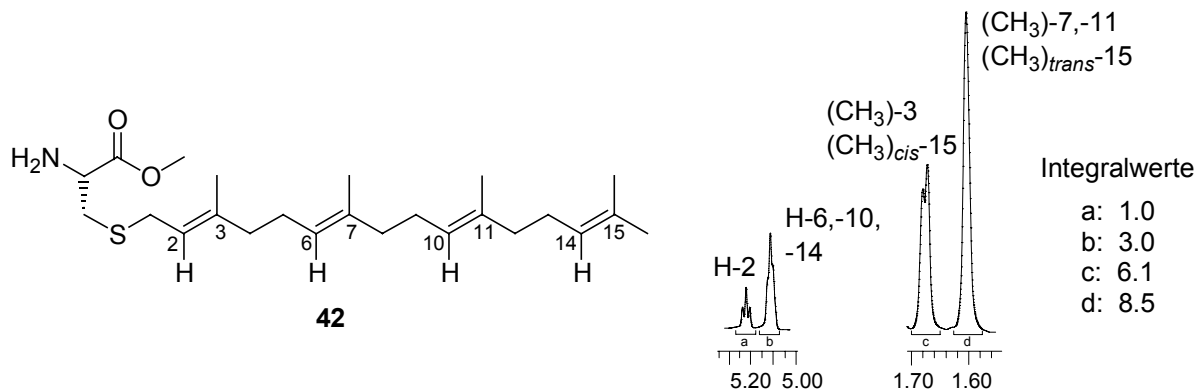
Die *Expressed Protein Ligation* gilt als Erweiterung der *Native Chemical Ligation*, in deren Reaktionssequenz eine Amidbindung zwischen zwei Peptidsegmenten durch Reaktion eines Thioesters mit einem N-terminal freien Cystein ausgebildet wird (s. 2.4.2.2.). Diese Verknüpfung sollte bei gleicher Synthesestrategie zum Aufbau modifizierter Rab-Proteine mit vollständigem Peptidrückgrat die maleinimidvermittelte Ligation ersetzen.

Zur Ermittlung optimaler Schutzgruppen für das zuletzt zu deblockierende N-terminale „Ligations“-Cystein, das formal den Maleinimidlinker ersetzt, und optimaler Bedingungen für die EPL mit lipidierten Peptiden wurde zunächst ein Testsystem entworfen, in dem die zu synthetisierenden lipidierten Hexapeptide auf Modelltripeptide (SG<sup>1</sup>-Cys(SG<sup>2</sup>)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe) reduziert wurden. Anhand dieser Modellpeptide lässt sich zudem feststellen, ob ein Fluoreszenzmarker in Nachbarschaft zum N-terminalen Cystein die Ligation beeinträchtigt.

##### 4.4.1. Untersuchungen zur Schutzgruppenstrategie und Synthese der Modelltripeptide

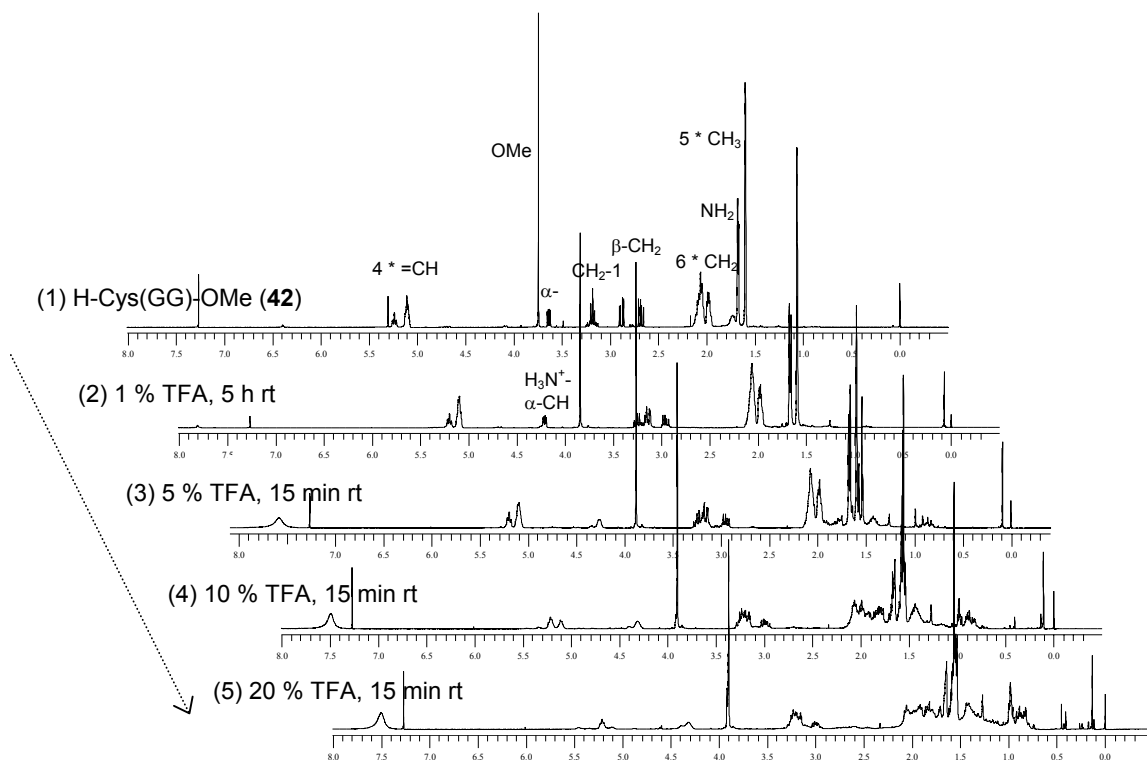
Ein N-terminales Cystein wird im neutralen Zustand aufgrund der freien Aminofunktion schneller als andere Cysteine zum Disulfid oxidiert.<sup>[123]</sup> Um diese Oxidation zu vermeiden, wird es häufig unter sauren Bedingungen (30-100 % Trifluoressigsäure), wie im Fall des Boc-Cys(Trt)-Bausteins, freigesetzt.<sup>[102]</sup> Diese Abspaltungsbedingungen sind mit der Säurelabilität des Geranylgeranylrestes jedoch nicht kompatibel. Alternativ könnte daher das Cystein als gemischtes Disulfid geschützt werden, das in einem letzten Schritt mit 1,2-Dithiothreitol (DTT) reduziert wird. Aus früheren Studien zur *Expressed Protein Ligation* von Ras-Proteinen am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund ging jedoch hervor, dass ein entsprechendes gereinigtes Peptid schon vor der Ligation zum Disulfid oxidiert worden war.<sup>[99]</sup> Die *in situ*-Entschützung während der Ligationsreaktion durch Zugabe von 1,2-Dithioerythrol (DTE) scheiterte an der Deaktivierung des Thioesters durch das Reduktionsmittel. In einer Kontrollreaktion mit einem nicht-lipidierten Peptid konnte die Inhibierung der Ligation durch Zugabe von DTE gezeigt werden.<sup>[99]</sup> Aus diesen Gründen wurde von der Verwendung reduktiv abspaltbarer Schutzgruppen zunächst Abstand genommen.

In einer ersten Synthesestrategie wurde zur vollständigen Freisetzung des N-terminalen Cysteins die Verwendung von Schutzgruppen, die schon unter schwach sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure abgespalten werden können, angestrebt. Zur Abschätzung der Säurelabilität des Geranylgeranylrestes wurden von einer Lösung aus H-Cys(GG)-OMe (**42**) in Trifluoressigsäure/Deuteriochloroform  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen, wobei die TFA-Konzentration sukzessive von 1 % bis auf 20 % gesteigert wurde. So war die ungefähre Bestimmung eines ersten Richtwertes möglich.



**Abbildung 7:** Charakteristische Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **42**.

(Die Zuordnung der Signale erfolgte über 2-dimensionale NMR-Messungen.)



**Abbildung 8:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **42** bei sukzessive steigender TFA-Konzentration.



Bei einer Konzentration von 1 % TFA bleibt auch nach fünfständiger Inkubation bei Raumtemperatur der Geranylgeranylrest unverändert (Abb. 8, Tabelle 2). Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann nur die Salzbildung des prenylierten Methylesters beobachtet werden. Diese lässt sich durch die Tieffeldverschiebung des  $\alpha\text{-CH-}$  und des  $\beta\text{-CH}_2\text{-}$  Signals des Cysteins nachweisen. Schon bei der Erhöhung der Konzentration auf 5 % TFA finden offenbar Additionsreaktionen statt: Besonders die olefinischen Signale an C-6, -10 und -14 und die Signale der Methylgruppen an C-7, -11 und -15 werden schwächer, ohne dass neue olefinische Signale - bedingt durch Umlagerungsreaktionen - hinzukämen. Im Bereich zwischen 0.8 ppm und 1.8 ppm nimmt die Signaldichte dagegen zu. Bei höheren Säurekonzentrationen erfolgen Additionen an fast allen Doppelbindungen mit Ausnahme der Doppelbindung C-2=C-3.

TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [% (v/v)]	# [ppm]	5.3<x<5.5 (=CH)	5.2 (=CH)	5.1 (=CH)	1.95-2.15 (CH <sub>2</sub> )	1.50-1.70 (CH <sub>3</sub> )
0	(1)	-	1.0	3.0	12.3	6.1, 8.5
1	(2)	-	1.0	3.0	12.7	6.2, 8.7
5	(3)	-	1.0	2.1	9.9	5.0, 0.5, 5.1, 1.2, 1.3, 0.7
10	(4)	0.1	1.0	0.7	(6.1)	n.b. (> 10 Signale)
20	(5)	0.2, 0.1	1.0	0.2	n.b.	n.b. (> 10 Signale)

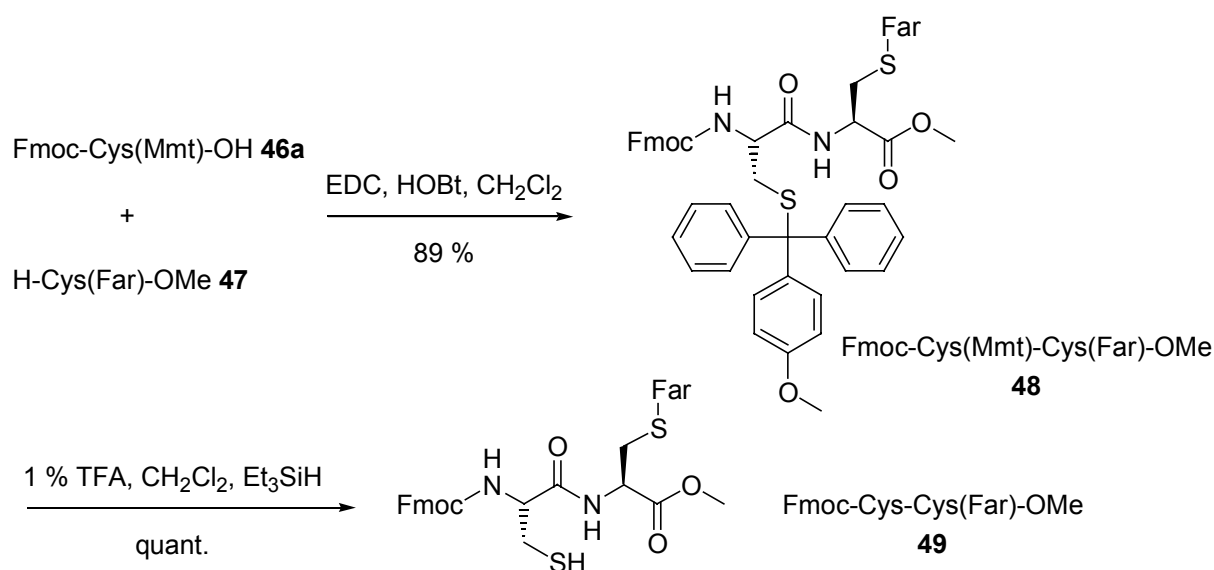
**Tabelle 2:** Integralwerte ausgewählter  $^1\text{H-NMR}$ -Signale bei steigender TFA-Konzentration.

(Da sich der Integralwert des olefinischen Protons H-2 im Geranylgeranylrest (bei 5.2 ppm) während der gesamten Messung im Verhältnis zu den Signalen des Cysteins nicht veränderte, wurde dieser auf 1.0 normiert.)

Schutzgruppen, die unter sauren Bedingungen in Gegenwart des Geranylgeranylrestes entfernt werden sollen, müssen sich daher schon bei einer Konzentration von maximal 1 % Trifluoressigsäure/Dichlormethan (v/v) abspalten lassen.

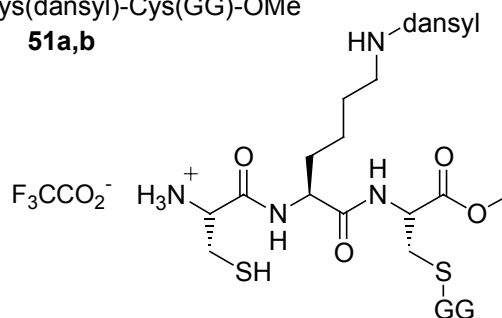
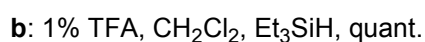
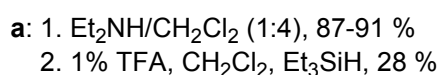
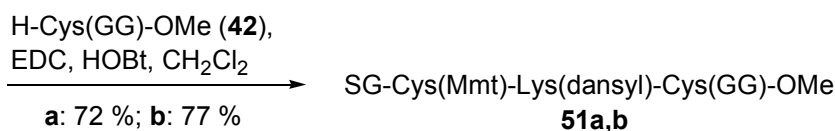
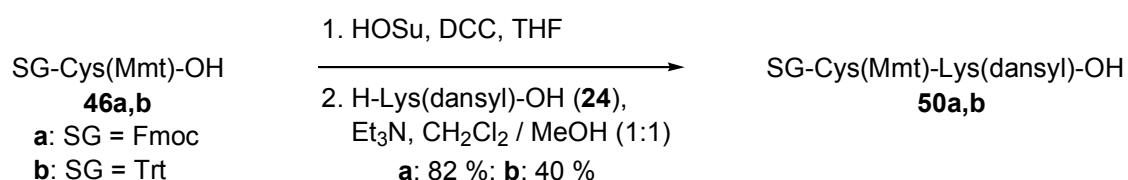
Eine solche ist der *para*-Methoxytrityl(Mmt)-Rest.<sup>[124]</sup> An einem Modellpeptid wurde überprüft, ob eine Prenylgruppe unter diesen Abspaltungsbedingungen tatsächlich unverändert bleibt (Schema 28).

Als Prenylrest wurde zunächst der Farnesylrest eingesetzt. Der farnesylierte L-Cysteinmethylester **47** wurde mit dem *N*- und *S*-blockierten Cystein **46a** zum Dipeptid **48** umgesetzt (Schema 28). Die Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins konnte mit 1%iger TFA in Dichlormethan und einem Überschuss an Triethylsilan als Fänger vollständig freigesetzt werden. Das Dipeptid **49** wurde quantitativ isoliert. Der Farnesylrest blieb unverändert.



**Schema 28:** Untersuchung zur Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe.

Diese Schutzgruppenstrategie wurde auf Modelltripeptide der Sequenz SG-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe übertragen. Deren allgemeine Darstellung ist in Schema 29 aufgeführt: Die unterschiedlich geschützten Cysteine **46a,b** wurden über die Hydroxysuccinimidmethode mit *N*<sup>(6)</sup>-Dansyl-L-lysin (**24**) zu den fluoreszenzmarkierten Dipeptiden **50a,b** kondensiert, die dann mit geranylgeranyliertem Cysteinmethyl ester (**42**) zu den blockierten Tripeptiden **51a,b** umgesetzt wurden. Diese wurden abschließend vollständig entschützt.



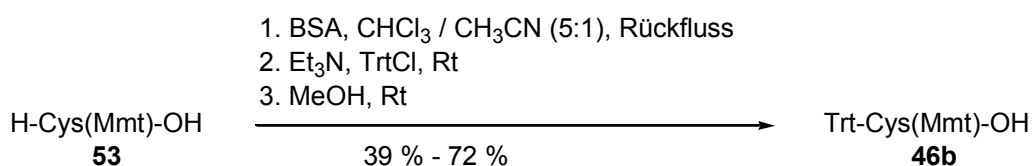
TFA \* H-Cys-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe **52**

**Schema 29:** Untersuchungen zur Synthese des vollständig deblockierten Tripeptids **52**.

In einem ersten Ansatz wurde ausgehend von Fmoc-Cys(Mmt)-OH (**46a**) das N- und C-terminal unterschiedlich geschützte Tripeptid **51a** hergestellt (Schema 29). Nach basischer Deblockierung des N-Terminus konnte bei der sauren Abspaltung der Thiolschutzgruppe zwar ein quantitativer Umsatz verzeichnet werden, das Produkt ließ sich jedoch säulenchromatographisch nur unter Verlusten reinigen. Das vollständig entschützte Tripeptid **52** wurde in ersten Ligationsreaktionen mit dem Rab7-Thioester eingesetzt (s. 4.4.2.).

Bei der günstigeren gleichzeitigen Entschützung eines Tripeptids, dessen N-Terminus und Thiolfunktionalität Trityl-geschützt vorlagen, stellte sich heraus, dass schon 3 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan ausreichen, dass es zu Additionen an den Geranylgeranylrest kommt. Damit erwies sich der Geranylgeranylrest als wesentlich säurelabiler als der Farnesylrest.<sup>[100a]</sup> Aus diesem Grund sollte der noch säurelabilere *S*-*para*-Methoxytrityl-geschützte Baustein **46b** verwendet werden.

Dieser wurde ausgehend von Mmt-geschütztem Cystein **53** generiert, das temporär in den Trimethylsilylester überführt wurde (Schema 30).<sup>[125]</sup> Anstelle von TMSCl wurde aufgrund der Säureempfindlichkeit des Mmt-geschützten Cysteins Bistrimethylsilylacetamid (BSA) eingesetzt. Die anschließende Reaktion mit Tritylchlorid und die Verseifung des Silylesters mit Methanol führten zum Baustein **46b**. Dieser wurde zum Tripeptid **51b** und nach saurer Entschützung zum deblockierten Testpeptid **52** umgesetzt (Schema 29). Durch einfaches Waschen mit *n*-Pentan anstelle einer säulenchromatographischen Reinigung konnte im letzten Schritt die Ausbeute erhöht werden.

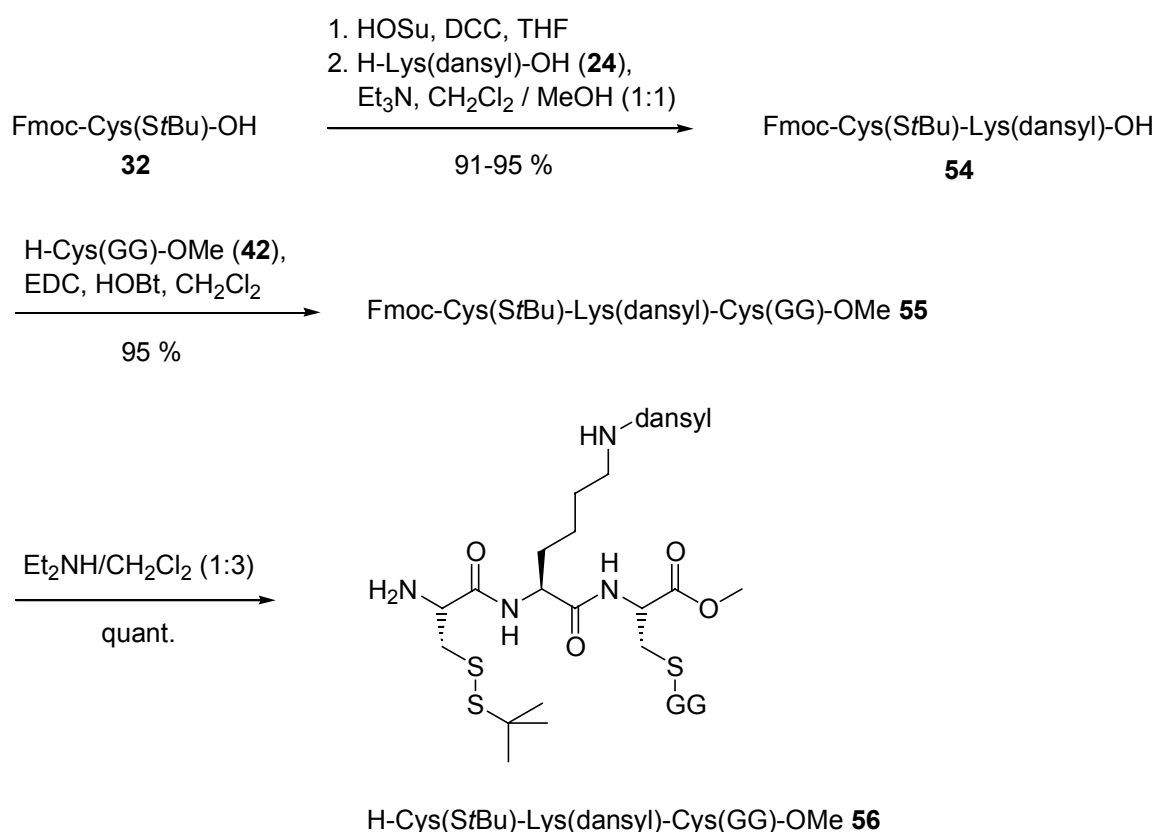


**Schema 30:** Synthese des säurelabil geschützten Cysteins **46b**.

Die Handhabbarkeit und Analytik des vollständig entschützten Tripeptids **52** stellte sich als schwierig heraus, da das Produkt teilweise als Disulfid vorlag. Zudem konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass, wenn auch in geringem Maß, Additionsprodukt entstanden war.

Alternativ konnte inzwischen gezeigt werden, dass die *Expressed Protein Ligation* auch unter reduktiven Bedingungen durchgeführt werden kann, jedoch anstelle von DTT mit Thiophenol

oder Natrium-2-mercaptoethansulfonsäure (MESNA) als Additiv.<sup>[97;91c]</sup> Gleichzeitig wurde N-terminal ein als gemischtes Disulfid geschütztes Cystein verwendet, das sich unter diesen Bedingungen *in situ* deblockieren ließ.<sup>[97]</sup> Im Folgenden wurde daher analog zu der vorhergehenden Reaktionssequenz (s. Schema 29) ein reaktiv deblockierbares Modelltripeptid aufgebaut (Schema 31).

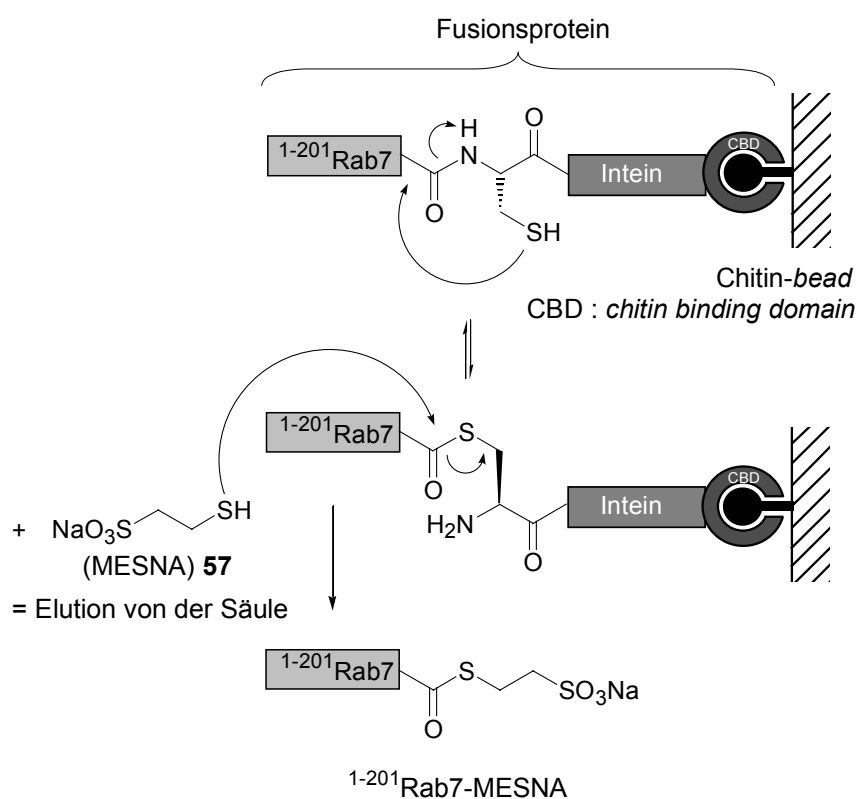


**Schema 31:** Untersuchungen zur Synthese des S-blockierten Tripeptids **56**.

Ausgehend von Fmoc-Cys(S*t*Bu)-OH (**32**) konnte das Tripeptid **56** in vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 90 % hergestellt werden (Schema 31). Die N-terminale Deblockierung erfolgte zur Vermeidung einer möglichen Epimerisierung des C-terminalen Cysteinmethylesters zwar schon unter den sehr milden Bedingungen von nur 14 % Diethylamin in Dichlormethan, dann aber in geringerer Ausbeute. Da die Drehwerte der unter diesen Bedingungen und der mit 25 % Diethylamin entschützten Peptide im Rahmen der Messgenauigkeit identisch waren, wurde im Folgenden die höhere Aminkonzentration verwendet. Das N-terminal entschützte S-blockierte Tripeptid **56** wurde zur Bestimmung der Ligationsparameter unter reduktiven Bedingungen eingesetzt (s. 4.4.2.).

#### 4.4.2. Die Expressed Protein Ligation mit Rab7-Modelltripeptiden

Für Kupplungen über die *Expressed Protein Ligation* wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody ein um 6 Aminosäuren C-terminal verkürztes Rab7-Protein (*canis familiaris*) unter Verwendung des IMPACT™-CN Systems (*Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) der Firma New England Biolabs als Thioester aktiviert.<sup>[91]</sup> Dazu wurde das Fusionsgen aus <sup>1-201</sup>Rab7, *Sce* VMA-Intein und CBD (Chitin-Bindedomäne) in den pTYB1-Vektor kloniert und das Fusionsprotein in *E. coli* (BL21 (DE3)) exprimiert.<sup>[126]</sup> Nach Isolation und Reinigung über Chitin(Poly- $\beta$ -(1,4)-*N*-Acetylglucosamin)-beads wurde <sup>1-201</sup>Rab7 durch Zugabe von Natrium-2-mercaptoethansulfonat (MESNA) (57) als entsprechender Thioester von der festen Phase eluiert (Schema 32).

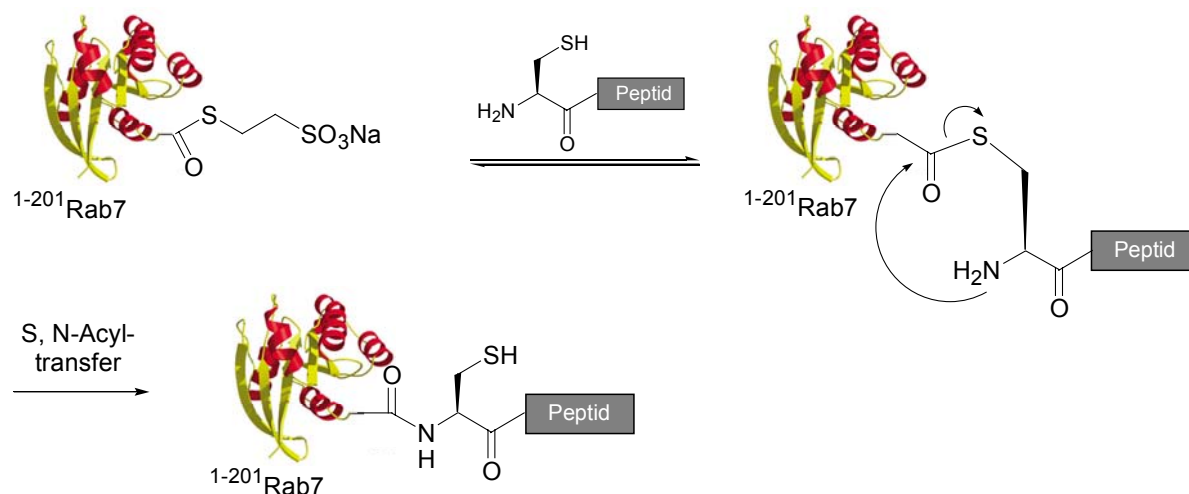


**Schema 32:** Herstellung von Natrium-2-(<sup>1-201</sup>Rab7-carboxylsulfanyl)-ethansulfonat.

In der Ligrationsreaktion reagiert das N-terminale Cystein des Peptids mit dem aktivierten C-Terminus des <sup>1-201</sup>Rab7-Proteins zunächst reversibel zum entsprechenden Thioester, der anschließend über eine S, N-Acyltransfer zum stabilen Amid umlagert (Schema 33).

Anders als die MIC-Ligation verläuft die EPL hochselektiv. Die inter- oder intramolekulare Reaktion des Proteinthioesters mit den internen Cysteinen, <sup>83</sup>Cys, <sup>84</sup>Cys und <sup>143</sup>Cys, ist

reversibel, da kein S, N-Acyltransfer möglich ist, während die Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen aufgrund der Selektivität der Reaktion bei neutralem pH verhindert ist.



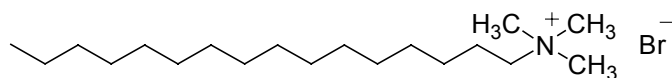
**Schema 33:** Reaktionsequenz zum semi-synthetischen <sup>1-207</sup>Rab7.

Die *Expressed Protein Ligation* wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody durchgeführt. Insbesondere Dr. Kirill Alexandrov und Thomas Durek waren an diesem Projekt entscheidend beteiligt. Detailliertere Ergebnisse werden in der Dissertation von Thomas Durek vorgestellt werden.<sup>[127]</sup>

Die Ligationsreaktion erfolgte zunächst mit dem vollständig deblockierten Modelltripeptid **52**, das in einem zehnfachen Überschuss eingesetzt wurde. Als Hauptproblem erwies sich die unterschiedliche Löslichkeit des Lipopeptids und des Proteinthioesters. Es mussten Bedingungen gefunden werden, unter denen hydrophobe Lipopeptide in wässriger Lösung solubilisiert werden können, ohne das Protein irreversibel zu denaturieren.

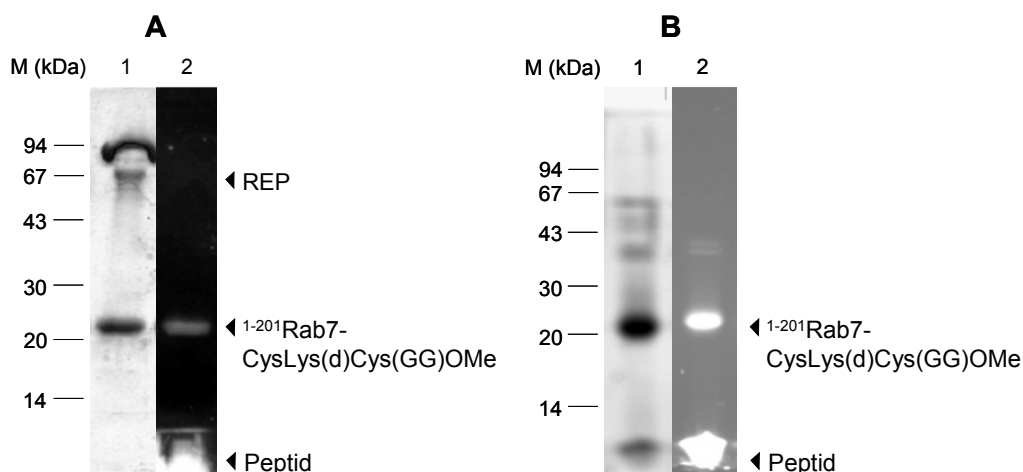
Die Verwendung von Cosolventien wie Methanol oder Acetonitril führte nicht zum Erfolg, da bei geringen Zusätzen zum wässrigen Puffer das lipophile Peptid nicht solubilisiert werden konnte, während höhere Lösungsmittelanteile zur Präzipitation des Proteins führten. Auch mit Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid oder dem in der MIC-Ligation erfolgreich eingesetzten Detergenz Triton<sup>®</sup> X-114 als Löslichkeitsvermittler konnte kein Peptid-Protein-Konjugat erhalten werden. Erst ein systematischer Detergenzscreen (Dr. K. Alexandrov) von 120 verschiedenen Detergenzien führte zur Identifizierung sehr weniger geeigneter Additive.<sup>[127]</sup> Besonders der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) führte zu hohen Ligationsumsätzen. Da CTAB aus Protokollen zur Detergenz-vermittelten Rückfaltung von Proteinen bekannt ist<sup>[128]</sup> und sich

trotz einer vergleichsweise niedrigen CMC (*critical micelle concentration*) vollständig unter dialytischen Bedingungen entfernen lässt, fiel die Wahl in den folgenden Ligationen auf dieses Detergenz.



**Abbildung 9:** Das kationische Detergenz CTAB.

Die Ligrationsreaktionen wurden wie folgt durchgeführt: Das Peptid wurde in Acetonitril/Methanol gelöst und in 8-10fachem Überschuss zu einer Lösung des  $^{1-201}$ Rab7-Thioesters in Ligationspuffer (pH 7.5) und einem Zusatz von 50 mM CTAB gegeben. Der Ansatz wurde dann 18 Stunden bei Raumtemperatur oder auch 40° C geschüttelt.



TFA \* H-Cys-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe **52**

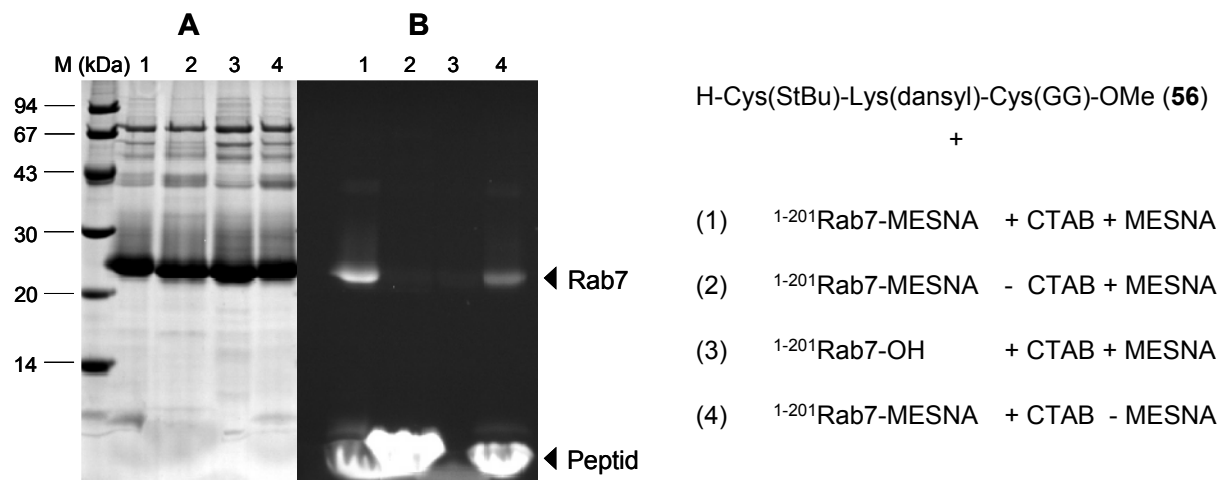
H-Cys(*StBu*)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe **56**

**Abbildung 10:** SDS-PAGE-Gele der Ligrationsprodukte.

(A: Ligation unter nicht-reduktiven Bedingungen; aufgetragen: Ligrationsprodukt in Komplex mit REP; B: Ligation unter Zusatz von MESNA; 1: Coomassie® Blau-Färbung; 2: UV-Licht)

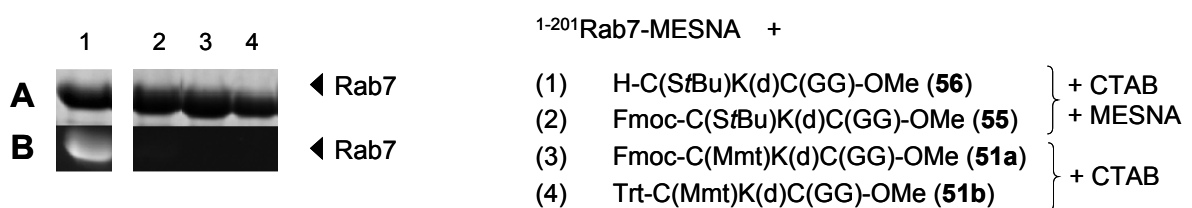
Der Erfolg der Ligationen wurde über SDS-PAGE durch UV-Detektion des Fluoreszenzmarkers nachgewiesen (Abb. 10). Deutlich ist unter den optimierten Bedingungen nach Einsatz des vollständig geschützten Peptids **52** (Abb. 10; A) im erwarteten Massenbereich von ca. 23 kDa das semi-synthetische Protein als fluoreszierende Bande erkennbar. Auch bei Einsatz des *StBu*-geschützten Peptids **56** (Abb.10; B), konnte die Ligation durch Zusatz von MESNA in einer Konzentration von 125 mM realisiert werden.<sup>[127]</sup>

Zur Kontrolle der Spezifität der EPL wurden das S-blockierte Tripeptid **56** und verschiedene geschützte Tripeptide in Ligationsreaktionen unter unterschiedlichen Bedingungen eingesetzt (Abb. 11 und 12): Der Zusatz von CTAB war auch unter reduktiven Bedingungen essentiell (Abb. 11, Spur 2). Wie erwartet bildete sich ohne den Zusatz von MESNA sehr viel weniger Ligationsprodukt (Abb. 11, Spur 4). Die Assoziation des Peptids an das Protein über nicht kovalente hydrophobe Wechselwirkungen konnte ausgeschlossen werden, da sich mit dem hydrolysierten Thioester oder den sehr hydrophoben vollständig geschützten Peptiden **51a,b** kein Peptid-Protein-Konjugat bildete (Abb. 11, Spur 3; Abb. 12, Spur 3 + 4).



**Abbildung 11:** Kontrollreaktionen zur EPL unter Verwendung des Modelltripeptids **56**.  
(A: Coomassie® Blau-Färbung; B: UV-Licht)

Die Verknüpfung von Peptid und Protein über Disulfidbrücken und nicht über eine Amidbindung konnte direkt durch die Reaktionsführung und die Probenbehandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol vor der SDS-PAGE ausgeschlossen werden. Durch Einsatz des N-terminal geschützten, aber S-deblockierbaren Peptids **55** war nachweisbar, dass die Umesterung zum Thioester-verknüpften Protein, die auch mit internen Cysteinen des Proteins stattfinden könnte, unter diesen Bedingungen nicht favorisiert ist (Abb. 12, Spur 2).



**Abbildung 12:** Kontrollreaktionen mit N-terminal blockierten Peptiden.  
(A: Coomassie® Blau-Färbung; B: UV-Licht)



Zusammenfassend ist festzustellen, dass erstmals die EPL zur Herstellung lipidierter Proteine verwendet werden konnte. Erst der Zusatz einiger weniger Detergenzien machte diese Ligation möglich. Dabei beeinträchtigt der Dansylrest als Fluoreszenzmarker, angebunden an die  $\epsilon$ -Aminofunktion eines dem „Ligations“-Cystein benachbarten Lysins, die sehr selektive Ligation offensichtlich nicht. Die Ligationen mit dem vollständig entschützten und mit dem S-blockierten Modelltripeptid verliefen vergleichbar gut.

Die unterschiedlich lipidmodifizierten Rab7-Hexapeptidfragmente, die es nach dem Erfolg des Testsystems im Folgenden zu synthetisieren galt, sollten S-blockiert in der Verknüpfung mit dem <sup>1-201</sup>Rab7-Thioester eingesetzt werden.

## 4.5. Synthese unterschiedlich lipidierter Rab7-Fragmente für die *Expressed Protein Ligation*

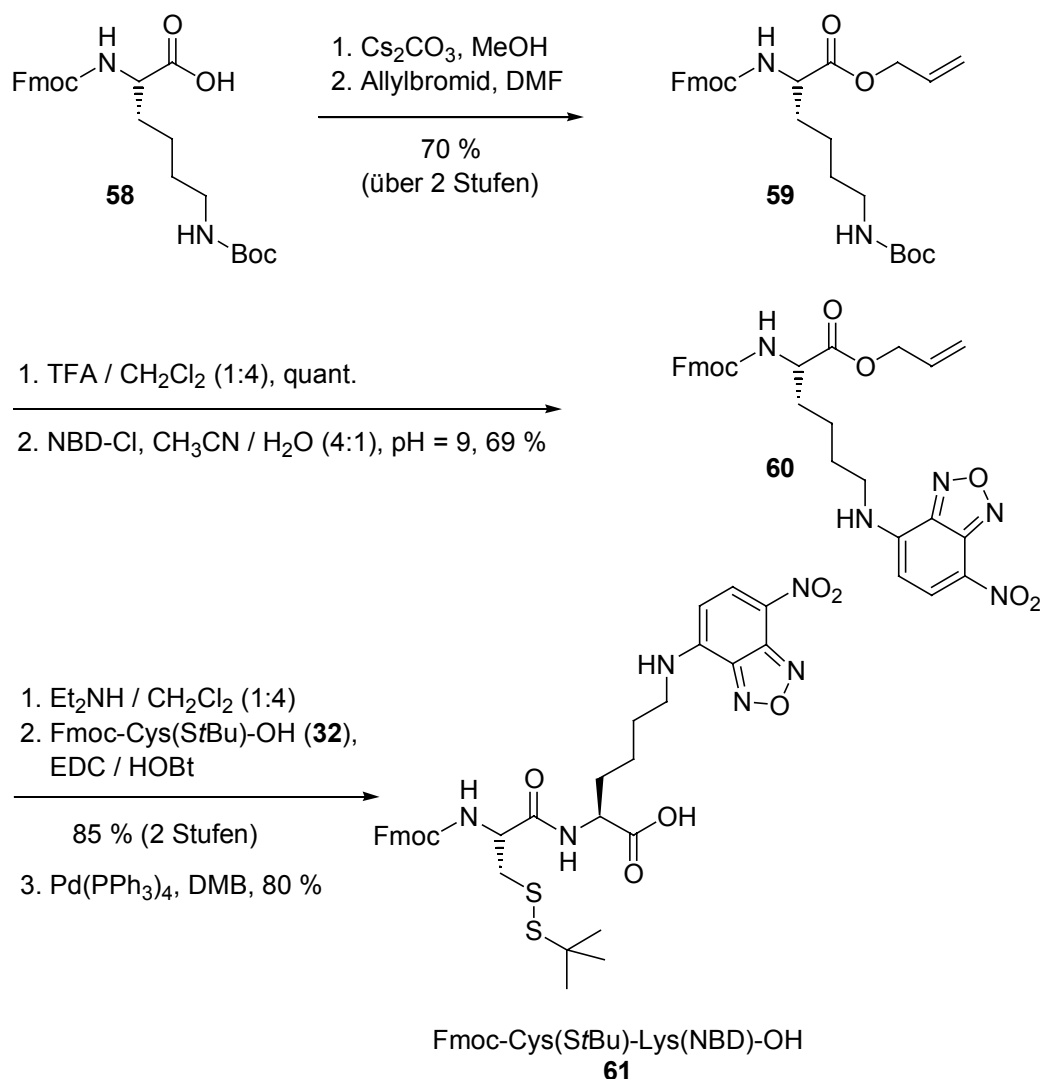
### 4.5.1. Synthese C-terminal geranylgeranylierter Hexapeptide

Der 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl(dansyl)-Rest hatte sich als Markierung der Ligationsprodukte bewährt und war auch für den späteren Einsatz der semi-synthetischen Proteine in Fluoreszenzassays unentbehrlich. Für weitere Experimente, wie z.B. Mikroinjektionsstudien war es jedoch wünschenswert, einen noch weniger bleichenden Fluorophor mit einer höheren Quantenausbeute, als sie der Dansylrest aufweist, in das Molekül einzubringen. Diese Vorteile bietet der 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl(NBD)-Rest.

Während für die Kupplung zum dansylmarkierten, C-terminal geranylgeranylierten Hexapeptid neben dem C-terminal prenylierten Tetrapeptid **43** aus der Synthese der MIC-modifizierten Peptide das dansylmarkierte Dipeptid **54** aus der Schutzgruppenvalidierung verfügbar war, musste im Fall der NBD-Markierung vorab das analoge NBD-markierte Dipeptid synthetisiert werden.

Über die Kupfer(II)komplexmethode wurde zunächst  $N^{(\alpha)}$ -Fmoc- und  $N^{(\epsilon)}$ -Boc-geschütztes L-Lysin (**58**) hergestellt. Um ohne Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe das Cäsiumsalz zu erhalten, wurde zu einer methanolischen Lösung des blockierten L-Lysins eine Lösung von Cäsiumcarbonat in Methanol gegeben (Schema 34). Das entstandene isolierte Cäsiumsalz wurde mit einem hohen Überschuss Allylbromid zum vollständig blockierten Lysin **59** umgesetzt. Über die selektive saure Entschützung der  $N^{(\epsilon)}$ -Aminofunktion und die anschließende Reaktion mit 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-chlorid konnte dann das NBD-markierte Lysin **60** generiert werden. Nach Deblockierung der  $N^{(\alpha)}$ -Aminofunktion unter

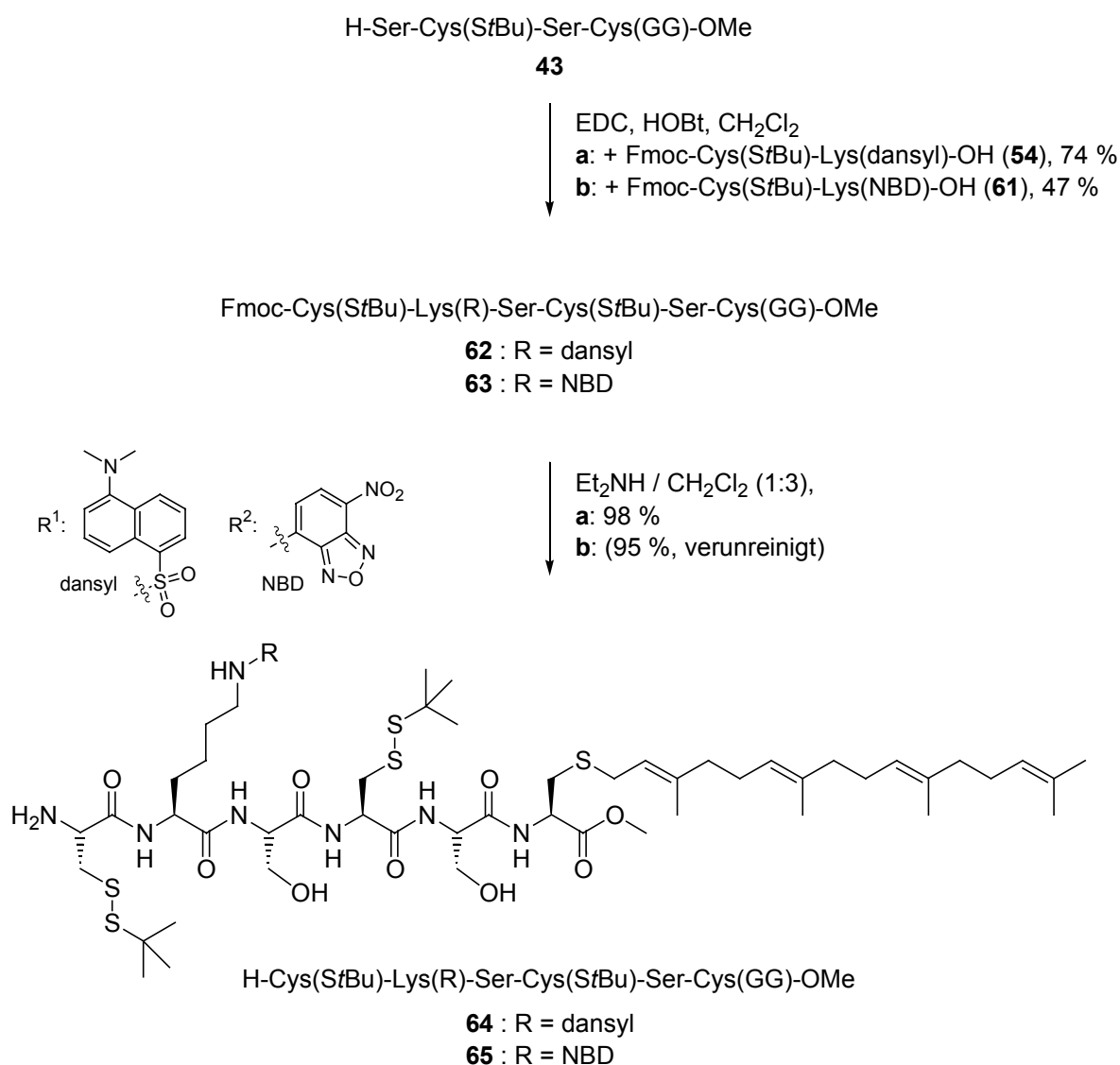
basischen Bedingungen wurde das Produkt ohne weitere Reinigung umgesetzt, da bei der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol teilweise die Umesterung zum Methylester beobachtet wurde. Die Kondensation mit dem geschützten Cystein **32** zum Dipeptid verlief mit hoher Ausbeute. Dieses wurde abschließend Pd(0)-vermittelt zum kupplungsfähigen Dipeptid **61** entschützt. Mit einer Gesamtausbeute von 33 % über 7 Stufen war somit auch der NBD-markierte N-terminale Dipeptidbaustein zugänglich.



**Schema 34:** Synthese des NBD-markierten Dipeptids **61**.

Zur Synthese der geschützten Hexapeptide **62** und **63** wurden die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Dipeptide **54** und **61** mit dem C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptid **43** EDC/HOBt-vermittelt kondensiert (Schema 35).

Während das dansylmarkierte Hexapeptid **62** sehr stabil war, empfahl sich bei dem NBD-markierten Hexapeptid **62** eine Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter einer Argonatmosphäre, da sich sonst in nicht geringem Ausmaß rasch das zum Sulfoxid oxidierte Produkt bildete.



**Schema 35:** Synthese der C-terminal geranylgeranylierten Zielpeptide **64** und **65** für die EPL.

Die N-terminale Schutzgruppe des dansylmarkierten Hexapeptids **62** wurde mit Diethylamin in Dichlormethan im Verhältnis 1:2.5 oder 1:4 in hohen Ausbeuten abgespalten. Dabei wurde das N-terminal freie Hexapeptid **64** säulenchromatographisch an Kieselgel und/oder über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 gereinigt. Anschließend wurde es in der *Expressed Protein Ligation* eingesetzt.

Die abschließende N-terminale Deblockierung des NBD-markierten Hexapeptids **63** verlief dagegen wesentlich problematischer. Die erwartete saubere Abspaltung konnte auch unter schwächer basischen Bedingungen oder unter Zusatz von HOBT<sup>[129]</sup> oder Verwendung von DBU/HOBT<sup>[130]</sup> nicht erreicht werden. Über Flashchromatographie war zudem eine vollständige Reinigung nicht möglich. Da es sich bei den Nebenprodukten vermutlich vornehmlich um oxidiertes Produkt handelte, wurde von einer Größenausschlusschromatographie abgesehen. Das deblockierte Hexapeptid **65** wurde jedoch trotzdem in der reduktiv geführten Ligation eingesetzt, da sich Sulfoxide zumindest auch mit Thiophenol reduzieren lassen.<sup>[131]</sup> Die ursprünglich angestrebte Synthese der intern und doppelt geranylgeranylierten NBD-markierten Hexapeptide wurde dann allerdings nicht weiter verfolgt.

#### **4.5.2. Synthese von Hexapeptiden mit einem intern geranylgeranylierten Cystein**

##### **4.5.2.1. Untersuchung zur Prenylierungsstrategie von Peptiden**

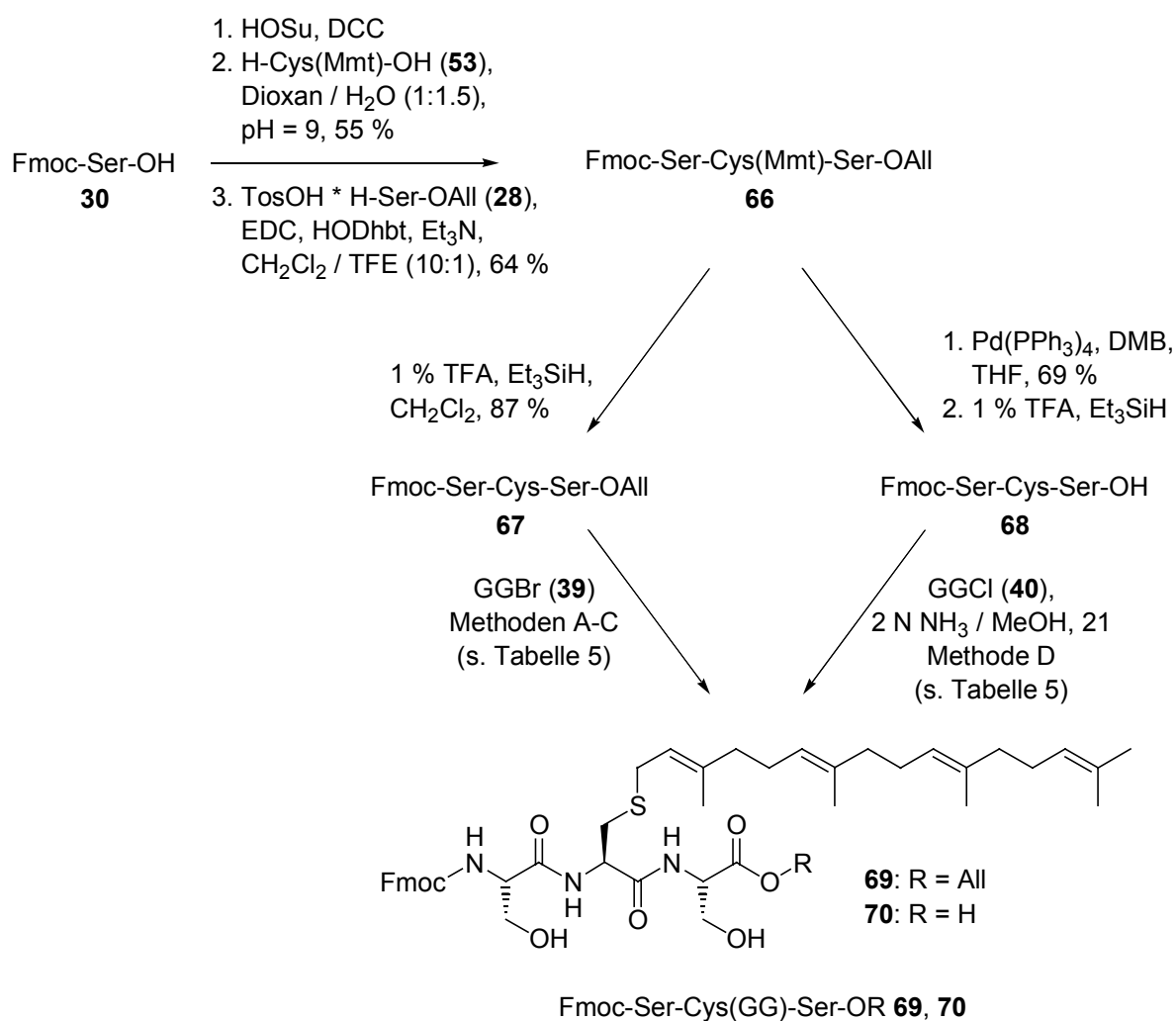
Für die Synthese von intern und doppelt geranylgeranylierten Tetrapeptiden, die zur Darstellung der analogen Hexapeptide benötigt werden, sind zwei Strategien vorstellbar (s. 4.1.; Schema 11). Zum einen bietet die Prenylierung von Tetrapeptiden der Sequenz SG<sup>1</sup>-Ser-Cys(SG<sup>2</sup>)-Ser-Cys(SG<sup>3</sup>)-OMe nach selektiver Entschützung der Cysteine elegant den Vorteil einer späten Einführung der Prenylreste. Über die Wahl der Schutzgruppen der Thiolfunktionalitäten der Cysteine ist die Prenylierung des selektiv deblockierten internen Cysteins (SG<sup>2</sup> ≠ SG<sup>3</sup>) oder beider gleichzeitig deblockierter Cysteine (SG<sup>2</sup> = SG<sup>3</sup>) möglich. Aufgrund der zu erwartenden hohen Selektivität der Prenylierung können hierbei die freien Hydroxylgruppen der Serine ungeschützt bleiben.

Andererseits ermöglicht die Synthese geranylgeranylierter Cysteinbausteine den Aufbau des intern und des doppelt prenylierten Tetrapeptids über modifizierte Aminosäuren.

Zunächst wurde die erste Strategie verfolgt, wobei anhand des C- und N-terminal geschützten Tripeptids, SG<sup>1</sup>-Ser-Cys-Ser-OSG<sup>2</sup>, die Praktikabilität der Modifizierung eines Cysteins innerhalb eines Peptids mit dem C<sub>20</sub>-Isopren erprobt werden sollte.

Da sich die *para*-Methoxytrityl(Mmt)-Gruppe als leicht und sehr sauber abspaltbar erwiesen hatte, wurde sie als temporäre Schutzgruppe des zu prenylierenden Cysteins verwendet. Ein sequentieller Aufbau des geschützten Tripeptids konnte dann allerdings aufgrund der Labilität eines entsprechenden N-terminal freien Dipeptids nicht verwirklicht werden. Daher wurde zunächst über die Hydroxysuccinimid-Methode Fmoc-geschütztes Serin (**30**) und Mmt-

geschütztes Cystein (**53**) zum Dipeptid kondensiert, das dann mit L-Serinallylesterhydrotosylat (**28**) zum Tripeptid **66** umgesetzt wurde (Schema 36). Für die Prenylierung mit Geranylgeranylchlorid (**39**) wurde das Tripeptid **66** mit 1%iger Trifluoressigsäure und Triethylsilan als Fänger trotz Reinigungsschwierigkeiten aufgrund der nur mäßigen Löslichkeit des Produkts, das sich ausschließlich in Tetrahydrofuran löst, mit einer Ausbeute von 87 % entschützt. Das S-deblockierte Tripeptid **67** ließ sich unter Argon und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  auch über längere Zeit lagern.



**Schema 36:** Untersuchungen zur Synthese der prenylierten Tripeptide **69** und **70**.

Für die Prenylierung mit Geranylgeranylchlorid (**40**) in einer 2 N Lösung von Ammoniak in Methanol wurde zunächst die Stabilität des geschützten Tripeptids **66** unter diesen Bedingungen untersucht. Die Fmoc-Schutzgruppe blieb auch über längere Zeit unbeeinflusst.

Es bildete sich aber nach kurzer Zeit basenkatalysiert der Methylester, weswegen das Tripeptid **66** vor der Prenylierung zunächst Palladium(0)-vermittelt C-terminal entschützt wurde (Schema 36). Die Abspaltung der Thiolschutzgruppe führte dann zum deblockierten Tripeptid **68**, das ohne weitere Aufreinigung in der Prenylierungsreaktion eingesetzt wurde.

Die Prenylierungen unter den verschiedenen Bedingungen wurden in Testansätzen mit geringem Material durchgeführt, und zunächst über MALDI-TOF-Analyse verfolgt. Im Fall der Methode C und D (Tabelle 3) wurde das Produkt anschließend isoliert. Da eine effiziente Synthese in Bezug auf den Geranylgeranylrest von Interesse war, wurde die Menge an eingesetztem Geranylgeranyl bromid auf zwei Äquivalente und die an Geranylgeranylchlorid auf 1-2 Äquivalente begrenzt. Die Alkylierung des Tripeptids **67** mit Geranylgeranyl bromid unter Zugabe von Di-*iso*-propylethylamin<sup>[59;56]</sup>, Kaliumfluorid-Dihydrat<sup>[19]</sup> bzw. Zinkacetat<sup>[60]</sup> (Tabelle 3), führte zu einem geringen Umsatz von ca. 10-20 %. Auch die Umsetzung des S-deblockierten, C-terminal freien Tripeptids **68** mit Geranylgeranylchlorid in einer 2 N Lösung Ammoniak in Methanol verlief mit Ausbeuten von ungefähr 20 % nicht wesentlich effizienter.

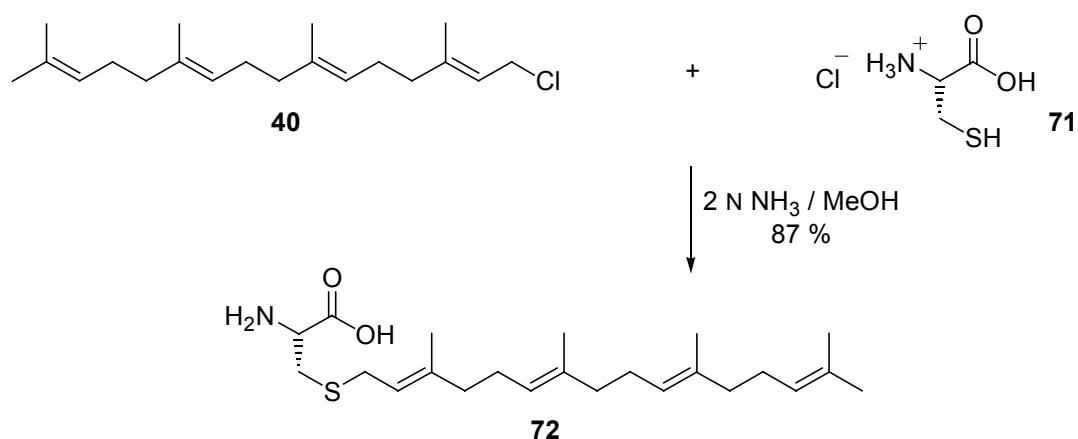
Eintrag	Tripeptid	Methode	Bedingungen	Ergebnis
1	<b>67</b>	A	2 Äq. GGBr, DMF, DIPEA, 0° C, 4 h, c = 0.01 M	< 10 %
2	<b>67</b>	B	2 Äq. GGBr, KF * 2H <sub>2</sub> O, DMF / CH <sub>3</sub> CN (1:2.4), 0° C, 2 h, Rt, 2 h, c = 0.06 M	< 10 %
3	<b>67</b>	C	2.7 Äq. GGBr, Zn(OAc) <sub>2</sub> , DMF / CH <sub>3</sub> CN / 0.025 % TFA (2:1:1), 0° C, 30 min, Rt, 30h, c = 0.0125 M	ca. 20 %
4	<b>68</b>	D	2 Äq. GGCl, 2 N NH <sub>3</sub> / MeOH, 0° C, 2 h	ca. 20 %

**Tabelle 3:** Bedingungen für die Prenylierung der Tripeptide **67** und **68**.

Insgesamt führte die Alkylierung der peptidischen Cysteine der Tripeptide **67** bzw. **68** unter den angegebenen Bedingungen mit einer begrenzten Zugabe von Geranylgeranylhalogenid nur zu sehr mäßigen Ausbeuten. Im Folgenden wurde daher die Strategie der Verknüpfung prenylierter Bausteine verfolgt.

#### 4.5.2.2. *Synthese des intern und des doppelt geranylgeranylierten Tetrapeptids*

In einem ersten Schritt wurde L-Cystein-hydrochlorid (**71**) mit Geranylgeranylchlorid (**40**) zum prenylierten Cystein **72** umgesetzt (Schema 37). Trotz der geringen Löslichkeit des prenylierten Cysteins **72** in allen gängigen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen und der erforderlichen säulenchromatographischen Abtrennung von ca. 3 % N-terminal prenylierten Cysteins gelang die Prenylierung in der hohen Ausbeute von 87 %.

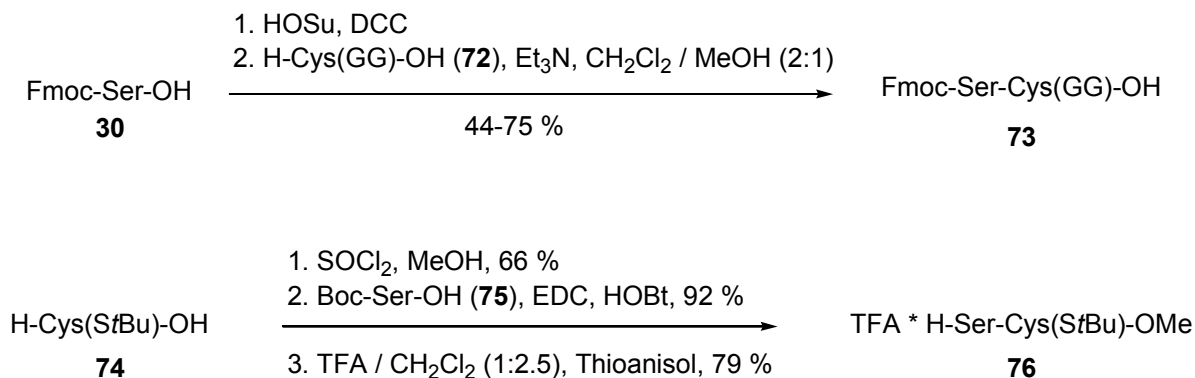


**Schema 37:** Synthese des geranylgeranylierten Cysteins **72**.

L-Cystein ist kaum oxidationsempfindlich, worin vermutlich die höheren Ausbeuten verglichen mit der Prenylierung von L-Cysteinmethylester (s. 4.2.1.) begründet sind.

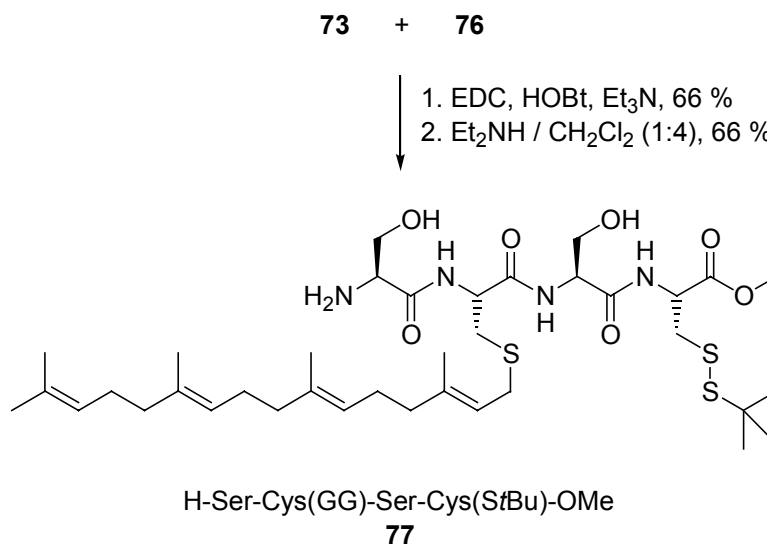
Mit dem geranylgeranylierten L-Cystein stand ein allgemein verwendbarer prenylierter Baustein für die weitere Synthese zur Verfügung.

Für eine möglichst hohe Effizienz in Bezug auf das eingesetzte Geranylgeraniol, wurde eine Blockkupplung zur Synthese des intern geranylgeranylierten Tetrapeptids anvisiert. Über die Hydroxysuccinimidmethode konnte je nach Ansatzgröße in mäßiger bis hoher Ausbeute aus Fmoc-geschütztem Serin (**30**) und dem prenylierten Cystein **72** das entsprechende kupplungsfähige Dipeptid **73** hergestellt werden (Schema 38). Parallel wurde das als gemischtes Disulfid geschützte Cystein **57** mit Thionylchlorid und Methanol in den Methylester überführt und mit dem Boc-geschützten Serin **75** Carbodiimid/HOBt-vermittelt zum Dipeptid kondensiert. Dieses wurde unter sauren Bedingungen in guten Ausbeuten zu **76** entschützt.



**Schema 38:** Synthese der Dipeptide **73** und **76**.

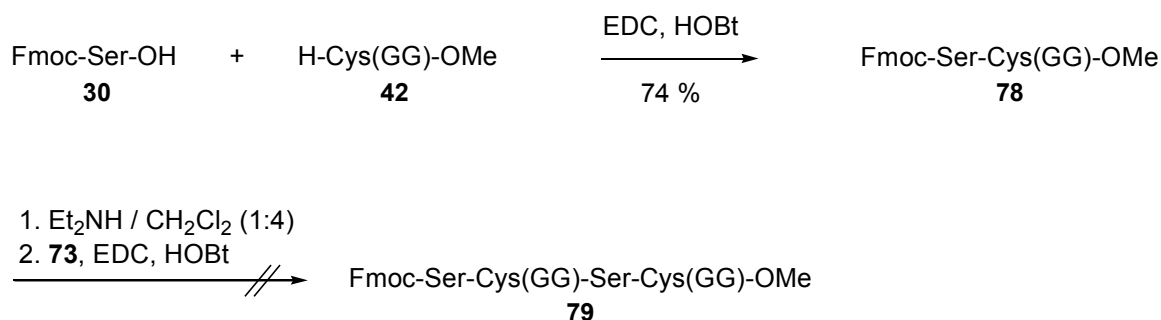
Die anschließende Kupplung der beiden Dipeptide **73** und **76** in Dichlormethan lieferte das intern geranylgeranylierte Tetrapeptid (Schema 39). Dieses konnte aufgrund von Aufreinigungsschwierigkeiten bei Behandlung mit Diethylamin in Dichlormethan nur in mäßiger Ausbeute zum Tetrapeptid **77** entschützt werden.



**Schema 39:** Synthese des intern geranylgeranylierten Tetrapeptids **77**.

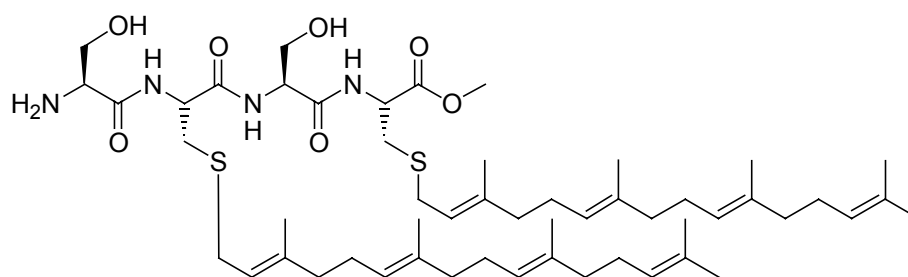
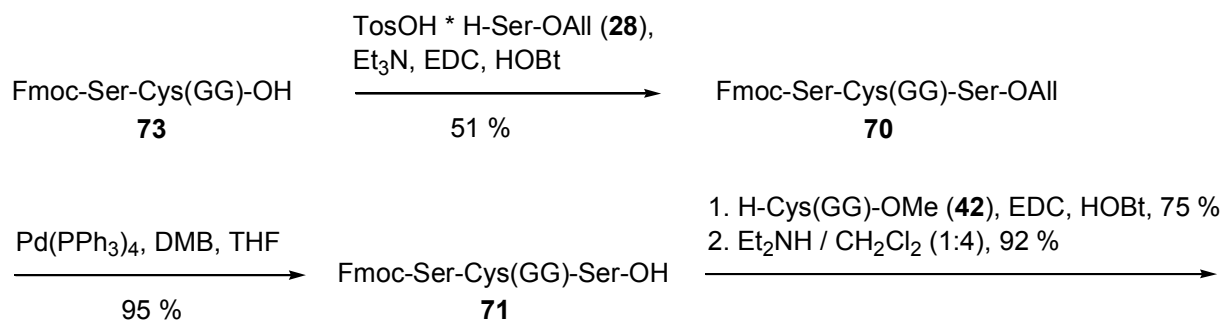
Das doppelt geranylgeranylierte Tetrapeptid sollte über eine analoge Kupplung generiert werden. Dazu wurde zunächst das Fmoc-geschützte Dipeptid **78** hergestellt, das N-terminal entschützt als instabiles Rohprodukt zügig in der Kupplung mit dem Dipeptid **73** eingesetzt wurde (Schema 40). Trotz sehr vorsichtiger Reaktionsführung gelang diese Kupplung jedoch nicht. Stattdessen bildete sich nahezu quantitativ das Diketopiperazin.





**Schema 40:** Versuch zur Darstellung des doppelt prenylierten Tetrapeptids **79**.

Aus diesem Grund wurde das Dipeptid **73** zunächst C-terminal mit L-Serinallylesterhydrotosylat (**28**) zum Tripeptid **70** verlängert (Schema 41). Nach der Pd(0)-vermittelten Allylabspaltung war aufgrund der guten Löslichkeit des prenylierten C-terminal freien Tripeptids **71** in unpolaren Lösungsmitteln eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel unumgänglich. Trotzdem konnten bei dieser Entschützung sehr hohe Ausbeuten erzielt werden. Die Kondensation mit dem geranylgeranylierten Cysteinmethylester **42** führte anschließend zum Tetrapeptid, das sich basisch zu **80** N-terminal deblockieren ließ.



H-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe **80**

**Schema 41:** Synthese des doppelt prenylierten Tetrapeptids **80**.

Insgesamt stellte sich der Aufbau der unterschiedlich geranylgeranylierten Tetrapeptide ausgehend von prenylierten Synthesebausteinen gegenüber der Prenylierung selektiv entschützter Peptide als überlegen heraus:

Das intern geranylgeranylierte Tetrapeptid **77** konnte ausgehend vom eingesetzten Geranylgeranylchlorid in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von bis zu 43 % hergestellt werden. Damit ist diese Syntheseroute effizienter als die vergleichbare Prenylierung selektiv entschützter Peptide, wenn man von ähnlich niedrigen Prenylierungsraten einer entschützten Thiofunktion im Tripeptid **67** (s. 4.5.2.1.; Tabelle 3: <10-20 %) wie auch in einem entsprechenden Tetrapeptid ausgeht.

Die Herstellung der geranylgeranylierten Tripeptide **69** und **70** in der Synthese des doppelt prenylierten Tetrapeptids **80** lässt einen direkten Vergleich beider Synthesestrategien zu. Mit einer Gesamtausbeute von bis zu 33 % über die ersten drei Stufen bzw. von 32 %, zählt man zusätzlich die C-terminale Entschützung hinzu, ist die Effizienz dieser Synthesestrategie größer als die der direkten Prenylierung eines entsprechenden S-deblockierten Tripeptids (s. 4.5.2.1.; Tabelle 3: <10-20 %).

#### **4.5.2.3. Abschließende Synthese des intern und des doppelt geranylgeranylierten Hexapeptids**

Die unterschiedlich geranylgeranylierten Tetrapeptide **77** und **80** wurden EDC/HOBt-vermittelt mit dem Dipeptid **54** zu den entsprechenden Hexapeptiden **81** und **82** kondensiert (Schema 42). Diese wurden abschließend N-terminal mit Diethylamin in Dichlormethan in einem optimierten Verhältnis von 1:3 bzw. 1:2 zu den Zielverbindungen **83** und **84** deblockiert. Deren Aufreinigung erwies sich als äußerst schwierig, da es bei der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel in nicht unerheblichen Maß zur Bildung von nicht weiter charakterisierten Nebenprodukten kam. Erst die Vorbehandlung des Kieselgels mit 1 % Dimethylethylamin in Dichlormethan/Methanol (30:1) und anschließendes Waschen mit Dichlormethan/Methanol (20:1) sowie Dichlormethan führte zu einer problemlosen Reinigung. Im Anschluß an die Chromatographie wurden die Peptide in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Diese Art der Reaktionsführung und der Reinigung führte in hohen Ausbeuten zu den unterschiedlich prenylierten Zielperptiden. Damit standen auch das intern und das doppelt geranylgeranylierte Hexapeptid für die *Expressed Protein Ligation* zur Verfügung.



Abschließend betrachtet konnte eine flexible Strategie entwickelt werden, die einen raschen Zugang zu unterschiedlich modifizierten Hexapeptiden in einer geringen Anzahl an Reaktionsschritten eröffnet.

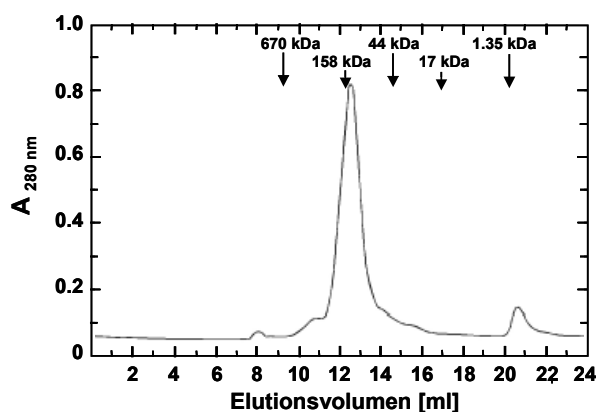
Im Vergleich zu Standardpeptidsynthesen traten bei der Synthese der Zielpeptide häufig unerwartete Schwierigkeiten auf. So bildeten prenylierte Tetrapeptide mit freien Hydroxylgruppen in der Seitenkette der Serine in unpolareneren Lösungsmitteln oftmals Gele, was ihre Handhabung erschwerte. Gut aufgelöste NMR-Spektren in  $\text{CDCl}_3$  konnten aber durch Zusatz einer geeigneten Menge an  $\text{MeOH-d}^4$  erhalten werden. Dies in Verbindung mit der Verwendung geringer Konzentrationen empfahl sich häufig auch bei den entsprechenden Hexapeptiden.

Trotz der Löslichkeitsschwierigkeiten konnten die hergestellten Peptide durch Optimierung der Aufreinigung größtenteils in hohen Ausbeuten isoliert werden. Die Detektion N-terminal freier prenylierter Peptide über HPLC-MS war jedoch nicht möglich.

## 4.6. Synthese unterschiedlich lipidierter fluoreszenzmarkierter Rab7-Proteine durch die *Expressed Protein Ligation*

### 4.6.1. Die Ligation

Die Ligationen der Hexapeptide wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biochem. T. Durek unter reduktiven Bedingungen durchgeführt, d.h. mit Zusatz von MESNA, wie unter 4.4.2. für die Ligrationsreaktion mit Modelltripeptiden beschrieben. Nach erfolgter Ligation präzipitierten die Peptid-Protein-Konjugate. Dies erscheint plausibel, bedenkt man die Unlöslichkeit prenylierter Rab-Proteine im Cytosol, die erst komplexiert mit GDI, vermutlich zum Zweck der Abschirmung der hydrophoben Prenylreste, durch die Zelle transportiert werden. Andererseits wird auch die destabilisierende Wirkung hoher Detergenzkonzentrationen zu der beobachteten Denaturierung der Proteine beitragen. Die Präzipitation konnte jedoch zur Abtrennung des überschüssigen Peptids und des hydrolysierten Thioesters ausgenutzt werden. Überschüssiges Peptid wurde durch mehrmaliges Waschen mit organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Methanol extrahiert, während sich nicht umgesetztes hydrophiles Protein durch Waschen mit Wasser entfernen ließ. In weiteren von Thomas Durek entwickelten Schritten wurden die Peptid-Protein-Konjugate durch Zugabe des chaotropen Reagenzes Guanidiniumhydrochlorid sowie des zwitterionischen nicht-denaturierenden Detergenz CHAPS zunächst gelöst.<sup>[127]</sup> Die Rückfaltung der Proteine erfolgte über ein Verdünnen dieser Lösung mit Puffer. Die Löslichkeitsvermittler wurden anschließend unter dialytischen Bedingungen entfernt. Eine erneute Präzipitation des Peptid-Protein-Konjugats während der Dialyse konnte durch Zugabe einer äquimolaren Menge an REP-1 durch Bildung des binären Komplexes aus semi-synthetischem Protein mit REP-1 verhindert werden.<sup>[127]</sup> Dieser Komplex wurde dann über Größenausschlusschromatographie an Superdex 200 gereinigt (Abb. 13).



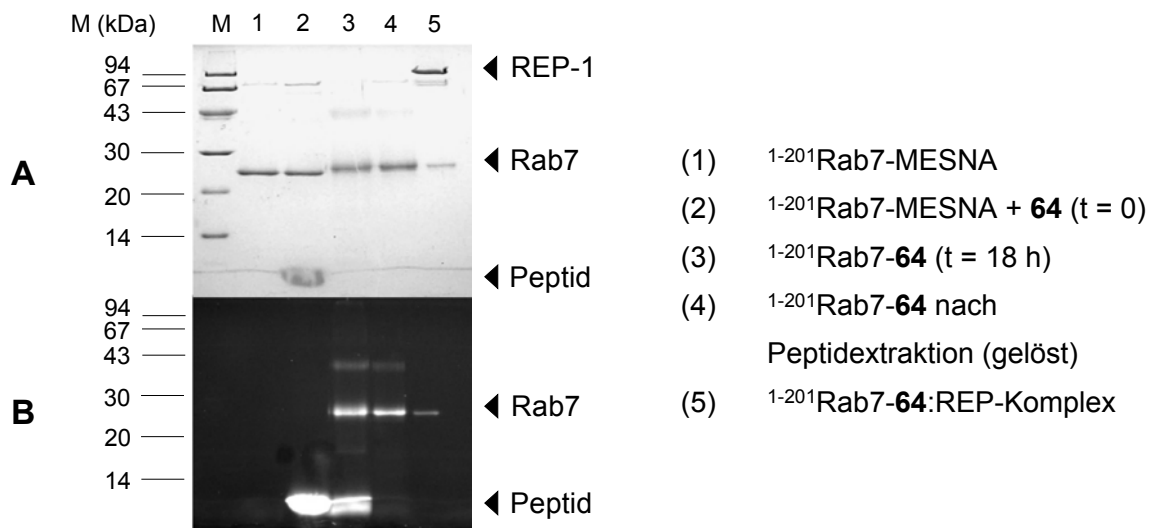
**Abbildung 13:** Reinigung der Komplexe  $^{1-201}$ Rab7-Peptid-Konjugat:REP über eine Superdex 200-Säule am Beispiel von  $^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)SCSC(GG)-OMe:REP.

Der  $^{1-201}$ Rab7-Peptid-Konjugat:REP-Komplex eluierte verglichen mit Proteinstandards bekannter Masse bei ca. 110 kDa. Dies entspricht erfahrungsgemäß einer Stöchiometrie von semi-synthetischem Rab zu REP von 1:1. Die Bildung des binären Komplexes kann als Beweis für die korrekte Faltung der semi-synthetischen Proteine gesehen werden.

Die Proteinkonjugate konnten trotz der aufwändigen Reinigung und der notwendigen Komplexierung mit REP-1 in Ausbeuten von 20-50 % erhalten werden. Je nach eingesetzter Peptidmenge entsprach dies mehreren Milligramm *neo*-Rab7:REP-Komplex. Diese Mengen und die Reinheit der *neo*-Rab7-Proteine komplexiert mit REP-1 sind die besten Voraussetzungen für eine kristallographische Strukturaufklärung. Erste Versuche, die von A. Rak aus der Gruppe von Prof. Dr. R. S. Goody durchgeführt wurden, waren jedoch nicht erfolgreich.

#### 4.6.2. Die Charakterisierung der Proteinkonjugate

Über SDS-PAGE wurde die Reinheit der erhaltenen lipidmodifizierten Proteine geprüft. Die nachfolgende Abbildung 14 zeigt das resultierende Gel, das bei der Auftragung verschiedener Fraktionen aus Ligation und Reinigung der Kupplung von  $^{1-201}$ Rab7-Thioester mit dem Peptid H-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**64**) erhalten wurde.



**Abbildung 14:** SDS-PAGE-Gel mit verschiedenen Fraktionen aus Ligation und Reinigung.

(A: Coomassie® Blau-Färbung; B: UV-Licht)

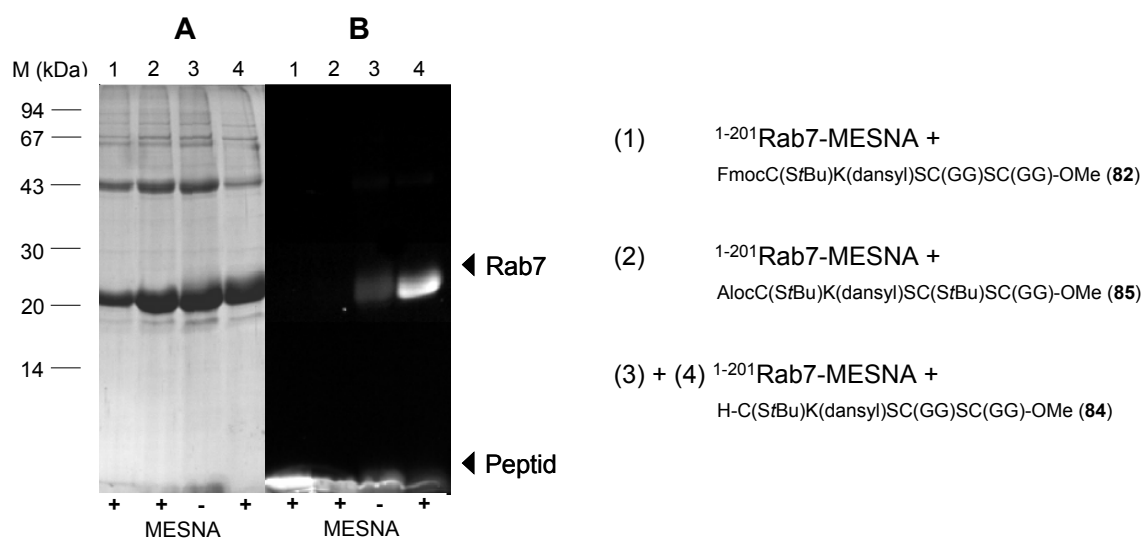
Ein Vergleich von Spur 2 und 3 in Abbildung 14 zeigt, dass direkt nach Zugabe der Kupplungspartner noch kein Ligationsprodukt zu detektieren ist. Generell ist bei Zusatz von MESNA eine Ligation zwar weniger schnell im Vergleich zu Ligationen mit Thiophenol als

Additiv, nach 18 Stunden ist jedoch ein vergleichbarer Umsatz zu verzeichnen.<sup>[98b]</sup> MESNA wurde aufgrund der guten Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen und des geringen Geruchs eingesetzt.

Überschüssiges Peptid ließ sich, wie in Spur 4 zu erkennen, durch Waschen des Ligationsprodukts vollständig entfernen. Der Komplex mit REP-1, der unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE aufgetrennt wird, konnte in sehr reiner Form erhalten werden (Abb. 13; Abb. 14, Spur 5).<sup>[127]</sup> Vergleicht man die Spuren 1 + 2 mit 3 - 5 der Coomassie® Blau-Färbung (Abb. 14, A), lässt sich in diesem Fall der vergleichsweise kleine Massenzuwachs durch die Anbindung des Peptids erkennen.

Mit allen anderen semi-synthetischen Rab7-Proteinen wurden nahezu identische Ergebnisse erzielt.

Die Kontrollreaktionen mit den Peptiden **82**, **84** und **85**, die u.a. aufgrund der ungeschützten Serine im Peptid durchgeführt wurden, zeigen, dass die Ligation ausschließlich mit N-terminal freien Peptiden verläuft, und dass die freien Hydroxylgruppen der Serine unter diesen Bedingungen nicht mit dem Thioester reagieren (Abb. 15, Spur 1 und 2). Der Zusatz von MESNA ist auch hier für einen hohen Umsatz der Ligation essentiell (Abb. 15, Spur 3 und 4).

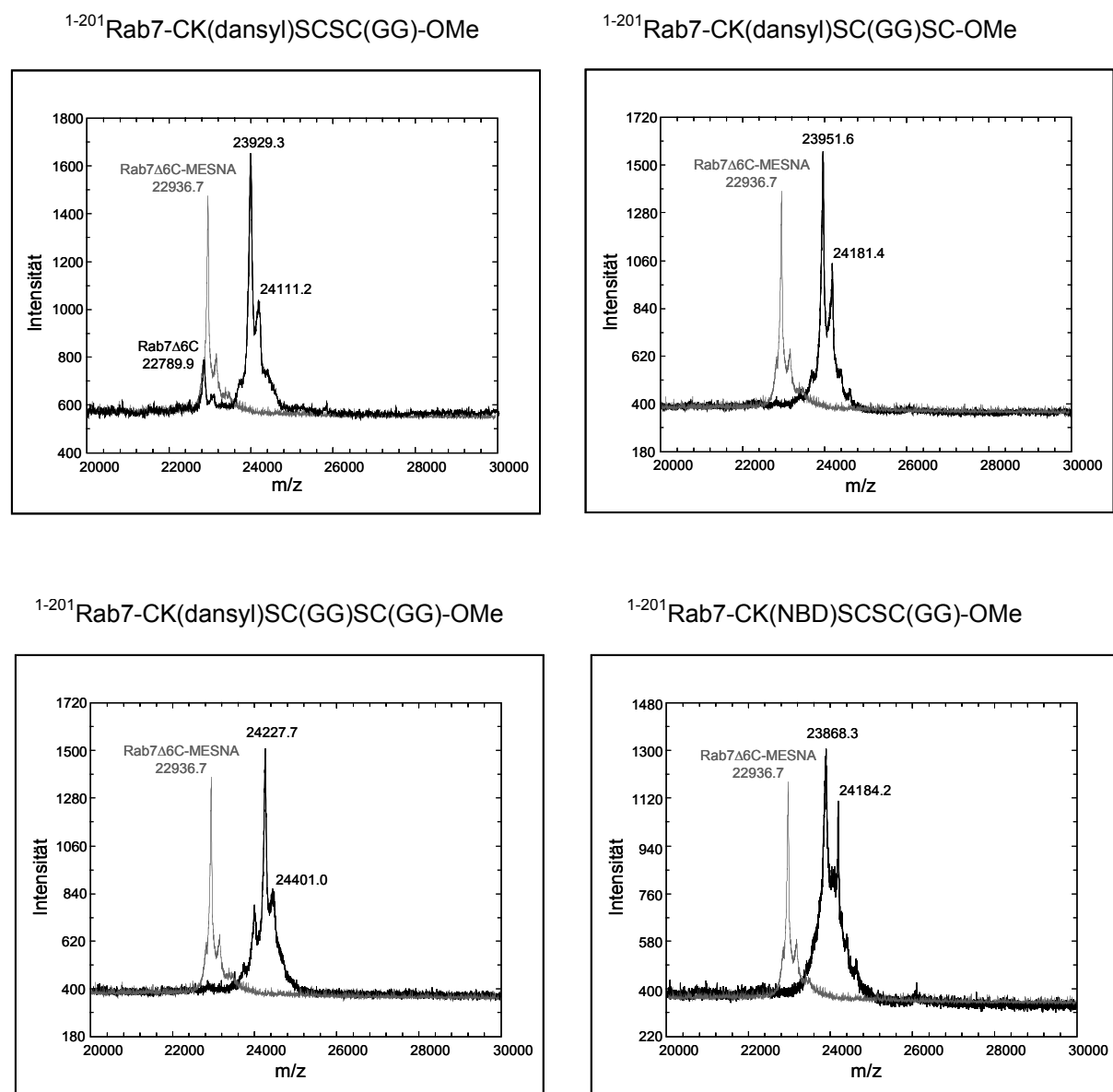


**Abbildung 15:** Kontrollreaktionen.

(A: Coomassie® Blau-Färbung; B: UV-Licht)

Eine weitergehende Analyse der Konjugate wurde massenspektrometrisch vorgenommen. Dabei gestaltete sich die Messung der semi-synthetischen Rab7-Proteine vor der Komplexbildung mit REP-1 sowohl mittels der Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) als auch der MALDI-TOF-Massenspektrometrie - vermutlich

aufgrund des Detergenzgehaltes der Proben - als unmöglich. Auch Reinigung und Entsalzen der Proben vor der Messung mit Hilfe von RP-Kieselgel oder Verwendung besonderer Matrices und Probenpräparationen, die sich bei Messungen in Gegenwart höherer Salz- oder Detergenzkonzentrationen bewährt hatten, führten nicht zum Erfolg.<sup>[132]</sup> Erst der Komplex der semi-synthetischen Proteine mit REP konnte nach Entsalzen über Gelfiltration mittels Centriflex-Kartuschen (EdgeBioSystems) im MALDI-TOF mit ausreichender Auflösung vermessen werden. Die erhaltenen Spektren wurden auf Adenylylcyclase (23 586 Da) und Apomyoglobin (16 953 Da) als Massenstandards kalibriert. Sie sind in der folgenden Abbildung aufgeführt. Eine Übersicht über die Massen gibt Tabelle 5.



**Abbildung 16:** MALDI-TOF-MS der hergestellten Peptid-Protein-Konjugate (schwarz) komplexiert mit REP-1 im Vergleich mit  $^{1-201}$ Rab7-MESNA (grau).



Protein *	[M+H] <sup>+</sup> (berechnet) **	[M+H] <sup>+</sup> (gefunden) **	Differenz
<sup>2-201</sup> Rab7-CK(dansyl)SCSC(GG)-OMe	23 941	23 929	- 12
<sup>2-201</sup> Rab7-CK(dansyl)SC(GG)SC-OMe	23 941	23 952	+ 11
<sup>2-201</sup> Rab7-CK(dansyl)SC(GG)SC(GG)-OMe	24 213	24 228	+ 15
<sup>2-201</sup> Rab7-CK(NBD)SCSC(GG)-OMe	23 870	23 868	- 2

\* <sup>2-201</sup>Rab7: Rab7 (*canis familiaris*) ohne Startmethionin; \*\* molare Masse.

**Tabelle 5:** Berechnete und gefundene Massen der semi-synthetischen Proteine.

In den Massenspektren der semi-synthetischen Proteine finden sich vor allem zwei Peaks. Diese entsprechen dem jeweiligen Molpeak des Proteins ohne Startmethionin (größerer Peak) und einem Matrixaddukt (kleinerer Peak). Das Fehlen des Startmethionins ist bei Proteinen ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Auch im Spektrum des eingesetzten Rab7-Thioesters lässt sich nur dieser Peak finden, was auf eine nahezu vollständige Abspaltung dieser ersten Aminosäure hindeutet.

Als Matrix wurde 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure (Sinapinsäure,  $M_r = 224 \text{ g mol}^{-1}$ ) verwendet. Wie auch in den Spektren der Proteinstandards oder des Rab7-Thioesters treten in den Spektren der Peptid-Protein-Konjugate Matrixaddukte ( $M + 224$ ) auf, die häufig aufgrund einer schlechteren Auflösung dieser Peaks größere Massenabweichungen zeigen.

Nur im Spektrum der Probe des C-terminal geranylgeranylierten dansylmarkierten Proteins findet sich noch ein sehr kleiner Anteil an hydrolysiertem Thioester. Die Reinigung der semi-synthetischen Proteine war demnach in allen Fällen erfolgreich verlaufen. Dies unterstreicht einmal mehr die sehr hohe Effizienz der angewandten Reinigungsmethode.

Die Peaks in den Spektren des doppelt geranylgeranylierten Proteins und des NBD-markierten, C-terminal prenylierten Proteins erscheinen aus verschiedenen Gründen verbreitert. Im ersten Fall wirkt sich die Schwierigkeit, Massen hydrophober Proteine zu messen, vermutlich besonders stark aus, während im zweiten Fall der Fluoreszenzmarker eine schlechtere Auflösung bedingt. Dies war vorher schon bei Messungen NBD-markierter Peptide beobachtet worden.

Nach der Kalibrierung liegen die Massenabweichungen von - 2 bis + 15 im Rahmen von Messungenauigkeiten. Sie zeigen deutlich, dass nicht nur die Ligationen erfolgreich waren, sondern auch, dass offenbar alle während der Ligation reaktiv freizusetzenden Cysteine nach der Ligation deblockiert vorliegen.

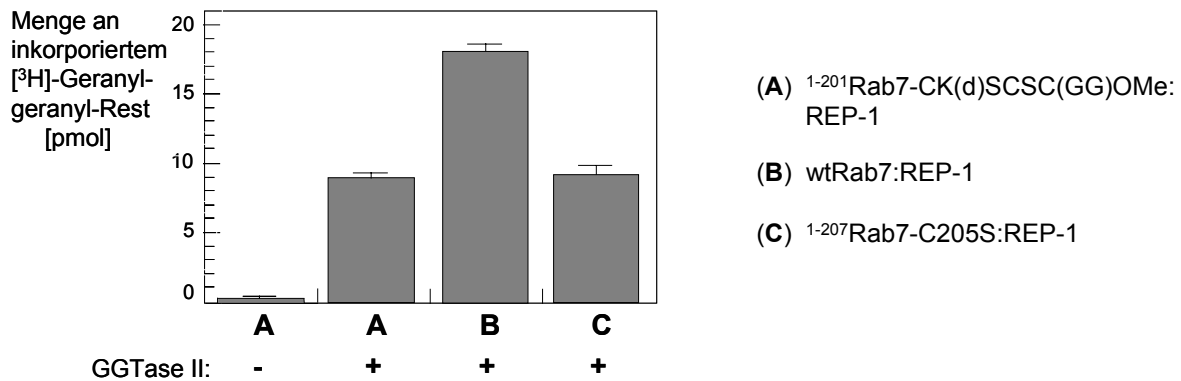
## 4.7. Evaluation und Einsatz der semi-synthetischen Rab7-Proteine in biophysikalischen und molekularbiologischen Studien

In biophysikalischen und weiteren Studien wurden die Eigenschaften der hergestellten *neo*-Rab7-Proteine untersucht. Bisherige Experimente wurden von Dr. Kirill Alexandrov und Thomas Durek im Rahmen dieses Projekts durchgeführt und werden in ausführlicher Form in der Dissertation von Thomas Durek vorgestellt werden. Die ersten Resultate sollen hier kurz präsentiert werden.

### 4.7.1. Die *in vitro* Geranylgeranylierung

Bei allen semi-synthetischen Proteinen befindet sich an Position 202, d.h. am Ort der Verknüpfung, ein freies Cystein. Die monoprenylierten *neo*-Rab7-Proteine besitzen zusätzlich im C-terminalen Bereich ein weiteres freies Cystein an Position 205 oder 207. Zur Evaluation der semi-synthetischen Proteine sollte ihre Fähigkeit untersucht werden, in der von der GGTase II-katalysierten Geranylgeranyltransferreaktion als Prenylakzeptoren zu fungieren. Dazu wurde die Menge an radioaktivmarkiertem Geranylgeranyl-Rest bestimmt, der GGTase II katalysiert inkorporiert wird. Zum Vergleich wurden das unmodifizierte wt<sup>1-207</sup>Rab7 und eine nur einfach prenylierbare Serinmutante, <sup>1-207</sup>Rab7C205S, in der Prenylierung eingesetzt. Die Reaktion wurde analog einem GGTase II-Aktivitätsassay *in vitro* durchgeführt.<sup>[133]</sup> Dabei wurde zunächst das C-terminal geranylgeranylierte Peptid-Protein-Konjugat untersucht. Dessen Komplex mit REP-1 wurde in Prenylierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 3 mM Nonidet P-40) mit GGTase II und [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranylpyrophosphat versetzt. Nach Inkubation bei 37° C wurde die Mischung über Glasfaser-Filter filtriert, die nach mehrmaligem Waschen mit Ethanol in eine Szintillations-Lösung überführt wurden. Diese Mischung wurde mittels eines Szintillationszählers vermessen. Mit den Vergleichsproteinen wurde in analoger Weise verfahren. Anhand der Ergebnisse, die in Abbildung 17 aufgeführt sind, lässt sich folgendes feststellen:

Die GGTase II erkennt das semi-synthetische Rab7-Protein, das C-terminal geranylgeranyliert ist, in Komplex mit REP-1 als Substrat. Dabei entsprach die Menge an eingebautem Geranylgeranylrest fast der Hälfte der Menge, die im Fall des doppelt prenylierbaren wt<sup>1-207</sup>Rab7 detektiert wurde, und fast genau der Menge, die im Fall der Serinmutante, <sup>1-207</sup>Rab7C205S, detektiert wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass über 90 % des semi-synthetischen Proteins korrekt gefaltet und aktiv sind. Zudem deuten die Mengenverhältnisse darauf hin, dass kein dritter Prenylrest eingebaut wird.



**Abbildung 17:** *In vitro* Prenylierung mit [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranylpyrophosphat.

Die Frage, ob neben dem <sup>205</sup>Cys aus dem CXC-Motiv auch das „Ligations“-Cystein, <sup>202</sup>Cys, modifiziert wird, lässt sich anhand dieser Daten wie folgt diskutieren:

Die Menge an inkorporiertem [<sup>3</sup>H]-GGPP deutet darauf hin, dass auf das semi-synthetische Protein nur ein weiterer Prenylrest übertragen wird. Bekannt ist, dass die GGTase II Cysteine an verschiedenen Positionen innerhalb eines kurzen Bereichs ausgehend vom C-Terminus modifizieren kann. Demzufolge kann allein aufgrund der obigen Daten nicht ausgeschlossen werden, dass bei der *in vitro* Prenylierung auch doppelt prenylierte Proteine mit einem [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranylrest an <sup>202</sup>Cys entstanden ist.

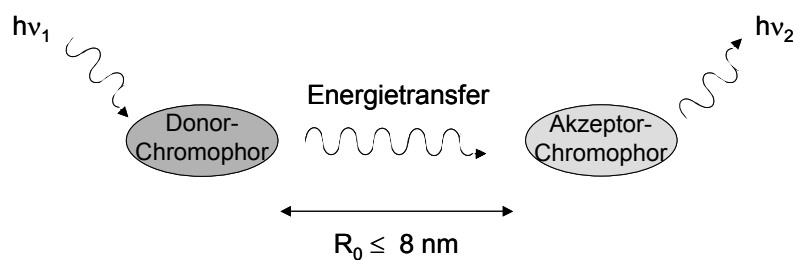
Für die alleinige oder zumindest bevorzugte Modifizierung des <sup>205</sup>Cys aus dem CXC-Motiv spricht, dass die C-terminalen Prenylierungsmotive der Rab-Proteine auf fünf Aminosäuren begrenzt zu sein scheinen, da bislang kein längeres als das CCXXX-Motiv (s. z.B. Rab30 (<sup>199</sup>CCNFN)) gefunden werden konnte. Sterisch ließe sich dies über die begrenzte Kapazität u.a. eines hydrophoben Tunnels in der GGTase II erklären, der einer neueren Theorie zufolge verschieden lange Abschnitte des ersten als Thioether gebundenen Geranylgeranylrestes aufnimmt, so dass unterschiedlich positionierte Cysteine an das katalytische Zentrum gelangen können.<sup>[134]</sup> Das „Ligations“-Cystein, <sup>202</sup>Cys, befindet sich jedoch an Position 6 ausgehend vom C-terminalen prenylierten <sup>207</sup>Cys.

Aufschluss über diese Fragestellung sollte erst der Einsatz des doppelt geranylgeranylerten *neo*-Rab7-Proteins geben können. Die Untersuchungen dieses und der anderen Peptid-Protein-Konjugate dauern noch an.

#### 4.7.2. Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen

Über den Energietransfer zwischen zwei entsprechend platzierten kovalent verknüpften Fluorophoren lässt sich *in vitro* und *in vivo* die konformative Änderung von Proteinen oder

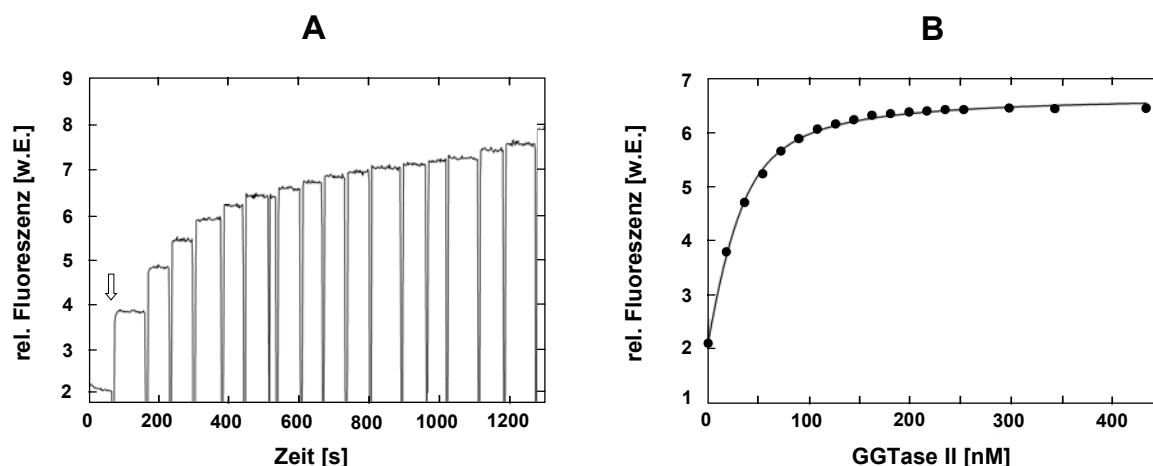
ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen verfolgen.<sup>[135]</sup> Dieser als FRET (*fluorescence resonance* (bzw. Förster) *energy transfer*) bezeichnete Energietransfer erfolgt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und ist distanzabhängig. Er kann über das Auftreten der Akzeptorfluoreszenz oder über das Auslöchen der Donorfluoreszenz detektiert werden (Abb. 18). Grundvoraussetzung ist neben der Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum die relative räumliche Nähe beider Fluorophore zueinander. Mit der Messung dieses Energietransfers lassen sich daher intra- oder intermolekulare Distanzen zwischen Proteinen und ihren Liganden oder innerhalb eines Proteins, wie z.B. im Fall von Konformationsänderungen, bestimmen.



**Abbildung 18:** Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).

Ein entsprechender Fluoreszenzassay wurde in der Gruppe von Prof. Dr. R. S. Goody entwickelt und zum Studium der Bildung des ternären Komplexes aus Rab, REP-1 und der GGTase II verwendet.<sup>[43]</sup> Durch die Komplexbildung kommt ein kovalent im C-terminalen Bereich des Rab-Proteins angebundener Dansylrest in die räumliche Nähe eines Tryptophans. Dieses muss nicht aus der GGTase II stammen, sondern kann auch bedingt durch konformelle Änderungen, die die Komplexbildung begleiten, dem REP-1 oder dem Rab-Protein selbst zugehören. Wird das Tryptophan, das ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und ein Emissionsmaximum bei 360 nm besitzt, bei 280 nm angeregt, dann wird im Fall der räumlichen Nähe zu einem Dansylfluorophor (Absorptionsmaximum bei 340 nm; Emissionsmaximum bei 500 nm) die Fluoreszenz des Dansylrests beobachtet. Durch diese Messung lässt sich die Komplexbildung quantifizieren.

Zur Fluoreszenztitration wurde der binäre Komplex aus dansylmarkiertem *neo*-Rab7-Protein und REP-1 in definierter Konzentration in einer Küvette vorgelegt. Die Fluoreszenzänderung bei 495 nm wurde unter Anregung bei 280 nm mit sukzessiv steigender Konzentration an GGTase II verfolgt (Abb. 19; A).



**Abbildung 19:** Fluoreszenztitration, beispielhaft am Komplex

$^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)-SC(GG)SC(GG)-OMe:REP-1 gezeigt.

(Der Pfeil in A bezeichnet den Zeitpunkt der ersten Zugabe von GGTase II. Bei jeder erneuten Zugabe bricht die Fluoreszenz durch Öffnen des Spektrometers ein. Die Konzentration des vorgelegten binären Komplexes aus  $^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)-SC(GG)SC(GG)-OMe:REP-1 betrug 100 nM.)

Diese Versuchsführung wie auch die umgekehrte Durchführung, in der die GGTase II vorgelegt wurde, ergab nach jeder Zugabe des jeweiligen Komplexpartners einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz, der insgesamt ein Sättigungsniveau erreichte.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzanstiege, die nach jeder Zugabe einer definierten Menge an GGTase II auftraten, gegen die Konzentration der zugegebenen GGTase II resultierte in einer Kurve, aus der sich die Dissoziationskonstante des Komplexes errechnen ließ (Abb. 19; B). In Tabelle 6 sind die einzelnen Dissoziationskonstanten der ternären Komplexe mit dem doppelt prenylierten und den einfach prenylierten semi-synthetischen Rab7-Proteinen aufgeführt.

ternärer Komplex	$K_D$ [nM]	$k_{diss}$ [ $s^{-1}$ ]
$^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)SCSC-OH:REP-1:GGTase II	111 <sup>[126]</sup>	-
$^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)SCSC(GG)-OMe:REP-1:GGTase II	$6.6 \pm 2.0$	$0.0265 \pm 0.001$
$^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)SC(GG)SC-OMe:REP-1:GGTase II	$35 \pm 7$	$0.0234 \pm 0.001$
$^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)SC(GG)SC(GG)-OMe:REP-1:GGTase II	$13 \pm 1$	$0.0191 \pm 0.001$

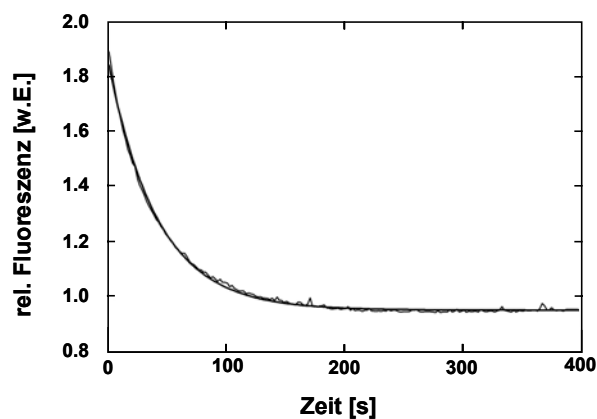
**Tabelle 6:**  $K_D$ - und  $k_{diss}$ -Werte der unterschiedlichen ternären Komplexe.

Alle  $K_D$ -Werte der ternären Komplexe aus prenyliertem semisynthetischen Rab7, REP-1 und

der GGTase II liegen im nanomolekularen Bereich. Die GGTase II besitzt demnach eine sehr hohe Affinität für binäre Komplexe aus intern oder C-terminal monoprenyliertem, aber auch doppelt prenyliertem Rab7-Protein und REP-1. Dies war u.a. aus Untersuchungen mit Serinmutanten bekannt<sup>[50]</sup> und konnte hier erstmals an prenylierbaren Reaktionsintermediaten gezeigt werden. Erst bei Zugabe weiteren GGPPs würde im Fall des doppelt prenylierten semi-synthetischen Rab7-Proteins die Dissoziationskonstante des ternären Komplexes stark ansteigen.<sup>[136]</sup>

Nach dem ersten Geranylgeranyltransfer sind zwei Möglichkeiten vorstellbar: Entweder bleibt der binäre Komplex aus monoprenyliertem Rab-Protein und REP-1 an die GGTase II gebunden, während die Prenylbindungsstelle mit einem zweiten Geranylgeranylpyrophosphat besetzt wird, oder aber es findet eine zeitweilige Dissoziation des ternären Komplexes statt (s. 2.2.3). Bestimmend für das eine oder andere Szenario ist das Verhältnis aus Geschwindigkeit des zweiten Prenyltransfers und der Geschwindigkeit der Dissoziation des ternären Komplexes.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation der fluoreszierenden ternären Komplexe wurde über die Messung der Abnahme des FRET-Signals bei Zugabe eines 16fachen Überschusses an enzymatisch doppelt prenyliertem, nicht-fluoreszenten wtRab7:REP-1-Komplex bestimmt (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des ternären Komplexes. (Beispielhaft am Komplex  $^{1-201}$ Rab7-CK(dansyl)-SC(GG)SC-OMe:REP:GGTase II gezeigt. T = 25° C.)

Die  $k_{\text{diss}}$ -Werte der einzelnen Komplexe sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Aus den  $k_{\text{diss}}$ -Werten der *monoprenylierten* Komplexe geht hervor, dass der zweite Prenyltransfer, der mit einer Geschwindigkeit von  $0.04 \text{ s}^{-1}$  verläuft,<sup>[50]</sup> etwas schneller ist als die Dissoziation des Komplexes. Eine temporäre Dissoziation des Komplexes zwischen dem

ersten und dem zweiten Prenyltransfer schließt sich demzufolge aus. Ein Vergleich der  $k_{\text{diss}}$ -Werte mit den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten des Prenyltransfers auf die unterschiedlich monogeranylgeranylierten *neo*-Rab7-Proteine sollte hier zu einem genaueren Ergebnis führen. Deren Bestimmung über einen Prenylierungsassay, der zur Zeit mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten semi-synthetischen Rab7-Proteine entwickelt wird, steht jedoch noch aus.<sup>[127]</sup>

Zusammenfassend ist festzustellen, dass erstmals definiert mit einem niedermolekularen Fluorophor ausgestattete unterschiedlich prenylierte Rab-Protein-Analoga hergestellt werden konnten. Sowohl das fluoreszenzmarkierte vollständig modifizierte <sup>1-207</sup>Rab7-Protein-Analogon, als auch die einfach geranylgeranylierten *prenylierbaren* Analoga der Reaktionsintermediate aus der Prenyltransferreaktion waren bisher über rein molekularbiologische Methoden nicht zugänglich. Die stattdessen verwendeten einfach prenylierbaren Serinmutanten wurden - vermutlich aufgrund ihrer schwächeren Bindung an das  $\text{Zn}^{2+}$ -gebundene katalytische Zentrum der GGTase II - verglichen mit den Ergebnissen anderer Experimente langsamer prenyliert als erwartet.<sup>[50]</sup> Erstmals können mit den vorliegenden semi-synthetischen Rab7-Proteinen die kinetischen Parameter des doppelten Geranylgeranyltransfers vollständig und einzeln bestimmt werden.

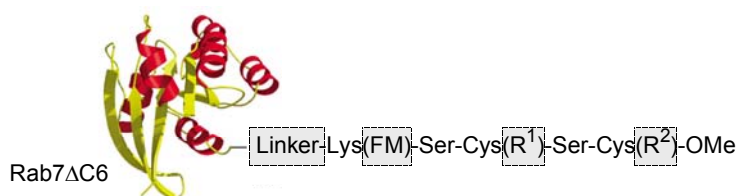
Alle diese Resultate sprechen für den hohen Wert der dargestellten Peptid-Protein-Konjugate beim Studium der Rab-Proteine. In gegenwärtigen Arbeiten mit den semi-synthetischen Proteinen, die ebenfalls von Thomas Durek durchgeführt werden, sollen zusätzliche Erkenntnisse über den molekularen Ablauf des Geranylgeranyltransfers gewonnen werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Bedeutung der Chemie für ihre Nachbardisziplinen ist immens. Nicht zuletzt der Einsatz kleiner, wohldefinierter Verbindungen führte in der Erforschung biologischer Phänomene bis hinunter auf die molekulare Ebene und so zu einer äußerst positiven Entwicklung der Medizin und Biologie. Ein relativ neues Untersuchungsgebiet der „Chemischen Biologie“ ist der intrazelluläre Vesikeltransport, der entscheidend von den Rab-Proteinen reguliert wird. Fast jedes der über 50 unterschiedlichen menschlichen Rab-Proteine ist zur essentiellen Membranbindung an zwei Cysteinen eines kurzen C-terminalen Motivs geranylgeranyliert (C<sub>20</sub>-Isopren). Bei einigen liegt der C-Terminus zusätzlich als Methylester vor. Während der Prozess der Prenylierung bei Ras-Proteinen weitgehend verstanden ist und sich Inhibitoren der Farnesyl(C<sub>15</sub>-Isopren)-transferase in den ersten klinischen Phasen befinden, ist das Verständnis des doppelten Geranylgeranyltransfers auf Rab-Proteine, der von der Geranylgeranyltransferase II katalysiert wird, wie auch des intrazellulären Vesikeltransports insgesamt noch äußerst lückenhaft.

### 5.1. Zusammenfassung

Zur detaillierteren Untersuchung der genannten Prozesse ist im Rahmen dieser Arbeit die Synthese fluoreszenzmarkierter und prenylierter C-terminaler Rab-Fragmente ausgearbeitet worden, die anschließend mit C-terminal verkürztem Rab7-Protein über ein geeignetes Linkersystem zu semi-synthetischen Proteinen verknüpft werden konnten (Abb. 21). Neben dem Einsatz der etablierteren Maleinimidocaproyl(MIC)-vermittelten Kupplung<sup>[81]</sup> kam dabei erstmals die *Expressed Protein Ligation* (EPL)<sup>[91b;92]</sup> zur Synthese lipidierter Proteinkonjugate zum Einsatz. Insgesamt wurde über diesen Ansatz ein flexibler Zugang zu unterschiedlich modifizierten Rab-Proteinen gefunden, der über die klassischen molekularbiologischen Methoden nicht realisierbar ist.



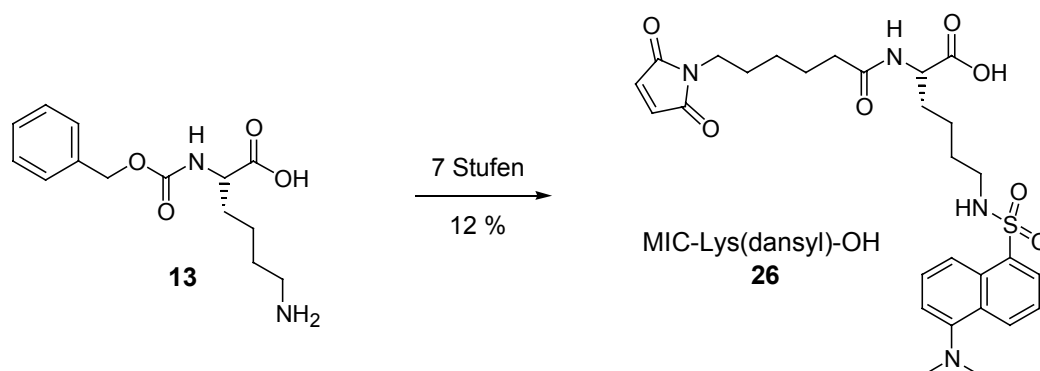
Linker = MIC-	<b>MIC-Ligation</b>	R <sup>1</sup> = GG, R <sup>2</sup> = GG	doppelt geranylgeranyliert
Linker = H-Cys-	<b>Expressed Protein Ligation</b>	R <sup>1</sup> = (H), R <sup>2</sup> = GG	C-terminal geranylgeranyliert
		R <sup>1</sup> = GG, R <sup>2</sup> = (H)	intern geranylgeranyliert

FM (Fluoreszenzmarker) = mant, dansyl, NBD

**Abbildung 21:** Allgemeine Struktur der Zielproteine der vorliegenden Arbeit.

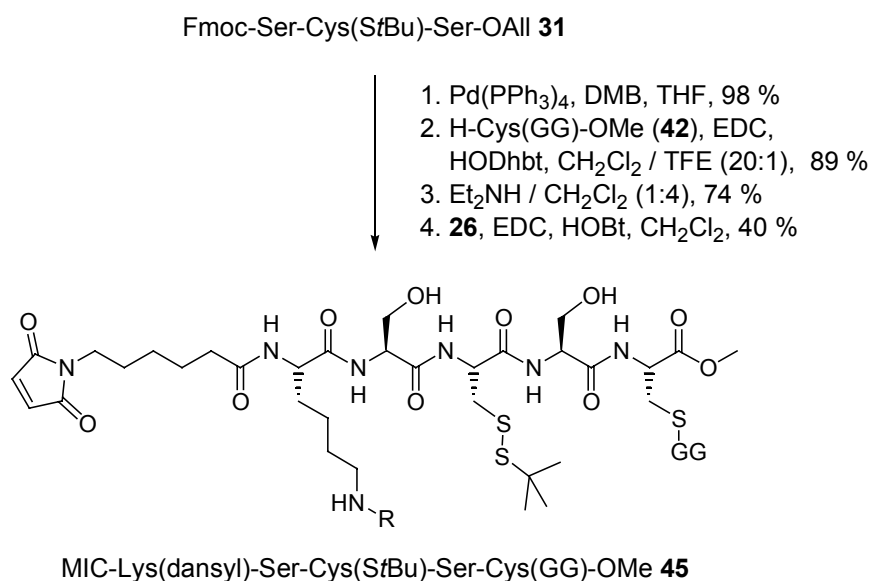


Die Darstellung der Peptide begann mit der Synthese eines C-terminal geranylgeranylierten Pentapeptids für die MIC-Ligation. Ausgehend von  $N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl(Cbz)-geschütztem L-Lysin (**13**) wurde zunächst der fluoreszenzmarkierte Lysinbaustein  $N^{(\alpha)}$ -MIC- $N^{(\epsilon)}$ -(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-L-lysin (**26**) über 7 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 12 % synthetisiert (Schema 43).



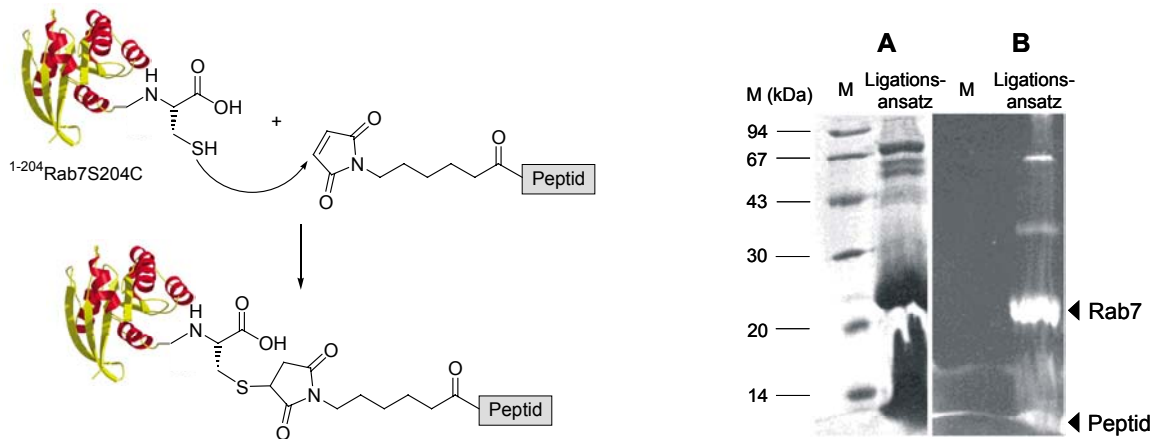
**Schema 43:** Synthese von  $N^{(\alpha)}$ -MIC- $N^{(\epsilon)}$ -dansyl-L-lysin (**26**).

Die Synthese des Pentapeptids **45** konnte trotz der freien Hydroxylgruppen der Serine und dadurch bedingter Ausbeuteverluste<sup>[71a,c]</sup> unter Verwendung von EDC/HOBt bzw. EDC/HODhbt effizient durchgeführt werden (Schema 44). Ausgehend von Tripeptid **31**, war das Pentapeptid **45** durch eine Reaktionssequenz bestehend aus  $\text{Pd}^0$ -vermittelter Allylabsplung, Kettenverlängerung mit geranylgeranyliertem Cysteinmethylester, N-terminaler Deblockierung und Kupplung mit dem dansylmarkierten Lysin **26** zugänglich.



**Schema 44:** Synthese des C-terminal prenylierten dansylmarkierten MIC-Pentapeptids **45**.

Das Pentapeptid **45** wurde nachfolgend erfolgreich unter Verwendung des Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Löslichkeitsvermittler mit dem verkürzten  $1-204$ Rab7S204C-Protein verknüpft. Über seine Fluoreszenz konnte das Peptid-Protein-Konjugat im SDS-PAGE-Gel detektiert werden (Schema 45).



**Schema 45:** Anknüpfung des dansylierten Pentapeptids **45** an  $1-204$ Rab7S204C.  
(A: Coomassie® Blau-Färbung, B: UV-Licht)

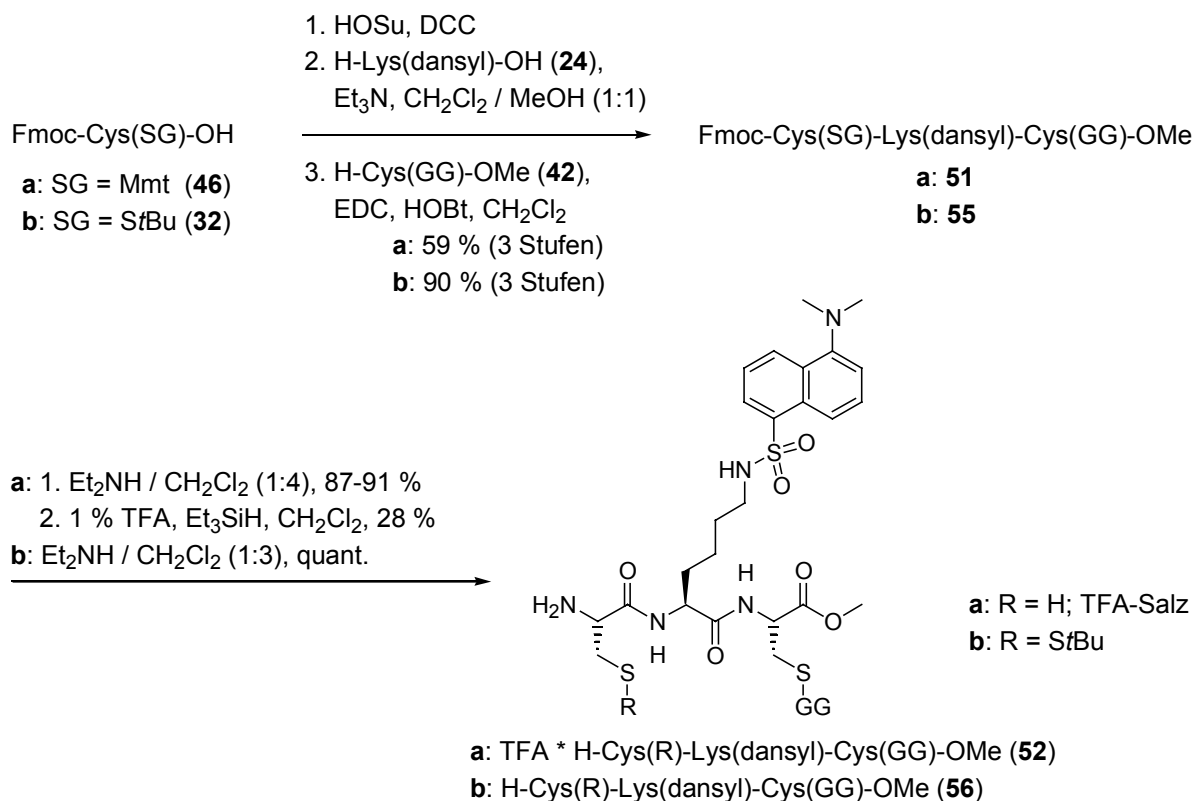
Aufgrund des großen Interesses an semi-synthetischen Proteinen mit einem durchgängigen Peptidrückgrat und eigenen Fortschritten auf dem Gebiet der *Expressed Protein Ligation* wurde an dieser Stelle das Projekt der MIC-vermittelten Ligation abgeschlossen.

Zur Entwicklung der EPL mit prenylierten Peptiden als Kupplungskomponente wurde zunächst ein Testsystem fluoreszenzmarkierter, geranylgeranylierter Modelltripeptide entworfen. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde eine Schutzgruppenstrategie für prenylierte Peptide mit freiem N-Terminus erarbeitet und die für die EPL erforderlichen Bedingungen bestimmt.

Die Synthese der unterschiedlich geschützten Modelltripeptide ging von *N*- und *S*-blockierten Cysteinen aus, die über die Hydroxysuccinimidmethode mit  $N^{(6)}$ -Dansyl-L-lysin (**24**) kondensiert wurden. Die erhaltenen Dipeptide wurden EDC/HOBt-vermittelt mit geranylgeranyliertem Cysteinmethylester (**42**) zu Tripeptiden kondensiert und anschließend unter milden Bedingungen entschützt (Schema 46).

Die Entwicklung einer für die Freisetzung N-terminaler Cysteine besonders geeigneten sauren Abspaltungsmethode war durch die ausgeprägte Säurelabilität des Geranylgeranylrestes erschwert. Das Problem der Additionsanfälligkeit der Isoprenylgruppe konnte erst durch die Verwendung hochsäurelabiler Schutzgruppen, wie des *para*-Methoxytritylrestes, weitgehend

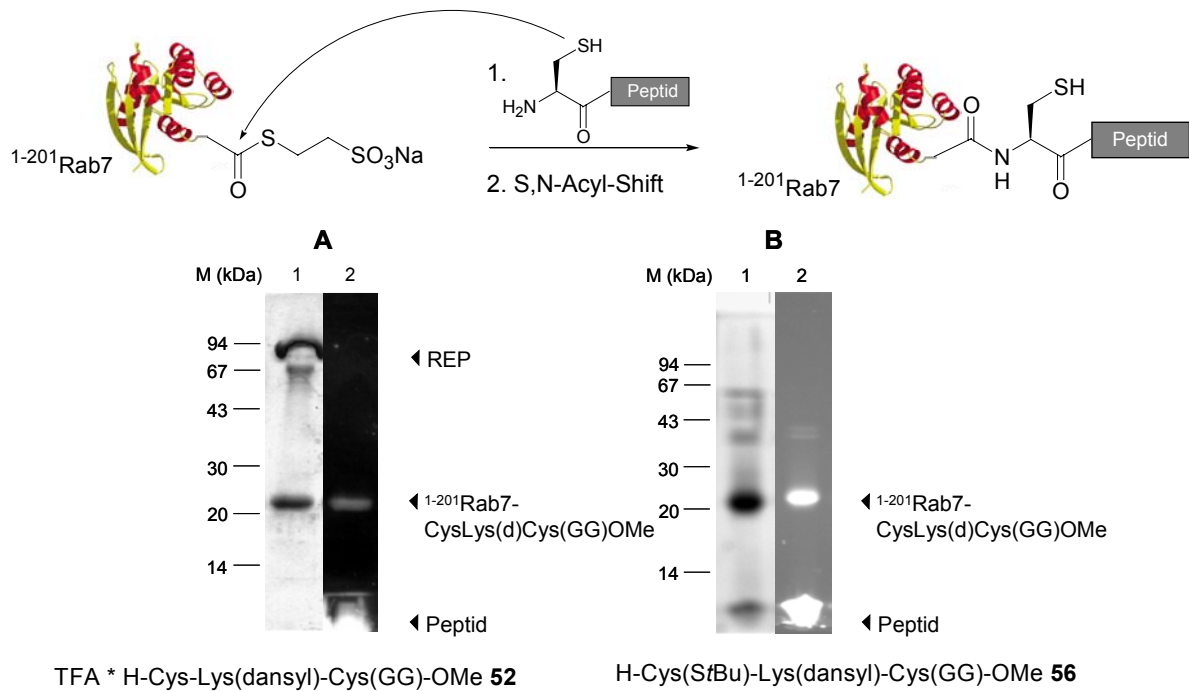
gelöst werden, dessen Abspaltung zum vollständig entschützten Tripeptid **52** führte (Schema 46; a). Als besonders erfolgreich stellte sich das parallel untersuchte Konzept der reduktiven *in situ*-Entschützung der Thiolgruppe während der Ligation heraus.<sup>[97]</sup> Das dafür benötigte als *S-tert*-Butyldisulfid geschützte Tripeptid **56** konnte in einer sehr hohen Gesamtausbeute von 90 % über 4 Stufen synthetisiert werden (Schema 46; b).



**Schema 46:** Synthese der Modelltripeptide **52** und **56**.

In Zusammenarbeit mit Dipl. Biochem. T. Durek und Dr. K. Alexandrov aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody vom Max-Planck-Institut in Dortmund wurden die Testpeptide **52** und **56** mit <sup>1-201</sup>Rab7-MESNA-Thioester, der unter Ausnutzung eines selbst-splicenden Systems (Intein) hergestellt worden war, in einer zu der von KENT et al. etablierten *Native Chemical Ligation*<sup>[83]</sup> analogen Reaktionssequenz erfolgreich verknüpft.<sup>[127]</sup>

Die Ligation konnte allerdings unter Standardbedingungen nicht erreicht werden. Erst nach aufwändiger Bestimmung einiger weniger geeigneter Additive, wie dem kationischen Detergenz CTAB, wurde die Synthese von Peptid-Protein-Konjugat über diese Methode möglich. Der Erfolg der Ligation ließ sich unmittelbar über die Fluoreszenz des semi-synthetischen Proteins im SDS-PAGE-Gel bestimmen (Schema 47).



**Schema 47:** Anknüpfung der dansylierten Modellpeptide **52** und **56** an  $1\text{-}^{201}\text{Rab7-MESNA}$ .

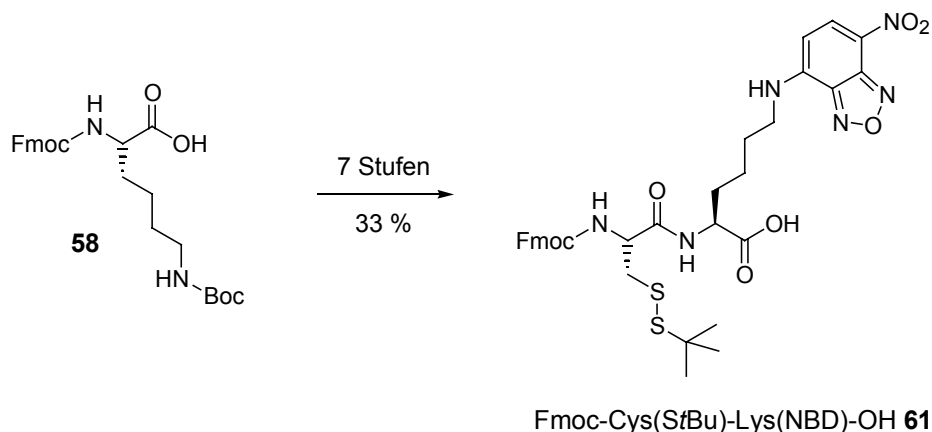
(A: Ligation unter nicht-reduktive Bedingungen; aufgetragen: Ligationsprodukt komplexiert mit REP; B: Ligation unter Zusatz von MESNA; 1: Coomassie® Blau-Färbung; 2: UV-Licht)

Die Ligation des vollständig entschützten Modellpeptids und des S-blockierten Modellpeptids - dann unter reduktiven Bedingungen durch den Zusatz von MESNA - verlief vergleichbar gut. Die unterschiedlich prenylierten Hexapeptide wurden daraufhin entsprechend dem Konzept der *in situ*-Reduktion *S-tert*-Butyldisulfid-blockierter Cysteine synthetisiert.

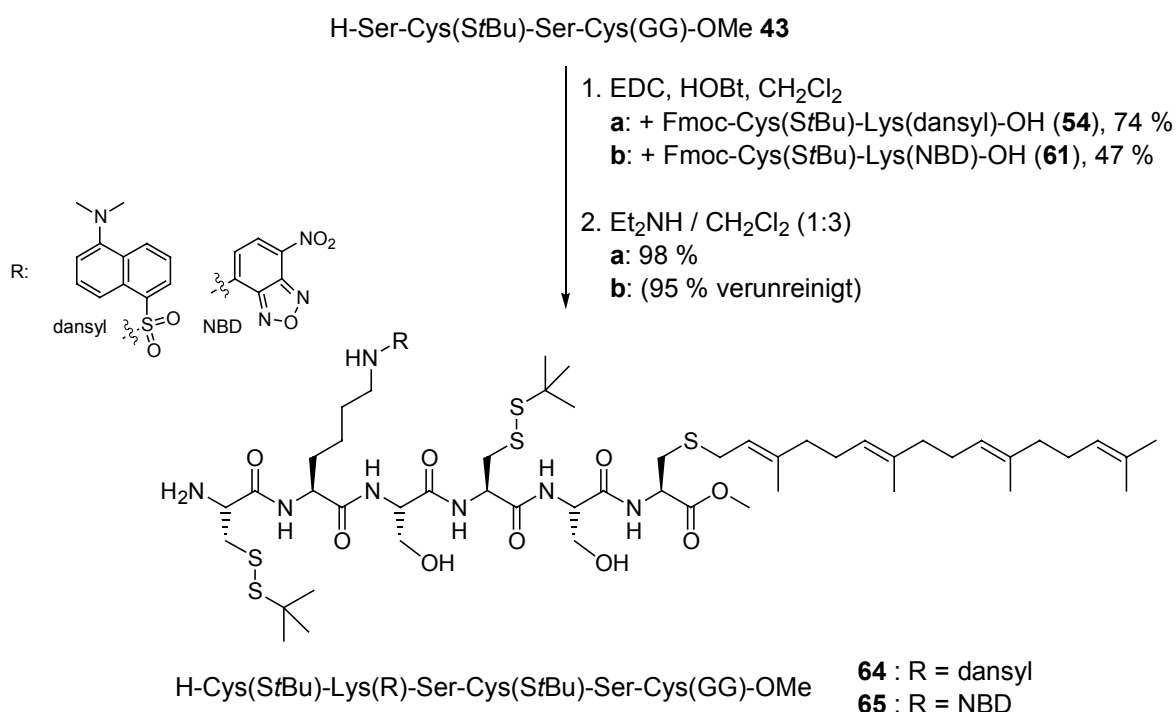
Neben dem Dansylrest für spätere Fluoreszenzassays war es geplant, die prenylierten Hexapeptide auch mit dem für zellbiologische Untersuchungen besonders geeigneten 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl(NBD)-Rest zu modifizieren.

Die Synthese eines entsprechenden NBD-markierten Dipeptids, das anschließend mit unterschiedlich prenylierten Tetrapeptiden verknüpft werden sollte, gelang ausgehend von  $N^{(\alpha)}$ -Fmoc- und  $N^{(\epsilon)}$ -Boc-geschütztem L-Lysin (**58**) über 7 Stufen in einer Gesamtausbeute von 33 % (Schema 48).

Durch Kondensation des C-terminal geranylgeranylierten Tetrapeptids **43** mit dem dansyl-markierten Dipeptid **54** (s. Schema 46) respektive dem NBD-markierten Dipeptid **61** und nachfolgende Entschützung wurden die ersten Zielpeptide für die EPL hergestellt (Schema 49).



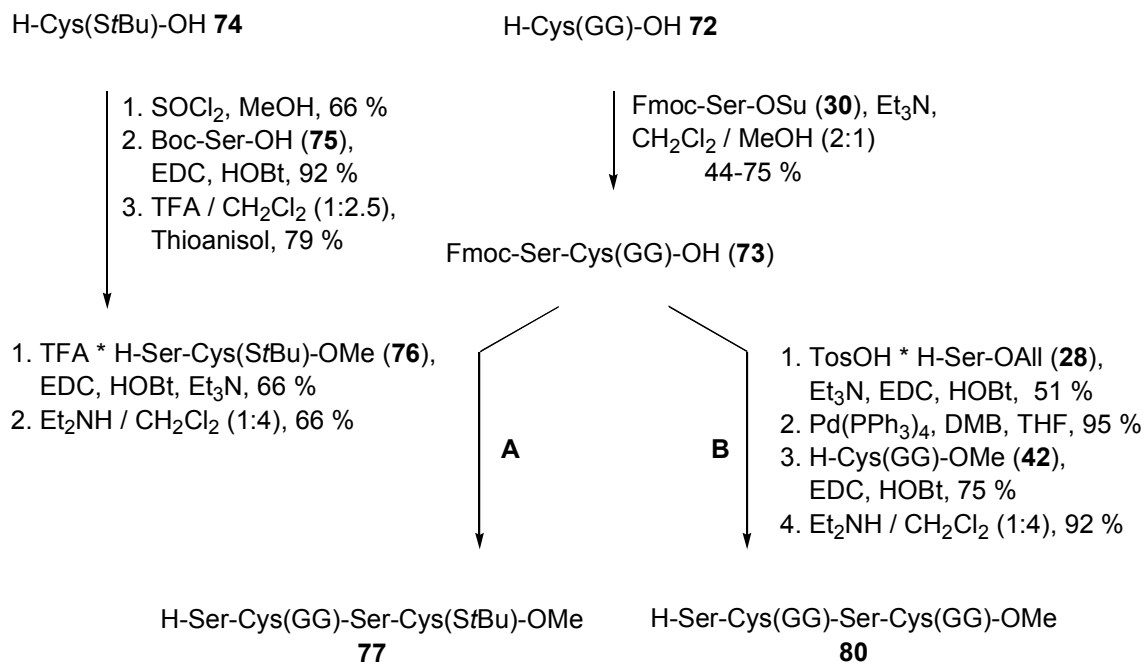
**Schema 48:** Synthese des NBD-markierten Dipeptids **61**.



**Schema 49:** Synthese C-terminal geranylgeranylierter Zielpeptide für die EPL.

Da sich das vollständig geschützte NBD-markierte Hexapeptid als besonders oxidationsempfindlich erwiesen hatte, wurde die Synthese von Hexapeptiden mit NBD-Markierung und variiertem Prenylmuster nicht weiter verfolgt.

Das Kernstück der Synthese des intern bzw. des doppelt geranylgeranylierten Tetrapeptids **77** bzw. **80** zur Synthese der entsprechenden dansylmarkierten Hexapeptide bildete das prenylierte Dipeptid **73**, da sich die nachträgliche Prenylierung selektiv entschützter längerer Peptide als ungeeignet herausgestellt hatte (Schema 50).



**Schema 50:** Synthese der Tetrapeptide **77** und **80**.

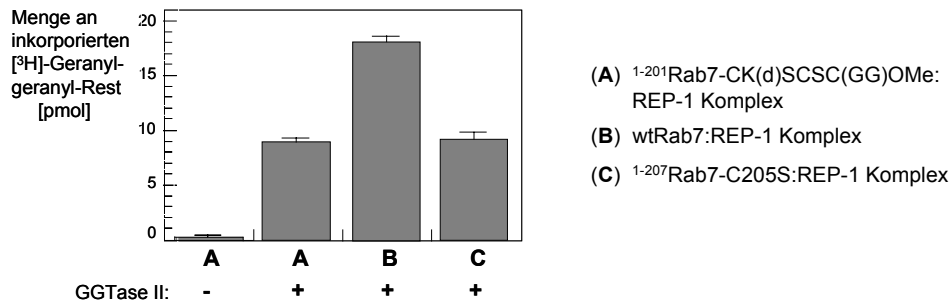
Das intern prenylierte Tetrapeptid **77** wurde demzufolge über die Verknüpfung der Dipeptide **73** und **76** und die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe generiert (Schema 50; Weg A). Der analoge Weg zum doppelt geranylgeranylierten Tetrapeptid **80** unter Verwendung eines Fmoc-geschützten C-terminalen Dipeptids gelang nicht. Dieses Tetrapeptid wurde daher über eine sukzessive Kettenverlängerung zum C-Terminus aufgebaut (Schema 50; Weg B).

Nach Optimierung konnten die Zielpeptide **83** und **84** durch Anknüpfung des dansylierten Dipeptids **54** an die entsprechenden Tetrapeptide und finale Fmoc-Entschützung in hohen Ausbeuten erhalten werden (Schema 51).

Die dansylmarkierten Hexapeptide konnten mit 1-201Rab7-MESNA (*canis familiaris*) unter den im Testsystem entwickelten Bedingungen zu semi-synthetischen Proteinen verknüpft werden. Durch SDS-PAGE, Kontrollreaktionen und massenspektrometrischer Analyse wurde die Spezifität der Ligation nachgewiesen (Abb. 22).

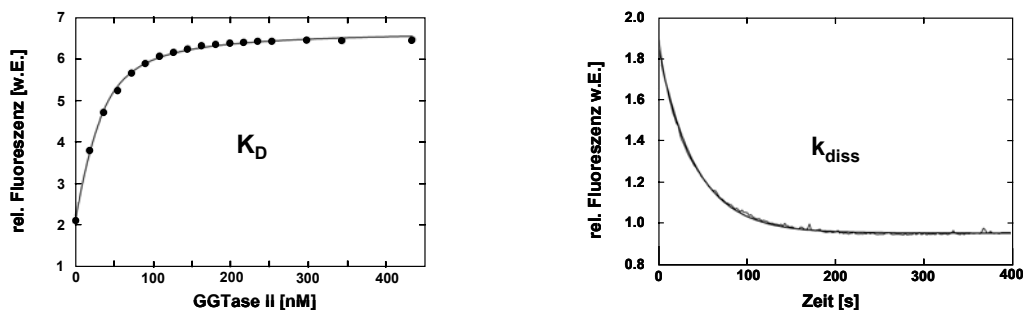


In der *in vitro* Geranylgeranylierung des zunächst eingesetzten C-terminal prenylierten semi-synthetischen Rab7 identifizierte die GGTase II den binären Komplex aus REP-1 und Peptid-Protein-Konjugat als Reaktionsintermediat und übertrug selektiv nur einen weiteren Geranylgeranylrest (Abb. 23). Das „Ligations“-Cystein wie auch der Fluoreszenzmarker beeinträchtigen demnach weder die Wechselwirkung der Proteine noch den Prenyltransfer.



**Abbildung 23:** Prenylierung mit  $[^3\text{H}]$ -GGPP.

Über einen Fluoreszenzassay wurden die  $K_D$ - und  $k_{\text{diss}}$ -Werte der ternären Komplexe aus semi-synthetischem Rab, REP-1 und der GGTase II bestimmt (Abb. 24). Mittels dieser ersten kinetischen Untersuchungen konnten bestehende Modelle des Prenyltransfers bestätigt und verfeinert werden.<sup>[127]</sup>



**Abbildung 24:** Bestimmung des  $K_D$ - und  $k_{\text{diss}}$ -Wertes der ternären Komplexe.

## 5.2. Ausblick

Im Fall des Rab7-Proteins mussten in beiden erfolgreich angewandten Ligationsmethoden artifizielle Linker, wie die MIC-Gruppe oder ein nicht natürlich vorkommendes Cystein, in das semi-synthetische Protein eingeführt werden. Während die MIC-Ligation *per se* beschränkt bleiben wird, bietet im Fall der EPL die Erweiterung über abspaltbare Auxiliargruppen einen Ausweg (s. 2.4.2.2.). Diese lassen sich jedoch bisher nur unter stark sauren Bedingungen, die nicht mit Prenylresten vereinbar sind, entfernen.<sup>[94]</sup> Daher bleibt im Fall des



Rab7-Proteins ein „Ligations“-Cystein weiterhin unumgänglich. Zukünftige Entwicklungen auf dem Gebiet der EPL oder anderer Ligationsmethoden, wie z.B. der Staudinger-Ligation, werden eventuell die Möglichkeit eröffnen, prenylierte Proteine mit vollständig nativer Aminosäuresequenz künstlich aufzubauen. Bisher sind die hier verwendeten Strategien allerdings die einzig möglichen.

Neben kinetischen Untersuchungen ist der Einsatz der synthetisierten Peptid-Protein-Konjugate in der kristallographischen Strukturaufklärung erfolgversprechend: Die Kristallstrukturen von Proteinen oder Proteinkomplexen bieten häufig die Möglichkeit eines Einblicks in molekulare Abläufe auf struktureller Ebene. Dies ist besonders lohnend, wenn sie Rückschlüsse auf eine Vielzahl anderer Proteine zulassen. Im Fall der zahllosen Rab-Proteine trifft dies zu. Vor allem die Kristallstrukturen der binären Komplexe aus lipidierten Rab-Proteinen mit REP oder GDI oder des ternären Komplexes aus Rab, REP und der GGTase II sind von großem Interesse. Bislang hat sich die Kristallisation lipidierter Proteine jedoch als besonders schwierig herausgestellt.<sup>[119]</sup> Der Vorteil der hier dargestellten semi-synthetischen Proteine oder analog gewonnener Proteine gegenüber den sonst eingesetzten enzymatisch prenylierten Proteinen ist ihre hohe chemische Reinheit. Erste Kristallisationsversuche mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptid-Protein-Konjugaten waren jedoch nicht erfolgreich. Allerdings konnte analog ein einfach lipidiertes Rab-Protein über die EPL mit einem C-terminal geranylgeranylierten Dipeptid hergestellt werden, mit dem vor kurzer Zeit erstmals die Strukturaufklärung des binären Komplexes aus GDI und einem lipidierten Rab-Protein in hoher Auflösung gelang.<sup>[137]</sup>

Für die Strukturaufklärung der genannten Proteinkomplexe mit doppelt prenyliertem Rab-Protein oder für andere Experimente wie Zelllokalisationsstudien oder *cross-linking*-Versuche zur weiteren Identifizierung von Rab-Effektoren oder Rezeptoren könnte die Übertragung der Peptidsynthese an die feste Phase zu einer noch flexibleren Anpassung der semi-synthetischen Proteine an diese einzelnen Experimente führen.

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

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Messgeräte und Hilfsmittel

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

Bruker AC 250	250 MHz $^1\text{H}$ -NMR
Bruker AM 400	400 MHz $^1\text{H}$ -NMR, 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR
Varian Mercury 400	400 MHz $^1\text{H}$ -NMR, 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR
Bruker DRX 500	500 MHz $^1\text{H}$ -NMR, 125.8 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR
Varian Inova 600	600 MHz $^1\text{H}$ -NMR, 150.9 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR

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

Die 70 eV EI- und die FAB-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Angegeben sind die  $m/z$ -Werte. Die FAB-Spektren wurden im positiven Modus in einer 3-Nitrobenzylalkohol(3-NBA)- oder Glycerin-Matrix gegebenenfalls unter Zusatz von Trifluoressigsäure gemessen. Im negativen Modus wurde Triethanolamin als Matrix verwendet.

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

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Voyager-DE<sup>TM</sup> Pro Biospectrometry Workstation Spektrometer der Firma Applied Biosystems gemessen. Die verwendeten Matrices und die Geräteeinstellung sind unter 6.5. angegeben.

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

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

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

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumplatten beschichtet mit Kieselgel 60<sub>F254</sub> der Firma Merck verwendet. Laufmittel und  $R_f$ -Werte sind bei den Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet:

- Reagenz A 2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser.
- Reagenz B 12 g Polymolybdato-phosphorsäure in 250 ml abs. Ethanol.
- Reagenz C 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml abs. Ethanol.
- Reagenz D 0.5 %ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser.
- UV-Licht 254 nm bzw. 366 nm.

Die präparative Säulenchromatographie<sup>[138]</sup> erfolgte mit Flash-Kieselgel (Korngröße 40-64  $\mu\text{m}$ ) der Firma Merck in geschlossenen Säulen bei einem Überdruck von 0.3-1.0 bar. Laufmittel und  $R_f$ -Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit Sephadex LH-20 der Firma Pharmacia und Chloroform / Methanol 1:1 (v/v) als Eluens ohne Überdruck durchgeführt.

Alle Chemikalien wurden bei den Firmen Fluka, Aldrich oder Acros erworben mit Ausnahme der eingesetzten Aminosäuren und der Palladium / Aktivkohle-Hydrierkatalysatoren (5 % und 10 %, wassernass), die aus Schenkungen der Degussa AG stammen. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch nach Standardvorschriften<sup>[139]</sup> destilliert und bei Bedarf absolutiert.

Nach der Einführung der Fluoreszenzmarker wurde weitestgehend unter Lichtausschluss gearbeitet, um ein vorzeitiges Bleichen der Fluorophore zu verhindern.

Für SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen<sup>[122]</sup> wurden Apparaturen und Standardlösungen der Firma Bio-Rad verwendet (12.5%iges Trenngel; Monomerlösung: 30 T, 1 C).

Die Proteine REP-1 und GGTase II wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. S. Goody hergestellt.

REP-1 wurde in Hefe<sup>[140]</sup> oder über ein Baculovirus/Sf21-Expressionssystem<sup>[133]</sup> über Infektion von Sf21-Insektenzellen mit rekombinanten REP-1-codierenden Baculoviren exprimiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte über einen His-*tag*.

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der GGTase II wurden ebenfalls nach Standardmethoden über Coinfektion von Sf21-Zellen mit Baculoviren, die die  $\alpha$ - bzw. die  $\beta$ -Untereinheit codieren, oder über ein Doppel-Vektor-System, das die Coexpression beider Untereinheiten in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL Zellen erlaubt, exprimiert.<sup>[141]</sup> Die Reinigung erfolgte im ersten Fall chromatographisch, im zweiten Fall über einen kombinierten His- und GST-*tag*, der abschließend proteolytisch abgespalten wurde.

## 6.1. Versuche zu Kapitel 4.2.

### 6.1.1. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung blockierter Lysinderivate<sup>[104]</sup>

A: Zu einer stark gerührten Lösung von 1 Äquivalent HCl\*L-Lysin in einer 2 N wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (100 ml/0.1 mol) wird eine Lösung von 0.5 Äquivalenten CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O in Wasser (100 ml/0.1 mol) gegeben. Die Lösung wird mit 1 Äquivalent NaHCO<sub>3</sub> versetzt, und über 1 h wird eine Lösung von 1.3 Äquivalenten Chlorameisensäureester bzw. Boc<sub>2</sub>O in Aceton (100 ml/0.1 mol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt, mit Methanol (25 ml/0.1 mol) versetzt und weitere 12 h gerührt. Der entstandene blaue Niederschlag wird nach Zugabe von Wasser/Ethylacetat 1:1 (v/v) (100 ml/0.1 mol) abfiltriert, dann dreimal mit Wasser gewaschen und schließlich getrocknet.

Zu einer stark gerührten Suspension von 1 Äquivalent Kupferkomplex in 10%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung/Aceton 2:1 (v/v) (600 ml/0.1 mol) werden 2.06 Äquivalente 8-Chinolinol gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 1.2 Äquivalenten Chlorameisensäureester bzw. Boc<sub>2</sub>O in Aceton (400 ml/0.1 mol) zugegeben, und das Reaktionsgemisch wird erneut 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und viermal mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wird mit 1 N HCl auf pH 2 angesäuert. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Ethylacetat umkristallisiert.

B: Zur Einführung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe wird bei 0° C eine Lösung von 1.5 Äquivalenten Chlorameisensäureester in 1,4-Dioxan (80 ml/0.01 mol) über 1 h zu einer Lösung von N<sup>( $\epsilon$ )</sup>-geschütztem L-Lysin in 10%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung/1,4-Dioxan 2:1 (v/v) (160 ml/0.1 mol) getropft. Nach 15 h bei Raumtemperatur wird die Lösung auf Wasser gegeben und zweimal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wird der pH-Wert der wässrigen Phase durch Zugabe von halbkonzentrierter Salzsäure auf pH = 3 eingestellt. und die wässrige Phase wird viermal mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

### 6.1.2. Versuche zu Kapitel 4.2.1.

#### *N*-Methylisatosäureanhydrid (12)<sup>[105]</sup>

Eine Mischung von 10.00 g (66.2 mmol) *N*-Methylantranilsäure und 25.30 ml (264.6 mmol) Chlorameisensäureethylester wird 15 min zum Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 6.25 ml

(88.0 mmol) Acetylchlorid wird das Reaktionsgemisch weitere 30 min zum Rückfluss erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Das ausgefallene Rohprodukt wird abfiltriert, mit *n*-Hexan gewaschen und aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 10.00 g (56.5 mmol, 85 %) eines braunen Feststoffs.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.15 (dd, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, CH-5), 7.79 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, J = 1.4 Hz, 1H, CH-7), 7.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-6), 7.21 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-8), 3.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 158.18, 147.72 (2 \* C=O), 141.79 (arom. quart. C), 137.12, 130.50, 123.90, 113.72 (4 \* arom. CH), 111.46 (arom. quart. C), 31.88 (CH<sub>3</sub>).

C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> (177.16)

***N*<sup>(α)</sup>-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>(ε)</sup>-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysin-*tert*-butylester (14)**  
(Cbz-Lys(Fmoc)-OtBu)

Ein Gemisch aus 3.00 g (5.97 mmol) Cbz-Lys(Fmoc)-OH, 18.48 ml (196.99 mmol) *tert*-Butanol und 7.5 ml Pyridin wird auf - 10 bis - 5° C abgekühlt, und tropfenweise werden dann 0.87 ml (9.55 mmol) Phosphoroxychlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei - 10 bis - 5° C und danach 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Zugabe von 40 ml Wasser und 40 ml Ethylacetat wird die organische Phase nacheinander mit je 30 ml 10%iger Citronensäure, 10%iger KHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 3:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 2.34 g (4.20 mmol, 70 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 97-98° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.43 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 5.2 (c = 1.0, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 7.76$  (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.59$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.40$  (dd,  $^3J_1 = 7.6$  Hz,  $^3J_2 = 7.2$ , 2H, Fmoc),  $7.29$ - $7.35$  (m, 7H, 2 \* arom. CH, 5 \* arom. CH Cbz),  $5.45$  (d,  $^3J = 8.0$ , 1H, NH),  $5.11$  (s, 2H,  $\text{OCH}_2$  Cbz),  $4.95$  (br, 1H, NH),  $4.36$ - $4.44$  (m, 2H,  $\text{OCH}_2$  Fmoc),  $4.27$  (dd,  $^3J_1 = 13.0$  Hz,  $^3J_2 = 7.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH),  $4.20$  (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ),  $3.17$ - $3.19$  (m, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ),  $1.75$ - $1.89$  (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$ ),  $1.61$ - $1.72$  (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$ ),  $1.60$ - $1.29$  (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ),  $1.47$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 171.43$  (C=O),  $156.37$ ,  $155.87$  (2 \* OCONH),  $143.88$ ,  $141.19$ ,  $136.23$  (3 \* arom. quart. C),  $128.38$ ,  $128.02$ ,  $127.98$ ,  $127.54$ ,  $126.91$ ,  $124.93$ ,  $119.84$  (7 \* arom. CH),  $81.97$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $66.76$ ,  $66.39$  (2 \*  $\text{OCH}_2$ ),  $54.04$  ( $\alpha$ -CH),  $47.18$  (CH Fmoc),  $40.52$  ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ),  $32.35$  ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ),  $29.30$  ( $\delta$ - $\text{CH}_2$ ),  $27.89$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $22.12$  ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$  (558.66)

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 70.95	H 6.86	N 5.01
	gef.:	C 70.76	H 6.85	N 4.95

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 559.2808  $[\text{M} + \text{H}]^+$   
gef.: 559.2781 (in 3-NBA-Matrix)

### **$N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -2-methylaminobenzoyl-L-lysin-*tert*-butylester (15)**

(Cbz-Lys(mant)-OtBu)

Unter Argonatmosphäre werden 0.900 g (1.61 mmol) Cbz-Lys(Fmoc)-OtBu (**14**) in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst, und 6.37 ml Piperidin werden tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 90 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt direkt eingesetzt. Zu einer Lösung von 342 mg (1.93 mmol) *N*-Methylisatosäureanhydrid (**12**) und 24 mg (0.19 mmol) DMAP in 5 ml trockenem Dimethylformamid wird bei 50° C unter Argonatmosphäre eine Lösung von 1.61 mmol Cbz-Lys-OtBu und 0.29 ml (2.09 mmol) trockenem  $\text{Et}_3\text{N}$  in 20 ml trockenem Dimethylformamid über 1 h gleichmäßig getropft. Nach 2.5 h Rühren bei 50° C wird zur Vervollständigung der Reaktion eine Lösung von 228 mg (1.29 mmol) *N*-Methylisatosäureanhydrid und 16 mg (0.13 mmol) DMAP in 2.5 ml trockenem Dimethylformamid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird anschließend 2 h bei 50° C gerührt, nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 50 ml Ethylacetat verdünnt und mit

50 ml halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/*n*-Hexan 1:5 (v/v), dann 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 606 mg (1.29 mmol, 80 %) eines schwach rosa Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.60 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1(v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 2.1 (*c* = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.46 (br, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 7.28-7.38 (m, 7H, 5 \* CH Cbz, 2 \* CH mant), 6.65 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH-6 mant), 6.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-4 mant), 6.25 (br, 1H, NH), 5.42 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.10 (d, <sup>2</sup>J = 12.4 Hz, 1H, OCH<sub>2a</sub>), 5.05 (d, <sup>2</sup>J = 12.0 Hz, 1H, OCH<sub>2b</sub>), 4.24-4.29 (m, 1H, α-CH), 3.38 (dt, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 6.3, Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.0 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 2.84 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 1.79-1.89 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.56-1.73 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub>), 1.44-1.51 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>), 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 171.43 (C=O), 169.90 (CONH mant), 155.94 (OCONH), 150.38 (C<sub>N</sub>HCH<sub>3</sub>), 136.23 (arom. quart. C Cbz), 132.61 (arom. CH mant), 128.41, 128.03, 127.98, 127.13 (4 \* arom. CH), 115.24 (C<sub>C</sub>ONHCH<sub>2</sub>), 114.34, 110.95 (2 \* arom. CH mant), 82.05 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.80 (OCH<sub>2</sub>), 53.97 (α-CH), 39.23 (ε-CH<sub>2</sub>), 32.58 (β-CH<sub>2</sub>), 29.57 (NHCH<sub>3</sub>), 28.90 (δ-CH<sub>2</sub>), 26.83 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.42 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (469.57)

Elementaranalyse (%):	ber.:	C 66.50	H 7.51	N 8.95
	gef.:	C 66.34	H 7.48	N 8.70

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 492.2475 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 492.2472 (in 3-NBA-Matrix)

### *N*<sup>(6)</sup>-2-Methylaminobenzoyl-L-lysin-*tert*-butylester

(H-Lys(mant)-*Ot*Bu)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.21 mmol) Cbz-Lys(mant)-*Ot*Bu (**15**) in 10 ml Ethylacetat/Ethanol 1:1 (v/v) werden 14 mg 10%iges Palladium auf Aktivkohle gegeben. Die



Lösung wird entgast, unter Argon und dann unter Wasserstoff gesetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Wasserstoff-Überdruck 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration über Celite<sup>®</sup> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt 15 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 72 mg (0.21 mmol, 100 %) eines schwach rosa Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.38 (Ethylacetat/Methanol 4:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 6.1 (c = 1.5, Chloroform/Methanol 8:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.41 (q, <sup>3</sup>J = 3.2 Hz, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 7.26-7.30 (m, 2H, 2 \* CH mant), 6.63 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, CH-6 mant), 6.54 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, J = 0.8 Hz, 1H, CH-4 mant), 6.27 (br, 1H, <sup>6</sup>NH), 3.37 (dt, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.0 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 3.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, 1H, α-CH), 2.82 (d, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 1.67-1.76 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.38-1.64 (m, 7H, β-CH<sub>2b</sub>, δ-, γ-CH<sub>2</sub>, <sup>α</sup>NH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 175.02 (C=O), 169.59 (CONH), 150.19 (CNHCH<sub>3</sub>), 132.45, 126.93 (2 \* arom. CH), 115.19 (CCON), 114.22, 110.84 (2 \* arom. CH), 80.92 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 54.83 (α-CH), 39.40 (ε-CH<sub>2</sub>), 34.48 (β-CH<sub>2</sub>), 29.68 (δ-CH<sub>2</sub>), 29.39 (NHCH<sub>3</sub>), 28.09 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.11 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (335.44)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 336.2287 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 336.2307 (in 3-NBA-Matrix)

### **N<sup>(α)</sup>-6-Maleinimidocaproyl-N<sup>(ε)</sup>-2-methylaminobenzoyl-L-lysin-tert-butylester**

(MIC-Lys(mant)-OtBu)

Unter Eiskühlung wird zu einer Lösung von 50 mg (0.23 mmol) 6-Maleinimidocaproylsäure, 72 mg (2.13 mmol) H-Lys(mant)-OtBu und 49 mg (0.32 mmol) HOBt in 10 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre eine Lösung von 49 mg (0.26 mmol) EDC in 4 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure und 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck

entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/*n*-Hexan 3:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 96 mg (0.18 mmol, 85 %) eines schwach gelben Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.47 (Ethylacetat/*n*-Hexan 3:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 2.8 (*c* = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.32 (dd, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, CH-3 mant), 7.25 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.1 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, CH-5 mant), 6.62 (s, 2H, CH=CH MIC), 6.60 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, CH-6 mant), 6.50 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH-4 mant), 6.45 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.4 Hz, 1H, (<sup>6</sup>NH)), 6.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.43 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>3</sub> = 4.8 Hz, 1H, α-CH), 3.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub> MIC), 3.27-3.39 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub> Lys), 2.80 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 2.05-2.18 (m, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 1.75-1.84 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Lys), 1.46-1.68 (m, 8H, β-CH<sub>2b</sub> Lys, β-CH<sub>2</sub> MIC, δ-CH<sub>2</sub> MIC, δ-CH<sub>2</sub> Lys), 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28-1.41 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub> Lys), 1.15-1.25 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub> MIC).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 172.22, 171.41, 170.46, 169.70 (4 \* C=O), 150.11 (C̄NHCH<sub>3</sub>), 133.74 (CH=CH MIC), 132.38, 127.08 (2 \* arom. CH), 115.09 (arom. quart. C), 114.17, 110.73 (2 \* arom. CH), 81.88 (C̄(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 52.13 (α-CH), 39.04 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 37.58 (ε-CH<sub>2</sub> MIC), 36.17 (α-CH<sub>2</sub>), 32.24 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.63 (NHCH<sub>3</sub>), 28.88 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 28.22 (δ-CH<sub>2</sub> MIC), 27.98 (C̄(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.27 (γ-CH<sub>2</sub> MIC), 25.00 (β-CH<sub>2</sub> MIC), 22.45 (γ-CH<sub>2</sub> Lys).

C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (528.64)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 529.3026 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 529.3008 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*<sup>(α)</sup>-6-Maleinimidocaproyl-*N*<sup>(δ)</sup>-2-methylaminobenzoyl-L-lysin (17)**

(MIC-Lys(mant)-OH)

Unter Eiskühlung wird zu einer Lösung von 35 mg (66 μmol) MIC-Lys(mant)-O*t*Bu und 39 μl (331 μmol) Thioanisol in 2 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 1 ml Trifluoressigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch zweimaliges Codestillieren mit je 20 ml Toluol und einmalige Codestillieren mit

Chloroform wird die Trifluoressigsäure entfernt. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan 1:3 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 27.0 mg (57  $\mu$ mol, 86 %) eines gelben Feststoffs.  
 Schmelzpunkt: 70-72° C  
 R<sub>f</sub>-Wert: 0.15 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))  
 $[\alpha]_D^{20}$ : + 4.7 ( $c = 1.35$ , Chloroform/Methanol 8:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta = 7.33$ -7.35 (m, 1H, CH-3 mant), 7.25 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.2$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, CH-5 mant), 6.65 (s, 2H, CH=CH MIC), 6.61 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, CH-6 mant), 6.50 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H, CH-4 mant), 4.35 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.4$  Hz,  $^3J_3 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 3.42 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 3.24-3.36 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 2.79 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 2.13 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 1.78-1.87 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Lys), 1.61-1.72 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Lys), 1.46-1.60 (m, 6H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> MIC,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> MIC), 1.26-1.40 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.15-1.26 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> MIC).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 175.15$  (CO<sub>2</sub>H), 171.38, 170.67, 170.13 (3 \* C=O), 149.57 (CNHCH<sub>3</sub>), 133.71 (CH=CH MIC), 132.30, 127.28 (2 \* arom. CH), 115.51 (arom. quart. C), 114.54, 110.76 (2 \* arom. CH), 52.33 ( $\alpha$ -CH), 38.82 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 37.44 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 35.65 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 31.13 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 29.46 (NHCH<sub>3</sub>), 28.63 ( $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 28.01 ( $\delta$ -CH<sub>2</sub> MIC), 26.06 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub> MIC), 24.91 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> MIC), 22.58 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys).

C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (586.58)

MALDI-MS ( $m/z$ ): ber.: 473.2 [M + H]<sup>+</sup>, 495.2 [M + Na]<sup>+</sup>  
 gef.: 473.7 [M + H]<sup>+</sup>, 495.7 [M + Na]<sup>+</sup> (in DHB-Matrix)

### *N*<sup>( $\alpha$ )</sup>-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N*<sup>( $\epsilon$ )</sup>-benzyloxycarbonyl-L-lysin-*tert*-butylester (21)

(Boc-Lys(Cbz)-OtBu)

Zu einer Lösung von 1.000 g (2.63 mmol) Boc-Lys(Cbz)-OH und 0.600 g (2.63 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid in 25 ml Dimethylacetamid werden unter starkem Rühren 3.385 g (34.19 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 21.27 ml (131.50 mmol) Bromtrimethylmethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 55° C gerührt, abgekühlt und auf 250 ml 0° C kaltes

Wasser und 100 ml Ethylacetat gegeben. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.903 g (2.07 mmol, 79 %) eines farblosen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 4.2 (c = 1.0, Chloroform)\*

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.26-7.34 (m, 5H, arom. CH), 5.07 (br, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.92 (br, 1H, NH), 4.11-4.16 (m, 1H, α-CH), 3.17 (dt, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.4 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.81-1.88 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.55-1.65 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub>), 1.47-1.55 (m, 2H, δ-CH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28-1.39 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 171.84 (C=O), 156.37, 155.41 (2 \* OCONH), 136.55 (arom. quart. C), 128.42, 128.03, 127.98, (3 \* arom. CH), 81.74, 79.55 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.51 (OCH<sub>2</sub>), 53.62 (α-CH), 40.66 (ε-CH<sub>2</sub>), 32.56 (β-CH<sub>2</sub>), 29.32 (δ-CH<sub>2</sub>), 28.26, 27.93 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.26 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (436.54)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 437.2652 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 437.2623 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*<sup>(α)</sup>-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-lysine-*tert*-butylester**

(Boc-Lys-*Ot*Bu)

Zu einer Lösung von 0.800 g (1.83 mmol) Boc-Lys(Cbz)-*Ot*Bu in 30 ml Methanol werden 0.119 g 10%iges Palladium auf Aktivkohle gegeben. Die Lösung wird entgast, unter Wasserstoff gesetzt und das Reaktionsgemisch unter Wasserstoff-Überdruck 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration über Celite<sup>®</sup> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt 15 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.507 g (1.68 mmol, 92 %) eines farblosen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.07 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ = 3.98 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH), 2.66 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.73-1.82 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.60-1.69 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42-1.58 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ = 173.87 (C=O), 158.17 (OCONH), 82.47, 80.40 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 55.83 (α-CH), 42.28 (ε-CH<sub>2</sub>), 33.33 (β-CH<sub>2</sub>), 32.56 (δ-CH<sub>2</sub>), 28.80, 28.32 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.28 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (302.41)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 303.2284 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 302.2290 (in 3-NBA-Matrix)

***N*<sup>(α)</sup>-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N*<sup>(ε)</sup>-5-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysin-*tert*-butylester**

(Boc-Lys(dansyl)-OtBu)

Zu einer Lösung von 286 mg (0.95 mmol) Boc-Lys-OtBu in 15 ml trockenem Dichlormethan werden bei 0° C 0.16 ml (1.13 mmol) trockenes Triethylamin und eine Lösung von 232 mg (0.86 mmol) 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid in 3 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Lichtausschluss 30 min bei 0° C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird zweimal mit je 20 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 414 mg (0.77 mmol, 90 %\*) eines grüngelben Öls.

Schmelzpunkt: 60-64° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.57 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 7.4 (*c* = 0.475, Chloroform)

\* Bezogen auf die Menge des eingesetzten 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorids.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.53 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.29 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.23 (dd, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H,

CH-7 dansyl), 7.51 (dd,  $^3J_1 = 8.4$  Hz,  $^3J_2 = 7.2$  Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.18 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, CH-6 dansyl), 4.97 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, NH), 4.91 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, NH), 4.03-4.08 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 2.88 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 2.84-2.88 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 1.56-1.68 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub>), 1.42 (s, 18H, 2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.35-1.48 (m, 3H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub>,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 1.16-1.34 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 171.71$  (C=O), 155.41 (OCONH), 151.92 (arom. quart. C C-5), 134.66 (arom. quart. C C-1), 130.31 (arom. CH), 129.83 (arom. quart. C), 129.56, 128.31, 123.13, 118.69, 115.14 (5 \* arom. CH), 81.82, 79.66 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 55.45 ( $\alpha$ -CH), 45.37 (CH<sub>3</sub>), 42.96 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 32.42 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 28.98 ( $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 28.30, 27.93 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.10 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>).

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S (535.70)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 536.2794 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 536.2803 (in 3-NBA-Matrix)

### **N<sup>(6)</sup>-5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysinhydrotrifluoracetat (22)**

((TFA)<sub>2</sub> \* H-Lys(dansyl)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 50 mg (0.09 mmol) Boc-Lys(dansyl)-OtBu in 3 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 1 ml Trifluoressigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch zweimaliges Codestillieren mit je 20 ml Toluol wird die Trifluoressigsäure entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 55 mg (0.09 mmol, 100 %) eines grüngelben Öls.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: nicht bestimmbar

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

$\delta = 8.55$ -8.56 (m, 2H, arom. CH), 8.25 (dd,  $^3J = 7.2$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, arom. CH), 7.66-7.70 (m, 2H, arom. CH), 7.56 (dd,  $^3J = 7.6$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H, arom. CH), 3.83-3.88 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 3.09 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 2.86 (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 1.70-1.87 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 1.36-1.50 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>).

C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>F<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (607.52)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 378.1488 [M - 2 TFA - H]<sup>-</sup>

gef.: 378.1487 (in Triethanolamin-Matrix)

**$N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -9-fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysinbenzylester**

(Cbz-Lys(Fmoc)-OBzl)

Zu einer Lösung von 1.000 g (1.99 mmol) Cbz-Lys(Fmoc)-OH in 20 ml Methanol wird unter starkem Rühren bei 0° C eine Lösung von 0.318 g (0.98 mmol) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 15 ml Methanol getropft. Das Reaktionsgemisch wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt im Vakuum 15 h getrocknet. Unter Eiskühlung werden zu der Suspension des Rohprodukts in 10 ml Dimethylformamid 4.7 ml (39.80 mmol) Benzylbromid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wird in 100 ml Ethylacetat/0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 1:1 (v/v) aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, und nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:1 (v/v) oder Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 (v/v), dann 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.942 g (1.59 mmol, 80 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 157° C

 $R_f$ -Wert: 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v)) $[\alpha]_D^{20}$ : - 3.9 ( $c = 1.0$ , Chloroform)<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 7.76$  (d, <sup>3</sup> $J = 8.0$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.58$  (d, <sup>3</sup> $J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.40$  (dd, <sup>3</sup> $J_1 = 7.6$  Hz, <sup>3</sup> $J_2 = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.29$ - $7.34$  (m, 12H, arom. CH),  $5.42$  (d, <sup>3</sup> $J = 7.2$  Hz, 1H, NH),  $5.07$ - $5.22$  (m, 4H, 2 \* OCH<sub>2</sub>),  $4.77$  (br, 1H,  $\alpha$ -CH),  $4.36$ - $4.45$  (m, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc),  $4.20$  (t, <sup>3</sup> $J = 6.8$  Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O),  $3.04$ - $3.16$  (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>),  $1.78$ - $1.92$  (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub>),  $1.59$ - $1.74$  (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub>),  $1.19$ - $1.53$  (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 172.16$  (C=O),  $156.40$ ,  $155.92$  (2 \* OCONH),  $143.92$ ,  $141.26$ ,  $136.14$ ,  $135.20$  (4 \* arom. quart. C),  $128.58$ ,  $128.47$ ,  $128.31$ ,  $128.14$ ,  $128.05$ ,  $127.60$ ,  $126.97$ ,  $124.95$ ,  $119.90$  (9 \* arom. CH),  $67.11$ ,  $66.97$ ,  $66.41$  (3 \* OCH<sub>2</sub>),  $53.67$  ( $\alpha$ -CH),  $47.25$  (CH Fmoc),  $40.46$  ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>),  $32.13$  ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>),  $29.27$  ( $\delta$ -CH<sub>2</sub>),  $22.14$  ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>).

$C_{36}H_{36}N_2O_6$  (592.26)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 615.2471  $[M + Na]^+$   
gef.: 615.2449 (in 3-NBA-Matrix)

### $N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl-L-lysinbenzylester

(Cbz-Lys-OBzl)

Unter Argonatmosphäre werden 0.880 g (1.48 mmol) Cbz-Lys(Fmoc)-OBzl in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst, und 10 ml Diethylamin werden zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 9 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 50 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v), dann 5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.491 g (1.32 mmol, 90 %) eines rötlichen Öls.

$R_f$ -Wert: 0.1 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : - 7.2 ( $c = 1.5$ , Chloroform)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):

$\delta = 7.26$ - $7.36$  (m, 10H, arom. CH),  $5.04$ - $5.20$  (m, 4H, 2 \*  $OCH_2$ ),  $4.22$  (dd,  $^3J_1 = 9.4$  Hz,  $^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH),  $2.85$  (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H,  $\epsilon$ - $CH_2$ ),  $1.81$ - $1.90$  (m, 1H,  $\beta$ - $CH_{2a}$ ),  $1.58$ - $1.76$  (m, 3H,  $\beta$ - $CH_{2b}$ ,  $\delta$ - $CH_2$ ),  $1.36$ - $1.50$  (m, 2H,  $\gamma$ - $CH_2$ ).

$^{13}C$ -NMR (100.7 MHz,  $CD_3OD$ ):

$\delta = 173.72$  (C=O), 158.76 (OCONH), 138.16, 137.28 (2 \* arom. quart. C), 129.61, 129.51, 129.38, 129.10, 129.07, 128.83 (6 \* arom. CH), 67.94, 67.71 (2 \*  $OCH_2$ ), 55.32 ( $\alpha$ -CH), 40.53 ( $\epsilon$ - $CH_2$ ), 31.98 ( $\beta$ - $CH_2$ ), 28.06 ( $\delta$ - $CH_2$ ), 23.84 ( $\gamma$ - $CH_2$ ).

$C_{21}H_{26}N_2O_4$  (370.44)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 371.1971  $[M + H]^+$   
gef.: 371.1945 (in 3-NBA-Matrix)



**$N^{(\alpha)}$ -Benzyloxycarbonyl- $N^{(\epsilon)}$ -5-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysinbenzylester  
(23)**

(Cbz-Lys(dansyl)-OBzl)

Zu einer Lösung von 430 mg (1.16 mmol) Cbz-Lys-OBzl in 50 ml trockenem Dichlormethan werden bei 0° C 0.32 ml (2.32 mmol) trockenes Triethylamin und eine Lösung von 313 mg (1.16 mmol) 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid in 10 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Lichtausschluss 30 min bei 0° C und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird zweimal mit je 40 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 (v/v), dann 4:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.501 g (0.80 mmol, 72 %) eines grüngelben Öls.

$R_f$ -Wert: 0.4 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : + 1.8 ( $c = 1.0$ , Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 8.53$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.22 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.53 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.2$  Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.50 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.5$  Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.25-7.38 (m, 10H, arom. CH), 7.16 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.33 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H,  $^{(\alpha)}\text{NH}$ ), 5.07-5.17 (m, 4H, 2 \*  $\text{OCH}_2$ ), 5.03 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 1H,  $^{(\epsilon)}\text{NH}$ ), 4.28-4.33 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 2.87 (s, 6H, 2 \*  $\text{CH}_3$ ), 2.80 (dt,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.4$  Hz, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 1.60-1.73 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$ ), 1.42-1.55 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$ ), 1.07-1.42 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 172.01$  (C=O), 155.90 (OCONH), 151.86 (C-5 dansyl), 136.10 (C-1 dansyl), 135.15, 134.67 (2 \* arom. quart. C), 130.27 (arom. CH), 129.76 (arom. quart. C), 129.50, 128.52, 128.42, 128.41, 128.27, 128.25, 128.09, 128.03 (8 \* arom. CH), 123.10, 118.68, 115.13 (3 \* arom. CH dansyl), 67.04, 66.96 (2 \*  $\text{OCH}_2$ ), 53.45 ( $\alpha$ -CH), 45.31 ( $\text{CH}_3$ ), 42.72 ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 31.91 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 28.73 ( $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 21.89 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  (603.24)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 604.2481  $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 604.2465 (in 3-NBA-Matrix)

***N*<sup>(6)</sup>-5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysin (24)**

(H-Lys(dansyl)-OH)

Zu einer Lösung von 200 mg (0.33 mmol) Cbz-Lys(dansyl)-OBzl in 15 ml Methanol werden 22 mg 10%iges Palladium auf Aktivkohle gegeben. Die Lösung wird entgast, unter Wasserstoff gesetzt und 6 h unter Wasserstoff-Überdruck bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration über Celite<sup>®</sup> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt 15 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 117 mg (0.31 mmol, 93 %<sup>\*</sup>) eines grüngelben Feststoffs.

Schmelzpunkt: 202° C<sup>\*\*</sup>

R<sub>f</sub>-Wert: 0.33 (Dichlormethan/Methanol 2:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: nicht bestimmbar

\* In anderen Ansätzen quantitative Ausbeute.

\*\* Lit.<sup>[142]</sup>: 200-202° C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 8.55 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.34 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.17 (dd, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.4 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.4 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.27 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 3.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.2 Hz, 1H, α-CH), 2.87 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 2.83 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.62-1.81 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 1.31-1.47 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ = 153.19 (C-5 dansyl), 136.95 (C-1 dansyl), 131.20 (arom. quart. C), 131.14 (arom. CH), 130.96 (arom. quart. C), 130.13, 129.15, 124.32, 120.51, 116.45 (5 \* arom. CH), 49.33 (α-CH), 45.83 (CH<sub>3</sub>), 43.59 (ε-CH<sub>2</sub>), 31.74 (β-CH<sub>2</sub>), 30.48 (δ-CH<sub>2</sub>), 23.38 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>S (379.47)

MALDI-MS: ber.: 380.2 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 380.4 [M + H]<sup>+</sup>, 402.4 [M + Na]<sup>+</sup>, 424.3 [M + 2\*Na]<sup>+</sup>

***N*-6-Maleinimidocapronsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (25)**

(MIC-OSu)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 28 mg (0.13 mmol) Maleinimidocapronsäure und 22 µl (0.159 mmol) Triethylamin in 3 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 41 mg (0.16 mmol) Disuccinimidylcarbonat gegeben, und das

Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird dann unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/Dichlormethan 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 39 mg (0.13 mmol, 96 %) eines farblosen Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.73 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 6.69 (s, 2H, CH=CH), 3.53 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 2.83 (br, 4H, 2 \* NC(O)CH<sub>2</sub>), 2.60 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 1.78 (tt, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 1.64 (tt, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, δ-CH<sub>2</sub>), 1.38-1.44 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.76, 169.09, 168.31 (3 \* C=O), 134.00 (CH=CH), 37.38 (ε-CH<sub>2</sub>), 30.69 (α-CH<sub>2</sub>), 27.95, 25.75 (2 \* CH<sub>2</sub>), 25.52 (2 \* CH<sub>2</sub> NC(O)CH<sub>2</sub>), 23.99 (CH<sub>2</sub>).

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (308.29)

### ***N*<sup>(α)</sup>-6-Maleinimidocaproyl-*N*<sup>(δ)</sup>-5-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysin (26)**

(MIC-Lys(dansyl)-OH)

Zu einer Lösung von 47 mg (124 μmol) H-Lys(dansyl)-OH (**24**) und 19 μl (137 μmol) trockenem Triethylamin in 10 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) unter Argonatmosphäre werden 38 mg (124 μmol) *N*-6-Maleinimidocapronsäure-*N*-hydroxy-succinimidester in 2 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Dichlormethan verdünnt und mit 20 ml ¼-gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) eluiert.

Ausbeute: 23 mg (40 μmol, 32 %) eines gelbgrünen Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.40 (Dichlormethan/Methanol 4:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 5.7 (c = 1.14, Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.53$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.19 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.56 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.2$  Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.53 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.0$  Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.20 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, CH-6 dansyl), 6.70 (s, 2H, CH=CH MIC), 4.38 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 3.50 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 2.89 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 2.87 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 2.21 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 1.72-1.75 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Lys), 1.58-1.66 (m, 5H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys, CH<sub>2</sub> MIC), 1.42-1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub> MIC), 1.21-1.35 (m, 4H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys, CH<sub>2</sub> MIC).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 175.22$  (CO<sub>2</sub>H), 174.13, 170.97 (2 \* C=O), 151.75 (C-5 dansyl), 134.93 (CH=CH), 134.03 (C-1 dansyl), 130.23 (arom. CH), 129.81, 129.58 (2 \* arom. quart. C), 129.27, 128.23, 123.22, 118.93, 115.23 (5 \* arom. CH), 52.48 ( $\alpha$ -CH), 45.39 (CH<sub>3</sub>), 42.58 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 37.59 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 35.91 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 31.07 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 28.87 ( $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 28.14, 26.11, 24.97 (3 \* CH<sub>2</sub> MIC), 22.05 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys).

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$  (572.67)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 595.2202 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 595.2234 (in 3-NBA-Matrix)

### 6.1.3. Versuche zu Kapitel 4.2.2.

#### *N-tert-Butyloxycarbonyl-S-tert-butylthio-L-cysteyl-L-serinalylester (29)*

(Boc-Cys(*St*Bu)-Ser-OAll)

Zu einer Lösung von 4.338 g (14.02 mmol) Boc-Cys(*St*Bu)-OH, 4.000 g (14.02 mmol) TosOH\*H-Ser-OAll und 4.294 g (28.04 mmol) HOBt in 100 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 1.96 ml (14.02 mmol) trockenes Triethylamin und 5.43 ml (35.05 mmol) DIC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und filtriert. Das Filtrat wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 (v/v), dann 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 2.857 g (6.54 mmol, 47 %) eines farblosen Öls.  
 R<sub>F</sub>-Wert: 0.22 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 28.7 (c = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, NH), 5.91 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.41 (d, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H, NH), 5.35 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.0 Hz, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, <sup>2</sup>J = 1.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>2</sup>J = 1.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.69 (d, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.64 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3</sub> = 3.4 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.35 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3</sub> = 5.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.05 (dd, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 2.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.95 (dd, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.15 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.09 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> StBu).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.63, 169.73 (2 \* C=O), 155.64 (OCONH), 131.31 (CH=CH<sub>2</sub>), 118.84 (CH=CH<sub>2</sub>), 80.70 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 66.27 (OCH<sub>2</sub> OAll), 62.59 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.06, 54.39 (2 \* α-CH Ser, Cys), 48.27 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> StBu), 42.03 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.76 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> StBu), 28.23 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc).

C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (436.59)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 437.1780 [M + H]<sup>+</sup>  
 gef.: 437.1795 (in 3-NBA-Matrix)

### L-Cysteyl-S-tert-butylthio-L-serinallylester-hydrotrifluoracetat

(TFA \* H-Cys(StBu)-Ser-OAll)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 0.665 g (1.52 mmol) Boc-Ser-Cys(StBu)-OMe (**29**) in 6 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 3 ml Trifluoressigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0° C und 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch zweimalige Codestillation mit je 20 ml Toluol und einmalige Codestillation mit 20 ml Chloroform wird die Trifluoressigsäure entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v), dann 30:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.624 g (1.38 mmol, 91 %) eines farblosen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.30 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 12.2 (*c* = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 5.94 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.36 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.4 Hz, <sup>2</sup>J = 1.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.27 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>2</sup>J = <sup>4</sup>J = 1.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.69 (ddt, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, *J* = 1.3 Hz, *J* = 1.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.59 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 3.6 Hz, 1H, α-CH Ser), 3.99 (dd, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.87 (dd, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.71 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.0 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.20 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 2.80 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 173.90 (CO<sub>2</sub>H), 169.76 (C=O), 131.28 (CH=CH<sub>2</sub>), 119.03 (CH=CH<sub>2</sub>), 66.38 (OCH<sub>2</sub>), 63.13 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 54.98, 54.22 (2 \* α-CH Ser, Cys), 48.49 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 44.93 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.84 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (450.50)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 337.1256 [M - TFA + H]<sup>+</sup>

gef.: 337.1243 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-serinallylester (31)**  
(Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-OAll)

A: Zu einer Lösung von 251 mg (0.77 mmol) Fmoc-Ser-OH, 250 mg (0.77 mmol) H-Cys(*St*Bu)-Ser-OAll und 235 mg (1.53 mmol) HOBt in 25 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 220 mg (1.15 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 40 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

B: Zu einer Lösung von 0.800 g (1.43 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Ser-OAll in 18 ml trockenem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre 12 ml trockenes Dichlormethan/Diethylamin 1:1 (v/v) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 50 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene

Rohprodukt zusammen mit 0.610 g (1.86 mmol) Fmoc-Ser-OH und 0.440 g (2.86 mmol) HOBt in 60 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden dann 0.412 g (2.15 mmol) EDC zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 200 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: A: 324 mg (0.50 mmol, 65 %); B: 257 mg (0.40 mmol, 29 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 157° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.47 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 16.51 min (Gradientstartbedingungen: 80% A (H<sub>2</sub>O/HCO<sub>2</sub>H 99.9:9.1) und 20% B (CH<sub>3</sub>CN/ HCO<sub>2</sub>H 99.9:9.1) (0 min))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 68.2 (c = 1.0, Dimethylformamid)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 3:1):

δ = 7.78 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.64-7.67 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, J = 1.1 Hz, 2H, Fmoc), 5.93 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J = 1.6 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.8 Hz, <sup>2</sup>J = 1.3 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.76 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.66 (d, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.2 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.40 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, 1H, α-CH Ser'), 4.24 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.93 (dd, <sup>2</sup>J = 11.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.82-3.88 (m, 2H, β-CH<sub>2b</sub> Ser, β-CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.79 (dd, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser'), 3.26 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.06 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 3:1):

δ = 170.88, 170.18, 169.11 (3 \* C=O), 156.47 (OCONH), 143.20, 143.06, 140.63, 140.61 (4 \* arom. quart. C), 130.96 (CH=CH<sub>2</sub>), 126.99, 126.37, 124.37, 124.33, 119.14 (5 \* arom. CH), 117.42 (CH=CH<sub>2</sub>), 66.52, 65.35 (2 \* OCH<sub>2</sub>), 61.45, 61.04 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 56.18, 54.46, 52.46 (3 \* α-CH), 47.21 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.40 (CH Fmoc), 40.67 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 28.73 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$C_{31}H_{39}N_3O_8S$  (645.79)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 646.2257  $[M + H]^+$

gef.: 646.2272 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*L*-serinallylester (33)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Ser-OAll)

Zu einer Lösung von 2.000 g (4.63 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH und 1.065 g (6.95 mmol) HOBt in 100 ml trockenem Dichlormethan wird eine Lösung von 2.941 g (9.26 mmol) TosOH\*H-Ser-OAll und 0.78 ml (5.56 mmol) trockenem Triethylamin in 20 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Anschließend werden unter Eiskühlung 1.065 g (5.56 mmol) EDC zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 80 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N  $NaHCO_3$ -Lösung und einmal mit 80 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $Na_2SO_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan 4:1 (v/v), dann 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.365 g (2.44 mmol, 53 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 110-112° C

$R_f$ -Wert: 0.10 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : - 15.1 ( $c = 1.0$ , Chloroform)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3/CD_3OD$  10:1 (v/v)):

$\delta = 7.83$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, <1H, NH), 7.77 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.65 (d,  $^3J = 7.7$  Hz, 2H, Fmoc), 7.41 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 6.88 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, < 1 H, NH), 5.92 (ddt,  $^3J_{trans} = 17.2$  Hz,  $^3J_{cis} = 10.4$  Hz,  $^3J_{vic} = 5.5$  Hz, 1H,  $\underline{CH=CH_2}$ ), 5.34 (d,  $^3J_{trans} = 17.2$  Hz, 1H,  $\underline{CH=CH_{2a}}$ ), 5.25 (d,  $^3J_{cis} = 10.4$  Hz, 1H,  $\underline{CH=CH_{2b}}$ ), 4.67 (d,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H,  $OCH_2$  OAll), 4.60-4.64 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.51-4.56 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.46 (dd,  $^2J = 10.2$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $OCH_{2a}$  Fmoc), 4.33-4.37 (m, 1H,  $OCH_{2b}$  Fmoc), 4.26 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.2$  Hz, 1H,  $\underline{CHCH_2O}$  Fmoc), 3.98 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2a}$  Ser), 3.86 (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2b}$  Ser), 3.17 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2a}$  Cys), 3.03 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2b}$  Cys), 1.35 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).



$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 170.41, 169.68$  (2 \*  $\text{C}=\text{O}$ ),  $156.26$  (OCONH),  $143.63, 143.54, 141.18$  (3 \* arom. quart. C),  $131.24$  ( $\text{C}=\text{CH}_2$ ),  $127.67, 127.04, 125.11$  (3 \* arom. CH),  $119.90$  (arom. CH),  $118.88$  ( $\text{CH}=\text{C}(\text{H})_2$ ),  $67.51$  ( $\text{OCH}_2$  Fmoc),  $66.33$  ( $\text{OCH}_2$  OAll),  $62.65$  ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Ser),  $55.04, 54.68$  (2 \*  $\alpha$ -CH Ser, Cys),  $48.39$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $46.91$  (CH Fmoc),  $42.27$  ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys),  $29.76$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$  (558.71)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.:  $581.1756$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$

gef.:  $581.1791$  (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-serin (34)**

(Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-OH)

Zu einer sorgfältig entgasten Lösung von 200 mg (0.31 mmol) Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-OH (**31**) in 15 ml trockenem Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 27 mg (0.17 mmol) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 3.6 mg (3.1  $\mu\text{mol}$ )  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 1.5 h unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und fünfmal mit je 10 ml Diethylether gewaschen, wobei ein gelblicher Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 184 mg (0.30 mmol, 98 %) eines orangebraunen Feststoffs.

Schmelzpunkt:  $184^\circ\text{C}$

$R_f$ -Wert: 0.3 (Dichlormethan/Methanol 5:1 (v/v)).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-73.6$  ( $c = 2.25$ , Methanol)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1 (v/v)):

$\delta = 7.77$  (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.64$ - $7.67$  (m, 2H, Fmoc),  $7.39$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc),  $7.31$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc),  $4.75$ - $4.78$  (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys),  $4.52$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser),  $4.40$  (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ),  $4.29$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'),  $4.24$  (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ),  $3.93$  (dd,  $^2J = 11.4$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser),  $3.84$ - $3.87$  (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser',  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser),  $3.80$  (dd,  $^2J = 11.0$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser'),  $3.27$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys),  $3.06$  (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys),  $1.33$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1 (v/v)):

$\delta$  = 172.53, 172.46, 171.60 (3 \* C=O), 157.96 (OCONH), 144.71, 144.57, 142.10 (3 \* arom. quart. C), 128.45, 127.84, 125.87, 125.82, 120.59 (5 \* arom. CH), 67.97 ( $\text{OCH}_2$ ), 62.95, 62.60 (2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Ser), 57.67, 55.84, 53.99 (3 \*  $\alpha$ -CH), 49.68 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 47.89 (CH Fmoc), 42.18 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys), 30.15 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ).

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$  (605.72)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 604.1787 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$

gef.: 604.1792 (in Triethanolamin-Matrix)

### **(*E,E*)-Farnesylaceton (36)**<sup>[113]</sup>

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 13.4 ml (105.2 mmol) frisch destillierter Acetessigsäureethylester und 4.71 g (87.2 mmol) Natriummethanolat in 110 ml trockenem Methanol unter Argonatmosphäre 9.05 g (31.7 mmol) Farnesylbromid gegeben, und das Reaktionsgemisch wird 3 h bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N Salzsäure bis zur Neutralisation beendet. Die wässrige Phase wird mit 180 ml Cyclohexan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Zu einer unter Ultraschall generierten Suspension von 4.80 g (85.5 mmol) Kaliumhydroxid in 40 ml Ethanol werden 10.61 g (31.7 mmol) 2-Farnesylacetessigsäureethylester (**35**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h zum Rückfluss erhitzt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 ml Wasser und 120 ml Cyclohexan versetzt. Die organische Phase wird je zweimal mit je 50 ml 5%iger Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 60:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

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

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

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.06-5.11 (m, 3H, 3 \* CH), 2.45 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 2.26 (dt,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 2.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ), 2.01-2.10 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.94-2.00 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.68 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.59 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 208.84 (C=O), 136.42, 135.07, 131.29 (3 \* quart. C), 124.39, 124.08, 122.55 (3 \* CH), 43.80 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 39.74, 39.66 (2 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 29.95 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ), 26.78, 26.55 (2 \*  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 25.72 ( $\omega\text{-CH}_3$  trans), 22.49 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 17.70 ( $\omega\text{-CH}_3$  cis), 16.01 ( $\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}$  (262.43)

Hochaufgelöstes EI-MS (40° C) ( $m/z$ ): ber.: 262.2297  $[\text{M}]^+$

gef.: 262.2283

**(*E,E,E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester (37)**<sup>[112d]</sup>

Zu 0.83 g (19.6 mmol) einer 60%igen Natriumhydrid-Dispersion in 22 ml trockenem Tetrahydrofuran wird eine Lösung von 4.45 ml (18.9 mmol) Diisopropylethylphosphonoacetat in 22 ml trockenem Tetrahydrofuran getropft und die Mischung 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 3.30 g (12.5 mmol) (*E,E*)-Farnesylaceton (**36**) in 30 ml trockenem Tetrahydrofuran über 30 min zugegeben und das Gemisch 20 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen, mit 35 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt, und die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 70:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 3.65 g (11.0 mmol, 88 %), eines farblosen Öls.

(*E,E,E*)-Isomer:(*Z,E,E*)-Isomer = 4.3:1

$R_f$ -Wert: 0.21 (*n*-Hexan/Ethylacetat 70:1 (v/v)), (*E,E,E*)-Isomer

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

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )\*:

$\delta$  = 5.66 (br, 1H,  $\text{CHC=O}$ ), 5.06-5.12 (m, 3H, 3 \* CH), 4.14 [4.14] (q,  $^3J = 7.1$  [7.1] Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 2.16-2.20 (m, 7H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.03-2.12 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.95-2.02 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (br, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ), 1.28 [1.27] (t,  $^3J = 7.1$  [7.2] Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )\*:

$\delta$  = 166.88 ( $\text{C=O}$ ), 159.75 ( $\text{C=CHCO}$ ), 136.16, 135.04, 131.25 (3 \* quart. C), 124.40 [124.23], 124.12 [123.54], 122.92 (3 \* CH), [116.27] 115.65 ( $\text{CHCO}$ ), 59.44 [59.40] ( $\text{OCH}_2$ ), 40.99, 39.72, 39.68 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 26.77 [26.72], 26.61, 26.01 (3 \*  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 25.70 [25.37] ( $\omega\text{-CH}_3$  trans), 18.81 ( $\omega\text{-CH}_3$  cis), 17.68, 16.03, 15.99 (3 \*  $\text{CH}_3$ ), 14.34 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

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

$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_2$  (332.52)

EI-MS (75° C) (*m/z*): gef.: 332.3 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (13.7 %), 287.3 [ $\text{M} - \text{OEt}$ ]<sup>+</sup> (3.8 %)

### **(*E,E,E*)-Geranylgeraniol (38a)**

(GGOH)

Zu 140 ml - 78° C kaltem trockenen Dichlormethan werden 27 ml (27.1 mmol) einer 1 M Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung in *n*-Hexan gegeben. Nach 30 min werden 3.65 g (11.0 mmol) einer Mischung von (*E,E,E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester und (*Z,E,E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraensäureethylester (**37**) im Verhältnis 4.3:1 tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 45 min bei - 15° C gerührt. Anschließend wird die Reaktion bei - 78° C durch Zugabe von 30 ml Methanol beendet. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur werden 100 ml einer gesättigten Natriumkaliumtartrat-Lösung zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan(*n*-Hexan)/Ethylacetat 30:1 (v/v), dann 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt und dabei in das (*E,E,E*)- und das (*Z,E,E*)-Isomer und eine Mischfraktion getrennt.

Gesamtausbeute: 2.90 g (10.0 mmol, 92 %)

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

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

R<sub>f</sub>-Wert: 0.15 (*n*-Hexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub>: 15.97 min (linearer Gradient von 90 % A, 10 % B (0 min) bis 10 % A, 90 % B (25 min))

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

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

R<sub>f</sub>-Wert: 0.21 (*n*-Hexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 5.42 (tq, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J = 1.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>OH), 5.08-5.12 (m, 3H, CH), 4.15 (d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, α-CH<sub>2</sub>), 2.02-2.14 (m, 8H, 4 \* CH<sub>2</sub>), 1.96-2.00 (m, 4H, 2 \* CH<sub>2</sub>), 1.68 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 139.77, 135.39, 134.98, 131.27 (4 \* quart. C), 124.41, 124.20, 123.81, 123.38 (4 \* CH), 59.40 (α-CH<sub>2</sub>), 39.74, 39.71, 39.58 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 26.78, 26.64, 26.35 (3 \* CH<sub>2</sub>CH), 25.70 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 17.69 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.29, 16.02 (2 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O (290.48)

EI-MS (55° C) (*m/z*): gef.: 290.3 [M]<sup>+</sup> (1.7 %), 272.3 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2.0 %)

### (*E,E,E*)-Geranylgeranyl bromid (39)

(GGBr)

A: Zu einer Lösung von 100 mg (0.34 mmol) (*E,E,E*)-Geranylgeraniol (**38a**) in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran werden tropfenweise unter Argonatmosphäre bei -15° C 32 µl (0.34 mmol) Phosphortribromid in 2 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei -10 bis -5° C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt in 20 ml Diethylether/Cyclohexan 1:1 (v/v) aufgenommen. Nach Waschen mit je 20 ml einer 5%igen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser wird die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

B: Unter Eiskühlung wird zu einer Lösung von 70 mg (0.24 mmol) (*E,E,E*)-Geranylgeraniol (**38a**) in 1 ml trockenem Diethylether unter Argonatmosphäre eine Lösung von 95 mg

(0.36 mmol) Triphenylphosphin in 1 ml trockenem Diethylether und dann eine Lösung von 120 mg (0.36 mmol) Tetrabrommethan in 1 ml trockenem Diethylether zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0° C und dann 2 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 10 ml *n*-Hexan verdünnt und filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet

Ausbeute:           A: 77 mg (0.22 mmol, 63 %);       B: 77 mg (0.22 mmol, 90 %)  
                      eines leicht gelblichen Öls.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 5.53 (tq, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J = 0.5 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Br), 5.06-5.14 (m, 3H, CH), 4.02 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2</sub>), 2.03-2.15 (m, 8H, 4 \* CH<sub>2</sub>), 1.94-2.02 (m, 4H, 2 \* CH<sub>2</sub>), 1.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>Br (353.38)

### **(*E,E,E*)-Geranylgeranylchlorid (40)**<sup>[115b]</sup>

(GGCl)

Unter Lichtausschluss wird eine Lösung von 253 mg (1.89 mmol) *N*-Chlorsuccinimid (umkristallisiert aus Wasser) in 5 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre auf -40 bis -35° C gekühlt, und 150 µml (2.06 mmol) Dimethylsulfid werden zugetropft. Nach fünfminütigem Erwärmen auf 0° C wird das Reaktionsgemisch erneut auf -40 bis -35° C gekühlt, und eine Lösung von 500 mg (1.72 mmol) (*E,E,E*)-Geranylgeraniol (**38a**) in 2 ml trockenem Dichlormethan wird zugegeben. Die resultierende weiße Suspension wird 1 h bei -10 bis -5° C und 1 h bei -4 bis -2° C gerührt, danach auf 20 ml 0° C kalter gesättigter NaCl-Lösung gegeben und mit 30 ml Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird dreimal mit je 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck (bis ca. 50 mbar) vorsichtig entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet.

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

R<sub>F</sub>-Wert:           0.73 (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 (v/v))

\* Die Ausbeute konnte aufgrund der Leichtflüchtigkeit des Produkts nicht exakt bestimmt werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 5.45$  (tq,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.3$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Cl}$ ), 5.07-5.13 (m, 3H, CH), 4.10 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 2.03-2.15 (m, 8H, 4 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.94-2.01 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.73 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.68 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 142.77$ , 135.61, 134.96, 131.25 (4 \* quart. C), 124.37, 124.16, 123.45, 120.29 (4 \* CH), 41.15 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), 39.72, 39.67, 39.45 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 26.77, 26.61, 26.13 (3 \*  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 25.69 ( $\omega\text{-CH}_3$  trans), 17.68 ( $\omega\text{-CH}_3$  cis), 16.11, 16.05, 16.00 (3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{Cl}$  (308.93)

### **S-Geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (42)**<sup>[100b]</sup>

(H-Cys(GG)-OMe)

Unter Eiskühlung werden zu 325 mg (1.89 mmol) HCl \* H-Cys-OMe werden unter Argonatmosphäre 12 ml einer 2 N  $\text{NH}_3$ /Methanol-Lösung gegeben. Bei  $-20^\circ\text{C}$  wird eine Lösung von 531 mg (1.72 mmol) (*E,E,E*)-Geranylgeranylchlorid (**38a**) in 2 ml trockenem Tetrahydrofuran zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei  $-15^\circ\text{C}$  und dann 1 h bei  $-10$  bis  $-5^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend mit 50 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 6:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: A: 470 mg (1.15 mmol, 67 %)  
eines farblosen Öls.

$R_f$ -Wert: 0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 5.24$  (tq,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H, CH GG), 5.08-5.12 (m, 3H, CH GG), 3.74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (dd,  $^3J_1 = 7.8$  Hz,  $^3J_2 = 4.4$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 3.21 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}_{2a}$ ), 3.16 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}_{2b}$ ), 2.88 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CH}_{2a}$ ), 2.68 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\beta\text{-CH}_{2b}$ ), 2.05-2.13 (m, 8H, 4 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.95-2.00 (m, 4H, 2 \*  $\text{CH}_2$ ), 1.70 (br, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.68 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.67 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 174.47$  (C=O), 139.49, 135.30, 134.87, 131.15 (4 \* quart. C), 124.32, 124.12, 123.69, 119.90 (4 \* CH), 54.24 ( $\text{OCH}_3$ ), 52.07 ( $\alpha$ -CH), 39.66, 39.63, 39.58 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 36.39 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 29.79 ( $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), 26.71, 26.57, 26.38 (3 \*  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH GG}$ ), 25.62 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  trans), 17.61 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  cis), 16.07, 15.97, 15.94 (3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_2\text{S}$  (407.65)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 408.2936  $[\text{M} + \text{H}]^+$   
gef.: 408.2961 (in Glycerin-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester**

(Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 200 mg (0.33 mmol) Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-OH (**34**), 135 mg (0.33 mmol) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 81 mg (0.50 mmol) HODhbt in 17 ml trockenem Dichlormethan/Trifluorethanol 7.5:1 werden unter Eiskühlung 135 mg (0.396 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 60 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 293 mg (0.29 mmol, 89 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 169° C

$R_f$ -Wert: 0.57 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$t_R = 18.39$  min

$[\alpha]_D^{20}$ : - 49.6 ( $c = 0.5$ , Chloroform)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 7.77$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.63-7.66 (m, 2H, Fmoc), 7.39 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 2H, Fmoc), 5.20 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, CH GG), 5.06-5.15 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.86 (dd,  $^3J_1 = 8.4$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.78-4.80 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.50 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -



CH Ser), 4.41 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.29 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.24 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.78-3.90 (m, 4H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.25 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.23 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>), 3.12 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>), 3.06 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 2.96 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.82 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.93-2.13 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta = 171.31, 170.55, 170.32, 169.86$  (4 \* C=O), 156.47 (OCONH), 143.19, 143.04, 140.62 (3 \* arom. quart. C), 139.11, 134.45, 134.04, 130.25 (4 \* quart. C GG), 126.98, 126.36, 124.33 (3 \* arom. CH), 123.63, 123.52, 123.16 (3 \* CH GG), 119.14 (arom. CH), 119.09 (CH GG), 66.52 (OCH<sub>2</sub>), 61.47, 61.09 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 56.16, 54.89 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 53.00 ( $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 51.74 (OCH<sub>3</sub>), 51.52 ( $\alpha$ -CH Cys(GG)), 47.90 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.41 (CH Fmoc), 40.17 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 39.98, 39.94 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.22 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 28.75 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.69 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 25.98, 25.80, 25.68 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 24.50 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 16.45 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 14.97, 14.85, 14.82 (3 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>52</sub>H<sub>74</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (995.36)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 1017.4516 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 1017.4536 (in 3-NBA-Matrix)

**L-Seryl-S-tert-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (43)**  
(H-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 208 mg (0.21 mmol) Fmoc-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe in 1.7 ml trockenem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre 1.7 ml trockenes Dichlormethan/Diethylamin 1:1 (v/v) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und dann einmal mit 40 ml Toluol und einmal mit 40 ml Chloroform codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 30:1 (v/v), dann 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (0.16 mmol, 74 %) eines farblosen Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v)).

$[\alpha]_D^{20}$ : - 76.6 ( $c = 1.15$ , Methanol)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 5.21$  (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, CH GG), 5.08-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.70 (dd,  $^3J_1 = 8.6$  Hz,  $^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.66 (dd,  $^3J_1 = 7.8$  Hz,  $^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.50 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 3.89 (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.75-3.79 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> H-Ser), 3.70 (dd,  $^2J = 10.6$  Hz,  $^3J = 6.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> H-Ser), 3.51 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH H-Ser), 3.24 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>), 3.23 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.13 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>), 3.07 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 2.97 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.83 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.96-2.14 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.69 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.61 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 174.31$ , 170.70, 170.28, 169.89 (4 \* C=O), 139.66, 134.90, 134.46, 130.76 (4 \* quart. C GG), 123.92, 123.74, 123.32 (3 \* CH GG), 119.01 (CH GG), 64.12 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> H-Ser), 61.63 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 55.80, 54.90 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 53.13 ( $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 52.29 (OCH<sub>3</sub>), 52.00 ( $\alpha$ -CH Cys(GG)), 48.07 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.03 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 39.48, 39.45 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.26 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 29.50 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.33 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 26.53, 26.40, 26.29 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.35 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 17.36 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 15.81, 15.72, 15.69 (3 \* CH<sub>3</sub>).

$\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_3$  (773.12)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 795.3835  $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 795.3852 (in 3-NBA-Matrix)

### 6.1.4. Versuche zu Kapitel 4.2.3.

#### *N*<sup>( $\alpha$ )</sup>-6-Maleinimidocaproyl-*N*<sup>( $\epsilon$ )</sup>-2-methylaminobenzoyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (44)

(MIC-Lys(mant)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 9.8 mg (21  $\mu$ mol) MIC-Lys(mant)-OH (**17**), 16.0 mg (21  $\mu$ mol) H-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**43**) und 6.3 mg (41  $\mu$ mol) HOBt in 5 ml trockenem Dichlormethan wird unter Eiskühlung eine Lösung von 6.0 mg (31  $\mu$ mol) EDC in 1 ml trockenem Dichlormethan getropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 20 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 20 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 7.5 mg (6  $\mu$ mol, 29 %) eines leicht gelben Öls.

Schmelzpunkt: 238-242° C\*

R<sub>F</sub>-Wert: 0.40 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 15.55 min

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -55.5 (c = 0.375, Dichlormethan/Methanol 8:1 (v/v))

\*Keine vollständige Schmelze; die Substanz verkohlt bei 270° C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta$  = 7.40-7.45 (m, 1H, CH-3 mant), 7.31 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.1 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, CH-5 mant), 6.72 (s, 2H, CH=CH MIC), 6.67 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-6 mant), 6.60 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, J = 0.5 Hz, 1H, CH-4 mant), 5.20 (t (br), <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.14 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.70 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.24-4.26 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.92 (dd, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.91 (dd, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.76-3.83 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.49 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 3.29-3.43 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 3.21-3.29 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu),  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub> GG), 3.11 (dd, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub> GG), 3.09 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 2.96 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2

Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.85 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 2.82 (dd, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.18-2.28 (m, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> MIC), 1.92-2.13 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.71-1.89 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.68 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.39-1.71 (m, 6H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> MIC,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> MIC), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.22-1.36 (m, 4H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> MIC).

C<sub>61</sub>H<sub>94</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub> (1227.64)

ESI-MS (*m/z*): ber.: 1227.6 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 1227.7 [M+H]<sup>+</sup>

***N*<sup>( $\alpha$ )</sup>-6-Maleinimidocaproyl-*N*<sup>( $\delta$ )</sup>-5-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (45)**

(MIC-Lys(dansyl)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 7.4 mg (13  $\mu$ mol) MIC-Lys(dansyl)-OH (**26**), 10.0 mg (13  $\mu$ mol) H-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**43**) und 3.0 mg (19  $\mu$ mol) HOBt in 4 ml trockenem Dichlormethan wird unter Eiskühlung eine Lösung von 3.0 mg (16  $\mu$ mol) EDC in 1 ml trockenem Dichlormethan getropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 20 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 20 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 6.8 mg (5  $\mu$ mol, 40 %) eines gelbgrünen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.48 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta$  = 8.55 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.33 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.19 (dd, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 8.4 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.24 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 6.75 (s, 2H, CH=CH MIC), 5.20 (t (br), <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.15 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.72 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.63-4.69 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.50 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.40 (dd,

$^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.17 (dd,  $^3J_1 = 8.2$  Hz,  $^3J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.92 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.89 (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.77-3.84 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.51 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> MIC), 3.26 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(StBu)), 3.23 (dd,  $^2J = 12.8$  Hz,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub> GG), 3.12 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub> GG), 3.09 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(StBu)), 2.95 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.90 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.87-2.90 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 2.81 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.24-2.28 (m, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> MIC), 1.94-2.15 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.52-1.76 (m, 6H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> MIC), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.27-1.50 (m, 6H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> MIC,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> MIC).

C<sub>64</sub>H<sub>98</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>4</sub> (1327.78)

FAB-MS: ber. 1327.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1349.6 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 1327.8 [M + H]<sup>+</sup>, 1349.8 [M + Na]<sup>+</sup>

## 6.2. Versuche zu Kapitel 4.3.

### ***Kupplung des maleinimidocaproylmarkierten Lipopeptids 45 an <sup>1-204</sup>Rab7S204C***

10  $\mu$ l einer Lösung von <sup>1-204</sup>Rab7S204C in Ligationpuffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 100  $\mu$ M GDP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), deren Proteingehalt zuvor nach der BRADFORD-Methode UV/VIS-spektroskopisch zu 10 mg / ml bestimmt worden war, wurden mit 4  $\mu$ l einer wässrigen 200 mM CTAB-Lösung und 4  $\mu$ l Peptidlösung (1 mg des Peptids gelöst in 35  $\mu$ l Methanol und 5  $\mu$ l einer wässrigen 200 mM CTAB-Lösung) vermischt. Die Endkonzentration des Ansatzes waren 0.24 mM Protein, 4.22 mM Peptid und 100 mM CTAB.

Die Mischung wurde unter Argonatmosphäre 18 h bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation bei 14 000 rpm wurde ein Teil des löslichen Überstandes über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Peptid-Protein-Konjugats im Gel erfolgte zunächst über UV-Licht und anschließend über Coomassie<sup>®</sup> Blau-Färbung.

### 6.3. Versuche zu Kapitel 4.4.

#### 6.3.1. Versuche zu Kapitel 4.4.1.

##### *N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*para*-methoxytrityl-L-cysteyl-*S*-farnesyl-L-cysteinmethylester (48)

(Fmoc-Cys(Mmt)-Cys(Far)-OMe)

Zu einer Lösung von 145 mg (0.24 mmol) Fmoc-Cys(Mmt)-OH, 80 mg (0.24 mmol) H-Cys(Far)-OMe und 54 mg (0.35 mmol) HOBt in 20 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 54 mg (0.28 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 15 ml 0.5 N Salzsäure und 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 15 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 197 mg (0.21 mmol, 89 %) eines farblosen Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.42 (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 3.2 (*c* = 0.5, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.74 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.9 Hz, 2H, Fmoc), 7.56 (br, 2H, Fmoc), 7.25-7.43 (m, 15H, 4 \* CH Fmoc, 10 \* CH Mmt, NH), 7.19-7.21 (m, 2H, Mmt), 6.80 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 2H, Mmt), 6.61 (d, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, NH), 5.14 (t, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH Far), 5.03-5.09 (m, 3H, 3 \* CH Far), 4.66-4.69 (m, 1H, α-CH Cys(Far)), 4.36 (d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.21 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.82-3.86 (m, 1H, α-CH Cys(Mmt)), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> Mmt), 3.11 (dd, <sup>2</sup>J = 13.1 Hz, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.05 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 2.89 (dd, <sup>2</sup>J = 13.9 Hz, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(Far)), 2.80 (dd, <sup>2</sup>J = 13.9 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(Far)), 2.72 (dd, <sup>2</sup>J = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(Mmt)), 2.64 (dd, <sup>2</sup>J = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(Mmt)), 1.92-2.09 (m, 8H, 4 \* CH<sub>2</sub> Far), 1.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.71, 169.97 (2 \* C=O), 158.27 (arom. quart. C Mmt), 155.90 (OCONH), 144.67 (arom. quart. C Mmt), 143.83, 143.66, 141.28 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 140.04 (quart. C

Far), 136.36 (quart. C Mmt), 135.34, 131.31 (2 \* quart. C Far), 130.78, 129.50, 128.08 (3 \* arom. CH Mmt), 127.74, 127.09 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.87 (arom. CH Mmt), 125.11 (arom. CH Fmoc), 124.33, 123.75 (2 \* CH Far), 119.97, 119.46 (arom. CH Fmoc, CH Far), 113.37 (arom. CH Mmt), 67.20 (OCH<sub>2</sub>), 66.91 (quart. C Mmt), 55.22 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.93 (OCH<sub>3</sub>), 52.54, 52.95 (2 \* α-CH), 47.07 (CH Fmoc), 39.70, 39.61 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 33.81, 33.15 (2 \* β-CH<sub>2</sub>), 29.94 (α-CH<sub>2</sub>), 26.73, 26.44 (2 \* CH<sub>2</sub>CH Far), 25.70 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 17.70 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.10, 16.02 (2 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>57</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (937.26)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 959.4104 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 959.4139 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-cysteyl-S-farnesyl-L-cysteinmethylester (49)**

(Fmoc-Cys-Cys(Far)-OMe)

Bei Raumtemperatur werden 1.5 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan (v/v) zu einer Lösung von 30 mg (0.032 mmol) Fmoc-Cys(Mmt)-Cys(Far)-OMe (**48**) in 0.2 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre gegeben. Anschließend werden 51 µl (0.320 mmol) Et<sub>3</sub>SiH zugegeben, wobei sich die vorher orange Lösung langsam zu entfärben beginnt. Nach 30 min wird der nun farblose Ansatz zweimal mit 4 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 22 mg (0.032 mmol, 100 %) eines farblosen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 67-69° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.3 (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 8.5 (*c* = 0.70, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.60 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.45 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.31-7.34 (m, 2H, Fmoc), 6.91 (br, 1H, NH), 5.75 (br, 1H, NH), 5.18 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 1H, CH Far), 5.07-5.10 (m, 3H, 3 \* CH Far), 4.74-4.78 (m, 1H, α-CH Cys(Far)), 4.45-4.47 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>, α-CH Cys(Mmt)), 4.24 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.19 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.1 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.12 (br, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.11 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.1 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 2.99 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.9 Hz,

$^3J = 4.7$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(Far)), 2.85 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(Far)), 2.75 (br, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys), 2.01-2.11 (m, 6H, 3 \* CH<sub>2</sub> Far), 1.94-1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Far), 1.77 (br, 1H, SH), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 170.86, 169.48$  (2 \* C=O), 155.90 (OCONH), 143.76, 143.61, 141.36 (3 \* arom. quart. C), 140.33, 135.43, 131.35 (3 \* quart. C Far), 127.81, 127.14, 125.03 (3 \* arom. CH), 124.32, 123.69 (2 \* CH Far), 120.06, 119.32 (arom. CH, CH Far), 67.35 (OCH<sub>2</sub>), 55.95 (OCH<sub>3</sub>), 52.76, 51.86 (2 \*  $\alpha$ -CH), 47.16 (CH Fmoc), 39.71, 39.63 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 33.12 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(Far)), 29.81 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 27.15 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys), 26.74, 26.44 (2 \* CH<sub>2</sub>CH Far), 25.71 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 17.70 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 16.17, 16.03 (2 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (664.92)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 665.3083 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 665.3118 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-*L*-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-*L*-lysin (**50a**)**

(Fmoc-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 500 mg (0.81 mmol) Fmoc-Cys(Mmt)-OH und 93 mg (0.81 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran 176 mg (0.85 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und direkt für weitere Umsetzungen verwendet.

120 mg (0.32 mmol) H-Lys(dansyl)-OH (**24**) werden in 16 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) gelöst. Unter Eiskühlung werden 88  $\mu$ l (0.64 mmol) trockenes Triethylamin und anschließend eine Lösung von 225 mg (0.32 mmol) Fmoc-Cys(Mmt)-OSu in 5 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 10:1.5 (v/v) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 20 ml  $\frac{1}{4}$ -gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 30 ml Dichlormethan versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene



Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 10:1 als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 253 mg (0.26 mmol, 82 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 117° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.55 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 8.8 (c = 0.5, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.48 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.16 (d, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.68-7.72 (m, 2H, Fmoc), 7.52-7.58 (m, 2H, Fmoc), 7.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 8.2 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.13-7.38 (m, 17H, 4 \* CH Fmoc, 12 \* CH Mmt, CH-6 dansyl), 6.75 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, Mmt), 6.67 (br, 1H, NH), 5.48 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 1H, NH), 5.36 (br, 1H, <sup>(ε)</sup>NH), 4.40-4.45 (m, 1H, α-CH), 4.32 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.14 (t, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.84 (br, 1H, α-CH), 3.70 (OCH<sub>3</sub>), 2.85 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.63-2.89 (m, 4H, β-CH<sub>2</sub> (Cys), ε-CH<sub>2</sub>), 1.68-1.75 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Lys), 1.50-1.58 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Lys), 1.19-1.38 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 174.69 (CO<sub>2</sub>H), 170.58 (C=O), 158.16 (arom. quart. C Mmt), 156.30 (OCONH), 151.57 (C-5 dansyl), 144.61 (arom. quart. C Mmt), 143.77, 143.53, 141.17 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 136.31 (arom. quart. C Mmt), 135.09 (C-1 dansyl), 130.74 (CH Mmt), 130.10 (arom. CH dansyl), 129.76, 129.58 (C-9, C-10 dansyl), 129.43 (arom. CH Mmt), 129.21, 128.26 (2 \* arom. CH dansyl), 128.03 (arom. CH Mmt), 127.67, 127.10 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.84 (arom. CH Mmt), 125.17 (arom. CH Fmoc), 123.22 (arom. CH dansyl), 119.86 (arom. CH Fmoc), 119.11, 115.25 (2 \* arom. CH dansyl), 113.32 (arom. CH Mmt), 67.31 (OCH<sub>2</sub>), 66.81 (quart. C Mmt), 55.17 (OCH<sub>3</sub>), 54.14, 51.94 (2 \* α-CH), 46.93 (CH Fmoc), 45.38 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.54 (ε-CH<sub>2</sub>), 33.54 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 31.14 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 28.35 (δ-CH<sub>2</sub>), 21.52 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>56</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> (977.20)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 977.3618 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 977.3580 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-Triphenylmethyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-*L*-cystein (46b)**

(Trt-Cys(Mmt)-OH)

In 2.4 ml trockenem Chloroform/Acetonitril 5:1 (v/v) werden 500 mg (1.27 mmol) H-Cys(Mmt)-OH suspendiert, 156  $\mu$ l (0.63 mmol) BSA werden tropfenweise zugegeben, und das Reaktionsgemisch wird 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 354  $\mu$ l (2.54 mmol) trockenes Triethylamin so langsam zugetropft, dass das Reaktionsgemisch leicht rückflusst. Anschließend wird eine Lösung von 354 mg (1.27 mmol) Triphenylchlormethan in 1 ml trockenem Chloroform zugegeben, und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 260  $\mu$ l Methanol zugegeben, und nach 1 h wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 100 ml Diethylether/5%ige 0° C kalte Citronensäure 1:1 (v/v) aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit je 40 ml 1 N NaOH und Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit je 40 ml Diethylether extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 312 mg (0.49 mmol, 39 %) \* eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 105° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.18 (Hexan/Ethylacetat 4:1 (v/v))

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 76.7 (*c* = 1.0, Chloroform)

\* Im kleineren Ansatz 75 %.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 7.09-7.44 (m, 28H, 15 \* CH Trt, 12 \* CH Mmt, NH), 6.72 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, Mmt), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.39 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 5.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 2.63 (dd, <sup>2</sup>*J* = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.6 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub>), 2.36 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 177.37 (CO<sub>2</sub>H), 158.12 (arom. quart. C Mmt), 145.16, 144.78, 144.73 (3 \* arom. quart. C), 136.46 (arom. quart. C Mmt), 130.82, 129.47, 128.69, 127.93, 126.78, 126.69 (6 \* arom. CH), 71.31 (C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>), 66.32 (quart. C Mmt), 55.54, 55.17 ( $\alpha$ -CH, OCH<sub>3</sub>), 36.38 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>).

C<sub>42</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub>S (635.81)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 636.2572 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 636.2592 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-Triphenylmethyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysin (50b)**

(Trt-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 250 mg (0.39 mmol) Trt-Cys(Mmt)-OH (**46b**) und 45 mg (0.39 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre 86 mg (0.41 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und direkt für weitere Umsetzungen verwendet.

In 8 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) werden 50 mg (0.13 mmol) H-Lys(dansyl)-OH (**24**) gelöst. Unter Eiskühlung werden 36 µl (0.26 mmol) trockenes Triethylamin und anschließend eine Lösung von 97 mg (0.13 mmol) Trt-Cys(Mmt)-OSu in 2 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min unter Eiskühlung und 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 30 ml ¼-gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 50 ml Dichlormethan versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (53 µmol, 40 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 132° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.40 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 50.8 (*c* = 0.5, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.50 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.27 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.18 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.52 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 8.2 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.44 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.41-7.45 (m, 1H, (ω)NH Lys), 7.07-7.29 (m, 28H, 15 \* CH Trt, 12 \* CH Mmt, CH-6 dansyl), 6.66 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, Mmt),

4.81 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H,  $^{(6)}\text{NH}$ ), 4.04 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.2$  Hz,  $^3J_3 = 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.33 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 3.00 (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 3.6$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys), 2.87 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.72-2.84 (m, 2H,  $\varepsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 2.00 (dd,  $^2J = 12.4$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys), 1.65-1.74 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys), 1.45-1.55 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys), 1.23-1.43 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 174.43$  ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 173.47 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 158.12 (arom. quart. C Mmt), 151.69 (C-5 dansyl), 144.97, 144.86, 144.62 (3 \* arom. quart. C), 136.31 (arom. quart. C Mmt), 134.93 (C-1 dansyl), 130.86, (arom. CH Mmt), 130.14 (arom. CH dansyl), 129.78, 129.57 (C-9, C-10 dansyl), 129.40, 129.35, 129.30, 128.26, 127.88, 126.77, 126.72, 126.69 (8 \* arom. CH), 123.16, 118.95, 115.21 (3 \* arom. CH dansyl), 113.19 (arom. CH Mmt), 71.79 ( $\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ ), 66.29 (quart. C Mmt), 56.37, 55.13, 52.16 (2 \*  $\alpha$ -CH,  $\text{OCH}_3$ ), 45.36 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 42.83 ( $\varepsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 36.32 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys), 31.40 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 29.17 ( $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 21.78 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$\text{C}_{60}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$  (997.27)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 997.4033  $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 997.3994 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (51a)**

(Fmoc-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 55 mg (56  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-OH (**50a**), 23 mg (56  $\mu\text{mol}$ ) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 13 mg (84  $\mu\text{mol}$ ) HOBt in 5 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 13 mg (67  $\mu\text{mol}$ ) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 60 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 55 mg (40  $\mu\text{mol}$ , 72 %) eines gelbgrünen Feststoffs.  
Schmelzpunkt: 79° C  
 $R_f$ -Wert: 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))  
 $[\alpha]_D^{20}$ : - 8.0 ( $c = 1.0$ , Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 8.49$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.18 (dd,  $^3J = 7.2$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.71 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.53-7.57 (m, 2H, Fmoc), 7.48 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.0$  Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.12-7.46 (m, 18H, 4 \* CH Fmoc, 12 \* CH Mmt, CH-3, CH-6 dansyl), 6.79 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, Mmt), 6.78-6.82 (m, 1H, NH), 6.41 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, NH), 5.28-5.32 (m, 2H, NH,  $^{(e)}\text{NH}$ ), 5.07-5.17 (m, 4H, 4 \* CH GG), 4.63-4.68 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.31-4.40 (m, 3H,  $\alpha$ -CH,  $\text{OCH}_2$ ), 4.15 (t,  $^3J = 7.0$  Hz,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.71 (br, 4H,  $\text{OCH}_3$ ,  $\alpha$ -CH), 3.13 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2a}$ ), 2.99 (dd,  $^2J = 12.8$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2b}$ ), 2.85 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.70-2.80 (m, 6H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys), 1.94-2.12 (m, 12H, 6 \*  $\text{CH}_2$  GG), 1.70-1.80 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys), 1.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.59 (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ), 1.47-1.56 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys), 1.23-1.40 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$  Lys).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 171.07$ , 170.76, 170.29 (3 \*  $\text{C}=\text{O}$ ), 158.23 (arom. quart. C Mmt), 156.06 ( $\text{OCONH}$ ), 151.84 (C-5 dansyl), 144.60, 144.57 (2 \* arom. quart. C Mmt), 143.76, 143.57, 141.18 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 140.01 (quart. C GG), 136.22 (arom. quart. C Mmt), 135.33 (quart. C GG), 135.05 (C-1 dansyl), 134.90, 131.18 (2 \* quart. C GG), 130.74 (arom. CH Mmt), 130.14 (arom. CH dansyl), 129.83, 129.58 (C-9, C-10 dansyl), 129.43 (arom. CH Mmt), 129.27, 128.18 (2 \* arom. CH dansyl), 128.05 (arom. CH Mmt), 127.64, 127.05 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.85 (arom. CH Mmt), 125.12 (arom. CH Fmoc), 124.34, 124.14, 123.72 (3 \* CH GG), 123.11 (arom. CH dansyl), 119.85 (arom. CH Fmoc), 119.41 (CH GG), 118.90, 115.11 (2 \* arom. CH dansyl), 113.35 (arom. CH Mmt), 67.19 ( $\text{OCH}_2$ ), 66.91 (quart. C Mmt), 55.17 ( $\text{OCH}_3$  Mmt), 54.24 ( $\alpha$ -CH), 52.64, 52.59, 51.65 ( $\text{OCH}_3$ , 2 \*  $\alpha$ -CH), 46.97 (CH Fmoc), 45.34 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 42.42 ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys), 39.68, 39.66, 39.63 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 33.65 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 32.71 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ), 31.07 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 29.53 ( $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), 28.58 ( $\delta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 26.87, 26.72, 26.63 (3 \*  $\text{CH}_2\text{CH}$  GG), 25.65 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  trans), 21.59 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 17.64 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  cis), 16.13, 16.01, 15.97 (3 \*  $\text{CH}_3$  GG).

$C_{80}H_{95}N_5O_9S_3$  (1366.84)

FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 1388.6  $[M + Na]^+$

gef.: 1388.3  $[M + Na]^+$

***N*-Triphenylmethyl-*S*-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (51b)**

(Trt-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 53 mg (53  $\mu$ mol) Trt-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-OH (**50b**), 22 mg (53  $\mu$ mol) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 12 mg (80  $\mu$ mol) HOBt in 8 ml trockenem Dichlormethan wird unter Eiskühlung eine Lösung von 12 mg (64  $\mu$ mol) EDC in 2 ml trockenem Dichlormethan getropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 80 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 40 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 (v/v), dann 2:1 (v/v), dann 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 57 mg (41  $\mu$ mol, 77 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 81° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : + 27.4 ( $c = 1.0$ , Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 8.52$  (d, <sup>3</sup> $J = 8.8$  Hz, 1H, CH-2 dansyl),  $8.33$  (d, <sup>3</sup> $J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl),  $8.22$  (d, <sup>3</sup> $J = 7.2$  Hz, 1H, CH-4 dansyl),  $7.51$ - $7.56$  (m, 1H, CH-7 dansyl),  $7.46$ - $7.50$  (m, 1H, CH-3 dansyl),  $7.28$ - $7.32$  (m, 4H, 4 \* arom. CH),  $7.12$ - $7.20$  (m, 24H, 23 \* arom. CH, CH-6 dansyl),  $6.96$  (d, <sup>3</sup> $J = 6.8$  Hz, 1H, NH),  $6.66$  (d, <sup>3</sup> $J = 8.0$  Hz, 2H, Mmt),  $6.56$  (d, <sup>3</sup> $J = 7.6$  Hz, 1H, NH),  $5.16$ - $5.22$  (m, 2H, <sup>(6)</sup>NH, CH GG),  $5.08$ - $5.12$  (m, 3H, 3 \* CH GG),  $4.59$ - $4.64$  (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)),  $3.99$  (ddd, <sup>3</sup> $J_1 = ^3J_2 = 6.1$  Hz, <sup>3</sup> $J_3 = 5.6$  Hz,  $\alpha$ -CH Lys),  $3.76$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $3.70$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $3.17$  (dd, <sup>2</sup> $J = 13.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>),  $3.06$  (dd, <sup>2</sup> $J = 13.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>),  $3.02$ - $3.05$  (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(Mmt)),  $2.95$  (dd, <sup>2</sup> $J = 12.2$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(Mmt)),  $2.88$  (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),  $2.77$ - $2.86$  (m, 3H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG),  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys),  $2.70$  (dd, <sup>2</sup> $J = 13.6$  Hz, <sup>3</sup> $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -

CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.14 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(Mmt)), 1.96-2.11 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.61 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.25-1.72 (m, 6H, β-, δ-, γ-CH<sub>2</sub> Lys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 172.75, 171.19, 170.53 (3 \* C=O), 158.08 (arom. quart. C Mmt), 151.84 (C-5 dansyl), 145.29 (arom. quart. C Trt), 144.72 (arom. quart. C Mmt), 140.08 (quart. C GG), 136.41 (arom. quart. C Mmt), 135.33 (quart. C GG), 135.05 (C-1 dansyl), 134.89, 131.17 (2 \* quart. C GG), 130.86, (arom. CH Mmt), 130.11 (arom. CH dansyl), 129.85, 129.62 (C-9, C-10 dansyl), 129.34, 128.85, 128.16, 127.89, 127.76, 126.65, 126.58 (7 \* arom. CH), 124.33, 124.12, 123.69 (3 \* CH GG), 123.12 (arom. CH dansyl), 119.34 (CH GG), 118.93 (arom. CH dansyl), 115.10 (CH-6 dansyl), 113.15 (arom. CH Mmt), 71.51 (C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>), 66.15 (quart. C Mmt), 56.38, 55.11, 52.67, 52.50 (3 \* α-CH, OCH<sub>3</sub>), 51.59 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.35 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.63 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 39.67, 39.66, 39.62 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 36.64, 32.70 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Cys), 31.70 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.64 (α-CH<sub>2</sub>), 29.14 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 26.86, 26.72, 26.61 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.65 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 21.51 (γ-CH<sub>2</sub>), 17.64 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.16, 16.00, 15.97 (3 \* CH<sub>3</sub> GG).

C<sub>84</sub>H<sub>99</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub> (1386.91)

FAB-MS (*m/z*): ber.: 1386.7 [M + H]<sup>+</sup>, 1408.7 [M + Na]<sup>+</sup>  
gef.: 1386.1 [M + H]<sup>+</sup>, 1408.2 [M + Na]<sup>+</sup> (in 3-NBA-Matrix)

Nanospray-MS (*m/z*): gef.: 1386.3 [M + Na]<sup>+</sup>, 1408.7 [M + Na]<sup>+</sup>

**S-4-Methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-N<sup>(ε)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester**

(H-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 55 mg (40 μmol) Fmoc-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe (**51a**) in 0.50 ml trockenem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre 0.17 ml Diethylamin unter starkem Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 1 h weitere 0.03 ml Diethylamin zugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird dann zweimal mit je 5 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (35 μmol, 87 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 72° C  
 R<sub>F</sub>-Wert: 0.1 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 4.6 (c = 1.675, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 40:1 (v/v)):

δ = 8.52 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.20 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.16-7.54 (m, 15H, 12 \* CH Mmt, 3 \* CH dansyl), 6.95 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <1H, NH), 6.80 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, Mmt), 5.43 (t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1H, <sup>(6)</sup>NH), 5.17 (t, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, CH GG), 5.06-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.65-4.69 (m, 1H, α-CH), 4.29-4.34 (m, 1H, α-CH), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.16 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.05 (dd, <sup>2</sup>J = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 3.01 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.4, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.2 Hz, 1H, α-CH Cys(Mmt)), 2.87 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.82-2.92 (m, 3H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(GG), ε-CH<sub>2</sub> Lys), 2.76 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.65 (dd, <sup>2</sup>J = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(Mmt)), 2.59 (dd, <sup>2</sup>J = 12.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(Mmt)), 1.94-2.11 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.46-1.76 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> Lys), 1.22-1.44 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub> Lys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 173.27, 173.20, 171.20 (3 \* C=O), 158.12 (arom. quart. C Mmt), 151.84 (C-5 dansyl), 144.79 (arom. quart. C Mmt), 140.05 (quart. C GG), 136.52 (arom. quart. C Mmt), 135.35 (quart. C GG), 135.02 (C-1 dansyl), 134.90, 131.18 (2 \* quart. C GG), 130.71 (arom. CH Mmt), 130.13 (arom. CH dansyl), 129.82, 129.58 (C-9, C-10 dansyl), 129.42 (arom. CH Mmt), 129.32, 128.16 (2 \* arom. CH dansyl), 127.90, 126.70 (2 \* arom. CH Mmt), 124.32, 124.11, 123.67 (3 \* CH GG), 123.12 (arom. CH dansyl), 119.36 (CH GG), 118.86, 115.10 (2 \* arom. CH dansyl), 113.19 (arom. CH Mmt), 66.47 (quart. C Mmt), 55.17 (OCH<sub>3</sub> Mmt), 53.80 (α-CH), 52.62, 52.29, 51.66 (OCH<sub>3</sub>, 2 \* α-CH), 45.34 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.58 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 39.66, 39.64, 39.60 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 37.19 (β-CH<sub>2</sub> Cys(Mmt)), 32.80 (β-CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 31.21 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.63 (α-CH<sub>2</sub>), 28.90 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 26.70, 26.59, 26.46 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.63 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 21.94 (γ-CH<sub>2</sub> Lys), 17.62 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.08, 15.98, 15.95 (3 \* CH<sub>3</sub> GG).

C<sub>65</sub>H<sub>85</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub> (1144.60)

FAB-MS (m/z): ber.: 1144.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1166.6 [M + Na]<sup>+</sup>  
 gef.: 1144.3 [M + H]<sup>+</sup>, 1166.2 [M + Na]<sup>+</sup>



**L-Cysteyl-*N*<sup>(ε)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylesterhydrotrifluoracetat (52)**

(TFA\*H-Cys-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

A: Bei Raumtemperatur werden 2.0 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan zu 38 mg (0.033 mmol) H-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe unter Argonatmosphäre gegeben. Anschließend werden 53 µl (0.332 mmol) Et<sub>3</sub>SiH zugegeben, wobei sich die vorher orange Lösung langsam zu entfärben beginnt. Nach 1 h werden zur Vervollständigung der Reaktion nochmals 1.5 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan und 25 µl (0.157 mmol) Et<sub>3</sub>SiH zugegeben, und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der nun farblose Ansatz wird zweimal mit je 30 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

B: Unter Argonatmosphäre werden 6.0 mg (4.3 µmol) Trt-Cys(Mmt)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe (**51b**) in 2.0 ml einer Lösung von 7 µl (43 µmol) Et<sub>3</sub>SiH und 1% Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan bei Raumtemperatur gelöst. Das Reaktionsgemisch wird 45 min bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 30 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet, fünfmal mit je 2 ml *n*-Pentan gewaschen und erneut im Vakuum getrocknet.

A: Ausbeute: 9.0 mg (9.1 µmol, 28 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 81° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.25 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 16.6 (*c* = 0.5, Chloroform)

B: Ausbeute: 4.2 mg (4.3 µmol, 100 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

A: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v))\*:

δ = 8.32-8.36 (m, 1H, CH-2 dansyl), 8.29-8.34 (m, 1H, CH-8 dansyl), 8.16-8.20 (m, 1H, CH-4 dansyl), 7.90 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, <1H, NH), 7.50-7.61 (m, 2H, 2 \* CH dansyl), 7.19-7.25 (m, 1H, CH-6 dansyl), 5.20 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.15 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.61-4.67 (m, 1H, α-CH), 4.11-4.15 (m, 1H, α-CH), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.17-3.24 (m, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.02-3.16 (m, 3H, α-CH<sub>2b</sub>, β-CH<sub>2</sub> Cys), 2.93-3.00 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys'), 2.90 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84-2.89 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub> Lys), 2.77-2.82 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys'),

1.96-2.14 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.65-1.85 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> Lys),  
1.61 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.40-1.54 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub> Lys).

C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sub>3</sub> (986.28)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 872.4488 [M - TFA + H]<sup>+</sup>

gef.: 872.4521 (in 3-NBA-Matrix)

B: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v))\*:

δ = 8.53 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.18 (dd, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.20 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.17-5.21 (m, 1H, CH GG), 5.07-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H, α-CH Cys(GG)), 4.38 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.4 Hz, 1H, α-CH Lys), 4.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.93-3.24 (m, 5H, α-CH<sub>2</sub>, β-CH<sub>2</sub> Cys, β-CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.89 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84-2.89 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub> Lys), 2.79 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.94-2.12 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.62-1.85 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> Lys), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.37-1.49 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub> Lys).

\* Unter Auslassung der Peaks des in wesentlich geringerem Maße entstandenen Disulfids.

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysine (54)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 1.000 g (2.32 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH und 0.267 g (2.32 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre 0.502 g (2.43 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und direkt für weitere Umsetzungen verwendet.

In 16 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) werden 100 mg (0.26 mmol) H-Lys(dansyl)-OH (**24**) gelöst. Unter Eiskühlung werden 74 µl (0.52 mmol) trockenes Triethylamin und anschließend eine Lösung von 178 mg (0.34 mmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-OSu in 2 ml trockenem Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 45 min unter Eiskühlung und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 30 ml ¼-gesättigter

NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 50 ml Dichlormethan versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 199 mg (0.24 mmol, 95 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 116° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.33 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 12.9 (c = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 8.51 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.32 (d, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.18 (dd, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.75 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.62 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.54 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 8.2 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.38 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.18 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 4.48-4.51 (m, 1H, α-CH), 4.31-4.45 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>, α-CH), 4.23 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.15 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.04 (dd, <sup>2</sup>J = 12.6 Hz, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 2.87 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.83-2.88 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.73-1.81 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Lys), 1.56-1.65 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Lys), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.26-1.45 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 174.53 (CO<sub>2</sub>H), 170.56 (C=O), 156.41 (OCONH), 151.30 (C-5 dansyl), 143.70, 143.58, 141.15 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 135.01 (C-1 dansyl), 130.06 (arom. CH dansyl), 129.68, 129.56 (C-9, C-10 dansyl), 129.27, 128.23 (2 \* arom. CH dansyl), 127.65, 127.09, 125.26 (3 \* arom. CH Fmoc), 123.27 (arom. CH dansyl), 119.85 (arom. CH Fmoc), 119.25, 115.32 (2 \* arom. CH dansyl), 67.60 (OCH<sub>2</sub>), 54.73 (α-CH), 52.11 (α-CH), 48.31 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.91 (CH Fmoc), 45.38 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 42.56 (ε-CH<sub>2</sub>), 42.08 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 31.27 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.79 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.44 (δ-CH<sub>2</sub>), 21.66 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub> (793.03)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 793.2763 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 793.2778 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-*L*-lysyl-*S*-geranylgeranyl-*L*-cysteinmethylester (55)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 68 mg (85  $\mu$ mol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-OH (**54**), 35 mg (85  $\mu$ mol) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 20 mg (128  $\mu$ mol) HOBt in 8 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 20 mg (102  $\mu$ mol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 80 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 40 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 (v/v), dann 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 96 mg (80.9  $\mu$ mol, 95 %) eines gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 68° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v))

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 22.2 (c = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 8.48 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.34 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.20 (dd, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.71 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.57-7.60 (m, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.45 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.34 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, J = 2.3 Hz, 2H, Fmoc), 7.22-7.26 (m, 2H, Fmoc), 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 7.09 (br, 1H, NH), 6.10 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, NH), 5.64 (br, 1H, NH), 5.17 (t (br), <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH GG), 5.06-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.72 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3</sub> = 5.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.58-4.61 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.54 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3</sub> = 6.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.29-4.42 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.18 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.13-3.20 (m, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.06 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 2.92 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.84 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.79-2.88 (m, 3H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG),  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.95-2.07 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.75-1.85 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Lys), 1.67 (d, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.55-1.70 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Lys), 1.34-1.44 (br, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 171.14, 170.96, 170.27$  (3 \* C=O), 156.14 (OCONH), 151.76 (C-5 dansyl), 143.71, 143.58, 141.12 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 139.93, 135.24 (2 \* quart. C GG), 135.00 (C-1 dansyl), 134.83, 131.11 (2 \* quart. C GG), 130.08 (arom. CH dansyl), 129.77, 129.55 (C-9, C-10 dansyl), 129.22, 128.12 (2 \* arom. CH dansyl), 127.57, 127.00, 125.18 (3 \* arom. CH Fmoc), 124.30, 124.09, 123.68 (3 \* CH GG), 123.06 (arom. CH dansyl), 119.79 (arom. CH Fmoc), 119.39 (CH GG), 118.93, 115.06 (2 \* arom. CH dansyl), 67.41 ( $\text{OCH}_2$ ), 54.76, 52.86, 52.55, 51.84 (3 \*  $\alpha$ -CH,  $\text{OCH}_3$ ), 48.32 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 46.91 (CH Fmoc), 45.28 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 42.45 ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys), 41.96 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(*St*Bu)), 39.62, 39.58 (2 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ), 32.77 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(GG)), 31.51 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 29.78 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.62 ( $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), 28.65 ( $\delta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 26.68, 26.57, 26.46 (3 \*  $\text{CH}_2\text{CH}$  GG), 25.61 ( $\omega$ - $\text{CH}_3_{\text{trans}}$ ), 21.75 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$  Lys), 17.60 ( $\omega$ - $\text{CH}_3_{\text{cis}}$ ), 16.10, 15.96, 15.93 (3 \*  $\text{CH}_3$  GG).

$\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_4$  (1182.67)

FAB-MS ( $m/z$ ):

ber.: 1182.6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 1204.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 1182.3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 1204.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (in 3-NBA-Matrix)

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl- $\text{N}^{(6)}$ -5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (56)**

(H-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe)

A: Zu einer Lösung von 50 mg (42  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe (**55**) in 0.56 ml trockenem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre 0.17 ml Diethylamin unter starkem Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2 h gerührt, dann zweimal mit je 40 ml Toluol und einmal mit 40 ml Chloroform codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann 1:2 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

B: Eine Lösung von 15 mg (13  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Cys(GG)-OMe in 2 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 6:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgt wie unter A beschrieben.

Ausbeute:           A: 41 mg (42  $\mu\text{mol}$ , 100 %);           B: 6.1 mg (6.4  $\mu\text{mol}$ , 50 %)  
eines gelbgrünen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.08 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: A: - 67.8 (*c* = 0.4, Dichlormethan); B: - 66.1 (*c* = 0.5, Dichlormethan)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 8.53 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.32 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.20 (dd, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.56 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.52 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.20 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.18-5.22 (m, 1H, CH GG), 5.08-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.67 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH Cys(GG)), 4.37 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz, 1H, α-CH Lys), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 4.0 Hz, 1H, α-CH Cys(*St*Bu)), 3.21 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.18 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.11 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 2.94 (dd, <sup>2</sup>*J* = 14.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.89 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.87 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub> Lys), 2.79 (dd, <sup>2</sup>*J* = 14.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.78 (dd, <sup>2</sup>*J* = 13.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 1.95-2.14 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.71-1.80 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Lys), 1.68 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (d, <sup>4</sup>*J* = 0.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.54-1.63 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Lys), 1.41-1.49 (m, 2H, δ-CH<sub>2</sub> Lys), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.31-1.38 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 173.60, 171.56, 171.12 (3 \* C=O), 151.62 (C-5 dansyl), 139.90, 135.19 (2 \* quart. C GG), 134.94 (C-1 dansyl), 134.75, 131.02 (2 \* quart. C GG), 129.94 (arom. CH dansyl), 129.67, 129.45 (C-9, C-10 dansyl), 129.00, 127.92 (2 \* arom. CH dansyl), 124.16, 123.97, 123.53 (3 \* CH GG), 122.99 (arom. CH dansyl), 119.24 (CH GG), 118.79, 114.99 (2 \* arom. CH dansyl), 54.03, 52.39, 52.20, 51.75 (3 \* α-CH, OCH<sub>3</sub>), 48.22 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.16 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.03 (β-CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 42.26 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 39.50, 39.48 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.46 (β-CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 31.35 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.57 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.44 (α-CH<sub>2</sub>), 28.71 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 26.53, 26.42, 26.29 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.40 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 21.88 (γ-CH<sub>2</sub> Lys), 17.39 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.85, 15.75, 15.72 (3 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>49</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub> (960.43)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 960.4835 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 960.4805 (in 3-NBA-Matrix)

### 6.3.2. Allgemeine Vorschrift für die Expressed Protein Ligation fluoreszenzmarkierter Lipopeptide und <sup>1-201</sup>Rab7-MESNA

#### *in vitro* Ligation:

- Lösung A : Peptid in Methanol/Acetonitril (30 mM)  
Lösung B : <sup>1-201</sup>Rab7-MESNA (*canis familiaris*) 20 mg/ml (900 µM) in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 100 µM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM GDP  
(Lösung C : 1 M MESNA (aq.))  
Lösung D : 200 mM CTAB (aq.)

Zu 400 µl der Proteinlösung B werden 200 µl der Detergenzlösung D und 100 µl der Peptidlösung A gegeben. Im Fall der Ligation unter reduktiven Bedingungen wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl C gestartet. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei Raumtemperatur oder 40° C leicht geschüttelt.

Endkonzentrationen der Reaktionsmischung:  
50 mM CTAB, (125 mM MESNA)

Eingesetzte Menge an Peptid bzw. Protein:  
3 µmol Peptid, 0.36 µmol <sup>1-201</sup>Rab7-MESNA

## 6.4. Versuche zu Kapitel 4.5.

### 6.4.1. Versuche zu Kapitel 4.5.1.

*N*<sup>(α)</sup>-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*<sup>(ε)</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysinallylester (59)  
(Fmoc-Lys(Boc)-OAll)

Unter Eiskühlung wird zu einer Lösung von 3.000 g (6.40 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-OH in 20 ml Methanol unter starkem Rühren eine Lösung von 1.022 g (3.14 mmol) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 10 ml Methanol getropft. Das Reaktionsgemisch wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt 15 h im Vakuum getrocknet. Unter Eiskühlung werden dann zu einer Lösung des

Rohprodukts in 20 ml Dimethylformamid 11.1 ml (128.04 mmol) Allylbromid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Allylbromid werden unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wird in 200 ml Ethylacetat/0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 1:1 (v/v) aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 2.228 g (4.38 mmol, 70 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 125-126° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.5 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 10.9 (c = 1.0, Ethanol)\*

\* Lit.<sup>[143]</sup>: - 10.3 (c = 1.12, Ethanol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.76 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.59-7.61 (m, 2H, Fmoc), 7.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.5, J = 0.5 Hz, 2H, Fmoc), 7.29-7.33 (m, 2H, Fmoc), 5.90 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.8 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.50 (d, <sup>3</sup>J = 8.0, 1H, NH), 5.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.64 (d, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> Oall), 4.35-4.44 (m, 3H, OCH<sub>2</sub> Fmoc, α-CH), 4.22 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.10-3.12 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.84-1.92 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.67-1.76 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub>), 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36-1.56 (m, 4H, δ-, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 171.83 (C=O), 155.78, 155.72 (2 \* OCONH), 143.64, 143.47, 141.03, 141.02 (4 \* arom. quart. C), 131.28 (CH=CH<sub>2</sub>), 127.48, 126.84, 124.89, 119.77, 119.75 (5 \* arom. CH), 118.80 (CH=CH<sub>2</sub>), 79.04 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.94, 65.91 (2 \* OCH<sub>2</sub>), 53.75 (α-CH), 47.14 (CH Fmoc), 40.05 (ε-CH<sub>2</sub>), 32.14 (β-CH<sub>2</sub>), 29.61 (δ-CH<sub>2</sub>), 28.46 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.43 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (508.61)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 509.2652 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 509.2659 (in 3-NBA-Matrix)



***N*<sup>(α)</sup>-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-lysinalylester**

(TFA \* Fmoc-Lys-OAll)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 1.000 g (1.97 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-OAll in 10 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 2.5 ml Trifluoressigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 0° C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch zweimaliges Codestillieren mit je 50 ml Toluol und einmaliges Codestillieren mit 50 ml Chloroform wird die Trifluoressigsäure entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird dreimal mit je 10 ml Cyclohexan gewaschen und 15 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.028 g (1.97 mmol, 100 %) eines leicht rötlichen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.09 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 3.4 (c = 1.0, Chloroform/Methanol 8:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.91 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.75-7.78 (m, 2H, Fmoc), 7.54 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 7.45 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.4, J = 1.2 Hz, 2H, Fmoc), 6.04 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.8 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.78 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.58 (dd, <sup>2</sup>J = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 1H, OCH<sub>2a</sub> Fmoc), 4.49 (dd, <sup>2</sup>J = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, OCH<sub>2b</sub> Fmoc), 4.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.4 Hz, 1H, α-CH) 4.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.02 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.97-2.06 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.74-1.91 (m, 3H, β-CH<sub>2b</sub>, δ-CH<sub>2</sub>), 1.53-1.64 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 171.68 (C=O), 161.04, 160.68 (CCF<sub>3</sub>), 156.41 (OCONH), 143.30, 143.17, 140.78 (3 \* arom. quart. C), 130.97 (CH=CH<sub>2</sub>), 128.46, 127.67 (CCF<sub>3</sub>), 127.24, 126.58, 124.56, 124.50, 119.46 (5 \* arom. CH), 118.25 (CH=CH<sub>2</sub>), 66.65, 65.72 (2 \* OCH<sub>2</sub>), 53.47 (α-CH), 46.83 (CH Fmoc), 38.96 (ε-CH<sub>2</sub>), 31.02 (β-CH<sub>2</sub>), 26.54 (δ-CH<sub>2</sub>), 22.24 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (522.51)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 409.2127 [M - TFA + H]<sup>+</sup>

gef.: 409.2141 (in 3-NBA-Matrix)

***N*<sup>(α)</sup>-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N*<sup>(ε)</sup>-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-L-lysinalylester (60)**

(Fmoc-Lys(NBD)-OAll)

Zu einer Lösung von 0.900 g (1.72 mmol) TFA\*Fmoc-Lys-OAll und 0.556 g (6.62 mmol) NaHCO<sub>3</sub> in 75 ml Acetonitril/Wasser 4:1 (v/v) wird eine Lösung von 0.516 g (2.58 mmol) 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylchlorid in 6 ml Acetonitril gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 80 ml Ethylacetat verdünnt und viermal mit je 30 ml halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 5:1 (v/v), dann 3:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 0.681 g (1.19 mmol, 69 %) eines rotbraunen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 69-72° C (unter Zersetzung)

R<sub>F</sub>-Wert: 0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 18.05 min (Gradientstartbedingungen: 80% A (H<sub>2</sub>O/HCO<sub>2</sub>H 99.9:9.1) und 20% B (CH<sub>3</sub>CN/ HCO<sub>2</sub>H 99.9:9.1) (0 min))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 8.0 (c = 0.2, Chloroform)\*

\* Aufgrund der starken Eigenfärbung der Lösung ist die Drehwertmessung nur bei geringer Konzentration möglich.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.40 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-6 NBD), 7.68-7.73 (m, 2H, Fmoc), 7.57 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.32-7.40 (m, 2H, Fmoc), 7.28 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 14.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2, J = 1.0 Hz, 2H, Fmoc), 6.65 (br, 1H, NH), 6.08 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-5 NBD), 5.90 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 16.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.53 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, NH), 5.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.66 (d, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.46 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.45-4.49 (m, 1H, α-CH), 4.19 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.38-3.50 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 1.90-2.01 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 1.73-1.85 (m, 3H, β-CH<sub>2b</sub>, δ-CH<sub>2</sub>), 1.51-1.66 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 171.60 (C=O), 156.08 (OCONH), 143.88, 143.63, 143.53, 143.24, 141.01 (5 \* quart. C), 136.25 (CH-6 NBD), 131.11 (CH=CH<sub>2</sub>), 127.60, 127.52, 126.89, 126.82, 124.81, 124.76 (6 \* arom. CH), 123.48 (C-7 NBD), 119.87, 119.80 (2 \* arom. CH), 119.11

(CH=CH<sub>2</sub>), 98.45 (CH-5 NBD), 67.16, 66.24 (2 \* OCH<sub>2</sub>), 53.14 (α-CH), 47.12 (CH Fmoc), 43.85 (ε-CH<sub>2</sub>), 32.88 (β-CH<sub>2</sub>), 27.36 (δ-CH<sub>2</sub>), 22.81 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (571.58)

FAB-MS (*m/z*): ber.: 572.2 [M + H]<sup>+</sup>, 594.2 [M + Na]<sup>+</sup>  
gef.: 572.1 [M + H]<sup>+</sup>, 594.1 [M + Na]<sup>+</sup> (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-L-lysinalylester**

(Fmoc-Cys(*S*tBu)-Lys(NBD)-OAll)

Eine Lösung von 170 mg (0.30 mmol) Fmoc-Lys(NBD)-OAll (**60**) in 6.0 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 4:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 4 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 80 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum über 15 h wird das erhaltene Rohprodukt mit 128 mg (0.30 mmol) Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH und 68 mg (0.45 mmol) HOBt in 40 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung werden unter Eiskühlung 68 mg (0.36 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 150 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 193 mg (0.253 mmol, 85 %) eines rotbraunen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 82-84° C (unter Zersetzung)

R<sub>F</sub>-Wert: 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 11.39 min

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 103.3 (*c* = 1.5, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.38 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, CH-6 NBD), 7.68 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc), 7.47-7.53 (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc), 7.34 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 2H, CH-3, -6 Fmoc), 7.24 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 2H, CH-2, -7 Fmoc), 6.99 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, 1H, <sup>(ω)</sup>NH Lys), 6.87 (br, 1H, <sup>(6)</sup>NH Lys), 6.05 (br, 1H, NH Cys), 6.02 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, CH-5 NBD), 5.89 (ddt, <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> = 16.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>vic</sub> = 5.6 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.32 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, 1H,

CH=CH<sub>2a</sub>), 5.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.67-4.73 (m, 1H, α-CH Lys), 4.65 (br, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.55-4.60 (m, 1H, α-CH Cys), 4.32-4.41 (m, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.17 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.27-3.41 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>), 3.22 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.08 (dd, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.89-2.02 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> Lys), 1.70-1.82 (m, 2H, δ-CH<sub>2</sub>), 1.46-1.59 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.83, 170.27 (2 \* C=O), 155.84 (OCONH), 143.90, 143.79, 143.64, 143.25, 143.19 (5 \* quart. C), 140.84 (arom. quart. C), 136.29 (CH-6 NBD), 131.05 (CH=CH<sub>2</sub>), 127.51, 126.83, 124.73 (3 \* arom. CH), 123.05 (C-7 NBD), 119.72 (arom. CH), 119.03 (CH=CH<sub>2</sub>), 98.42 (CH-5 NBD), 67.32, 66.21 (2 \* OCH<sub>2</sub>), 54.95 (α-CH), 51.77 (α-CH), 48.52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.90 (CH Fmoc), 43.80 (ε-CH<sub>2</sub>), 42.02 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 32.37 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.82 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.05 (δ-CH<sub>2</sub>), 22.69 (γ-CH<sub>2</sub>).

C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> (762.90)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 785.2403 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 785.2409 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-*L*-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-*L*-lysine (61)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(NBD)-OH)

Zu einer sorgfältig entgasten Lösung von 65.0 mg (85 μmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)Lys(NBD)-OAll in 6 ml trockenem Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 7.3 mg (47 μmol) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 2.0 mg (1.7 μmol) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2 h unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und durch Waschen mit Diethylether und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v), dann 10:1 (v/v), dann 5:1 (v/v), dann 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 49 mg (68 μmol, 80 %) eines rotbraunen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 128-130° C (unter Zersetzung)

R<sub>F</sub>-Wert: 0.27 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$t_R = 8.50$  min

$[\alpha]_D^{20}$ : - 58.2 ( $c = 1.25$ , Chloroform/Methanol 5:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.29$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-6 NBD), 7.64 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc), 7.53-7.55 (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc), 7.31 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, CH-3, -6 Fmoc), 7.23 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, CH-2, -7 Fmoc), 6.00 (br, 1H, CH-5 NBD), 4.50 (dd,  $^3J_1 = 7.6$  Hz,  $^3J_2 = 5.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.24-4.41 (m, 3H,  $\alpha$ -CH Lys,  $\text{OCH}_2$ ), 4.16 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 3.30 (br, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 3.17 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys), 3.07 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys), 1.91-1.99 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys), 1.63-1.81 (m, 3H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 1.43-1.53 (m, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ), 1.30 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 177.68$  ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 170.65 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 156.47 ( $\text{OCONH}$ ), 144.20, 144.09, 143.69, 143.12, 142.97 (5 \* quart. C), 140.74 (arom. quart. C), 136.56 (CH-6 NBD), 127.49, 126.79, 124.67 (3 \* arom. CH), 122.11 (C-7 NBD), 119.66 (arom. CH), 98.17 (CH-5 NBD), 67.43 ( $\text{OCH}_2$ ), 55.18 ( $\alpha$ -CH Cys), 53.90 ( $\alpha$ -CH Lys), 48.33 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 46.77 (CH Fmoc), 43.54 ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ), 42.12 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys), 32.46 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Lys), 29.64 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.17 ( $\delta$ - $\text{CH}_2$ ), 23.09 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ).

$\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  (722.83)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 722.2193 [M]

gef.: 722.2197 (in Triethanolamin-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (62)**

(Fmoc-Cys(*S*tBu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(*S*tBu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 38 mg (49  $\mu\text{mol}$ ) H-Ser-Cys(*S*tBu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**43**), 42 mg (52  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(*S*tBu)-Lys(dansyl)-OH (**54**) und 11 mg (74  $\mu\text{mol}$ ) HOBt in 25 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 11 mg (59  $\mu\text{mol}$ ) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 80 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 40 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und einmal mit 40 ml

gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 56 mg (36  $\mu\text{mol}$ , 74 %) eines hellen gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 206° C

$R_f$ -Wert: 0.63 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$t_R = 24.79$  min

$[\alpha]_D^{20}$ : + 56.0 ( $c = 1.0$ , Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.51$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.31 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.17 (dd,  $^3J = 7.4$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.76 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc), 7.59-7.63 (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc), 7.56 (dd,  $^3J_1 = 8.6$  Hz,  $^3J_2 = 7.8$  Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.50 (dd,  $^3J_1 = 8.6$  Hz,  $^3J_2 = 7.4$  Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.36-7.41 (m, 2H, CH-3, -6 Fmoc), 7.27-7.31 (m, 2H, CH-2, -7 Fmoc), 7.19 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.18-5.22 (m, 1H, CH GG), 5.08-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.73 (dd,  $^3J_1 = 8.8$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.67 (dd,  $^3J_1 = 7.8$  Hz,  $^3J_2 = 5.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.44-4.52 (m, 3H,  $\alpha$ -CH Ser,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu),  $\text{OCH}_{2a}$ ), 4.38 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.32-4.36 (m, 1H,  $\text{OCH}_{2b}$ ), 4.20-4.24 (m, 2H,  $\alpha$ -CH Lys,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 3.91 (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser), 3.81 (dd,  $^2J = 11.4$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser), 3.74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.00-3.28 (m, 6H,  $\alpha$ - $\text{CH}_2$ , 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(*St*Bu)), 2.95 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(GG)), 2.87 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.84-2.93 (m, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys), 2.81 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(GG)), 1.95 -2.12 (m, 12H, 6 \*  $\text{CH}_2$  GG), 1.71-1.83 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys), 1.68 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.67 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60-1.68 (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys), 1.60 (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ), 1.39-1.48 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$  Lys), 1.35 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.32 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 172.60$ , 171.70, 170.99, 170.82, 170.49, 170.03 (6 \* C=O), 156.63 (OCONH), 151.61 (C-5 dansyl), 143.47, 143.38, 141.02 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 139.85, 135.14 (2 \* quart. C GG), 134.89 (C-1 dansyl), 134.72, 131.02 (2 \* quart. C GG), 129.99 (CH-2 dansyl), 129.66, 129.39 (C-9, C-10 dansyl), 128.87 (CH-4 dansyl), 127.99 (CH-7 dansyl),

127.52 (CH-3,6 Fmoc), 126.92, 126.87 (CH-2, CH-7 Fmoc), 124.92, 124.89 (CH-1, CH-8 Fmoc), 124.14, 123.97, 123.57 (3 \* CH GG), 122.95 (CH-3 dansyl), 119.71 (CH-4,5 Fmoc), 119.24 (CH GG), 118.73 (CH-8 dansyl), 115.02 (CH-6 dansyl), 67.23 (OCH<sub>2</sub>), 61.94, 61.40 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.95 (α-CH Ser), 55.32 (α-CH Cys(*St*Bu)), 54.65 (α-CH Ser<sup>2</sup>), 54.15 (α-CH Lys), 53.13 (α-CH Cys(*St*Bu)), 52.31 (OCH<sub>3</sub>), 51.96 (α-CH Cys(GG)), 48.21, 48.03 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.78 (CH Fmoc), 45.12 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 41.96 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 41.38, 40.71 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 39.47 (C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.40 (β-CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 30.27 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.55 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.33 (α-CH<sub>2</sub>), 28.53 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 26.53, 26.42, 26.32 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.36 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 21.95 (γ-CH<sub>2</sub>), 17.36 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 15.81, 15.71, 15.69 (3 \* CH<sub>3</sub> GG).

C<sub>77</sub>H<sub>110</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>6</sub> (1548.14)

FAB-MS (*m/z*): ber.: 1547.7 [M + H]<sup>+</sup>, 1569.6 [M + Na]<sup>+</sup>, 1585.6 [M + K]<sup>+</sup>

gef.: 1548.3 [M + H]<sup>+</sup>, 1570.4 [M + Na]<sup>+</sup>

ESI-MS (*m/z*): gef.: 1547.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1569.7 [M + Na]<sup>+</sup>, 1585.6 [M + K]<sup>+</sup>

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-L-lysyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (63)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(NBD)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 16 mg (21 μmol) H-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**43**), 15 mg (21 μmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(NBD)-OH (**61**) und 6 mg (31 μmol) HOBt in 5 ml trockenem Dichlormethan wird unter Eiskühlung eine Lösung von 6 mg (25 μmol) EDC in 2 ml trockenem Dichlormethan getropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 20 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 20 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v), dann 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (10 μmol, 47 %) eines orangen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 154-160° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.55 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 20.39 min

$[\alpha]_D^{20}$ : + 10.1 ( $c = 0.775$ , Chloroform/Methanol 10:1 (v/v))\*

\* Der Drehwert stellte sich sehr schlecht ein.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v))\*:

$\delta = 8.41$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-6 NBD),  $7.73$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc),  $7.59$ -  
 $7.61$  (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc),  $7.38$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.6$  Hz, 1H, CH-3, -6 Fmoc),  $7.30$  (dd,  
 $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 1H, CH-2, -7 Fmoc),  $6.11$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-5 NBD),  $5.20$  (t,  
 $^3J = 7.6$  Hz, 1H, CH GG),  $5.07$ - $5.13$  (m, 3H, 3 \* CH GG),  $4.73$  (dd,  $^3J_1 = 8.8$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$   
 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)),  $4.67$  (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)),  $4.51$   
 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser),  $4.36$ - $4.49$  (m, 5H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu),  $\alpha$ -CH  
 Ser',  $\alpha$ -CH Lys,  $\text{OCH}_2$ ),  $4.22$  (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ),  $3.88$ - $3.95$  (m, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$   
 Ser),  $3.78$ - $3.84$  (m, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser),  $3.75$  (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $3.39$  (br, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys),  
 $3.21$ - $3.28$  (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(*St*Bu),  $\alpha$ - $\text{CH}_{2a}$ ),  $3.12$ - $3.17$  (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(*St*Bu)',  $\alpha$ -  
 $\text{CH}_{2b}$ ),  $3.07$  (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(*St*Bu)),  $3.03$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  
 $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(*St*Bu)'),  $2.97$  (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$   
 Cys(GG)),  $2.82$  (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(GG)),  $1.88$ - $2.14$  (m, 13H,  
 6 \*  $\text{CH}_2$  GG,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys),  $1.71$ - $1.82$  (m, 3H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys,  $\delta$ - $\text{CH}_2$  Lys),  $1.68$  (s, 6H, 2 \*  
 $\text{CH}_3$ ),  $1.60$  (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ),  $1.45$ - $1.57$  (m, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ),  $1.35$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $1.33$  (s, 9H,  
 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

\* NMR-Spektren mit guter Auflösung sind nur in großer Verdünnung messbar.

$\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_5$  (1477.94)

ESI-MS ( $m/z$ ): ber.:  $1477.6$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $1499.6$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.:  $1477.5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $1499.7$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$

FAB-MS ( $m/z$ ): gef.:  $1478.0$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $1500.1$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl- $N^{(6)}$ -5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-  
*tert*-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (64)**

(H-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 20 mg (13  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**62**) in 80  $\mu\text{l}$  trockenem Dichlormethan wird unter Argonatmosphäre 110  $\mu\text{l}$  trockenes Dichlormethan/Diethylamin 1:1 (v/v) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und dann einmal mit 40 ml Toluol und einmal mit 40 ml Chloroform codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt



säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (13  $\mu$ mol, 98 %) eines grüngelben Öls.

Schmelzpunkt: 170-171° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.58 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 65.8 (c = 0.325, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta$  = 8.53 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.31 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.19 (dd, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.21 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.19 (t, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, CH GG), 5.08-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)), 4.67 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.21 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.91 (dd, <sup>2</sup>J = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.76-3.81 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.0 Hz, 1H,  $\alpha$ -CH H-Cys(*StBu*)), 3.24 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*StBu*)), 3.18-3.28 (m, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>), 3.17 (dd, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.2 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> H-Cys(*StBu*)), 3.07-3.14 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*StBu*),  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>), 2.94 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.89 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.86-2.89 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 2.81 (dd, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 2.80 (dd, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> H-Cys(*StBu*)), 1.95-2.12 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.71-1.80 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Lys), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60-1.68 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Lys), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.37-1.49 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v))\*:

$\delta$  = 172.7, 171.0, 170.8 (3 \* C=O), 151.7 (C-5 dansyl), 139.8, 135.1 (2 \* quart. C GG), 134.7 (C-1 dansyl), 134.4, 131.1 (2 \* quart. C GG), 130.5 (CH-2 dansyl), 129.6 (arom. quart. C), 129.5 (CH-4 dansyl), 128.4 (CH-7 dansyl), 124.2 (CH GG), 123.3 (CH-3 dansyl), 119.6 (CH GG), 119.1 (CH-8 dansyl), 115.4 (CH-6 dansyl), 61.9 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 55.6 ( $\alpha$ -CH Ser), 55.4 ( $\alpha$ -CH Ser'), 53.9 ( $\alpha$ -CH H-Cys(*StBu*)), 53.8 ( $\alpha$ -CH Lys), 53.2 ( $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)), 52.5 (OCH<sub>3</sub>), 52.2 ( $\alpha$ -CH Cys(GG)), 48.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),

45.3 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> H-Cys(*St*Bu)), 42.5 ( $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 40.8 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 39.7 (C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.7 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 31.5 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 29.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.7 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 28.5 ( $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 26.7 (CH<sub>2</sub>CH GG), 25.7 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> *trans*), 22.2 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 17.7 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> *cis*), 15.9 (CH<sub>3</sub> GG).

\* Berechnet aus 2-dimensionalen NMR-Spektren.

C<sub>62</sub>H<sub>100</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S<sub>6</sub> (1325.90)

FAB-MS (*m/z*): ber.: 1325.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1347.6 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 1324.8 [M + H]<sup>+</sup>, 1346.8 [M + Na]<sup>+</sup>

ESI-MS (*m/z*): gef.: 1325.5 [M + H]<sup>+</sup>

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl-N<sup>( $\epsilon$ )</sup>-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-L-lysyl-L-seryl-*S*-tert-butylthio-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (65)**

(H-Cys(*St*Bu)-Lys(NBD)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Eine Lösung von 8 mg (5.4  $\mu$ mol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(NBD)-Ser-Cys(*St*Bu)-Ser-Cys(GG)-OMe (**63**) in 0.50 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 3:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt und dann einmal mit 40 ml Toluol und einmal mit 40 ml Chloroform codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel, das zuvor mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v) + 1 % Dimethylethylamin, dann Dichlormethan/ Methanol 30:1 (v/v), dann Dichlormethan vorbehandelt wird, mit Dichlormethan und dann Dichlormethan/Methanol 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Anschließend wird das Produkt in 30 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 20 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 6.5 mg (5.1  $\mu$ mol, 95 %) \* eines grüngelben Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.50 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

\* Mit oxidiertem Produkt verunreinigt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta$  = 8.51 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-6 NBD), 6.25 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, CH-5 NBD), 5.20 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.15 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.72 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.6

Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)), 4.67 (dd,  $^3J_1 = 7.4$  Hz,  $^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.51 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.45 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.34-4.36 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.88-3.93 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.79-3.83 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 4.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH H-Cys), 3.53 (br, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 3.21-3.28 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*StBu*),  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>), 3.10-3.16 ( $\beta$ -CH<sub>2a</sub> H-Cys,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>), 3.09 (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 9.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*StBu*)), 2.97 (dd,  $^2J = 14.4$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.89 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> H-Cys), 2.82 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.89-2.13 (m, 13H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Lys), 1.72-1.87 (m, 3H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.68 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.50-1.60 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

C<sub>56</sub>H<sub>90</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>S<sub>5</sub> (1255.70)

ESI-MS (*m/z*): ber.: 1255.5 [M + H]<sup>+</sup>, 1271.5 [M(O) + H]<sup>+</sup>, 1287.5 [M(O)<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup>  
gef.: 1255.4 [M + H]<sup>+</sup>, 1271.4 [M(O) + H]<sup>+</sup>, 1287.3 [M(O)<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup>

#### 6.4.2. Versuche zu Kapitel 4.5.2.1.

##### ***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-seryl-S-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cystein (Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-OH)**

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 5.000 g (15.27 mmol) Fmoc-Ser-OH und 1.758 g (15.27 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 200 ml trockenem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre 3.309 g (16.04 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und direkt für die weitere Umsetzung verwendet.

Unter Ultraschall werden 6.008 g (15.27 mmol) H-Cys(Mmt)-OH in 250 ml Wasser/1,4-Dioxan 2.5:1 (v/v) 30 min suspendiert. Anschließend werden erst 1.283 g (15.27 mmol) NaHCO<sub>3</sub>, und dann eine Lösung des rohen Fmoc-Ser-OSu (15.27 mmol) in 50 ml 1,4-Dioxan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1 N Salzsäure auf pH 1-2 angesäuert und dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt

wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 5.966 g (8.49 mmol, 55 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 81-83° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.20 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 8.2 (c = 1.0, Methanol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.71 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.51-7.55 (m, 2H, Fmoc), 7.32-7.34 (m, 6H, 2 \* CH Fmoc, 4 \* CH Mmt), 7.15-7.24 (m, 8H, 2 \* CH Fmoc, 6 \* CH Mmt), 7.09-7.12 (m, 2H, Mmt), 6.71 (d, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, 2H, Mmt), 6.16 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.26-4.36 (m, 2H, 2 \* α-CH), 4.29 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.12 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.77-3.82 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.59 (dd, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 2.74 (dd, <sup>2</sup>J = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 2.64 (dd, <sup>2</sup>J = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 172.82 (CO<sub>2</sub>H), 170.13 (C=O), 158.03 (arom. quart. C Mmt), 156.47 (OCONH), 144.38, 144.35 (2 \* arom. quart. C Mmt), 143.68, 143.56, 141.08 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 136.06 (arom. quart. C Mmt), 130.58, 129.25, 127.93 (3 \* arom. CH Mmt), 127.62, 127.04 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.75 (arom. CH Mmt), 125.13 (arom. CH Fmoc), 119.81 (arom. CH Fmoc), 113.20 (arom. CH Mmt), 67.40 (OCH<sub>2</sub>), 66.62 (quart. C Mmt), 62.81 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.51 (α-CH Ser), 55.05 (OCH<sub>3</sub>), 51.76 (α-CH Cys), 46.83 (CH Fmoc), 32.86 (β-CH<sub>2</sub> Cys).

C<sub>41</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (702.82)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 703.2478 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 703.2462 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-L-serinallylester (66)**

(Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-Ser-OAll)

Zu einer Lösung von 4.641 g (6.60 mmol) Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-OH und 1.516 g (9.90 mmol) HOBT in 60 ml trockenem Dichlormethan wird eine Lösung von 2.515 g (7.92 mmol) TosOH

\* H-Ser-OAll und 1.656 ml (11.88 mmol) trockenem Triethylamin in 20 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Anschließend wird unter Eiskühlung eine Lösung von 1.518 g (7.92 mmol) EDC in 20 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 200 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 (v/v), dann 1:3 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3.514 g (4.23 mmol, 64 %) eines weißen Feststoffs.  
Schmelzpunkt: 83° C  
R<sub>f</sub>-Wert: 0.47 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 8.6 (c = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.59-7.62 (m, 2H, Fmoc), 7.38-7.42 (m, 6H, 2 \* CH Fmoc, 4 \* CH Mmt), 7.26-7.33 (m, 8H, 2 \* CH Fmoc, 6 \* CH Mmt), 7.18-7.21 (m, 2H, Mmt), 6.82 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, Mmt), 5.88 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.31 (dd, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, <sup>2</sup>J = 1.4 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 4.63 (d, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 3.4 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.39 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.21 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 4.16-4.19 (m, 1H, α-CH Ser'), 4.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.86-3.90 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.81 (dd, <sup>2</sup>J = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.77-3.80 (m, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 (dd, <sup>2</sup>J = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser'), 2.74 (dd, <sup>2</sup>J = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 2.65 (dd, <sup>2</sup>J = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.83, 170.02, 169.70 (3 \* C=O), 158.21 (arom. quart. C Mmt), 156.14 (OCONH), 144.53, 144.50 (2 \* arom. quart. C Mmt), 143.71, 143.55, 141.22 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 136.21 (arom. quart. C Mmt), 131.26 (CH=CH<sub>2</sub>), 130.67, 129.35, 128.04 (3 \* arom. CH Mmt), 127.70, 127.07 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.84 (arom. CH Mmt), 125.06 (arom. CH Fmoc), 119.93 (arom. CH Fmoc), 118.88 (CH=CH<sub>2</sub>), 113.34 (arom. CH Mmt), 67.35 (OCH<sub>2</sub> Fmoc), 66.86 (quart. C Mmt), 66.28 (OCH<sub>2</sub> OAll), 63.04, 62.44 (2 \* β-CH<sub>2</sub>

Ser), 55.64, 55.17, 54.89 (2 \*  $\alpha$ -CH, OCH<sub>3</sub>), 52.83 ( $\alpha$ -CH), 47.00 (CH Fmoc), 32.81 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys).

C<sub>47</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S (829.96)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 830.3111 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 830.3130 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-4-methoxyphenyl-diphenylmethyl-L-cysteyl-L-serin**

(Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-Ser-OH)

Zu einer sorgfältig entgasten Lösung von 500 mg (0.60 mmol) Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-Ser-OAll (**66**) in trockenem Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 52 mg (0.33 mmol) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 14 mg (12  $\mu$ mol) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 326 mg (0.41 mmol, 69 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 133° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.13 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 9.6 (*c* = 0.5, Methanol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta$  = 7.71 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.52-7.56 (m, 2H, Fmoc), 7.31-7.36 (m, 6H, 2 \* CH Fmoc, 4 \* CH Mmt), 7.19-7.26 (m, 8H, 2 \* CH Fmoc, 6 \* CH Mmt), 7.12-7.15 (m, 2H, Mmt), 6.74 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, Mmt), 4.26-4.34 (m, 4H, 2 \*  $\alpha$ -CH Ser, OCH<sub>2</sub>), 4.18 (br, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.10 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.86 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.8 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.79 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.66-3.73 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser'), 2.75 (dd, <sup>2</sup>*J* = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys), 2.62 (dd, <sup>2</sup>*J* = 12.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 5.2 Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 172.24 (CO<sub>2</sub>H), 171.16, 170.25 (2 \* C=O), 158.06 (arom. quart. C Mmt), 156.38 (OCONH), 144.50, 144.45 (2 \* arom. quart. C Mmt), 143.62, 143.49, 141.10 (3 \* arom.

quart. C Fmoc), 136.20 (arom. quart. C Mmt), 130.60, 129.30, 127.94 (3 \* arom. CH Mmt), 127.63, 127.03 (2 \* arom. CH Fmoc), 126.75 (arom. CH Mmt), 125.64 (arom. CH Fmoc), 119.82 (arom. CH Fmoc), 113.25 (arom. CH Mmt), 67.43 (OCH<sub>2</sub>), 66.71 (quart. C Mmt), 62.76, 62.10 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.80, 55.07, 54.78 (2 \* α-CH, OCH<sub>3</sub>), 52.78 (α-CH), 46.83 (CH Fmoc), 32.69 (β-CH<sub>2</sub> Cys).

C<sub>44</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S (789.89)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 812.2618 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 812.2643 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-L-cysteyl-L-serinallylester (67)**

(Fmoc-Ser-Cys-Ser-OAll)

Bei Raumtemperatur werden zu einer Lösung von 200 mg (0.24 mmol) Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-Ser-OAll (**66**) in 5.0 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan (v/v) unter Argonatmosphäre 0.38 ml (2.41 mmol) Et<sub>3</sub>SiH gegeben, wobei sich die zuvor orange Lösung langsam zu entfärben beginnt. Nach 30 min bei Raumtemperatur werden nochmals 5 ml einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan (v/v) und 0.19 ml (1.21 mmol) Et<sub>3</sub>SiH zugegeben, und das Reaktionsgemisch wird weitere 20 min gerührt. Der farblose Ansatz wird zweimal mit 40 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum getrocknet, in Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 (v/v) suspendiert, auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und mit Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) gewaschen. Die vollständig ausgefallene Substanz wird von der Säule genommen, mit 40 ml Ethanol/Dichlormethan 1:1 (v/v) versetzt, und die Suspension wird filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 117 mg (0.21 mmol, 87 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 188-191° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.62 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -12.8 (*c* = 1.0, Tetrahydrofuran)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, THF-d<sup>8</sup>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.69 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.56-7.59 (m, 2H, Fmoc), 7.26 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.19 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 2H, Fmoc), 5.82 (ddt, <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>cis</sub> =

10.4 Hz,  $^3J_{\text{vic}} = 5.4$  Hz, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$ ), 5.23 (ddt,  $^3J_{\text{trans}} = 17.2$  Hz,  $^2J = 1.6$  Hz,  $^4J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_{2\text{a}}$ ), 5.08 (ddt,  $^3J_{\text{cis}} = 10.6$  Hz,  $^2J = ^4J = 1.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_{2\text{b}}$ ), 4.50-4.55 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.52 (ddd,  $^3J = 5.6$  Hz,  $J = 1.6$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.44 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.20-4.28 (m, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.11-4.14 (m, 2H,  $\alpha$ -CH Ser',  $\underline{\text{C}}\text{HCH}_2\text{O}$  Fmoc), 3.78 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.66-3.72 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.63 (dd,  $^2J = 10.8$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser'), 2.82 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys), 2.76 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, THF-d<sup>8</sup>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta = 172.10, 171.03, 170.53$  (3 \* C=O), 157.64 (OCONH), 145.06, 144.93, 142.17, 142.16 (4 \* arom. quart. C), 133.13 ( $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$ ), 128.38, 127.83, 127.81, 126.04, 125.97, 120.60 (6 \* arom. CH), 118.06 ( $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 67.90 (OCH<sub>2</sub> Fmoc), 66.50 (OCH<sub>2</sub> OAll), 63.21, 62.63 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 58.07 ( $\alpha$ -CH), 56.33, 56.21 (2 \*  $\alpha$ -CH), 48.29 (CH Fmoc), 26.98 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys).

C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (557.62)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 580.1730 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 580.1705 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-serinallylester (69)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-OAll)

Unter Eiskühlung wird zu einer Lösung von 45 mg (0.08 mmol) Fmoc-Ser-Cys-Ser-OAll (**67**) und 53 mg (0.24 mmol) Zn(OAc)<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O in 2 ml Dimethylformamid/Acetonitril/0.025% Trifluoressigsäure (aq.) 2:1:1 (v/v/v) eine Lösung von 77 mg (0.22 mmol) GGBr (**39**) in 0.5 ml DMF über 10 min gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 53 mg (0.24 mmol) Zn(OAc)<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O versetzt, weitere 15 h gerührt und dann mit 40 ml Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wird mit 20 ml Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:1 (v/v), dann 60:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (0.02 mmol, 23 %) eines weißen Feststoffs.

Weitere Daten: s. 6.4.3.



***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-serin (70)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-OH)

Zu einer Lösung von 28.0 mg (35  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Ser-Cys(Mmt)-Ser-OH in 5 ml einer 1.5%igen Lösung von Trifluoressigsäure in trockenem Dichlormethan werden 60  $\mu\text{l}$  (0.4 mmol)  $\text{Et}_3\text{SiH}$  gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Diethylether verdünnt, und die organische Phase wird zweimal mit je 20 ml 1 N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit je 20 ml Diethylether gewaschen, mit 1 N HCl auf pH 1 angesäuert und dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, und das Lösungsmittel wird durch Codestillation mit 20 ml Toluol unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird unter Eiskühlung in 2 ml einer 2 N Lösung von Ammoniak in Methanol gelöst. Bei  $-15^\circ\text{C}$  wird eine Lösung von 22.0 mg (71  $\mu\text{mol}$ ) GGCl (**40**) in 0.5 ml trockenem Tetrahydrofuran zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei  $-15^\circ\text{C}$  und 2 h unter Eiskühlung gerührt und anschließend zweimal mit je 20 ml Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 8:1 (v/v), dann 5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 5.8 mg (7  $\mu\text{mol}$ , 23 %) eines weißen Feststoffs.

Weitere Daten: s. 6.4.3.

**6.4.3. Versuche zu Kapitel 4.5.2.2.*****S*-Geranylgeranyl-L-cystein (78)**

(H-Cys(GG)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu 271 mg (1.72 mmol) HCl \* H-Cys-OH unter Argonatmosphäre 10 ml einer 2 N  $\text{NH}_3$ /Methanol-Lösung gegeben. Anschließend wird bei  $0^\circ\text{C}$  eine Lösung von 531 mg (1.72 mmol) rohem GGCl in 2 ml trockenem Tetrahydrofuran zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 3.5 h bei  $0^\circ\text{C}$  und 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf 80 ml  $0^\circ\text{C}$  kaltes Toluol gegeben und codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet, und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 15:1 (v/v), dann 10:1 (v/v), dann 8:1 (v/v), dann 5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 591 mg (1.50 mmol, 87 %) eines weißen Feststoffs.  
 Schmelzpunkt: 163-166° C  
 R<sub>f</sub>-Wert: 0.18 (Dichlormethan/Methanol 7:1 (v/v))  
 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 12.0 (c = 0.2, Methanol)\*

\* Die Drehwertmessung ist aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz nur bei geringer Konzentration möglich.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ = 5.21 (tq, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz, 1H, CH GG), 5.00-5.07 (m, 3H, 3 \* CH GG), 3.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 3.6 Hz, 1H, α-CH), 3.14-3.25 (m, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.17 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 3.07 (dd, <sup>2</sup>J = 14.8 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub>), 2.77 (dd, <sup>2</sup>J = 14.6 Hz, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub>), 1.88-2.08 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (d, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.52 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 173.31 (C=O), 140.98, 136.28, 135.91, 132.10 (4 \* quart. C), 125.51, 125.21, 121.12 (3 \* CH), 55.39 (α-CH), 40.91, 40.84, 40.81 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 34.08 (β-CH<sub>2</sub>), 30.32 (α-CH<sub>2</sub>), 27.87, 27.66, 27.54 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG GG), 25.94 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 17.80 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.34, 16.16 (2 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>S (393.63)

Hochaufgelöstes FAB-MS (m/z): ber.: 394.2780 [M + H]<sup>+</sup>  
 gef.: 394.2809 (in Glycerin-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cystein (73)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-OH)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 3.000 g (9.17 mmol) Fmoc-Ser-OH und 1.055 g (9.17 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 15 ml trockenem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre 1.986 g (9.62 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° C gekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum getrocknet und direkt für weitere Umsetzungen verwendet.

In 60 ml trockenem Dichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) werden 390 mg (0.99 mmol) H-Cys(GG)-OH (**78**) gelöst. Unter Eiskühlung werden 0.15 ml (1.09 mmol) trockenes Triethylamin und anschließend eine Lösung von 630 mg (1.49 mmol) Fmoc-Ser-OSu in 2 ml

trockenem Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1.5 h unter Eiskühlung und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wieder auf 0° C gekühlt und zur Vervollständigung der Reaktion mit weiteren 570 mg (1.34 mmol) Fmoc-Ser-OSu und 0.09 ml (0.66 mmol) trockenem Triethylamin versetzt. Nach 6 h bei 0° C und dann 15 h bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 40 ml Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird in je 40 ml Diethylether und 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 40 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden dann mit 40 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat, dann Ethylacetat/Methanol 20:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 305 mg (0.43 mmol, 44 %) \* eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 100-101° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.30 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 25.8 (c = 1.2, Methanol)

\* In kleineren Ansätzen 75 % Ausbeute.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.61-7.64 (m, 2H, Fmoc), 7.70 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, <1H, NH), 7.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 6.38 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, <1H, NH), 5.21 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.40 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.30 (br, 1H, α-CH Ser), 4.24 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.92 (dd, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.71 (dd, <sup>2</sup>J = 11.4 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.23 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.16 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 3.03 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 2.87 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.96-2.12 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 172.52 (CO<sub>2</sub>H), 170.77 (C=O), 156.40 (OCONH), 143.55, 143.42, 141.00 (3 \* arom. quart. C), 139.79, 135.07, 134.65, 130.94 (4 \* quart. C GG), 127.45, 126.82, 124.77 (3 \* arom. CH), 124.09, 123.93, 123.51 (3 \* CH GG), 119.66 (arom. CH), 119.21 (CH GG), 66.99 (OCH<sub>2</sub>), 62.32 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.86 (α-CH Ser), 51.96 (α-CH Cys), 46.81 (CH

Fmoc), 39.42, 39.39, 39.36 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.53 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.51 (α-CH<sub>2</sub>), 26.46, 26.34, 26.20 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.26 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 17.25 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 15.66, 15.59 (2 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S (702.94)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 701.3624 [M - H]<sup>-</sup>

gef.: 701.3635 (in Triethanolamin-Matrix)

***N*<sup>(α)</sup>-*tert*-Butyloxycarbonyl-L-seryl-*S-tert*-butylthio-L-cysteinmethylester**

(Boc-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe)

Zu einer Lösung von 0.735 g (3.58 mmol) Boc-Ser-OH und 0.800 g (3.58 mmol) H-Cys(*St*Bu)-OMe in 30 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 1.418 g (5.73 mmol) EEDQ gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 40 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 (v/v), dann 1:1 (v/v), dann 1:2 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.352 g (3.29 mmol, 92 %) eines farblosen Öls.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 23.4 (c = 1.0, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.42 (d, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 1H, NH), 5.60 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.86 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3</sub> = 4.6 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.26 (br, 1H, α-CH Ser), 4.07 (dd, <sup>2</sup>J = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.69 (dd, <sup>2</sup>J = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.22 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.14 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> *St*Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 171.21, 170.72 (2 \* C=O), 155.90 (OCONH), 80.46 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 62.97 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.14 (α-CH Ser), 52.75 (α-CH Cys), 52.18 (OCH<sub>3</sub>), 48.26 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> *St*Bu), 41.55 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.71 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> *St*Bu), 28.27 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc).

C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (410.55)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 433.1443 [M + Na]<sup>+</sup>, 411.1624 [M + H]<sup>+</sup>  
gef.: 433.1450, 411.1613 (in 3-NBA-Matrix)

### L-Seryl-S-*tert*-butylthio-L-cysteinmethylester-hydrotrifluoacetat (76)

(TFA\*H-Ser-Cys(*t*Bu)-OMe)

Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung von 0.800 g (1.95 mmol) Boc-Ser-Cys(*t*Bu)-OMe und 0.46 ml (3.90 mmol) Thioanisol in 4.0 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre 1.6 ml Trifluoressigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0° C und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch zweimaliges Codestillieren mit je 30 ml Toluol und einmaliges Codestillieren mit Chloroform wird die Trifluoressigsäure entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml Diethylether und fünfmaliges Waschen mit je 10 ml Cyclohexan gereinigt.

Ausbeute: 0.655 g (1.54 mmol, 79 %) eines farblosen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 136° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.07 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 74.8 (*c* = 1.0, Methanol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 4.82 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.4 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.07 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.6 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.01 (dd, <sup>2</sup>J = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.86 (dd, <sup>2</sup>J = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.20 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 3.07 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 170.56, 166.98 (2 \* C=O), 60.30 (β-CH<sub>2</sub> Ser), 54.51, 52.39, 51.93 (2 \* α-CH, OCH<sub>3</sub>), 47.93 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.75 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.35 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (424.46)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 311.1099 [M - TFA + H]<sup>+</sup>  
gef.: 311.1093 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-tert-butylthio-L-cysteinmethylester**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe)

Zu einer Lösung von 93 mg (0.13 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GG)-OH (**73**), 56 mg (0.13 mmol) TFA·H-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe (**76**), 55 µl (0.40 mmol) trockenem Triethylamin und 30 mg (0.20 mmol) HOBt in 15 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 30 mg (0.16 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 60 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 87 mg (0.09 mmol, 66 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 174° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.62 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 18.49 min

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 22.6 (c = 0.5, Chloroform)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc), 7.62-7.64 (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc), 7.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 2H, CH-3, -6 Fmoc), 7.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 2H, CH-2, -7 Fmoc), 5.23 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.79 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH Cys(*St*Bu)), 4.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH Cys(GG)), 4.53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.40 (d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.0 Hz, 1H, α-CH Ser'), 4.23 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.88-3.92 (m, 2H, 2 \* β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.74-3.81 (m, 2H, 2 \* β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.21 (d, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 3.18 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.11 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 3.01 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.87 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.96-2.11 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.67 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 171.27, 170.69, 170.56, 170.04$  (4 \* C=O), 156.38 (OCONH), 143.40, 143.28, 140.90 (3 \* arom. quart. C), 139.79, 134.90, 134.48, 130.77 (4 \* quart. C GG), 127.36 (CH-3,6 Fmoc), 126.71 (CH-2,7 Fmoc), 124.65 (CH-1,8 Fmoc), 123.98, 123.82, 123.41 (3 \* CH GG), 119.55 (CH-4 Fmoc), 118.99 (CH GG), 66.88 ( $\text{OCH}_2$ ), 62.07, 61.51 (2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Ser), 55.86, 54.95 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 53.03 ( $\alpha$ -CH Cys(GG)), 52.17 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.75 ( $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 47.80 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 46.67 (CH Fmoc), 40.91 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(*St*Bu)), 39.30, 39.27, 39.24 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 32.06 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(GG)), 29.31 ( $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), 29.25 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 26.32, 26.20, 26.08 (3 \*  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH GG}$ ), 25.09 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  trans), 17.08 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  cis), 15.57, 15.44, 15.42 (3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_3$  (995.36)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 995.4696  $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 995.4675 (in 3-NBA-Matrix)

### **L-Seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-tert-butylthio-L-cysteinmethylester (77)**

(H-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe)

Zu einer Lösung von 56 mg (56  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe in 0.96 ml trockenem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre 0.64 ml trockenes Dichlormethan/Diethylamin 1:1 (v/v) unter starkem Rühren tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 3 h gerührt und dann zweimal mit je 30 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v), dann 20:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 28.6 mg (37.0  $\mu\text{mol}$ , 66 %) eines farblosen Öls.

$R_f$ -Wert: 0.21 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : - 35.0 ( $c = 0.5$ , Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v))

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 5.23$ - $5.27$  (m, 1H, CH GG), 5.08- $5.14$  (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.78 (dd,  $^3J_1 = 7.2$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.56 (dd,  $^3J_1 = 7.6$  Hz,  $^3J_2 = 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.51 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 3.91 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser), 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.75- $3.81$  (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  H-Ser),

3.70 (dd,  $^2J = 10.8$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> H-Ser), 3.52 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH H-Ser), 3.24 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 3.18 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*StBu*)), 3.11 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*StBu*)), 3.00 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.86 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.95-2.13 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (d,  $^4J = 0.8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta = 174.36, 170.83, 170.65, 170.15$  (4 \* C=O), 139.93, 135.07, 134.63, 130.91 (4 \* quart. C GG), 124.06, 123.90, 123.48, 119.06 (4 \* CH GG), 64.05 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> H-Ser), 61.57 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 55.73, 54.88 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 52.90 ( $\alpha$ -CH Cys(GG)), 52.31 (OCH<sub>3</sub>), 51.85 ( $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)), 47.89 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.01 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(*StBu*)), 39.40, 39.39, 39.36 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.46 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 29.45 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 29.39 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.43, 26.33, 26.21 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.23 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 17.22 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 15.73, 15.59, 15.56 (3 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>37</sub>H<sub>64</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub> (773.12)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 795.3835 [M + Na]<sup>+</sup>, 773.4015 [M + H]<sup>+</sup>  
gef.: 795.3844, 773.4000 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (78)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 40 mg (0.12 mmol) Fmoc-Ser-OH, 50 mg (0.12 mmol) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 28 mg (0.19 mmol) HOBt in 8 ml trockenem Dichlormethan wird unter Eiskühlung eine Lösung von 28 mg (0.15 mmol) EDC in 2 ml trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 60 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1.5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 65 mg (0.09 mmol, 74 %) eines farblosen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat 1.5:1 (v/v))

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 18.5 (*c* = 1.0, Chloroform)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta$  = 7.76 (d,  $^3J$  = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.60-7.64 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (ddd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 2H, Fmoc), 5.19 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.73 (dd,  $^3J_1 = 7.0$  Hz,  $^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.37-4.45 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.30 (br, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.24 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 3.90 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser), 3.75 ( $\text{OCH}_3$ ), 3.73 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser), 3.21 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2a}$ ), 3.12 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2b}$ ), 2.97 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys), 2.83 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys), 1.95-2.12 (m, 12H, 6 \*  $\text{CH}_2$  GG), 1.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.66 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (s, 9H, 3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 171.19, 170.78 (2 \*  $\text{C=O}$ ), 156.38 ( $\text{OCONH}$ ), 143.72, 143.59, 141.22 (3 \* arom. quart. C), 140.24, 135.37, 134.90, 131.18 (4 \* quart. C GG), 127.68, 127.03, 125.03 (3 \* arom. CH), 124.33, 124.12, 123.64 (3 \* CH GG), 119.93 (arom. CH), 119.22 (CH GG), 67.39 ( $\text{OCH}_2$ ), 63.07 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Ser), 55.54 ( $\alpha$ -CH Ser), 52.74 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.88 ( $\alpha$ -CH Cys), 47.04 (CH Fmoc), 39.66, 39.65, 39.58 (3 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 32.85 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys), 29.68 ( $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ), 26.72, 26.60, 26.43 (3 \*  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH GG GG}$ ), 25.64 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  trans), 17.63 ( $\omega$ - $\text{CH}_3$  cis), 16.09, 15.98, 15.96 (3 \*  $\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$  (716.97)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 717.3937  $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 717.3959 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-serinallylester***

**(69)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-OAll)

Zu einer Lösung von 232 mg (0.33 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GG)-OH (**73**), 76 mg (0.50 mmol) HOBt, 138  $\mu\text{l}$  (0.99 mmol) trockenem Triethylamin und 210 mg (0.66 mmol) TosOH \* H-Ser-OAll in 35 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 76 mg (0.40 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 150 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 50 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und einmal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene

Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:1 (v/v), dann 60:1 (v/v), dann 30:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 139 mg (0.17 mmol, 51 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 157° C

R<sub>F</sub>-Wert: 0.58 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 15.97 min

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 23.4 (c = 0.5, Chloroform/Methanol 3:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.60-7.62 (m, 2H, Fmoc), 7.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, J = 1.0 Hz, 2H, Fmoc), 5.91 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>vic</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J = 1.6 Hz, 1H, CH=CH<sub>2a</sub>), 5.25 (dd, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 10.4 Hz, <sup>2</sup>J = 1.2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2b</sub>), 5.22 (t (br), <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.12 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.66 (dd, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> OAll), 4.60-4.62 (m, 2H, α-CH Cys, α-CH Ser), 4.40 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub> Fmoc), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.2 Hz, 1H, α-CH Ser'), 4.23 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O Fmoc), 3.94 (dd, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser), 3.89-3.93 (m, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Ser'), 3.85 (dd, <sup>2</sup>J = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser), 3.69 (dd, <sup>2</sup>J = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Ser'), 3.22 (dd, <sup>2</sup>J = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, α-CH<sub>2a</sub>), 3.17 (dd, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, α-CH<sub>2b</sub>), 2.99 (dd, <sup>2</sup>J = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 1H, β-CH<sub>2a</sub> Cys), 2.85 (dd, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, β-CH<sub>2b</sub> Cys), 1.95-2.11 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 170.88, 170.51, 169.27 (3 \* C=O), 156.42 (OCONH), 143.30, 143.18, 140.77 (3 \* arom. quart. C), 139.38, 134.67, 134.27 (3 \* quart. C GG), 131.05 (CH=CH<sub>2</sub>), 130.52 (quart. C GG), 127.19, 126.54, 124.49 (3 \* arom. CH), 123.83, 123.70, 123.31 (3 \* CH GG), 119.36 (arom. CH), 119.07 (CH GG), 117.80 (CH=CH<sub>2</sub>), 66.71 (OCH<sub>2</sub> Fmoc), 65.59 (OCH<sub>2</sub> OAll), 61.81, 61.32 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 56.04, 54.54 (2 \* α-CH Ser), 52.44 (α-CH Cys), 46.56 (CH Fmoc), 39.15, 39.11, 39.07 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.03 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.17 (α-CH<sub>2</sub>), 26.17, 26.03, 25.91 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 24.82 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 16.80 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 15.27, 15.17, 15.15 (3 \* CH<sub>3</sub>).

$C_{47}H_{63}N_3O_8S$  (830.08)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 830.4414  $[M + H]^+$

gef.: 830.4399 (in 3-NBA-Matrix)

### ***N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-serin (70)***

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-OH)

Zu einer sorgfältig entgasten Lösung von 110 mg (0.13 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-All (**69**) in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran werden unter Argonatmosphäre 11 mg (0.07 mmol) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 3.1 mg (2.7  $\mu$ mol)  $Pd(PPh_3)_4$  gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 2.5 h unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird 15 h im Vakuum getrocknet und dann säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v), dann 10:1 (v/v), dann 5:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 99 mg (0.13 mmol, 95 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 156-158° C

$R_f$ -Wert: 0.05 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : - 15.9 ( $c = 1.0$ , Chloroform/Methanol 1:1 (v/v))

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3/CD_3OD$  10:1 (v/v)):

$\delta = 7.76$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc), 7.60-7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc), 7.31 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc), 5.22 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.64 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys), 4.53 (br, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.39 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $OCH_2$ ), 4.31 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.22 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H,  $CHCH_2O$ ), 3.95 (dd,  $^2J = 11.4$  Hz,  $^3J = 3.4$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2a}$  Ser), 3.83-3.92 (m, 2H,  $\beta$ - $CH_{2a}$  Ser',  $\beta$ - $CH_{2b}$  Ser), 3.73 (dd,  $^2J = 10.8$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2b}$  Ser'), 3.15-3.25 (m, 2H,  $\alpha$ - $CH_2$ ), 3.01 (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2a}$  Cys), 2.85 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $CH_{2b}$  Cys), 1.94-2.10 (m, 12H, 6 \*  $CH_2$  GG), 1.68 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.66 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.60 (s, 9H, 3 \*  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (100.7 MHz,  $CDCl_3/CD_3OD$  10:1 (v/v)):

$\delta = 175.29$  ( $CO_2H$ ), 170.97, 170.39 (2 \*  $C=O$ ), 156.37 ( $OCONH$ ), 143.31, 143.19, 140.76 (3 \* arom. quart. C), 139.33, 134.64, 134.24, 130.49 (4 \* quart. C GG), 127.16, 126.52, 124.48 (3 \* arom. CH), 123.80, 123.68, 123.31 (3 \* CH GG), 119.33 (arom. CH), 119.06

(CH GG), 66.67 (OCH<sub>2</sub>), 61.82, 61.45 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.98, 54.55 (2 \* α-CH Ser), 52.56 (α-CH Cys), 46.55 (CH Fmoc), 39.13, 39.10, 39.05 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.01 (β-CH<sub>2</sub> Cys), 29.14 (α-CH<sub>2</sub>), 26.16, 26.01, 25.88 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 24.77 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 16.74 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 15.21, 15.11, 15.09 (3 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>44</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (790.02)

Hochaufgelöstes FAB-MS (*m/z*): ber.: 788.3945 [M - H]<sup>-</sup>

gef.: 788.3967 (in Triethanolamin-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (79)**

(Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 99 mg (0.13 mmol) Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-OH (**70**), 62 mg (0.15 mmol) H-Cys(GG)-OMe (**42**) und 39 mg (0.25 mmol) HOBt in 15 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 36 mg (0.19 mmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 60 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 30 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:1 (v/v), dann 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 112 mg (0.10 mmol, 75 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 170-171° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.48 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 26.17 min

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 28.4 (*c* = 1.0, Chloroform/Methanol 1:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 7.77 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.61 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.40 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 7.32 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 2H, Fmoc), 5.22 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, CH GG), 5.20 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 1H, CH GG'), 5.07-5.12 (m, 6H, 6 \* CH GG), 4.67 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.59 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 6.4 Hz, 1H, α-CH Cys'), 4.51 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.40 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.32 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> =

$^3J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.22 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.89-3.95 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.67-3.76 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.23 (dd,  $^2J = 12.8$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>), 3.20 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>'), 3.12 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>), 2.95-3.02 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys), 2.88 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys), 2.82 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys'), 1.95-2.11 (m, 24H, 12 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.67 (s, 12H, 4 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 18H, 6 \* CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

$\delta = 171.32, 170.99, 170.63, 170.23$  (4 \* C=O), 156.32 (OCONH), 143.61, 143.48, 141.12 (3 \* arom. quart. C), 140.16, 140.09, 135.26, 135.23, 134.80, 134.79, 131.09 (7 \* quart. C GG), 127.60, 126.94, 124.89 (3 \* arom. CH), 124.21, 124.04, 124.02, 123.59, 123.58 (5 \* CH GG), 119.82 (arom. CH), 119.19, 119.11 (2 \* CH GG), 67.14 (OCH<sub>2</sub>), 62.52, 62.00 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 55.70, 54.96 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 53.24 ( $\alpha$ -CH Cys), 52.46 (OCH<sub>3</sub>), 52.03 ( $\alpha$ -CH Cys'), 46.91 (CH Fmoc), 39.55, 39.53, 39.49 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.46, 32.31 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys), 29.64, 29.42 (2 \*  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 26.59, 26.49, 26.48, 26.37, 26.35 (5 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.46 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 17.45 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 15.93, 15.91, 15.80, 15.78 (4 \* CH<sub>3</sub>).

C<sub>68</sub>H<sub>98</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> (1179.66)

FAB-MS (*m/z*): ber.: 1179.7 [M + H]<sup>+</sup>, 1201.7 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 1179.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1201.6 [M + Na]<sup>+</sup>

### **L-Seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (80)**

(H-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Eine Lösung von 50 mg (42  $\mu$ mol) Fmoc-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe (**79**) in 1.0 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 4:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 30 ml Toluol und einmal mit 30 ml Chloroform codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), dann Dichlormethan/Methanol 50:1 (v/v), dann 25:1 (v/v), dann 10:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 37 mg (39  $\mu$ mol, 92 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 96-97° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.18 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ : -27.5 (*c* = 0.75, Chloroform/Methanol 1:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 5.24$  (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H, CH GG),  $5.20$  (t,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, CH GG'),  $5.07$ - $5.13$  (m, 6H, 6 \* CH GG),  $4.68$  (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys),  $4.55$  (dd,  $^3J_1 = 6.2$  Hz,  $^3J_2 = 7.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys'),  $4.51$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser),  $3.98$  (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser),  $3.81$  (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser'),  $3.75$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $3.71$  (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser),  $3.66$  (dd,  $^2J = 10.8$  Hz,  $^3J = 6.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser'),  $3.51$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH H-Ser),  $3.21$ - $3.26$  (m, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>),  $3.22$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>'),  $3.12$  (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>),  $2.98$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys),  $2.97$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys'),  $2.89$  (dd,  $^2J = 13.6$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys),  $2.82$  (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys'),  $1.95$ - $2.12$  (m, 24H, 12 \* CH<sub>2</sub> GG),  $1.68$  (s, 12H, 4 \* CH<sub>3</sub>),  $1.60$  (s, 18H, 6 \* CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 174.79$  (CO<sub>2</sub>H), 171.04, 170.68, 170.32 (3 \* C=O), 140.26, 140.22, 135.36, 134.90, 131.19 (5 \* quart. C GG), 124.29, 124.10, 124.09, 123.64, 119.21 (5 \* CH GG), 64.66, 62.13 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Ser), 55.90, 54.83 (2 \*  $\alpha$ -CH Ser), 53.04 ( $\alpha$ -CH Cys), 52.59 (OCH<sub>3</sub>), 51.99 ( $\alpha$ -CH Cys'), 39.62, 39.59, 39.57 (3 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.72, 32.60 (2 \*  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Cys), 29.74, 29.51 (2 \*  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 26.67, 26.58, 26.56, 26.43 (4 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.56 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> trans), 17.56 ( $\omega$ -CH<sub>3</sub> cis), 16.06, 16.02, 15.91, 15.89 (4 \* CH<sub>3</sub>).

$\text{C}_{53}\text{H}_{88}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$  (957.42)

Hochaufgelöstes FAB-MS ( $m/z$ ): ber.: 979.5992 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 979.5970 (in 3-NBA-Matrix)

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteinmethylester (81)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe)

Zu einer Lösung von 14 mg (19  $\mu\text{mol}$ ) H-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*St*Bu)-OMe (77), 15 mg (19  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-OH (54) und 4 mg (28  $\mu\text{mol}$ ) HOBt in 8 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 4 mg (22  $\mu\text{mol}$ ) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 20 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 20 ml

gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 16 mg (10  $\mu\text{mol}$ , 55 %) eines hellen gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 187-190° C

$R_f$ -Wert: 0.55 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$t_R = 23.87$  min

$[\alpha]_D^{20}$ : + 23.6 ( $c = 0.5$ , Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.52$  (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.30 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.18 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.76 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, CH-4, -5 Fmoc), 7.60-7.64 (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc), 7.56 (dd,  $^3J_1 = 8.5$  Hz,  $^3J_2 = 7.5$  Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.50 (dd,  $^3J_1 = 8.5$  Hz,  $^3J_2 = 7.5$  Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.37-7.41 (m, 2H, CH-3, -6 Fmoc), 7.27-7.31 (m, 2H, CH-2, -7 Fmoc), 7.20 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.23 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, CH GG), 5.08-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.78 (dd,  $^3J_1 = 7.3$  Hz,  $^3J_2 = 5.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)), 4.59 (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 5.5$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.51 (dd,  $^3J_1 = 5.3$  Hz,  $^3J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.44-4.49 (m, 2H,  $\alpha$ -CH Cys(*St*Bu)', OCH<sub>2a</sub>), 4.41 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.34-4.36 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>), 4.20-4.25 (m, 2H,  $\alpha$ -CH Lys, CHCH<sub>2</sub>O), 3.89-3.94 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.79-3.83 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.15-3.25 (m, 4H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*St*Bu)), 3.09 (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)), 2.98-3.05 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG),  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*St*Bu)'), 2.88 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84-2.92 (m, 3H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)), 1.95 -2.11 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.68 (d,  $^3J = 1.0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.56-1.80 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.41-1.48 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.31 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 172.55$ , 171.64, 170.88, 170.80, 170.72, 170.06 (6 \* C=O), 156.60 (OCONH), 151.65 (C-5 dansyl), 143.51, 143.42, 141.06 (3 \* arom. quart. C Fmoc), 140.01, 135.15 (2 \* quart. C GG), 134.87 (C-1 dansyl), 134.74, 131.05 (2 \* quart. C GG), 130.03 (CH-2 dansyl), 129.69, 129.42 (C-9, C-10 dansyl), 128.92 (CH-4 dansyl), 128.02 (CH-7 dansyl),

127.55 (CH-3,6 Fmoc), 126.93, 126.91 (CH-2, CH-7 Fmoc), 124.92 (CH-1,8 Fmoc), 124.17, 124.01, 123.60 (3 \* CH GG), 122.98 (CH-3 dansyl), 119.74 (CH-4,5 Fmoc), 119.11 (CH GG), 118.74 (CH-8 dansyl), 115.05 (CH-6 dansyl), 67.26 (OCH<sub>2</sub>), 61.87, 61.49 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Ser), 55.90, 55.30 (2 \* α-CH Ser), 54.63 (α-CH Cys(*St*Bu)), 54.15 (α-CH Lys), 53.20 (α-CH Cys(GG)), 52.40 (OCH<sub>3</sub>), 51.93 (α-CH Cys(*St*Bu)), 48.24, 47.93 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.81 (CH Fmoc), 45.15 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 41.97 (ε-CH<sub>2</sub> Lys), 41.34, 41.22 (2 \* β-CH<sub>2</sub> Cys(*St*Bu)), 39.51, 39.47 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 32.22 (β-CH<sub>2</sub> Cys(GG)), 30.31 (β-CH<sub>2</sub> Lys), 29.56, 29.47 (2 \* C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.48 (α-CH<sub>2</sub>), 28.51 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 26.55, 26.47, 26.35 (3 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.40 (ω-CH<sub>3</sub> *trans*), 21.91 (γ-CH<sub>2</sub>), 17.39 (ω-CH<sub>3</sub> *cis*), 15.89, 15.74, 15.72 (3 \* CH<sub>3</sub> GG).

C<sub>77</sub>H<sub>110</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>6</sub> (1548.14)

ESI-MS (*m/z*): ber.: 1547.6 [M + H]<sup>+</sup>, 1569.6 [M + Na]<sup>+</sup>

gef.: 1547.4 [M + H]<sup>+</sup>, 1569.5 [M + Na]<sup>+</sup>

***N*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-*tert*-butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>(6)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (82)**

(Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Zu einer Lösung von 17 mg (21 μmol) Fmoc-Cys(*St*Bu)-Lys(dansyl)-OH (**54**), 20 mg (21 μmol) H-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe (**80**) und 4.8 mg (31.3 μmol) HOBt in 5 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 4.8 mg (25.1 μmol) EDC gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 40 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit je 20 ml 0.5 N Salzsäure, 0.5 N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit 20 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 100:1 (v/v), dann 40:1 (v/v) und anschließend durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (12 μmol, 56 %) eines hellen gelbgrünen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 196-198° C

R<sub>f</sub>-Wert: 0.37 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

t<sub>R</sub> = 29.59 min



$[\alpha]_D^{20}$ : - 6.6 ( $c = 0.5$ , Chloroform)

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.52$  (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H, CH-2 dansyl),  $8.30$  (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H, CH-8 dansyl),  $8.19$  (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, CH-4 dansyl),  $7.74$ - $7.77$  (m, 2H, CH-4, -5 Fmoc),  $7.58$ - $7.62$  (m, 2H, CH-1, -8 Fmoc),  $7.56$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 8.7$  Hz, 1H, CH-7 dansyl),  $7.49$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 7.8$  Hz, 1H, CH-3 dansyl),  $7.37$ - $7.41$  (m, 2H, CH-3, -6 Fmoc),  $7.27$ - $7.31$  (m, 2H, CH-2, -7 Fmoc),  $7.18$  (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H, CH-6 dansyl),  $5.22$  (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, CH GG),  $5.21$  (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, CH GG'),  $5.02$ - $5.13$  (m, 6H, 6 \* CH GG),  $4.71$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)),  $4.64$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)'),  $4.50$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 4.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser),  $4.49$ - $4.52$  (m, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)),  $4.42$ - $4.47$  (m, 2H,  $\alpha$ -CH Ser',  $\text{OCH}_{2a}$ ),  $4.34$ - $4.37$  (m, 1H,  $\text{OCH}_{2b}$ ),  $4.27$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 6.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys),  $4.21$  (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ),  $3.95$ - $3.99$  (m, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Ser),  $3.78$ - $3.83$  (m, 2H, 2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Ser),  $3.74$  (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $3.17$ - $3.24$  (m, 3H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2a}$ ,  $\alpha$ - $\text{CH}_2'$ ),  $3.13$ - $3.16$  (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(*StBu*)),  $3.11$  (dd,  $^2J = 13.5$  Hz,  $^3J = 6.9$  Hz, 1H,  $\alpha$ - $\text{CH}_{2b}$ ),  $3.04$ - $3.07$  (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(*StBu*),  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(GG)),  $2.95$  (dd,  $^2J = 14.4$  Hz,  $^3J = 4.2$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Cys(GG)'),  $2.85$ - $2.90$  (m, 3H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(GG)),  $2.88$  (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ),  $2.82$  (dd,  $^2J = 14.1$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Cys(GG)'),  $1.96$ - $2.11$  (m, 24H, 12 \*  $\text{CH}_2$  GG),  $1.76$ - $1.82$  (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2a}$  Lys),  $1.69$  (s, 6H, 2 \*  $\text{CH}_3$ ),  $1.67$ - $1.73$  (m, 1H,  $\beta$ - $\text{CH}_{2b}$  Lys),  $1.67$  (s, 6H, 2 \*  $\text{CH}_3$ ),  $1.61$  (s, 18H, 6 \*  $\text{CH}_3$ ),  $1.41$ - $1.50$  (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$  Lys),  $1.36$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 173.22$ ,  $172.37$ ,  $171.53$ ,  $171.45$ ,  $170.80$  (5 \* C=O),  $157.37$  (OCONH),  $144.14$ ,  $144.08$ ,  $141.67$  (3 \* arom. quart. C Fmoc),  $140.38$ ,  $140.30$  (2 \* quart. C GG),  $135.86$  (C-1 dansyl),  $135.61$ ,  $135.59$ ,  $135.20$ ,  $135.19$ ,  $131.44$  (5 \* quart. C GG),  $130.27$  (CH-2 dansyl),  $130.09$  (arom. quart. C dansyl),  $129.48$  (CH-4 dansyl),  $128.49$  (CH-7 dansyl),  $128.12$  (CH-3,6 Fmoc),  $127.51$ ,  $127.48$  (CH-2, CH-7 Fmoc),  $125.56$ ,  $125.51$  (CH-1, CH-8 Fmoc),  $124.77$ ,  $124.65$ ,  $124.64$ ,  $124.29$ ,  $124.27$  (5 \* CH GG),  $123.80$  (CH-3 dansyl),  $120.29$  (CH-4,5 Fmoc),  $120.09$  (CH GG),  $119.97$  (CH-8 dansyl),  $115.93$  (CH-6 dansyl),  $67.89$  ( $\text{OCH}_2$ ),  $62.55$ ,  $62.20$  (2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Ser),  $56.65$ ,  $56.31$  (2 \*  $\alpha$ -CH Ser),  $55.51$  ( $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)),  $54.90$  ( $\alpha$ -CH Lys),  $54.12$  ( $\alpha$ -CH Cys(GG)),  $52.96$  ( $\text{OCH}_3$ ),  $52.90$  ( $\alpha$ -CH Cys(GG)'),  $48.76$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $47.68$  (CH Fmoc),  $45.86$  ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ),  $42.88$  ( $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  Lys),  $42.23$  ( $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys (*StBu*)),  $40.32$ ,  $40.29$  (2 \*  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ ),  $33.10$ ,  $33.04$  (2 \*  $\beta$ - $\text{CH}_2$  Cys(GG)),  $31.26$  ( $\beta$ -

CH<sub>2</sub> Lys), 30.23 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.09 (α-CH<sub>2</sub>), 29.54 (δ-CH<sub>2</sub> Lys), 27.37, 27.24, 27.21, 27.14, 27.11 (5 \* CH<sub>2</sub>CH GG), 25.97 (ω-CH<sub>3</sub> trans), 23.00 (γ-CH<sub>2</sub>), 17.98 (ω-CH<sub>3</sub> cis), 16.56, 16.49, 16.38, 16.34 (4 \* CH<sub>3</sub> GG).

C<sub>93</sub>H<sub>134</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>S<sub>5</sub> (1732.44)

ESI-MS (*m/z*): ber.: 1731.9 [M + H]<sup>+</sup>

gef.: 1731.7 [M + H]<sup>+</sup>

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl-N<sup>(ε)</sup>-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-S-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-S-tert-butylthio-L-cysteinmethylester (83)**

(H-Cys(*StBu*)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*StBu*)-OMe)

Eine Lösung von 8.5 mg (5.5 μmol) Fmoc-Cys(*StBu*)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(*StBu*)-OMe (**81**) in 0.8 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 2:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 30 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel, das zuvor mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v) + 1 % Dimethylethylamin, dann Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v), dann Dichlormethan vorbehandelt wird, mit Dichlormethan und dann Dichlormethan/Methanol 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Anschließend wird das Produkt in 30 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 20 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 5.6 mg (4.2 μmol, 77 %) eines hellen gelbgrünen Öls.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.38 (Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: - 37.6 (c = 0.25, Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 10:1 (v/v)):

δ = 8.54 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-2 dansyl), 8.32 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, CH-8 dansyl), 8.19 (dd, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, CH-4 dansyl), 7.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH-7 dansyl), 7.54 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-3 dansyl), 7.23 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 1H, CH-6 dansyl), 5.23 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, CH GG), 5.07-5.13 (m, 3H, 3 \* CH GG), 4.78 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, α-CH Cys(*StBu*)), 4.59 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2</sub> = 6.0 Hz,

1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)), 4.51 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.43 (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'), 4.26 (dd,  $^3J_1 = 8.2$  Hz,  $^3J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 3.87-3.93 (m, 2H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser), 3.77-3.83 (m, 3H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser,  $\alpha$ -CH H-Cys(*S*tBu)), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.14-3.26 (m, 4H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*S*tBu)), 3.08 (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*S*tBu)), 2.99-3.04 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)), 2.90 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84-2.90 (m, 4H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG),  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> H-Cys(*S*tBu)), 1.95-2.13 (m, 12H, 6 \* CH<sub>2</sub> GG), 1.71-1.83 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.67 (s, 6H, 2 \* CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9H, 3 \* CH<sub>3</sub>), 1.37-1.52 (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.32 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

C<sub>62</sub>H<sub>100</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S<sub>6</sub> (1325.90)

ESI-MS (*m/z*):           ber.: 1325.6 [M + H]<sup>+</sup>  
                                   gef.: 1325.7 [M + H]<sup>+</sup>

***S*-tert-Butylthio-L-cysteyl-*N*<sup>( $\epsilon$ )-5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl-L-lysyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteyl-L-seryl-*S*-geranylgeranyl-L-cysteinmethylester (84)</sup>**

(H-Cys(*S*tBu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe)

Eine Lösung von 10.0 mg (5.8  $\mu$ mol) Fmoc-Cys(*S*tBu)-Lys(dansyl)-Ser-Cys(GG)-Ser-Cys(GG)-OMe (**82**) in 1.0 ml trockenem Dichlormethan/Diethylamin 2:1 (v/v) wird unter Argonatmosphäre 1.15 h bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit je 40 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel, das zuvor mit Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v) + 1 % Dimethylethylamin, dann Dichlormethan/Methanol 30:1 (v/v), dann Dichlormethan vorbehandelt wird, mit Dichlormethan und dann Dichlormethan/Methanol 15:1 (v/v) als Eluens gereinigt. Anschließend wird das Produkt in 30 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 20 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Produkt erhalten.

Ausbeute:           8.6 mg (5.7  $\mu$ mol, 99 %) eines hellen gelbgrünen Öls.  
 R<sub>f</sub>-Wert:           0.35 (Dichlormethan/Methanol 20:1 (v/v))  
 [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:         - 31.4 (*c* = 0.22, Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v))

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1 (v/v)):

$\delta = 8.53$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, CH-2 dansyl),  $8.31$  (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H, CH-8 dansyl),  $8.19$  (dd,  $^3J = 7.2$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, 1H, CH-4 dansyl),  $7.57$  (dd,  $^3J_1 = 8.8$  Hz,  $^3J_2 = 7.6$  Hz, 1H, CH-7 dansyl),  $7.53$  (dd,  $^3J_1 = 8.4$  Hz,  $^3J_2 = 7.2$  Hz, 1H, CH-3 dansyl),  $7.21$  (dd,  $^3J = 7.6$  Hz,  $J = 0.4$  Hz, 1H, CH-6 dansyl),  $5.22$  (t,  $^3J = 8.6$  Hz, 1H, CH GG),  $5.19$  (t,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H, CH GG'),  $5.07$ - $5.13$  (m, 6H, 6 \* CH GG),  $4.66$  (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)),  $4.59$  (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Cys(GG)'),  $4.51$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser),  $4.42$  (dd,  $^3J_1 = ^3J_2 = 5.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Ser'),  $4.24$  (dd,  $^3J_1 = 8.0$  Hz,  $^3J_2 = 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH Lys),  $3.92$  (dd,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 3.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser),  $3.90$  (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Ser'),  $3.75$ - $3.81$  (m, 3H, 2 \*  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Ser,  $\alpha$ -CH Cys(*StBu*)),  $3.74$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $3.16$ - $3.25$  (m, 4H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>,  $\alpha$ -CH<sub>2a</sub>',  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(*StBu*)),  $3.11$  (dd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 7.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH<sub>2b</sub>'),  $3.01$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)),  $2.94$  (dd,  $^2J = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2a</sub> Cys(GG)'),  $2.89$  (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),  $2.83$ - $2.89$  (m, 4H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG),  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(*StBu*)),  $2.80$  (dd,  $^2J = 14.0$  Hz,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2b</sub> Cys(GG)'),  $1.95$ - $2.13$  (m, 24H, 12 \* CH<sub>2</sub> GG),  $1.63$ - $1.78$  (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys),  $1.67$ - $1.68$  (4 \* s, 12H, 4 \* CH<sub>3</sub>),  $1.60$  (s, 18H, 6 \* CH<sub>3</sub>),  $1.39$ - $1.48$  (m, 4H,  $\delta$ -,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys),  $1.35$  (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

$\text{C}_{78}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_5$  (1510.20)

ESI-MS ( $m/z$ ):           ber.: 1509.8 [M + H]<sup>+</sup>  
                                  gef.: 1510.0 [M + H]<sup>+</sup>

## 6.5. Versuche zu Kapitel 4.6.

### Darstellung der semi-synthetischen Rab7-Proteine:

Allgemeine Vorschrift der *in vitro* Ligation:

Lösung A : Peptid in Methanol/Acetonitril (30-40 mM)

Lösung B :  $^{1-201}$ Rab7-MESNA (*canis familiaris*) 20 mg/ml (900  $\mu\text{M}$ ) in 10 mM  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5, 100  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  GDP

Lösung C : 1 M MESNA (aq.)

Lösung D : 200 mM CTAB (aq.)

Zu 400 µl der Proteinlösung B werden 200 µl der Detergenzlösung D und 100 µl der Peptidlösung A gegeben. Die Ligation wird durch Zugabe von 100 µl C gestartet, und die Reaktionsmischung wird 12 h bei Raumtemperatur oder 40° C leicht geschüttelt.

Endkonzentrationen der Reaktionsmischung:

50 mM CTAB, 125 mM MESNA

Eingesetzte Menge an Protein:

0.36 µmol <sup>1-201</sup>Rab7-MESNA

Eingesetzte Menge an Peptid:

8.5 mg (6.4 µmol) H-Cys(*St*Bu)Lys(dansyl)SerCys(*St*Bu)Ser-Cys(GG)-OMe (**64**)\*

5.0 mg (4.0 µmol) H-Cys(*St*Bu)Lys(NBD)SerCys(*St*Bu)Ser-Cys(GG)-OMe (**65**)

5.0 mg (3.8 µmol) H-Cys(*St*Bu)Lys(dansyl)SerCys(GG)Ser-Cys(*St*Bu)-OMe (**83**)

5.0 mg (3.8 µmol) H-Cys(*St*Bu)Lys(dansyl)SerCys(GG)Ser-Cys(GG)-OMe (**84**)

\* Der Ansatz wurde entsprechend einem Verhältnis von Protein zu Peptid von 1:10 Äquivalenten berechnet.

Nach Ende der Reaktion wird das präzipitierte Protein vom Überstand durch Zentrifugation (14 000 rpm, 2 min) abgetrennt. Das Präzipitat wird 5 x mit Dichlormethan, 2 x mit 20% Methanol in Ethylacetat, 2 x mit Methanol und 2 x mit Wasser gewaschen, (jeweils ca. 1.0 ml verbunden mit einer 10minütigen Inkubation bei 40° C).

### **Rückfaltung und Bildung des Rab7:REP-1 Komplexes:<sup>[127]</sup>**

Das erhaltene Proteinpellet wird in Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1 mM EDTA, 100 mM DTE und 1 % CHAPS) zu einer Konzentration von 0.2 mg/ml semi-synthetisches Protein bei 4° C über eine Stunde gelöst. Diese Lösung wird 20fach mit Rückfaltungspuffer (100 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM DTE, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM GDP, 1 % CHAPS und 10% Glycerin) verdünnt und 1 h bei 15° C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Äquivalent REP-1 wird die Lösung erneut 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 12 h gegen Dialysepuffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM GDP, 5 mM DTE, 20 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 10% Glycerin) dialysiert. Die erhaltene Lösung wird anschließend unter Verwendung einer Amicon-Filtrationseinheit konzentriert (Endkonzentration ca. 2 mg/ml).

Der Komplex aus semi-synthetischem Rab7 und REP-1 wird über Größenausschlusschromatographie an Superdex 200 (Laufpuffer: 25 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM GDP, 5 mM DTE, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25% Glycerin) gereinigt.

### Aufnahme von MALDI-TOF-Massenspektren

Die verwendeten Matrices und Geräteeinstellungen wurden je nach Molmasse der zu messenden Probensubstanz variiert.

(1) Für Messungen synthetisierter Peptide oder von Peptiden aus Proteinverdau wurde eine Matrixlösung aus 10 mg 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 1 ml 0.1 %iger wässriger TFA / Ethanol 10:1 (v/v) verwendet. Dabei wurde 1 µl Matrixlösung mit 1 µl Probenlösung gemischt. Die Messungen erfolgten im positiven Reflektor-Modus.

(2) Vor der Messung der Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden diese über eine Gelfiltration mittels Centriflex-Kartuschen (EdgeBioSystems) entsalzt. Für die Messungen wurde eine Matrixlösung aus 10 mg 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) in 1 ml 0.1 %iger wässriger TFA / Acetonitril 1:1 (v/v) verwendet. Dabei wurden 1 µl Matrixlösung und 1 µl Probenlösung gemischt. Die Messungen erfolgten im positiven linearen Modus.

Die Geräteeinstellungen sind in Tabelle 7 aufgeführt:

	Peptide	Proteine bis 30 kDa	Proteine bis 100 kDa
Beschleunigungs- spannung	20 000 V	25 000 V	25 000 V
Gitterspannung	93 %	93 %	91 %
<i>guide wire</i>	0.15 %	0.3 %	0.3 %
<i>extraction delay time</i>	350 ns	750 ns	1000 ns

**Tabelle 7:** Geräteeinstellungen des MALDI-TOF-Massenspektrometers.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] J. Folch, M. Lees, *J. Biol. Chem.* **1951**, *191*, 833-841.
- [2] P. Stoffyn, J. Folch-Pi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1971**, *44*, 157-161.
- [3] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16.
- [4] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245-261.
- [5] a) F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241-269. b) M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1484*, 93-106.
- [6] J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1996**, *274*, 255-259.
- [7] S. Chatterjee, S. Mayor, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1969-1987.
- [8] a) A. I. Magee, L. Gutierrez, I. A. McKay, C. J. Marshall, A. Hall, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3353-3357. b) J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23594-23600.
- [9] a) W. W. Epstein, D. Lever, L. M. Leining, E. Bruenger, H. C. Rilling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 9668-9670. b) P. J. Casey, P. A. Solski, C. J. Der, J. E. Buss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 8323-8327.
- [10] a) C. C. Farnsworth, M. H. Gelb, J. A. Glomset, *Science* **1990**, *247*, 320-322. b) H. C. Rilling, E. Bruenger, W. W. Epstein, P. F. Crain, *Science* **1990**, *247*, 318-320.
- [11] Y. Kamiya, A. Sakuai, S. Tamura, N. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *83*, 1077-1083.
- [12] a) S. L. Wolda, J. A. Glomset, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5997-6000. b) L. A. Beck, T. J. Hosick, M. J. Sinensky, *Cell Biol.* **1988**, *107*, 1307-1316.
- [13] G. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4454-4458.
- [14] S. D. Black, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *186*, 1437-1442.
- [15] C. C. Farnsworth, M. C. Seabra, L. H. Ericsson, M. H. Gelb, J. A. Glomset, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11963-11967.
- [16] a) T. E. Smeland, M. C. Seabra, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10712-10716. b) M. H. Gelb, Y. Reiss, F. Ghomashichi, C. C. Farnsworth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 881-886.
- [17] J. A. Glomset, M. H. Gelb, C. C. Farnsworth, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 139-142.
- [18] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 203-209.
- [19] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813-3822.
- [20] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133-139.

- [21] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*, 69-80.
- [22] Y. Kuroda, N. Suzuki, T. Kataoka, *Science* **1993**, *259*, 683-686.
- [23] Z. Buo, B. Diaz, M. S. Marshall, J. Avruch, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 46-53.
- [24] a) T. Soldati, M. A. Riederer, S. R. Pfeffer, *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 425-434. b) T. Musha, M. Kawata, Y. Takai, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9821-9825.
- [25] I. Rubio, U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward, R. Wetzker, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 70-82.
- [26] Hepler, Gilman, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 3-387.
- [27] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **1995**, S. 870-882.
- [28] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 153-208.
- [29] M. Geyer, A. Wittinghofer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 786-792.
- [30] A. Levitzky, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1-13.
- [31] J. B. Pereira-Leal, M. C. Seabra, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 1077-1087.
- [32] a) N. Segev, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 500-511. b) M. C. Seabra, Emilie H. Mules, A. N. Hume, *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 23-30.
- [33] Y. A. Chen, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 98-105.
- [34] T. Söllner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller, J. E. Rothman, *Cell* **1993**, *75*, 409-418.
- [35] a) M. Götte, G. F. von Mollard, *Trends in Cell Biol.* **1998**, *8*, 215-218. b) S. J. Scales, Y. A. Chen, B. Y. Yoo, S. M. Patel, Y.-C. Doung, R. H. Scheller, *Neuron* **2000**, *26*, 457-464.
- [36] M. Zerial, H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107-117.
- [37] a) F. Schimmöller, I. Simon, S. R. Pfeffer, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22161-22164. b) L. Gonzalez, Jr., R. H. Scheller, *Cell* **1999**, *96*, 755-758.
- [38] A. Echard, F. Jollivet, O. Martinez, J. Lacapère, A. Rousselet, I. Janoueix-Lerosey, B. Goud, *Science* **1998**, *279*, 580-585.
- [39] a) J. Pevsner, S.-C. Hsu, J. E. A. Braun, N. Calakos, A. E. Ting, M. K. Bennett, R. H. Scheller, *Neuron* **1994**, *13*, 353-361. b) K. M. S. Misura, R. H. Scheller, W. I. Weis, *Nature* **2000**, *404*, 355-362.
- [40] a) R. B. Sutton, K. D. Fasshauer, R. Jahn, A. T. Brunger, *Nature* **1998**, *395*, 347-353. b) R. Fukuda, J. A. McNew, T. Weber, F. Parlati, T. Engel, W. Nickel, J. E. Rothman, T. H. Söllner, *Nature* **2000**, *407*, 198-202.



- [41] A. Mayer, W. Wickner, A. Haas, *Cell* **1996**, *85*, 83-94.
- [42] A. B. Dirac-Svejstrup, T. Sumizawa, S. R. Pfeffer, *EMBO J.* **1997**, *16*, 465-472.
- [43] K. Alexandrov, I. Simon, V. Yurchenko, A. Iakovenko, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 160-170.
- [44] J. S. Anant, L. Desnoyers, M. Machius, B. Demeler, J. G. Hansen, K. D. Westover, J. Deisenhofer, M. C. Seabra, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12559-12568.
- [45] N. H. Thomä, A. Iakovenko, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48637-48643.
- [46] S. L. Morres, M. D. Schaber, S. D. Mosser, E. Rands, M. B. O'Hara, V. M. Garsky, M. S. Marshall, D. L. Pompliano, J. B. Gibbs, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14603-14610.
- [47] H. Zhang, M. C. Seabra, J. Deisenhofer, *Structure* **2000**, *8*, 241-251.
- [48] L. Desnoyers, M. C. Seabra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12266-12270.
- [49] F. Shen, M. C. Seabra, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3692-3698.
- [50] N. H. Thomä, A. Niculae, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48631-48636.
- [51] a) F. P. Cremers, S. A. Armstrong, M. C. Seabra, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2111-2117. b) M. C. Seabra, Y. K. Ho, J. S. Anant, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24420-24427.
- [52] J. C. Detter, Q. Zhang, E. H. Mules, E. K. Novak, V. S. Mischra, W. Li, E. B. McMurtie, V. T. Tchernev, M. R. Wallace, M. C. Seabra, R. T. Swank, S. F. Kingsmore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4144-4149.
- [53] P. D'Adamo, A. Menegon, C. L. Nigro, M. Grasso, M. Gulisano, F. Tamanini, T. Bienvenu, A. K. Gedeon, B. Oostra, S.-K. Wu, A. Tandon, F. Valtorta, W. E. Balch, J. Chelly, D. Toniolo, *Nature Genetics* **1998**, *19*, 134-139.
- [54] a) H. Zhao, T. Laitala-Leinonen, V. Parikka, H. K. Väänänen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39295-39302. b) H. Zhao, O. Ettala, H. K. Väänänen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, *293*, 1060-1065.
- [55] F. P. Coxon, M. H. Helfrich, B. Larijani, M. Muzylak, J. E. Dunford, D. Marshall, A. D. McKinnon, S. A. Nesbitt, M. A. Horton, M. C. Seabra, F. H. Ebetino, M. J. Rogers, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48213-48222.
- [56] M. Koppitz, T. Spellig, R. Kahmann, H. Kessler, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *48*, 377-390.
- [57] P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75-83.

- [58] E. Atherton, P. M. Hardy, D. E. Harris, B. H. Matthews, *Peptides* **1990**, 243-244.
- [59] C.-B. Xue, A. Ewenson, J. M. Becker, F. R. Naider, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *36*, 362-373.
- [60] a) F. Ghomashchi, X. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11910–11918.  
b) C.-B. Xue, J. M. Becker, F. R. Naider, *Tet. Lett.* **1992**, *33*, 1435-1438.
- [61] R. L. Edelstein, V. A. Weller, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5298-5299.
- [62] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954-5955.
- [63] a) F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, *43*, 3-14. b) D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Biochem.* **2000**, *1*, 144-169.
- [64] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *112*, 1067-1068.
- [65] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [66] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [67] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034-2040.
- [68] Modifiziert nach <http://www.daecr1.harvard.edu/cgi-bin/seminar.cgi> (J. Katz, *Evans Group Friday Seminar* **1998**).
- [69] a) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 282. b) Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307-4312.
- [70] H. Kuroda, Y.-N. Chen, T. Kimura, S. Sakakibara, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 294-299. b) T. Kimura, M. Takay, Y. Masui, T. Morikawa, S. Sakakibara, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1823-1832.
- [71] a) K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023-1035. b) Z. Xia, C. D. Smith, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5241-5244. c) D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1184-1193. d) H. Xie, Y. Shao, J. M. Becker, F. Naider, R. A. Gibbs, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8552-8563.
- [72] a) K. G. Waddick, F. M. Uckun, *Biochemical Pharmacology* **1998**, *56*, 1411-1426. b) R. A. Gibbs, T. J. Zahn, J. S. Seboldt-Leopold, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1437-1465.
- [73] Y. Q. Mu, C. A. Omer, R. A. Gibbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1817-1823.
- [74] Dolence, J.M, Poulter, C.D., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5008-5011.
- [75] C. M. Harris, C. D. Poulter, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 137-144.
- [76] J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014-3022.
- [77] H. Schröder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102-13109.

- [78] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239-1252.
- [79] I. Chaiken, S. Rose, R. Karlsson, *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 197-210.
- [80] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nägele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schröder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2334-2337.
- [81] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [82] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.
- [83] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [84] D. S. Kemp, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1793-1804.
- [85] a) J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers* **1999**, *51*, 311-332. b) J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, *60*, 194-205.
- [86] H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 375-386.
- [87] P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevans, *Science* **1990**, *250*, 651-657.
- [88] M.-Q. Xu, T. C. Evans Jr., *Methods* **2001**, *24*, 257-277.
- [89] T. Klabunde, S. Sharma, A. Telenti, W. R. Jacobs, J. C. Saccettini, *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 31-36.
- [90] B. W. Poland, M.-Q. Xu, F. A. Quioco, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16408-16413.
- [91] a) <http://www.neb.com/neb/products/pfp/6900.html>. b) T. C. Evans Jr., J. Benner, M.-Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, 2256-2264. c) T. C. Evans Jr., J. Benner, M.-Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18359-18363.
- [92] a) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705-6710. b) K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16205-16209.
- [93] T. C. Evans, Jr., M.-Q. Xu, *Biopolymers* **1999**, *51*, 333-342.
- [94] a) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 1831-1833. b) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 6554-6559.
- [95] a) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143. b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [96] D. A. Erlanson, M. Chytil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 981-991.
- [97] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421-5428.

- [98] a) R. S. Roy, O. Allen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 789-799. b) B. Ayers, U. K. Blaschke, J. A. Camarero, G. J. Cotton, M. Holford, T. W. Muir, *Biopolymers* **2000**, *51*, 343-354.
- [99] B. Bader, *Dissertation*, Universität Marburg **2000**.
- [100] a) D. Kadereit, *Dissertation*, Universität Karlsruhe **2000**. b) F. Eisele, *Dissertation*, Universität Dortmund **2000**.
- [101] J. Jones, *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, *Oxford Chemistry Primers*, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **1995**.
- [102] a) I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 198-221. b) J. Sakowski, M. Boehm, I. Sattler, H.-M. Dahse, M. Schlitzer, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886-2889. c) H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 1223-1233.
- [103] a) R. Ledger, F. H. C. Stewart, *Aust. J. Chem.* **1965**, *18*, 933-935. b) A. Crivici, G. Lajoie, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 49-53.
- [104] S. Wiejak, E. Masiukiewicz, B. Rzeszotarska, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1489-1490.
- [105] H. B. Cottam, H. Shih, L. R. Tehrani, D. B. Wasson, D. A. Carson, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2-9.
- [106] a) K. Burgess, S. E. Jacutin, D. Lim, A. Shitangkoon, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5165-5168. a) B. Qualmann, M. M. Kessels, H.-J. Musiol, W. D. Sierralta, P. W. Jungblut, L. Moroder, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 970-973, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 909-911.
- [107] G. W. Anderson, J. E. Zimmermann, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839-1842.
- [108] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651-1652.
- [109] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [110] A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 922-936.
- [111] H. Kunz, J. März, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1424-1425, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1375-1377.
- [112] a) B. Radetich, E. J. Corey, *Org. Letters* **2002**, *4*, 3463-3464. b) B. Radetich, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2430-2431. c) S. Bouzbouz, B. Kirschleger, *Synlett* **1994**, 763-764. d) S. Klinge, M. Demuth, *Synlett* **1993**, 783-784. e) E. J. Corey, W.-C. Shieh, *Tet. Lett.* **1992**, *33*, 6435-6438. f) B. M. Trost, L. Weber, P. Strege, T. J. Fullerton, T. J. Dietsche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3426-3435. g) R. M.

- Coates, D. A. Ley, P. L. Cavender, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4915-4922. h) L. J. Altman, L. Ash, S. Marson, *Synthesis* **1974**, 129-131.
- [113] E. E. v. Tamelen, R. G. Nadeau, *Bioorg. Chem.* **1982**, *11*, 197-218.
- [114] M. J. Brown, D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176-3177.
- [115] a) E. J. Corey, C. V. Kim, M. Taheeda, *Tet. Lett.* **1972**, *13*, 4339-4342. b) V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremler, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4768-4779.
- [116] a) E. Choy, M. Philips, *Method Enzymol.* **2001**, *332*, 50-64. b) T. Krämer, *Dissertation* **2002**, Universität Dortmund. c) D. Owen und J. Kuhlmann, persönliche Mitteilung.
- [117] Die Verkürzung der cDNA des Volllängen-Rab7 wurde unter der Erzeugung der Mutanten <sup>1-204</sup>Rab7S204C durch die Einführung des Cys-Codons in Position 204 und Stop-Codons in Position 205 nach Standardmethoden der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt: J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbour Laboratory Press, **1989**. Das PCR-Produkt wurde in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert. Die Proteinexpression in *E. coli* sowie die Reinigung folgte Standardmethoden.
- [118] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, **1996**.
- [119] A. Rak und K. Alexandrov, persönliche Mitteilung.
- [120] L. Gutierrez, A. I. Magee, C. J. Marshall, J. F. Hancock, *EMBO J.* **1989**, *8*, 1093-1098.
- [121] C. Bordier, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1604-1607.
- [122] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [123] J. P. Tam, C.-R. Wu, W. Liu, J.-W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657-6662.
- [124] K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, N. Koch, S. Koutsogianni, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1996**, *47*, 148-153.
- [125] a) K. Barlos, D. Papaioannou, D. Theodoropoulos, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1324-1326. b) P. Mamos, K. Barlos, C. Sanida, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1083. c) K. Barlos, P. Mamos, D. Papaioannou, S. Patrianakou, C. Sanida, W. Schafer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 1025.
- [126] A. Iakovenko, E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thomä, R. S. Goody, K. Alexandrov, *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 155-158.
- [127] T. Durek, *geplante Dissertation*, Universität Dortmund.
- [128] E. De Bernardez Clark, *Curr. Opin. Biotech.* **1998**, *9*, 157-163.

- [129] J. D. Wade, M. N. Mathieu, M. Macris, G. W. Tregear, *Lett. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 107-112.
- [130] X. Bu, G. Xie, C. W. Law, Z. Guo, *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 2419-2422.
- [131] S. Funakoshi, N. Fujii, K. Akaji, H. Irie, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 2151.
- [132] a) M. Cadene, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5655-5658. b) N. Zhang, A. Doucette, L. Li, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2968-2975.
- [133] S. A. Armstrong, M. S. Brown, J. L. Goldstein, M. C. Seabra, *Methods Enzymol.* **1995**, *257*, 30-41.
- [134] S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Nature* **2002**, *419*, 645-650.
- [135] P. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 1-13.
- [136] N. H. Thomä, A. Iakovenko, A. Kalinin, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2001**, *40*, 268-274.
- [137] K. Alexandrov, L. Brunsveld, T. Durek, A. Rak, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [138] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [139] D. D. Perrin, W. L. F. Amarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3<sup>rd</sup> Ed., Pergamon, Oxford, **1988**.
- [140] V. Sidorovitch, A. Niculae, A. C. Ceacareanu, K. Alexandrov, *Prot. Expr. Pur.* **2002**, *26*, 50-58.
- [141] A. Kalinin, N. H. Thomä, A. Iakovenko, I. Heinemann, E. Rostkova, A. T. Constantinescu, K. Alexandrov, *Prot. Expr. Pur.* **2001**, *22*, 84-91.
- [142] C. W. Parker, T. J. Yoo, M. C. Johnson, S. M. Godt, *Biochemistry* **1967**, *6*, 3408-3411.
- [143] C. M. Taylor, C. A. Weir, C.A., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1414-1421.

## 8. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

All	Allyl
Aloc	Allyloxycarbonyl
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
Bn	Benzoyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
C	$C = m_{\text{Bisacrylamid}} \times (m_{\text{Acrylamid}} + m_{\text{Bisacrylamid}})^{-1}$ in % (w/w)
Cbz	Benzyloxycarbonyl-
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
dansyl	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMB	Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DME	1,2-Dimethoxyethan
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EI-MS	<i>electron impact</i> -Massenspektrometrie
EE	Essigester = Essigsäureethylester
FAB-MS	<i>fast atom bombardment</i> -Massenspektrometrie
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTase	Farnesyltransferase

GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden
GEF	<i>Guanidinin nucleotide exchange factor</i>
GG	Geranylgeranyl
GGTaseI/GGTaseII	Geranylgeranyltransferase Typ I/II
ges.	gesättigt
GTP	Guanosintriphosphat
HAc	Essigsäure
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
Hd	Hexadecyl
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HODhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Hz	Hertz
IPTG	Isopropylgalaktosid
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight-</i> Massenspektrometrie
mant	<i>N</i> -Methylanthranyl
Me	Methyl
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz
MIC	Maleinimidocaproyl
Mmt	<i>para</i> -Methoxytrityl
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitoyl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
quart	quartär
$R_f$	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
REP	<i>rab escort protein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
T	$T = (m_{\text{Acrylamid}} + m_{\text{Bisacrylamid}}) \times V^{-1}$ in % (w/w)
TAA	Thioacetamid



---

tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TMS-	Trimethylsilyl
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
verd.	verdünnt
wt	<i>wild type</i>

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

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung in den letzten Jahren die Anfertigung dieser Arbeit sehr erleichtert haben:

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung und die stete Förderung dieser Arbeit.

Dr. Kirill Alexandrov und Thomas Durek danke ich herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Synthese der Proteinkonjugate und für die Bereitstellung vorgestellter biologischer Ergebnisse.

Meinen langjährigen Laborgenossinnen und -genossen, Jantje Mareike Gerdes, Patrick Hugo Deck, Norman Kuder, Stefanie Schlummer und Elke Simon, danke ich, wie Patrick es unübertroffen ausdrückte, für die hervorragende Stimmung und den hohen Unterhaltungswert am Arbeitsplatz. Besonders Jantje sei zudem herzlichst für ihre Freundschaft und unvergessliche Diskussionen über fachliche und andere Dinge gedankt. Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und den Kollegen des Max-Planck-Instituts Dortmund möchte ich mich für die gute Atmosphäre, die fruchtbaren Gespräche und die vielen Anlässe des netten Beisammenseins bedanken.

Thomas Durek, Dr. Karsten Kuhn, Carsten Peters, Stefanie Schlummer und Martin Völkert danke ich für die kritische und zügige Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen der Universitäten Karlsruhe und Dortmund danke ich für die Durchführung der Analysen und die Messung der Spektren. Sandra Eichhorn, Dörte Göhrke, Dr. Petra Janning und Christiane Vornweg danke ich für die unermüdliche Aufnahme von Massenspektren.

Beim Fonds der Chemischen Industrie bedanke ich mich für die Gewährung eines Kekulé-Stipendiums.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich für ihre finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums und für ihren fortwährenden Beistand.

Mein ganz besonderer Dank gilt abschließend Karsten für seine Geduld, seine Tipps und seine Unterstützung.

## Lebenslauf

Name: Ines Heinemann  
Geboren: am 14. Juni 1971 in Eckernförde  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

08/1978-06/1982 Grundschule Gettorf  
08/1982-06/1991 Humboldt-Gymnasium in Kiel  
08.06.1991 Abitur

### Studium:

10/1991-09/1998 Studium der Biologie und der Chemie (LA/Gym.) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
04/1993-09/1997 Studium der Chemie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
14.09.1993 Zwischenprüfung (Biologie)  
19.05.1995 Vordiplom (Chemie)  
01.11.1996 Vordiplom (Biologie)  
02/1997-09/1997 Diplomarbeit (Chemie) unter der Betreuung von Prof. Dr. Werner Tochtermann: „Synthese neuer makrocyclischer Moschusriechstoffe aus 10-Undecensäure und 1, $\omega$ -Diolen“  
23.09.1997 Diplom (Chemie)  
01/1998-09/1998 Diplomarbeit (Biologie) unter der Betreuung von Prof. Dr. Jürgen Soll: „Proteine und Proteinkomplexe der Plastidenhüllmembranen“  
29.09.1998 Diplom (Biologie)

### Promotion:

11/1998- Anfertigung der Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH), ab 05/2000 an der Universität Dortmund und ab 09/2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund: „Synthese und biologische Evaluierung semi-synthetischer Rab7-Proteine“  
05/2003 Promotion

**Dortmund, im Mai 2003**